

DEPARTAMENT DE CIRURGIA

ANÁLISIS DE VEGF-A Y HIF-1 α EN EL PRONÓSTICO DE
LOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE CÁNCER DE
PULMÓN NO MICROCÍTICO TRATADOS CON CIRUGÍA
MEDIANTE EXÉRESIS REGLAMENTARIA Y
LINFADENECTOMÍA.

ANTONIO FRANCISCO HONGUERO MARTÍNEZ

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2011

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 11 de març de 2011 davant un tribunal format per:

- Dr. Juan Cortijo Gimeno
- Dr. Rafael Jiménez Merchán
- Dr. Jordi Freixinet Gilart
- Dr. Gustavo Juan Samper

Va ser dirigida per:

Dr. Carlos Camps Herrero

Dr. Antonio Arnau Obrer

Dr. Rafael Sirera Pérez

Dr. Ricardo Guijarro Jorge

©Copyright: Servei de Publicacions
Antonio Francisco Honguero Martínez

Dipòsit legal: V-498-2012

I.S.B.N.: 978-84-370-8147-2

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115

TESIS DOCTORAL

Presentada por Antonio Francisco Honguero Martínez

Dirigida por los doctores: Carlos Camps Herrero
 Antonio Arnau Obrer
 Rafael Sirera Pérez
 Ricardo Guijarro Jorge

ANÁLISIS DE VEGF-A Y HIF-1 α EN EL PRONÓSTICO DE LOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO TRATADOS CON CIRUGÍA MEDIANTE EXÉRESIS REGLAMENTARIA Y LINFADENECTOMÍA.

Departamento de Cirugía

Universidad de Valencia

Valencia, 2010

D. Ricardo Guijarro Jorge, Profesor Titular de Cirugía y jefe de Servicio de Cirugía Torácica del Hospital General Universitario de Valencia,

D. Antonio Arnau Obrer, Profesor Asociado de Cirugía Torácica de la facultad de Medicina de Valencia y jefe clínico del Servicio de Cirugía Torácica del Hospital General Universitario de Valencia,

D. Carlos Camps Herrero, jefe de Servicio de Oncología Médica del Hospital General Universitario de Valencia,

D. Rafael Sirera Pérez, Profesor Asociado de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia y biólogo del Laboratorio de Oncología Molecular de la Fundación para la Investigación del Hospital General Universitario de Valencia

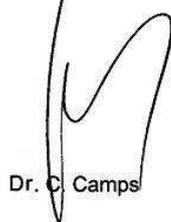
CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “Análisis de VEGF-A y HIF-1 α en el pronóstico de los pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón no microcítico tratados con cirugía mediante exéresis reglamentaria y linfadenectomía”, ha sido realizada por **D. Antonio Francisco Honguero Martínez**, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de Valencia, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Valencia.

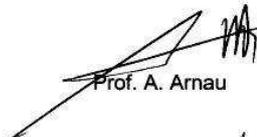
En Valencia, a 25 de Junio de 2010



Prof. R. Guijarro



Dr. C. Camps



Prof. A. Arnau



Prof. R. Sirera

A mi mujer María José
y a mis hijas María y Elena,
por todo el tiempo que les robé.
Con todo mi cariño.

Agradecimientos.

Tras todo el trabajo que conlleva la realización de un estudio para la tesis doctoral, una vez finalizado, miro hacia atrás y pienso que el esfuerzo mereció la pena y que siempre conté con el apoyo de personas que lo hicieron posible.

Quisiera dar las gracias a Andrea Cabrera Pastor por la paciencia que mostró con sus explicaciones, por las correcciones que me hizo sobre la metodología y por su inestimable ayuda con el trabajo de laboratorio.

También agradecer a mis directores de tesis, los doctores Carlos Camps Herrero y Rafael Sirera Pérez, la ayuda y el ánimo que me dieron para seguir adelante con este estudio.

Agradecer a los doctores Antonio Arnau Obrer y Ricardo Guijarro Jorge (también directores de esta tesis) por las horas, meses y años que pasamos juntos durante mi formación como residente de Cirugía Torácica en el Hospital General Universitario de Valencia. Fue con ellos y con sus compañeros de trabajo, el doctor Alfonso Fernández Centeno y el doctor Antonio Cantó Armengod, a quienes debo mis inicios en el mundo de la Cirugía Torácica. Destacar el análisis y la visión crítica sobre el trabajo científico que me inculcó el que fue mi tutor, el Dr. Arnau.

Por último, agradezco a mis padres la oportunidad que me ofrecieron para hacer posible que llegase hasta aquí y, en especial, le doy las gracias enormemente a mi mujer, María José, por su gran comprensión, por la alegría que transmite y por su amor.

Muchas gracias a todos.

INDICE

Abreviaturas	pág	7
1.- Introducción		9
1.1.- Epidemiología		10
1.2.- Anatomía, mapa ganglionar y T N M		16
1.3.- Estadificación del cáncer de pulmón		25
1.3.1- pruebas de imágenes		25
1.3.2- pruebas endoscópicas		27
1.3.3- pruebas quirúrgicas		30
1.4.- Cirugía del cáncer de pulmón		33
1.5.- Angiogénesis		40
1.6.- Hipoxia y fisiopatología. HIF-1 α		44
1.7.- VEGF		48
1.8.- Marcadores tumorales y biología molecular en el cáncer de pulmón		52
2.- Hipótesis y objetivos		59
3.- Pacientes y método		61
3.1.- Criterios de inclusión		62
3.2.- Criterios de exclusión		63
3.3.- Evaluación preoperatoria		63
3.4.- Procedimiento quirúrgico		65
3.5.- Seguimiento de los pacientes		66
3.6.- Variables de estudio		67
3.7.- Análisis estadístico		68
3.8.- Procesamiento de las muestras tisulares		69
3.8.1.- Recogida de las muestras de tejido		69
3.8.2.- Extracción del ARN		70

3.8.3.- Análisis cuantitativo y cualitativo del ARN.....	72
a.- Conversión del ARN a cDNA (retrotranscripción).....	75
b.- PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR).....	76
c.- Parámetros de la RT-PCR.....	81
4.- Resultados.....	84
4.1.- Resultados del análisis comparativo entre los pacientes operados en el Consortio Hospital General Universitario de Valencia y en el Hospital General Universitario de Albacete.....	85
4.2.- Estadística descriptiva.....	88
4.3.- Relación entre las características clinicopatológicas y la recidiva tumoral, el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia.....	97
4.4.- Relación del HIF-1 α y del VEGF-A con las características clinicopatológicas, la recidiva tumoral, la supervivencia y el periodo libre de enfermedad.....	105
4.5.- Factores pronóstico de supervivencia.....	119
4.6.- Factores pronóstico del tiempo libre de enfermedad tumoral.....	120
5.- Discusión.....	121
6.- Conclusiones.....	136
7.- Bibliografía.....	138

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosina trifosfato
BAL	lavado broncoalveolar (<i>bronchoalveolar lavage</i>)
BAS	aspirado broncoalveolar (<i>bronchoalveolar aspirate</i>)
cDNA	ADN complementario sintetizado utilizando ARN como molde
CPNCP	cáncer de pulmón no-célula pequeña
CTP	citidina trifostato
DM	diabetes mellitus
dNTP	desoxinucleótidos trifosfato
dTTP	desoxitimidina trifosfato
dUTP	desoxiuridina trifosfato
EBUS	ecografía endobronquial (<i>endobronchial ultrasound</i>)
EPOC	enfermedad pulmonar obstructiva crónica
EUS-FNA	ecografía endoscópica con PAAF
FEV1	volumen expiratorio forzado en el primer segundo
FEV1ppo	FEV1 predictivo postoperatorio
GTP	guanosina trifosfato
HTA	hipertensión arterial
HIF-1 α	factor inducible por la hipoxia 1 alpha
HRE	elementos sensibles a la hipoxia

mRNA	ARN mensajero
NF-κB	factor nuclear kappa B
PAAF	punción aspiración con aguja fina
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PET	tomografía por emisión de positrones
PET-TC	PET fusionada con TC
PI3K	fosfatidilinositol-3 quinasa
PTB	punción transbronquial
RNM	resonancia nuclear magnética
RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
TC	tomografía computarizada
TNF-α	factor de necrosis tumoral alpha
(TNM)c	estadificación clínica del sistema TNM
(TNM)p	estadificación anatomopatológica del sistema TNM
(TNM)q	estadificación quirúrgica del sistema TNM
TTP	timidina trifosfato
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Epidemiología

A lo largo del siglo anterior, el cáncer de pulmón pasó de ser una enfermedad rara y poco frecuente a ser prácticamente una epidemia. Está entre los cánceres más importantes por su frecuencia, tanto en España como en el resto de países desarrollados. En España, es el tumor maligno que más ha aumentado en la última década (Fernández 2000). Los datos de mortalidad se obtienen de los certificados de defunción o de los registros de tumores, pero éstos no existen en todas las provincias. Referente a cifras absolutas, por ejemplo, en los Estados Unidos se diagnosticó en 1999 a 180.000 personas de esta enfermedad y 162.000 murieron a causa de ella (www.seer.ims) representando aproximadamente un 30% de todas las muertes por cáncer, cifra que supone más que la suma de todas las muertes por cáncer de mama, próstata, colon y ovario. También en Estados Unidos es la primera causa de muerte por cáncer en la mujer (Greenlee 2001). En España, con una población aproximadamente un 15% la de Estados Unidos, murieron en 1994 unas 11.500 personas por cáncer de pulmón. Se estima que aproximadamente unas 900.000 personas fallecen cada año por esta enfermedad en todo el mundo (Pisani 1999).

En el año 1990 el cáncer de pulmón ocupaba el lugar número diez entre las causas de muerte en todo el mundo y se estima que sobre el año 2020 alcanzará el quinto lugar e incluso que, entre los países occidentales, podría alcanzar el cuarto puesto (Murray 1997).

Los primeros datos sobre la mortalidad del cáncer de pulmón en España se disponen desde el año 1951 (Vioque 1987). Existen registros sobre la epidemiología del cáncer en algunas provincias de España como son Zaragoza, establecido en 1960, Navarra (1970) y a partir de 1980 se formaron los de Asturias, Tarragona, Murcia, Granada, País Vasco, Mallorca y Albacete entre otros. Los registros de cáncer envían sus datos de forma periódica a la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (*International Agency for Research on Cancer: IARC*). Así, los datos de España junto con los de otros países europeos han constituido la Red Europea de Registros de Cáncer (*European Network of Cancer Registries: ENCR*) que recoge información sobre la incidencia y la mortalidad por cáncer en la Unión Europea.

La tasa de mortalidad estimada del cáncer de pulmón en España en 1990 fue de 46,2 casos/100.000 para los hombres. Entre las mujeres representó 3,5 casos /100.000, lo que significa que es la más baja de Europa. La tasa de incidencia en ese mismo año se situó en 51,6/100.000 para los hombres y de 3,4/100.000 para las mujeres. (Hernández Hernández 2002) Debido a la escasa supervivencia global del cáncer de pulmón, las cifras de mortalidad se consideran un indicador de su incidencia bastante fiable, es decir, las tasas de incidencia y de mortalidad son similares reflejando el mal pronóstico global de esta enfermedad, principalmente debido a que en el momento del diagnóstico suele hallarse en estadios avanzados.

Entre las españolas, el cáncer de pulmón representa la sexta causa de mortalidad por cáncer, mientras que en las mujeres europeas ocupa el tercer puesto. Sin embargo, en algunos países como Escocia, Estados Unidos y Canadá, esta enfermedad ya es la primera causa de muerte tumoral entre la población femenina, por encima incluso del cáncer de mama (Patel 2004 y Henschke 2004). La tendencia es hacia un aumento progresivo en la mayoría de los países de la Unión Europea (aunque en el Reino Unido y en Irlanda están descendiendo), siendo Dinamarca el país que tiene la mortalidad femenina más alta de todo el mundo (Brennan 2002). En España, el incremento de la incidencia entre las mujeres es más moderado, a diferencia de lo que está ocurriendo en Europa y Norte América, hecho que concuerda con la fase de habituación al tabaco de la mujer española. En la segunda mitad del siglo XX, se comprobó un aumento de la incidencia y de la mortalidad por cáncer de pulmón en los varones, pero en las mujeres españolas las tasas se mantuvieron más o menos estables hasta los años noventa (Hernández 2002). Sin embargo, en un estudio más reciente de Cayuela et al. apuntan a un incremento en la tasa de mortalidad para las mujeres en España, con un incremento progresivo estimado anualmente del 2,2% para el periodo 1990-1999 y del 4,8% entre los años 1999-2005 (Cayuela 2008).

En cuanto a los varones españoles, basándose en los hábitos registrados del consumo de tabaco, se estima que podría haber una tendencia teórica hacia un aumento de la mortalidad hasta alcanzar su pico en torno al año 2020, a partir del cual debería estabilizarse y producirse un posterior descenso (Patel 2004 y Franceschi 1995). No obstante, un análisis reciente sobre epidemiología del cáncer de pulmón en España indica que, en los varones, hay un descenso en la tasa de mortalidad desde el comienzo de los

años noventa y es semejante al registrado en otros países mediterráneos y en países del norte de Europa, pero en España esta proyección ocurre casi una década más tarde (Cayuela 2008).

Es decir, nos encontramos con unas inclinaciones en la incidencia y mortalidad del cáncer de pulmón de la población española que vienen a reflejar el patrón de consumo de tabaco: la incorporación tardía de la mujer al tabaco y la tendencia al descenso de la prevalencia en el hombre. Fenómenos iniciados unos 20-30 años después respecto a otros países de Europa.

Aproximadamente, se puede decir a grandes rasgos que sólo un 30% de los pacientes diagnosticados de CPNCP se encuentra en un estadio I-II. Otro 30% presenta la enfermedad localmente avanzada y el 40% restante una enfermedad avanzada (Reif 2000). Según publicaciones de diversos estudios españoles, en general, entre un 20-30% de los pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón reciben tratamiento quirúrgico sólo o combinado con quimio- y/o radioterapia (Hernández 2004, Miravet 2004 y Alonso 2005).

En 1995 se estimaron 377.000 casos nuevos de cáncer de pulmón en Europa y 330.000 fallecimientos atribuibles a esta enfermedad, cifra que representa un 20% de las defunciones por cáncer en Europa (Bray 2002). En el año 1998 murieron en España 15.437 varones y 1.778 mujeres por cáncer de pulmón y en el año 2000 murieron 17.340 personas; en el año 2005 ocurrieron 16.647 fallecimientos en varones y 2.471 en mujeres correspondiendo a un 26,6% y un 6,6% de la mortalidad por tumores respectivamente, según fuentes del Instituto Nacional de Estadística (INE; www.ine.es). En 1998 se le atribuyó a esta neoplasia el mayor porcentaje de muertes por tabaco (26,5%) (Banegas 2001). Estos datos se calculan de forma indirecta mediante las tasas de mortalidad, ya que no todos los países tienen registros de tumores sobre todo el territorio nacional correspondiente.

La *International Agency for Research on Cancer* (IARC) comunicó las tasas de incidencia del cáncer de pulmón en España y Europa en 1998 ajustadas a la población mundial y europea (www.iarc.fr) (tabla 1), cifras que demuestran una tasa de incidencia en

Tabla 1. Tasa de incidencia del cáncer de pulmón en España y Europa.

Para España	Varones=79,13 (ajustada a la población europea) Mujeres=7,16 (ajustada a la población europea)
	Varones=54,62 (ajustada a la población mundial) Mujeres=5,03 (ajustada a la población mundial)
Para Europa	Varones=73,95 (ajustada a la población europea) Mujeres=17,31 (ajustada a la población europea)
	Varones=50,29 (ajustada a la población mundial) Mujeres=11,97 (ajustada a la población mundial)

las mujeres españolas todavía muy por debajo de las europeas, como consecuencia de la incorporación posterior del tabaco en esta población. Sin embargo, estudios recientes detectan un aumento de la proporción de mujeres con cáncer de pulmón que puede corresponder en torno al 10% de los casos (Sánchez de Cos 2006).

Existen publicaciones y estudios de la epidemiología del cáncer de pulmón en diversas provincias de España. Así, se ha observado un incremento en la tasa de incidencia del cáncer de pulmón en la provincia de Ávila en todos los grupos y también en el grupo de los varones en Tarragona, Navarra y norte de Castellón respecto a las cifras a primeros de los años noventa (Hernandez 2004 y Mirabet 2004).

El principal factor de riesgo del cáncer de pulmón es el tabaquismo que, aproximadamente, es responsable de un 85-90% de las muertes por esta causa. En España, se estimó por primera vez la prevalencia de los fumadores en 1978 con unos

valores del 53,9% para los varones y un 16,5% para las mujeres (Boletín Epidemiológico Semanal 1981). La máxima prevalencia en los varones se alcanzó sobre 1975 para estabilizarse posteriormente durante una década y empezar a descender posteriormente. En las mujeres, el ascenso tuvo lugar sobre 1970 hasta alcanzar una prevalencia máxima de 27,2% en el año 1995.

El diagnóstico del cáncer de pulmón suele ocurrir alrededor de 30-50 años después de comenzar a fumar. De modo que ahora comienzan a aparecer las consecuencias del tabaquismo iniciado sobre 1960-1970.

En general, el tipo histológico más frecuente es el escamoso (Hernández 2004, Mirabet 2004, Sánchez de Cos 2000 y Montero 2003 y Miravet 2001) a diferencia de lo que ocurre en Estados Unidos donde el más frecuente es el adenocarcinoma. Sin embargo, en la mujer española el adenocarcinoma es el predominante y, entre los varones, existe una tendencia hacia un incremento del adenocarcinoma (Charloux 1997 y Santos 2005). Se cree que esta distribución puede deberse al cambio en el contenido de nicotina de los cigarrillos y a la existencia de filtro que supuestamente inducirían unas inhalaciones más profundas; de esta forma el humo y sus componentes llegarían a las zonas más distales del parénquima pulmonar. Ver tabla 2 de la clasificación histológica de la Organización Mundial de la Salud.

Otros factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de pulmón son los ocupacionales o relacionados con el ambiente laboral. Destacan entre otros el asbesto, arsénico, berilio, cadmio, cromo, gas mostaza, níquel, radón, cloruro de vinilo, etc. Estas sustancias son empleadas en la industria química y del automóvil, en la construcción, astilleros, la minería, en fundiciones de metales, la agricultura, etc. Además, existe un efecto sinérgico entre el tabaquismo y ciertas sustancias como el asbesto o el radón. Se estima que entre el 10-15% de los agentes causantes del cáncer pulmonar se debe a estos factores laborales (Lange 2000).

Tabla 2. Clasificación de los tumores epiteliales malignos de pulmón según la Organización Mundial de la Salud (Travis 2004).

- carcinoma de células escamosas
 - papilar
 - células claras
 - células pequeñas
 - basaloide
- carcinoma de células pequeñas
 - carcinoma de células pequeñas combinado
- adenocarcinoma
 - adenocarcinoma con subtipo mixto
 - acinar
 - papilar
 - carcinoma bronquioloalveolar
 - no mucinoso
 - mucinoso
 - mixto o de tipo celular indeterminado
 - adenocarcinoma sólido productor de mucina
 - adenocarcinoma fetal bien diferenciado
 - adenocarcinoma mucinoso ("coloide")
 - cistoadenocarcinoma mucinoso
 - signet-ring* adenocarcinoma
 - adenocarcinoma de células claras
- carcinoma de células grandes
 - carcinoma neuroendocrino de cél. grandes
 - carcinoma neuroendocrino de cél. grandes combinado
 - carcinoma basaloide
 - carcinoma tipo linfopitelioma
 - carcinoma de células claras
 - carcinoma de células grandes de fenotipo rabdoide
- carcinoma adenoescamoso
- carcinoma sarcomatoide
 - carcinoma pleomórfico
 - carcinomas fusiforme ("spindle cell")
 - carcinoma de células gigantes
 - carcinosarcoma
 - blastoma pulmonar
- tumor carcinoide
 - carcinoide típico
 - carcinoide atípico
- tumores de glándulas salivares
 - carcinoma mucoepidermoide
 - carcinoma adenoide quístico
 - carcinoma epitelial-mioepitelial

En cuanto a la dieta, hay estudios discordantes sobre la influencia en el cáncer de pulmón. No hay contundencia ni firmeza desde un punto de vista estadístico en la protección que pueden ofrecer ciertas dietas ricas en verduras y frutas.

1.2.- Anatomía, mapa ganglionar y TNM.

El pulmón derecho está formado por tres lóbulos (superior, medio e inferior) separados por dos cisuras. La cisura mayor u oblicua separa el inferior de los otros dos y la menor u horizontal separa el medio del superior. En el hombre adulto pesa como promedio unos 700 gramos (550 gramos como promedio en la mujer). El pulmón izquierdo está formado por dos lóbulos (superior e inferior) separados por una cisura. Su peso promedio es de unos 600 gramos en el varón y unos 450 gramos en la mujer. Es más pequeño que el derecho porque el corazón está lateralizado hacia el hemitórax izquierdo dejando una impronta pulmonar llamada escotadura cardíaca. De hecho, no existe bronquio segmentario número 7 (o paracardíaco) en el pulmón izquierdo (Orts Llorca 1986).

Los pulmones están recubiertos por la pleura visceral en toda la superficie del pulmón excepto en el hilio, y están separados de la pared torácica (costillas, músculos intercostales y columna vertebral) a su vez por la pleura parietal y la fascia endotorácica. En la cara interna o mediastínica de los pulmones se encuentra el hilio o pedículo, formado por el bronquio principal, venas pulmonares (generalmente dos para cada pulmón, ocasionalmente puede haber una vena pulmonar única común para un pulmón), arteria pulmonar, arterias bronquiales, nervios simpáticos y parasimpáticos, venas bronquiales, vasos linfáticos y ganglios hiliares.

Los pulmones están constituidos por vasos sanguíneos (venas y arterias pulmonares, venas y arterias bronquiales), vasos linfáticos, nervios, porción intrapulmonar del árbol bronquial y por tejido conjuntivo que rellena los intersticios entre los elementos citados. En el pulmón derecho, el bronquio principal derecho da primero una rama lobar para el lóbulo superior derecho. A continuación el bronquio principal cambia de nombre y se llama bronquio intermediario del que parte una bifurcación para el lóbulo medio y, por último, más caudalmente conforma el bronquio lobar inferior. En el pulmón izquierdo, el bronquio principal izquierdo se divide sólo en dos bronquios; en primer lugar da el origen

del bronquio lobar superior izquierdo del que se originan bronquios segmentarios para la llingula (es el equivalente al lóbulo medio del pulmón derecho) y más caudalmente conforma el bronquio lobar inferior.

El drenaje linfático de los pulmones va progresando de forma centripeta, es decir, de los lóbulos pulmonares parten vasos linfáticos con estaciones ganglionares a diferentes niveles y en dirección al mediastino (figura 1). Anatómicamente, hay varios grupos de ganglios principales:

- Ganglios mediastínicos anteriores situados en la parte superior del mediastino delante de los grandes vasos (cadena mediastínica anterior derecha prevenosa, anterior izquierda o preaorticocarotídea y transversal que anastomosa las dos cadenas anteriores).
- Ganglios mediastínicos posteriores: a lo largo del esófago y aorta descendente.
- Ganglios mediastínicos peritraqueobronquiales: situados en los pedículos pulmonares, en la bifurcación de la tráquea y peritraqueales derechos e izquierdos.
- Ganglios intrapulmonares: son los ganglios interlobares, intralobares y subpleurales (más periféricos).

Sin embargo, la comunicación de los diferentes lóbulos pulmonares con los ganglios linfáticos mediastínicos no es tan simplista ni uniforme, ya que puede ocurrir el drenado de los vasos linfáticos pulmonares directamente sobre ganglios linfáticos mediastínicos ipsi- o contralaterales, saltándose de esta forma el nivel pulmonar o hilar (Riquet 1991).

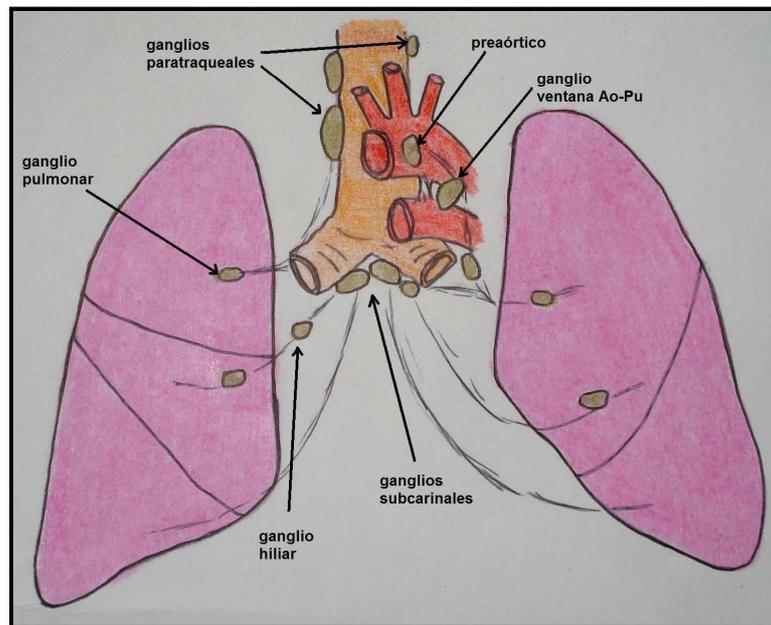


Figura 1. Esquema representando la dirección centrípeta del drenaje linfático pulmonar hacia el mediastino. Ao-Pu: aortopulmonar.

Para la estadificación del cáncer de pulmón se utiliza el sistema TNM aceptado por la *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) y *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). Es la clasificación que impera mundialmente y tiene valor pronóstico. Esta clasificación ha sufrido varias revisiones. La última revisión tuvo lugar recientemente en 2009 (Detterbeck 2009). En este estudio se aplicó la de 1997 (Mountain 1997) que es una revisión de la que se adoptó de Mountain en 1986 (Mountain 1986). En ella se considera el descriptor T, de tumor, según su tamaño y la relación con estructuras vecinas; el descriptor N que atiende a la afectación ganglionar y el descriptor M según la existencia de metástasis a distancia. En las figuras 2-6 y en la tabla 3 se observa la numeración que se le asignó a cada grupo de ganglios según su localización.

Tabla 3. Clasificación de los grupos ganglionares mediastínicos en el cáncer de pulmón según su localización anatómica. Los grupos ganglionares 1 a 9 corresponden a la patología N2 (por localizarse dentro o medial a la pleura mediastínica) en la estadificación TNM-1997 y del grupo 10 al 14 corresponden a la patología N1 (por estar fuera o lateral a la pleura mediastínica y por dentro de la pleura visceral).

Grupo 1 (mediastínicos altos)	Situados cranealmente a una línea horizontal en el borde superior de la vena innominada izquierda cuando cruza por delante de la tráquea en su línea media. Son laterales a la tráquea.
Grupo 2 (paratraqueales superiores)	Situados bajo el límite del grupo 1 y craneales a una línea horizontal sobre el borde superior del cayado aórtico. Son laterales a la tráquea.
Grupo 3 (prevasculares, retrotraqueales)	Los prevasculares se llaman 3A y los retrotraqueales 3P
Grupo 4 (paratraqueales inferiores)	Laterales a la tráquea, caudales al límite inferior del grupo 2 y superiores a una línea horizontal sobre el borde superior del bronquio lobar superior y medial a la pleura mediastínica.
Grupo 5 (ventana aortopulmonar)	Laterales al ligamento arterioso, aorta y arteria pulmonar izquierda y mediales a la primera rama de la arteria pulmonar izquierda mediastínica
Grupo 6 (ganglios paraaórticos)	Inferiores a una línea horizontal sobre el borde superior del cayado aórtico y localizadas anteriores y laterales a la aorta ascendente.
Grupo 7 (subcarinal)	Debajo de la carina pero sin asociarse a los bronquios o arterias lobares pulmonares.
Grupo 8 (paraesofágico)	Adyacentes a la pared esofágica pero sin localizarse en la región subcarinal.
Grupo 9 (ligamento pulmonar)	Dispuestos en el espesor del ligamento pulmonar y también por detrás de la vena pulmonar inferior.
Grupo 10 (ganglios hiliares)	Ganglios lobares próximos al hilio pulmonar y laterales a la pleura mediastínica, también en torno al bronquio intermediario.
Grupo 11 (interlobares)	Ganglios situados entre los bronquios lobares.
Grupos 12-14 (lobares y segmentarios)	Adyacentes a los bronquios segmentarios y subsegmentarios.

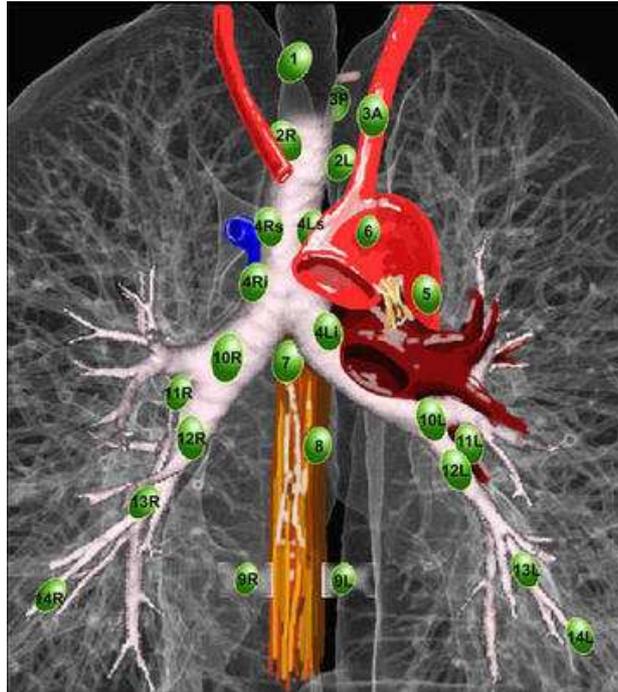


Figura 2. Esquema de la visión frontal de los elementos traqueobroncopulmonares con la localización de los grupos ganglionares paratraqueales (1, 2 y 4 derechos e izquierdos), de la ventana aortopulmonar (5), prevasculares (6), subcarinales (7), paraesofágicos (9), hiliares (10), interlobares (grupo 11) e intersegmentarios (grupo 12-14). www.imaos.com.

En la práctica, se consideran como N2 a los ganglios del mediastino (situados medialmente respecto a la pleura mediastínica y los situados en el ligamento pulmonar) independientemente del número con que se le designa en el mapa ganglionar; N1 si están situados lateralmente respecto a la pleura mediastínica (pueden ser hiliares, interlobares, intralobares, segmentarios, subpleurales). Cuando hay afectación de las cadenas ganglionares contralaterales o bien supraclaviculares o escalénicas ipsi- o contralaterales, se habla de enfermedad N3, que no suele ser considerada como candidata para un tratamiento quirúrgico. En la tabla 4 se muestra la explicación del sistema TNM del cáncer de pulmón.

Tabla 4. Clasificación TNM del cáncer de pulmón (Mountain 1997)

Tx	tumor demostrado por células malignas en esputo o lavados bronquiales, pero no visualizado por técnicas de imagen o broncoscopia
T0	no evidencia de tumor primario
Tis	carcinoma in situ
T1	tumor ≤ 3 cm rodeado por pulmón o pleura visceral sin invasión más proximal que el bronquio lobar
T2	tumor >3 cm, o invasión del bronquio principal a 2 o más cm de la carina, o que invade la pleura visceral, o que produce atelectasia o neumonitis obstructiva sin afectar a todo el pulmón
T3	tumor que invade cualquiera de las siguientes estructuras: pared torácica, diafragma, pleura mediastínica, pericardio parietal, bronquio principal a menos de 2 cm de carina o que produce atelectasia o neumonitis obstructiva de todo el pulmón
T4	tumor que invade cualquiera de las siguientes estructuras: mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, esófago, cuerpos vertebrales, carina, o bien la existencia de uno o varios nódulos tumorales separados del tumor principal y situados en el mismo lóbulo, derrame pleural maligno o metástasis pleurales
Nx	los ganglios linfáticos no pueden ser analizados
N0	no hay metástasis en los ganglios linfáticos
N1	afectación de ganglios linfáticos peribronquiales o hiliares ipsilatales e intrapulmonares
N2	afectación de ganglios linfáticos mediastínicos ipsilaterales
N3	afectación de ganglios linfáticos mediastínicos o hiliares contralaterales, escalenos o supraclaviculares ipsi- o contralaterales
Mx	las metástasis a distancia no pueden ser evaluadas
M0	no hay metástasis a distancia
M1	hay metástasis a distancia, nódulos tumorales separados del tumor principal y situados en un lóbulo diferente

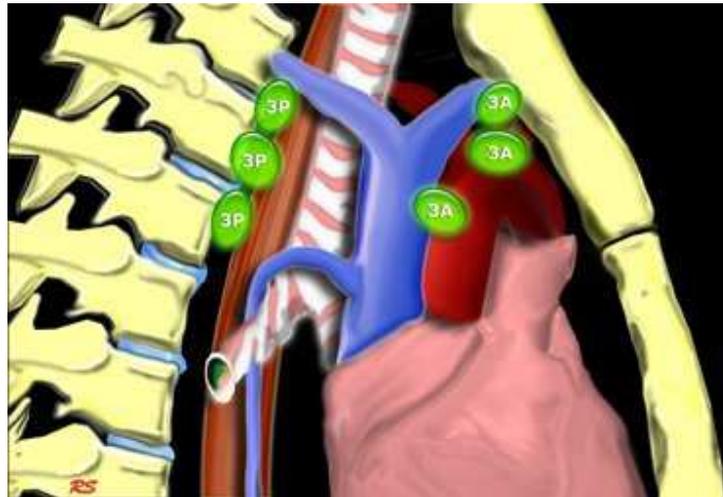


Figura 3. Esquema mostrando la localización de los grupos ganglionares 3a (prevasculares, sobre la vena cava superior) y 3p (retroesofágicos). www.radiologyassistant.nl

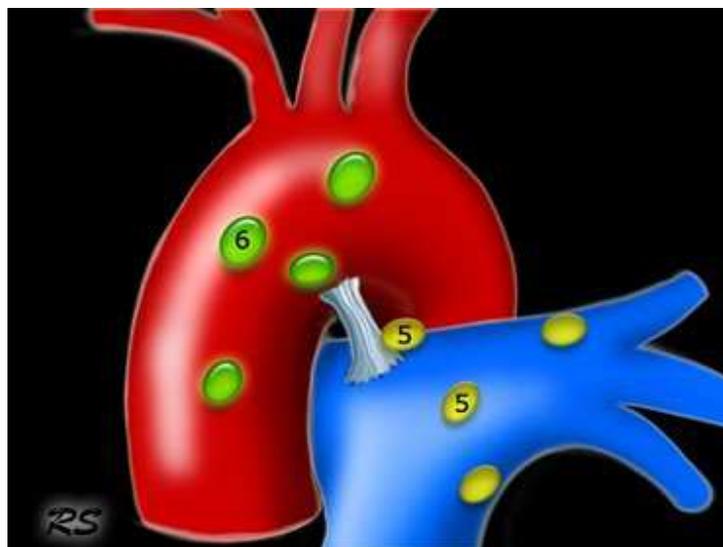


Figura 4. Esquema con la situación de los grupos ganglionares mediastínicos 5 (en la ventana aortopulmonar) y 6 (prevasculares, sobre el cayado aórtico). www.radiologyassistant.nl

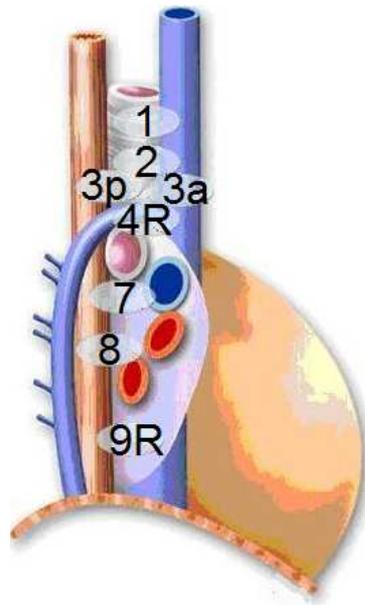


Figura 5. Esquema de la cara mediastínica del hemitórax derecho donde se muestra la localización de los grupos ganglionares 1, 2 y 4 (paratraqueales), 3a (prevasculares), 3p (retrotraqueales), 7 (subcarinales), 8 (paraesofágicos) y 9 (ligamento pulmonar).

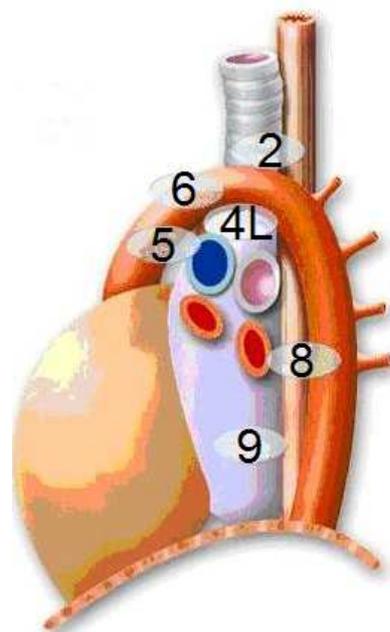


Figura 6. Esquema de la cara mediastínica del hemitórax izquierdo donde se muestra la localización de los grupos ganglionares 2 y 4 (paratraqueales), 5 (ventana aortopulmonar), 6 (preaórticos, aorta ascendente), 8 (paraesofágicos) y 9 (ligamento pulmonar).

Según la combinación de los descriptores T, N y M la enfermedad se clasifica en un determinado estadio clínico inicial (tabla 5), según la exploración física y las pruebas complementarias realizadas, incluyendo las invasivas como la mediastinoscopia, toracoscopia, biopsia transbronquial, etc. Así queda especificado el estadio clínico como (T N M)_c. Después de la cirugía y obtener el resultado del estudio de la pieza pulmonar así como de las adenopatías mediastínicas, el estadio queda como (T N M)_p de anatomopatológico. Se añade una "y" cuando el paciente llevó un tratamiento neoadyuvante o una "r" si fue una reintervención.

Tabla 5. Clasificación por estadios del cáncer de pulmón (Mountain 1997)

Oculto	Tx N0 M0
Estadio 0	Tis N0 M0
Estadio I-A	T1 N0 M0
Estadio I-B	T2 N0 M0
Estadio II-A	T1 N1 M0
Estadio II-B	T2 N1 M0 / T3 N0 M0
Estadio III-A	T1-3 N2 M0 / T3 N1 M0
Estadio III-B	Cualquier T4 y/o N3
Estadio IV	Cualquier M1

1.3.- Estadificación del cáncer de pulmón

Ante todo paciente con un diagnóstico de cáncer de pulmón, hay que determinar básicamente dos condiciones fundamentales para optimizar el tratamiento. Una de ellas es establecer la extensión o el estadio de la enfermedad, porque para ofrecer el tratamiento más apropiado a cada paciente hay que atender al estadio en el que se encuentre la enfermedad e intentar buscar la reseccabilidad del tumor, ya que la cirugía con resección completa es actualmente el mejor tratamiento y el que proporciona una mayor supervivencia, aunque en determinados estadios. La otra condición es determinar si el paciente es operable, es decir, si sus condiciones físicas y su comorbilidad asociada le permiten someterse a un tratamiento quirúrgico. Esta evaluación se comentará en el apartado 1.4.-(cirugía del cáncer de pulmón). Por tanto, la estadificación implica una estimación del pronóstico del paciente y una decisión sobre el tratamiento. Para ello existen una serie de pruebas o técnicas complementarias que ayudan con esta tarea. Se pueden dividir en tres grupos, que de menos a más invasivos se pueden clasificar en:

1.3.1- pruebas de imágenes

1.3.2- pruebas endoscópicas

1.3.3- pruebas quirúrgicas

1.3.1- Entre las técnicas de imagen están la radiografía de tórax y la tomografía computarizada (TC). Además, otras veces son útiles más pruebas como la resonancia nuclear magnética (RNM), la tomografía por emisión de positrones (PET) o la gammagrafía ósea.

a.- La radiografía simple de tórax se realiza en dos proyecciones (anteroposterior y lateral) y suele ser el estudio iconográfico inicial en los pacientes con sospecha clínica de cáncer de pulmón. También con la radiografía de tórax se diagnostican una parte de los tumores pulmonares de forma casual en pacientes sin síntomas, ya que es una exploración rutinaria en la evaluación preoperatoria de cualquier intervención que requiera anestesia general. Sin embargo, la placa simple de tórax no es demasiado útil en la estadificación.

b.- La TC es la técnica radiológica de elección para estadiar con más precisión el cáncer de pulmón y también ayuda a guiar en la punción de procedimientos diagnósticos más invasivos, por ejemplo, punción de masas o nódulos pulmonares, de un tumor suprarrenal, hepático, etc. Actualmente, es posible realizar reconstrucciones de estructuras intratorácicas en diferentes planos espaciales (ya sea coronal, axial o sagital), evaluar la presencia de ganglios mediastínicos (su localización, tamaño, relación con estructuras vecinas), localización del tumor pulmonar y su relación con las cisuras vecinas, vasos arteriales mediastínicos o infiltración de la pared torácica. Permite realizar reconstrucciones volumétricas o la broncoscopia virtual, con detalle de la situación de la tumoración endobronquial, de la distancia al bronquio principal, al intermediario o a la carina.

c.- La RNM no se emplea de forma rutinaria en la estadificación locorregional del cáncer de pulmón. Tiene algunas limitaciones como son las producidas por el movimiento cardíaco y respiratorio, la baja densidad protónica del parénquima pulmonar o los artefactos producidos por las numerosas interfases entre el aire y los tejidos blandos del pulmón. Por el contrario, entre sus ventajas destacan: la facilidad para la evaluación de estructuras vasculares mediastínico-hiliares sin utilizar contraste endovenoso (sobre todo útil en pacientes con alergia al contraste yodado de la TC), estudiar la invasión de la pared torácica, los tumores del vértice pulmonar, diferenciar entre recidiva local y cambios post-tratamiento y también en el estudio de metástasis extratorácicas como suprarrenales o del sistema nervioso central.

d.- La PET consiste en la administración de un compuesto glucosado que suele ser 18-fluorodeoxiglucosa-6-fosfato marcado con un trazador radioactivo que es detectado por unas cámaras de centelleo que convierten las cuentas que reciben en unas imágenes cuantificables. La glucosa es utilizada como fuente de energía por muchas células y, en el cáncer de pulmón, las células malignas poseen un mayor metabolismo que las células sanas vecinas, de modo que este incremento de su actividad metabólica se puede detectar con la prueba. También, de modo fisiológico, hay una captación habitual en el miocardio, en el sistema nervioso central (por la actividad ininterrumpida de estos órganos que requiere un aporte continuo de glucosa como fuente energética) y en el sistema pielocalicial excretor renal y vejiga que es por donde se elimina la sustancia utilizada. La sensibilidad y especificidad están sobre el 97% y 78% respectivamente y un valor

predictivo negativo alto, de modo que un nódulo pulmonar negativo sin captación significativa en la PET debe ser considerado benigno, en principio (Gould 2001 y Cheran 2004). Hay falsos negativos en pacientes con hiperglucemias, en tumores con un tamaño pequeño (inferior a un centímetro) o en tumores con bajo metabolismo de glucosa como ocurre en el carcinoma, en adenomas o en el carcinoma bronquioloalveolar. También se han descrito falsos positivos como ocurre en lesiones inflamatorias granulomas, como la sarcoidosis, y en infecciones pulmonares (Chang 2006). Sin embargo, la PET posee una definición anatómica más pobre comparada con la TC. A veces, ante una lesión sospechosa de malignidad, es difícil determinar si corresponde a un ganglio mediastínico maligno o a un tumor pulmonar próximo al hilio. La fusión de la PET y la TC, lo que se denomina PET-TC, permite mejorar los detalles anatómicos y combinarlos con los detalles metabólicos consiguiendo imágenes de gran utilidad para el diagnóstico. La PET o la PET-TC es una de las herramientas más recientes empleadas en el diagnóstico y estadificación del cáncer de pulmón. Hoy día, la tendencia es hacia una progresiva incorporación al arsenal de pruebas complementarias utilizadas de modo rutinario en esta enfermedad. Hace pocos años, era utilizado sólo por algunos profesionales dependiendo de la disponibilidad de cada centro, pero se va empleando de forma cada vez más genérica, acorde a los resultados que ofrece y a las exploraciones invasivas que puede evitar. Por ejemplo, evitar mediastinoscopias en ganglios aumentados de tamaño pero que no son captantes en la PET con el ahorro que implica la cirugía y la estancia hospitalaria o, por el contrario, encamina la dirección en la toma de decisiones cuando hay captación patológica en ciertas localizaciones evitando otras cirugías o tratamientos no adecuados (Álvarez 2002).

1.3.2- Pruebas endoscópicas

Estas pruebas complementarias poseen un mayor grado de certeza respecto a las pruebas de imágenes en el diagnóstico y estadificación del cáncer de pulmón porque proporcionan muestras citohistológicas.

a.- Punción transbronquial aspirativa (PTB). El instrumental utilizado para esta técnica es similar a la broncoscopia flexible habitual y además un catéter unido a una aguja que pasan a través del canal de trabajo del fibrobroncoscopio. El catéter y la aguja

están recubiertos por una vaina externa metálica o de poliuretano para proteger al broncoscopio. Los calibres de las agujas varían entre 18 y 23 gauges con una longitud de hasta 15 mm. Así, durante la realización de la broncoscopia habitual, además de explorar las vías aéreas respiratorias con la posible existencia de lesiones endobronquiales, biopsia diagnóstica y descripción de su localización, también se puede realizar la punción de adenopatías mediastínicas para afinar en la estadificación. Es preciso la realización de una TC de tórax antes de la broncoscopia para determinar las regiones ganglionares a biopsiar y su relación con estructuras mediastínicas (carina, bronquios principales, lobares, intermediarios) y troncos vasculares. La distancia de las adenopatías hasta estas estructuras se calcula a partir de las imágenes en la TC, contando los cortes en dirección craneal o caudal, según interese, y tomando como referencia la carina. La broncoscopia virtual puede proporcionar buenas imágenes y ayudar a la localización con más exactitud de los ganglios mediastínicos (Hopper 2001).

La rentabilidad diagnóstica de la PTB dependerá de las características del ganglio (su tamaño, su localización, el grado de necrosis y de afectación tumoral), de la experiencia del broncoscopista, de la experiencia del anatomopatólogo, de las condiciones en las que se llevó a cabo la PTB y de la comunicación entre ambos profesionales para que ayude a la interpretación de las muestras. La PTB es una técnica barata en comparación con procedimientos quirúrgicos, se puede hacer de forma ambulatoria y es segura, con pocas complicaciones importantes, aunque puede producirse un neumotórax, neumomediastino, hemomediastino (por sangrado ganglionar o sangrado vascular), rotura o perforación del broncoscopio y pérdida de la conexión de la aguja con su catéter (cuerpo extraño punzante). La PTB mejora la rentabilidad diagnóstica de la broncoscopia con escaso incremento de la morbilidad y no necesita una infraestructura diferente de la fibrobroncoscopia habitual. Se comienza el análisis de los grupos ganglionares que impliquen un peor pronóstico como los N3 y se continua con los N2. (Martínez 2008).

El coste económico de la broncoscopia con PTB se estima, en España, entre 300-330€ y el de una mediastinoscopia entre 3000-3600€. Según algunos autores, con la PTB se evitaron intervenciones quirúrgicas y supuso un importante ahorro económico estimando un coste 5 veces mayor en la estadificación mediastínica si no se hubiese utilizado la PTB (Bango 2003 y Fernández 2001). Esta técnica se realiza en el mismo

momento de la broncoscopia y se pueden analizar las regiones paratraqueales, retrotraqueales, subcarinales e hiliares, es decir, los grupos ganglionares 1, 2, 4, 3p, 7, 10 y ocasionalmente los paraesofágicos o grupo 8. Un resultado negativo en la punción no excluye la afectación maligna ganglionar y en estos casos se recomienda continuar con una estadificación quirúrgica del mediastino si hay sospecha manifiesta.

b.- La ultrasonografía endobronquial (EBUS: *endobronchial ultrasonography*) combina junto con la broncoscopia habitual la realización de un examen del mediastino, sus ganglios, de la pared bronquial y de grandes vasos mediante el empleo de ultrasonidos. Los ganglios linfáticos aparecen con un color grisáceo, ya que poseen baja ecogenicidad, y los vasos se muestran en negro porque son anecoicos. También se puede realizar dicha exploración a través del esófago con lo que se denomina ultrasonografía endoscópica transesofágica (EUS: *esophageal endoscopic ultrasound*). Así, es posible el estudio con gran detalle de tumores centrales y su relación o afectación de la pared traqueobronquial, de grandes vasos y estructuras mediastínicas, aportando una mayor sensibilidad que la TC (Hünerbein 1998). El principal problema consiste en diferenciar entre la infiltración por el tumor y contacto por contigüidad, o bien adhesión por fibrosis. También es capaz de detectar ganglios mediastínicos con un tamaño de 2-3 mm y aporta más información sobre su naturaleza benigna o maligna atendiendo a la forma, la definición de sus bordes y su estructura ecográfica (Hawes 1994). Combinando la EBUS y EUS se pueden explorar prácticamente todas las regiones ganglionares mediastínicas excepto la región 6.

c.- Para obtener un mayor rendimiento, se realiza la PTB guiada con EBUS o EUS y, así, se obtiene en tiempo real la certeza de la localización de la aguja de punción sin ser una técnica a ciegas como la PTB. Los inconvenientes de esta técnica son que es un aparataje más caro (entre 60.000 y 90.000 €, según el modelo), las sondas son muy frágiles y pueden romperse con facilidad, tienen una limitada penetración en profundidad sobre los tejidos, y para su manejo con destreza se necesita de una curva de aprendizaje y una dedicación mayor que con otras técnicas broncoscópicas. Por tanto, es una técnica que no es habitual en la práctica diaria para el diagnóstico y estadificación del cáncer de pulmón en los diferentes hospitales. Su empleo depende de la disponibilidad de recursos de cada centro y de la capacidad de realizarla y dominarla por los broncoscopistas. Sin embargo, esta técnica en manos expertas puede cambiar el manejo y el tratamiento de un

porcentaje importante de pacientes como señalan algunos autores donde evitaron la toracoscopia/toracotomía en el 49% de los pacientes y la mediastinoscopia en el 68% (Larsen 2002). La EBUS con punción ofrece más ventajas que la PTB porque la aguja va dirigida en todo momento con una morbilidad prácticamente nula y evita los falsos positivos que pueden ocurrir al atravesar el tumor para alcanzar los ganglios mediastínicos con la vía transbronquial.

En un estudio en Estados Unidos comparando la EBUS-PAAF, mediastinoscopia, PTB, punción guiada por TC y PET en el CPNCP para el estudio de adenopatías mediastínicas se obtuvo como conclusión que la EBUS-PAAF fue la herramienta con mejor relación coste-eficacia (Harewood 2002). Hay estudios que han evaluado la utilidad de la EBUS-PAAF en pacientes con cáncer de pulmón y una TC negativa para adenopatías (diámetro menor a 1 cm en el eje corto) concluyendo que demostraron afectación ganglionar metastásica en el 25% y 10% de los pacientes (Wallace 2004 y Belda 2004). La existencia de falsos negativos puede deberse a la presencia de micrometástasis ganglionares o a la afectación selectiva de sólo algunos ganglios de una misma región ganglionar mediastínica. Todavía no existe una técnica de imagen con una sensibilidad y una especificidad lo suficientemente elevadas como para no obtener muestra citohistológica de las adenopatías mediastínicas y, dada la falta de especificidad con la PET/PET-TC, las lesiones hipercaptantes deberían confirmarse con biopsia, preferiblemente por vías lo menos invasivas posibles para el paciente, como son las técnicas endoscópicas descritas (ver tabla 6).

1.3.3- Pruebas quirúrgicas

Para la estadificación del cáncer de pulmón existen unas técnicas quirúrgicas disponibles cuando, por procedimientos menos invasivos, y por tanto menos agresivos para el paciente, no se obtiene material para estudio histológico, es material insuficiente o un resultado negativo para malignidad. Entre estas técnicas se encuentra la mediastinoscopia, la mediastinotomía y la toracoscopia. Son exploraciones que se realizan con anestesia general, aunque, a veces, la toracoscopia puede realizarse fácilmente y con seguridad para el paciente mediante anestesia local si el paciente colabora y el derrame pleural es moderado-grande. Estas técnicas quirúrgicas han

permitido disminuir las toracotomías exploradoras y aumentar la supervivencia en los pacientes operados al mejorar la selección para el tratamiento quirúrgico (De Giacomo 1997, De Leyn 2007).

Tabla 6. Pruebas diagnósticas sobre la estadificación mediastínica no quirúrgica.

Autores-año	Nº casos	S	E	VPP	VPN	Prevalencia
ESTUDIO DE ESTADIFICACIÓN CON TC						
Dunagan et al. 2001	72	0.50	0.87	0.56	0.84	0.25
Kamiyoshihara et al.2001	546	0.33	0.90	0.46	0.84	0.20
Osada et al. 2001	335	0.56	0.93	0.77	0.83	0.30
Pieterman et al. 2000	102	0.75	0.66	0.50	0.85	0.31
Takamochi et al. 2000	401	0.30	0.82	0.30	0.83	0.20
Marom et al. 1999	79	0.59	0.86	0.84	0.63	0.56
Suzuki et al. 1999	440	0.33	0.92	0.56	0.82	0.23
ESTUDIO DE ESTADIFICACIÓN CON PET						
Dunagan et al. 2001	81	0.52	0.88	0.61	0.84	0.26
Farrell et al. 2000	84	1.00	0.93	0.40	1.00	0.05
Liewald et al. 2000	78	0.93	0.78	0.69	0.95	0.35
Pieterman et al. 2000	102	0.91	0.86	0.74	0.95	0.31
Roberts et al. 2000	100	0.88	0.91	0.75	0.96	0.24
Marom et al. 1999	79	0.73	0.94	0.85	0.88	0.56
Saunders et al. 1999	84	0.71	0.97	0.86	0.93	0.20
ESTUDIO DE ESTADIFICACIÓN CON EBUS						
Wiersema et al. 2001	29	0.86	0.57	0.86	0.57	0.76
Gress et al. 1997	45	0.86	0.83	0.83	0.86	0.49
Potepan et al. 1996	30	0.45	0.58	0.38	0.65	0.37
Silvestri et al. 1996	27	0.89	1.00	1.00	0.82	0.67

S: sensibilidad. E: Especificidad. VPP: valor predictivo positivo. VPN: valor predictivo negativo.

a.- La mediastinoscopia y su vía de abordaje fueron definidas por Carlens a finales de los años 50 (Carlens 1959). Es una exploración que se realiza con frecuencia, es segura con una mortalidad prácticamente nula y una baja morbilidad en manos expertas. A través de una pequeña incisión cervical y siguiendo un plano por delante de la cara anterior traqueal, permite el acceso para biopsiar ganglios mediastínicos situados en la región paratraqueal de forma bilateral (grupos 1, 2 y 4) y subcarinal (grupo 7). Durante su realización se pueden enviar muestras ganglionares a anatomía patológica para su procesado en congelación. Si no se observa afectación maligna, se puede continuar

durante la misma intervención con la resección pulmonar; mientras que si se obtienen adenopatías con metástasis, el paciente es dirigido hacia un tratamiento neoadyuvante para posterior reevaluación. Esta técnica de exploración tiene, como todos los tests diagnósticos, un porcentaje de falsos negativos que puede rondar el 10% y una sensibilidad aproximada entre el 70-90% (DeLeyn 2007). Los ganglios de la ventana aortopulmonar, los preaórticos, los paraesofágicos y los del ligamento triangular no son accesibles por esta técnica, aunque la mediastinoscopia cervical extendida puede conseguir acceso atravesando el espacio entre el tronco arterial braquiocefálico y la arteria carótida izquierda hacia los ganglios de los grupos 5 (ventana aortopulmonar) y 6 (preaórticos).

b.- La mediastinotomía fue descrita inicialmente por Charberlaim y McNeill en 1966 (McNeill 1966) como un abordaje paraesternal derecho o izquierdo para acceder a los ganglios del mediastino anterior y del hilio pulmonar. Para ello, se suele penetrar a través del segundo espacio intercostal y extirpando, o bien evertiendo el tercer cartílago costal. Se suele emplear también el mediastinoscopio y los vasos mamarios internos se respetan o, a veces, se ligan. Esta técnica puede combinarse en la misma intervención junto con la mediastinoscopia según requieran las circunstancias de cada paciente.

c.- La toracoscopia se suele realizar cuando con el cáncer de pulmón viene asociado un derrame pleural y las toracocentesis indican que no es maligno. Si el derrame pleural fuese maligno, la toracoscopia ya no tendría tanto interés en la estadificación sino en una actitud paliativa. Se realiza con el paciente bajo sedación y se emplea anestesia local sobre la zona de colocación de uno o dos trócares, o bien, también se realiza con anestesia general, según el estado clínico del paciente, la cantidad de derrame pleural y la preferencia de cada grupo de trabajo. La toracoscopia permite una visión de la cavidad pleural, tomar nuevas muestras de líquido pleural para su estudio citológico y realizar biopsias pleurales dirigidas sobre las zonas macroscópicamente sospechosas de estar afectadas. También permite hacer una exploración de los ganglios mediastínicos e hiliares. Se pueden realizar biopsias intraoperatorias y según el resultado continuar con la resección pulmonar o no. En casos donde se observa una carcinomatosis pleural, a la vez que se hace el diagnóstico y estadificación se emplea talco para realizar la pleurodesis como tratamiento quirúrgico paliativo.

1.4.- Cirugía del cáncer de pulmón

Actualmente, la cirugía es el tratamiento más efectivo para el CPNCP y el de mayor potencial curativo en estadios iniciales. El objetivo de toda resección quirúrgica debe ser conseguir la extirpación completa de la enfermedad y obtener, además, un margen adecuado libre de tumoración. La cirugía del cáncer de pulmón en la primera mitad del siglo XX era poco frecuente y representaba una entidad más bien anecdótica. En abril de 1932, apareció por primera vez la cuestión sobre el tratamiento quirúrgico del cáncer pulmonar cuando el doctor Edward D. Churchill presentó su experiencia con cuatro pacientes durante la reunión anual de la Asociación Americana de Cirugía Torácica (Churchill 1933). Unas décadas después, esta patología comenzó a incrementarse progresivamente debido al consumo de cigarrillos y, hasta nuestros días, han transcurrido más de 70 años. Desde entonces, se han conseguido numerosos e importantes avances en el conocimiento de la fisiología respiratoria y cardiorácica, de la etiopatogenia del cáncer de pulmón, mejorías de las técnicas quirúrgicas, del cuidado postoperatorio y de las unidades de cuidados intensivos, del manejo anestésico, de la investigación en biología molecular, avances en la tecnología de imagen y de técnicas diagnósticas invasivas, etc. Sin embargo, pese a todos estos logros, la supervivencia global en el cáncer de pulmón sigue siendo baja y sólo un pequeño porcentaje de pacientes son diagnosticados en estadios iniciales susceptibles de recibir un tratamiento con mayor tasa de curación.

La mayoría de los pacientes que sobreviven a largo plazo tuvieron un tratamiento quirúrgico solo o combinado. La resección incompleta, ya sea porque quede tumor macroscópico o microscópico (ver tabla 7) , o bien por las micrometástasis regionales o a distancia (que son metástasis que no se pueden diagnosticar por los procedimientos técnicos habituales y tienen un tamaño de unos pocos milímetros, o son un grupo de células aisladas al microscopio) hacen fracasar el tratamiento quirúrgico curativo. Uno de los principales objetivos pendientes es la detección precoz del cáncer de pulmón para ofrecer un tratamiento más eficaz. El cirujano debe preocuparse por seleccionar a aquellos pacientes que puedan beneficiarse de un tratamiento quirúrgico, atender al estado cardiorrespiratorio y a las comorbilidades asociadas del enfermo para llevar a cabo el procedimiento quirúrgico más adecuado e intentar conseguir una resección completa de la enfermedad (R0).

Tabla 7. Clasificación de tumor residual (Hermanek 1994)

R0	No evidencia de tumor residual microscópico en los bordes de la pieza extirpada
R1	Tumoración residual microscópica en los bordes de resección de la pieza extirpada
R2	Tumoración residual observada macroscópicamente tras la resección quirúrgica

La cirugía del pulmón comenzó a finales del siglo XIX sobre lesiones tuberculosas, heridas torácicas abiertas o bronquiectasias. Sobre los años 1930-1950 la neumonectomía fue considerada la técnica más adecuada para el tratamiento quirúrgico del cáncer de pulmón. Años más tarde, la práctica de la lobectomía fue imponiéndose al comprobar que se obtenían resultados similares en cuanto a supervivencia en pacientes con una extensión parecida de la enfermedad y disminuía mucho más la morbi-mortalidad respecto a la neumonectomía. De modo que, hoy día, la lobectomía es la técnica de elección para el tratamiento quirúrgico de esta patología. Además, hay también resecciones ampliadas para tumores con afectación de pared torácica o tumores más hiliares para cuyo abordaje hay que realizar una resección más amplia (Waters 2002).

La evaluación preoperatoria de cada paciente debe ser orientada a la consecución de la reseabilidad tumoral, es decir, hacia la exéresis por completo del tumor. También debe ser enfocada hacia el estado funcional del paciente, de modo que le permita superar la intervención quirúrgica, es decir, determinar la operabilidad del paciente. En lo que respecta a la resección del tumor pulmonar, hay que prestar especial atención al tipo histológico. El carcinoma de célula pequeña, en general, no suele ser tributario de tratamiento quirúrgico. Por otra parte, hay que atender a la extensión de la enfermedad tumoral, que viene marcada por la clasificación TNM (tumor, ganglios y metástasis) (Mountain 1997). Para el estudio de la estadificación clínica TNM, aparte de la exploración física, se realizan una serie de pruebas complementarias como la radiografía simple de tórax, la tomografía computarizada (TC), la fibrobroncoscopia, la tomografía de emisión de positrones (PET) o su combinación PET-TC, la mediastinoscopia, toracoscopia o mediastinotomía, la esofagoscopia o ecografía transesofágica, la gammagrafía ósea o la RNM (García Yuste 2010).

En general, se puede decir que los pacientes con tumores en estadio I y II son candidatos a tratamiento quirúrgico con finalidad curativa. El estadio III-A sería para tratamiento multimodal (quimioterapia, radioterapia, cirugía) y debería entrar en ensayos clínicos, ya que es una enfermedad localmente avanzada sin pautas exactas sobre cuál es la secuencia de tratamientos más idónea ni sobre qué fármacos en concreto o su tiempo de tratamiento. Para los estadios III-B y IV el tratamiento suele ser médico (quimioterapia, radioterapia) y en casos muy seleccionados se realiza cirugía. Los tumores T1, T2 y T3 son, en principio, candidatos para un tratamiento quirúrgico. Los que pertenecen al grupo T4, en general, no son subsidiarios de cirugía (invasión de grandes vasos mediastínicos, esófago, corazón, vértebras, derrame pleural o pericárdico malignos, carina); sin embargo, en casos muy seleccionados se puede llevar a cabo una cirugía con resección completa para tumores que afecten a carina, tráquea, nervio recurrente, o grandes vasos (Tsuchiya 1994).

En cuanto a la enfermedad ganglionar o descriptor N, hay que señalar que los pacientes con N3 por afectación supraclavicular o ganglionar contralateral no son candidatos a tratamiento quirúrgico. El grupo de N2 es discutido y su manejo suele ser combinado e incluido en ensayos clínicos. Hay grupos que realizan quimioterapia y radioterapia de inducción seguido de cirugía (Uy 2007). Otros realizan sólo cirugía de rescate en caso de una respuesta completa tras el tratamiento neoadyuvante comprobando mediante mediastinoscopia, remediastinoscopia o toracoscopia la ausencia de enfermedad mediastínica (Mateu Navarro 2000).

La detección de metástasis (M1) es una contraindicación para la cirugía. Sin embargo, hay situaciones poco comunes que pueden suponer una excepción como, por ejemplo, la presencia de metástasis cerebral única donde se puede realizar un tratamiento quirúrgico cerebral y pulmonar (Mussi 1996). Otra situación que puede beneficiarse de cirugía es la metástasis única suprarrenal que puede tratarse en el mismo acto quirúrgico (Luketich 1996). Con el estudio de extensión tumoral es frecuente hallar otras lesiones como quistes renales, adenomas suprarrenales, quistes o hemangiomas hepáticos, etc. que son lesiones benignas, pero que deben ser evaluadas con detenimiento porque pueden tratarse de metástasis. Para el estudio de estas lesiones puede ser necesario el uso de RNM, ecografía o incluso la biopsia.

La evaluación de la función cardiorrespiratoria del paciente candidato a cirugía de resección pulmonar es fundamental para llevar a cabo con seguridad la intervención, prever qué pacientes pueden presentar más problemas en el postoperatorio y qué pacientes deben ser excluidos por su mala situación funcional. La mayoría de los pacientes con cáncer de pulmón son pacientes con edad superior a los 50 años y con antecedentes de tabaquismo. Aproximadamente, la mitad de ellos padece una enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y con la resección pulmonar también se extirpa parte de tejido pulmonar funcionante. La edad, en sí misma, no es un factor excluyente para la cirugía. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en pacientes con una edad superior a 70 años hay más del doble de probabilidad de fallecimiento tras la neumonectomía (14%) que en los pacientes menores de 60 años (6,5%) (DePerrot 1999) y que la frecuencia de la comorbilidad asociada como, por ejemplo, la enfermedad pulmonar, cardiovascular, diabetes, etc. está directamente relacionada con la edad. A mayor edad, mayor probabilidad de comorbilidad importante asociada.

Las pruebas de función respiratoria preoperatorias son unos instrumentos para cuantificar cómo es la situación funcional del paciente. El parámetro más utilizado es el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV1). La espirometría debe realizarse cuando el paciente se encuentre en una situación de estabilidad clínica y cumpliendo su tratamiento médico broncodilatador cuando así le sea prescrito. Bajo estas condiciones, los valores que se tendrán en consideración serán los obtenidos tras la broncodilatación. Los pacientes con un FEV1 superior a 2.000 ml pueden someterse a una neumonectomía sin más estudios respiratorios, ya que la tolera desde un punto de vista respiratorio y siempre que el paciente no presente una enfermedad pulmonar intersticial, en cuyo caso habría que evaluar el test de difusión. El límite inferior establecido tras la resección quirúrgica suele ser de 700-800 ml o un 30% en valor relativo que es llamado FEV1 predictivo postoperatorio (FEV1ppo). De modo que valores inferiores a estas cifras contraindican la resección pulmonar. Suelen utilizarse más los términos en porcentajes que los valores absolutos, porque son valores que dependen de la edad, del sexo, de la raza, del peso y de la talla del individuo. Cuando se obtiene un FEV1 < 60% y/o una capacidad de difusión de monóxido de carbono (DLCO) < 60%, es aconsejable realizar otras pruebas para determinar el FEV1ppo. El cálculo del FEV1ppo se basa en el FEV1 preoperatorio y en la estimación de parénquima pulmonar a extirpar mediante la siguiente fórmula (Juhl 1975): $FEV1ppo = FEV1 \times (1 - n^{\circ} \text{ de segmentos resecados} \times 0.0526)$.

La gammagrafía de ventilación/perfusión también permite hacer una estimación cuantitativa del porcentaje de participación en la función respiratoria de las diferentes zonas pulmonares para calcular cómo quedaría dicha función tras el tipo de resección que se prevea realizar (Varela 2005):

a.- en el caso de una neumonectomía sería

$$FEV1_{ppo} = FEV1 \times (1 - \% \text{perfusión del pulmón a extirpar})$$

b.- en el caso de una lobectomía sería

$$FEV1_{ppo} = FEV1 \times [1 - (\% \text{perfusión del pulmón a resecar} \times n^{\circ} \text{ segmentos del lóbulo a resecar} / n^{\circ} \text{ segmentos del pulmón})]$$

Si el FEV1_{ppo} es >40% el paciente es apto para el tipo de resección planteado. Si resulta inferior a 40% pero superior al 30% se realiza una tercera batería de tests que consiste en cuantificar el consumo de oxígeno máximo en la prueba de esfuerzo. Así, un VO₂max < 10-15 ml/kg/min contraindicaría la cirugía de resección y un valor superior hace considerar al paciente apto para la cirugía, aunque considerado como un paciente de alto riesgo. La gasometría arterial también nos puede orientar sobre el riesgo operatorio. Así, una PCO₂ superior a 50 mmHg indica que aumenta el riesgo quirúrgico y con valores por encima de 55 mmHg o PO₂ inferior a 50 mmHg se contraindica la resección (Fernández Fau 1998).

Recientemente se publicó una guía sobre la evaluación preoperatoria en el cáncer de pulmón destacando algunas modificaciones (Brunelli 2009):

- se aconseja la realización de test de difusión (DLCO) de forma rutinaria
- para calcular el FEV1_{ppo} no es necesaria la gammagrafía pulmonar, sino que se basa en la fórmula: $FEV1_{ppo} = FEV1 \times (1 - n^{\circ} \text{ segmentos no obstruidos a extirpar} / n^{\circ} \text{ segmentos no obstruidos totales})$. La misma fórmula para DLCO_{ppo} y VO₂max-ppo.

- Utilizar la gammagrafía de perfusión pulmonar para determinar FEV1ppo postneumectomía.
- Si el FEV1 y/o DLCO es <80%, se debería realizar una evaluación ergométrica determinando el VO2max. Si no fuese posible por no disponer de la infraestructura logística adecuada, puede servir el test de subir escalones.
- Se reduce el límite para aceptar un paciente a tratamiento quirúrgico: FEV1ppo y DLCOppo ambos > 30%.
- Se utilizan los valores relativos (porcentajes) y no los valores absolutos de los tests de función cardiopulmonar.

En pacientes con antecedentes de cardiopatía isquémica o una edad superior a los 50 años, es conveniente realizar unas pruebas de función cardíaca que pueden incluir el electrocardiograma, ecocardiografía, la prueba de esfuerzo o incluso un cateterismo coronario. La ecocardiografía nos indica la situación de contractilidad cardíaca, la fracción de eyección, la situación de las válvulas y una estimación de la presión arterial pulmonar. Cuando la presión arterial pulmonar es mayor de 30 mmHg la indicación de la cirugía es controvertida porque hay un aumento de la mortalidad postoperatoria. En pacientes con infarto agudo de miocardio reciente, es decir, en menos de tres meses, hay un elevado índice de reinfarto y conviene esperar entre 3 y 6 meses tras el episodio de infarto y siempre que el sistema cardiovascular del paciente halla permanecido estable posteriormente. También se ha descrito el tratamiento conjunto en la misma intervención de la resección pulmonar y la cirugía de revascularización cardíaca en casos seleccionados (Danton 1998).

Los pacientes evaluados con un riesgo anestésico ASA IV o mayor (según la clasificación de la *American Society of Anesthesiologists*. www.asahp.org) no son candidatos para la cirugía electiva de resección pulmonar, salvo casos muy seleccionados (Tabla 8).

Tabla 8. Clasificación del estado físico preoperatorio (*American Society of Anesthesiologists*).

ASA I:	Paciente sano normal
ASA II:	Enfermedad sistémica leve o moderada
ASA III:	Enfermedad sistémica grave
ASA IV:	Enfermedad sistémica grave y que supone un riesgo constante para su vida.
ASA V:	Moribundo que no se espera que viva sin ser operado.
ASA VI:	Paciente en muerte cerebral cuyos órganos van a ser extraídos para donación.

En cuanto a la tarea quirúrgica, una vez seleccionado el paciente adecuado según las exploraciones y pruebas complementarias mencionadas anteriormente, el cirujano debe intentar conseguir una extirpación completa de todas las lesiones identificadas. Ya que con esto, se consigue el mejor resultado para alcanzar un mayor periodo libre de enfermedad y su curación. El cirujano, una vez en el campo quirúrgico, tiene que realizar una evaluación de los descriptores TNM antes de tomar una decisión terapéutica. El descriptor T hace referencia al tamaño tumoral: cómo es de grande el tumor, dónde está localizado, si afecta a uno o más lóbulos, si invade estructuras vecinas, etc. También hay que efectuar una exploración del resto del parénquima pulmonar, aparentemente sin afectación, para buscar la detección de otros nódulos que puedan pasar desapercibidos con las exploraciones preoperatorias, atender al aspecto del resto de la cavidad pleural y del mediastino en busca de implantes pleurales, mediastínicos, etc. La resección se debe realizar según los principios de la cirugía oncológica: no atravesar el tumor durante la manipulación quirúrgica, debe intentarse una resección anatómica (como lobectomía, bilobectomía o neumonectomía), comprobar que los márgenes de resección estén libres de enfermedad tumoral mediante el estudio anatomopatológico intraoperatorio y atender al estudio del descriptor N, es decir, de los ganglios mediastínicos a través de la linfadenectomía. No existe unanimidad universal en la forma de realizar la linfadenectomía mediastínica. Hay diferentes actitudes sobre el abordaje de los ganglios mediastínicos en

el cáncer de pulmón. Así, algunos cirujanos realizan la exéresis de los ganglios mediastínicos que son evidentes a simple vista o que aparecen durante las maniobras de preparación de la resección pulmonar y en zonas vecinas al lóbulo a tratar. Otros defienden una linfadenectomía sistemática, englobando no sólo los ganglios linfáticos, sino también el tejido adiposo circundante, o bien una disección ganglionar extendida mediante esternotomía media. Y en definitiva, los hay que siguen una opción más intermedia respecto a las opciones previas, como es el muestreo ganglionar mediastínico; es decir, se buscan como mínimo tres o cuatro estaciones ganglionares y se puede hacer un estudio anatomopatológico intraoperatorio de ellos. En caso de malignidad, se puede ampliar la disección ganglionar mediastínica a todas las regiones. Las estaciones ganglionares del muestreo dependen de la localización lobar del tumor. Se debe incluir siempre la subcarinal y además las paratraqueales para el lóbulo superior derecho y lóbulo medio, las paraesofágicas y del ligamento pulmonar para los lóbulos inferiores y las de la ventana aortopulmonar y paraaórtica para el lóbulo superior izquierdo (GCCB-S 2001). No obstante, en las recomendaciones de la Sociedad Europea de Cirugía Torácica (ESTS: *European Society of Thoracic Surgery*) se defiende en la cirugía de resección del CPNCP una disección ganglionar sistemática, preferiblemente en bloque (Lardinois 2006).

1.5.- Angiogénesis

La angiogénesis es un proceso fisiológico que consiste en la formación de nuevos vasos a partir de otros preexistentes. Esto ocurre durante el desarrollo embrionario, con el crecimiento, con el ciclo menstrual en la mujer y en la cicatrización de las heridas.

El organismo regula la angiogénesis mediante una serie de factores favorecedores y otros inhibidores. Cuando hay un predominio de los factores que favorecen la angiogénesis, ésta tiene lugar, pero cuando hay un exceso de factores inhibidores se detiene. En condiciones habituales de estabilidad fisiológica, hay un equilibrio entre las sustancias moduladoras de la angiogénesis y suele predominar, en general, la inhibición. (Folkman 1992).

Sin embargo, la angiogénesis también se produce en el crecimiento de los tumores. Un tumor no puede crecer más allá de unos pocos milímetros sin neovascularización porque necesita un aporte extra de oxígeno y nutrientes para continuar su crecimiento y un medio para eliminar los desechos del metabolismo (Folkman 1971). Las células tumorales que promueven la angiogénesis secretan una serie de factores que favorecen el crecimiento angiogénico (conocidos como citocinas angiogénicas) que superan el efecto de los inhibidores angiogénicos. Este inicio de la angiogénesis tumoral se conoce como *angiogenesis switch* (Bikfalvi 1997). Las citocinas secretadas por las células tumorales tienen un efecto sobre la formación de vasos y su crecimiento, influyen en la permeabilidad vascular, interfieren con la respuesta moduladora del huésped y en la capacidad de invasión tumoral, también desempeñan un papel en el desarrollo de metástasis y en el pronóstico de la enfermedad. Existen numerosos factores y sustancias que intervienen sobre la angiogénesis de un modo activador o inhibitorio (Tabla 9).

En muchas enfermedades, se descontrolan los mecanismos de regulación sobre la angiogénesis y ésta tiene lugar por defecto o por exceso. Situaciones en las que hay una insuficiente angiogénesis son, por ejemplo: la enfermedad arterial coronaria, accidentes cerebrovasculares isquémicos o retraso en la curación de heridas. De esta forma, hay un crecimiento inadecuado de vasos sanguíneos, no se restaura la circulación adecuadamente y se pone en riesgo la vitalidad de los tejidos comprometidos. En otras enfermedades se produce un exceso de angiogénesis como ocurre en el cáncer, la retinopatía diabética, la artritis reumatoide, etc.

Tabla 9. Factores que intervienen en la regulación de la angiogénesis.

FACTORES QUE FAVORECEN LA ANGIOGÉNESIS
<ul style="list-style-type: none"> -Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) -Factor básico de crecimiento fibroblástico(bFGF) -Factor ácido de crecimiento fibroblástico (aFGF) -Interleucina-8 (IL-8) -Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) -Factor de crecimiento transformante alfa (TGFα) -Factor de crecimiento transformante beta (TGFβ) -Factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) -Factor de crecimiento de hepatocito (HGF)
FACTORES QUE INHIBEN LA ANGIOGÉNESIS
<ul style="list-style-type: none"> -Angioarrestina -Angiostatina (fragmento de plasminógeno) -Endostatina (fragmento del colágeno XVIII) -Interleukina-12 -Factor plaquetario-4 (PF-4) -Vasculostatina -Vasostatina (fragmento de calreticulina)

El término angiogénesis fue designado por primera vez en 1787 por el cirujano inglés John Hunter para describir el crecimiento de los vasos sanguíneos en las astas del ciervo. Hace más de un siglo que se había observado que el crecimiento tumoral era acompañado por un aumento en la vascularización, pero no fue hasta 1939 cuando se postuló que había un factor derivado del tumor que estimulaba el crecimiento vascular (Ide 1939). Algire et al. en 1945 comunicaron que, a raíz de sus trabajos experimentales con trasplante de tumores, el incremento local en la densidad vascular precedía al rápido crecimiento del tumor (Algire 1945). En 1971, el cirujano Judah Folkman planteó una hipótesis en la que el crecimiento tumoral dependía de la capacidad de angiogénesis basándose en su trabajo donde un tumor sólido no crecía más de 2 – 3 mm³ en ausencia de neovascularización, de modo que el tamaño era limitado por el aporte de oxígeno y nutrientes (Folkman 1971). En 1975 los doctores Henry Brem y Judah Folkman descubrieron el primer inhibidor de la angiogénesis. Posteriormente, el primer factor

angiogénico (bFGF) fue purificado en la Universidad de Harvard por Yuen Shing y Michael Klagsbrun. En 1989 Ferrara y Henzel (Ferrara 1989) por un lado y Plouet et al. (Plouet 1989) por otro purificaron y secuenciaron un factor mitógeno para las células endoteliales que llamaron respectivamente VEGF y vasculotropina. Más tarde, ambas moléculas resultaron ser iguales. (Tabla 10).

Hoy día, es conocido que la angiogénesis no sólo interviene en el crecimiento tumoral mediante la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la red vascular preexistente, sino que la angiogénesis también interviene en el desarrollo y en la transformación de una lesión inicialmente premaligna a una maligna (Hanahan 1996), también en el paso de las células cancerígenas al torrente circulatorio (Liotta 1988) y en el crecimiento de metástasis latentes (Holmgren 1995). De modo que la angiogénesis está implicada tanto desde los primeros inicios del desarrollo del cáncer hasta las etapas más avanzadas cuando aparecen metástasis a distancia.

Tabla 10. Cronograma de los descubrimientos sobre la angiogénesis

AÑO	EVENTO
1787	John Hunter, cirujano inglés, describió la angiogénesis como un fenómeno que ocurría en el desarrollo de las astas de los ciervos.
1858	Virchow describió la riqueza vascular que caracteriza a los tumores malignos.
1890	Goldman observó la formación anómala y desestructurada de vasos sanguíneos en el tejido tumoral.
1935	Tremain, patólogo norteamericano, describió la angiogénesis que tenía lugar en la placenta de las monas.
1968	Greenblatt propuso que era el propio tumor el que producía una sustancia que inducía la angiogénesis.
1971	Folkman estableció que el tumor para crecer depende de la angiogénesis. Así, su inhibición podría ser un objetivo importante para frenar el crecimiento tumoral.
1984	Se purificó el primer factor angiogénico, llamado factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).
1989	Se descubrió el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).
1992	Se realizó el primer ensayo clínico con un agente antiangiogénico.
Desde 1999	Se desarrollaron ensayos clínicos para evaluar agentes antiangiogénicos en el cáncer.

1.6.- Hipoxia y fisiopatología. HIF-1 α .

El ser humano, como organismo multicelular y complejo, necesita para el correcto funcionamiento y desarrollo de sus células y, por tanto, de sus diferentes tejidos, órganos y aparatos, un aporte adecuado de oxígeno y nutrientes. El pulmón permite el intercambio gaseoso con el medio externo, recoge la sangre oxigenada y la vierte sobre el corazón que, a modo de bomba, lanza la sangre a través del torrente circulatorio al resto de órganos, tejidos y células. El vehículo de transporte en concreto son los eritrocitos o hematíes, quienes proveen las moléculas de oxígeno para las necesidades celulares.

Cuando no hay un aporte suficiente de oxígeno en las células se da una situación de hipoxia tisular y las células responden para intentar adaptarse a las nuevas condiciones del medio circundante. Todas las células nucleadas del cuerpo humano detectan los cambios en la concentración de oxígeno y producen una respuesta a la hipoxia. Dicha situación puede ser aguda o crónica. Las situaciones agudas, que pueden variar desde segundos a minutos, ocurren como resultado de alteraciones en proteínas preexistentes (mediante procedimientos de fosforilación y reacciones de reducción-oxidación, básicamente). Sin embargo, la hipoxia crónica que puede durar minutos, horas o más tiempo, conlleva una alteración en la expresión génica (Semenza GL. J Appl Physiol 2000). De este modo, la homeostasis del oxígeno es fundamental para la supervivencia.

La hipoxia es la responsable de numerosas situaciones de morbilidad y mortalidad como pueden ser, por ejemplo, la enfermedad pulmonar, la cardiopatía isquémica, la arteriopatía periférica, la isquemia cerebral, etc. Si la hipoxia es muy prolongada o intensa puede producir la muerte celular al inducir la apoptosis. Por otro lado, la hipoxia también tiene un papel manifiesto durante el crecimiento tumoral. Se ha llegado a observar de forma directa la presencia de hipoxia en los tejidos cancerígenos humanos mediante la utilización de electrodos de oxígeno y se comprobó que una tensión de oxígeno reducida en los tumores se asocia con una mayor frecuencia de metástasis y, por tanto, un peor pronóstico con una supervivencia más corta en pacientes con tumores de cabeza, cuello y mama (Hockel 2001).

Así, las células tumorales también se ven afectadas por la hipoxia a medida que el tumor va creciendo de tamaño, ya que, a pesar de los nuevos vasos que se forman (angiogénesis), el aporte sanguíneo es insuficiente por ser vasos aberrantes con un flujo sanguíneo más obstaculizado que dificulta el aporte de oxígeno (Vaupel 2004). Las células tumorales sufren cambios adaptativos a la hipoxia induciendo una serie de mecanismos moleculares más o menos complejos. Estos cambios en su expresión génica les permiten sobrevivir en condiciones de hipoxia e incluso multiplicarse. Uno de los principales mecanismos por el que las células responden a una reducción en el nivel de oxígeno es mediante el factor inducible por la hipoxia 1 (HIF-1: *hypoxia inducible factor 1*). El HIF-1 es un heterodímero formado por dos subunidades llamadas HIF-1 α y HIF-1 β , este último también conocido como translocador nuclear de aril hidrocarbano (ARNT: *aryl hydrocarbon nuclear translocator*). La proteína HIF-1 α está formada por 826 aminoácidos y la HIF-1 β por 774 o 789 aminoácidos como resultado de la expresión o no de un exón que codifica 15 aminoácidos. Hay varios tipos de subunidad α : HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α . Cada subunidad alpha se une a una subunidad β o ARNT: ARNT (HIF-1 β), ARNT2 y ARNT3. Las moléculas HIF-1 α y ARNT (HIF-1 β) están expresadas en prácticamente todos los tejidos humanos. Sin embargo, las moléculas HIF-2 α , HIF-3 α , ARNT2 y ARNT3 no están tan presentes en los diferentes tejidos (Semenza 2000).

Como cualquier proteína, la cantidad o concentración de HIF-1 α viene determinada por el equilibrio entre su síntesis y su degradación. En condiciones de homeostasis celular hay presencia de oxígeno y el HIF-1 α se une a la proteína supresora de tumor llamada von Hippel Lindau (VHL). Esta interacción hace que HIF-1 α sea ubiquitinizado y dirigido a los proteosomas para su degradación, de modo que se impide el acúmulo de HIF-1 α (ver figura 7). En el cáncer de riñón y en hemangioblastomas se han observado mutaciones en VHL y como consecuencia un aumento de HIF-1 α (Maxwell 1999). Una enzima prolil-hidroxilasa está implicada en el mecanismo por el que las células detectan la hipoxia y regulan la expresión de HIF-1 α . Dicha enzima necesita oxígeno, hierro ferroso y oxoglutarato para realizar su actividad, que consiste en añadir residuos hidroxilo sobre los aminoácidos prolina 402 y 564 de HIF-1 α . Esto hace que HIF-1 α interaccione con la proteína VHL para que sea ubiquitinizado y degradado por los proteosomas. Cuando hay hipoxemia la enzima prolil-hidroxilasa no actúa, de este modo, HIF-1 α permanece estable sin que sea degradado (Jaakkola 2001) (Semenza 2003). El

HIF-1 α que no ha sido degradado, es translocado hacia el núcleo celular donde interacciona con otras proteínas o cofactores como ARNT(HIF-1 β), DNA polimerasa-II, etc. y allí se une a elementos sensibles a la hipoxia (HRE: *hypoxia responsive elements*) del ADN para activar la transcripción de más de 60 genes que regulan diferentes procesos biológicos, como por ejemplo: la proliferación celular, la angiogénesis, la apoptosis, la glicolisis, la adhesión celular, la eritropoyesis, el metabolismo del hierro, la regulación del pH, etc. (figura 8). Sin embargo, la síntesis de HIF-1 α también está condicionada por otros mecanismos independientes de la hipoxia, como son las vías del PI3K y la cinasa proteína activada por mitógeno (MAPK: *mitogen-activated protein kinase*) (Semenza 2003).

Las células tumorales han desarrollado mecanismos para evitar la muerte celular inducida por la hipoxia. Con la hipoxia se activa la vía de la glicolisis para la obtención de energía y, como consecuencia de esta ruta metabólica anaeróbica, se obtiene CO₂ y un pH más ácido. Las células tumorales también se han adaptado a crecer y proliferar en un medio con pH más bajo (más acidótico) que las células normales. Parece ser que los cambios en el pH son más importantes en la muerte celular que la hipoxia en sí misma (Harris 2002).

Se ha observado un incremento en los niveles de HIF-1 α en diferentes cánceres, como en el cáncer de cuello (Birner 2000), de mama (Bos 2003), de endometrio (Sivridis 2002) y CPNCP (Giatromanolaki 2001). También se ha comprobado una asociación entre HIF-1 α y la presencia de metástasis ganglionares y a distancia en diferentes tipos histológicos de tumores humanos, así como la relación que comporta con la neovascularización y la proliferación celular (Zhong 1999). Sin embargo, otros autores han encontrado que el HIF-1 α es un factor de mejor pronóstico sobre la supervivencia en el CPNCP (Volm 2000).

Uno de los procesos más conocidos como consecuencia de la activación de HRE es la regulación del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF: *vascular endothelial growth factor*) y su implicación en la formación de vasos o angiogénesis.

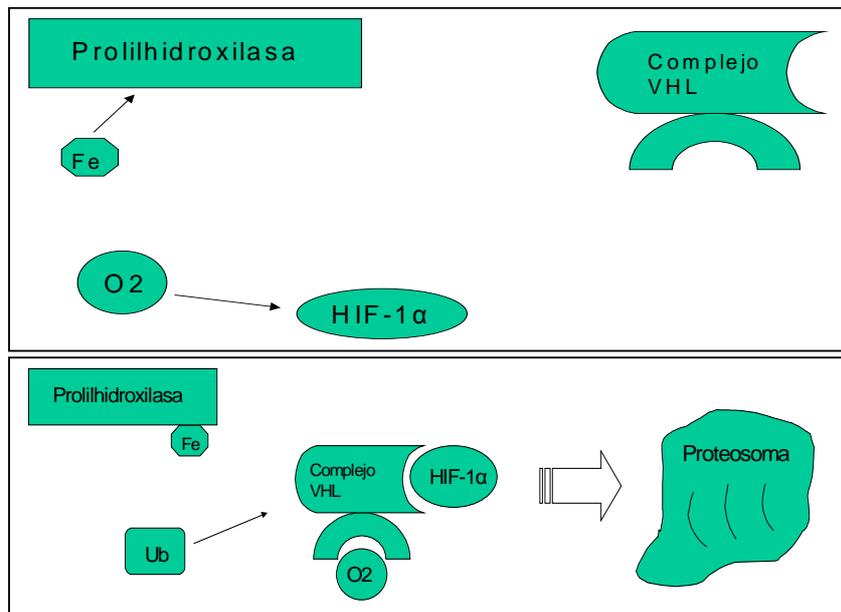


Figura 7. Esquema de la degradación de HIF-1 α en presencia de oxígeno. Fe: hierro. O₂: oxígeno. HIF-1 α : Hypoxia Inducible Factor 1-alpha. VHL: von Hippel Lindau. Ub: Ubiquitina

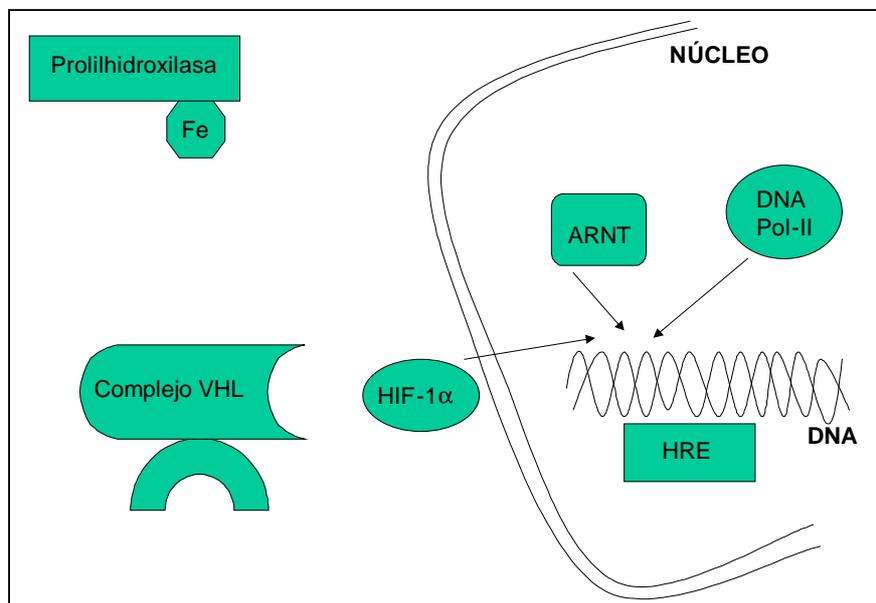


Figura 8. Esquema de la translocación de HIF-1 α no degradado al núcleo celular. Fe: hierro. VHL: von Hippel Lindau. HIF-1 α : Hypoxia Inducible Factor 1-alpha. ARNT: Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator. DNA Pol-II: enzima DNA polimerasa-II. HRE: Elementos sensibles a la hipoxia. DNA: Desoxiribonucleic acid.

1.7.- VEGF

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es el principal factor angiogénico. Aproximadamente, hay un incremento en la expresión de VEGF y/o aumento en la actividad angiogénica en torno al 30-40% de los pacientes con cáncer de pulmón no-célula pequeña (CPNCP) (O'Byrne 2000). Hay varios estudios donde los resultados muestran un peor pronóstico ante la presencia de neoangiogénesis en los pacientes con cáncer de pulmón (Macchiarini 1992, Fontanini 1997, Matsuyama 1998, Yano 2000, Han 2001, Giatromanolaki 2001).

El VEGF es una glicoproteína de unos 45 KDa codificada en un gen del cromosoma 6 en su brazo corto (6p21), se puede unir a la heparina y tiene una cierta homología con el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). Al menos se han descrito cinco miembros de la familia VEGF: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E. El VEGF-A es el principal en la participación angiogénica. Existen seis isoformas del VEGF humano; todas las isoformas proceden del mismo gen mediante divisiones alternativas (splicing): VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆, de modo que este subíndice indica el número de aminoácidos que contiene la molécula. Se ha comprobado que, in vivo, sólo las tres primeras isoformas son secretadas y promueven la angiogénesis; y que el VEGF₁₆₅ (el más importante) es secretado por las células benignas y malignas (Park 1993). Todas estas isoformas se pueden unir a los receptores VEGFR1 y VEGFR2 que tienen actividad tirosin-cinasa intrínseca. Los receptores VEGFR1 y VEGFR2 intervienen en el desarrollo embrionario del sistema cardiovascular y en su maduración postnatal. VEGFR2 es el principal mediador en la mitosis, angiogénesis y permeabilidad vascular inducido por VEGF. Por otro lado, VEGFR1 interviene en la diferenciación vascular, en la organización arquitectural, en la hematopoyesis y no posee actividad mitogénica (Bremnes 2006).

El VEGF-A tiene afinidad principalmente por las células endoteliales y es secretado por varios tipos celulares como macrófagos, células del estroma, células epiteliales de la retina y por células malignas. El VEGF-A parece carecer de actividad mitógena sobre otro tipo de células benignas e interviene en la regulación del crecimiento de los vasos sanguíneos, tanto de forma fisiológica como en el crecimiento patológico (Ferrara 2001, Folkman 1995 y Brem

1999). Este factor actúa sobre todos los pasos de la angiogénesis: se une a receptores de las células endoteliales de los vasos vecinos y activan a dichas células endoteliales que sintetizan unas enzimas para disolver la membrana basal formando pequeños orificios. Moléculas de adhesión facilitan la protrusión de las células endoteliales a través de estos orificios de la membrana basal. Las metaloproteinasas de matriz disuelven el tejido circundante y así van avanzando las células endoteliales que, a su vez, se organizan para conformar un tubo vascular. Finalmente, sobre el nuevo vaso se depositan pericitos para proporcionar estabilidad. (Kumar 1998) (Figura 9).

Cuando el tumor va creciendo, las células malignas se van privando del oxígeno al aumentar la distancia hacia los vasos sanguíneos circundantes y así se va creando un ambiente hipóxico. La hipoxia en estas células promueve, a través de HRE, la producción de VEGF-A (Levy 1996). No solamente la hipoxia favorece la síntesis de VEGF-A sino que otras circunstancias también intervienen como la inactivación de p53 o el gen de von Hippel Lindau, mutaciones del oncogén Ras o expresión del oncogén Src, entre otros (Mukhopadhyay 1995).

También se ha observado que las distintas clases de la familia de VEGF desempeñan un papel pronóstico diferente entre los subtipos de CPNCP, indicando que el papel o mecanismo de los miembros integrantes de la familia de VEGF tiene una función diferente sobre la angiogénesis (Nakashima 2004). Por ejemplo, el VEGF-A se cree que actúa directamente estimulando la angiogénesis, mientras que el VEGF-C parece ser que favorece la entrada de las células tumorales en los vasos linfáticos (Niki 2000). Hay muchos más estudios sobre pacientes con cáncer de pulmón no-célula pequeña donde la fuente de obtención del VEGF-A fue la sangre y son menos frecuentes los que determinan el VEGF-A directamente sobre el tumor, debido a que la obtención sobre la sangre es más accesible, se puede hacer una evaluación antes y después del tratamiento, es más económico y conlleva menos tiempo. Sin embargo, tienen inconvenientes como la

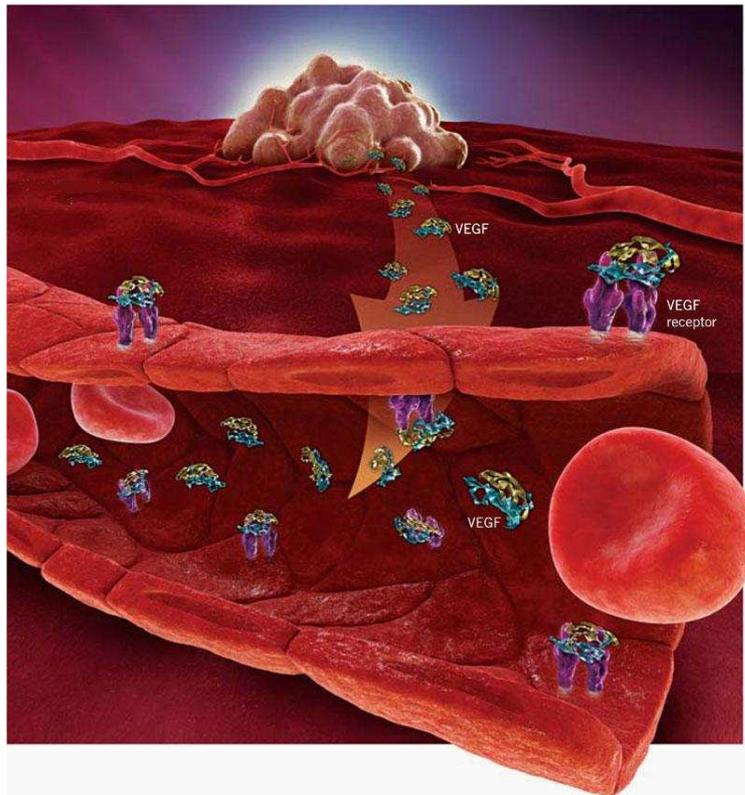


Figura 9. Ilustración de cómo interacciona el VEGF-A secretado por el tumor con las células endoteliales en la angiogénesis.

variabilidad en la detección de la cantidad total de VEGF circulante frente al VEGF libre, o el empleo de anticuerpos específicos para determinadas isoformas de VEGF; además, el VEGF es liberado no sólo por las células tumorales sino también por plaquetas y leucocitos, y no hay pautas o protocolos internacionales establecidos para el procesamiento de factores angiogénicos en sangre, con lo que, en teoría, se hace menos exacta la comparación entre diferentes grupos de investigación (Bremnes 2006).

Se ha demostrado sobreexpresión de VEGF en tumores diferentes como en pulmón, mama, tracto gastrointestinal, riñón y ovario. La expresión de VEGF varía, no sólo entre los diferentes carcinomas mencionados, sino que en el mismo tumor hay variaciones. Es decir, la expresión de VEGF es mayor en las zonas tumorales que más hipoxia sufren y que están próximas a zonas de necrosis tisular (Bremnes 2006). En 1996, el grupo alemán de Mattern et al. estableció por primera vez la relación entre el VEGF y el

CPNCP y demostró la implicación pronóstica negativa del VEGF (Mattern 1996). Desde entonces se han publicado numerosos trabajos sobre VEGF y CPNCP. En la mayoría de ellos se observó que representa un factor de pobre pronóstico sobre la supervivencia, sin embargo, también hay estudios con resultados opuestos. De este modo, el tema es controvertido y la realización de estudios prospectivos con grupos de pacientes más homogéneos encauzará esta discusión hacia una conclusión más firme. Sin embargo, dos revisiones sistemáticas con metaanálisis concluyeron que la sobreexpresión de VEGF implica un peor pronóstico sobre la supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón (Zhan 2009, Delmotte 2002).

El estudio de VEGF-A en muestras de sangre periférica se ha llevado a cabo de forma extensa en pacientes con cáncer de pulmón. El incremento de VEGF-A en los pacientes con CPNCP es de origen tumoral. Sin embargo, las plaquetas también son productoras de VEGF-A. Esto indica un sesgo o un factor a tener en cuenta en aquellos pacientes con trombocitosis (Bremnes 2006). En este estudio, el VEGF-A se determinó en el propio tejido tumoral, representando una muestra directa de la fuente productora de esta citocina. La muestra tumoral se extrajo en el mismo quirófano tras la observación macroscópica del tumor al completar la resección pulmonar. Así, queda asegurada la rápida conservación de la muestra al depositarla casi de inmediato en su recipiente con RNA-later®. Esta forma de seleccionar la muestra para el estudio puede implicar un defecto, en el sentido de que el tumor puede contener áreas heterogéneas con diferente oxigenación, diferente vascularización, zonas necróticas, microabscesos, etc. Una posible mejoría sobre esta cuestión, puede conseguirse tomando las muestras tras ser revisadas por un anatomopatólogo al examinar los tejidos con más detalle y minuciosidad al microscopio y guardar una muestra de la zona que más interese. Se tomaron muestras de la periferia tumoral evitando el centro, que es donde suele haber más necrosis y tejido desvitalizado.

El incremento de VEGF-A en el suero está relacionado con un peor pronóstico de la enfermedad (Brattström 2004) y hay autores que defienden el tratamiento adyuvante con anticuerpos anti-VEGF (como bevacizumab) apoyándose en sus resultados más desfavorables para aquellos pacientes con mayor expresión de VEGF-A (O'Byrne 2000, Shibuya 2008, Niklinska 2001, Kuhn 2006, Laack 2005). El análisis en suero de las moléculas angiogénicas también puede hacerse de forma cuantitativa, objetiva e

independiente del observador. Sin embargo, es una medida indirecta de la actividad angiogénica en pacientes con cáncer. Los estudios llevados a cabo en muestras tumorales suelen ser realizadas con inmunohistoquímica y la mayor o menor fluorescencia o intensidad luminosa observada al microscopio determinan si un tumor presenta mayor o menor actividad angiogénica (alta, media o baja). Este método es más subjetivo y dependiente del observador. Por el contrario, la utilización de RT-PCR sobre tejido tumoral expresa en valores cuantitativos la mayor o menor presencia de las moléculas, citocinas o genes que nos interesen investigar, es un valor continuo, no depende del observador y es fácilmente reproducible.

Una teórica aplicación al ámbito de la práctica clínica habitual sería poder evaluar determinadas moléculas o citocinas del paciente enfermo de una forma rutinaria y fácilmente accesible. La sangre es un medio muy accesible y posibilita conocer el estado previo y el posterior al tratamiento. Sin embargo, conservar un fragmento tumoral tras la extirpación quirúrgica facilita la cuantificación directa de la fuente productora y permite obtener material tumoral para el estudio de alteraciones en su material genético, proteico o estructural y realizar estudios con una visión pronóstica más detallada que aporten más precisión al actual sistema TNM. Pero por contra, este procedimiento requiere cierta infraestructura y aparataje que no poseen todos los centros (aunque económicamente es bastante asequible), conlleva tiempo y dedicación para procesar las muestras. No obstante, el futuro del tratamiento de las enfermedades oncológicas, como es el cáncer de pulmón, está enfocado a un mejor conocimiento de las alteraciones celulares y moleculares de los tumores.

1.8.- Marcadores tumorales y biología molecular en el cáncer de pulmón.

Un marcador tumoral es una sustancia, generalmente de naturaleza proteica, que es sintetizada por las células tumorales, o bien, elaborada por células normales del organismo bajo la inducción de las células tumorales. En situación fisiológica, estos marcadores tumorales también existen y su nivel se puede cuantificar, aunque se encuentra en unas concentraciones reducidas. Hay muchos tipos de marcadores tumorales. Unos son producidos por algunos tumores determinados y otros pueden

detectarse en multitud de neoplasias. Estas sustancias pueden detectarse en la sangre periférica de los pacientes con cáncer o en la orina y también en el propio tejido tumoral. Sin embargo, los marcadores tumorales pueden detectarse elevados en ciertas situaciones sin que exista enfermedad neoplásica o cuando ocurren otras condiciones patológicas no cancerosas, como por ejemplo, en la insuficiencia renal, en hepatitis, en infecciones como la tuberculosis, etc. De este modo, los marcadores tumorales no son, en sí mismos, diagnósticos de un proceso maligno subyacente, pero sí son una herramienta más que, incluida en el contexto clínico y en la evolución, pueden ayudar a orientar sobre el diagnóstico de una enfermedad neoplásica maligna. También tienen un papel importante en el seguimiento del paciente. Tras aplicar un tratamiento, ya sea quirúrgico o médico, las células tumorales desaparecen o se reducen en número y así, disminuye la concentración de los marcadores tumorales hasta unos niveles considerados normales. De este modo, una recidiva de la enfermedad puede reflejarse como un incremento en la cuantificación de los marcadores tumorales durante el seguimiento del paciente. Los más utilizados en el CPNCP son el CEA (antígeno carcinoembrionario), CA 19.9, (antígeno carbohidratado), CA 125 y SCC (carcinoma de células escamosas). Por estas razones, su utilización y su interpretación debe ser acorde al contexto y a la situación propia de cada paciente (Ferrigno 1994).

Con el término carcinogénesis se entiende un proceso molecular y celular en el que ocurre una alteración sobre el control del ciclo celular. Así, las células comienzan a duplicarse sin control y esta situación lleva posteriormente a un estado macroscópico de la enfermedad que se denomina cáncer. La palabra cáncer procede del latín cancer / cancri y del griego Kárkinos que significan cangrejo. Hace alusión a la invasión de los tejidos vecinos con el desarrollo de la enfermedad y su penetración en ellos a modo de prolongaciones o patas como las de un cangrejo. Por tanto, el cáncer es una situación de enfermedad que afecta inicialmente a unas células y que con el transcurso del tiempo se produce su expansión para hacerse manifiesta a nivel tisular con invasión local de los tejidos circundantes, hasta finalmente extenderse a distancia (metástasis).

El cáncer es de origen esporádico en la mayoría de los casos, pero entre un 5%-10% se origina por alteraciones o predisposiciones genéticas heredadas. En este sentido, el cáncer es por tanto heredable con una susceptibilidad genética que se puede manifestar en los diferentes individuos de un grupo familiar (Haber 1998). Las alteraciones

genéticas o mutaciones pueden tener lugar a nivel molecular (sustitución, inserción o delección de bases), cromosómico (delecciones o supresiones, translocaciones, duplicaciones e inversiones) y genómico (poliploidía, aneuploidía). Con las delecciones lo que suele ocurrir es la pérdida de algún gen supresor de tumor (como el gen p53, Rb, 3p, etc.), mientras que con las translocaciones, duplicaciones e inversiones lo que suele ocurrir es la activación de protooncogenes implicando la expresión de oncogenes y proteínas que alteran el ciclo celular normal. Entre las delecciones más frecuentes en el CPNCP están las que afectan a los cromosomas 3p donde se encuentran el gen hMLH1 (Human Mut.Homologue1) que es un gen reparador de ADN y el gen FHIT (Fragile Histidine Triad) relacionado con el control del ciclo celular y su pérdida favorece la síntesis y duplicación de ADN (Lukeis 1990). También el cromosoma 5q21 que contiene los genes supresores tumorales MCC y APC (Sánchez-Céspedes 1997, Sánchez-Céspedes 1998 y Sánchez-Céspedes 2001). Otros cromosomas, implicados en las delecciones son el 13q y 17p, con la respectiva pérdida de los genes supresores tumorales del retinoblastoma y de p53.

La carcinogénesis es un proceso continuo con una serie de etapas que pueden establecerse de la siguiente manera:

-Una etapa inicial, que es cuando ocurre la alteración molecular en el material genético con activación de protooncogenes, expresión de oncogenes, defectos o inactivación de genes supresores de tumor, etc. Esto ocurre por la acción de agentes carcinogénicos (agentes químicos, físicos, microbiológicos, etc) y por errores en la elaboración y procesamiento del material genético. En este momento, de la actuación y de la eficacia de los sistemas reparadores dependerá que la alteración genética finalice o se perpetúe.

-Una siguiente fase donde las lesiones moleculares se mantienen al sobrevivir las células lesionadas. Así, aumenta la posibilidad de daño genético por incremento en la acumulación de mutaciones.

-Posteriormente, se produce el crecimiento autónomo y la proliferación celular independientemente de los carcinógenos. Se producen cambios en el contenido y en la estructura del material genético como aneuploidía, ganancia o pérdida de cromosomas, incremento de las mutaciones, mayor probabilidad de amplificación de genes, etc.

-Y finalmente, el tumor evoluciona hacia una fase de invasión local y de metástasis a distancia (Scheiner 2004).

El ciclo celular consiste en una serie de procesos destinados a la obtención de dos células descendientes con un contenido genético igual al de su célula inicial progenitora. Este ciclo celular y su crecimiento se produce de una forma ordenada y controlada. Cada tejido tiene su ritmo de crecimiento y duplicación, por ejemplo, las células endoteliales se dividen cada tres años, las del hígado una vez al mes, las del colon cada 39 horas y las del carcinoma bronquial cada 200 horas aproximadamente (García Foncillas 2003). Un ciclo celular normal tiene las siguientes fases (figura 10):

M (→ G0) → G1 → S → G2 → M

La fase M es la de mitosis, con la división de una célula inicial en dos células descendientes con igual contenido genético. Esta fase se subclasifica en varias más, que son la interfase, profase, metafase, anafase y telofase.

En la fase G0, algunas células detienen su progresión y no se dividen más. De modo que permanecen en esta fase un periodo indefinido de tiempo.

La fase G1 es la que continua a la mitosis y durante este tiempo la célula aumenta su tamaño debido a la síntesis de sus componentes, como consecuencia de la transcripción y de la traducción de los genes que cada célula expresa. En esta fase existe un punto de control en el que la célula comprueba que los procesos de la fase anterior fueron correctos, para asegurarse que todo está en condiciones y llevar a cabo la síntesis de ADN en la siguiente fase.

La fase S o síntesis es en la que ocurre la replicación del ADN y cada cromosoma presenta dos cromátidas.

En la fase G2, la célula continúa creciendo y sintetizando proteínas. Al final de esta fase existe un control para determinar si la célula debe entrar en mitosis y dividirse.



Figura 10. Esquema de las fases de la división del ciclo celular.

En el ciclo celular de las células tumorales ocurre una alteración entre la fase G0 y G1. Se produce un crecimiento desmesurado sin control y una pérdida de la especialización celular. Se pierde el equilibrio entre proliferación celular y quiescencia, y hay una ausencia de sensibilidad a factores de diferenciación terminal, lo que conlleva un incremento del crecimiento celular. En definitiva, ocurre un escape de las células tumorales al mecanismo de senescencia proliferativa, una ausencia de apoptosis y una inmortalidad celular.

Los genes supresores tumorales, también llamados oncogenes recesivos o antioncogenes, son genes que se encargan de suprimir la neoplasia. Son recesivos porque la fusión de células normales y células neoplásicas suele producir una supresión de la neoplasia. Para que ocurra una proliferación tumoral maligna por alteración de los genes supresores tumorales, debe ocurrir que ambos alelos de esos genes tengan una pérdida de función, que suele ocurrir generalmente por mutación. Cuando los genes supresores de tumor son inactivados provocan la pérdida de la regulación de las vías de crecimiento y de la diferenciación con el consiguiente incremento en la probabilidad de transformación maligna. Entre algunos de estos genes supresores de tumor destacan el Rb que al inactivarse origina el retinoblastoma y el osteosarcoma, el p53 que está relacionado con el cáncer de mama, de colon y de pulmón. La presencia de las mutaciones de p53 es muy frecuente en el cáncer de pulmón y varían desde delecciones

amplias hasta mutaciones puntuales. La mutación más habitual es la transversión de GC a TA que está relacionada con el tabaco. La mutación del gen p53 es un indicador de mal pronóstico en el cáncer de pulmón, sobre todo en el adenocarcinoma (Mitsudomi 2000).

Los protooncogenes son genes normales de las células que se encargan de codificar proteínas celulares e intervienen en la proliferación y diferenciación celular. Cuando los protooncogenes están alterados tras sufrir una mutación se les denomina oncogenes y su activación produce una desregulación del crecimiento y de la diferenciación celular. De esta forma, aumenta la posibilidad de transformación neoplásica. Estas alteraciones suelen ser dominantes, es decir, que la presencia de una mutación en un alelo desarrolla la enfermedad. Los oncogenes se designan con tres letras, por ejemplo, src para el virus del sarcoma de Rous. Las familias de oncogenes más conocidas son la familia ras (H-ras, K-ras y N-ras) y la familia myc (C-myc, N-myc, L-myc) que son expresados en el cáncer de pulmón con gran frecuencia.

El cáncer de pulmón por su importancia epidemiológica en nuestro medio, por su estadio avanzado globalmente en el momento del diagnóstico, por su mal pronóstico en general, por conseguir una limitada mejoría de su supervivencia respecto a algunas décadas atrás y por el importante desarrollo de las líneas de investigación biomoleculares modernas, hace que sea un reto importante y de actualidad para conseguir un mejor conocimiento de los mecanismos implicados en su agresividad, en sus vías de progresión y metástasis y en individualizar, sobre cada paciente, la expresión de determinados genes o proteínas con la enfermedad tumoral para aportar el tratamiento más idóneo y efectivo; ya sea combinado con los diferentes tratamientos (quimioterapia, radioterapia, cirugía) o con nuevos fármacos específicos atendiendo al perfil biomolecular que cada paciente exprese.

Los diferentes marcadores moleculares estudiados en el cáncer de pulmón pueden ser utilizados como factores de predicción de la respuesta al tratamiento o también como dianas terapéuticas, como por ejemplo: anticuerpos humanizados frente a determinados receptores celulares, inhibidores específicos de complejos enzimáticos, reintroducción de genes normales a través de vectores virales, etc. (Egri 2006, Rosell 2006).

Los sistemas de clasificación actuales clinicopatológicos (TNM) son los que mejor predicen el pronóstico del paciente, sin embargo, no pueden definir de forma más exacta e individualizada cómo será el transcurso de la enfermedad de cada paciente en concreto.

Es conocido que pacientes con un mismo estadio inicial anatomopatológico desarrollan metástasis más precoces que otros pacientes en el mismo estadio, también que pacientes con enfermedad localmente avanzada resisten más, con el tratamiento adecuado, la progresión de la enfermedad y la aparición de metástasis a distancia que otros pacientes con la misma extensión de la enfermedad (Duchesne 1994. Padilla 2002). Por tanto, hay todo un mundo biomolecular y celular que se investiga constantemente para conocer qué marcadores moleculares pueden ser de mayor utilidad para ofrecer el mejor tratamiento y establecer el pronóstico de forma más precisa. El uso de los marcadores moleculares como factores pronósticos todavía no se ha generalizado debido a que hay resultados contradictorios en la bibliografía científica y también deben cumplir unos criterios, entre otros, de fácil reproducibilidad, bajo coste económico, etc.

El presente estudio pretende analizar la expresión relativa cuantificada mediante RT-PCR de VEGF-A y HIF-1 α sobre el pronóstico de los pacientes operados de CPNCP para intentar contribuir al conocimiento de la influencia que pueden ejercer en la mencionada enfermedad.

2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis planteada fue la siguiente:

- Si con el crecimiento tumoral ocurre una hipoxia celular que induce la expresión de HIF-1 α y de VEGF-A y, a su vez, un desarrollo de la angiogénesis que posibilita la progresión tumoral y su diseminación, la sobreexpresión de VEGF-A y HIF-1 α indicará un peor pronóstico con un periodo libre de enfermedad más corto y una supervivencia más reducida.

Los objetivos propuestos fueron los siguientes:

- Cuantificar la expresión relativa mediante RT-PCR de VEGF-A y de HIF-1 α en el tejido tumoral de la pieza de resección conservada con el medio RNA-later® en pacientes con CPNCP sometidos a tratamiento quirúrgico con intención curativa.
- Analizar la relación entre las expresiones de VEGF-A y HIF-1 α con respecto a:
 1. las características clinicopatológicas de los pacientes
 2. (T N M)p y el estadio final
 3. la recidiva tumoral locorregional y a distancia
 4. el periodo libre de enfermedad
 5. la supervivencia

3.- PACIENTES Y MÉTODO

Se trata de un estudio prospectivo, en el que se incluyeron a los pacientes operados desde el 21 de abril de 2004 (fecha en la que se operó el primer paciente) hasta el 31 de mayo de 2008 (fecha en la que se operó el último paciente). Los pacientes fueron intervenidos en el Servicio de Cirugía Torácica del Hospital General Universitario de Valencia y en la Unidad de Cirugía Torácica del Hospital General Universitario de Albacete. El periodo de seguimiento de este estudio finalizó el 31 de noviembre de 2008. Todos los pacientes fueron presentados en el Comité de Tumores de Tórax donde participaron los siguientes especialistas: Cirugía Torácica, Oncología Médica, Oncología Radioterapéutica y Neumología. Este estudio contó con la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica y de la Comisión de Investigación del Hospital General Universitario de Valencia y de Albacete. Todos los pacientes incluidos firmaron el Consentimiento Informado.

3.1.- Criterios de inclusión

-Se incluyeron a todos los pacientes con CPNCP que recibieron tratamiento quirúrgico con intención curativa.

-También a aquellos pacientes con un tumor pulmonar sin diagnóstico histológico preoperatorio pero con sospecha de CPNCP y que fue confirmado tras la resección quirúrgica.

Después de la cirugía, los pacientes recibieron tratamiento adyuvante cuando hubo afectación ganglionar metastásica. Este tratamiento fue proporcionado por los oncólogos de los diferentes hospitales de procedencia.

3.2.- Criterios de exclusión

Quedaron excluidos de este estudio los pacientes que cumpliesen las siguientes condiciones:

- 1- no tratarse de un cáncer de pulmón no-célula pequeña (CPNCP).
- 2- negarse a participar en el estudio.
- 3- recibir un tratamiento quirúrgico no curativo (R1-R2, ver tabla 7 pág 27, o bien que fuese una cirugía exploradora sin posibilidad de resección)
- 4- fallecimiento en el periodo postoperatorio: periodo de tiempo comprendido desde la intervención quirúrgica hasta los 30 primeros días o hasta que el paciente fue dado de alta hospitalaria (en caso de que su estancia superase los 30 días).
- 5.- recogida de las muestras de tejido pulmonar de forma inadecuada o no válidas para su procesamiento.
- 6.- pacientes N2c (enfermedad localmente avanzada preoperatoria) o que recibieron tratamiento neoadyuvante (quimio- y/o radioterapia).
- 7.- otras neoplasias sincrónicas o metacrónicas (en un intervalo de tiempo inferior a 5 años).

3.3.- Evaluación preoperatoria

Todos los pacientes fueron sometidos a un estudio preoperatorio con una anamnesis y exploración física inicial orientada hacia los signos y síntomas que pueden guiar sobre la localización del tumor y su extensión (presencia de ganglios palpables o sospechosos de ser patológicos, dolor torácico o tumor palpable en el tórax, presencia de disnea, tos o hemoptisis, fiebre en caso de un tumor abscesificado o neumonitis obstructiva, auscultación respiratoria, semiología de derrame pleural, etc). Los criterios sobre la elección de los pacientes y su tratamiento quirúrgico fue el mismo en ambos hospitales.

Las exploraciones complementarias consistieron en la realización de un análisis de sangre (incluyendo hemograma, bioquímica y coagulación), electrocardiograma, espirometría, fibrobroncoscopia con BAS-BAL y/o biopsia endobronquial, radiografía simple de tórax en dos proyecciones (posteroanterior y lateral), TC de tórax y de abdomen superior incluyendo ambas glándulas suprarrenales. No se realizó TC craneal ni gammagrafía ósea de forma rutinaria, sino sólo en caso de sospecha clínica por su sintomatología o alteraciones analíticas (elevación del calcio o fosfatasas alcalinas). Se realizó gammagrafía de ventilación-perfusión pulmonar cuando el FEV1 fue menor del 60% o cuando se preveía una neumonectomía para determinar con más exactitud el FEV1ppo. Los pacientes con un FEV1ppo <35% del teórico o FEV1ppo < 800 ml no fueron considerados aptos para el tratamiento quirúrgico.

La RNM se utilizó para la evaluación de las glándulas suprarrenales en caso de sospecha de estar afectadas por metástasis en la TC, o bien para la evaluación de la relación que el tumor presentase con los grandes vasos intratorácicos o con la columna vertebral.

Los pacientes con antecedentes o con sospecha de cardiopatía isquémica llevaron a cabo un estudio cardiológico con las exploraciones complementarias pertinentes (ecocardiografía, prueba de esfuerzo, coronariografía, etc). Según dichas pruebas fueron aceptados o excluidos para el tratamiento quirúrgico.

Los ganglios mediastínicos se biopsiaron cuando había sospecha de que pudieran estar afectados. Es decir, cuando el diámetro ganglionar en su eje corto fuera superior a un centímetro y fuesen accesibles a la punción transbronquial, mediastinoscopia o mediastinotomía.

La PET no fue empleada sistemáticamente por no disponer de ella y sólo en los últimos pacientes de la serie se utilizó. Si el estudio con PET indicaba que existía una captación metabólica sólo en el tumor pulmonar, el paciente era sometido a tratamiento quirúrgico. Cuando existía sospecha de lesión maligna en el mediastino (afectación de ganglios linfáticos por su comportamiento metabólico) se procedía a la confirmación histológica con biopsia mediante mediastinoscopia, mediastinotomía, o punción transbronquial; atendiendo a la localización de las adenopatías implicadas

(estaciones ganglionares número 2, 3, 4, 5, 6 y 7). No se utilizó EBUS ni EUS-FNA por no disponer de estos instrumentos en los años en los que se realizó este estudio.

Para la clasificación del cáncer de pulmón se utilizó el sistema internacional TNM de Mountain (Mountain 1997) y la clasificación histológica de la Organización Mundial de la Salud (Travis 2004).

Los pacientes que en el estudio preoperatorio y con las exploraciones complementarias eran clasificados como no N2-3, es decir, que no tuvieran afectación ganglionar mediastínica fueron tratados mediante cirugía con intención curativa. Los pacientes que recibieron tratamiento de inducción (quimio- y/o radioterapia) fueron excluidos, ya que existe la posibilidad de que el tratamiento neoadyuvante al afectar al tumor pueda alterar también la expresión de los genes diana de este estudio; de este modo el grupo resultante fue más homogéneo.

Posteriormente al tratamiento quirúrgico, se ofreció tratamiento adyuvante cuando hubo afectación ganglionar metastásica o en estadios avanzados.

Todo el trabajo de laboratorio, el procesamiento de las muestras y la determinación de las moléculas VEGF-A y HIF-1 α fue realizado sin conocimiento previo de la información clinicopatológica o de la evolución de los pacientes.

3.4.- Procedimiento quirúrgico

La resección pulmonar llevada a cabo fue la lobectomía con disección ganglionar mediastínica como técnica estándar para el tratamiento del cáncer de pulmón (muestreo intraoperatorio de al menos tres estaciones ganglionares incluyendo siempre el grupo subcarinal en los pacientes operados en el Servicio de Cirugía Torácica del Hospital General Universitario de Valencia o mediante linfadenectomía mediastínica sistemática en los pacientes intervenidos en la Unidad de Cirugía Torácica del Hospital General Universitario de Albacete). Sin embargo, en pacientes con pruebas cardiopulmonares límites, con comorbilidad asociada importante y que tuviesen un tumor con un tamaño

inferior a 4 cm se realizaron resecciones sublobares del tipo segmentectomía o resección en cuña. En otros casos, se realizó una resección pulmonar más amplia (bilobectomía o neumonectomía) según la extensión del tumor para llevar a cabo un tratamiento quirúrgico con intención curativa. La incisión quirúrgica fue una toracotomía posterolateral y se realizó una intubación endobronquial selectiva. Todos los pacientes llevaron catéter epidural para analgesia intra- y postoperatoria durante los 3-4 días siguientes. No se utilizó catéter epidural en caso de imposibilidad o limitaciones debidas a la anatomía y movilidad vertebral de cada paciente. Tras la resección se hizo un estudio anatomopatológico intraoperatorio (cortes en congelación) de los bordes de resección para evitar que quedase enfermedad microscópica y ampliar la resección si fuese necesario. El paciente salía de quirófano extubado y con dos tubos de tórax (uno en pacientes con neumonectomía) para ingresar en reanimación donde permanecía una noche. Al día siguiente de la intervención era enviado a la planta de Cirugía Torácica, salvo complicaciones mayores. Todos los pacientes contaron con fisioterapia respiratoria en el postoperatorio.

3.5.- Seguimiento de los pacientes

El seguimiento se llevó a cabo mediante controles radiológicos. Se realizaron radiografías de tórax a las dos semanas y a los tres meses tras ser dado de alta, que es cuando con más frecuencia pueden aparecer problemas relacionados con la cirugía (derrame pleural, atelectasia, neumotórax, etc.) y posteriormente TC toracoabdominal cada seis meses los dos primeros años para continuar después con una periodicidad anual. En el caso de que el paciente presentase signos o síntomas de recidiva tumoral se realizaron las exploraciones complementarias pertinentes y un seguimiento más intenso.

Los pacientes fueron atendidos en las consultas externas de Cirugía Torácica los primeros meses y de forma indefinida si los pacientes no necesitaron tratamiento adyuvante. Aquellos que tuvieron que recibir tratamiento adyuvante fueron seguidos en las consultas de Oncología periódicamente.

Los datos del seguimiento se extrajeron de la revisión de historias clínicas, mediante llamadas telefónicas a los pacientes o a sus familiares, o bien a través de contacto con médicos de otros hospitales que llevaron a cabo el seguimiento.

Cuando hubo sospecha de recidiva tumoral o de metástasis a distancia se intentó la confirmación histológica mediante biopsia o punción, siempre que fue posible, excepto aquellas lesiones que por su localización no fuesen accesibles. La fecha de la recidiva fue considerada aquella en la que se descubrieron las lesiones con la realización de las exploraciones radiológicas.

No se empleó PET para el seguimiento por no estar disponible, excepto en los últimos pacientes de esta serie. Se anotó el lugar de la recidiva: intra- y/o extratorácica.

3.6.- Variables de estudio

Se analizaron las siguientes características clinicopatológicas:

- Edad
- Sexo
- Fumador y cantidad
- FEV1 (Valores absolutos y relativos)
- Hemoglobina basal inicial al diagnóstico
- Comorbilidad asociada (EPOC, HTA, DM, cáncer previo, enferm. cardiovascular)
- Tipo de resección quirúrgica (lobectomía, sublobar, neumonectomía, bilobectomía)
- Complicaciones postoperatorias
- Estancia postoperatoria
- Histología tumoral
- Invasión vascular tumoral microscópica (vasos linfáticos y/o sanguíneos)
- Grado de diferenciación tumoral
- (T N M)p
- Estadio anatomopatológico

Las variables independientes fueron las siguientes:

- VEGF-A (factor de crecimiento endotelial vascular A)
- HIF1 α (factor inducible por la hipoxia 1-alpha)

Como variables dependientes fueron consideradas las siguientes:

- Periodo libre de enfermedad (comprendido desde la fecha de la intervención quirúrgica hasta la fecha de recidiva tumoral, ya sea locorregional y/o sistémica)
- Supervivencia (tiempo desde la fecha de la intervención quirúrgica hasta la fecha de muerte o hasta la fecha del último seguimiento en la consulta o mediante contacto telefónico)
- Existencia de recidiva (local y/o a distancia)

3.7.- Análisis estadístico

Las variables cuantitativas se expresaron como la media \pm desviación estándar. Las variables cuantitativas con una distribución normal se compararon con el test de t-Student y si no siguieron una distribución normal se empleó el test no paramétrico de U-Mann Whitney. Las variables cualitativas se compararon con el test de χ^2 de Pearson; se aplicó el test exacto de Fisher cuando alguna la frecuencia esperada no fue mayor de 5. Las determinaciones de la expresión génica de VEGF-A y HIF-1 α fueron numéricas (variables cuantitativas) y se transformaron posteriormente en variables cualitativas. La supervivencia global se calculó desde la fecha de la cirugía para la exéresis del cáncer de pulmón hasta la muerte o bien hasta el último contacto con el paciente (casos censurados). El día 31 de noviembre de 2008 se concluyó el periodo de seguimiento de este estudio. El intervalo libre de enfermedad se calculó desde la fecha de la intervención quirúrgica para la resección pulmonar hasta la fecha de diagnóstico de recidiva tumoral, ya sea local o a distancia. Se estableció como límite de significación estadística un valor de $p < 0,05$. Pruebas de seguridad y eficacia diagnóstica sobre las variables independientes: sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP), Valor predictivo negativo (VPN) y precisión (P). Las supervivencias medianas y actuariales se

calcularon según el método de Kaplan-Meier. Para la comparación de curvas de supervivencia se utilizó la prueba de los rangos logarítmicos de Cox-Mantel. Se aplicó el modelo de riesgos proporcionales de Cox para analizar el efecto entre las covariables y la supervivencia; en el análisis multivariante se incluyeron las variables que tuviesen en el análisis univariante un valor de $p \leq 0.05$. El criterio usado para la introducción de las covariables fue la prueba de la razón de verosimilitud por pasos hacia delante. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS (*Statistical Package for Social Science*) para Windows, versión 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3.8.- Procesamiento de las muestras tisulares

3.8.1.- Recogida de las muestras de tejido

Durante la intervención quirúrgica, una vez que se extraía la pieza de resección quirúrgica (contiene la tumoración y también parénquima pulmonar sano) se tomaba una muestra de aproximadamente $0,3 \text{ cm}^3$ de tejido pulmonar sano de una zona alejada como mínimo 5 cm del tumor. Esta muestra se sumergía en un tubo de Eppendorf estéril (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) que contenía 1 mL de una solución para estabilizar y conservar el ARN celular al impregnar los tejidos con rapidez (RNAlater®, Ambion Inc. Austin, Texas, USA). Seguidamente, se realizaba el mismo procedimiento sobre el tumor. Se abría ampliamente en dos mitades para observar macroscópicamente un área que fuese considerada adecuada. Esto es, que no contuviese material necrótico, purulento, secreciones mucosas ni procediese de regiones abscesificadas, como podría ocurrir en algunos tumores cavitados. Una vez que se recogían las muestras tisulares ya podían ser almacenadas sin poner en peligro la calidad ni la cantidad de ARN que se obtuviese posteriormente de dichas muestras.

Se recogían dos muestras por cada paciente. Una correspondía al parénquima sano pulmonar y otra al tejido tumoral. Se le asignó un número a cada paciente que se identificó con su nombre, apellidos y número de historia. Además, se rotulaba la fecha de la intervención quirúrgica y sus iniciales para que no diese lugar a ninguna confusión posterior. Las muestras recogidas se almacenaban en un congelador a una temperatura

entre -20 y -80°C . Es preferible conservar a una temperatura de -80°C porque de esta forma se puede realizar hasta 10 veces el ciclo de congelación-descongelación de las muestras sin afectar la calidad del ARN aislado en cada actuación.

3.8.2.- Extracción del ARN

El estudio de laboratorio se realizó sin conocimiento de ninguna característica que vinculase la muestra de tejido con el paciente ni con su evolución.

La muestra conservada en RNAlater® en el congelador se descongeló. Se extrajo la pieza de tejido y se colocó sobre una placa Petri estéril para cortarlo con una hoja de bisturí también estéril. Durante las siguientes etapas fue necesario manipular el material con guantes y usar instrumentación estéril y de un sólo uso para evitar posibles contaminaciones por ácidos nucleicos ajenos a la muestra. Se realizó un corte a la muestra de modo que se obtuvo un peso de tejido entre 50-100 mg. Para ello, previamente se pesó la tapa de la placa Petri vacía y después añadiendo el fragmento de la muestra cortada. El resto de la muestra se sumergió de nuevo en su tubo Eppendorf con RNAlater® y se almacenó de nuevo en el congelador de -80°C .

El método de extracción del ARN utilizado se basa en la propiedad de los ácidos nucleicos de ser más solubles en soluciones acuosas que en solventes orgánicos. La separación diferencial del ARN se realiza mediante fenol/cloroformo y su protección es gracias a la solución de tiocianato de guanidina que actúa como inhibidor de ribonucleasas. El fenol desnaturaliza las proteínas de la muestra y el cloroformo disuelve los lípidos y desnaturaliza proteínas. De esta forma, se forma una fase inferior orgánica que contiene lípidos, proteínas y fragmentos celulares, y una fase superior acuosa que contiene el ARN. La inmiscibilidad de la fase orgánica (fenólica y clorofórmica) con la fase acuosa (contiene el ARN) y su diferente densidad, permite su rápida separación por centrifugación. Las etapas siguientes están destinadas a purificar cada vez más el ARN mediante precipitaciones a baja temperatura con alcoholes (como etanol e isopropanol) y centrifugaciones secuenciales, produciendo un *pellet* cada vez más libre de contaminantes (polisacáridos, sales, etc).

El fragmento de tejido cortado se introdujo en un tubo Eppendorf y se añadió 1 mL de reactivo TRI Reagent® (Molecular Research Center. Sigma-Aldrich Inc. St Louis, MO, USA) que contiene fenol y tiocianato de guanidina con un pH de 4, para destruir las células, desnaturalizar las nucleasas endógenas y evitar la degradación de los ácidos nucleicos. El pH ácido del tampón permite retener el ADN en la fase orgánica y en la interfase, dejando el ARN en la fase acuosa.

Se empleó también un control negativo que contenía agua Mili-Q (250 µl). Todo el agua que se empleó en los análisis fue de calidad Mili-Q® de Millipore.

A continuación, se realizó la homogenización y disrupción de la muestra. Estos dos procesos son un requisito necesario en todos los protocolos de purificación de ácidos nucleicos. En la disrupción se produce la ruptura de la membrana plasmática y de los orgánulos para liberar el contenido en ácidos nucleicos. Así mismo, los agentes inhibidores de nucleasas que contiene el tampón de lisis pueden acceder a los ácidos nucleicos. Por otra parte, la homogeneización es necesaria para reducir la viscosidad de los lisados celulares obtenidos por disrupción. En este paso, se disgregan las proteínas de alto peso molecular junto con los carbohidratos para crear un lisado homogéneo. Una disrupción y/o homogeneización incompleta conlleva una reducción significativa en el rendimiento de la extracción de ácidos nucleicos.

Estos dos procesos se llevaron a cabo en el TissueLyser (QIAGEN®, Ambion Inc, Austin, Texas, USA) que es un aparato para homogeneizar las muestras de forma mecánica. Las muestras se sometieron a una frecuencia de 20 Hz/s durante 5 minutos y se repitió 4 veces. De este modo, se produjo una lisis o rotura del tejido por impactos físicos mediante unas bolas de tungsteno de 3 mm de diámetro que se echaron en el tubo de Eppendorf con el tejido. Las bolas de tungsteno se añadieron manteniendo las condiciones de esterilidad, dentro de una cámara de flujo laminar. El tejido, golpeado con movimientos oscilatorios rápidos y continuos con las bolas de tungsteno, se fue desgarrando y se obtuvo una solución homogénea con el tejido triturado. Este paso se puede realizar varias veces en función de la homogeneización conseguida. A veces, hay tumores más fibrosos que son más difíciles de triturar y debe repetirse este proceso varias veces.

Posteriormente, se incubó la solución, ya más homogénea, durante 5 minutos a 25°C y a 700 rpm en un termobloque (Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Hamburg. Germany) para disociar el complejo nucleoproteico y obtener proteínas y ácidos nucleicos separados. Se añadió cloroformo (0.2 mL por cada 1 mL de TRI Reagent®) y se agitó manualmente unos 15 segundos. Después se incubó durante 15 minutos a 25 °C y 700 rpm. Se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos a 4 °C (Centrifuge 5415R, Eppendorf AG, Hamburg. Germany) y se obtuvieron así tres fases: una acuosa e incolora que contenía el ARN, otra blanca que contenía el ADN y otra roja que contenía las proteínas.

La fase acuosa se recogió en una pipeta y se vertió en un nuevo tubo Eppendorf, se añadió isopropanol para precipitar el ARN (0.5 ml por 1ml de TRI Reagent®) y se mezcló por inversión. Se incubó durante 10 minutos a 25 °C y se centrifugó después a 12000 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se desechó y el sedimento (ARN precipitado) se lavó con etanol al 75% (1 mL de etanol por cada 1 mL de TRI Reagent®). La nueva disolución se centrifugó a 7500 g durante 5 minutos y a 4 °C y nuevamente se descartó el sobrenadante. El sedimento se dejó secar al aire libre para que se evaporase el etanol, a continuación se resuspendió en 50 µL de agua libre de ribonucleasas (RNase-Free Water. QIAGEN GmbH, Hilden. Germany) y se incubó 15 minutos a 55 °C.

3.8.3.- Análisis cuantitativo y cualitativo del ARN

La disolución de ARN obtenida con cada muestra se cuantificó en un espectrofotómetro (NanoPhotometer™. Implen GmbH, Munich. Germany) y también se sometió a una electroforesis (G:BOX, Syngene, Cambridge. United Kingdom) para conocer su integridad.

La cuantificación del ARN se puede realizar en un espectrofotómetro gracias a la propiedad que tienen los ácidos nucleicos de absorber luz ultravioleta a una determinada longitud de onda. Concretamente, el ARN absorbe a una longitud de onda de 260 nm, mientras que las proteínas absorben a 280nm y los compuestos orgánicos y sales que se emplean durante el procedimiento de la extracción del ARN lo hacen a 230 nm. La concentración de ARN se expresó en µg/mL y también se obtuvo la relación entre las

absorbancias A260/A280 y A260/A230. Para considerar válidas estas relaciones la A260 debe ser como mínimo de 0,1. La primera relación debe oscilar entre 1,5-2, así, un valor de 2 nos indica que la pureza de ARN es máxima y valores inferiores a 2 señalan que hay elementos proteicos contaminantes en la muestra de ARN. Igualmente la relación A260/A230 debe ser superior a 1,8 para indicar que hay poca contaminación por materiales orgánicos (fenoles) y sales. Cuanta mayor sea la pureza del ARN aislado mayor será el rendimiento obtenido al realizar la PCR. Es importante determinar la concentración de ARN para cuantificar el peso de ARN empleado de cada muestra en la conversión de ARN a cDNA (retrotranscripción).

La electroforesis permite determinar la calidad del ARN extraído de forma que las bandas de ARN más luminosas y nítidas corresponderán a las de mayor calidad, mientras que las bandas no definidas indican un ARN degradado (*smear*). La luminosidad conseguida en cada calle de ARN se debe al bromuro de etidio que se intercala entre las bases nitrogenadas que componen el ARN y emite fluorescencia al ser iluminado con luz ultravioleta. Con el transiluminador observamos dos bandas en cada calle que corresponden a las dos subunidades de ARN ribosómico, que son la 18S y la 28S (Figura 11).

Preparación del gel al 2% de agarosa empleado en la electroforesis:

- 30 mL de tampón de electroforesis: tris (0,04 M), EDTA (1 mM) y ácido acético (0,02 M).
- 0,6 g de agarosa
- 8 μ L de bromuro de etidio

En cada pocillo se cargaban 2,5 μ L de ARN y 2,5 μ L de tampón de carga. El tampón de carga contiene glicerol y azul de bromofenol. El glicerol aumenta la densidad a la muestra para que se deposite en los pocillos. El azul de bromofenol es un colorante que permite monitorizar hasta donde se ha desplazado la muestra en el gel de agarosa.

Se sometió a 80 voltios durante 30-45 minutos.

La observación y análisis de las bandas se realizó con el programa *GeneSnap from SynGene* (Cambridge.United Kingdom).

Marcador....P.....T.....P.....T.....P.....T.....Cneg
de PM ⁽¹⁾

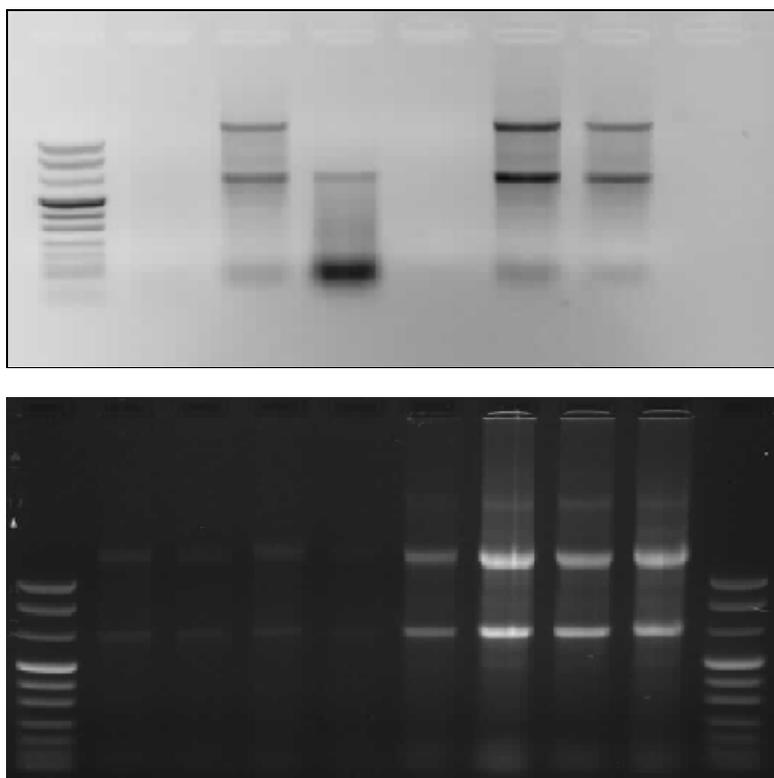


Figura 11: Bandas de electroforesis de ARN.

(1) DNA Molecular Weight Marker VIII: 19-1114 bp (Roche Diagnostics. Mannheim Germany)

P: banda resultante del tejido pulmonar

T: banda resultante del tejido tumoral

Cneg: control negativo de extracción

a.- Conversión del ARN a cDNA (retrotranscripción)

La expresión de un determinado gen se analiza mediante la detección de la cantidad de sustancia transcrita presente. No obstante, el ARN no sirve como molde de la reacción de PCR, por tanto es necesario retrotranscribirlo a cDNA.

Para llevar a cabo la síntesis de cDNA se empleó el Kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* de Applied Biosystems (Foster City, California. USA).

Se preparó una mezcla de reacción para $n + 10\%(n)$ reacciones, siendo n el número de muestras a analizar. El mix se preparó siguiendo las indicaciones del protocolo para un volumen final de reacción de 25 μL por cada muestra:

- 3 μL de Buffer 10X.
- 1.2 μL de dNTPs (ATP, GTP, CTP y TTP) 25X
- 3 μL de los cebadores aleatorios (*Random Primers*) 10X: se unen inespecíficamente a diferentes regiones del ARN.
- 1.5 μL de Multiscribe a 50 U/ μL (es la enzima retrotranscriptasa del virus de la leucemia murina Moloney recombinante)
- 0.25 μL del Inhibidor de RNasa (RNAase Inhibitor Cloned. Ambion, Cambridgeshire. United Kingdom)
- 6.05 μL de agua libre de nucleasas (Nuclease Free Water. QIAGEN GmbH, Hilden. Germany)

A continuación, se añadieron 10 μl de la disolución de ARN aislado previamente (500ng de ARN total ajustados con agua milliQ hasta completar el volumen de 10 μL).

Se emplearon dos controles negativos. Uno contuvo 10 μL de agua libre de nucleasas y 15 μL del kit de Applied Biosystem, como indicador de contaminación en el mix empleado en la síntesis de cDNA. Otro contuvo una muestra de ARN y del kit de Applied Biosystems pero sin la enzima retrotranscriptasa Multiscribe (control *RT minus*), como indicador de la presencia de contaminación de ADN genómico.

Todas las muestras se colocaron en un termociclador (Thermal Cycler, Eppendorf AG, Hamburg. Germany) a los siguientes ciclos:

- Primer ciclo de 10 minutos a 25 °C (condiciones de incubación óptimas para maximizar la hibridación de los cebadores al ARN molde)
- Segundo ciclo de 120 minutos a 37 °C (retrotranscripción)
- Tercer ciclo de 5 segundos a 85 °C (inactivación de la retrotranscriptasa)
- Cuarto ciclo durante un tiempo indefinido a 4 °C

Finalizado el proceso de retrotranscripción se almacenó el cDNA en congelador de -80°C hasta su posterior uso.

b.- PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR)

La RT-PCR monitoriza el procedimiento completo de la reacción de la PCR al ir detectando la emisión de fluorescencia conforme se va produciendo la duplicación del fragmento diana de cDNA. El equipo consiste en un termociclador junto con un dispositivo que es capaz de detectar en todo momento la emisión de fluorescencia producida en cada pocillo con las diferentes muestras. El equipo empleado de PCR en tiempo real con cuantificación relativa fue el ABI Prism ® 7000 Sequence Detection System. (Applied Biosystems, Foster City, California. USA).

Una RT-PCR requiere un par de *primers* (*forward-reverse*) y una sonda. La sonda es un oligonucleótido diseñado para que hibride con la región de cDNA correspondiente a los genes que nos interese analizar. Contiene un marcador fluorescente llamado “reporter” situado en el extremo 5´ y en el otro extremo 3´ de la sonda se sitúa otro elemento llamado “quencher”. La sonda que se empleó fue Taqman® MBG (*Minor Groove Binder*) que utiliza el marcador fluorescente FAM™. Al no ser demasiado grande la longitud de la sonda (entre 20-40 pares de bases) la energía fluorescente emitida por el *reporter* es absorbida por el *quencher* y no se registra ningún tipo de emisión fluorescente. Sin embargo, cuando comienza la reacción de la PCR, los cebadores o *primers* se sitúan en los extremos de la región complementaria al cDNA y la enzima Taq polimerasa comienza a añadir nucleótidos en dirección 5´ a 3´ de ambos cebadores. La sonda TaqMan, que quedó unida a un fragmento de cDNA complementario situado entre ambos cebadores, comienza a ser fragmentada por la actividad 5´-exonucleasa de la Taq polimerasa cuando

alcanza su extremo 5' y así el *reporter* queda libre del *quencher*; de esta forma se produce luz fluorescente que es detectada por el aparato (figura-12).

La sonda TaqMan MBG contiene la estructura MBG como *quencher* que permite aumentar la temperatura de fusión de la sonda; de este modo, se pueden utilizar sondas cortas para conseguir una mayor especificidad en los ensayos con PCR cuantitativa.

Este proceso de copia del cDNA, liberación del *reporter* y su consiguiente emisión de fluorescencia ocurre en cada ciclo. En los primeros ciclos la cantidad de fluorescencia emitida es todavía pequeña pero llega un momento en el que comienza a expresarse de forma exponencial.

La RT-PCR con cuantificación relativa es la que se empleó en esta tesis doctoral. Consiste en estudiar los cambios relativos en los niveles de mRNA de uno o varios genes. Este procedimiento lleva dos etapas: la primera es la transcripción inversa del mRNA a cDNA gracias a una enzima retrotranscriptasa y la segunda etapa es la amplificación específica de los genes problema o diana. La cuantificación relativa se lleva a cabo con la normalización del mRNA del gen diana respecto a un gen de referencia también llamado gen interno, gen de expresión constitutiva o gen *housekeeping*. Los genes *housekeeping* se expresan en todos los tejidos para mantener las funciones celulares básicas y tienen una expresión constante e invariable en todas las muestras. El gen interno, utilizado para todas las PCR en tiempo real fue la β -actina (Applied Biosystem, Assay ID: Hs99999903_m1. Tamaño amplicón: 171 pb). Se seleccionó después de testar una batería de genes mediante el Kit Taqman® *Human Endogenous Control Plate* (Applied Biosystem, Part Number: 4309199) analizando tejido de pulmón tumoral y de pulmón sano. La β -actina mostró la expresión más constante y reproducible.

La cuantificación relativa evita que los resultados se vean afectados por las variaciones que puedan existir entre las diferentes muestras, por ejemplo, la cantidad de la muestra empleada, la integridad del ARN, cambios de la concentración o del volumen de las diferentes reacciones, etc. Una vez seleccionado el gen de referencia se normaliza la expresión del gen diana en relación a ese gen de referencia. Para ello, existen varios modelos matemáticos y el que se empleó en el trabajo de esta tesis doctoral fue el modelo de Michael W. Pfaffl (Pfaffl 2001).

Para obtener el rendimiento adecuado de la PCR se necesitan unas condiciones de temperatura durante unos periodos de tiempo, de modo que se van repitiendo durante una serie de ciclos. Esto se consigue en unos aparatos llamados termocicladores que pueden conseguir oscilaciones de temperaturas en un periodo muy corto de tiempo para que se lleve a cabo la reacción de la PCR. En una PCR clásica cada ciclo consta de varias fases:

a.- Fase de desnaturalización: se separan las dos cadenas de ADN molde o cDNA al aplicar una alta temperatura superior a los 90°C durante unos segundos o minutos. Bajo estas condiciones térmicas, se rompen los puentes de hidrógeno entre las dos cadenas complementarias, de manera que quedan lineales y libres. Esto permite el acoplamiento de los cebadores específicos.

b.- Fase de unión a los cebadores: los cebadores se unen a las cadenas de cDNA complementario en los extremos de las secuencias de genes que nos interesen amplificar. Esto ocurre a una temperatura determinada llamada temperatura de fusión o T_m (del inglés "melting temperature") que es específica para cada pareja de cebadores según el contenido de sus bases purínicas. Es decir, a mayor contenido de nucleótidos G y C en el cebador, más alta será la temperatura para que tenga lugar la unión específica.

c.- Fase de extensión: la enzima polimerasa añade nucleótidos a las cadenas nuevas a partir de los extremos 3' libres de los cebadores. Cuanto mayor sea la longitud del fragmento que se va a amplificar más durará esta fase.

Estas tres fases forman ciclos que se van repitiendo en un número determinado de ocasiones (entre 25-40 generalmente) para obtener un gran número de copias de la región de cDNA amplificada.

La RT-PCR es una variante de la PCR clásica. Presenta la capacidad de detectar el producto a medida que se genera, no requiere un procesamiento posterior de la reacción porque los resultados son obtenidos numéricamente y es una técnica más sensible basada en el incremento de la emisión de fluorescencia proporcional a la cantidad del producto generado por amplificación.

Las condiciones de tiempo y temperatura para la RT-PCR fueron dos etapas. Una primera etapa de 2 minutos a 50 °C, requerida para una actividad óptima de la enzima AmpErase UNG, y después 10 minutos a 95 °C para activar la enzima AmpliTaq Gold y desactivar la enzima AmpErase UNG. Una segunda etapa de desnaturalización e hibridación/extensión compuesta por 40 ciclos (en cada ciclo dos etapas: 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C). La reacción se realizó por duplicado para cada muestra. Se preparó una mezcla de reacción para $n + 10\%(n)$ reacciones, siendo n el número de muestras a analizar. Las muestras se analizaron por duplicado. Cada pocillo de cada muestra se llenó con un volumen final de 20 μ L del siguiente modo:

- 10 μ L TaqMan® Universal PCR Master Mix (Roche Molecular Systems, Inc. Branchburg, New Jersey. USA) que contiene la enzima AmpliTaq Gold DNA polimerasa, los dNTPs con dUTP, la enzima Amp Erase UNG, la referencia pasiva (ROX) y un buffer de PCR.

- 1 μ L del par de cebadores sentido y antisentido (*forward primer*, *reverse primer*) junto con la sonda de cada gen (VEGF-A y HIF-1 α) contenidos en un producto comercial (TaqMan® Gene Expression Assays. Applied Biosystems, Foster City, CA. USA). Los *primers* y la sonda están diseñados de tal manera que no amplifican ADN genómico, contaminación que lleva implícita cualquier método de extracción de ARN.

VEGF-A (Applied Biosystems ,Assay ID: Hs00900054_m1, amplicón de 77 pb)

HIF-1 α (Applied Biosystems, Assay ID: Hs00153153_m1, amplicón de 76 pb)

- 9 μ L de cDNA diluido en agua (2 μ L de cDNA y 7 μ L de agua mili-Q).

Los controles negativos que se emplearon fueron:

- Control negativo de la PCR cuantitativa o *Non Template Control* (NTC): 10 μ L de agua mili-Q con el mix de PCR.
- Control negativo de la retrotranscripción: 2 μ L del producto de reacción obtenido en el control de la síntesis de cDNA.
- Control negativo RTminus: 2 μ L del producto de reacción obtenido en el control RTminus de la síntesis de cDNA.
- Control negativo de extracción: 2 μ L del producto de reacción obtenido en la síntesis de cDNA.

Antes de introducir la tabla contenedora de los pocillos con las muestras en el termociclador de fluorescencia en tiempo real (ABI PRISM® 7000. Applied Biosystems, Foster City, CA.USA) se centrifugó para que se depositara todo el contenido de los pocillos en su fondo y así evitar restos de muestras sobre sus paredes (850 rpm durante 1 minuto a 4°C, en la centrifugadora: Centrifuge 5810R Eppendorf, Hamburg.Germany).

La *AmpliTaq Gold Polimerasa* es una enzima estable a altas temperaturas y le permite actuar entre 55-74°C, previa activación a 95 °C, incorporando entre 40 y 100 nucleótidos por segundo a la nueva cadena de ADN que se está sintetizando. Además, presenta una actividad exonucleasa en sentido 5'→3' pero no a la inversa lo que le permite liberar la sonda que contiene el *reporter* del *quencher* a medida que la reacción de polimerización va avanzando. (figura 12).

La *AmpErase UNG* es una enzima Uracil-N-glicosilasa que rompe las cadenas de ADN en las posiciones donde encuentre un uracilo. Esta enzima es necesaria para evitar la contaminación por el efecto “carry over”. Debido a la elevada sensibilidad de la PCR, los amplicones producidos en anteriores reacciones y que podrían contaminar el material, servirían como sustrato a las nuevas amplificaciones posteriores. El kit TaqMan® Universal PCR Master Mix contiene dNTPs, además de dUTPs que es el análogo al dTTP. Con la amplificación, este nucleótido se coloca en el lugar que corresponde al dTTP en las nuevas copias de las cadenas formadas. Así, se evita la contaminación por “carry over” al degradar los productos de reacciones anteriores pero no el ADN *template*, o también llamado ADN molde inicial, que no contiene el dUTP. De esta manera no se obtienen falsos positivos. Además, la enzima *AmpErase UNG* se inactiva a temperaturas superiores a 55 °C, de modo que no actuará en los pasos térmicos posteriores y, por tanto, tampoco degradará el nuevo producto de PCR (el cual sí contendrá dUTPs).

Una cuantificación típica se compone de tres fases (ver figura 13): una fase temprana de ruido de fondo, una fase exponencial o logarítmica y una fase de meseta o plateau. La fase de ruido dura hasta que la señal de fluorescencia del producto de PCR es mayor que la fluorescencia propia del sistema. Por tanto, la fase exponencial comienza cuando hay

suficiente producto acumulado como para ser detectado claramente por encima del ruido y al final cae la eficiencia de la reacción y se entra en la fase de meseta.

c.- Parámetros de la RT-PCR

Hay que conocer algunos parámetros para trabajar con PCR en tiempo real. Destacan los siguientes:

- Curva de amplificación, es la que resulta de la amplificación de la secuencia de cDNA diana (figura 13).
- Línea de base, es la línea del inicio de la gráfica y corresponde a los ciclos iniciales antes de que ocurra el aumento exponencial de la fluorescencia como consecuencia de la amplificación. En esos ciclos iniciales no se produce un cambio importante en la emisión de fluorescencia.
- Umbral o *threshold*, es el nivel de fluorescencia que el propio usuario establece en la zona de amplificación exponencial de la curva.
- Ct o *threshold cycle*, es el ciclo de PCR en el cual se produce un incremento importante de la fluorescencia como consecuencia de la amplificación del gen diana.
- Rn es el cociente entre la intensidad fluorescente que emite el reporter y la intensidad de la fluorescencia de la referencia pasiva que lleva ya incluido el producto comercial TaqMan® *Gene Expression Assays* (Applied Biosystems, Foster City, CA. USA) para evitar variaciones de la fluorescencia por cambios en la concentración o en el volumen de las diferentes reacciones.
- ΔRn : es la magnitud del intervalo de intensidad luminosa o fluorescencia entre los primeros ciclos de la PCR y los ciclos finales cuando ya se ha producido la reacción final con las copias del cDNA.

El sistema ABI PRISM® nos proporcionó para cada gen analizado, el cálculo del Ct de cada duplicado de cada muestra. El Ct equivale al número del ciclo en el cual ocurre un incremento significativo de la fluorescencia y este incremento luminoso es proporcional al número de moléculas de cDNA de partida. A partir de los Ct se calculó el nivel de la

expresión génica de cada gen empleando una fórmula matemática descrita por Pfaffl (Pfaffl 2001). Para determinar las diferencias de expresión génica de los tejidos tumorales, se normalizó la expresión de los genes por la cantidad de cDNA total que cada muestra contenía. Ahora bien, para cuantificar la cantidad de cDNA total se determinó el nivel de expresión de un gen constitutivo o *housekeeping* cuya expresión no estuviese alterada entre las diferentes muestras y fuese constante. Así, los resultados quedaron expresados como la relación entre el nivel de expresión del gen en cada tejido tumoral respecto a la expresión en el tejido pulmonar sano y estandarizados por la expresión del gen control o *housekeeping* en cada uno. Esto se realizó para el gen VEGF-A (*Vascular Endothelial Growth Factor A*) y para el HIF-1 α (*Hypoxia Inducible Factor 1, alpha subunit*).

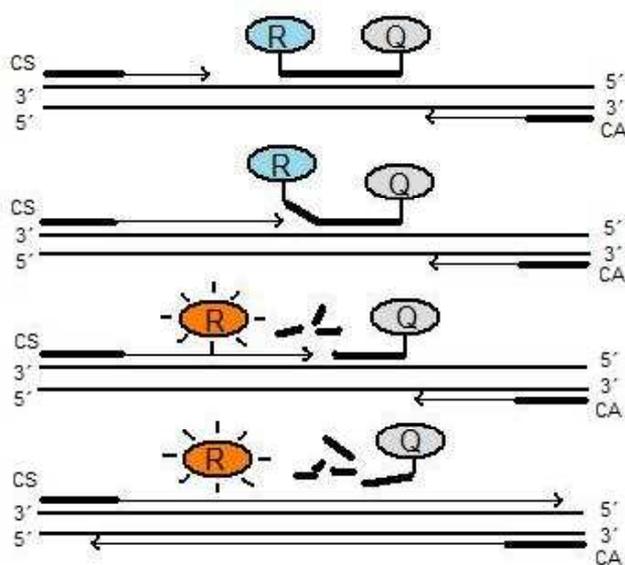


Figura 12. Esquema de la RT-PCR mostrando cómo actúa la polimerasa. CS: *primer* o cebador sentido. CA: *primer* o cebador antisentido. R: *reporter*. Q: *quencher*.

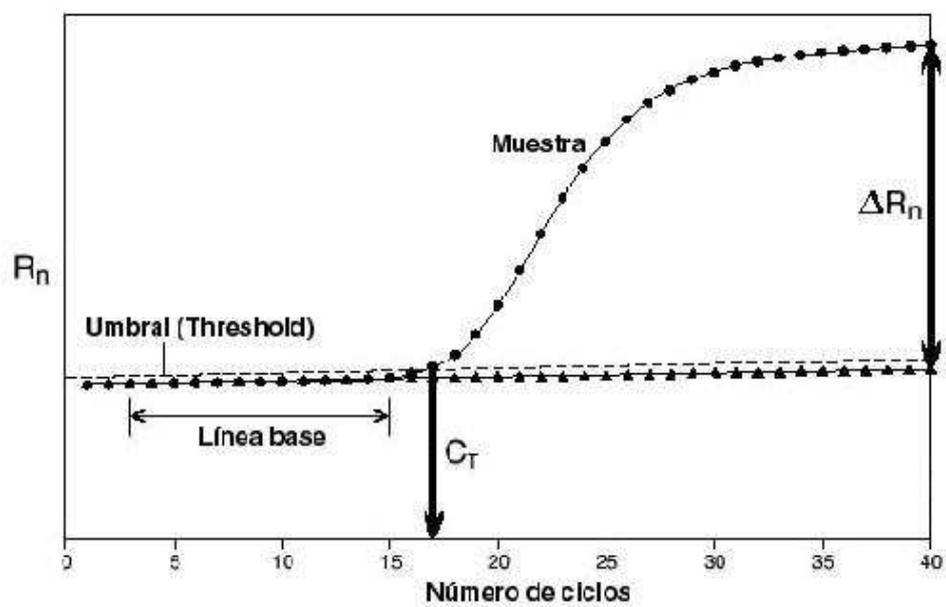


Figura 13. Esquema de la curva que se obtiene en la RT-PCR. Abreviaturas explicadas en el texto.

4.- RESULTADOS

Inicialmente 188 pacientes se incluyeron en este estudio, pero tras los criterios de exclusión permanecieron un total de 106. Es decir, 82 pacientes fueron excluidos por las siguientes causas:

- R1-R2 (ver tabla 7, pág 27): 4 pacientes
- Fallecimiento en el postoperatorio: 12 pacientes
- Tumor benigno: 7 pacientes
- Tumor carcinoide: 6 pacientes
- Cáncer de pulmón célula pequeña: 2 pacientes
- Linfoma pulmonar: 1 paciente
- Metástasis pulmonar: 3 pacientes
- Muestra inadecuada o insuficiente o toracotomía exploradora: 22 pacientes
- Otro cáncer previo: 12 pacientes
- Tratamiento neoadyuvante (Qt y/o Rt): 13 pacientes.

4.1.- Resultados del análisis comparativo entre los pacientes operados en el Consorcio Hospital General Universitario de Valencia y en el Hospital General Universitario de Albacete

No hubo diferencias clinicopatológicas con significación estadística entre los pacientes operados en Valencia y los operados en Albacete (ver tablas 11 y 12):

- Edad ($p=0.33$; IC al 95%: -5.86 y 1.97)
- Tabaquismo (paquetes-año) ($p=0.40$; IC al 95%: -5.58 y 13.87)
- FEV1 en valor absoluto ($p=0.87$; IC al 95%: -316.70 y 268.68)
- FEV1 en valor relativo ($p=0.74$; IC al 95%: -6.61 y 9.28)
- Hemoglobina preoperatoria ($p=0.78$; IC al 95%: -0.57 y 0.76)
- Complicaciones postoperatorias ($p=0.23$)
- Comorbilidad ($p=0.88$)
- EPOC ($p=0.54$)
- PS (performance status-ECOG) ($p=0.91$)
- Histología ($p=0.57$)
- Factor Nap ($p=0.14$)

-Factor Tap ($p=0.98$)

-Estadio (inicial 1-2 vs avanzado 3) ($p=0.76$)

Por lo que los pacientes operados en Valencia y los operados en Albacete fueron similares en cuanto a sus características clinicopatológicas y se incluyeron en un solo grupo.

Tabla 11. Comparación de las variables: edad, tabaquismo, FEV1 en valores absolutos y en porcentaje y la hemoglobina preoperatoria entre los pacientes operados en Valencia y los operados en Albacete.

Variable	Provincia	Núm.casos	Media	Valor de p
Edad	Valencia	66	62,76	0.33
	Albacete	40	64,70	
Tabaquismo (paq-año)	Valencia	66	49,811	0.40
	Albacete	39	45,667	
FEV1	Valencia	64	2306,52	0.87
	Albacete	38	2330,53	
FEV1(%)	Valencia	64	81,5250	0.74
	Albacete	39	80,1923	
Hb preoperatoria	Valencia	66	14,236	0.78
	Albacete	40	14,140	

Tabla 12. Comparación de las variables: complicaciones postoperatorias, comorbilidad, EPOC, PS-ECOG, histología, descriptores Np, Tp y estadio entre los pacientes operados en Valencia y los operados en Albacete.

	Pacientes operados en Valencia n (%)	Pacientes operados en Albacete n (%)	Valor de p
Complicaciones Postoperatorias			
NO	36 (54.5%)	17 (42.5%)	0.23
SÍ	30 (45.5%)	23 (57.5%)	
Comorbilidad			
NO	14 (21.2%)	9 (22.5%)	0.88
SÍ	52 (78.8%)	31 (77.5%)	
EPOC			
NO	26 (40.0%)	18 (46.2%)	0.54
SÍ	39 (60.0%)	21 (53.8%)	
PS-ECOG			
NO	55 (83.3%)	33 (82.5%)	0.91
SÍ	11 (16.7%)	7 (17.5%)	
Histología			
Epidermoide	31 (47.0%)	18 (45.0%)	0.57
Adenocarcinoma	22 (33.3%)	16 (40.0%)	
Cél. grande	2 (3.0%)	3 (7.5%)	
Adenoescamoso	5 (7.6%)	0 (0%)	
Indiferenciado	6 (9.1%)	3 (7.5%)	
Descriptor Np			
N0	39 (59.1%)	32 (80.0%)	0.14
N1	8 (12.1%)	3 (7.5%)	
N2	17 (25.8%)	5 (12.5%)	
Nx	2 (3.0%)	0 (0%)	
Descriptor Tp			
T1	10 (15.2%)	6 (15.0%)	0.98
T2	42 (63.6%)	26 (65.0%)	
T3	10 (15.2%)	5 (12.5%)	
T4	4 (6.1%)	3 (7.5%)	
Estadio			
Inicial (I-II)	46 (69.7%)	29 (72.5%)	0.76
Avanzado (III)	20 (30.3%)	11 (27.5%)	

4.2.- Estadística descriptiva

Fue más frecuente el grupo de varones con 95 pacientes (89.6%).

La edad media de los pacientes fue de 63.5 años (rango 37-85).

La localización más frecuente fue en los lóbulos superiores (LSI=33.0% y LSD=29.2%).

En cuanto al descriptor T, el más frecuente fue el T2 (62.4%) (ver figura 14 y tabla 13).

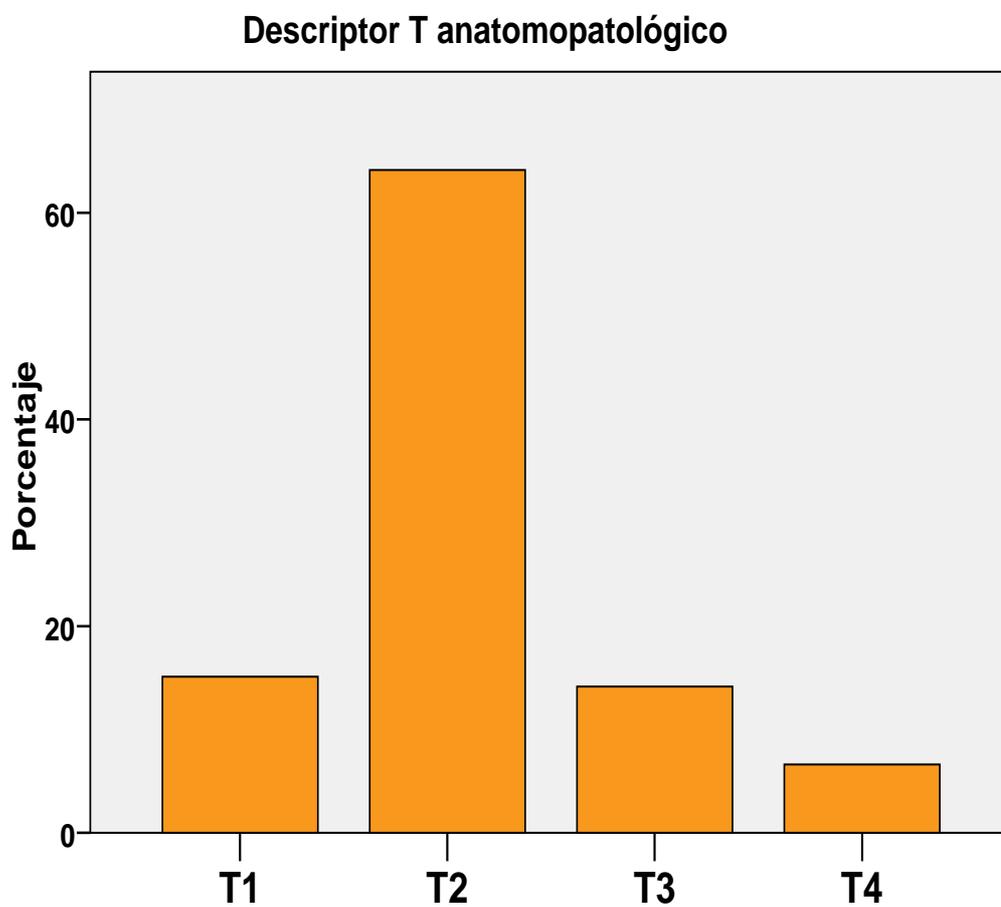


Figura 14. Distribución del porcentaje de los casos según el descriptor T anatomopatológico.

Tabla 13. Distribución de los casos según el descriptor T anatomopatológico.

	Nº casos	Porcentaje
T1	16	15.1%
T2	68	64.2%
T3	15	14.2%
T4	7	6.6%
Total:	106	100%

El tipo histológico más frecuente fue el epidermoide (46.2%) seguido de cerca por el adenocarcinoma (35.8%). El resto de tumores fueron más infrecuentes en esta serie y ocupan, en su conjunto, un tercer grupo (17.9%). Ver tabla 14 y figura 15. En las mujeres, la histología más frecuente fue el adenocarcinoma (Ver tabla 15).

Tabla 14. Distribución de los casos según su histología.

HISTOLOGÍA	Nº de casos	porcentaje
epidermoide	49	46.2%
adenocarcinoma	38	35.8%
célula grande	5	4.7%
adenoescamoso	5	4.7%
indiferenciado	9	8.5%
Total:	106	100%

Tabla 15. Distribución de la histología tumoral respecto al sexo.

Sexo	Histología	Nº casos (porcentaje)
Mujer	Adenocarcinoma	9 (81.8%)
	Epidermoide	1 (9.1%)
	Otros	1 (9.1)
Varón	Adenocarcinoma	29 (30.5%)
	Epidermoide	48 (50.5%)
	Otros	18 (19.0%)

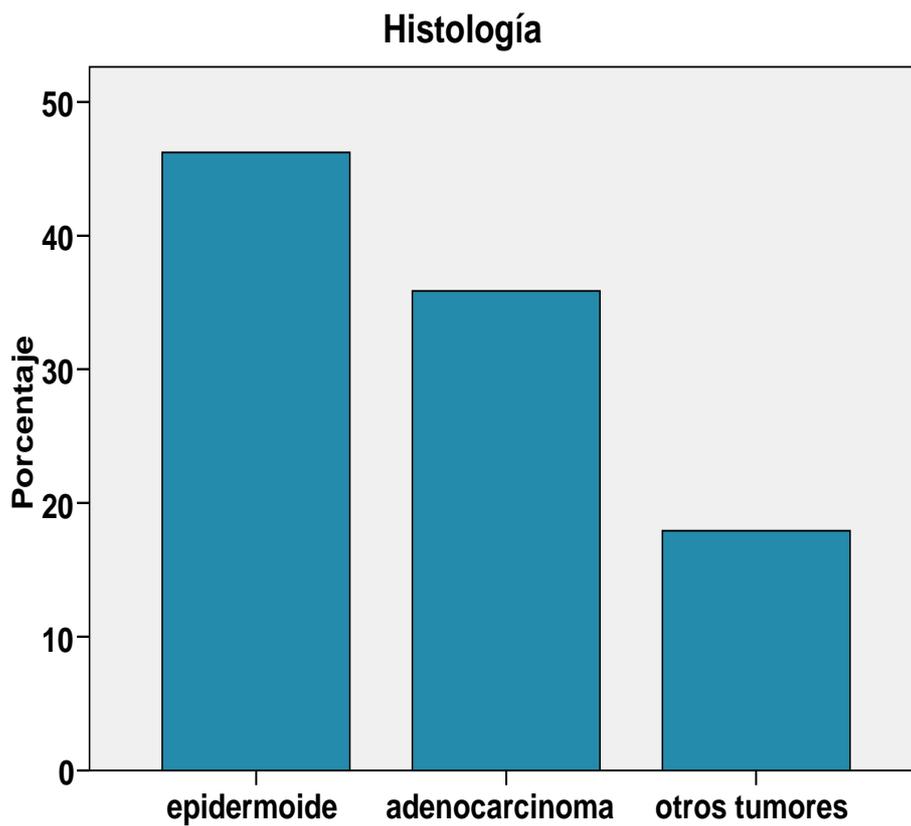


Figura 15. Distribución del porcentaje de casos según la histología.

La mayoría de los pacientes operados fueron N0 (67.0%), (ver tabla 16).

El PS-ECOG predominante fue 0 con un 83.0%. En el 17% restante fue 1.

El tipo de resección pulmonar más frecuente fue la lobectomía (58.5%). A uno de cada cinco pacientes aproximadamente se le realizó una neumonectomía (20.8%). Las resecciones sublobares correspondieron a 5 segmentectomías y a 6 resecciones en cuña (tamaño medio = 2.7cm, rango: 1.5 - 3.8). Ver tabla 17.

Tabla 16. Distribución de casos según el descriptor Np (afectación ganglionar anatomopatológica)

Descriptor Np	Nº de casos	Porcentaje
N0	71	67.0%
N1	11	10.4%
N2	22	20.8%
Nx	2	1.9%
Total:	106	100%

Tabla 17. Distribución de los casos según el tipo de resección quirúrgica pulmonar practicada.

Tipo de resección quirúrgica	Nº de casos	Porcentaje
Segmentectomía (anatómica)	11	10.4%
(cuña)	(5) (6)	(4.7%) (5.7%)
Lobectomía	62	58.5%
Bilobectomía	11	10.4%
Neumonectomía	22	20.8%
Total:	106	100%

El estadio tumoral más frecuente según la clasificación TNM fue el I-B (45.3%). El estadio inicial I-II representó un 70.8% y el avanzado III un 29.2%. (ver tablas 18-19).

Tabla 18. Distribución de los pacientes según la clasificación anatomopatológica por estadios tras la resección quirúrgica.

Estadio TNM anatomopatológico	Nº de casos	Porcentaje
I-A	12	11.3%
I-B	48	45.3%
II-B	15	14.2%
III-A	24	22.6%
III-B	7	6.6%
Total:	106	100.0%

Tabla 19. Distribución de los pacientes según su agrupación en estadio inicial (I y II) y en estadio avanzado (III) tras la resección quirúrgica y su estudio anatomopatológico.

	Nº de casos	Porcentaje
Estadio inicial I-II	75	70.8%
Estadio avanzado III	31	29.2%
Total:	106	100.0%

La mayoría de los pacientes no presentó recidiva tumoral (65.1%) durante el periodo de seguimiento. La recidiva más frecuente fue en el tórax con 18 casos (Ver tabla 20).

Al finalizar el estudio, 32 pacientes fallecieron por causa tumoral (30.2%) y 66 pacientes permanecieron vivos. En 8 casos la causa del fallecimiento no tuvo relación con el cáncer de pulmón (fueron censurados para la supervivencia). La enfermedad recidivó en 34 pacientes (32.1%) durante el tiempo de seguimiento. Ver tablas 20 y 21. El tiempo medio de seguimiento fue de 19.5 meses (6 – 50.9). El tiempo medio del periodo libre de enfermedad fue de 16.6 meses (4 - 50.9).

Tabla 20. Distribución de los casos según la recidiva del tumor y la localización.

	Nº de casos	Porcentaje
No recidiva	69	65.1%
Sí recidiva	(34)	(32.1%)
Intratorácica	18	17.0%
Extratorácica	5	4.7%
Intra- y extratorác.	11	10.4%
Perdidos	3	2.8%
Total:	106	100%

Tabla 21. Distribución de los pacientes según si permanecieron vivos o fallecieron al final del periodo de seguimiento.

	Nº de casos	Porcentaje
Vivos	66	62.3%
Fallecidos	32	30.2%
Fallecidos causa no tumoral (censurados)	8	7.5%
Total:	106	100%

El tipo de diferenciación tumoral que más prevaleció fue el de moderadamente diferenciado (G2 con un 61.2%, porcentaje tras excluir los casos perdidos). Un 19.8% de los datos de esta variable fueron perdidos porque esta información no fue aportada en 21 casos por los anatomopatólogos que realizaron la descripción microscópica (Ver tabla 22).

Tabla 22. distribución de los casos según el tipo de diferenciación tumoral y los casos perdidos de esta variable.

Grado diferenciación	Número casos	Porcentaje	Porcentaje válido
Bien diferenciado	6	5.7	7.1
Moderadamente	52	49.1	61.2
Poco diferenciado	27	25.5	31.8
Total válidos	85	80.2	100.0
Perdidos	21	19.8	
Total	106	100.0	

El consumo acumulado de tabaco fue de 48.7 paquetes-año (rango 0-120). Mayor tabaquismo entre los varones con una media de 52.0 paquetes-año que entre las mujeres (media de 16.4 paquetes-año), diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) (ver tabla 23).

La hemoglobina preoperatoria tuvo una media de 14.2 gr/dL (rango 7.7 – 19.1). El valor absoluto del FEV1 preoperatorio tuvo una media de 2315.5 mL (rango 1060-4740). El porcentaje del FEV1 preoperatorio tuvo una media de 81.0% (rango 42.1 – 131.0%).

Tabla 23. Distribución del tabaquismo respecto al sexo.

Sexo	Tabaquismo	Nº casos (porcentaje)	Paq-año (media) p<0.01
Mujeres	Nunca fumó	6 (54.5%)	16.4
	Exfumadora	1 (9.1%)	
	Fumadora	4 (36.4%)	
Varones	Nunca fumó	1 (1.1%)	52.0
	Exfumador	39 (41.1%)	
	Fumador	55 (57.9%)	

Las variables HIF1- α y VEGF-A en este estudio fueron variables cuantitativas continuas cuyo valor se determinó al cuantificarlo de forma relativa mediante la técnica RT-PCR. Como variables cuantitativas, se analizó su distribución (histograma con curva de normalidad) y se les aplicó el test de Kolmogorov-Smirnov. Atendiendo a estos datos, se observó que estas variables cuantitativas no presentaron una distribución normal (curva de normalidad asimétrica y $p < 0.05$ en el test de Kolmogorov-Smirnov, siendo la hipótesis nula H_0 : sigue una distribución normal. Figuras 16 y 17). Por esta razón, se estableció su punto de corte atendiendo a la mediana. Los valores iguales o menores a la mediana fueron considerados como HIF1- α bajo o VEGF-A bajo y los que fueron mayores a la mediana como HIF1- α elevado o VEGF-A elevado. Si estas variables hubiesen mostrado una distribución siguiendo la normalidad, se hubiera procedido de igual forma pero basándose en el valor de la media.

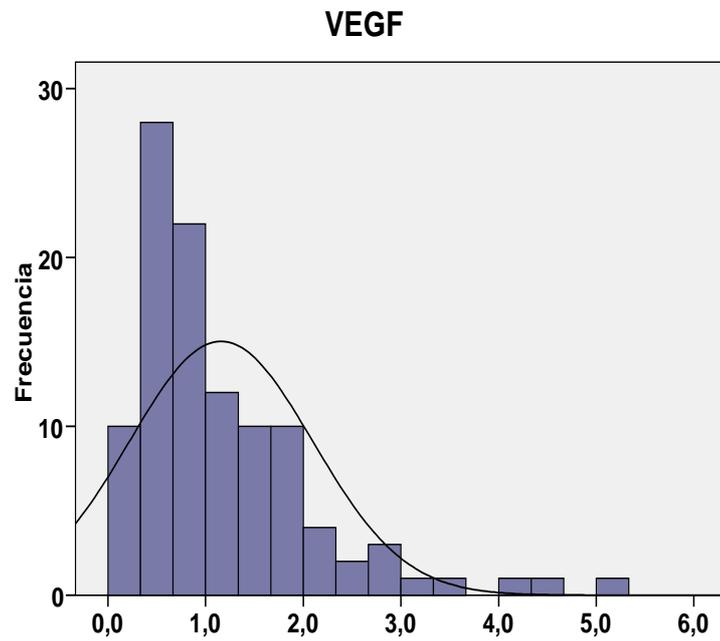


Figura 16. Histograma con la curva de normalidad de la variable VEGF-A. Asimetría hacia la izquierda.

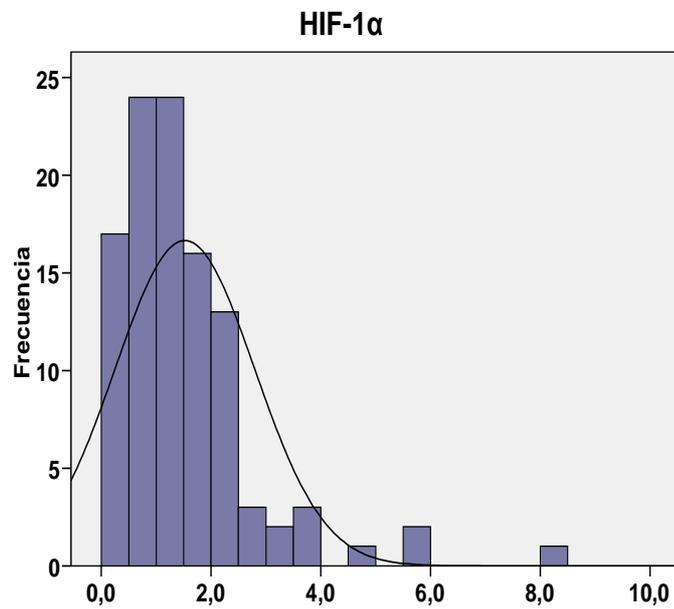


Figura 17. Histograma con la curva de normalidad de la variable HIF-1 α . Asimetría hacia la izquierda.

4.3.- Relación entre las características clinicopatológicas y la recidiva tumoral, el periodo libre de enfermedad y la supervivencia.

La recidiva es una variable cualitativa y se utilizó el test de χ^2 (Chi-cuadrado). Hubo más recidiva en los pacientes con T avanzada (T3-T4), en los que tuvieron afectación ganglionar metastásica (N1, N2), en los casos de microinvasión vasculonerviosa, en los tumores poco diferenciados y en los carcinomas epidermoides pero en ninguno de estos casos hubo una significación estadística (todos fueron $p > 0.05$). Ver tabla 24.

En cuanto al tamaño tumoral (descriptor T anatomopatológico), los pacientes T1-T2 tuvieron una mayor mediana de supervivencia (38.0 meses) que los T3-T4 (19.7 meses). Estas diferencias tuvieron significación estadística ($p=0.01$) Ver figura 18.

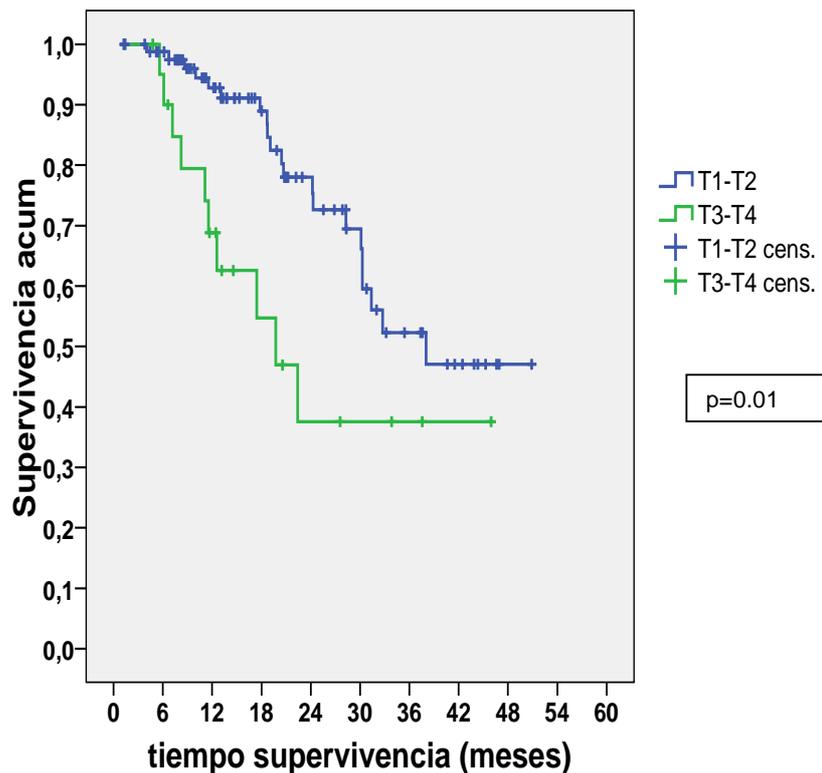


Figura 18. Gráfico de la supervivencia respecto al descriptor T anatomopatológico entre los pacientes que fueron T1 o T2 y los pacientes que fueron T3 o T4.

Tabla 24. Distribución de la recidiva tumoral y las variables anatomopatológicas tumorales.

	No Recidiva % (n)	Sí Recidiva % (n)	Valor p	O.R.	IC al 95%
Descriptor Tp:					
T1-T2	68.3% (56)	31.7% (26)	0.58	1.33	0.49-3.59
T3-T4	61.9% (13)	38.1% (8)			
Descriptor Np:					
N0	72.5% (50)	27.5% (19)	0.19	1.80	0.75-4.35
N1-2	59.4% (19)	40.6% (13)			
Estadio:					
Inicial (I-II)	68.5% (50)	31.5% (23)	0.61	1.26	0.52-3.07
Avanzado (III)	63.3% (19)	36.7% (11)			
Tp:					
T1	66.7% (10)	33.3% (5)	0.94		
T2	68.7% (46)	31.3% (21)			
T3	60.0% (9)	40.0% (6)			
T4	66.7% (4)	33.3% (2)			
Estadio:					
I-A	81.8% (9)	18.2% (2)	0.80		
I-B	68.1% (32)	31.9% (15)			
II-B	60.0% (9)	40.0% (6)			
III-A	62.5% (15)	37.5% (9)			
III-B	66.7% (4)	33.3% (2)			
Histología					
Epidermoide	63.3% (31)	36.7% (18)	0.09		
Adenocarcinoma	78.9% (30)	21.1% (8)			
Otros tumores	50% (8)	50% (8)			
Microinvasión Vasculonerviosa:					
No	68.2% (15)	31.8% (7)	0.12	2.45	0.78-7.72
Sí	46.7% (14)	53.3% (16)			
Tipo de diferenciación:					
Bien	83.3% (5)	16.7% (1)	0.34		
Moderadamente	69.2% (36)	30.8% (16)			
Poco	56.0% (14)	44.0% (11)			

OR: odds ratio. IC: intervalo de confianza.

Tabla 25. Estadística de la supervivencia (kaplan-Meier y log rank) referente a las variables anatomopatológicas.

	Mediana (meses)	I.C. al 95%	Superv. Acumul. (meses)			Valor p
			12	24	36	
Descriptor Tp						
T1-2	38.03	.	0.92	0.72	0.52	0.01
T3-4	19.73	9.88 - 29.59	0.68	0.37	0.37	
Descriptor Np						
N0	38.03	.	0.91	0.76	0.55	0.30
N1-2	31.37	27.26 - 35.47	0.80	0.62	0.41	
N0	38.03	.	0.90	0.74	0.54	0.06
N2	30.13	4.45 - 55.81	0.71	0.51	0.20	
Estadio						
I-II	38.03	.	0.91	0.74	0.54	0.05 (0.049)
III	30.13	17.56 - 42.71	0.74	0.54	0.30	
Microinvasión Neurovascular						
No	38.03	9.60 - 66.47	0.82	0.65	0.58	0.43
Sí	30.13	17.13 - 43.14	0.86	0.54	0.32	
Diferenciación						
Bien	N.A	.	1.00	0.66	0.66	0.31
Moderadamente	38.03	.	0.85	0.79	0.53	
Poco	19.07	1.46 - 36.7	0.82	0.47	0.41	
Histología						
Epidermoide	31.37	.	0.85	0.61	0.48	0.10
Adenocarcinoma	38.03	.	1.00	0.88	0.61	

I.C.: intervalo de confianza. N.A.: no se alcanzó la mediana de mortalidad.

Cuando no hubo afectación ganglionar metastásica (N0) la supervivencia fue mayor (mediana de 38.03 meses) que cuando hubo metástasis ganglionar N1-N2 (mediana de 31.07) pero las diferencias no tuvieron significación estadística. Las diferencias de la supervivencia fueron más marcadas entre N0 (mediana=38.03 meses) y N2 (peor supervivencia con una mediana de 30.13 meses) pero tampoco hubo significación estadística (p=0.06) Ver tabla 25 y figura 19.

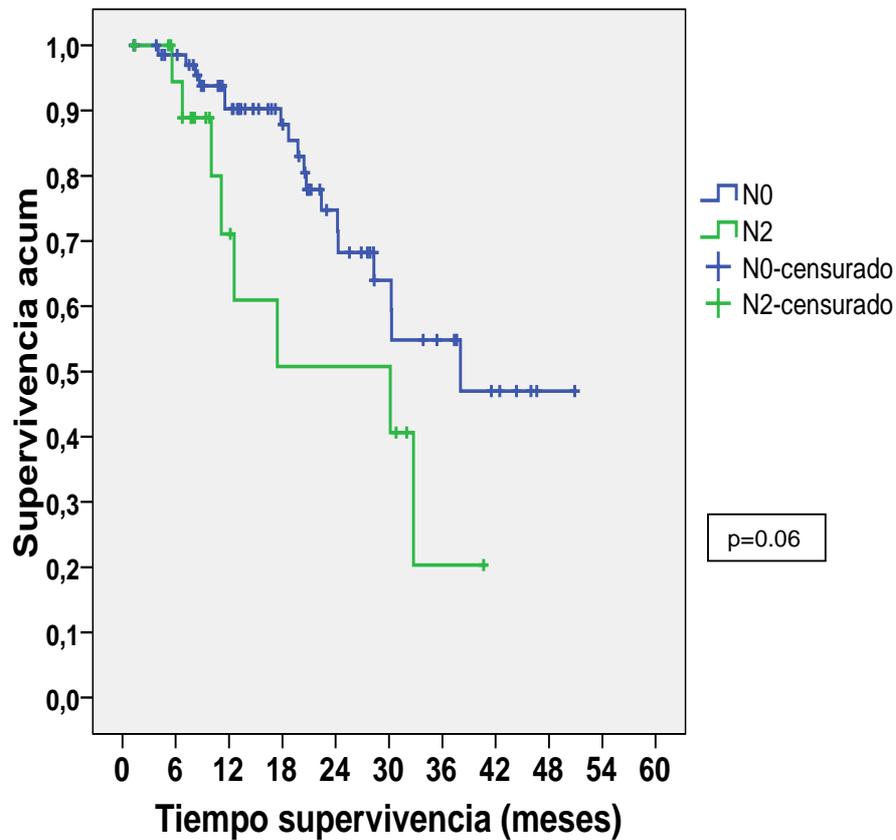


Figura 19. Gráfico de la supervivencia entre los pacientes que no tuvieron metástasis ganglionar (N0) y los que tuvieron metástasis ganglionar mediastínica (N2).

Respecto al estadio tumoral anatomopatológico, en el estadio inicial (I-II) la supervivencia fue mayor (mediana de 38,03 meses) que en el estadio avanzado (III; mediana de 30,13 meses) con una $p=0,049$. Ver figura 20.

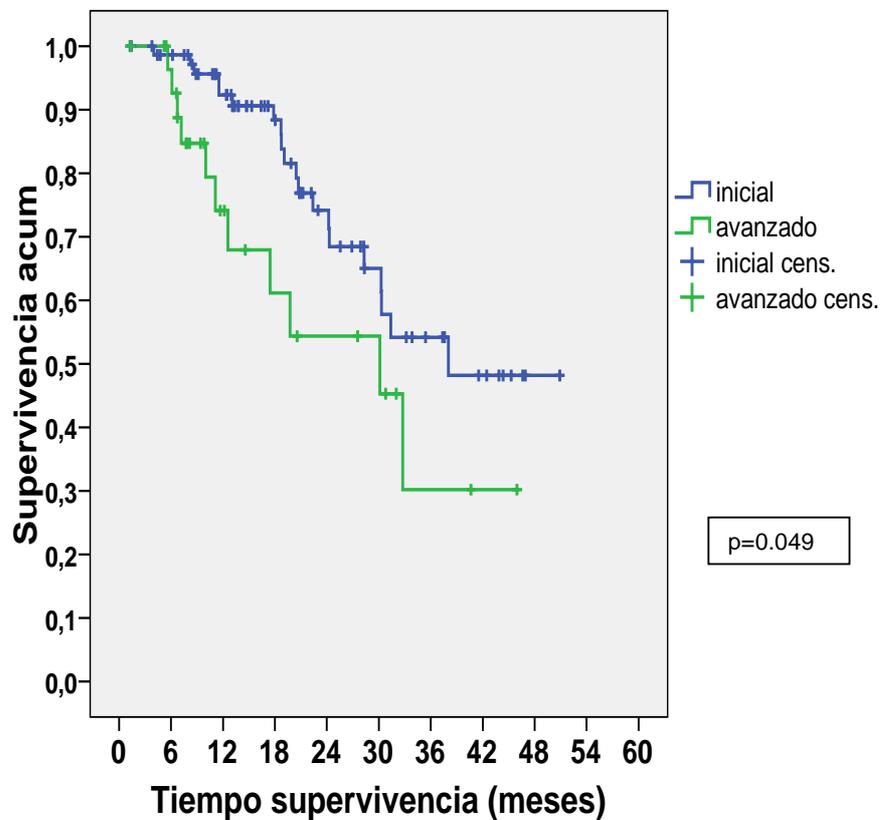


Figura 20. Gráfico de la supervivencia entre los pacientes con estadio inicial (I-II) y estadio avanzado (III).

Los pacientes con un tumor poco diferenciado tuvieron una tendencia hacia una peor supervivencia que los medianamente diferenciados y los bien diferenciados ($p=0.31$). Cuando hubo microinvasión tumoral vasculonerviosa, la supervivencia tendió a ser menor ($p=0.43$) y los carcinomas epidermoides presentaron una tendencia a una supervivencia menor ($p=0.10$). Ver tabla 25.

Tabla 26. Cuadro sobre el tiempo libre de enfermedad tumoral (kaplan-Meier y log rank) referente a las variables anatomopatológicas.

	Mediana (meses)	I.C. al 95%	Superv. Acumul. (meses)			Valor p
			12	24	36	
Descriptor Tp						
T1-2	30.5	.	0.83	0.63	0.48	0.21
T3-4	N.A	.	0.65	0.55	0.55	
Descriptor Np						
N0	N.A	.	0.81	0.59	0.59	0.09
N1	30.5	.	0.91	0.79	0.48	
N2	19.67	5.16 – 34.17	0.66	0.40	0.26	
N0	N.A	.	0.81	0.59	0.59	0.03
N2	19.67	5.16 – 34.17	0.66	0.40	0.26	
Estadio						
I-II	N.A	.	0.83	0.64	0.53	0.13
III	30.13	12.96 – 47.30	0.70	0.52	0.39	
Microinvasión Neurovascular						
No	N.A	.	0.80	0.63	0.63	0.09
Sí	19.47	8.02- 30.91	0.67	0.46	0.26	
Diferenciación						
Bien	N.A	.	0.83	0.83	0.83	0.46
Moderadamente	30.50	.	0.82	0.61	0.45	
Poco	24.00	.	0.72	0.55	0.46	
Histología						
Epidermoide	30.5	.	0.79	0.57	0.46	0.22
Adenocarcinoma	N.A	.	0.87	0.69	0.59	

I.C.: intervalo de confianza. N.A.: no se alcanzó la mediana.

Respecto al tiempo libre de enfermedad tumoral, los pacientes con tumores poco diferenciados tendieron hacia una menor mediana de supervivencia así como cuando hubo microinvasión vasculonerviosa (figura 21), con una valor de $p=0.46$ y 0.09 respectivamente. Ver tabla 26.

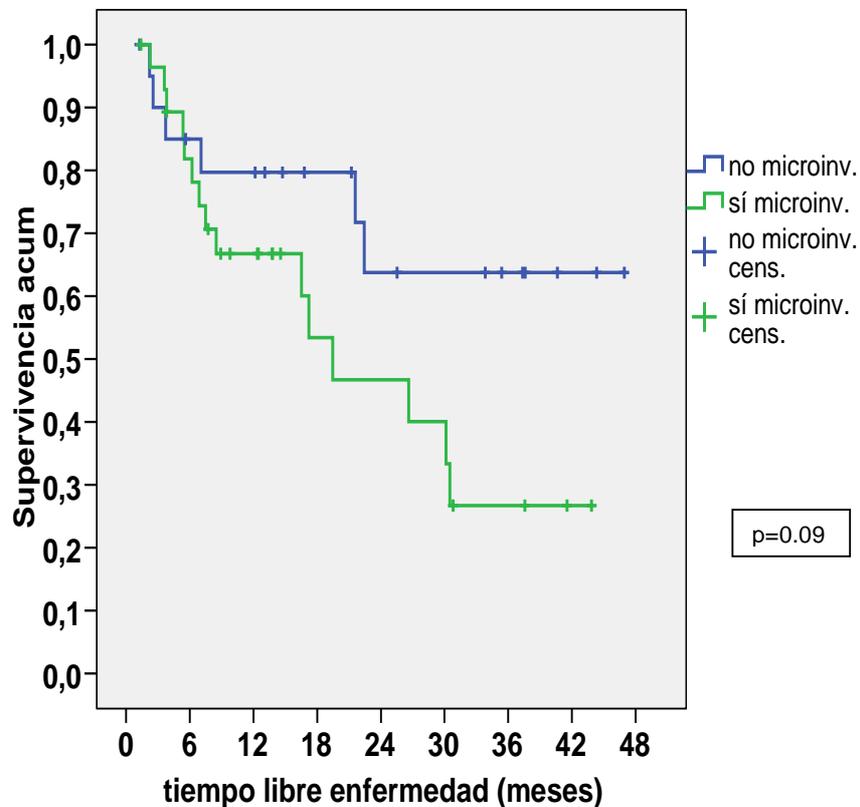


Figura 21. Gráfico del tiempo libre de enfermedad tumoral entre pacientes con y sin microinvasión vasculonerviosa.

Según el descriptor T anatomopatológico, al agrupar a los pacientes en T1-2 y en T3-4, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0.21$).

Los pacientes con enfermedad ganglionar metastásica tuvieron menor tiempo libre de enfermedad. Fue peor el subgrupo N2 que el N1 y éste, a su vez, peor que N0 aunque la significación estadística no se obtuvo ($p=0.09$). Al comparar N2 con N0 sí hubo significación estadística con $p=0.03$. Ver figuras 22 y 23.

En cuanto al estadio, los pacientes con un estadio inicial (I-II) tendieron a presentar un mayor tiempo libre de enfermedad tumoral que con un estadio más avanzado (III), con un valor de $p=0.13$.

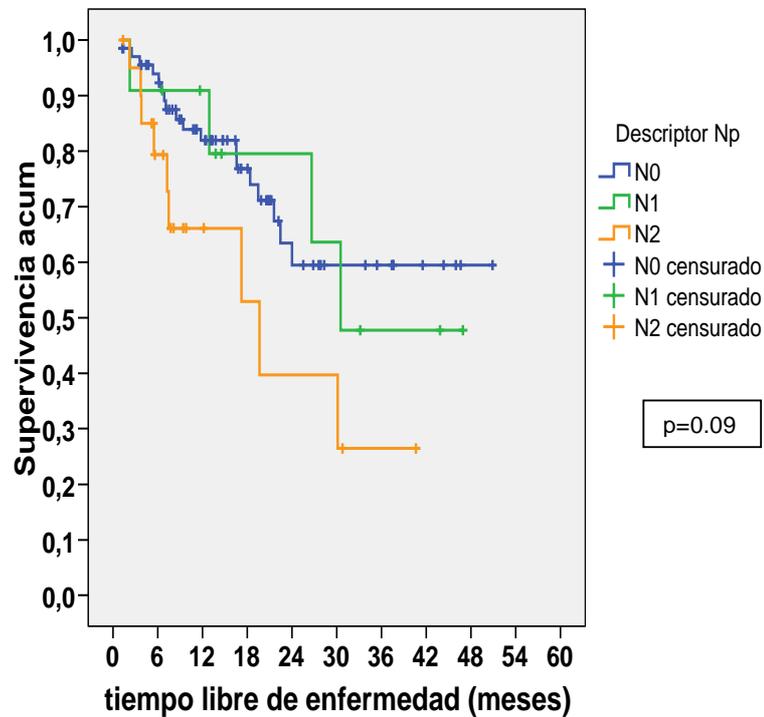


Figura 22. Gráfico del tiempo libre de enfermedad tumoral según la afectación ganglionar metastásica.

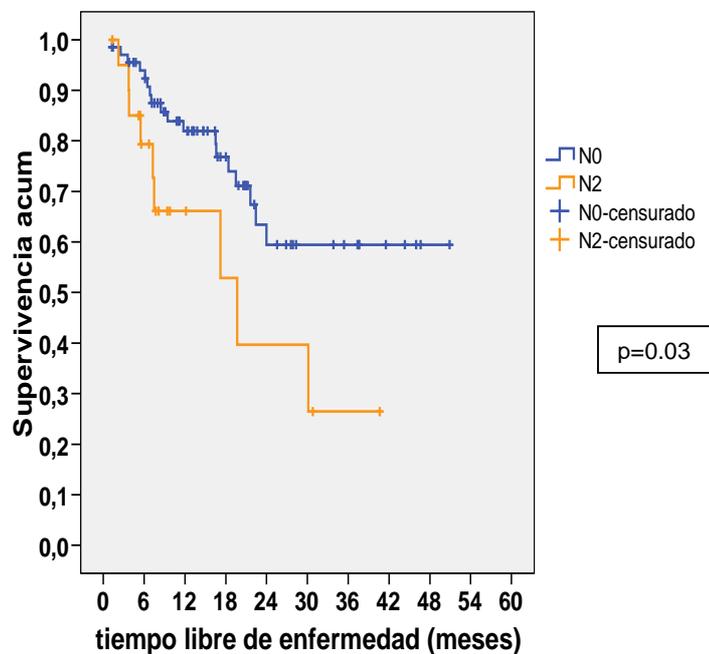


Figura 23. Gráfico comparando el tiempo libre de enfermedad tumoral entre los pacientes sin afectación ganglionar metastásica (N0) y los que tuvieron afectación ganglionar mediastínica (N2).

4.4.- Relación del HIF-1 α y del VEGF-A con las características clinicopatológicas, la recidiva tumoral, la supervivencia y el periodo libre de enfermedad.

Tras estudiar las variables HIF-1 α y VEGF-A, se llegó a la conclusión de que su distribución no seguía la normalidad, por lo que se aplicaron contrastes no paramétricos para analizar la relación entre dichas variables con las demás variables cualitativas. Se estudió la correlación lineal sobre las cuantitativas (Test de Spearman: distribución no normal).

-Se halló relación estadísticamente significativa entre VEGF-A y el sexo ($p < 0.01$), de modo que los varones presentaron una mediana de 0.93 y las mujeres una mediana de 0.52.

-También hubo relación estadísticamente significativa entre HIF-1 α y la histología tumoral ($p = 0.04$). Los carcinomas epidermoides tuvieron una mayor mediana (1.39), los adenocarcinoma una mediana de 1.07 y el grupo "otros tumores" tuvo una mediana de 0.96.

- Hubo significación estadística con $p = 0.03$ entre HIF-1 α y el descriptor Tp. T1 tuvo la menor mediana (0.88), T2 fue de 1.27, T3 de 1.44 y T4 de 1.39.

- VEGF-A y HIF-1 α mostraron una correlación con $p < 0.01$ y un coeficiente de correlación de 0.38.

- VEGF-A también tuvo correlación con una $p = 0.02$ respecto al tabaquismo (paquetes-año) con un coeficiente de correlación de 0.27. Ver figuras 24-25 y tablas 27-28.

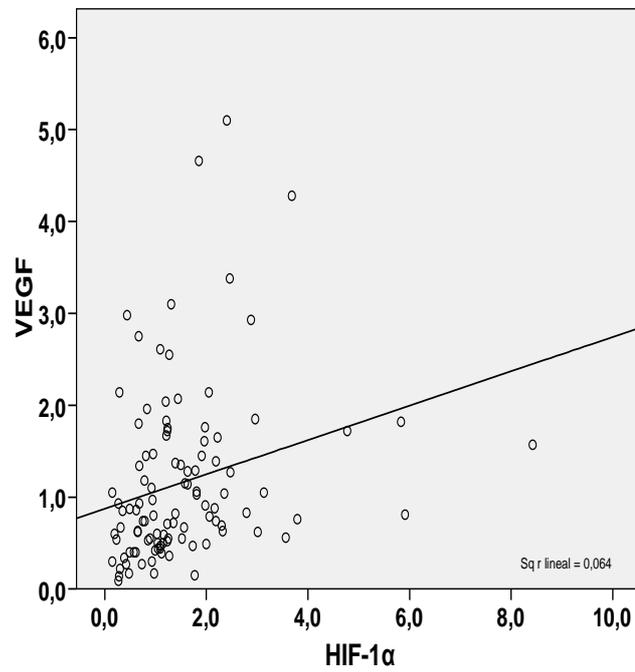


Figura 24. Gráfico de dispersión de puntos y ajuste lineal entre las variables VEGF-A y HIF-1 α . Coeficiente de determinación (r^2) = 0.06

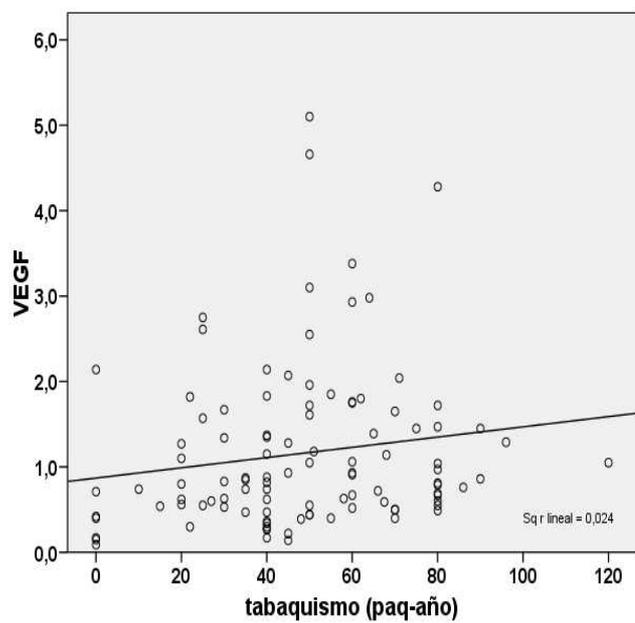


Figura 25. Gráfico de dispersión de puntos y ajuste lineal entre las variables VEGF-A y tabaquismo (paq-año). Coeficiente de determinación (r^2) = 0.02

Tabla 27. Relación de la expresión de HIF-1 α y VEGF-A con las características clinicopatológicas de los pacientes.

	HIF-1 α			VEGF-A		
	Mediana	(mínimo-máximo)	p	Mediana	(mínimo-máximo)	p
Sexo:						
varón	1.23	(0.15-8.42)	0.07	0.93	(0.14-5.10)	<0.01*
mujer	0.99	(0.23-2.16)		0.52	(0.09-2.14)	
PS-ECOG:						
0	1.18	(0.15-8.42)	0.60	0.81	(0.09-4.66)	0.14
1	1.29	(0.35-2.96)		1.11	(0.27-5.10)	
Tipo diferenciación:						
Bien	1.37	(0.93-2.32)	0.33	0.67	(0.30-2.14)	0.52
Moderadam.	1.11	(0.15-8.42)		0.79	(0.14-5.10)	
Poco	1.63	(0.15-4.77)		1.06	(0.17-3.38)	
Histología						
Epidermoide	1.39	(0.19-8.42)	0.04*	0.83	(0.17-4.28)	0.96
Adenocarcin.	1.07	(0.15-3.56)		0.81	(0.09-5.10)	
Otros Tumor.	0.93	(0.27-5.91)		0.86	(0.27-3.10)	
Microinvasión						
Neurovascular:	No	1.27	0.70	0.86	(0.22-2.93)	0.81
	Sí	1.23		0.94	(0.15-2.98)	
Estadio:						
Inicial I-II	1.21	(0.15-8.42)	0.47	0.86	(0.09-4.66)	0.99
Avanzado III	1.39	(0.15-4.77)		0.85	(0.17-5.10)	
Estadio:						
I-A	0.88	(0.27-1.31)	0.07	0.77	(0.09-3.10)	0.68
I-B	1.27	(0.19-8.42)		0.90	(0.15-4.66)	
II-B	0.97	(0.15-2.46)		0.79	(0.14-3.38)	
III-A	1.39	(0.15-3.56)		1.01	(0.30-5.10)	
III-B	1.10	(0.30-4.77)		0.55	(0.17-2.14)	
III-B	1.10	(0.30-4.77)		0.55	(0.17-2.14)	
Tp:						
T1	0.88	(0.15-1.44)	0.03*	0.77	(0.09-3.10)	0.53
T2	1.27	(0.15-8.42)		0.92	(0.15-5.10)	
T3	1.39	(0.28-2.88)		1.10	(0.14-3.38)	
T4	1.10	(0.30-4.77)		0.55	(0.17-2.14)	
Np:						
N0	1.21	(0.19-8.42)	0.63	0.81	(0.09-4.66)	0.66
N1	0.97	(0.15-2.19)		0.74	(0.17-1.80)	
N2	1.39	(0.15-4.77)		1.16	(0.22-5.10)	
Nx	1.91	(0.85-2.96)		1.19	(0.53-1.85)	
Np:						
N0	1.21	(0.19-8.42)	0.74	0.81	(0.09-4.66)	0.59
N1-2	1.35	(0.15-4.77)		0.97	(0.17-5.10)	

Marcado con asterisco los que tuvieron una $p < 0.05$

Tabla 28. Relación de la expresión de HIF-1 α y VEGF-A con las características clinicopatológicas cuantitativas de los pacientes.

	HIF-1 α	VEGF-A	Edad	Tamaño tumoral	Tabaquismo (paq-año)	Hemoglobina preoperatoria
HIF-1 α						
Coef.correlac.	1	0.38	0.06	0.15	0.16	0.12
Valor de p	.	<0.01*	0.53	0.13	0.10	0.23
VEGF-A						
Coef.correlac.	0.38	1	0.07	0.03	0.23	0.06
Valor de p	<0.01*	.	0.47	0.79	0.02*	0.53
Edad						
Coef.correlac.	0.06	0.07	1	-0.13	0.11	0.05
Valor de p	0.53	0.47	.	0.20	0.26	0.63
Tamaño Tumoral						
Coef.correlac.	0.15	0.03	-0.13	1	0.14	-0.13
Valor de p	0.13	0.79	0.20	.	0.17	0.17
Tabaquismo (paq-año)						
Coef.correlac.	0.16	0.23	0.11	0.14	1	0.11
Valor de p	0.10	0.02*	0.26	0.17	.	0.28
Hemoglobina Preoperatoria						
Coef.correlac.	0.12	0.06	0.05	-0.13	0.11	1
Valor de p	0.23	0.53	0.63	0.17	0.28	.

Con asterisco se muestran los que tuvieron una $p < 0.05$.

La recidiva tumoral es una variable cualitativa y para comparar las medianas de HIF-1 α y VEGF-A se utilizó el test no paramétrico (U-Mann-Whitney).

Los pacientes con recidiva tumoral tuvieron una mediana HIF-1 α menor (1.09) que los que no tuvieron recidiva tumoral (mediana HIF-1 α =1.23); estas diferencias estuvieron próximas a la significación estadística con $p=0.055$. No hubo significación estadística de la recidiva respecto a VEGF-A ($p=0.50$). Ver tabla 29.

Tabla 29. Relación entre la recidiva tumoral y la expresión de HIF-1 α y VEGF-A.

(Nº casos)	HIF-1 α			VEGF-A		
	Mediana	(mínimo-máximo)	p	Mediana	(mínimo-máximo)	p
No recidiva (69)	1.23	(0.27-8.42)	0.055	0.81	(0.09-5.10)	0.50
Sí recidiva (34)	1.09	(0.15-3.01)		0.88	(0.22-4.66)	

Los pacientes con recidiva tumoral fueron divididos según el lugar donde presentaron la recidiva (tabla 20, pág 91):

- recidiva torácica;
- recidiva intratorácica y extratorácica;
- recidiva extratorácica.

HIF-1 α mostró una mayor mediana en el grupo de pacientes que tuvieron recidiva intratorácica, pero los resultados no fueron estadísticamente significativos ($p=0.41$). Respecto a VEGF-A, los pacientes con recidiva limitada al tórax tuvieron una mediana mayor que los demás subgrupos, con un valor de $p=0.05$ (ver tabla 30).

Al agrupar de nuevo a los pacientes que presentaron recidiva en dos grupos, según si la recidiva fue intratorácica o extratorácica (tanto extratorácica solamente como intra- extratorácica), el valor de p fue de 0.02 respecto a VEGF-A, con una mediana menor para el grupo de recidiva tumoral extratorácica (0.59) y una mayor mediana (1.36) para el grupo de recidiva intratorácica. Con HIF-1 α , el subgrupo con recidiva limitada al tórax mostró una mediana mayor pero no estadísticamente significativa ($p=0.18$). Es decir, el grupo de pacientes que presentó recidiva tumoral a lo largo del seguimiento, mostró un patrón diferente de recidiva respecto a VEGF-A con significación estadística (ver tabla 31).

Tabla 30. Relación entre la localización de la recidiva tumoral y la expresión de HIF y VEGF-A.

Lugar de la Recidiva (Nº casos)	HIF			VEGF-A		
	Mediana	(mínimo-máximo)	p	Mediana	(mínimo-máximo)	p
intratorácica (18)	1.24	(0.19-2.96)	0.41	1.36	(0.44-3.10)	0.05
intra-extratorácica (5)	0.85	(0.23-1.78)		0.54	(0.36-2.98)	
extratorácica (11)	0.81	(0.15-3.01)		0.62	(0.22-4.66)	

Tabla 31. Distribución de la localización de la recidiva tumoral intratorácica (sólo intratorácica) y extratorácica (cualquier paciente con recidiva extratorácica) y la expresión de HIF y VEGF-A.

Lugar de la Recidiva (Nº casos)	HIF			VEGF-A		
	Mediana	(mínimo-máximo)	p	Mediana	(mínimo-máximo)	p
intratorácica (18)	1.24	(0.19-2.96)	0.18	1.36	(0.44-3.10)	0.02
extratorácica (16)	0.83	(0.15-3.01)		0.59	(0.22-4.66)	

Para analizar las variables moleculares HIF-1 α y VEGF-A, a los pacientes se les clasificó en dos subgrupos atendiendo al valor de la mediana. Los que tuviesen un valor igual o menor que la mediana estuvieron en el grupo llamado “HIF-1 α bajo” o bien “VEGF-A bajo” y los que tuvieron un valor mayor a la mediana estuvieron en el grupo llamado “HIF-1 α elevado” o “VEGF-A elevado”. Los pacientes del grupo HIF-1 α bajo alcanzaron una mediana de supervivencia de 30.3 meses y los pacientes del grupo HIF-1 α elevado no alcanzaron la mediana de mortalidad. Es decir, los pacientes con un HIF-1 α bajo

tuvieron menor supervivencia que los de HIF-1 α elevado, sin embargo, esta diferencia no tuvo significación estadística ($p=0.17$).

Los pacientes con VEGF-A bajo tuvieron una mediana de 38.0 meses y los que tuvieron VEGF-A elevado su mediana fue de 28.3 meses. Es decir, los pacientes con un VEGF-A elevado tuvieron menor supervivencia que los de VEGF-A bajo, pero estas diferencias no tuvieron significación estadística ($p=0.23$). Ver figuras 26 y 27 y tabla 32.

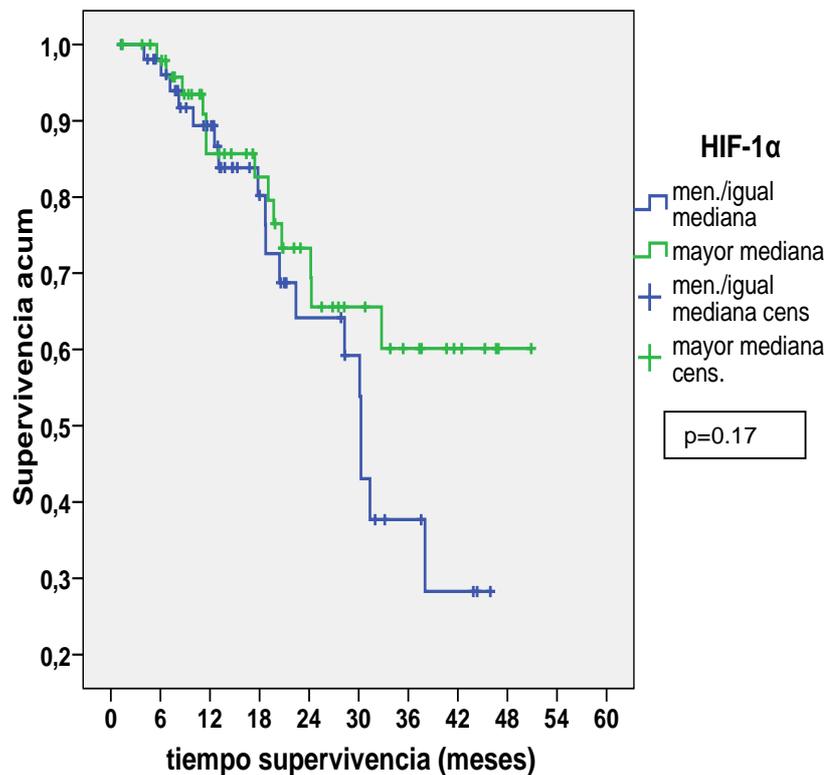


Figura 26. Gráfico de la supervivencia entre pacientes con una expresión de HIF-1 α menor o igual a la mediana y los que tuvieron una expresión mayor a la mediana.

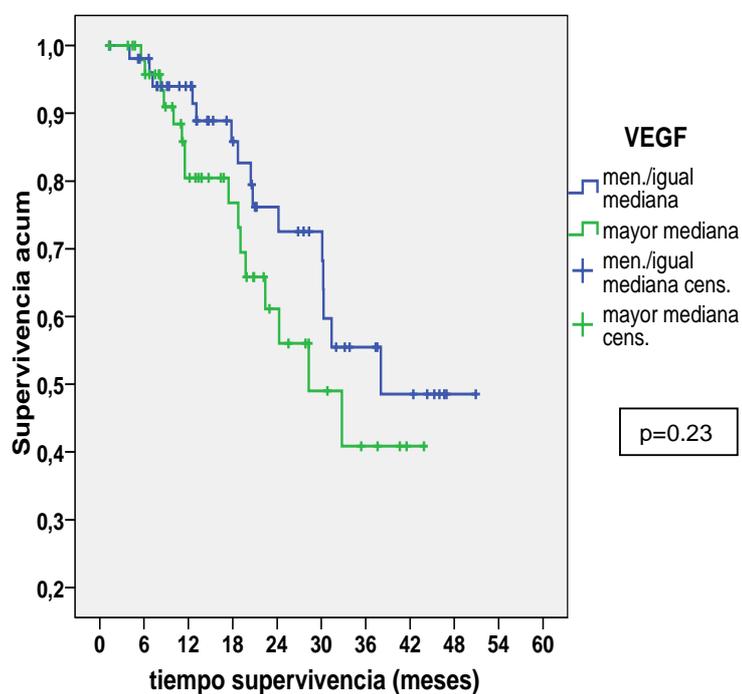


Figura 27. Gráfico de la supervivencia entre pacientes con una expresión de VEGF-A menor o igual a la mediana y los que tuvieron una expresión mayor a la mediana.

Tabla 32. Estadística de la supervivencia (kaplan-Meier y log rank) referente a las variables moleculares.

	Mediana (meses)	I.C. al 95%	Superv. Acumul. (meses)			Valor p
			12	24	36	
HIF-1 α (mediana)						
Menor o igual	30.27	27.75 - 32.79	0.88	0.67	0.34	0.17
Mayor	N.A.		0.85	0.73	0.60	
VEGF-A						
Menor o igual	38.03	.	0.93	0.72	0.55	0.23
Mayor	28.30	24.01 - 41.53	0.80	0.61	0.41	
Riesgo según HIF-1 α / VEGF-A						
bajo	N.A.	.	0.94	0.85	0.77	0.09
medio	31.37	28.04 - 34.69	0.87	0.68	0.43	
elevado	22.40	13.72 - 31.07	0.81	0.48	0.24	

I.C.: intervalo de confianza. N.A.: no se alcanzó la mediana de mortalidad.

Al agrupar a los pacientes que tuvieron HIF-1 α bajo y a la vez VEGF-A elevado (ambas situaciones indicaron una peor supervivencia aunque sin significación estadística) y compararlos con los demás pacientes, la supervivencia también fue más baja (mediana = 22.4 meses) en el subgrupo de “HIF-1 α bajo- VEGF-A elevado” que en el resto de pacientes (mediana = 38.0 meses), aunque sin significación estadística ($p=0.19$). Ver figura 28.

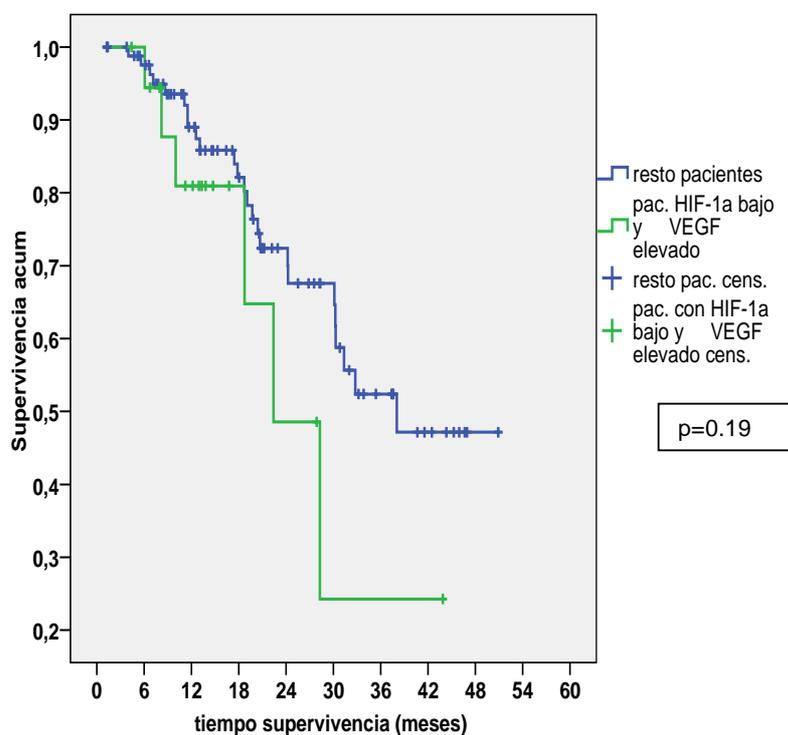


Figura 28. Gráfico de la comparación de la supervivencia con el test de log-rank entre los pacientes que presentaron una expresión de HIF-1 α menor o igual a la mediana y también VEGF-A mayor a la mediana con los demás pacientes.

Para el periodo libre de enfermedad (ver tabla 33), también se agrupó a los pacientes según la mediana de VEGF-A y HIF-1 α como ya se explicó anteriormente. Los pacientes con HIF-1 α bajo tendieron hacia una menor mediana del tiempo libre de enfermedad ($p=0.27$). Los pacientes con VEGF-A bajo mostraron una tendencia hacia una mayor mediana ($p=0.49$). Ver figuras 29 y 30.

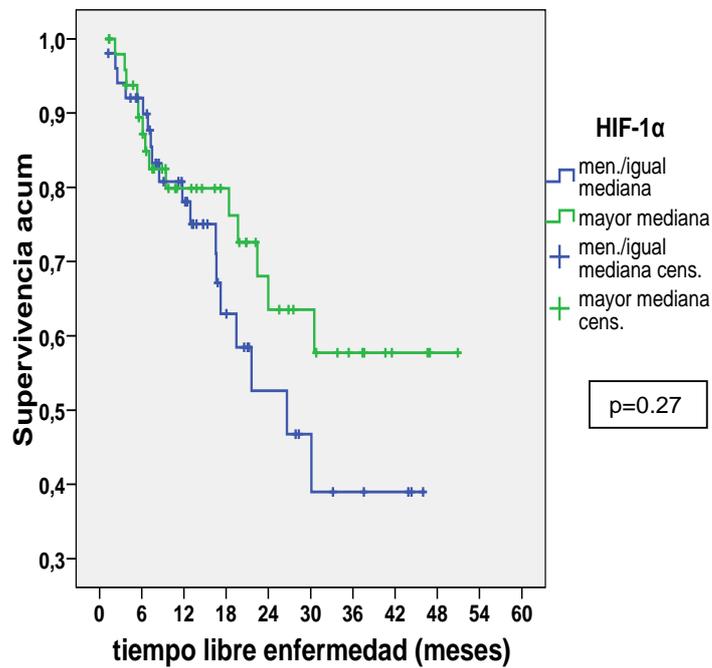


Figura 29. Gráfico del tiempo libre de enfermedad tumoral entre pacientes con una expresión de HIF-1 α menor o igual a la mediana y los que tuvieron una expresión mayor a la mediana.

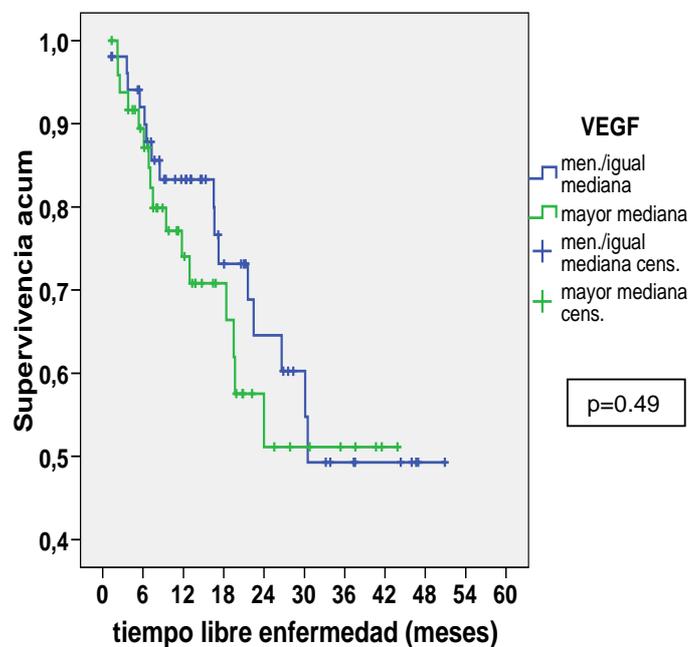


Figura 30. Gráfico del tiempo libre de enfermedad tumoral entre pacientes con una expresión de VEGF-A menor o igual a la mediana y los que tuvieron una expresión mayor a la mediana.

Tabla 33. Cuadro del tiempo libre de enfermedad tumoral (kaplan-Meier y log rank) referente a las variables moleculares. I.C.: intervalo de confianza. N.A.: no se alcanzó la mediana.

	Mediana (meses)	I.C. al 95%	Superv. Acumul. (meses)			Valor p
			12	24	36	
HIF-1 α (mediana)						
Menor o igual	26.63	15.56 – 37.70	0.78	0.52	0.39	0.27
Mayor	N.A	.	0.80	0.63	0.58	
VEGF-A						
Menor o igual	30.5	.	0.83	0.64	0.49	0.49
Mayor	N.A	.	0.73	0.57	0.51	

Se observa una tendencia hacia un peor pronóstico en aquellos pacientes con HIF-1 α inferior a la mediana (llamado HIF-1 α bajo) y también en los que tuvieron VEGF-A superior a la mediana (VEGF-A alto). Según esta tendencia, se hicieron tres subgrupos de pacientes que pueden considerarse como:

- riesgo bajo, cuando HIF-1 α fue elevado y a la vez VEGF-A bajo
- riesgo medio, cuando HIF-1 α fue elevado y VEGF-A elevado, o bien, HIF-1 α bajo y VEGF-A bajo
- riesgo alto, cuando HIF-1 α fue bajo y VEGF-A elevado.

Al comparar la supervivencia de los tres subgrupos, se observó cómo hubo una tendencia a una mayor supervivencia para los pacientes de riesgo bajo ($p=0.09$), ver tabla 32. Al comparar los subgrupos dos a dos, se obtuvo que las diferencias tuvieron significación estadística entre el grupo de riesgo bajo y el de riesgo alto ($p=0.047$), y una tendencia hacia un peor pronóstico entre el grupo de riesgo medio respecto al de riesgo bajo ($p=0.07$). La diferencia fue menos llamativa entre los subgrupos de riesgo medio y alto ($p=0.36$). Ver figuras 31-34.

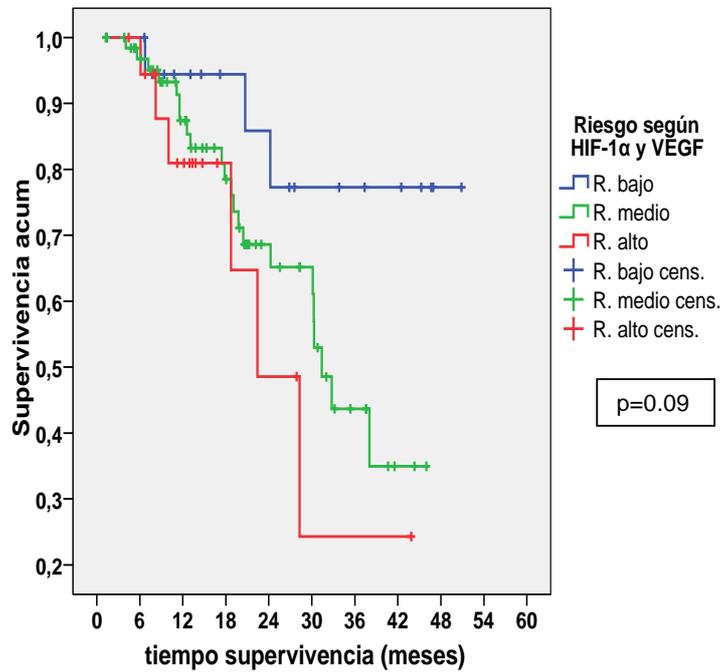


Figura 31. Gráfico de la supervivencia según el valor de HIF-1α y de VEGF-A:
 -riesgo bajo cuando HIF-1α fue elevado y VEGF-A bajo
 -riesgo medio si HIF-1α fue elevado y VEGF-A elevado, o bien, HIF-1α bajo y VEGF-A bajo
 -riesgo alto si HIF-1α fue bajo y VEGF-A elevado

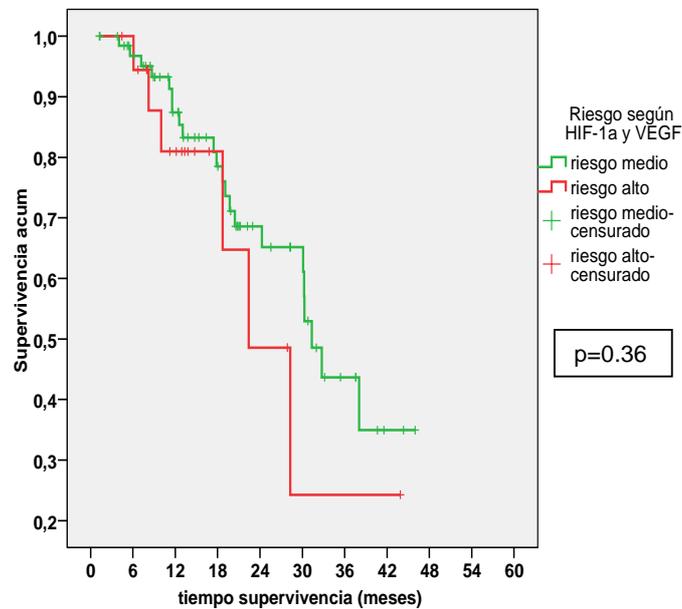


Figura 32. Gráfico de la supervivencia según el valor de HIF-1α y de VEGF-A:
 -riesgo medio si HIF-1α fue elevado y VEGF-A elevado, o bien, HIF-1α bajo y VEGF-A bajo
 -riesgo alto si HIF-1α fue bajo y VEGF-A elevado

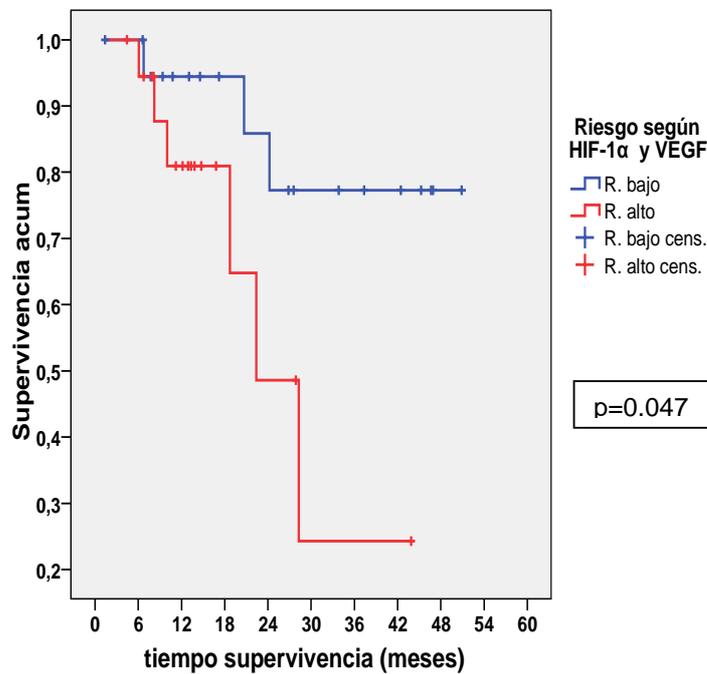


Figura 33. Gráfico de la supervivencia según el valor de HIF-1α y de VEGF-A:
 -riesgo bajo cuando HIF-1α fue elevado y VEGF-A bajo
 -riesgo alto si HIF-1α fue bajo y VEGF-A elevado

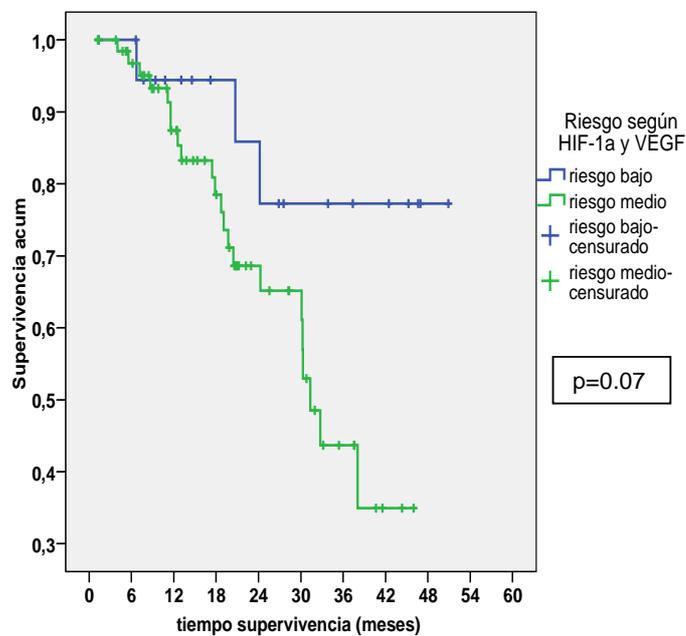


Figura 34. Gráfico de la supervivencia según el valor de HIF-1α y de VEGF-A:
 -riesgo bajo cuando HIF-1α fue elevado y VEGF-A bajo
 -riesgo medio si HIF-1α fue elevado y VEGF-A elevado, o bien, HIF-1α bajo y VEGF-A bajo

Al utilizar las variables HIF-1 α , VEGF-A y la combinación para el subgrupo de riesgo alto (combinación de HIF-1 α bajo y VEGF-A elevado) como tests diagnósticos sobre la recidiva tumoral, se obtuvo que los datos más destacados fueron la elevada especificidad (82.6%) del subgrupo de riesgo alto y el mayor valor predictivo negativo (70.6%) para HIF-1 α (ver tablas 34-35).

Tabla 34. Resultados de los tests diagnósticos (HIF-1 α , VEGF-A) sobre la recidiva tumoral.

	VP	VN	FP	FN
HIF-1 α	19	36	33	15
VEGF-A	17	36	33	17
Combinación H-V (\downarrow HIF-1 α / \uparrow VEGF-A)	7	57	12	27

VP: verdaderos positivos. VN: verdaderos negativos. FP: falsos positivos. FN: falsos negativos.

Tabla 35. Pruebas de eficacia y seguridad diagnóstica de HIF-1 α , VEGF-A y la combinación de HIF-1 α bajo con VEGF-A elevado respecto a la recidiva tumoral.

	HIF-1 α	VEGF-A	Combinación H-V (\downarrow HIF-1 α / \uparrow VEGF-A)
Sensibilidad	55.9%	50.0%	20.6%
Especificidad	52.2%	52.2%	82.6%
VPP	36.5%	34.0%	36.8%
VPN	70.6%	67.9%	67.9%
Exactitud	53.4%	51.4%	62.1%

VPP: valor predictivo positivo. VPN: valor predictivo negativo.

4.5.- Factores pronóstico de supervivencia

El descriptor Tp tuvo un riesgo relativo de 2.54 ($p=0.02$) y la agrupación en estadio inicial o avanzado mostró un riesgo relativo de 2.07 con $p=0.05$. Con HIF-1 α se mostró una tendencia hacia un factor protector por tener un riesgo relativo < 1 y con VEGF-A hacia un factor de mayor riesgo por ser superior a la unidad, aunque ambos resultados no fueron estadísticamente significativos (ver tabla 36).

En el modelo multivariante se incluyeron las variables que tuvieron un valor de $p<0.05$ en el modelo univariante. Se obtuvo que sólo el descriptor Tp presentó significación estadística con un riesgo relativo de 2.54 ($p=0.02$). Ver tabla 37.

Tabla 36. Análisis univariante de los riesgos proporcionales (regresión de Cox) de las diferentes covariables anatomopatológicas y moleculares sobre el tiempo de supervivencia.

	O.R.	I.C. al 95%	Valor de p
HIF-1 α	0.61	0.30 – 1.25	0.18
VEGF-A	1.54	0.76 – 3.14	0.23
Combinación de HIF-1 α /VEGF-A			0.11
Descriptor Tp (T1-2/T3-4)	2.54	1.19 – 5.41	0.02
Descriptor Np (N0/N1-N2)	1.49	0.70 – 3.19	0.30
Estadio (Inicial I-II/Avanzado III)	2.07	0.99 – 4.32	0.054
Diferenciación (Bien/moderado/poco)			0.32
Histología (Epidermoide/Adenoca)	2.14	0.84 – 5.49	0.11
Microinvasión vasculonerviosa (sí/no)	1.40	0.60 – 3.24	0.43

O.R.: odds ratio. I.C.: intervalo de confianza

Tabla 37. Análisis multivariante de los riesgos proporcionales (regresión de Cox) de las diferentes covariables sobre el tiempo de supervivencia.

	O.R.	I.C. al 95%	Valor de p
Descriptor Tp (T1-2/T3-4)	2.54	1.19 – 5.41	0.02
Estadio (Inicial I-II/Avanzado III)			0.27

O.R.: odds ratio. I.C.: intervalo de confianza

4.6.- Factores pronóstico del tiempo libre de enfermedad tumoral

En el modelo univariante ninguna variable tuvo significación estadística ($p > 0.05$).

Ver tabla 38.

Tabla 38. estadística del análisis univariante de los riesgos proporcionales (regresión de Cox) de las diferentes covariables anatomopatológicas y moleculares sobre el tiempo libre de enfermedad.

	O.R.	I.C. al 95%	Valor de p
HIF-1 α	0.68	0.33 – 1.37	0.27
VEGF-A	1.28	0.64 – 2.57	0.49
Combinación de HIF-1 α /VEGF-A			0.35
Descriptor Tp (T1-2/T3-4)	1.65	0.74 – 3.69	0.22
Descriptor Np (N0/N1-N2)	1.75	0.85 – 3.58	0.13
Estadio (Inicial I-II/Avanzado III)	1.75	0.84 – 3.65	0.13
Diferenciación (Bien/moderado/poco)			0.48
Histología (Epidermoide/Adenoca)	1.70	0.72 – 3.98	0.22
Microinvasión vasculonerviosa (sí/no)	2.27	0.87 – 5.89	0.09

O.R.: odds ratio. I.C.: intervalo de confianza

No se hizo análisis multivariante porque ninguna variable tuvo una $p < 0.05$ en el univariante.

5.- DISCUSIÓN

La importancia del cáncer de pulmón es un hecho presente desde las últimas décadas en nuestro medio y en los países desarrollados. Es una enfermedad con gran relevancia sanitaria por su elevada mortalidad, superando incluso a la suma de los otros tres cánceres más frecuentes (colon, mama y próstata). Es la causa más frecuente de mortalidad relacionada con el cáncer en los países desarrollados (Greenlee 2001). Su incidencia es similar a su prevalencia, dato que refleja su alta mortalidad, y en las últimas décadas no se ha conseguido una gran mejoría en la supervivencia de los pacientes con esta enfermedad. La cirugía es el principal tratamiento por su efectividad contra el cáncer de pulmón en estadios iniciales. Sin embargo, la gran mayoría de los pacientes presentan en el momento del diagnóstico un estadio avanzado, donde las posibilidades de curación son reducidas. El screening y diagnóstico precoz del cáncer de pulmón es un reto de la medicina actual. Todavía no hay evidencia consolidada de que el screening del cáncer de pulmón mejore la supervivencia, a diferencia de lo que ocurre en otros cánceres como el de mama o de próstata (Bach 2003).

El pronóstico del cáncer de pulmón está determinado por su estadio. Actualmente la clasificación del cáncer de pulmón viene dada por el sistema TNM. Es una clasificación que ha sufrido varias revisiones y que está en constante evolución. Este modelo de clasificación atiende fundamentalmente a elementos anatómicos o anatomopatológicos, de modo que el estadio final y el pronóstico de la enfermedad están considerados como consecuencia de la extensión estructural y anatómica de la enfermedad. El cáncer es un proceso biológico complejo cuyos resultados macroscópicos son el reflejo de las alteraciones en la expresión biomolecular, celular y de la ruptura del equilibrio fisiológico preexistente. Estas alteraciones moleculares tienen implicaciones en el pronóstico y en la evolución de cada paciente con cáncer de pulmón. Sin embargo, hoy día, estos hallazgos biológicos no tienen ninguna manifestación ni ninguna representación en la clasificación o estadificación del cáncer de pulmón ni en el seguimiento rutinario de estos pacientes. Por este motivo, la investigación biomolecular del cáncer de pulmón ofrece una gran relevancia en cuanto a su potencial aplicación y a su posible utilidad para la práctica clínica diaria.

La estadificación preoperatoria viene orientada por estudios de imágenes, como la radiografía simple de tórax, la TC, la RNM, la PET-TC, la gammagrafía ósea, etc. Estas pruebas inocográficas guían sobre la sospecha de afectación ganglionar mediastínica o

de metástasis a distancia y se confirma mediante biopsias con punción o biopsias quirúrgicas. Todas las exploraciones complementarias tienen sus limitaciones en cuanto a su sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo. Los casos de falsos negativos pueden surgir ante las limitaciones para diagnosticar una lesión todavía con un tamaño pequeño y una baja actividad metabólica, las micrometástasis pueden pasar desapercibidas y producirse una infraestadificación del cáncer de pulmón.

Es sabido que pacientes con un mismo estadio inicial y que hayan recibido el mismo tratamiento curativo pueden presentar una evolución diferente; de modo que, en unos pacientes es posible la aparición de recidiva tumoral local o la presencia de metástasis a distancia en un periodo de tiempo más corto que en otros pacientes con el mismo estadio (Padilla 2002). Además, la resistencia que presentan ciertos pacientes a agentes quimioterápicos es un dato también observado con frecuencia (Adams 2010). Por todas estas razones, es necesario indagar en el comportamiento biomolecular del cáncer de pulmón para conocer mejor su funcionamiento, poder prever qué pacientes presentarán un mayor riesgo de recidiva tras la cirugía, quiénes serán más propensos a desarrollar fenómenos de quimiorresistencia y qué pacientes se beneficiarían de un tratamiento complementario. En definitiva, el estudio biomolecular del cáncer de pulmón tiene, día tras día, mayor dedicación y mayor campo de trabajo. La tendencia futura puede ser proporcionar al paciente con cáncer de pulmón un tratamiento personalizado según el comportamiento biológico que exprese (Adams 2010).

Los tumores sólidos necesitan, para crecer y expandirse, la formación de nuevos vasos sanguíneos que les proporcionen nutrición y sustento adecuados. La neovascularización que ocurre con el desarrollo de nuevos vasos a partir de los ya existentes, se conoce como angiogénesis. Desde el momento en el que el tumor tiene un tamaño superior a unos pocos milímetros, queda sometido a una situación de estrés hipóxico al que debe responder y adaptarse para continuar su desarrollo (Folkman 1971). El HIF-1 α es uno de los principales factores para la adaptación celular tumoral al ambiente hipóxico. Con el incremento de HIF-1 α se activan una gran cantidad de genes (conocidos como elementos de respuesta a la hipoxia) que proporcionan una serie de acciones y cualidades a las células tumorales para favorecer su estabilidad y su crecimiento. Entre estas acciones destacan: el metabolismo anaerobio, fenómenos de quimiorresistencia, glicolisis anaerobia, inhibición de la apoptosis, favorecer la

angiogénesis, etc (Bikfalvi 1997). El VEGF-A es una de las moléculas que aumenta su expresión inducida por HIF-1 α . Hay una relación directa entre HIF-1 α y VEGF-A. En este estudio también se observó una relación directamente proporcional (ver figura 24), pero fue una relación débil con un coeficiente de determinación bajo ($r^2= 0.06$). Esto puede ser debido a que VEGF-A se activa también mediante otras vías diferentes con independencia de HIF-1 α , como ocurre en determinadas alteraciones genéticas (mutaciones, deleciones...). VEGF-A estimula la migración de macrófagos que, a su vez, también son productores de factores angiogénicos como VEGF-A, TNF- α , etc. (Vaupel 2004) (Kuhn 2006). La angiogénesis es un proceso complejo con múltiples factores moleculares interconectados y se añade, además, el hecho de que su manifestación fenotípica puede depender de su polimorfismo genético haciendo un tanto más difícil de determinar la relación de la expresión genotípica con la expresión fenotípica observada (Koukourakis MI. 2006). El papel que los diferentes factores de crecimiento angiogénicos desempeñan en la formación de nuevos vasos sanguíneos y en la expansión del tumor es motivo de múltiples estudios. Así mismo, la terapia antiangiogénica con inhibidores de VEGF-A está ya siendo extensamente investigada en ensayos clínicos. El anticuerpo monoclonal bevacizumab dirigido contra VEGF-A en combinación con quimioterápicos habituales es una muestra de ello con estudios en fase-II (Herbst 2004).

Son numerosos los estudios sobre angiogénesis, VEGF-A y CPNCP. Sin embargo, son escasos los que analizan HIF-1 α y VEGF-A simultáneamente en esta enfermedad. También la mayoría de los estudios sobre este tema realizan el análisis de la angiogénesis apoyado en estudios de inmunohistoquímica y son menos frecuentes los que trabajan con RT-PCR. La inmunohistoquímica tiene el inconveniente de ser un dato más subjetivo, ya que clasifican la actividad angiogénica según sea más o menos intensa la tinción resultante cuando se observan las muestras al microscopio. Es decir, depende del observador (subjetividad). Por el contrario, con RT-PCR se obtienen unos resultados cuantitativos, objetivos, su manejo es relativamente sencillo, reproducible con facilidad y un aparataje accesible a cualquier hospital interesado en la investigación clínica biomolecular.

Referente a las variables clinicopatológicas de los pacientes, los datos observados en este estudio son similares a la literatura científica habitual y a los datos epidemiológicos registrados en España. La edad media fue de 63.5 años con un rango entre 37-85 años. En este estudio la mitad de los pacientes tenía una edad superior a 64 años, dato que concuerda con los que figuran en una de las últimas revisiones epidemiológicas españolas (Sánchez de Cos 2009), corroborando el hecho de que el cáncer de pulmón lo padecen principalmente personas a partir de la quinta década de la vida.

Prácticamente todos los pacientes eran fumadores activos o exfumadores (93.4%), con un consumo medio acumulado de 48.7 paquetes-año. Se consideraron exfumadores a aquellos pacientes que abandonaron el tabaco durante un tiempo de seis o más meses ininterrumpidamente antes de la intervención quirúrgica. Sólomente un 6.6% no tenían antecedentes de contacto directo con el tabaco. No se investigó el tabaquismo pasivo en este estudio, causa también conocida como factor etiopatogénico del cáncer broncopulmonar.

El tipo histológico más frecuente en este estudio fue el carcinoma epidermoide con un 46.2% de los casos, seguido del adenocarcinoma con un 35.8%; este hallazgo también está en consonancia con los datos epidemiológicos de España (Montero 2003). Sin embargo, en otros países como Estados Unidos, Japón, etc., hay un predominio del adenocarcinoma (Travis 1995, Charloux 1997). Quizá la modificación de los filtros de los cigarrillos y del hábito de la calada (más profunda haría que el humo del tabaco llegase a los bronquios más distales y periféricos, que es donde suele presentarse el adenocarcinoma). En España, las últimas series reflejan todavía un predominio del carcinoma epidermoide (Hernández 2004, Mirabet 2004). Al observar la distribución histológica atendiendo al sexo hubo variaciones, de modo que las mujeres presentaron la variedad adenocarcinoma en el 81.8% de los casos; en consonancia con los estudios epidemiológicos habituales del CPNCP en la mujer (Patel 2004 y Henschke 2004). El tabaquismo fue también más intenso en los varones que en las mujeres, dato que indica el patrón de consumo de tabaco hace unas décadas y que se ve reflejado en los pacientes que padecen actualmente esta patología. Globalmente, el sexo masculino fue el predominante con un 89.6% de los casos.

Hay muchos estudios sobre la angiogénesis tumoral y los múltiples factores o moléculas que intervienen en las diferentes fases de la neovascularización. El VEGF-A es el factor principal por su actividad angiogénica. Los resultados sobre el pronóstico de los factores VEGF-A y HIF-1 α en el cáncer de pulmón son contradictorios. Es decir, en la literatura hay autores que observaron un peor pronóstico con la sobreexpresión de VEGF-A o de HIF-1 α , siendo esta vertiente la predominante (Niklinska 2001, Kim 2005, Brattström 2002, O'Byrne 2000, Kajita 2001, Ishii 2004, Kuhn 2006, Semenza 2003, Giatromanolaki 2001, Zhong 1999, Enatsu 2006, Liao 2007). Pero, también existen otros trabajos donde no encontraron resultados para poder considerarlos como factores de peor pronóstico (Offersen 2001, Liao 2001) o incluso otros grupos de trabajo han observado resultados con un mejor pronóstico (Brattström 2004, Volm 2000, Aabersold 2001, Lidgren 2005). Aunque esta última postura es más infrecuente en la literatura científica.

El mecanismo entre la hipoxia tisular que ocurre con el crecimiento tumoral, la menor degradación de HIF-1 α y el consiguiente incremento de VEGF-A es conocido. Como ya se comentó en la introducción (ver figuras 7-8), cuando se da una situación de hipoxia celular, se inactiva la enzima proil-hidroxilasa, se bloquea la degradación lisosomal de HIF-1 α y se favorece su traslocación al núcleo celular para activar a los diferentes genes a través de la zona de ADN conocida como elementos sensibles a la hipoxia (HRE). Además de ese mecanismo directo entre HIF-1 α y VEGF-A, también se ha observado que deben existir mecanismos independientes de HIF-1 α (Liao 2007) y de VEGF-A (O'Byrne 2000) mediante los que se producen un incremento de la neovascularización tumoral. VEGF-A está regulado también mediante vías no hipóxicas como estrógenos, NF- κ B, TNF- α , etc. (Shibuya 2008, Kuhn 2006, Kim 2005). Igualmente, también se han descrito mecanismos independientes de la hipoxia por los que se produce un aumento de HIF-1 α como son la vía PI3K/AKT (Solban 2006, Vleugel 2004), inactivación de genes supresores tumorales como p53, pVHL, PTEN o a través de oncogenes como Src, HER/2, Ha-Ras, etc. (Zhang 2007).

Estas situaciones implican que la relación entre HIF-1 α , VEGF-A y la hipoxia sean más complejas y no siempre sean tan fáciles de asimilar o encontrar una interpretación sencilla a sus resultados. Y aún hay mayor variación si se tiene en cuenta el fenómeno de

polimorfismo genético y la variación fenotípica que pueden mostrar los diferentes perfiles genotípicos (Koukourakis 2004. Koukourakis 2006).

Al estudiar las relaciones entre HIF1- α y VEGF-A con las variables clinicopatológicas, se halló relación entre VEGF-A y el sexo, con una mayor expresión entre los varones que en las mujeres ($p < 0.01$). También hubo correlación con significación estadística entre VEGF-A y el tabaquismo ($p = 0.02$). Estos datos pueden reflejar que el tabaco favorece el incremento de VEGF-A y, también, que es mayor el tabaquismo en los varones que en el sexo femenino, como se observa en el análisis descriptivo (ver tabla 23). Con HIF1- α la tendencia fue similar, aunque los valores estuvieron próximos a la significación estadística respecto al sexo y al tabaquismo, con $p = 0.07$ y $p = 0.10$ respectivamente. Este dato también ha sido observado por otros autores y es una muestra del efecto potencialmente angiogénico que posee el tabaco (Zhang 2007). La nicotina, además de su efecto adictivo y psicoestimulante, también posee un efecto angiogénico a través de un incremento de HIF-1 α y de VEGF-A como se ha descrito en estudios experimentales con células in vitro (Zhang 2007). Esto es un ejemplo de la existencia de mecanismos independientes de la hipoxia para favorecer el incremento de HIF1- α , como también a través de determinadas citocinas, hormonas, factores de crecimiento, oncogenes o genes supresores tumorales, ya comentados anteriormente. Todas estas opciones indican un amplio y complejo papel de HIF1- α en la biología tumoral.

La relación entre el tabaquismo y HIF1- α fue directamente proporcional, aunque sin obtener significación estadística (ver tabla 28). La relación entre HIF1- α y VEGF-A es directa, como se desprende de los estudios fisiológicos que relacionan HIF1- α con VEGF-A y de los resultados de varios grupos, quienes analizaron VEGF-A y HIF1- α mediante inmunohistoquímica (Giatromanolaki 2001, Kim 2005 y Enatsu 2006). La mencionada relación en este estudio consiguió significación estadística ($p < 0.01$), sin embargo, el coeficiente de correlación entre HIF1- α y VEGF-A obtenido no fue muy alto ($r = 0.38$), lo cual puede ser debido a que existen también otras vías alternativas a HIF1- α para producir un incremento en la expresión de VEGF-A.

La clasificación histológica se dividió entre los subgrupos: carcinoma epidermoide, adenocarcinoma (que fueron los dos más numerosos representando al 82% del total) y un

tercer grupo donde se incluyeron los demás tipos histológicos. HIF1- α mostró significación estadística sobre el descriptor Tp y en los carcinomas epidermoides (ver tabla 27). Esta explicación puede ser debida a que el tamaño medio de los carcinomas epidermoides fue mayor (4.69 cm) que el de los adenocarcinomas (3.43 cm), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.01$). Los tumores que fueron T1 presentaron menor expresión de HIF1- α , probablemente debido a que son tumores más pequeños (3 cm o menos) y con un ambiente menos hipóxico. Con VEGF-A, los valores fueron muy similares entre los subtipos histológicos, por lo que no se observó una tendencia claramente predominante.

HIF1- α y VEGF-A mostraron mayor expresión en los tumores poco diferenciados, así como en los casos con estadio avanzado y afectación ganglionar mediastínica; pero ninguno de estos resultados obtuvieron significación estadística (ver tabla 27). Sólo se pudo recoger el grado de diferenciación tumoral en el 80.2% de los casos, ya que este dato no siempre lo reflejaron los patólogos.

La intervención quirúrgica más habitual fue la lobectomía en un 58,5% de los casos. Este tipo de resección es el estándar para el tratamiento del cáncer de pulmón. Las resecciones más amplias quedan reservadas para los casos con tumores mayores o que invaden estructuras que imposibilitan una resección menor. De igual forma, la resección sublobar se realiza principalmente en aquellos pacientes con unas pruebas de función respiratoria límites, importante comorbilidad asociada, etc. Actualmente, las recomendaciones más recientes, aceptan la resección sublobar (segmentectomía o cuña amplia) como una opción terapéutica válida para tumores en estadio I de pacientes y que posean un alto riesgo quirúrgico, o que sean mayores de 75 años; si bien, en los de un tamaño superior a 3 cm (T2) se recomienda la lobectomía (Schubert 2010). También en el carcinoma bronquioloalveolar, la resección sublobar es aceptada ante un tamaño pequeño, ya que es una patología frecuentemente multifocal y rara vez asociada a afectación ganglionar donde la supervivencia a los 5 años es elevada y así se permite conservar parénquima pulmonar para futuras resecciones pulmonares (Rusch 2006, Yoshioka 2009).

El estadio tumoral más frecuente fue el I-B con un 45.3% de los casos y también es el más frecuente descrito en la literatura sobre los pacientes sometidos a tratamiento

quirúrgico (Ginsberg 2002). La agrupación de estadio inicial englobó al estadio I-A, I-B, II-A y II-B y el término estadio avanzado al estadio III. Entre los 106 pacientes que formaron este estudio, no hubo ninguno con estadio IV porque quedaron excluidos al ajustar las condiciones de inclusión y exclusión como se detalla en el apartado de la metodología. No se encontró relación con significación estadística entre HIF-1 α y VEGF-A con la agrupación de los pacientes por estadio inicial / avanzado. Sin embargo, se apreció una tendencia hacia valores más inferiores de HIF-1 α en el estadio I-A (mediana de 0.88 y una $p=0.07$) que en los demás estadios. Es decir, el estadio I-A, que viene determinado principalmente por el tamaño tumoral más pequeño y por la ausencia de afectación ganglionar metastásica (ver tablas 4 y 5), fue el estadio en el que la expresión de HIF-1 α registrada fue la más baja con una mediana de 0.88. De este modo, puede deducirse que el incremento de HIF-1 α se observó en tumores más grandes y por tanto con mayores áreas sometidas a hipoxia celular. De la misma forma, el descriptor T1 anatomopatológico que es el tumor con menor tamaño (3 ó menos centímetros de diámetro) mostró una menor expresión de HIF-1 α con significación estadística ($p=0.03$). El tamaño tumoral más pequeño presenta, posiblemente, menos áreas sometidas a un ambiente hipóxico y, por tanto, menor expresión de HIF-1 α . Estos hallazgos orientan a que cuando el tumor tiene un mayor tamaño, hay más estrés hipóxico celular por la privación relativa de la vascularización y así se incrementa la síntesis de HIF-1 α . Con VEGF-A hubo una tendencia similar, es decir, una menor expresión en tumores más pequeños y un incremento sobre los tumores mayores, aunque las diferencias no tuvieron significación estadística (tabla 27).

Hubo una expresión aumentada de HIF1- α en los pacientes con estadio III-A y una mayor disminución sobre los pacientes en estadio I-A con un valor cercano a la significación estadística ($p=0.07$). Con VEGF-A se observó una tendencia similar (incremento en estadio mayor y disminución en el estadio menor) pero sin significación estadística. Ishii et al. demostraron en un estudio experimental cómo la diseminación metastásica pleural y ganglionar viene favorecida por la secreción de VEGF de las células tumorales (Ishii 2004) lo que apoya la mencionada tendencia en este estudio de VEGF-A respecto al estadio.

En cuanto al descriptor N, VEGF-A y HIF-1 α presentaron mayor expresión en el subgrupo de pacientes con afectación ganglionar mediastínica (N2), pero sin significación

estadística. El subgrupo sin metástasis ganglionar (N0) tuvo una mediana mayor que el subgrupo N1 pero no que los pacientes con N2; esto puede indicar que desde un estadio más inicial sin afectación ganglionar metastásica ya se produce una activación de la mecánica angiogénica tumoral. El trabajo de Kawai et al. sostiene que desde una fase precoz, ocurre un incremento de la actividad de VEGF-A en el ganglio centinela de pacientes con cáncer de pulmón, aún incluso sin que haya afectación metastásica ganglionar (Kawai 2008). Al evaluar globalmente a los pacientes sin afectación ganglionar y a los que sí tuvieron metástasis ganglionar (tanto N1 como N2), se observó un incremento de HIF-1 α y VEGF-A en este último grupo, aunque sin alcanzar significación estadística (ver tabla 27). Los mecanismos de la angiogénesis para los vasos sanguíneos también son aplicables a los vasos linfáticos (linfangiogénesis) y a su papel en la afectación ganglionar metastásica locorregional. Donnem et al. estudiaron la relación entre VEGF-A en el cáncer de pulmón y la afectación ganglionar y observaron una relación con significación estadística entre VEGF-A y la metástasis ganglionar linfática (Donnem 2009). Otros autores, por el contrario, no encontraron este enlace entre VEGF y las metástasis ganglionares (Renyi-Vamos 2005).

Los pacientes que sufrieron recidiva tumoral presentaron una mediana de HIF-1 α inferior que los pacientes sin recidiva, siendo esta diferencia con un valor muy cercano a la significación estadística ($p=0.055$). Este resultado muestra que la mayor expresión de HIF-1 α pueda ejercer un efecto protector sobre la recidiva tumoral, o bien, que una reducida expresión de HIF-1 α puede favorecer determinados mecanismos celulares para estimular la metástasis tumoral tras el tratamiento quirúrgico. Al estudiar la variable recidiva respecto a la expresión de VEGF-A no se hallaron diferencias significativas ($p=0.5$), con medianas muy similares (0.88 y 0.81). Otros autores, al estudiar VEGF-A y HIF-1 α sobre la recidiva, no hallaron asociación con significación estadística entre ninguna de estas moléculas y la recurrencia tumoral ($p=0.15$ y $p=0.19$ respectivamente); sin embargo, la mayoría de los casos que tuvieron recidiva presentaron sobreexpresión de VEGF-A y también de HIF-1 α (a diferencia de este estudio donde hubo disminución de HIF-1 α), aunque dichos autores incluyeron en su trabajo solamente a pacientes varones con estadio I-II (Kim 2005).

Al analizar el lugar de recidiva tumoral, se observó que la variable VEGF-A pudo reflejar un patrón de recidiva con un valor de $p=0.05$. Así, los pacientes que tuvieron una

recidiva sólo intratorácica mostraron una mayor mediana de VEGF-A (1.36) respecto a aquellos pacientes con recidiva fuera del tórax (mediana VEGF-A = 0.62) y a los que presentaron recidiva a la vez intratorácica y extratorácica (mediana = 0.54). No se observó con claridad ninguna tendencia del patrón de recidiva tumoral respecto a la variable HIF-1 α ($p=0.41$).

Cuando se agruparon a los pacientes con recidiva en dos grupos, según si la recidiva tumoral fue sólo intratorácica (mediana VEGF-A = 1.36) o extratorácica (tanto sólo extratorácica como aquellos que tuvieron recidiva intra- y extratorácica: mediana = 0.59) las diferencias tuvieron significación estadística ($p=0.02$). De este modo, el patrón de recidiva presentó un valor de VEGF-A diferente. Los pacientes con mayor VEGF-A tuvieron más recidiva limitada al tórax y aquellos con menor VEGF-A presentaron una recidiva principalmente extratorácica. La interpretación de este mecanismo no está muy aclarada, porque podría ser que los pacientes con mayor expresión de VEGF-A tendiesen a presentar mayor metástasis a distancia, pero, por el contrario, este grupo de pacientes tuvo una mayor recidiva limitada al tórax, quizás reflejando un mayor efecto locorregional de la neoangiogénesis promovida por VEGF-A (Ishii 2004). No encontré ningún trabajo que reflejase la relación entre los marcadores vasculares de pacientes con cáncer de pulmón y el lugar de la recidiva tumoral. Sin embargo, sí se estudió en pacientes con cáncer de mama y se observó un diferente destino de la metástasis atendiendo al grado de expresión de VEGF-A (Linderholm 2000).

Hubo una tendencia hacia una mayor recidiva tumoral en aquellos pacientes con T avanzado (T3-T4 vs T2-T1), con afectación ganglionar metastásica (N1-N2 vs N0), en los casos con microinvasión tumoral vasculonerviosa, en tumores poco diferenciados y en los carcinomas epidermoides. Sin embargo, en ninguna de estas situaciones tampoco se obtuvo significación estadística ($p>0.05$).

Al analizar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de VEGF-A, de HIF-1 α y de la combinación de VEGF-A elevado más HIF-1 α bajo, se observó que el dato más destacado fue la mayor especificidad (82.6%) observada cuando ocurrió la combinación de VEGF-A elevado más HIF-1 α bajo. Ninguna de estas variables aplicadas como tests diagnósticos tuvieron una adecuada sensibilidad (entre 20.6% y 55.9%) para determinar la probabilidad de enfermedad (recidiva tumoral) y

sí para detectar teóricamente a los pacientes sanos cuando el test fuese negativo, es decir, cuando no se dio la asociación de VEGF-A elevado más HIF-1 α bajo (ver tabla 35).

Los pacientes con mayor expresión de HIF-1 α tuvieron una tendencia hacia una supervivencia mayor que aquellos con una menor expresión, aunque no hubo significación estadística. Esto concuerda con lo que otros autores reflejaron en su trabajo (Volm 2000). También se ha observado una elevada expresión de HIF-1 α como factor pronóstico favorable en cáncer distinto al de pulmón (Lidgren 2005).

HIF-1 α regula los genes implicados en el metabolismo celular, en la angiogénesis, en la proliferación celular y también en la apoptosis. La apoptosis es un mecanismo homeostático que participa en el equilibrio biológico existente entre la proliferación y la muerte celular. Los resultados del presente estudio señalan un efecto protector de HIF-1 α con tendencia hacia una supervivencia mayor de los pacientes con elevada expresión de HIF-1 α . Una posible explicación biológica sería que, una producción incrementada de HIF-1 α , se correspondería con una mayor expresión de elementos destinados a evitar la proliferación celular. Esta situación viene también apoyada por el hecho de que los pacientes con HIF-1 α elevado sufrieron menor recidiva tumoral (diferencia próxima a la significación estadística, $p=0.055$). El trabajo de Volm et al. mostró una correlación con significación estadística entre HIF-1 α y la apoptosis y factores proapoptóticos pero no entre HIF-1 α y la proliferación celular (Volm 2000).

Al comparar los pacientes de este estudio con los del análisis de Volm et al., el número de pacientes fue similar (106 vs 96), ningún paciente recibió tratamiento neoadyuvante, la histología fue similar (escamoso 46.2% vs 50%; adenocarcinoma 35.8% vs 31.3%), pero el estadio no (inicial I-II: 70.8% vs 26%, avanzado: 29.2% vs 74%). Esto muestra que HIF-1 α puede indicar una tendencia hacia un mejor pronóstico, tanto cuando la mayoría de los pacientes se encuentran en un estadio inicial (71.8% de este estudio), como en un estadio avanzado (74%, Volm 2000).

Sin embargo, en la literatura científica, hay que remarcar que la mayoría de los estudios mostraron un peor pronóstico sobre los pacientes con HIF-1 α elevado (Hung 2009, Kim 2005, Semenza 2003, Giatromanolaki 2001, Zhong 1999). Hay que reseñar que dichos estudios presentaron una metodología realizada con análisis

inmunohistoquímico, en lugar de RT-PCR (como este estudio). Parece ser que una inducción muy elevada o reducida de HIF-1 α pueda favorecer la apoptosis inducida por la hipoxia y un término medio en la expresión de HIF-1 α pueda corresponder más hacia una proliferación celular (Swinson 2006). También depende del punto de corte elegido para determinar una expresión anormal o incrementada; con inmunohistoquímica suele ser cuando la inmunoreactividad se expresa en más de un 50% de las células observadas al microscopio. En este estudio se basó en la mediana por su distribución no normal.

Respecto a VEGF-A, los resultados se asemejan a los encontrados habitualmente en la mayor parte de la literatura, donde la expresión incrementada de VEGF-A refleja un peor pronóstico como así lo sostentan dos metaanálisis en el cáncer de pulmón (Zhan 2009, Delmotte 2002). Los pacientes con elevado VEGF-A presentaron una tendencia hacia una peor supervivencia y un menor periodo libre de enfermedad, aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística, quizá por el tiempo relativamente corto de seguimiento, o por el punto de corte elegido (mediana o percentil 50).

Al evaluar la supervivencia clasificando a los pacientes en tres grupos de riesgo según la expresión de HIF-1 α y VEGF-A, (riesgo bajo si expresaron la combinación de HIF-1 α elevado y VEGF-A bajo; riesgo medio si expresaron la combinación de HIF-1 α elevado y VEGF-A elevado, o bien, HIF-1 α bajo y VEGF-A bajo; riesgo alto si expresaron la combinación de HIF-1 α bajo y VEGF-A elevado) se observó cómo la supervivencia empeoró progresivamente cuando el grupo cambió desde un riesgo bajo hacia uno alto, aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística (ver figura 31).

Al comparar estos subgrupos dos a dos, hubo diferencias estadísticamente significativas entre aquellos considerados como subgrupo de riesgo bajo y los del subgrupo de riesgo alto ($p=0.047$).

Los descriptores del sistema TNM presentaron una supervivencia con peor pronóstico para los tumores mayores y más invasivos (T1-2 vs T3-4) encontrando diferencias con significación estadística ($p=0.01$); también hubo menor supervivencia con afectación ganglionar metastática, si bien, las diferencias estuvieron próximas a la significación estadística ($p=0.06$ ver figura 19). Lo mismo se observó para el estadio, peor supervivencia con un estadio más avanzado, mostrando las diferencias observadas

prácticamente significación estadística ($p=0.05$). Al analizar el periodo libre de enfermedad maligna, la tendencia fue similar a la de la supervivencia, si bien, no se alcanzó significación estadística.

Las variables moleculares HIF-1 α y VEGF-A registraron una tendencia pronóstica, aunque sin conseguir significación estadística. Es manifiesta la progresión hacia un peor pronóstico, conforme se van sumando las situaciones que suponen un empeoramiento de la supervivencia según expresen, en mayor o en menor medida, las moléculas estudiadas. Cada vez son más los estudios que analizan los factores biomoleculares en el cáncer de pulmón y es posible que, en un futuro, tengan más peso y representación en la labor clínica diaria para proporcionar todavía más agudeza en el pronóstico y en la aplicación de un tratamiento complementario a la cirugía. Una posible limitación de este estudio puede ser el periodo de seguimiento relativamente corto con una mediana de 16.8 meses y un rango entre 6 y 50.9 meses. Hay que cotejar esta tendencia con estudios multicéntricos e intentar incorporar un análisis biomolecular al estudio rutinario de todo paciente con cáncer de pulmón.

6.- CONCLUSIONES

Las conclusiones que se pueden desprender de este estudio son las siguientes:

- 1.- El análisis mediante RT-PCR para cuantificar la expresión relativa de HIF-1 α y de VEGF-A fue factible en muestras de tejido tumoral de cáncer de pulmón obtenidas directamente en quirófano tras realizar la extirpación quirúrgica y su conservación inmediata en RNAlater®.
- 2.- Se observó una tendencia hacia una mayor expresión de HIF-1 α cuando el descriptor Tp fue mayor y también cuando el estadio fue más avanzado.
- 3.- Los pacientes con metástasis ganglionares tuvieron una tendencia hacia una mayor expresión de HIF-1 α y de VEGF-A.
- 4.- En pacientes con recidiva tumoral hubo una tendencia hacia una menor expresión de HIF-1 α .
- 5.- Entre los pacientes con recidiva tumoral, hubo mayor expresión de VEGF-A cuando la recidiva ocurrió en el tórax.
- 6.- Se observó una tendencia hacia una menor supervivencia en los pacientes que presentaron menor expresión de HIF-1 α y también en aquellos pacientes con una mayor expresión de VEGF-A
- 7.- El subgrupo de pacientes que presentó una menor expresión de HIF-1 α y a la vez también una mayor expresión de VEGF-A mostró una peor supervivencia.

7.- BIBLIOGRAFÍA

Aabersold DM, Burr P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α : a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 2911-2916.

Adams VR, Harvey RD. Histological and genetic markers for non-small cell lung cancer: customizing treatment based on individual tumor biology. *Am J Health Syst Pharm*. 2010; 67(suppl 1): S3-S9.

Algire GH, Chalkey HW, Legallis FY, Park HD. Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. Vascular reactions in mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J Natl Cancer Inst* 1945; 6: 73-85.

Alonso Fernández MA, García Clemente M, Escudero Bueno C. Características del carcinoma broncopulmonar en una región del norte de España. *Arch Bronconeumol* 2005; 41: 478-483.

Álvarez Martínez CJ, Pozo Rodríguez F. Tomografía de emisión de positrones en nódulo pulmonar solitario y en cáncer de pulmón. En : López Encuentra A, Llobregat Poyán N, eds. *Cáncer de pulmón. Monografía Neumomadrid*. Madrid: Ediciones Doyma S.L. 2002; p. 47-57.

Bach PB, Kelley MJ, Tate RC, McCrory DC. Screening for lung cancer: a review of the current literature. *Chest* 2003; (suppl 1): S72-S82.

Banegas Banegas JR, Díez Gañán L, Rodríguez Artalejo F, González Enríquez J, Graciani Pérez Regadera A, Villar Álvarez F. Mortalidad atribuible al tabaquismo en España en 1998. *Med Clin* 2001; 117: 692-694.

Bango A, Luyando L, Pandiella JR, Molinos L, Ramos S, Escudero C, et al. Bronchoscopic needle aspiration and biopsy of paratracheal tumors and hilar and mediastinal lymph nodes. Security yield and cost-effectiveness. *J Bronchol* 2003; 10: 183-188.

Belda J, Fernández-Esparrach G, Pellisé M, Soler M, Soria MT, Llach J, et al. Eficacia de la ultrasonografía endoscópica (USE) y la punción aspirativa con aguja fina guiada por USE-PAAF en el diagnóstico de extensión del carcinoma de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) en pacientes con TC negativa. *Arch Bronconeumol* 2004; 40 (suppl 2): A108.

Bikfalvi A, Javerzat S, Perollet C, Savona C. Angiogenesis and cancer. *Bull Cancer* 1997; 84: 885-890.

Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenacker G, Oberhuber G. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res*. 2000; 60: 4693-4696.

Bos R, van der Groep P, Greijer AE, Shvarts A, Meijer S, Pinedo HM, et al. Levels of hypoxia-inducible factor-1 α independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer* 2003; 97: 1573-1581.

Brattström D, Bergqvist M, Hesselius P, Larsson A, Lamberg K, Wernlund J, et al. Elevated preoperative serum levels of angiogenic cytokines correlate to larger primary

tumours and poorer survival in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 2002; 37: 57-63.

Brattström D, Bergqvist M, Hesselius P, Larsson A, Wagenius G, Brodin O. Serum VEGF and bFGF adds prognostic information in patients with normal platelet counts when sampled before, during and after treatment for locally advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004; 43: 55-62.

Bray F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur J Cancer* 2002; 38: 99-166.

Brem S. Angiogenesis and cancer control: from concept to therapeutic trial. *Cancer Contr* 1999; 6: 436-458.

Bremnes RM, Camps C, Sirera R. Angiogenesis in non-small cell lung cancer: The prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood. *Lung Cancer* 2006; 51: 143-158.

Brennan P, Bray I. Recent trends and future directions for lung cancer mortality in Europe. *Br J Cancer* 2002; 87: 43-48.

Brunelli A, Charloux A, Bolliger CT, Rocco G, Sculier JP, Varela G, et al. ERS/ESTS clinical guidelines on fitness for radical therapy in lung cancer patients (surgery and chemo-radiotherapy). *Eur Respir J*. 2009; 34: 17-41.

Carlens E. Mediastinoscopy: a method for inspection and tissue biopsy in the superior mediastinum. *Chest* 1959; 36: 343-348.

Cayuela A, Rodríguez Domínguez S, López Campos JL, Vigil E, Otero R. Mortalidad por cáncer de pulmón en España. *Arch Bronconeumol* 2008; 44: 70-74.

Chang JM, Lee HJ, Goo JM, Lee HY, Lee JJ, Chung JK et al. False Positive and False Negative FDG-PET Scans in Various Thoracic Diseases. *Korean J Radiol*. 2006 ; 7: 57-69.

Charloux A, Quoix E, Wolkove N, Small D, Pauli G, Kreisman H. The increasing incidence of lung adenocarcinoma. Reality or artefact? A review of the epidemiology of lung adenocarcinoma. *Int J Epidemiol*. 1997; 26: 14-23.

Cheran SK, Nielsen ND, Patz EF, False-negative findings for primary lung tumors on FDG positron emission tomography: staging and prognostic implications. *Am J roentgenol* 2004; 182: 1129-1132.

Churchill ED. The surgical treatment of carcinoma of the lung. *J Thorac Surg* 1933; 2: 254-261.

Danton MH, Anikin VA, McManus KG, McGuigan JA, Campalani G. Simultaneous cardiac surgery with pulmonary resection: presentation of series and review of literature. *Eur J Cardiothorac Surg* 1998; 13: 667-672.

De Giacomo T, Rendina EA, Venuta F, Della Rocca G, Ricci C. Thoracoscopic staging of IIIB non-small cell lung cancer before neoadjuvant therapy. *Ann Thorac Surg*. 1997; 64: 1409-1411.

De Leyn P, Lardinois D, van Schil P, Rami Porta R, Passlick B, Zielinski M, et al. ESTS guidelines for preoperative lymph node staging for non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 2007;32: 1-8.

De Perrot M, Licker M, Reymond MA, Robert J, Spiliopoulos A. Influence of age on operative mortality and long-term survival after lung resection for bronchogenic carcinoma. *Eur Respir J* 1999; 14: 419-422.

Delmotte P, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Mascaux C, Meert AP, Steels E, Verdebout JM, Lafitte JJ, Sculier JP. VEGF et survie des patients atteints d'un cancer pulmonaire. Revue systématique avec méta-analyse. *Rev Mal Respir* 2002; 19: 577-584.

Detterbeck FC, Boffa DJ, Tanoue LT. The new lung cancer staging system. *Chest* 2009; 136: 260-271.

Donnem T, Al-Shibli K, Al-Saad S, Delghandi MP, Busund LT, Bremnes RM. VEGF-A and VEGFR-3 correlate with nodal status in operable non-small cell lung cancer: inverse correlation between expression in tumor and stromal cells. *Lung Cancer* 2009; 63: 277-283.

Duchesne GM. Fundamental bases of combined therapy in lung cancer: cell resistance to chemotherapy and radiotherapy. *Lung Cancer*, 1994; 10(Suppl. 1): S67-S72.

Dunagan DP, Chin R, McCain TW, et al. Staging by positron emission tomography predicts survival in patients with nonsmall cell lung cancer. *Chest* 2001; 119:333-339.

Egri G, Takáts A. Monoclonal antibodies in the treatment of lung cancer. *Eur J Surg Oncol* 2006; 32: 385-394.

Enatsu S, Iwasaki A, Shirakusa T, Hamasaki M, Nabeshima K, Iwasaki H, et al. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006; 29: 891-895.

Encuesta Nacional sobre Consumo de Tabaco (1981). *Boletín Epidemiológico Semanal*. 1981; 1502: 289-291.

Farrell MA, McAdams HP, Herndon JE, et al. Non-small cell lung cancer: FDG PET for nodal staging in patients with stage I disease. *Radiology* 2000; 215:886-890.

Fernández E, Borrás JM, Levi F, Schiaffino A, García M, Vecchia C. Mortalidad por cáncer en España. *Med Clin* 2000; 114: 449-451.

Fernández Fau L, Pun YW, Nieto Jiménez MB, Prieto Vicente J. Evaluación preoperatoria. En: Caminero Luna JA, Fernández Fau L, eds. *Manual de Neumología y Cirugía Torácica*. Madrid: Editores Médicos S.A.; 1998; 373-382.

Fernández Villar JA, Iglesias Río F, Barreiro Barreiro JM, Mosteiro Añón MM, Vilariño Pombo C, Torres Durán ML, et al. Utilidad clínica y coste-efectividad de la punción-

aspiración transbronquial en el diagnóstico de adenopatías mediastínicas. *Rev Clin Esp* 2001; 201: 169-173.

Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280: C1358-C1366.

Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161: 851-858.

Ferrigno D, Buccheri G, Biggi A. Serum tumour markers in lung cancer: history, biology and clinical application. *Eur Respir J*, 1994; 7: 186–197.

Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-1186.

Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267: 10931-10934.

Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995; 333: 1757-1763.

Fontanini G, Vignati S, Lucchi M, Mussi A, Calcinai A, Boldrini L, et al. Neoangiogenesis and p53 protein in lung cancer: their prognostic role and their relation with vascular endothelial growth factor (VEGF) expression. *Br J Cancer*. 1997; 75: 1295-1301.

Franceschi S, Naett C. Trends in smoking in Europe. *Eur J Cancer Prev* 1995; 4: 271-84.

García-Foncillas J. *Biología molecular en cáncer. Programa interactivo de formación.* Barcelona: Ed Prous Science; 2003.

García Yuste M, Matilla JM, González Aragonese F, Heras F. Detección de la afectación ganglionar y tratamiento quirúrgico de los procesos neoplásicos pulmonares. Estado actual de distintos procedimientos diagnósticos y terapéuticos. *Arch Bronconeumol* 2010; 46 (supl 1): 43-49.

GCCB-S (Grupo Cooperativo de Carcinoma Broncogénico de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica). Estadificación ganglionar intraoperatoria en la cirugía del carcinoma broncogénico. Documento de consenso. *Arch Bronconeumol* 2001; 37: 495-503.

Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Theodossiou D, Barbatis K, O'Byrne K, Harris AL, et al. Comparative evaluation of angiogenesis assessment with anti-factor-VIII and anti-CD31 immunostaining in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 1997; 3: 2485-2492.

Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Turley H, Talks K, Pezzella F, et al. Relation of hypoxia inducible factor 1 α and 2 α in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival. *Br J Cancer* 2001; 85: 881-890.

Ginsberg RJ, Martini N. Non-small cell lung cancer. En: Pearson FG, Cooper JD, Deslauriers J, Ginsberg RJ, Hiebert CA, Patterson GA, Urschel HC, eds. Thoracic Surgery. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone ; 2002: 837-859.

Gould MK, MacLean CC, Kuschner WG, Rydzak CE, Owens DK. Accuracy of positron emission tomography for diagnosis of pulmonary nodules and mass lesions: a meta-analysis. JAMA 2001; 285: 914-924.

Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thum M. Cancer statistics. Cancer J Clin 2001; 51: 15-36.

Gress FG, Savides TJ, Sandler A, et al. Endoscopic ultrasonography, fine-needle aspiration biopsy guided by endoscopic ultrasonography, and computed tomography in the preoperative staging of non-small-cell lung cancer: a comparison study. Ann Intern Med 1997; 127:604-612.

Haber DA, Fearon ER. The promise of cancer genetics. Lancet 1998; 351 (Suppl. 2): 1-8.

Han H, Silverman JF, Santucci TS, Macherey RS, d'Amato TA, Tung MY, et al. Vascular endothelial growth factor expression in stage I non-small cell lung cancer correlates with neoangiogenesis and a poor prognosis. Ann Surg Oncol. 2001; 8: 72-79.

Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell 1996; 86: 353-364.

Harewood GC, Wiersema MJ, Edell ES, Liebow M. Cost-minimization analysis of alternative diagnostic approaches in a modeled patient with non-small cell lung cancer and subcarinal lymphadenopathy. Mayo Clin Proc 2002; 77: 155-164.

Harris AL. Hypoxia-a key regulatory factor in tumor growth. Nat Rev Cancer 2002; 2:38-47.

Hawes RH, Gress F, Kesler A, Cummings OW, Conces DJ. Endoscopic ultrasound versus computed tomography in the evaluation of the mediastinum in patients with non-small-cell lung cancer. Endoscopy 1994; 26: 784-787.

Henschke CI, Miettinen OS. Women's susceptibility to tobacco carcinogens. Lung Cancer 2004; 43: 1-5.

Herbst RS, Sandler AB. Non-Small Cell Lung Cancer and Antiangiogenic Therapy: What Can Be Expected of Bevacizumab? The Oncologist 2004; 9 (Suppl 1): 19-26.

Hermanek P, Wittekind C. Residual tumor (R) classification and prognosis. Semin Surg Oncol 1994;10:12-20.

Hernández Hernández JR, Izarzugaza Lizarraga MI. Epidemiología del cáncer de pulmón en España. En : López Encuentra A, Llobregat Poyán N, eds. Cáncer de pulmón. Monografía Neumomadrid. Madrid: Ediciones Doyma S.L. 2002; p. 5-18.

Hernández Hernández JR, Tapias del Pozo JA, Moreno Canelo P, Rodríguez Puebla A, Paniagua Tejo S, Sánchez Marcos JC. Incidencia del cáncer de pulmón en la provincia de Ávila. Año 2002 y tendencias en una década. Arch Bronconeumol 2004; 40: 304-310.

Hockel M., Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. J Natl Cancer Inst. 2001; 93: 266-276.

Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. Nat Med 1995; 1: 149-153.

Hopper KD, Lucas TA, Gleeson K, Stauffer JL, Bascom R, Mauger DT, et al. Transbronchial biopsy with virtual CT bronchoscopy and nodal highlighting. Radiology 2001; 221: 531-536.

Hünerbein M, Ghadami BM, Haensch W, Schlag PM. Transesophageal biopsy of mediastinal and pulmonary tumors by means of endoscopic ultrasound guidance. J Thorac Cardiovasc Surg 1998; 116: 554-559.

Hung JJ, Yang MH, Hsu HS, Hsu WH, Liu JS, Wu KJ. Prognostic significance of hypoxia-inducible factor-1 α , TWIST1 and Snail expression in resectable non-small cell lung cancer. Thorax 2009; 64: 1082-1089.

Ide AG, Baker NH, Warren SL. Vascularization of the brown pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transplant ear chamber. Am J Roentgenol 1939; 42: 891-899.

Instituto Nacional de Estadística. Banco de datos de series TEMPUS. Estadísticas de causas de muerte. Madrid, 2003. Disponible en: www.ine.es

International Agency for Research on Cancer. Cancer databases. IARC Cancer Epidemiology Database. Information on cancer incidence, mortality and survival. Lyon, 2003. Disponible en: <http://www.iarc.fr>

Ishii H, Yazawa T, Sato H, Suzuki T, Ikeda M, Hayashai Y, et al. Enhancement of pleural dissemination and lymph node metastasis of intrathoracic lung cancer cells by vascular endothelial growth factors (VEGFs). Lung Cancer 2004; 45: 325-337.

Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF-1 α to the von Hippel Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. Science 2001; 292: 468-472.

Juhl B, Frost N. A comparison between measured and calculated changes in the lung functions after operation for pulmonary cancer Acta Anaesth Scand 1975; 57: 39-45.

Kajita T, Ohta Y, Kimura K, Tamura M, Tanaka Y, Tsunozuka Y, et al. The expression of vascular endothelial growth factor C and its receptors in non-small cell lung cancer. Br J Cancer 2001; 85: 255-260.

Kamiyoshihara M, Kawashima O, Ishikawa S, et al. Mediastinal lymph node evaluation by computed tomographic scan in lung cancer. J Cardiovasc Surg (Torino) 2001; 42:119-124.

Kawai H, Minamiya Y, Ito M, Saito H, Ogawa J. VEGF121 promotes lymphangiogenesis in the sentinel lymph nodes of non-small cell lung carcinoma patients. *Lung Cancer* 2008; 59: 41-47.

Kim SJ, Rabbani ZN, Dewhirst MW, Vujaskovic Z, Vollmer RT, Schreiber EG, et al. Expression of HIF1- α , CA IX, VEGF, and MMP-9 in surgically resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2005; 49: 325-335.

Kourkourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A, Bougioukas G, Maltezos E, Siviridis E. VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004; 46: 293-298.

Koukourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A, Panagopoulos I, Maltezos E, Harris AL, et al. C2028T polymorphism in exon 12 and dinucleotide repeat polymorphism in intron 13 of the HIF-1 α gene define HIF1- α protein expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2006; 53: 257-262.

Kuhn H, Konrad J, Holtz S, Salameh A, Gessner C, Hammerschmidt S, et al. Enhanced expression of VEGF following bFGF inhibition in non-small cell lung cancer cell lines. *Lung Cancer* 2006; 54: 149-153.

Kumar R, Yoneda J, Bucana CD, Fidler IJ. Regulation of distinct steps of angiogenesis by different angiogenic molecules. *Int J Oncol* 1998; 12: 749-757.

Laack E, Scheffler A, Burkholder I, Boeters I, Andritzky B, Schuch G, et al. Pretreatment vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) serum levels in patients with metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* 2005; 50: 51-58.

Lange P, Vestbo J. Lung cancer. *Eur Respir Mon* 2000; 15: 92-104.

Lardinois D, de Leyn P, van Schil P, Rami Porta R, Waller D, Passlick B, et al. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006; 30: 787-792.

Larsen SS, Krasnik M, Vilmann P, Jacobsen GK, Pedersen JH, Faurschou P, et al. Endoscopic ultrasound guided biopsy of mediastinal lesions has a major impact on patient management. *Thorax* 2002; 57: 98-103.

Levy AP, Levy NS, Goldberg MA. Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J Biol Chem* 1996; 271: 2746-2753.

Liao D, Corle C, Seagroves TN, Johnson RS. Hypoxia-inducible factor-1 α is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression. *Cancer Res* 2007; 67: 563-572.

Liao M, Wang H, Lin Z, Feng J, Zhu D. Vascular endothelial growth factor and other biological predictors related to the postoperative survival rate on non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001; 33: 125-132.

Lidgren A, Hedberg Y, Grankvist K, Rasmuson T, Vasko J, Ljungberg B. The expression of hypoxia-inducible factor 1 α is a favorable independent prognostic factor in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11:29-1135.

Liewald F, Grosse S, Storck M, et al. How useful is positron emission tomography for lymphnode staging in non-small-cell lung cancer? *Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 48:93–96.

Linderholm B, Grankvist K, Wilking N, Johansson M, Tavelin B, Henriksson R. Correlation of vascular endothelial growth factor content with recurrences, survival, and first relapse site in primary node-positive breast carcinoma after adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1423-1431.

Liotta LA, Strackle ML. Tumor invasion and metastases: biochemical mechanisms. *Cancer Treat Res* 1988; 40: 223-238.

Lukeis R, Irving L, Garson M, Hasthorpe S. Cytogenetics of non-small cell lung cancer: analysis of consistent non-random abnormalities. *Genes Chrom Cancer* 1990; 2: 116.

Luketich JD, Burt ME. Does Resection of Adrenal Metastases From Non–Small Cell Lung Cancer Improve Survival? *Ann Thorac Surg* 1996; 62: 1614-1616.

Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA. Relation of neovascularisation to metastasis of non-small cell lung cancer. *Lancet* 1992; 340: 145-146.

Marom EM, McAdams HP, Erasmus JJ, Goodman PC, Culhane DK, Coleman RE, et al. Staging non-small cell lung cancer with whole-body PET. *Radiology* 1999; 212:803–809.

Martínez Olondris P, Molina Molina M, Xaubet A, Marrades RM, Luburich P, Ramírez J, et al. Punción transbronquial aspirativa en el estudio de las adenopatías mediastínicas: rentabilidad y coste-beneficio. *Arch Bronconeumol*. 2008; 44: 290-294.

Mateu Navarro M, Rami Porta R, Bastus Piulats R, Cirera Noguera L, González Pont G. Remediastinoscopy after induction chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2000; 70: 391-395.

Matsuyama K, Chiba Y, Sasaki M, Tanaka H, Muraoka R, Tanigawa N. Tumor angiogenesis as a prognostic marker in operable non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*. 1998; 65: 1405-1409.

Mattern J, Koomägi R, Volm M. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma. *Br J Cancer* 1996; 73: 931-934.

Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al. The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999; 399: 271-275.

McNeill TM, Chamberlain JM. Diagnostic anterior mediastinotomy. *Ann Thorac Surg* 1966; 2: 532-539.

Miravet L, Peláez S, Paradís A, Arnal M, Cabadés F. Estudio epidemiológico del cáncer de pulmón en el norte de la provincia de Castellón. Arch Bronconeumol 2001; 37: 298-301.

Miravet L, Paradís A, Peláez S, Arnal M, Cabadés F. Evolución del carcinoma broncopulmonar en el norte de la provincia de Castellón, 1993-2002. Arch Bronconeumol 2004; 40: 553-557.

Mitsudomi T, Hamajima N, Ogawa M, Takajashi T. Prognostic significance of p53 alterations in patients with non-small cell lung cancer: a metaanalysis. Clin Cancer Res 2000; 6: 4055-4063.

Montero C, Rosales M, Otero I, Blanco M, Rodríguez G, Peterga S, et al. Cáncer de pulmón en el Área Sanitaria de A Coruña: incidencia, abordaje clínico y supervivencia. Arch Bronconeumol 2003; 39: 209-216.

Mountain CF. A new international staging system for lung cancer. Chest 1986; 89: 225S.

Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. Chest 1997; 111: 1710-1717.

Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Sukhatme VP. Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. Cancer Res 1995; 55: 6161-6165.

Murray CL, López AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: global burden of disease study. Lancet 1997; 349: 1498-1504.

Mussi A, Pistolesi M, Lucchi M, Janni A, Chella A, Parenti G, et al. Resection of single brain metastasis in non-small-cell lung cancer: prognostic factors. J Thorac Cardiovasc Surg 1996; 112: 146-153.

N.C.I.: National Cancer Institute - maintained Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER), www.seer.ims.nci.nih.gov

Nakashima T, Huang CL, Liu D, Kameyama K, Masuya D, Ueno M, et al. Expression of vascular endothelial growth factor-A and vascular endothelial growth factor-C as prognostic factors for non-small cell lung cancer. Med Sci Monit 2004; 10: BR157-165.

Niki T, Iba S, Tokunou M, Yamada T, Matsuno Y, Hirohashi S. Expression of vascular endothelial growth factors A, B, C, and D and their relationships to lymph node status in lung adenocarcinoma. Clin Cancer Res 2000; 6: 2431-2439.

Niklinska W, Burzykowski T, Chyczewski L, Niklinski J. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in non-small cell lung cancer (NSCLC): association with p53 gene mutation and prognosis. Lung Cancer 2001; 34: S59-S64.

O'Byrne KJ, Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Cox G, Turley H, Steward WP, et al. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived endothelial cell growth factor and angiogenesis in non-small cell lung cancer. Br J Cancer 2000; 82: 1427-1432.

- Offersen BV, Pfeiffer P, Hamilo-Dutoit S, Overgaard J. Patterns of angiogenesis in non-small cell lung carcinoma. *Cancer* 2001; 91: 1500-1509.
- Orts Llorca. Anatomía Humana. 6ª ed. Barcelona: Ed. Científico técnica; 1986.
- Osada H, Kojima K, Tsukada H, et al. Cost-effectiveness associated with the diagnosis and staging of non-small-cell lung cancer. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 49:1-10.
- Padilla J, Calvo V, Peñalver JC, Zarza AG, Pastor J, Blasco E, et al. Survival and risk model for stage I-B non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2002; 36: 43-48)
- Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 1993; 4: 1317-1326.
- Patel JD, Bach PB, Kris MG. Lung cancer un US women. A contemporary epidemic. *JAMA* 2004; 291: 1763-1768.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time PCR. *Nucl Acids Res*; 29(9): e-45, 2001.
- Pieterman RM, van Putten JW, Meuzelaar JJ, et al. Preoperative staging of non-small-cell lung cancer with positron emission tomography. *N Engl J Med* 2000; 343:254-261.
- Pisani P, Parkin DM, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 83: 18-29.
- Plouet J, Schilling J, Gospodarowicz D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J* 1989; 8: 3801-3806.
- Potepan P, Meroni E, Spagnoli I, et al. Non-small-cell lung cancer: detection of mediastinal lymph node metastases by endoscopic ultrasound and CT. *Eur Radiol* 1996; 6:19-24.
- Reif MS, Socinski MA, Rivera MP. Evidence-based medicine in the treatment of non-small cell lung cancer. *Clin Chest Med* 2000; 21: 107-120.
- Renyi-Vamos F, Tovari J, Fillinger J, Timar J, Paku S, Kenessey I, et al. Lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis, prognosis, and angiogenic phenotype in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 7344-7353.
- Riquet M. Mediastinal lymphatic spread of bronchopulmonary cancer. *Rev Mal Respir.* 1991;8(5):443-58.
- Roberts PF, Follette DM, von Haag D, et al. Factors associated with false-positive staging of lung cancer by positron emission tomography. *Ann Thorac Surg* 2000; 70: 1154-1159.
- Rosell R, Cecere F, Cognetti F, Cuello M, Sanchez JM, Taron M, et al. Future directions in the second-line treatment of non-small cell lung cancer. *Semin Oncol.* 2006; 33 (Suppl. 1): S45-5.

- Rusch VW, Tsuchiya R, Tsuboi M, Pass HI, Grunenwald D, Goldstraw P. Surgery for bronchioloalveolar carcinoma and "very early" adenocarcinoma: an evolving standard of care? *J Thorac Oncol* 2006; 1: S27-S31.
- Sánchez Céspedes M, López Cabrerizo MP, Moreno I, Ariza A, Monzó M, Rosell R. Importancia de la pérdida de heterocigosidad en el brazo largo del cromosoma 5 (5q21) en cáncer de pulmón no microcítico. *Med Clin* 1997; 109: 1-5.
- Sánchez-Céspedes M, Monzó M, Rosell R, Pifarré A, Calvo R, López-Cabrerizo MP, et al. Detection of chromosome 3p alterations in serum DNA of non-small cell lung cancer patients. *Ann Oncol* 1998; 9: 113-116.
- Sanchez-Céspedes M, Ahrendt SA, Piantadosi S, Rosell R, Monzo M, Wu L, et al. Chromosomal alterations in lung adenocarcinoma from smokers and nonsmokers. *Cancer Res* 2001; 61: 1309-1313.
- Sánchez de Cos Escuín J, Riesco Miranda JA, Antón Martínez J, Díaz Santamaría P, Márquez Pérez L, Medina Gallardo JF, et al. Incidencia del carcinoma broncopulmonar en Extremadura durante el año 1998. *Arch Bronconeumol* 2000; 36: 381-384.
- Sánchez de Cos Escuín J, Miravet Sorribes L, Abal Arca J, Núñez Ares A, Hernández Hernández J, Castañar Jover AM, et al. Estudio multicéntrico epidemiológico-clínico de cáncer de pulmón en España (estudio EpicliCP-2003). *Arch Bronconeumol* 2006; 42: 446-452.
- Sánchez de Cos Escuín J. El cáncer de pulmón en España. Epidemiología, supervivencia y tratamiento actuales. *Arch Bronconeumol* 2009; 45: 341-348.
- Santos-Martínez MJ, Curull V, Blanco ML, Macià F, Mojal S, Vila J, et al. Características del cáncer de pulmón en un hospital universitario. Cambios epidemiológicos e histológicos en relación con una serie histórica. *Arch Bronconeumol* 2005; 41: 307-312.
- Saunders CA, Dussek JE, O'Doherty MJ, et al. Evaluation of fluorine-18-fluorodeoxyglucose whole body positron emission tomography imaging in the staging of lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1999; 67:790-797.
- Schneider BL, Kulesz-Martin M. Destructive cycles: the role of genomic instability and adaptation in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2004; 25: 2033-2044.
- Schubert MJ, Abbas G, Pennathur A, Nason KS, Wilson DO, Luketich JD, et al. Sublobar resection for early-stage lung cancer. *Semin Thoracic Surg* 2010; 22: 22-31.
- Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol*. 2000; 88: 1474-1480.
- Semenza GL. Targeting HIF1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2003; 3: 721-732.
- Shibuya M. Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis. *BMB reports* 2008; 41: 278-286.

Silvestri GA, Hoffman BJ, Bhutani MS, et al. Endoscopic ultrasound with fine-needle aspiration in the diagnosis and staging of lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1996; 61:1441–1445.

Sivridis E, Giatromanolaki A, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis MI; Tumor and Angiogenesis Research Group. Association of hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α with activated angiogenic pathways and prognosis in patients with endometrial carcinoma. *Cancer* 2002; 95: 1055-1063.

Solban N, Pal SK, Alok SK, Sung CK, Hasan T. Mechanistic investigation and implications of photodynamic therapy induction of vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 5633-5640.

Suzuki K, Nagai K, Yoshida J, et al. Clinical predictors of N2 disease in the setting of a negative computed tomographic scan in patients with lung cancer. *Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 117:593–598.

Swinson DEB, O'Byrne KJ. Interactions between hypoxia and epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer. *Clinical Lung Cancer* 2006; 4: 250-256.

Takamochi K, Nagai K, Yoshida J, et al. The role of computed tomographic scanning in diagnosing mediastinal node involvement in non-small cell lung cancer. *Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 119:1135–1140.

Travis WD, Travis LB, Devesa SS. Lung cancer. *Cancer* 1995; 75: 191-202.

Travis WD, Brambilla E, Konrad Müller-Hermelink H, Harris CC, editors. World Health Organization Classifications of Tumours. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Lyon: IARC Press; 2004.

Tsuchiya R, Asamura H, Kondo H, Goya T, Naruke T. Extended resection of the left atrium, great vessels, or both for lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1994; 57: 960-965.

Uy KL, Darling G, Xu W, Yi QL, De Perrot M, Pierre AF, et al. Improved results of induction chemoradiation before surgical intervention for selected patients with stage IIIA-N2 non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 134: 188-193.

Varela Simó G, Barberá Mir JA, Cordovilla Pérez R, Duque Medina JL, López Encuentra A, Puente Maestu L. Normativa sobre valoración del riesgo quirúrgico en el carcinoma broncogénico. *Arch Bronconeumol* 2005; 41: 686-697.

Vaupel P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *The Oncologist* 2004; 9 (suppl 5): 10-17.

Vioque J, Bolumar F. Trends in mortality from lung cancer in Spain, 1951-1980. *J Epidemiol Community Health* 1987; 41: 74-78.

Vleugel MM, Greijer AE, Shvarts A, van der Groep P, van Berkel M, Aarbodem Y, et al. Differential prognostic impact of hypoxia induced and diffuse HIF1- α expression in invasive breast cancer. *J Clin Pathol* 2005; 58: 172-177.

Volm M, Koomägi R. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer. *Anticancer Res* 2000; 20: 1527-1534.

Wallace MB, Ravenel J, Block MI, Fraig M, Silvestri G, Wildi S, et al. Endoscopic ultrasound in lung cancer patients with a normal mediastinum on computed tomography. *Ann Thorac Surg* 2004; 77: 1763-1768.

Waters PF, Martini N, Ginsberg RJ, Fell SC, Kirby TJ, Tshuchiya R, et al. Surgical techniques, chapter 36. En: Pearson FG, Cooper JD, Deslauriers J, Ginsberg RJ, Hiebert CA, Patterson GA, Urschel HC, eds. *Thoracic Surgery*. Philadelphia: Churchill Livingstone ; 2002: 974-1084.

Wiersema MJ, Vazquez-Sequeiros E, Wiersema LM. Evaluation of mediastinal lymphadenopathy with endoscopic Usguided fine-needle aspiration biopsy. *Radiology* 2001; 219: 252–257.

Yano T, Tanikawa S, Fujie T, Masutani M, Horie T. Vascular endothelial growth factor expression and neovascularisation in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 2000; 36: 601-609.

Yoshioka M, Ichiguchi O. Selection of sublobar resection for c-stage IA non-small cell lung cancer based on a combination of structural imaging by CT and functional imaging by FDG PET. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2009; 15: 82-88.

Zhan P, Wang J, Xiao-jing, Wang Q, Qiu L, Lin X, Yu L, Song Y. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in patients with lung cancer. A systematic review with meta-analysis. *J Thorac Oncol* 2009; 4: 1094-1103.

Zhang Q, Tang X, Zhang ZF, Velikina R, Shi S, Le AD. Nicotine induces hypoxia-inducible factor-1 α expression in human lung cancer cells via nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling pathways. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 4686-4694.

Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999; 59: 5830-5835.