

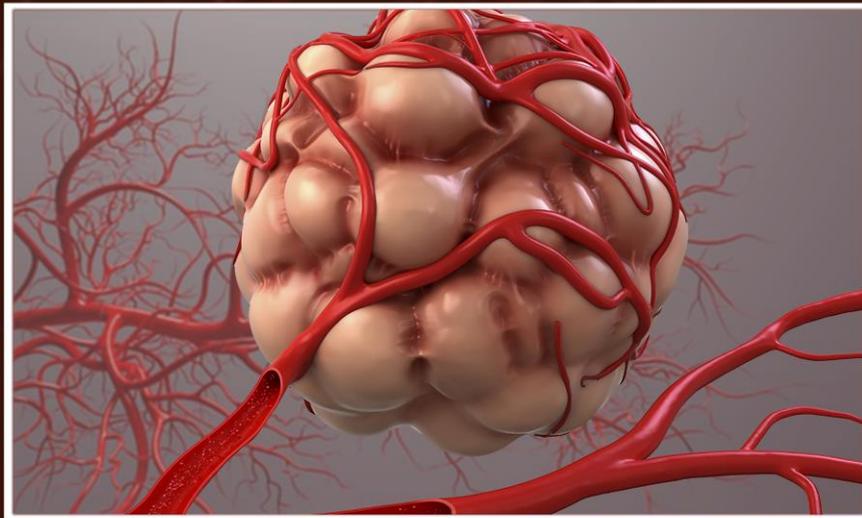


VNIVERSITAT (ò ˆ ˆ)
D VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia

Departament de patologia

“EVALUACIÓN DE MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS DE
ANGIOGÉNESIS TUMORAL COMO FACTOR PRONÓSTICO EN EL
ADENOCARCINOMA PULMONAR EN ESTADIO IA”



TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR:

Karol De Aguiar Quevedo

DIRIGIDA POR:

Dr. Juan Carlos Peñalver Cuesta

Prof. Dr. Francisco J. Vera Sempere

Prof. Dra. Amparo Ruiz Saurí

Valencia, junio 2019

VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

FACULTAT DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA

Programa de doctorado 3139 Medicina – R.D. 99/2011



**“EVALUACIÓN DE MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS DE
ANGIOGÉNESIS TUMORAL COMO FACTOR PRONÓSTICO EN EL
ADENOCARCINOMA PULMONAR EN ESTADIO IA”**

PRESENTADA POR:

Karol De Aguiar Quevedo

Licenciada en Medicina y Cirugía

Médico especialista en Cirugía Torácica

DIRIGIDA POR:

Dr. Juan Carlos Peñalver Cuesta

Prof. Dr. Francisco J. Vera Sempere

Prof.^a Dr.^a Amparo Ruiz Saurí

Valencia, junio 2019

TESIS DOCTORAL

“EVALUACIÓN DE MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS DE ANGIOGÉNESIS TUMORAL COMO FACTOR PRONÓSTICO EN EL ADENOCARCINOMA PULMONAR EN ESTADIO IA”

PRESENTADA POR:

Karol De Aguiar Quevedo, Licenciada en Medicina y Cirugía y Facultativo Especialista de Cirugía Torácica, Fundación Instituto Valenciano de Oncología (FIVO) de Valencia.

DIRIGIDA POR:

Dr. Juan Carlos Peñalver Cuesta, Doctor en Medicina y Jefe de Servicio de Cirugía Torácica de la Fundación Instituto Valenciano de Oncología.

Prof. Dr. Francisco J. Vera Sempere, Catedrático de Anatomía Patológica de la Universidad de Valencia y Jefe de Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe.

Prof.^a Dr.^a Amparo Ruiz Saurí, Profesora Titular de Anatomía Patológica de la Universidad de Valencia.

INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS

Director (es) / Codirector (es):

1.- Apellidos y nombre: Peñalver Cuesta Juan Carlos N.I.F. 25375475 N, Departamento/Instituto: Cirugía Torácica Centro: Fundación Instituto Valenciano de Oncología

2.- Apellidos y nombre: Vera Sempere Francisco José N.I.F. 22094976 A, Departamento/Instituto: Patología. Centro: Facultad de Medicina Universidad de Valencia, Hospital Universitari y Politecnia la Fe

3.- Apellidos y nombre: Ruiz Saurí Amparo N.I.F.73539315 N, Departamento/Instituto: Patología. Centro: Facultad de Medicina Universidad de Valencia.

Tutor o tutora (si procede)

Apellidos y nombre. .N.I.F. , Departamento/Instituto: Centro:

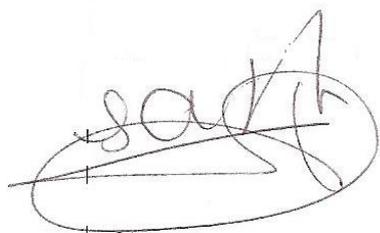
Directores/as y tutor/a, respectivamente, de la tesis doctoral: "Evaluación de marcadores inmunohistoquímicos de angiogénesis tumoral en el adenocarcinoma pulmonar en estadio IA"

de D/Dña. Karol De Aguiar Quevedo,

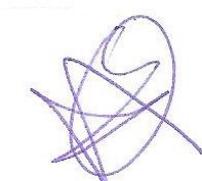
estudiante del Programa de Doctorado **3139 Medicina** (RD99/2011) en Medicina de la Universitat de València, emiten informe *favorable* para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: 28 de mayo de 2019

Fdo.: Juan Carlos Peñalver Cuesta Fdo.: Francisco J. Vera Sempere Fdo.: Amparo Ruiz Saurí



Director/a



Director/a



Director/a

**ESCUELA DOCTORAL
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

A mi familia

*Nada en este mundo
debe ser temido... solo entendido
Ahora es el momento
de comprender más,
para que podamos
temer menos*

Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis realizado con la colaboración de tres grandes instituciones, la Universidad de Valencia, la Fundación Instituto valenciano de oncología y el Hospital Universitario y Politecnico la Fe, ha sido un gran esfuerzo en el cual han participado distintas personas que deseo agradecer en este apartado.

En primer lugar, a mi director, el Dr. Juan Carlos Peñalver por iniciarme en el mundo de la investigación, por todo su tiempo, dedicación, profesionalidad y por confiar en mi.

En segundo lugar, a mis codirectores la Dra. Amparo Ruiz Saurí, por su valiosa ayuda y sus enseñanzas en el área de la angiogénesis, por su apoyo en seguir este camino y llegar al final del trabajo. Al Dr. Francisco José Vera, por su experiencia, sus consejos y sus exigencias.

No puedo dejar de agradecer a mis colaboradores y amigos de ambas instituciones, Julia Cruz, José Cerón, Carlos Jordá, Nuria Mancheño, Encarnación Martínez y Miguel Arrarás ya que, sin su cooperación, esta tesis no existiría. Así como, al Dr José Padilla, por su experiencia, por su espíritu crítico, por motivarme en aprender y ha superarme.

Mi mas sincero agradecimiento al equipo técnico de ambos hospitales, en especial Gema, Maria y Soraya, por su ayuda incondicional en las técnicas anatomopatológicas.

Por último y no menos importante, quiero agradecer a mis padres, por darme una infancia feliz y por inculcarme un interés por aprender, así como por la vida misma. A mis hermanos por su apoyo y paciencia. A Cristóbal, mi marido por acompañarme en este duro camino de la elaboración de una tesis doctoral, por la paciencia de soportarme y comprenderme en los momentos más estresates del proceso. Y por su puesto, a Cristóbal José por ser el verdadero motor que me impulsó para terminar esta tesis.

ACTIVIDAD CIENTÍFICA

- Primer premio de las becas a proyectos de investigación SECT 2016, en la categoría de grupos y/o investigadores emergentes. Sociedad Española de Cirugía Torácica (Anexo 1).
- Karol De Aguiar, Miguel Arrarás Martínez, Encarnación Martínez, Julia Cruz, José Cerón, Carlos Jordá, Nuria Mancheño, Amparo Ruíz, Francisco Vera y Juan Carlos Peñalver. Póster: Densidad Microvascular en Adenocarcinoma de pulmón estadio A. XXIV Congreso de la Sociedad Valenciana de Neumología. Valencia 31 de marzo al 1 de abril 2017 (Anexo 2).

ABREVIATURAS

ADC	Adenocarcinoma
AIS	Adenocarcinoma in situ
ALK	Quinasa similar al receptor de activina
Ang	Angiopoyetina
ATS	American thoracic society
BAC	Carcinoma bronquioloalveolar
CE	Célula endotelial
CK	Citoqueratina
CM	Célula madre
CP	Cáncer de pulmón
CPC	Célula precursora circulante
CPCNP	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
CPCP	Cáncer de pulmón de células pequeñas
CPM	Cáncer de pulmón microcitico
CPNM	Cáncer de pulmón no microcitico
CPNM	Cáncer de pulmón no microcitico
DMV	Densidad microvascular
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERS	European respiratory society
GD	Grado de diferenciación
GN	Grado nuclear
GST	Genes supresores de tumorsa
H.U. La Fe	Hospital universitario y politécnico la Fe
HAA	Hiperplasia adenomatosa atípica
HE	Hematoxinila - eosina
HIF	Hypoxia inducible factor
HSPG	Proteoglicanos de sulfato de heparano

IASLC	International association for the study of lung cancer
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Invasión linfática
IV	Invasión vasos sanguíneos
IVM	Invasión vascular microscópica
IVO	Instituto valenciano de oncología
MB	Membrana basal
ME	Matriz extracelular
MIA	Adenocarcinoma mínimamente invasivo
MMP	Metaloproteínasa de matriz
NP	Neuropilín
OMS	Organización mundial de la salud
PDGF	Factor de crecimiento plaquetario
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PIGF	Factor de crecimiento de placenta
RTQ	Receptor tirosin quinasa
SCE	Supervivencia cáncer específica
SG	Supervivencia global
TGF	Factor de crecimiento transformante
TLE	Tiempo libre de enfermedad
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNM	Tumor-nodulo-metástasis
TQ	Tirosin quinasa
TTF-1	Factor transcriptor tiroideo
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. MOTIVACIÓN DEL ESTUDIO	3
1.2. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER	6
1.2.1. <i>Activación sostenida de las señales de proliferación</i>	7
1.2.2. <i>Evasión de las señales supresoras de crecimiento</i>	8
1.2.3. <i>Resistencia a la muerte celular programada y alteraciones de la autofagia</i>	8
1.2.4. <i>Potencial replicativo ilimitado</i>	9
1.2.5. <i>Angiogénesis sostenida</i>	9
1.2.6. <i>Invasión y metástasis</i>	9
1.2.7. <i>Inestabilidad del genoma y mutación</i>	10
1.2.8. <i>Inflamación promotora de tumor</i>	10
1.2.9. <i>Reprogramación del metabolismo energético</i>	10
1.2.10. <i>Evasión de la destrucción inmune</i>	11
1.3. ANGIOGÉNESIS TUMORAL	11
1.3.1. <i>Mecanismo de Angiogénesis</i>	12
1.3.2. <i>Evaluación de la angiogénesis por medio de la densidad microvascular</i>	20
1.4. ADENOCARCINOMA DE PULMÓN	23
1.4.1. <i>Subtipos histológicos</i>	25
1.4.2. <i>Estadificación del adenocarcinoma pulmonar</i>	31
1.4.3. <i>Otros factores morfológicos con valor pronóstico</i>	33
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	41
3. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS	45
4. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS	51
4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO	51
4.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO	51
4.3. ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO	53
4.3.1. <i>IHQ convencional</i>	53
4.4. VARIABLES ESTUDIADAS	56
4.4.1. <i>Variables demográficas</i>	56
4.4.2. <i>Variables quirúrgicas</i>	56
4.4.3. <i>Variables anatomopatológicas</i>	56
4.4.4. <i>Variables de angiogénesis tumoral</i>	59
4.4.5. <i>Variables de seguimiento</i>	60
4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	61

5. RESULTADOS	67
5.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, MORFOPATOLÓGICAS Y DE SEGUIMIENTO	67
5.1.1. <i>Características clínicas</i>	67
5.1.2. <i>Características morfológicas</i>	68
5.1.3. <i>Evolución clínica y seguimiento</i>	71
5.2. EXPRESIÓN VEGF	74
5.3. MARCADORES ENDOTELIALES	78
5.3.1. <i>CD34</i>	78
5.3.2. <i>CD31 (PECAM-1)</i>	86
5.3.3. <i>CD105 (Endoglin)</i>	91
5.3.4. <i>Valor predictivo de los marcadores de angiogénesis</i>	95
5.4. ANÁLISIS UNIVARIANTE Y MULTIVARIANTE	106
6. DISCUSIÓN	113
6.1. VEGF EN EL ADC DE PULMÓN	119
6.2. MARCADORES ENDOTELIALES EN EL ADC DE PULMÓN	123
7. CONCLUSIONES	135
8. BIBLIOGRAFÍA	141
9. ANEXOS	169

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1. Motivación del estudio

Hace más de un siglo, Theodor Boveri propuso que el cáncer estaba causado por alteraciones cromosómicas que llevaban a las células a dividirse de forma incontrolada^{1,2}. Si actualizamos esta definición, cabe considerar el cáncer como una enfermedad genética en la que la población de células tumorales van adquiriendo cambios o mutaciones en su secuencia de ADN, responsables de una serie de nuevas características y habilidades, como son una mayor capacidad de proliferación y supervivencia, que suponen una ventaja frente a las células vecinas, y que permiten a los tumores evadir los mecanismos homeostáticos tisulares^{2,3}. Por tanto, el cáncer es el resultado de la proliferación incontrolada de un tipo celular, que ocurre junto con la invasión de tejidos circundantes y la diseminación de células malignas (metástasis), lo cual lleva a comprometer la vida del paciente⁴.

En todo este contexto, el cáncer constituye una de las principales causas de morbimortalidad del mundo, con aproximadamente 18 millones de casos nuevos y 9,6 millones de muertes para el año 2018⁵. Según los datos mundiales disponibles más recientemente, el cáncer de pulmón (CP) es la neoplasia más frecuentemente diagnosticada y la que más muertes causa en el mundo. Se estima que 2.093.876 personas fueron diagnosticadas de CP y 1.761.007 murieron por este tumor^{5,6}. En EE.UU

representa más de un cuarto de las muertes por cáncer (26%)⁷, mientras que en la Unión Europea se predice que cerca de un 20% de las muertes son ocasionadas por este tumor⁸.

En España, según datos publicados en la Red Española de Registros de Cáncer, el número total de nuevos casos en 2015 fue de 247.771 (148.827 en varones y 98.944 en mujeres). Según los últimos informes la causa de muerte más frecuente entre varones, por delante de las enfermedades cardiovasculares y respiratorias, son las neoplasias malignas (65.014 fallecimientos). En mujeres, sin embargo, suponen la segunda causa de muerte (41.020 fallecimientos). Estos datos indican que una de cada tres muertes en varones y una de cada cinco en mujeres se debieron a tumores malignos^{9,10}. Los tipos de cáncer más frecuentemente diagnosticados fueron el cáncer de colon-recto, de próstata, de pulmón (28.645 casos), de mama y de vejiga. En varones, el CP fue, en ese año, el segundo tipo de tumor diagnosticado con 23.398 casos y el cuarto en las mujeres con 5.247 casos¹⁰⁻¹².

Según los datos del Instituto Nacional de Estadística, el CP fue la primera causa de muerte por cáncer en España en el año 2016, con 22.187 fallecidos¹². Esta misma fuente lo refiere como el tumor que causó el mayor número de muertes, por delante del cáncer de colon y de próstata en hombres, representando el 24% del total de muertes producidas por tumores malignos, y la tercera causa de muertes en mujeres, por detrás del cáncer de mama y colon, representando el 15%. En las mujeres españolas, es la localización tumoral que presentó mayor velocidad de ascenso entre los años 2003 y 2012, con un 5,1% de incremento, siendo aún mayor entre las mujeres de mediana edad (35 a 64 años)^{9,10,12}.

El hábito tabáquico es el factor de riesgo más importante del CP¹³, encontrándose aproximadamente en el 90% de los varones que mueren por CP y en el 80% de las mujeres¹⁴. El tabaquismo activo aumenta la probabilidad de padecer un CP entre 15-30 veces más que en aquellos no fumadores y el riesgo se incrementa con la edad de iniciación del hábito, la intensidad y la duración¹⁵. Así mismo, el efecto del uso de pipas y puros sobre el riesgo de CP es similar al cigarrillo¹⁶.

Se ha estimado que un 15% de hombres y un 53% de mujeres que desarrollaron un CP alrededor del mundo no eran fumadores¹⁷. Así, Jenks y cols.¹⁸, comunican un 15% de muertes por CP en la población americana no fumadora; Cufari y cols.¹⁹, en el Reino Unido, advierten un aumento del 13% al 28% de los pacientes no fumadores con CP sometidos a cirugía en los últimos 7 años. De este modo, sin duda hay otros factores de riesgos relacionados con el CP, alguno de los cuales son el tabaquismo pasivo, la exposición ocupacional y medioambiental, la susceptibilidad genética heredada, la exposición a gas radón y las radiaciones ionizantes^{17,20}.

Pese a que se ha experimentado un aumento global de la incidencia del cáncer en general, la mortalidad por tumores se estima que se ha reducido en un 1,32%. Esta tendencia refleja las mejoras en la supervivencia de los pacientes con tumores, debido a las actividades preventivas, las campañas de diagnóstico precoz y los avances terapéuticos. Así, la supervivencia de los pacientes con cáncer en España es similar a la del resto de países, situándose en un 53% a los 5 años^{9,10}. Sin embargo, el CP sigue siendo una enfermedad de muy mal pronóstico con una supervivencia menor al 15% en la Unión Europea, variando desde 16,7% en Austria a un 6% en Bulgaria. En España, la supervivencia CP, para pacientes diagnosticados entre el año 2000 y 2007, fue de un 11,7%^{9,21}.

Casi la totalidad de la supervivencia de esta patología lo es a expensas de la cirugía. Los tumores con un diámetro máximo de 3 cm, localizados exclusivamente en el pulmón y sin afectación ganglionar o metastásica a distancia, presentan una supervivencia en torno al 80% a los 5 años²²⁻²⁶. En la última clasificación TNM propuesta, 8ª edición, en los tumores T1a-b-cN0M0 (Estadio IA1, IA2 y IA3) se estiman una supervivencia a 5 años del 90, 85 y 80%, respectivamente²⁷. Pero no hemos de olvidar que un porcentaje de estos pacientes presentan recurrencias y fallecen por metástasis, de aquí el interés en buscar factores pronósticos no contemplados en el actual sistema TNM^{22,28-31}. En el pasado, el CP se clasificó en CP microcítico (CPM) o de células pequeñas (CPCP) y en CP no microcítico (CPNM) o de células no pequeñas (CPCNP), pero esta distinción en dos grandes subgrupos no resulta en el momento actual suficiente,

por lo que ha sufrido multitud de revisiones y nuevas clasificaciones desde la primera, emitida en 1967, hasta la actualidad^{32,33}.

En las últimas décadas, junto al aumento de la incidencia del CP en la mujer, se ha experimentado un cambio en el patrón histológico del CPCNP, siendo el adenocarcinoma (ADC) la estirpe o forma histológica más frecuente^{15,34,35}.

El ADC es también el más variable y la forma más heterogénea de CP en muchos aspectos^{35,36}. Este hecho, parece ser una de las razones determinantes de que existan diferentes comportamientos clínicos entre pacientes con el mismo estadio tumoral, lo que ha determinado que sea un importante foco de investigación de factores pronósticos, diferentes al clásico TNM, para intentar mejorar las terapias dirigidas y la supervivencia del paciente con CP³⁷. Siguiendo esta premisa, han aparecido nuevas líneas de investigación basadas en el análisis del entorno que rodea a las células tumorales. En este sentido, el estudio de la angiogénesis tumoral representa un campo de estudio que puede tener una importante traslación y aplicación a la clínica^{38,39}. Investigaciones previas han demostrado que el grado de vascularización intratumoral es un factor con valor pronóstico significativo e independiente para la recurrencia de la enfermedad y la supervivencia⁴⁰⁻⁴³.

Por tanto, el presente estudio fue diseñado para investigar y correlacionar factores morfológicos del ADC de pulmón con la expresión de marcadores de angiogénesis tumoral como factor pronóstico, en pacientes resecaados y clasificados como T1a-b-cN0M0 según la 8ª edición de la clasificación TNM⁴⁴.

1.2. Biología molecular del cáncer

Los avances biotecnológicos han proporcionado información acerca de la biología molecular del CP, demostrando que es un proceso de múltiples pasos, con

numerosas alteraciones genéticas y epigenéticas acumuladas (que se cifran en el CP, en más de 20)⁴⁵.

Por otro lado, la visión del cáncer pasa de percibirse como una simple masa formada por células cancerígenas homogéneas, a mostrarse como un órgano con un nivel de complejidad incluso mayor que el tejido normal, donde, en el caso de los carcinomas, las células neoplásicas epiteliales constituyen el “parénquima” del tumor que se distingue claramente de las células mesenquimales asociadas al tumor que constituyen el “estroma” tumoral^{39,46}.

Hanahan y Weinberg⁴⁷, en el año 2000 publican seis “hallmarks del cáncer”, definidos como las capacidades funcionales adquiridas que permiten a la célula tumoral sobrevivir, proliferar y diseminarse. Estas alteraciones han sido solidificadas y extendidas en la última década, revelando que la biología tumoral no debe ser entendida como simples rasgos en las células del cáncer, sino que además debe abarcar la contribución de un microambiente tumoral para la tumorigénesis. Posteriormente, en 2011 se ampliaron estos “hallmarks” a 10 características que a continuación se describen brevemente^{39,47}(Fig. 1).



Figura 1: Características funcionales de las células tumorales, adaptado de Hanahan y Weinberg³⁹.

1.2.1. Activación sostenida de las señales de proliferación

El tejido normal tiene un control cuidadoso de la producción y liberación de señales mitogénicas que introducen a las células en el ciclo celular, manteniendo, de

este modo, la homeostasis celular en los tejidos. Sin duda, un rasgo fundamental de las células del cáncer es la proliferación celular crónica y mantenida, la cual se lleva a cabo por varias vías alternativas, tales como, mutaciones somáticas que activan adicionalmente las vías proliferativas en distintos puntos, la disrupción de los mecanismos de feedback negativo que atenúan las señales de proliferación y la excesiva señal proliferativa por aumento de la producción de ciertas proteínas. Un número de factores de crecimiento y sus receptores son expresados en el CP y sus células estromales adyacentes, lo que produce un bucle continuo de proliferación y diferenciación epitelial³⁹. Tal es el caso de los receptores tirosin quinasa (RTQ), incluido el factor epidérmico de crecimiento (EGFR, por sus siglas en inglés, epidermal growth factor receptor), con sus ligandos, que aparecen en un 27% de los ADC de pulmón³⁸. Así como la mutación en la familia de protooncogenes RAS, en especial KRAS, conduciendo a señales inapropiadas para la proliferación celular, encontrándose en el 15-20% de todos los CP, en especial en el ADC (20-30%)^{45,48}.

1.2.2. Evasión de las señales supresoras de crecimiento

Múltiples señales antiproliferativas funcionan en las células normales para mantener la quiescencia celular. Las células tumorales deben ser capaces de evitar los poderosos programas que regulan negativamente la proliferación que, en condiciones fisiológicas, están regulados por los genes supresores de tumor (GST). Por otro lado, la inhibición de la proliferación celular que se produce por contacto célula-célula en los tejidos normales, está suprimido en algunos tipos de cáncer³⁹. En el CP se encuentran frecuentemente alteraciones cromosómicas en los GST que determinan esta evasión de la señal supresora de crecimiento, entre las que se encuentra el p53, altamente relacionado con el hábito tabáquico, la proteína del retinoblastoma y p16^{45,48}.

1.2.3. Resistencia a la muerte celular programada y alteraciones de la autofagia

Desde el punto de vista fisiopatológico, se ha entendido la muerte celular programada (o apoptosis) y la autofagia como herramientas para mantener la homeostasis tisular y, por tanto, como una barrera frente al desarrollo tumoral. Las

células cancerosas desarrollan una serie de estrategias para evadir el efecto antitumoral de ambos mecanismos, pudiendo actuar de manera independiente o combinada³⁹. Los elementos clave en este programa son el p53, ya comentado, que se encuentra frecuentemente alterado en el CP, y el protooncogén BCL-2, encontrado más frecuentemente en CPM⁴⁸.

1.2.4. Potencial replicativo ilimitado

El comportamiento de las células normales pasa por un número limitado de sucesivos ciclos de crecimiento y división celular. Esta limitación ha sido asociada a dos tipos distintos de barreras hacia la proliferación, la primera es la senescencia celular y la segunda es la fase de crisis/apoptosis, la cual conduce a la muerte celular. Por el contrario, las células del cáncer requieren un potencial replicativo ilimitado para llegar a generar tumor macroscópico. La inmortalización eventual de algunas células que proceden a formar tumores se ha atribuido a su capacidad para mantener el un ADN telomérico lo suficientemente capaz de evitar el desencadenamiento de la senescencia o la apoptosis, lo que se logra con mayor frecuencia al elevar la expresión de la telomerasa, expresada en casi todos los CP³⁹.

1.2.5. Angiogénesis sostenida

Los tumores, al igual que los tejidos normales, necesitan para su mantenimiento un aporte continuo de nutrientes y O₂, además de eliminar los desechos metabólicos y el CO₂, y para conseguirlo el crecimiento tumoral inducen la angiogénesis. Durante la progresión tumoral, se produce un cambio en la normalmente quiescente vascularización innata que comienza a formar nuevos vasos para sostener el metabolismo tumoral³⁹.

1.2.6. Invasión y metástasis

La capacidad de invasión permite a las células neoplásicas escapar de la masa tumoral primaria y colonizar otras partes del cuerpo. Cuando alguna de estas células llega a un nuevo nicho puede formar tumores secundarios (colonización) o puede

mantenerse en un estado de latencia o letargo que podría llegar a formar metástasis, incluso años después de la eliminación del tumor primario³⁹.

1.2.7. Inestabilidad del genoma y mutación

Es la alteración más destacada para el desarrollo del cáncer, el cual genera mutaciones aleatorias, entre las que incluye el raro cambio genético que orquesta el resto de los “hallmarks” mencionados anteriormente. Es frecuentemente encontrado en el CP, incluyendo pérdidas y ganancias en el material genético^{39,45}.

1.2.8. Inflamación promotora de tumor

En la última década se ha descrito la contribución de la inflamación en múltiples “hallmarks” del cáncer, debido a que suple el microambiente tumoral de moléculas bioactivas que contribuyen a la proliferación celular, limita la muerte celular programada, promueve la angiogénesis y facilita la invasión y las metástasis. Por tanto, tiene un efecto paradójico en la tumorigénesis y progresión del cáncer³⁹.

1.2.9. Reprogramación del metabolismo energético

La enfermedad neoplásica no solo involucra la proliferación celular crónica y a menudo descontrolada, sino también los correspondientes ajustes del metabolismo energético para impulsar el crecimiento y la división celular. A principio del siglo XX, el fisiólogo alemán Otto Warburg⁴⁹ observó que los tumores, en comparación con tejidos normales no proliferativos, mostraban un aumento en el consumo de glucosa, facilitando su ingreso intracelular a través de una sobreexpresión de receptores de la glucosa en la membrana celular (la familia de los receptores GLUT). Asociado a ello, e incluso en presencia de oxígeno, las células tumorales preferían metabolizar esta glucosa a través de la glicólisis, por lo que se denominó “glicólisis aeróbica”^{39,49-51}. Este aumento de la glicólisis es crucial para proveer suficientes nucleótidos, proteínas y lípidos para que la célula doble su biomasa y pueda luego dividirse para producir dos células hijas⁵¹.

1.2.10. Evasión de la destrucción inmune

La teoría propuesta, formulada ya hace mucho tiempo, indica que existe una vigilancia del sistema inmune constante para reconocer y eliminar la gran mayoría de células tumorales. La aparición los tumores sólidos implica que de alguna forma han evitado o evadido la detección, por varios mecanismos, del sistema inmune o han sido capaces de limitar la respuesta inmunológica frente al tumor³⁹.

1.3. Angiogénesis tumoral

Toda célula necesita oxígeno y nutrientes, así como desechar metabolitos, para su supervivencia. Estos procesos requieren que las células se localicen a una distancia entre 100 y 200 μm de los vasos sanguíneos. El crecimiento más allá de esta distancia necesita de nuevos vasos sanguíneos, los cuales se forman por vasculogénesis y angiogénesis. La vasculogénesis es la formación de nuevos vasos desde precursores de células endoteliales (CE) que ocurre en el embrión. La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos desde otros ya preexistentes⁵²⁻⁵⁷.

La angiogénesis es el proceso de neovascularización más estudiado y sucede normalmente en la embriogénesis. En la vida adulta, la red vascular normal ya está constituida y las CEs se convierten en gran parte en células quiescentes. Solo entre un 0,01 a un 0,5% están sometidas a división como parte de procesos fisiológicos y ocurre en la cicatrización de heridas y en el ciclo reproductivo de la mujer. Este proceso se produce por expansión capilar mediante brotes y ramificaciones o por intususcepción, en el cual un vaso preexistente se divide y de él surgen dos vasos hijos^{53-55,57}.

La hipótesis de que la angiogénesis ocurre en las masas tumorales se conoce desde hace más de 100 años. Es Folkman⁵², en 1971, quién propuso que dicho proceso es fundamental para el crecimiento y diseminación tumoral, por tanto el bloqueo de este proceso podría ser una diana terapéutica contra el cáncer^{39,52,56}.

1.3.1. Mecanismo de angiogénesis

1.3.1.1. El interruptor o “switch” de la angiogénesis

La angiogénesis es un proceso complejo que involucra distintas células, compuestos solubles y factores de la matriz extracelular (ME), controlado por el equilibrio entre factores proangiogénicos y antiangiogénicos que pueden coexistir en un mismo tejido.

Actualmente, se ha aceptado que el “switch” angiogénico está apagado “off” cuando el efecto de las moléculas proangiogénicas está en balance con las moléculas antiangiogénicas, y que está encendido “on” cuando el balance neto está a favor de la angiogénesis^{54,58} (Fig. 2). Estos factores pueden ser solubles y circulantes o actuar como factores auto o paracrinos⁵⁹. Entre las señales que pueden activar el “switch” angiogénico en los tumores se encuentra el estrés mecánico, como sería la presión generada por la proliferación celular, el estrés metabólico como son la hipoxia, la acidosis o la hipoglicemia y la respuesta inmune/inflamatoria, o las mutaciones genéticas⁵⁴.

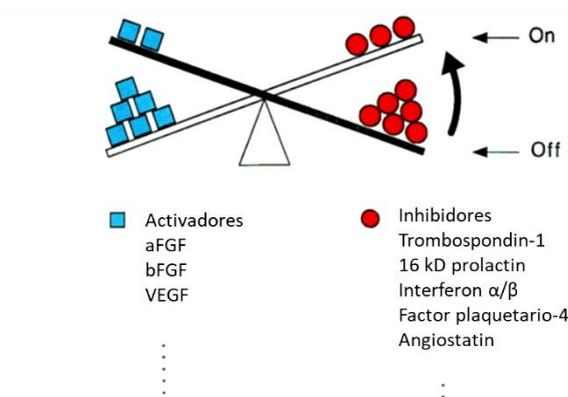


Figura 2: Switch angiogénico, balance entre activadores e inhibidores, modificado de Hanahan y Folkman⁵⁸.

La activación del “switch” de la angiogénesis tiene lugar en estadios precoces del desarrollo tumoral. Ello sugiere que la regulación de la angiogénesis es una vía discreta, potencial y un paso limitado en muchos tumores sólidos⁵⁸. De acuerdo con Gullino⁶⁰, las células precancerosas en el tejido adquieren ya capacidad de angiogénesis y, según Folkman y cols.⁶¹, la actividad angiogénica aparece primero en áreas de hiperplasia antes

de la formación del propio tumor. Por tanto, sin el proceso de neovascularización, el tumor permanece en estado quiescente en su forma no angiogénica, en donde la proliferación celular está en balance con la apoptosis⁶².

1.3.1.2. Familia VEGF y sus receptores

Entre las proteínas angiogénicas, el complejo VEGF/VEGFR (VEGF, del inglés vascular endothelial growth factor / VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor) es un regulador crucial en la vasculogénesis y la angiogénesis fisiológica en etapas tempranas del embrión y en la vida adulta, así como en la angiogénesis patológica propia de otros procesos como en el cáncer^{63,64}. La hipoxia parece ser un factor regulador esencial de esta angiogénesis. Por tanto, cuando la célula se encuentra deficiente de oxígeno, ésta produce factor inducible de hipoxia (hypoxia inducible factor- HIF), el cual estimula la liberación de VEGF⁶³⁻⁶⁵. El incremento de la expresión de HIF y, por tanto de VEGF, es observada en una gran variedad de tumores incluyendo el CP⁶⁶.

El VEGF es una glicoproteína homodimérica codificada en el cromosoma 6^{64,66,67}. La familia VEGF la componen cinco miembros codificados en el genoma de mamífero, VEGF-A (o simplemente VEGF), VEGF-B, -C, -D y el factor de crecimiento de placenta (PIGF); tres receptores (VEGFR-1, -2 y -3) y una molécula soluble (sVEGFR-1). Además, el VEGF expresa varias isoformas, por ejemplo, el VEGF-A presenta, VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₉ y VEGF-A₂₀₈. Mientras, que el homodímero VEGF-B solo tiene dos transcriptos, VEGF-B₁₆₇ y VEGF-B₁₈₆^{63-65,68,69}.

El VEGFR es un receptor con un dominio tirosin quinasa (TQ), un dominio transmembrana y un dominio extracelular con siete proteínas similares a inmunoglobulinas. Es expresado en las CEs, en otras células de carácter no endoteliales como macrófagos y monocitos, y en células derivadas de diferentes tipos de cáncer, incluyendo el CP. El VEGF-A, se une al VEGFR-1 y 2, con mayor afinidad al VEGFR-1 que al 2. Sin embargo, la actividad TQ es 10 veces mayor en el VEGFR-2 que en el VEGFR-1. Por tanto, el VEGFR-2 es el principal mediador de la actividad del VEGF, mientras que el VEGFR-1 es un regulador de la señalización del VEGFR-2^{63,64,66,70}. No obstante, se ha demostrado que el VEGF-A activa la señalización del VEGFR-1 para mediar funciones

clave, incluyendo vasculogénesis, quimiotaxis y migración, tanto en las CEs como en las células tumorales. También contribuye a la progresión del cáncer promoviendo la migración y la invasión de células tumorales, como se ha demostrado en el cáncer de mama^{64,70}. El VEGF-B y el PlGF se unen al VEGFR-1^{63,64,68}. El VEGF-C y -D son ligandos específicos para el VEGFR-3 que juega un papel crítico en la linfangiogénesis^{63,64}. Las Neuropilin (NP) son proteínas accesorias que ayudan en la formación de complejos VEGF/VEGFR-2^{66,67}. Los proteoglicanos de sulfato de heparán (HSPG) comprenden otra clase de moléculas que interactúan con ambos receptores de VEGF. Los HSPG tienen una amplia variedad de funciones y se considera que regulan la acción del VEGF in vivo⁶⁷.

En este contexto, el VEGF es el más potente y específico factor de crecimiento de las CEs. Además, potencia la migración y supervivencia de éstas, recluta células progenitoras de la médula ósea, incrementa la permeabilidad vascular permitiendo la diseminación tumoral y estimula factores tisulares que degradan la ME. Todo esto hace al complejo VEGF/VEGFR el principal regulador de la angiogénesis tumoral y un potencial objetivo o diana para la terapia contra el cáncer^{63-65,68}.

Muchos son los factores que regulan la expresión del VEGF en el CP, dentro de los que se pueden mencionar el EGF (factor de crecimiento epidérmico), el TGF β (factor de crecimiento transformante beta) y el TNF α (factor de necrosis tumoral alfa). Por otro lado, alteraciones genéticas en oncogenes y GST también inducen expresión del VEGF. Con respecto a esto, la mutación del EGFR ha sido correlacionada con el aumento del VEGF en el CP. Por último, más recientemente, la expresión de VEGF se ha visto regulada por microRNA, como la disminución o ausencia de miRNA-126, el cual sobreexpresa VEGF en algunas líneas celulares^{66,67}.

1.3.1.3. Formación de vasos mediante angiogénesis

Un nuevo vaso, en condiciones fisiológicas, surge de una serie de señales muy complejas y bien programadas que se describen de forma sintética a continuación.

El primero de los procesos característicos es la angiogénesis por brote⁵⁴, el más conocido y estudiado en la literatura. El segundo descrito es la angiogénesis intususceptiva, menos dependiente de la proliferación de las CEs y que puede expandir

toda la red vascular con menos consumo de energía^{53,55,71}. Por último y menos conocido, es la proliferación microvascular glomeruloide, en el cual se desarrollan pequeñas estructuras parecidas a los glomérulos del riñón^{72,73}.

El proceso de angiogénesis por brote, puede dividirse en cuatro pasos para su mejor comprensión^{68,74}:

a) Se inicia con la activación de una CE, llamada “célula tip”, por estimulación de factores proangiogénicos, VEGF fundamentalmente. El VEGF activa el VEGFR-2 para estimular la migración de dicha célula (Fig. 3).

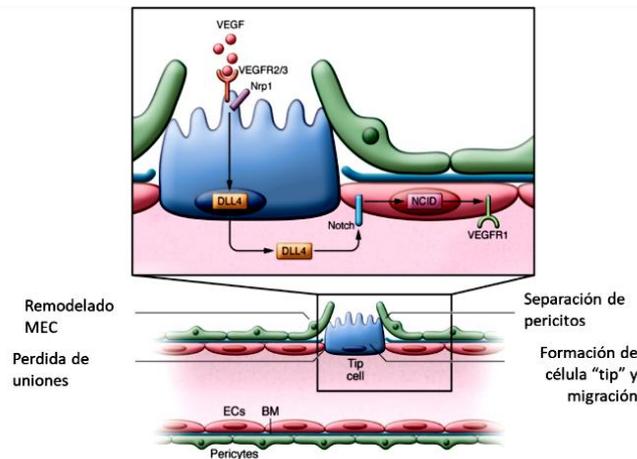


Figura 3: Selección de la célula tip y migración celular, modificado de Welti y cols⁷⁴.

b) La migración de las “células tip” requiere primero la degradación de la membrana basal (MB), en parte por una metaloproteinasa de matriz (MMP), en el lado de la vénula próxima al estímulo. Posteriormente, hay pérdida de las uniones célula–célula causada por pérdida de VE-cadherina y otras moléculas de adhesión de célula endotelial-plaqueta, así como la separación de los pericitos, regulada por la angiopoyetina 2 (Ang2). EL VEGF aumenta la permeabilidad de los vasos, permitiendo la extravasación de proteínas que son depositadas como matriz provisional, mientras la matriz intersticial es remodelada por proteasas (Fig. 4).

c) Proliferación de las CEs llamadas “células tallo”, van siguiendo a la “célula tip” formando un lumen. Estos brotes crecen a lo largo de un gradiente de VEGF. Cuando dos “células tips” se encuentran, éstas se anastomosan, proceso asistido por macrófagos, los cuales se acumulan en los sitios de anastomosis vascular para actuar como células puentes. Las “células tallo” también depositan ME y reclutan pericitos, así estabilizan la formación del vaso. Los pericitos precursores son atraídos hacia el vaso en formación por la expresión de factor de crecimiento plaquetario (PDGF) en las CEs. Una vez en el vaso, los precursores mesenquimales se diferencian a pericitos en respuesta al TGFβ y disminuye la migración y proliferación de las CE, así como la permeabilidad vascular (Fig. 4).

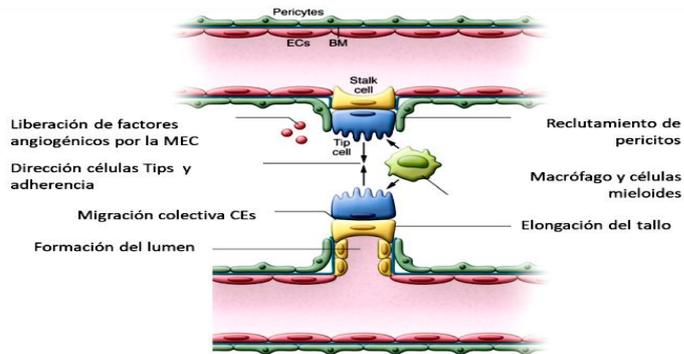


Figura 4: Guía de la célula tip y elongación del tallo, adaptado de Welte y cols⁷⁴.

d) Por último, ocurre la maduración de los vasos. Una vez realizada la fusión, se forma un lumen que permite el flujo a través del nuevo vaso sanguíneo. Por tanto, el tejido hipóxico es perfundido con la llegada de oxígeno y nutrientes que conducen a la disminución de las señales angiogénicas, inactivando los sensores de oxígeno en las CEs e incrementando las moléculas proquiescentes que conducen al reposo de las mismas. La perfusión induce maduración vascular por restablecimiento de las uniones célula-célula, maduración de pericitos y depósito de MB^{55,68,74} (Fig. 5).

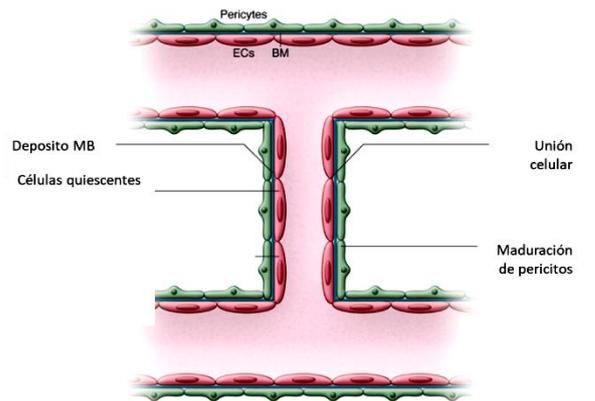


Figura 6: Maduración de los nuevos vasos, adaptado de Welti y cols⁷⁴.

Por otro lado, la angiogénesis intususceptiva ha sido descrita en una extensa variedad de condiciones normales y patológicas, aunque ésta se conoce menos que la angiogénesis por brote. Ocurre por el desarrollo de repliegues en la pared de los capilares hacia el lumen, contactando la membrana de dos CE opuestas. En dicho punto las membranas se adelgazan y la presión inducida por el citoplasma la abre y separa el vaso en dos. Posteriormente, ocurre la inserción de tejido conectivo llamado “pilar” entre las células conectadas y, por último, empieza el crecimiento de dicho pilar formando dos vasos nuevos. Es un mecanismo rápido y que consume escasa energía, a diferencia de la angiogénesis por brotes^{53,71,75} (Fig. 6).

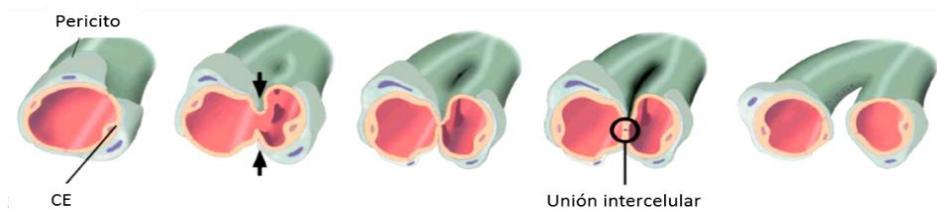


Figura 5: Proceso de intususcepción, adaptado de Spiegelaere y cols⁷⁵.

En la angiogénesis tumoral la expresión temporal y espacial de los reguladores no están bien coordinados, a diferencia de la angiogénesis fisiológica, y su mecanismo de acción está pobremente clarificados⁵⁴.

1.3.1.4. Otros mecanismos de vascularización tumoral

Los vasos tumorales se desarrollan por angiogénesis. Sin embargo, se han encontrado otros mecanismos aun no muy bien entendidos que podrían contribuir a la

vascularización de la masa tumoral. Entre los mecanismos descritos en la literatura se pueden mencionar.

a) Vasculogénesis tumoral, es la formación de vasos de novo por incorporación in situ, diferenciación, migración y/o proliferación de células precursoras endoteliales tumorales. Las CEs tumorales pueden originarse de células madres (CM) de la médula ósea, de las CM tumorales o de células precursoras circulantes (CPC)^{55,72,76,77} (Fig. 7).

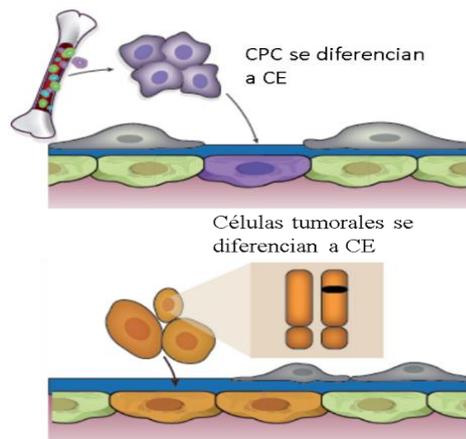


Figura 7: Vasculogénesis, adaptado de Carmeliet y cols⁵⁵.

b) La mimetización vasculogénica, en el que se evidencia un paso especial de sangre sin las CEs, es decir, éstas no revisten el vaso. Los canales sanguíneos funcionantes están formados por células tumorales que mimetizan en diferentes grados las CEs. Este mecanismo se ha observado en distintos tipos tumorales incluyendo el pulmonar^{55,72,77-79} (Fig. 8).

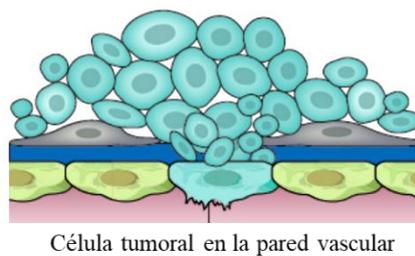
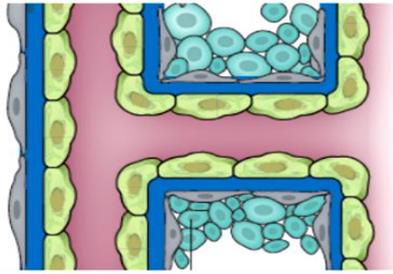


Figura 8: Mimetismo vascular, modificado de Carmeliet y cols⁵⁸.

c) La coaptación de vasos, proceso donde las células tumorales secuestran los vasos del huésped, es el mecanismo más comúnmente utilizado por los tumores no angiogénicos. En estos tumores no se evidencian crecimiento de nuevos vasos, se observa la estructura y distribución topográfica de los vasos ya existentes^{55,72,73,79}. En el CPCNP se ha observado el fenotipo llamado “no angiogénico”, en el cual las células tumorales rellenan los alvéolos y utilizan la vascularización de los septos^{40,72,77,80} (Fig. 9).



Las células tumorales cooptan los vasos preexistentes

Figura 9: Coaptación vascular, adaptado de Carmeliet y cols⁵⁸.

d) Vasos mosaico, en el cual las células tumorales se intravascan hacia el lumen del vaso y temporalmente forman parte de la pared del capilar^{79,81}. Se diferencia de la mimetización vasculogénica debido a que las células tumorales, en este caso, no presentan fenotipo endotelial⁴².

Estos diferentes mecanismo pueden coexistir en el mismo tumor o pueden estar selectivamente involucrados en un tipo de tumor específico⁷⁹. Por otro lado, la evidencia demuestra que estos diferentes mecanismos nos conducen a vasos tumorales anormales en todos sus componentes^{73,76,82,83} (Fig. 10).

Las CEs son frecuentemente permeables, tienen uniones amplias y contienen múltiples fenestraciones y otros canales transendoteliales, añadidos a mecanismos de migración transendotelial mediante micropinocitosis. Además, los vasos tumorales no están formados por una capa homogénea de CEs, pueden estar alineadas con células tumorales y formar mosaico entre ambos tipos de células^{76,83,84}. La MB es anormal, presenta pérdida de la asociación con las CEs y los pericitos, hay una amplia distancia entre ésta y la pared del vaso y se evidencia reduplicación en múltiples capas. Los

pericitos están unidos de forma débil a las CE, tienen formas anormales y pueden presentar grandes procesos citoplasmáticos que lo distancian de la pared del vaso^{76,82,83}. Este hecho condiciona un flujo caótico, hemorragias e incremento de la presión de fluidos intersticiales, el cual limita la perfusión, produce pérdida de la capacidad del control vasoactivo y, por último, ausencia de quiescencia vascular. Por tanto, el microambiente tumoral es hipóxico, con un bajo pH y un aumento de la presión intersticial que puede alterar las características de las células tumorales y facilitar el escape de las células neoplásicas por los vasos permeables, favoreciendo las metástasis y beneficiando un círculo vicioso que estimula el aumento de los factores angiogénicos^{54,76,83,85}.

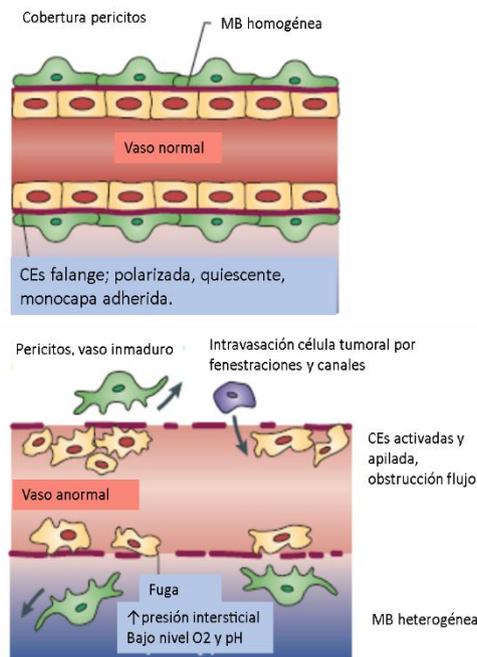


Figura 10: Estructura vasos sanguíneos, arriba vasos normales, abajo vasos tumorales, modificado de Carmeliet y cols⁷⁶.

1.3.2. Evaluación de la angiogénesis por medio de la densidad microvascular

La angiogénesis es medida indirectamente en los tumores por el conteo tisular de los microvasos^{65,68,86}. Esta medición solo se puede conseguir en tumores después de la resección quirúrgica⁸⁶. Esto involucra la tinción de una sección de tejido, usando diferentes anticuerpos para marcar las CEs vasculares y realizar el conteo de los vasos

en las zonas vascularizadas elegidas por el investigador^{65,77,86}. Chalkley⁸⁷, en 1943, diseñó una retícula o cámara para estimar el área de vascularización^{42,77,86,87}. Weidner y cols.⁸⁸ en 1991, postularon el realizar el conteo de la densidad microvascular (DMV) en áreas intensamente vascularizadas (hot spot)^{77,86,88}. Otros autores han usado un grado vascular parecido al grado tumoral, el cual es un método subjetivo y que requiere entrenamiento y experiencia del observador. Y por último, mencionar los sistemas computarizados de análisis de imagen, donde se obtiene el número de vasos así como otros parámetros morfométricos⁷⁷.

Diversos marcadores inmunohistoquímicos (IHQ) panendoteliales han sido utilizados en la mayoría de los estudios, tales como el factor VIII, CD31, CD34^{65,68,77,89}. Posteriormente, otros anticuerpos se han visto más involucrados en el endotelio asociado a tumor, comparados con el tejido normal, incluyendo EN7/44, CD105 y endosialin^{68,77}.

1.3.2.1. CD34

Es una glicoproteína transmembrana presente en células precursoras hematopoyéticas inmaduras humanas y en las CEs. Su exacta funcionalidad aún no está completamente establecida⁸⁹⁻⁹¹. Algunos estudios sugieren un papel en la citoadhesión y en la regulación de la diferenciación y proliferación celular. Aunque se encuentra expresada en las CEs quiescentes, algunos estudios han sugerido que una subpoblación celular CD34⁺ son homólogas a las “células tips” en el proceso de brote de angiogénesis, enfatizando así su importancia en la angiogénesis activa^{91,92}. En la evaluación de la DMV como factor pronóstico, el anticuerpo CD34 parece ser el más confiable en términos de especificidad y reproducibilidad que otros anticuerpos monoclonales generados contra otros antígenos de CEs, por lo que es ampliamente utilizado^{40,41,89,93}, aunque tiene el inconveniente de que marca CEs linfáticas^{89,91,92}.

1.3.2.2. CD31 o PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule-1)

Es una glicoproteína miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas que se expresa en las plaquetas, los leucocitos y en las uniones laterales de las CEs. Se expresa con gran intensidad en el borde lateral de las CEs y con baja intensidad en la superficie

de células hematopoyéticas e inmunes (macrófagos, neutrófilos, monocitos, células mastoides, células natural killer, linfocitos nativos T y B, y plaquetas). Está implicada en varias funciones biológicas como la trans migración leucocitaria, la migración y adhesión celular, la modulación de apoptosis y de la respuesta inmune, y la formación de nuevos vasos sanguíneos por angiogénesis. Ha demostrado estar involucrada en la formación inicial y estabilización del contacto célula-célula en las uniones laterales de las CEs, manteniendo la permeabilidad de la barrera vascular^{89,90,94}. Como marcador panendotelial ha demostrado ser de gran utilidad en la determinación de la DMV y como factor pronóstico en algunos tipos de cáncer, incluido el CP^{42,89,95}. Sin embargo, la eficacia de su empleo puede verse influenciada por reaccionar de forma cruzada con células inmunes⁸⁹.

1.3.2.3. CD105 o Endoglin

Es una glicoproteína homodimérica transmembrana, componente del complejo receptor de TGF β , expresado principalmente en la superficie de las CEs y con bajo nivel de expresión en monocitos/macrófagos activados, en células mesenquimales y en células de músculo liso vascular⁹⁶⁻⁹⁹. Es un regulador de la proliferación y migración de las CEs, crucial para la angiogénesis^{98,99}. La endoglin forma complejos con dos receptores tipo I diferentes, una quinasa similar al receptor de activina-1(ALK-1), restringida al endotelio, y ALK-5 ampliamente expresada (Fig. 11). Después de activar estos receptores, las señales se transducen de la membrana al núcleo a través de la fosforilación de factores transcripcionales (llamados SMAD) y regulan la actividad transcripcional de genes específicos. La activación de ALK-1 induce la fosforilación de SMAD 1/5 y estimula la proliferación y migración de CEs, mientras que la activación de ALK-5 fosforila SMAD 2/3 que inhibe estos procesos^{96,99,100}. Por lo tanto, parece que la expresión de TGF β en CEs puede modularse de manera diferente bajo ciertas circunstancias. Por ejemplo, recientes estudios han demostrado que las condiciones de hipoxia de un tejido incrementan la expresión de CD105 en las CEs, incrementando la vía de señalización de TGF β /ALK-1/Smad 1/5, y por tanto, la estimulación de la angiogénesis, mientras que ALK-5/Smad 3 no la incrementa^{97,99}. Por consiguiente, CD105 es altamente expresada en CEs activas en los vasos sanguíneos intratumorales,

por lo que se está estudiando su utilidad como objetivo terapéutico antiangiogénico y ha mostrado su superioridad como factor pronóstico comparado con otros marcadores panendoteliales en varios tipos de cáncer¹⁰¹⁻¹⁰³, incluido en CPCNP^{43,98}.

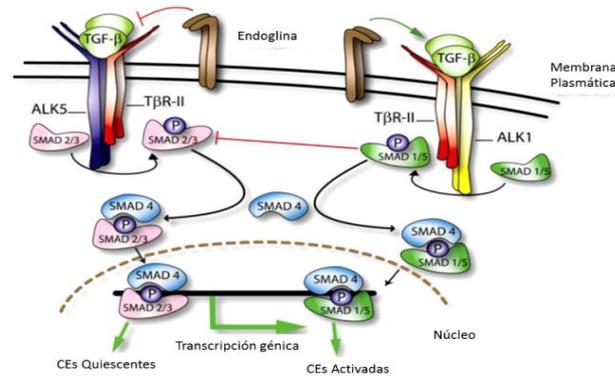


Figura 11: Esquema de las vías de señalización de la endoglin en las CEs, adaptado de Fonsatti y cols¹⁰⁰.

1.4. Adenocarcinoma de pulmón

Por definición, el ADC de pulmón es un tipo de tumor maligno epitelial con diferenciación glandular y con producción de mucina o marcadores de expresión de neumocitos^{36,104}. Indudablemente, el ADC ha sido el tumor más frecuente entre la población no fumadora, pero como se ha mencionado anteriormente, se ha observado un incremento de este tipo de CP en la población en general, incluso en los pacientes fumadores^{15,20,105}. Sánchez de Cos Escuín y cols.¹⁰⁶ en 2013, informaron por primera vez en un estudio español multicéntrico, de un predominio (34%) de ADC en el conjunto de todos los pacientes, con un 69% en mujeres no fumadoras, un 50% en fumadoras y exfumadoras y un 51,2% en hombres no fumadores, aunque en los hombres fumadores continúa siendo el tipo más frecuente el carcinoma epidermoide.

Los factores que han influido en el cambio de la prevalencia de los tipos histológicos del CP, entre ADC y carcinoma epidermoide, no están bien definidos^{107,108}. En la literatura se ha relacionado con factores asociados a la manufactura de los cigarrillos. Por un lado, la inclusión de filtros y una menor cantidad de alquitrán y nicotina que conduce a inhalaciones más profundas y una distribución más periférica del

humo del tabaco en el pulmón^{15,109}, y por otro, el aumento de N-nitrosamina específica del tabaco, promueven un cambio de los tumores centrales, carcinoma epidermoide y CPM, a tumores más periféricos, es decir, el ADC^{15,36,110}. Asimismo, se observa que después de dejar el hábito tabáquico, el riesgo de carcinoma epidermoide y CPM disminuyen más rápidamente que el riesgo de ADC.^{15,111}

Se estima que entre 10-15% de las muertes por CP ocurren por factores diferentes del hábito tabáquico activo^{18,112}. Ciertamente, hay evidencia de que otros factores no relacionados con el tabaquismo han influido en los cambios en la prevalencia del ADC¹⁰⁷. Las mejoras en las pruebas de imagen para la detección de nódulos pulmonares periféricos, así como los cambios en la clasificación histológica y en las técnicas histopatológicas podrían haber influido en la ratio entre ADC/carcinoma epidermoide^{104,107,113,114}. Por otro lado, entre las mujeres, la tasa de ADC siempre ha sido más alta que el carcinoma epidermoide, independientemente del tabaquismo y estas diferencias se han ampliado con el tiempo^{15,112}.

El término ADC pulmonar engloba una serie de tumores con un comportamiento diferente, no solo desde el punto de vista morfológico, sino también radiológico, terapéutico y pronóstico. Este hecho justifica que esta estirpe tumoral haya sido la que más cambios ha sufrido en las distintas revisiones de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Tabla 1).

Tabla 1: Subclasificación histórica del ADC de pulmón según la OMS.

1967 ¹¹⁵	1982 ¹¹⁶	1999 ¹¹⁷	2004 ¹¹⁸	2015 ³⁶
Broncogénico	Acinar	Acinar	Subtipos mixtos	Lesiones preinvasivas
Acinar	Papilar	Papilar	Acinar	AAH
Papilar	Bronquioloalveolar	Bronquioloalveolar	Papilar	AIS
Bronquioloalveolar	Sólido productor de mucina	No mucinoso	Bronquioloalveolar	MIA
		Mucinoso	No mucinoso	ADC invasivo
		Mixto	Mucinoso	Lepídico
		Sólido productor de mucina	Mixto	Acinar
		Subtipos mixtos	Sólido productor de mucina	Papilar
		Variantes	Variantes	Micropapilar
		Fetal bien diferenciado	Fetal	Sólido productor de mucina
		Mucinoso (coloide)	Mucinoso (coloide)	Variantes
		CistoADC mucinoso	CistoADC mucinoso	Mucinoso
		Células en anillo	Células en anillo	CistoADC mucinoso
				Coloide
				Fetal
				Entérico

En 2011, la International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC), la American Thoracic Society (ATS) y la European Respiratory Society (ERS) propusieron una nueva clasificación del ADC de pulmón¹⁰⁴, adoptada por la OMS en 2015 con modificaciones menores³⁶. Esta nueva clasificación ha sido muy importante al describir una neoplasia muy heterogénea, no solo por su complejidad histopatológica, sino también por los matices moleculares, clínicos, radiológicos y quirúrgicos^{36,104,119}. Una deficiencia importante de la anterior clasificación de la OMS de 2004 fue que el subtipo mixto comprendía más del 90% de todos los ADC, con una amplia variedad de resultados clínicos^{35,37,104,120}. Esta nueva clasificación ha impactado precisamente sobre el valor pronóstico de los subtipos de ADC en función de la presencia y la proporción de cinco patrones histológicos distintos (lepídico, acinar, papilar, micropapilar y sólido), enfatizando sobre el patrón predominante existente^{32,36,37,119,121,122}.

1.4.1. Subtipos histológicos

1.4.1.1. Lesiones preinvasivas

En la clasificación actual, se describe la hiperplasia adenomatosa atípica (HAA) y el ADC in situ (AIS) como lesiones preinvasivas^{32,34,36}.

La **HAA** es una proliferación localizada, ≤ 5 mm, de neumocitos atípicos tipo II y células de clara. Es la contraparte de la displasia escamosa y suele ser un hallazgo incidental en las piezas quirúrgicas^{36,123} (Fig. 12).

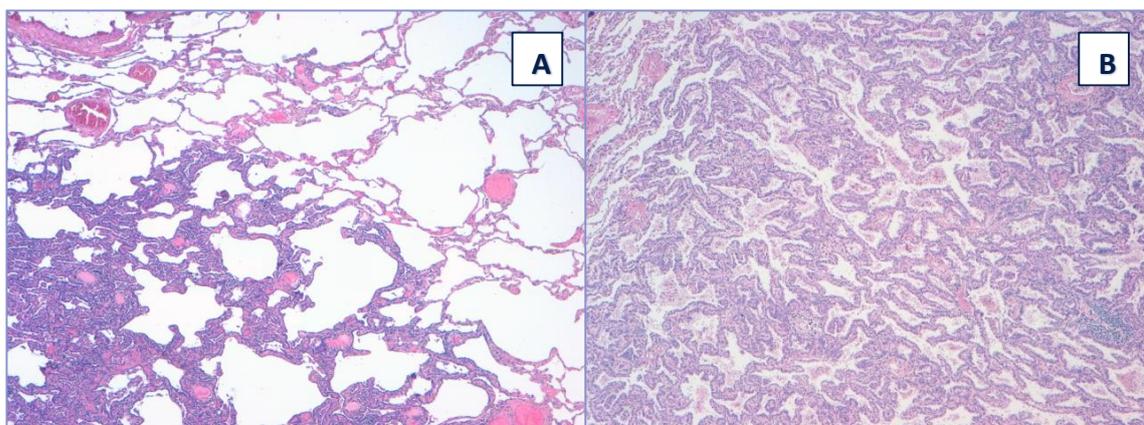


Figura 12: Hiperplasia adenomatosa atípica (A), ADC in situ (B), HE 40x.

El **AIS** es un pequeño ADC solitario, ≤ 3 cm, con patrón lepídico, carente de invasión estromal, vascular y pleural. Las atipias nucleares están ausentes o no visibles.

No debería haber patrón papilar o micropapilar y hay ausencia de células tumorales intraalveolares. Son típicamente no mucinosos, pero en raros casos pueden ser mucinoso o mixto. El diagnóstico puede hacerse sólo en tumores resecados para la valoración del tumor completo, pudiendo descartar componente invasivo. Está correlacionado con el 100% de supervivencia libre de enfermedad a los 5 años si está completamente resecado^{32,34,36,123} (Fig. 12).

1.4.1.2. Adenocarcinoma mínimamente invasivo

El ADC mínimamente invasivo (MIA, del inglés minimally invasive adenocarcinoma) es un ADC pequeño y solitario, \leq a 3cm, con patrón predominantemente lepidico y una invasión \leq 5mm. El componente invasivo incluye cualquier subtipo histológico además del lepidico, es decir, acinar, papilar, micropapilar, sólido y/o células tumorales que infiltran un estroma miofibroblástico. Para diagnosticar un MIA debe excluirse la invasión angiolinfática o pleural, que contenga necrosis tumoral o se disemine a través del espacio aéreo. Al igual que el AIS debe diagnosticarse con la resección completa y posterior análisis de todo el tumor. Múltiples estudios han demostrado que estos pacientes tiene una supervivencia libre de enfermedad a los 5 años del 100% si el tumor ha sido completamente resecado^{32-34,36,121,123} (Fig. 13).

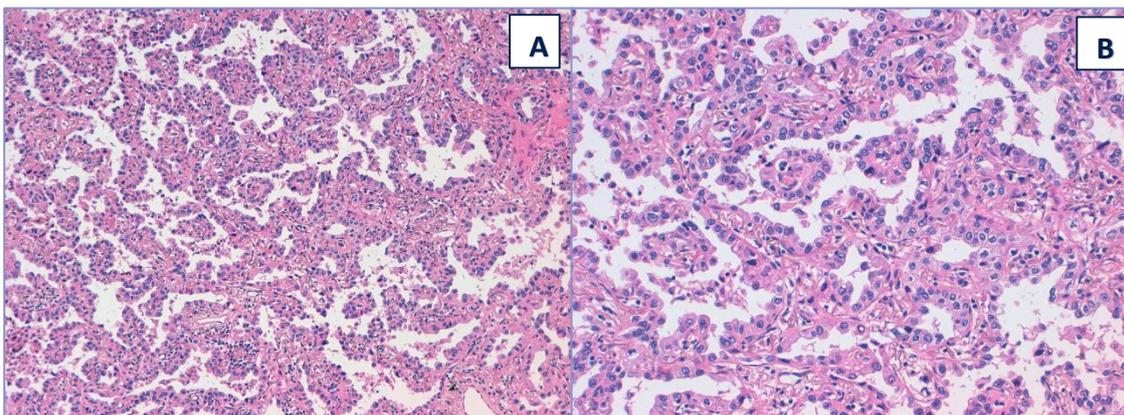


Figura 13: ADC mínimamente invasivo, observación a pequeño (A) y mediano (B) aumento. HE40x y 100x.

1.4.1.3. Adenocarcinoma invasivo

El ADC invasivo representa entre el 70% y el 90% de todos los ADC resecados quirúrgicamente. Típicamente consisten en una compleja y heterogénea mezcla de patrones histológicos^{32,34-36}, dado que los ADC que muestran un patrón puro son

relativamente raros³⁵. La estimación semicuantitativa de los subtipos, en incrementos del 5%, alienta a los observadores a identificar todos los patrones de crecimiento y debe realizarse considerando todas las secciones histológicas del tumor. Es útil registrar en los informes de diagnóstico cada subtipo de ADC que está presente así como los porcentajes que representan dentro del conjunto tumoral^{32,33,36}.

El ADC **lepídico** consiste en células tumorales neumocíticas blandas (neumocitos tipo II o células de Clara) que crecen a lo largo de la superficie de las paredes alveolares, similar a la morfología definida para AIS y MIA. Está presente un componente de ADC invasivo > 5mm, puede encontrarse invasión angiolinfática o pleural, o puede evidenciarse focos de necrosis tumoral. Algunos estudios en estadio precoz de ADC muestran un pronóstico favorable de estos pacientes, con una supervivencia libre de enfermedad a los 5 años entre 86% y el 90%^{33,36}, y una baja tasa de recurrencia en la medida que el porcentaje de patrón lepídico aumenta¹²⁴ (Fig. 14).

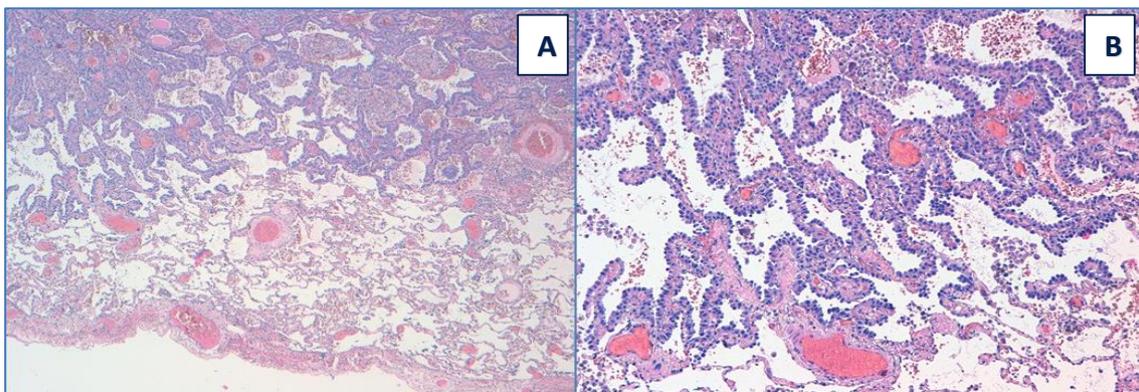


Figura 14: Patrón lepídico, a pequeño (A) y mediano (B) aumento. HE 40x y 100x.

El ADC **acinar**, es el patrón predominante más común en el ADC de pulmón. Muestra un componente estructural mayoritariamente glandular y está constituido por células tumorales redondeadas u ovaladas dispuestas alrededor de un espacio luminal central. Las células neoplásicas y los espacios glandulares pueden contener mucina. Cuando el crecimiento lepídico forma nidos atrapados por el colapso, la morfología puede ser difícil de distinguir del patrón acinar. Sin embargo, cuando la arquitectura alveolar se pierde y/o el estroma miofibroblástico está presente, se considera el diagnóstico de ADC acinar invasivo^{33,36} (Fig. 15).

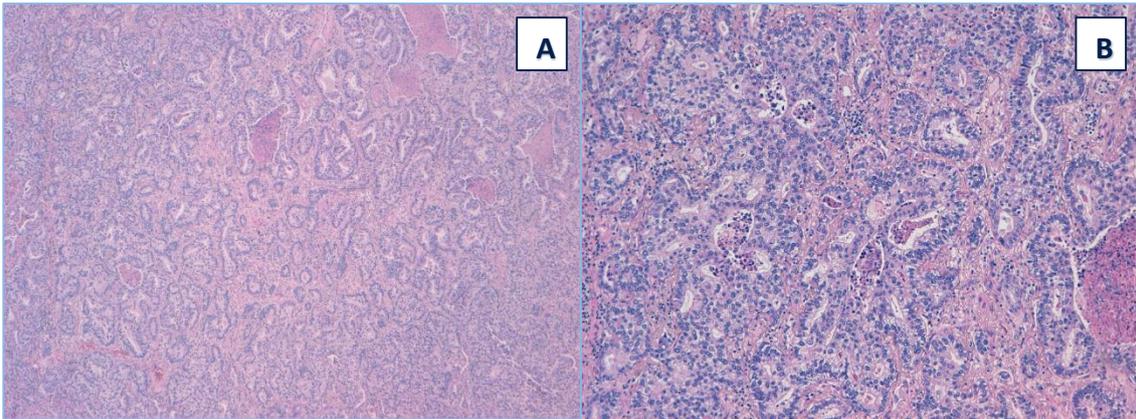


Figura 16: Patrón acinar, pequeño (A) y mediano (B) aumento. HE 40x y 100x.

El ADC **papilar** consiste en células glandulares cuboidales o columnares creciendo alrededor de núcleos o cores fibrovasculares centrales^{33,36} (Fig. 16).

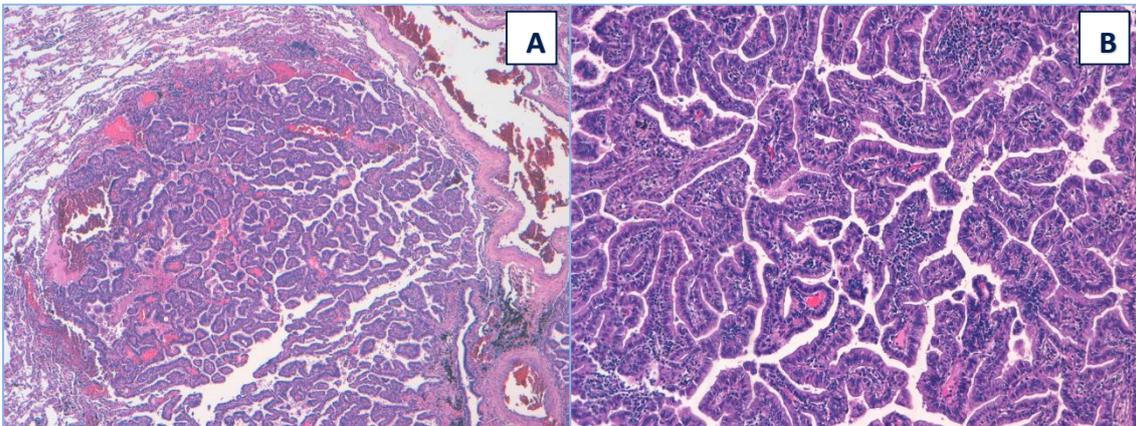


Figura 15: Patrón papilar, a pequeño (A) y mediano (B) aumento. HE 40x y 100x.

En el ADC **micropapilar**, las células tumorales crecen en “mechones” papilares que carecen de un núcleo fibrovascular aparente, característicos del ADC papilar. Estas florecillas o ramilletes de células pueden aparecer desprendidos o conectados a las paredes alveolares. Las células tumorales son generalmente pequeñas y cuboidales, presentando atipias variables. La invasión vascular y estromal es común^{33,36} (Fig. 17).

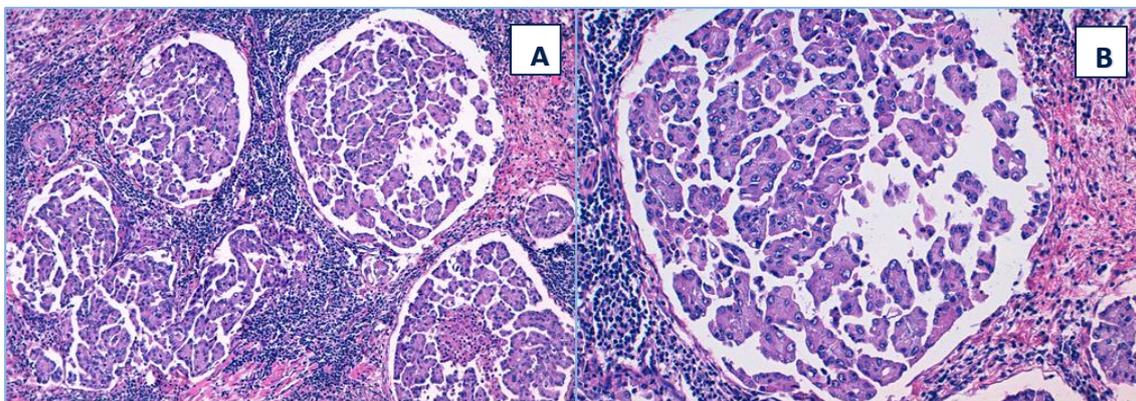


Figura 17: Patrón micropapilar, a pequeño (A) y mediano (B) aumento. HE 40x y 100x.

Por último, el ADC **sólido** con producción de mucina consiste en un componente principal de células tumorales poligonales que forman láminas pero sin ningún crecimiento acinar, papilar, micropapilar o lepidico claramente establecido. Estos tumores se deben distinguir de los carcinomas epidermoides mal diferenciados y de los carcinomas de células grandes^{33,36} (Fig. 18).

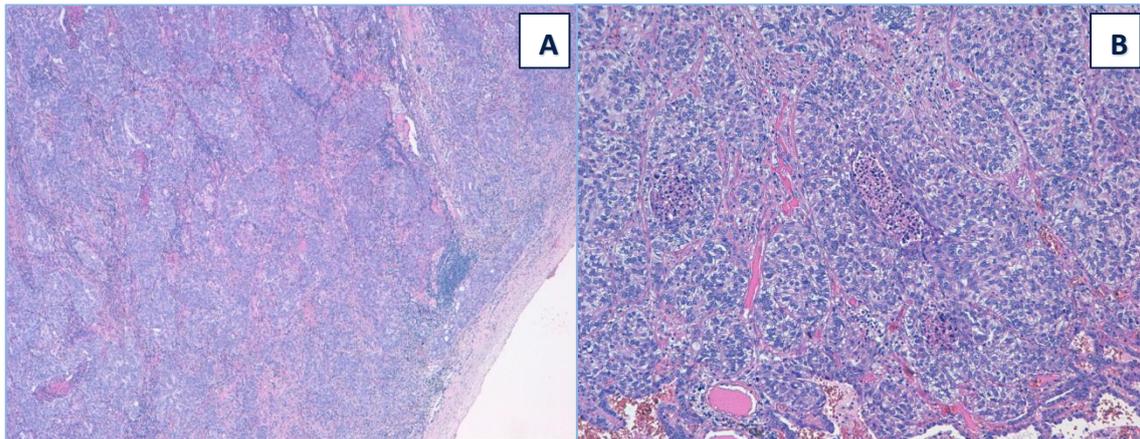


Figura 18: Patrón sólido, a pequeño (A) y mediano (B) aumento. HE 40x y 100x.

1.4.1.4 Variantes de adenocarcinoma

El ADC **mucinoso invasivo**, incluye el ADC anteriormente clasificado como carcinoma bronquioloalveolar (BAC) mucinoso, tienen células tumorales columnares con abundante mucina intracitoplásmica y pequeño núcleo ubicado en la base celular. Las atipias nucleares son característicamente discretas o ausentes. Los espacios alveolares a menudo se llenan de mucina. Se puede ver cualquier patrón de crecimiento, excepto sólido, siendo el patrón lepidico el más común. Las mezclas de ADC mucinoso y no mucinoso suelen rara vez ocurrir. Si hay más del 10% de cada componente el tumor debe clasificarse como ADC mucinoso y como no mucinoso invasivo mixto, con una descripción de cada componente. Los ADC mucinosos invasivos muestran una correlación muy fuerte con la mutación KRAS y el perfil inmune de estos tumores es diferente al de otros subtipos, ya que son típicamente positivos para citoqueratina (CK) 7 y CK20 y generalmente negativos para el factor transcriptor tiroideo 1 (TTF-1) y napsina A^{33,36} (Fig. 19).

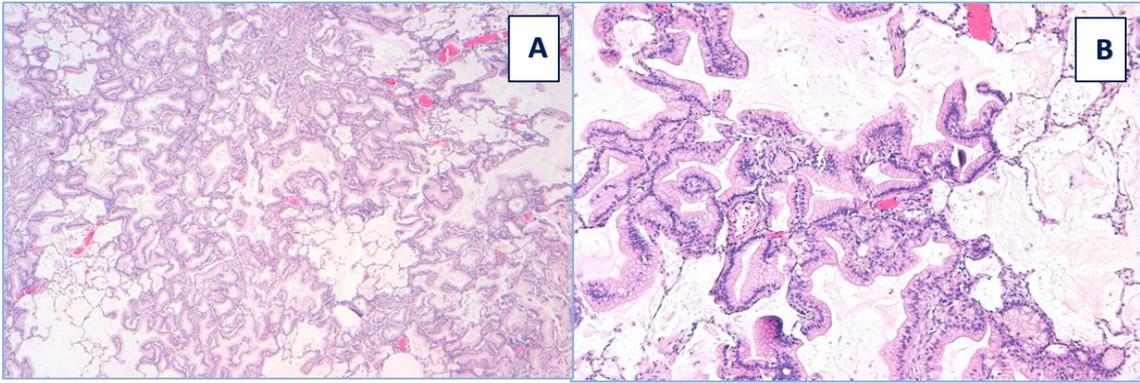


Figura 19: ADC mucinoso invasivo, a pequeño (A) y mediano (B) aumento. HE 40x y 100x.

En el ADC **coloidal**, abundantes acúmulos de mucina extracelular reemplazan los espacios aéreos y destruyen sus paredes. Las células tumorales pueden comprender solo un pequeño porcentaje del área total y estar muy bien diferenciado^{33,36} (Fig. 20).

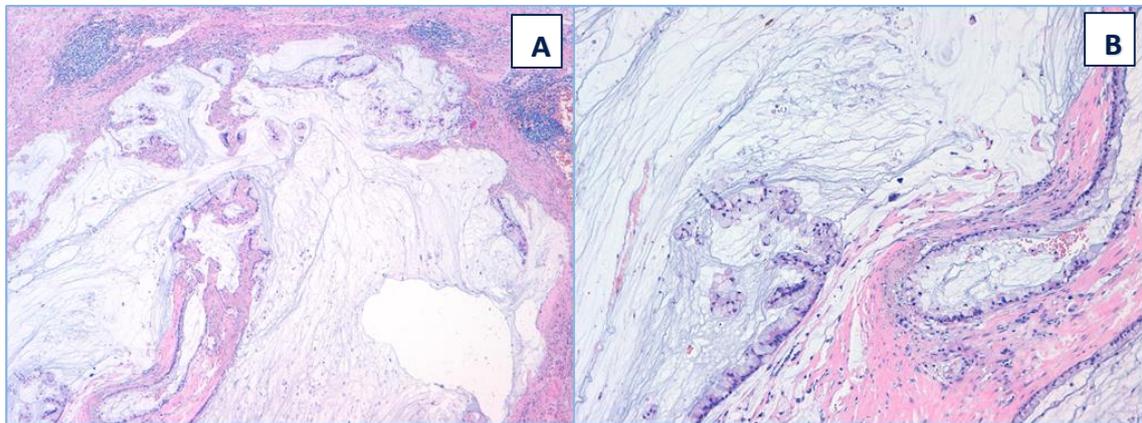


Figura 20: ADC coloidal, a pequeño (A) y mediano (B) aumento. HE 40x y 100x.

El ADC **fetal** (Fig. 21) consiste en estructuras glandulares complejas que imitan el epitelio en desarrollo en la fase pseudoglandular del pulmón fetal, mientras que el ADC **entérico** (Fig. 22) se asemeja en su estructura a los ADCs colorrectales^{33,36}.

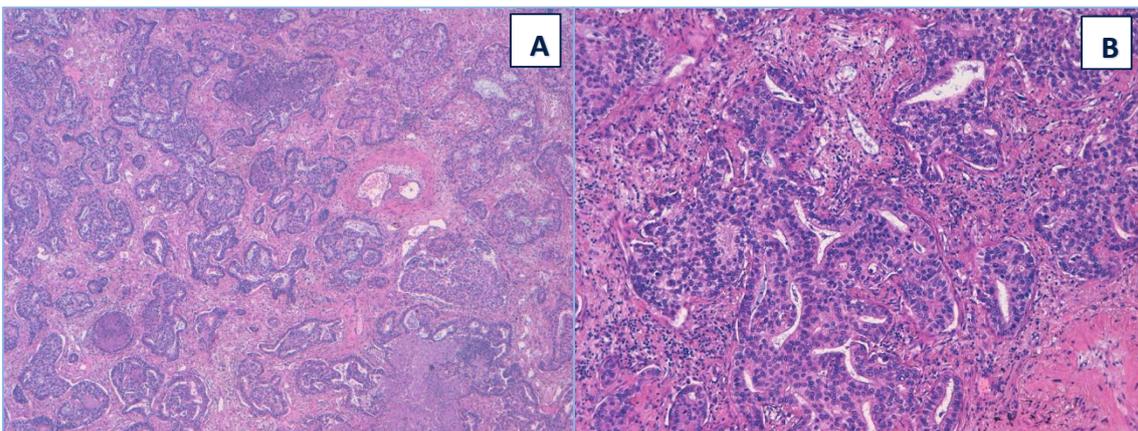


Figura 21: ADC fetal, a pequeño (A) y mediano (B) aumento. HE 40x y 100x.

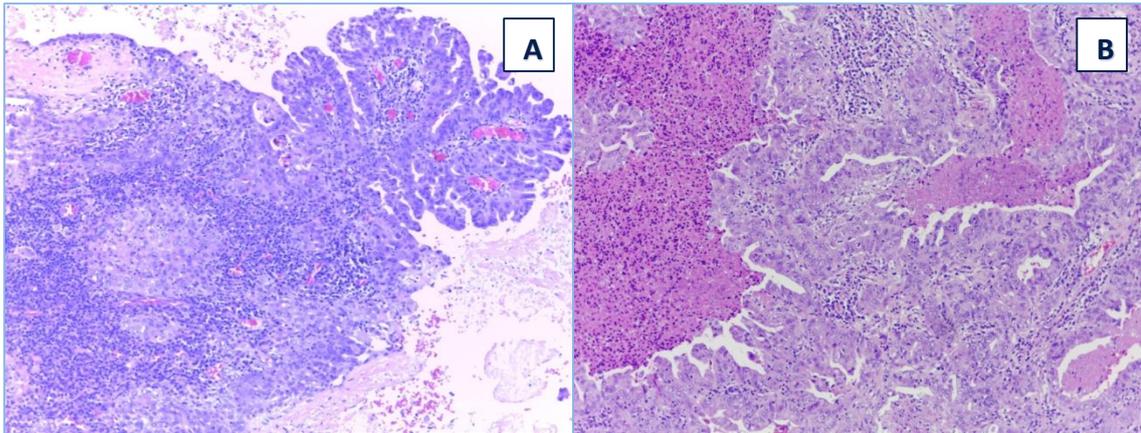


Figura 22: ADC entérico, a pequeño (A) y mediano (B) aumento. HE 40x y 100x.

Algunos autores demuestran que esta nueva clasificación tiene claramente significado pronóstico. El patrón lepidico presenta buen pronóstico, los patrones invasivos acinar y papilar tienen un pronóstico intermedio y los patrones micropapilar, coloide y sólido tienen pobre pronóstico³³. Incluso, cuando los patrones micropapilar y sólido no son predominantes, algunos estudios afirman que están asociados a peor pronóstico, con baja tasa de supervivencia y afectación ganglionar oculta¹²⁵⁻¹²⁸.

1.4.2. Estadificación del adenocarcinoma pulmonar

El sistema de estadificación TNM describe la extensión anatómica de la enfermedad y se basa en la evaluación de tres componentes: T que describe la extensión anatómica del tumor primario (tamaño del tumor, ubicación del tumor y las estructuras involucradas), N que define la ausencia o presencia de la afectación ganglionar linfática regional, y M que denota la ausencia o presencia de metástasis a distancia¹²⁹. Este sistema sigue siendo el mejor método para predecir el pronóstico y determinar el tratamiento de los pacientes diagnosticados de CP.

Dentro del descriptor T, los tumores son clasificados como T1 cuando tienen un diámetro máximo de 3 cm, están rodeados de pulmón, no presentan afectación de la pleura visceral y no hay evidencia de invasión proximal a un bronquio lobar en la broncoscopia. La ausencia de afectación ganglionar y la no presencia de metástasis a distancia se clasifican como N0 y M0, respectivamente^{130,131}.

En la 7ª edición, publicada en 2009, se establecieron nuevos puntos de corte en el descriptor T1. Los tumores con un diámetro máximo de 2 cm pasaron a denominarse T1a y T1b para aquellos con un diámetro comprendido entre 2,1 y 3 cm. El estadio IA quedó configurado por los tumores clasificados como T1aN0M0 y T1bN0M0¹³⁰.

En la última y vigente revisión de la clasificación TNM, la 8ª edición, se introdujo en diciembre de 2016 y se puso en marcha en enero del siguiente año⁴⁴. De nuevo se ha revisado le descriptor T, incluyendo características morfológicas como el subtipo AIS, denominándose Tis, o el MIA etiquetado como T1mi. Los tumores anteriormente clasificados como T1 se han redefinido en tres categorías: T1a, tumor con un diámetro máximo de 1 cm, T1b los comprendidos entre 1,1 y 2 cm, y T1c aquellos entre 2,1 y 3 cm. Aunque el punto de corte de 3cm se mantiene separando T1 de T2, se pudo determinar que de 1 a 5cm, cada cm separa los tumores con respecto al pronóstico^{44,131-133}.

El estadio IA de la pasada edición ha pasado a reclasificarse como IA1, que engloba los tumores agrupados como T1aN0M0, estadio IA2 para los T1bN0M0 y estadio IA3 para los T1cN0M0, con una supervivencia a los cinco años del 92, 83 y 77 %, respectivamente^{27,123,131,134} (Fig. 23).

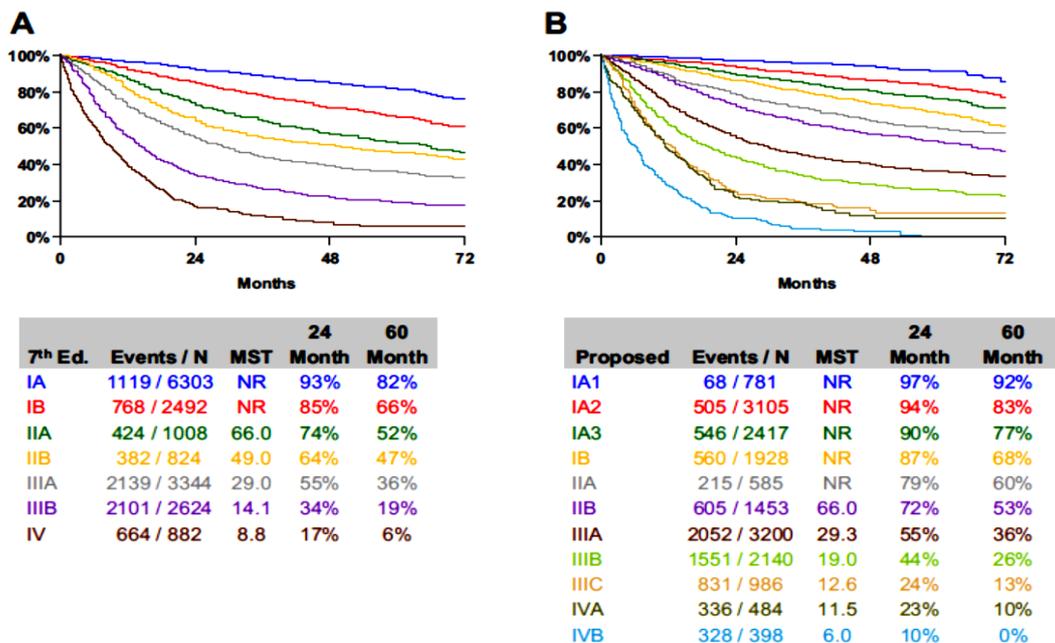


Figura 23: Curvas de supervivencia, 7ª edición (A) y 8ª edición (B), modificado de Goldstraw y cols²⁷.

1.4.2.1. Tamaño tumoral y tamaño de la invasión

El tamaño tumoral ha sido uno de los más importantes predictores de supervivencia en el CP, por lo que ha sido uno de los elementos de la clasificación TNM. Ha sido predictor independiente de supervivencia en muchas publicaciones¹³⁴⁻¹³⁶. Sin embargo, el método de medición del diámetro del tumor ha cambiado dramáticamente en esta última edición. Radiológicamente el componente de “ground glass” y el componente lepidico en los hallazgos patológicos ya no cuentan como diámetro tumoral^{123,133,137}. Este cambio se debe a la evidencia, en algunos estudios, de que el ajuste del descriptor T, de acuerdo al componente invasivo del ADC no mucinoso, es mejor predictor de la supervivencia que el tamaño tumoral total, basado principalmente en datos de pequeños tumores ($\leq 3\text{cm}$)^{119,123,133,137-142}.

1.4.3. Otros factores morfológicos con valor pronóstico

Como se comentó con anterioridad, la estadificación del TNM continúa siendo el parámetro utilizado para determinar el tratamiento del paciente con CP y para predecir el pronóstico de estos pacientes. Sin embargo, se describe una incidencia entre un 10-30% de recurrencia en estadio I de CP después de resección completa y es imposible, hasta el momento, predecir qué paciente presenta un riesgo más elevado para padecer una recurrencia basado solo en la estadificación patológica del TNM, sobre todo en estadios tempranos. Por tanto, se continúa en la búsqueda de otros factores clínicos y morfológicos que se puedan relacionar con la recidiva y la supervivencia de estos pacientes^{22,30,31,143-147}.

1.4.3.1. Grado de diferenciación

Según la OMS, la clasificación de tumores en grados es la división de un grupo tumoral en dos o más categorías de pronóstico relevante, basados en la apariencia morfológica³⁶.

Algunos tumores, como los neuroendocrinos, se clasifican de manera inherente, ya que se ordenan como carcinoide típico de bajo grado, carcinoide atípico de grado intermedio y, por último, carcinoma neuroendocrino de células grandes y carcinoma de

células pequeñas, como de alto grado. Otros tumores como el carcinoma de células grandes y el carcinoma pleomórfico son siempre de alto grado^{32,148}. La clasificación de ADC de pulmón en bien diferenciado, moderadamente diferenciado y pobremente diferenciados, propuesta por la OMS en el 2004, se basó en criterios histológicos convencionales, como la atipia citológica y la medida en que el patrón arquitectónico del tumor se asemejaba al tejido pulmonar normal, es decir, el grado de variación histológica^{32,118}. Sin embargo, en estos tumores altamente heterogéneos junto a la falta de estandarización de estos criterios, hizo que esta clasificación fuera muy subjetiva¹⁴⁹.

Tras la introducción de la clasificación de la IASLC/ATS/ERS, los subtipos histológicos predominantes de ADC han demostrado estar asociados con diferentes pronósticos^{36,119,121}. Actualmente, estas asociaciones proporcionan la base para un sistema de clasificación arquitectónico específico, que es el más recomendado, y se basa en el patrón de crecimiento predominante del carcinoma invasivo^{32,148,150}. Así, los tumores con patrón lepidico se consideran tumores de grado I, bien diferenciados, con excelentes resultados y tasas de supervivencia a los 5 años del 86-93%. Los ADC acinares y papilares se consideran moderadamente diferenciados, correspondiente al grado II, con tasa de supervivencia de 67-84% y 71-83% respectivamente. Los ADC sólidos y micropapilares se consideran poco diferenciados, correspondientes al grado III, con tasas de supervivencia 38-67% para los primeros y 39-70% para los últimos, según la población estudiada. Los datos de supervivencia en ADC mucinoso invasivo son algo conflictivos, pero actualmente se considera como un subtipo con un pronóstico pobre^{37,119,121}.

Algunos autores proponen otros sistemas de clasificación con varios parámetros, como el grado de Sica con un sistema de puntuación similar al de Gleason en el ADC de próstata, tomando el patrón predominante y el segundo más predominante^{148,151}. También encontramos el sistema de gradación propuesto por Kadota y cols.¹⁵², que combina el patrón predominante con el conteo de mitosis^{148,152}. Sin embargo, en estudios como el de Zombori y cols.¹⁵⁰, que realiza la comparación de estos tres sistemas de gradación, se comprueba que el actual sistema basado en el patrón arquitectónico, es el que mejor estratifica los tres grados de diferenciación en grupos pronósticos. Por

otro lado, un reciente estudio relaciona las características patológicas como el índice mitótico, la invasión vascular y la necrosis tumoral, con el patrón de ADC, cuestionando la necesidad de utilizar otro grado de diferenciación (GD) distinto a los patrones arquitecturales¹⁵³.

1.4.3.2. Grado nuclear

El grado nuclear (GN) ha sido asociado como factor pronóstico en cáncer de mama¹⁵⁴. En el ADC de pulmón su utilidad es discutida^{152,155}. Uno de los sistemas de gradación más utilizados es el de Barletta y cols.¹⁴⁹, que establecen un sistema de gradación nuclear o atipia citológica en función del pleomorfismo nuclear y la presencia de nucléolo evidente, catalogando de este modo tres categorías que se correlacionan con el pronóstico. Otros estudios valoran esta característica junto con el patrón histológico predominante u otras características histopatológicas para establecer el pronóstico^{152,155,156}. Sin embargo, no han podido validarse su utilidad como factor pronóstico.

1.4.3.3. Mitosis

Respecto a la influencia que el número de mitosis pueda tener en el pronóstico del ADC de pulmón hay divergencia entre los distintos estudios realizados. Mientras que algunos autores no hallan un valor pronóstico significativo en el número de mitosis, valorado de manera aislada^{149,152}, sí que se ha demostrado que es un factor pronóstico en estadio I de ADC de pulmón, valorado en conjunto con criterios arquitecturales, permitiendo estratificar a los pacientes en el caso de los tumores de grado arquitectural intermedio en función del riesgo de recurrencia¹⁵².

1.4.3.4. Invasión vascular microscópica

La metástasis microscópica comienza con la invasión local por células tumorales en el estroma del huésped dentro o alrededor del tumor primario. Cuando las células tumorales penetran en un vaso sanguíneo o un linfático periférico pueden separarse, diseminarse y detenerse en la microvasculatura. De hecho, muchos autores consideran que la presencia de invasión vascular por células neoplásicas indica que los cánceres se

encuentran en una fase metastásica^{39,146}. Se ha encontrado que la invasión vascular microscópica (IVM) se correlaciona con enfermedad avanzada en muchos tipos de cánceres¹⁵⁷⁻¹⁵⁹. En el caso del cáncer de mama, Kato y cols.¹⁶⁰, no solo informaron de la importancia de la microinvasión de vasos sanguíneos como factor pronóstico, sino que lo relacionan con el conteo de microvasos.

La IVM, la cual incluye invasión de vasos sanguíneos (IV) y vasos linfáticos (IL), ha sido asociada como factor predictivo independiente de recidiva en el CPCNP. Sin embargo, no ha sido incorporada en la clasificación TNM^{146,153,161-164}. El problema de este factor es la falta de homogeneidad de los estudios, tanto en su valoración morfológica a la hora de realizar las tinciones, como en los estudios realizados donde usan la IL y de IV sin distinción, o la IV únicamente y en menor cantidad IL sola^{146,161,162}. La invasión de vasos sanguíneos puede encontrarse en un rango muy variable, entre 6,2% y 77%¹⁴⁶; la linfática ha sido informada entre 15%¹⁶⁵ y el 36%¹⁶⁶, y juntos se encontró presente en 26% en el estudio de Arame y cols.¹⁶¹. En 1993, Macchiarini y cols.¹⁶⁷, en tumores T1N0M0, fueron los primeros en demostrar que los pacientes con CPCNP que albergan IVM tienen una tendencia significativa a la recaída a los 5 años después de la cirugía. Shimada y cols.¹⁶², en un estudio con 1.884 pacientes T1-4N0-2M0, presentaron un 58% de IVM y esto tuvo relación tanto con la supervivencia global como con la recurrencia, observando el mayor impacto en aquellos pacientes con tumores ≤ 5cm. Mientras que Kato y cols.¹⁶³, encuentran significado pronóstico en los pacientes con ADC de pulmón en estadio I, pero no en pacientes con otra estirpe histológica.

En definitiva, se ha asociado la IVM como factor pronóstico pero, para que este pueda ser valorado e incorporada como tal, es imprescindible la unificación y precisión de métodos para valorar tanto la microinvasión de vasos sanguíneos como la linfática^{146,161,162}.

1.4.3.5. Necrosis tumoral

Históricamente la necrosis ha sido vista como una forma de muerte orgánica, pero el panorama actual ha cambiado. En el contexto neoplásico, la necrosis activa

células proinflamatorias que pueden promover la progresión tumoral, además de crear un microambiente hipóxico que estimula numerosos factores de crecimiento, como es el caso de HIF-1 α y VEGF, modulando respuestas celulares como proliferación celular, supervivencia y angiogénesis³⁹.

La necrosis tumoral, por tanto, ha sido analizada como factor de mala evolución pronóstica en el CP de pacientes sometidos a cirugía^{147,153,164,168}. Park y cols.¹⁴⁷ presentan una serie con 201 pacientes en estadio IA confirmando la necrosis como factor pronóstico. Fan y cols.¹⁶⁴ informaron del mismo resultado con una serie de 265 pacientes con ADC en estadio IA. Por consiguiente, la necrosis tumoral podría ser un factor, hasta ahora no considerado en las clasificaciones tradicionales, que ayudaría a individualizar el tratamiento en fases iniciales del CP.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

2. Hipótesis de trabajo

Los factores pronósticos utilizados habitualmente en el CP, y en particular en el ADC, se basan en el análisis histopatológico y en la clasificación y estadificación TNM según el tamaño del tumor, la afectación ganglionar y la metástasis. A pesar de ello, dentro de los mismos grupos no existe una respuesta homogénea al tratamiento y los índices de recidiva y mortalidad son variables.

En un intento por disponer de otros marcadores pronóstico se han realizado estudios, no solo de las características de las células tumorales, sino también en el estroma tumoral, como por ejemplo el estudio de la vascularización tumoral. Por tanto, en este estudio se planteó la siguiente hipótesis:

“Si la angiogénesis tumoral es un factor determinante para el crecimiento y la diseminación tumoral a distancia, la evaluación de ésta mediante la DMV, utilizando diferentes marcadores inmunohistoquímicos y obtenida mediante análisis de imagen, podría ser un factor pronóstico por determinar en los pacientes con ADC de pulmón en estadio IA tratados mediante cirugía radical”.

***OBJETIVOS GENERALES Y
ESPECÍFICOS***

3. Objetivos generales y específicos

El objetivo general de la presente tesis fue evaluar y comparar una serie de marcadores inmunohistoquímicos de angiogénesis en pacientes con ADC de pulmón sometidos a resección quirúrgica radical y clasificados patológicamente en estadio IA. Para esto se formularon los siguientes objetivos específicos:

1.- Describir y analizar las características clínicas, anatomo-patológicas y de seguimiento de los pacientes incluidos en el estudio.

2.- Determinar la expresión del VEGF mediante una metodología morfométrica y establecer su posible correlación con las características clínicas, morfológicas y con la evolución de los pacientes.

3.- Determinar la DMV mediante morfometría en secciones de tejido tumoral de los casos incluidos, utilizando los marcadores inmunohistoquímicos CD34, CD31 y CD105. Identificar la posible la relación existente entre la cuantificación morfométrica de estos marcadores con las características clínicas, anatomo-patológicas y con la evolución de los pacientes.

4.- Analizar la posible correlación existente entre la expresión de VEGF como factor estimulante de la angiogénesis y la expresión de los distintos marcadores inmunohistoquímicos CD34, CD31, CD105 como marcadores de la vascularización existente.

5.- Evaluar el impacto pronóstico de la expresión de VEGF y de los marcadores de angiogénesis en la recidiva de la enfermedad y en la supervivencia en los pacientes incluidos en el estudio.

6.- Analizar las características clínicas, patológicas y angiogénicas como factores pronósticos para establecer grupos de riesgo y crear un nuevo “score” que estratifique de una forma mejorada a los pacientes con ADC de pulmón estadio IA.

***PACIENTES, MATERIALES Y
MÉTODOS***

4. Pacientes, materiales y métodos

4.1. Diseño del estudio

Se diseñó un proyecto de investigación clínica, de naturaleza observacional y analítico, con recogida de datos retrospectivos de los casos a partir de los archivos de historias clínicas del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (H.U. La Fe) y los archivos de historias clínicas del Instituto Valenciano de Oncología (IVO).

Dicho estudio se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki y a los requisitos regulatorios a nivel nacional. Además, el protocolo de estudio se aprobó por el comité ético de investigación del IVO (Anexo 3).

4.2. Población de estudio

Se incluyeron los pacientes con diagnóstico de ADC pulmonar en estadio IA patológico, según la 8ª edición TNM, y que fueron sometidos a resección quirúrgica en el H.U. La Fe, en un período de tiempo comprendido entre el 1 de enero del 1990 hasta

el 31 de diciembre 2007 y en el IVO en un período de tiempo entre 1 de noviembre 2008 al 31 de enero de 2012.

Se excluyeron aquellos pacientes que, al revisar las muestras, la anatomía patológica demostró categorías diagnósticas distintas del ADC. Se descartaron también los pacientes sometidos a algún tipo de terapia neoadyuvante. Por otro lado, se excluyeron los pacientes con antecedentes de neoplasias malignas previas que pudieran confundir en el seguimiento, las recidivas o el fallecimiento.

El período de seguimiento se estableció desde la realización del procedimiento quirúrgico hasta el momento de la recidiva o el fallecimiento o, en aquellos supervivientes, hasta la fecha de cierre del estudio, estableciéndose como censor el 1 de enero de 2018, por lo que todos los pacientes tuvieron una posibilidad de supervivencia de al menos 5 años.

El seguimiento se llevó a cabo en consultas externas de ambos hospitales; de forma trimestral el primer año de la cirugía, semestral entre el segundo y el tercer año y anual a partir del cuarto año. En este seguimiento, en cada episodio asistencial, se efectuó una anamnesis clínica del paciente y una prueba de imagen, con constatación documental del estado del paciente.

Inicialmente se seleccionaron 104 pacientes del H.U. La Fe, de los cuales se descartaron cinco pacientes por histología diferente a ADC (tres tumores neuroendocrinos y dos carcinomas adenoescamosos). Igualmente se descartaron cuatro pacientes por ausencia de tumor en los bloques de parafina o por no encontrar muestra representativa tumoral en los bloques histológicos conservados, al ser el período de tiempo del estudio tan dilatado. En la institución IVO, se seleccionaron 29 pacientes de los cuales tres fueron excluidos por falta de muestra y otros dos por antecedentes de neoplasias malignas. La cohorte final del estudio fue de 119 pacientes.

4.3. Estudio anatomopatológico

Se analizaron muestras de tejido tumoral, peritumoral y tejido pulmonar sano, fijadas en formaldehído tamponado al 10% e incluidas en bloques de parafina, mediante un procesador automático de tejidos Leica® (Germany). Se realizaron secciones histológicas seriadas con un espesor de 3 micras (μm) en un micrótopo de rotación (tipo Minot) de Leica MicroSystems® (Germany). Las secciones histológicas obtenidas se montaron en portaobjetos, previamente tratados con poly-L-lisina, para el estudio de Inmunohistoquímica (IHQ). Para el estudio morfológico se utilizaron técnicas histológicas convencionales, empleando la tinción de hematoxilina (colorante nuclear) y eosina (colorante ácido citoplasmático) (HE) (Dakopaths®, Denmark). La tinción en cada muestra fue realizada, de forma protocolizada, en un teñidor y montador automático (CoverStainer®, Dakopaths, Denmark).

4.3.1. IHQ convencional

Las técnicas de IHQ son técnicas de inmunolocalización de antígenos tisulares o celulares mediante su unión con anticuerpos específicos, que utiliza una enzima conjugada como trazador. Por este motivo, la reacción antígeno-anticuerpo se visualiza añadiendo al final de la reacción un sustrato de la enzima más una sustancia cromógena, dando lugar a un precipitado insoluble y coloreado. La enzima peroxidasa es el “trazador” más comúnmente utilizado y empleado en técnicas de anticuerpos marcados directa o indirectamente.

Las tinciones de IHQ se llevaron a cabo en un inmunoteñidor automático Omnis® (Dakopaths, Denmark) siguiendo las instrucciones del fabricante para cada anticuerpo primario utilizados (Tabla 2).

En aquellos casos en los que la valoración morfológica convencional de los tumores pulmonares incluidos en el estudio resultaba equívoca y poco definitoria para la categorización lesional como ADC por la ausencia de claros signos de diferenciación escamosa (queratinización, formación de puentes intercelulares) o glandular (formación

de glándulas, mucosecreción), se llevaron a cabo técnicas IHQ adicionales (tales como el TTF1, p63, la CK 5/6, la cromogranina y la sinaptofisina) para corroborar el diagnóstico histopatológico emitido de ADC (Tabla 2).

La observación morfológica y de IHQ se realizó utilizando un microscopio óptico binocular Leica®. Por otro lado, todas las preparaciones histológicas fueron escaneadas mediante el procesador Pannoramic SCAN 150 1.17® (3DHISTECH Ltd, Hungary) y se llevaron a cabo microfotografías de los preparados más representativos de cada tinción, empleando el software Pannoramic Viewer versión 1.15.3®, siendo el área capturada en cada imagen de 0,32 mm².

Los preparados histológicos e inmunohistoquímicos obtenidos fueron analizados por un patólogo experimentado en patología pulmonar y se estudiaron las características morfológicas del tumor, así como las relaciones con la angiogénesis tumoral que se comentan en el siguiente apartado.

Tabla 2: Características de los anticuerpos empleados para estudios morfológicos y angiogénico con el patrón de tinción.

Anticuerpo	Fuente	Tipo AC	Clon	Isotipo	Imunógeno	Patrón de tinción	Dilución de trabajo
TTF1	DAKO Glostrup, DK	MONO	8G7G3/1	Cadena Kappa de la IgG1	TTF-1 recombinante de rata	Nuclear	RtU
p63	Abcam® Cambridge, UK	MONO	BC4-A4	IgG2a	Proteína recombinante aminoácidos 1-205 de la p63 humana	Nuclear	1:50
CK5/6	DAKO Glostrup, DK	MONO	D5/16 B4	Cadena Kappa de la IgG1	Citoqueratina 5 aislada	Citoplasmático	RtU
Cromogranina	DAKO Glostrup, DK	POLI			Cromogranina A aislada de orina de pacientes con Sdr. Carcinóide	Citoplasmático (granular)	RtU
Sinaptofisina	DAKO Glostrup, DK	MONO	SY38	Cadena Kappa de la IgG1	Fraciones brutas de vesículas recubiertas de cerebro bovino	Citoplasmático (granular)	RtU
D2-40	DAKO Glostrup, DK	MONO	D2-40	Cadena Kappa de la IgG1	Tejido con disgerminoma	Citoplasmático y membranoso	RtU
VEGF	DAKO Glostrup, DK	MONO	VG1	Cadena Kappa de la IgG1	Proteína recombinante VEGF ¹⁸⁹	Citoplasmático y/o membranoso	1:25
CD34	DAKO Glostrup, DK	MONO	QBErd 10	Cadena Kappa de la IgG1	Membranas de CES obtenidas de vesículas de placenta humana	Membranoso	RtU
CD31	DAKO Glostrup, DK	MONO	JC70A	Cadena Kappa de la IgG1	Membrana de células esplénicas de paciente con leucemia de células pilosa	Citoplasmático y membranoso	RtU
CD105	DAKO Glostrup, DK	MONO	SN6h	Cadena Kappa de la IgG1	Glicoproteínas de membrana de células frescas con leucemia linfoblástica aguda noB/not	Citoplasmático	1:25

RtU: Ready to Use

4.4. Variables estudiadas

4.4.1. Variables demográficas

- **Sexo:** variable dicotómica, hombre/mujer.
- **Edad:** variable continua, expresada en años.
- **Hábito tabáquico:** variable categórica definida por los valores: fumador, exfumador y no fumador.

4.4.2. Variables quirúrgicas

- **Fecha de intervención quirúrgica:** este dato permite posteriormente el cálculo de la supervivencia.
- **Amplitud de la exéresis:** variable categórica definida por los valores: segmentectomía, lobectomía, bilobectomía y neumonectomía.

4.4.3. Variables anatomopatológicas

- **Clasificación morfológica:** variable categórica según la última clasificación OMS 2015^{32,36}.
 - Lesiones preinvasivas: AIS no mucinoso/mucinoso/mixto
 - MIA no mucinoso/mucinoso/mixto
 - ADC invasivo
 - ADC lepidico
 - ADC acinar
 - ADC papilar
 - ADC micropapilar
 - ADC sólido

Estos tumores se clasificaron de acuerdo con el subtipo morfológico predominante existente en la lesión tumoral. Se consideró como patrón predominante

aquel con mayor porcentaje cuantificado, y se añadieron los distintos subtipos existentes en incrementos de 5%.

La HAA y las variantes del ADC por su escaso número no fueron incluidas en el estudio.

- **Componente lepidico:** variable categórica definida por los valores ausente/presente.
- **Componente acinar:** variable categórica definida por los valores ausente/presente.
- **Componente papilar:** variable categórica definida por los valores ausente/presente.
- **Componente micropapilar:** variable categórica definida por los valores ausente/presente.
- **Componente sólido:** variable categórica definida por los valores ausente/presente.
- **Tamaño tumoral:** variable continua, definida por la longitud del diámetro mayor de la tumoración, expresado en mm.
- **Tamaño de la invasión:** tamaño del foco invasivo sin considerar las áreas de crecimiento o patrón lepidico, expresado en mm.
- **Tumor:** definido según la última normativa TNM, y en el caso del ADC, basado en el componente invasivo de la lesión^{44,123,137}:

- Tis
- T1a: T1(mi): tumor con componente invasivo ≤ 5 mm.
T1a: tumor con diámetro máximo de 10 mm, rodeado de pulmón y no proximal a un bronquio lobar.
- T1b: tumor con diámetro comprendido entre 11 – 20 mm, rodeado de pulmón y sin afectación proximal a un bronquio lobar.
- T1c: tumor con diámetro comprendido entre 21 – 30 mm, rodeado de pulmón y sin afectación proximal a un bronquio lobar.

- **Estadificación:**

– Estadio 0:	Tis	N0	M0
– Estadio IA1:	T1(mi)	N0	M0
	T1a	N0	M0
– Estadio IA2:	T1b	N0	M0
– Estadio IA3:	T1c	N0	M0

- **Grado de diferenciación (GD):** variable categórica que se basa en el patrón de crecimiento predominante del carcinoma invasivo y según los grupos de riesgo^{32,119,122,148,150}.

- Grado I (ADC de buen pronóstico): AIS, MIA o ADC invasivo lepidico no mucinoso.
- Grado II (ADC de pronóstico intermedio): ADC invasivo papilar o acinar.
- Grado III (ADC de mal pronóstico): ADC invasivo mucinoso, sólido o micropapilar

- **Grado nuclear/atipia citológica:** en base al tamaño nuclear y rasgos morfológicos nucleares, así como la evidencia/ausencia de nucléolo visible, siguiendo los criterios de Kadota y cols.¹⁵² y Barletta y cols.¹⁴⁹. Para ello, se valoraron las áreas tumorales con mayor atipicidad, estimando un mínimo de un 5% de afectación valorada con un objetivo de 100x, estableciéndose tres grupos:

- G1 (atipia leve): núcleos de tamaño y morfología uniforme sin evidencia de nucléolos visible.
- G2 (atipia moderada): núcleos de tamaño intermedio con discreta irregularidad en la morfología con nucléolos evidente.
- G3 (atipia severa): núcleos de tamaño aumentado y contornos irregulares con nucléolos en ocasiones de tamaño doble al habitual.

- **Número de mitosis:** variable continua, definida por el número de mitosis contabilizado en las áreas de mayor índice divisional o densidad mitótica. Registrando la media de número de mitosis contabilizada en 10 campos de gran aumento (objetivo de 40x). Se contabilizaron en conjunto tanto mitosis típicas como atípicas, evitando las zonas de necrosis o de fibrosis estromal prominente, así como de las dotadas de inflamación. Para el análisis de la variable, ésta se dicotomizó en la mediana.
- **Invasión vascular y/o linfática:** variable categórica definida por los valores ausente/presente. Se consideró positivos aquellos casos en los que se evidenció celularidad tumoral en el interior de las luces de los vasos sanguíneos (IV) y/o linfáticos (IL) respectivamente. En caso de valoración no concluyente con HE se utilizó el inmunomarcador CD34 para la valoración de endotelios vasculares, así como el D2-40 (podoplanina) para definir endotelio de vasos linfáticos (Tabla 2).
- **Necrosis tumoral:** variable categórica definida por los valores ausente/presente. Se consideró presente en función de la existencia de focos o áreas intratumorales de disrupción de la arquitectura con una combinación variable de fenómenos de pérdida de adherencia intercelular, cariorrexis, picnosis, borramiento o desaparición nuclear asociada o no a infiltración por leucocitos polimorfonucleares.

4.4.4. Variables de angiogénesis tumoral

- **VEGF:** la expresión de VEGF fue establecida mediante la utilización del anticuerpo monoclonal VEGF. Se evaluó mediante observación con microscopia de luz. Para cada paciente se seleccionaron y fotografiaron seis zonas de cada preparado donde se objetivó tinción tanto de las células tumorales como de las células estromales, en una observación con objetivo a 20x. Se empleó para la cuantificación un sistema de análisis de imagen (Pro-Plus 6.1 Media-Cybernetics®), mediante el cual se analizó el porcentaje de células positivas. La positividad del anticuerpo se consideró a partir de un umbral de 10% de células teñidas.
- **DMV:** se analizó utilizando la expresión inmunohistoquímica de CD34, CD31 y CD105. Se evaluó asimismo mediante observación con microscopia de luz. Para cada paciente se seleccionaron y fotografiaron seis zonas de cada preparación en las zonas más vascularizadas del tumor, con un objetivo a 20x. En cada caso se estimó la

media del número de microvasos de las seis zonas por mm². Para ello, se empleó un sistema de análisis de imagen (Imagen Pro-Plus 6.1 Media-Cybernetics®) y, como parámetro para seleccionar los vasos, se utilizó la existencia de un diámetro mínimo vascular comprendido entre 3 y 100 µm para descartar así células únicas teñidas, marcas inespecíficas y/o vasos diferentes a capilares. Así mismo, se valoraron parámetros como el diámetro de los vasos y el área de inmunotinción acumulada por mm². En el caso del CD34 se realizaron además seis fotos para valorar la DMV en la zona peritumoral de cada muestra, para la comparación de ésta con la zona tumoral.

Por otro lado, en siete casos de pacientes sin patología tumoral, se realizaron determinaciones de CD34, CD31 y CD105 en zonas pulmonares no patológicas para utilizarlo como control.

4.4.5. Variables de seguimiento

- **Recidiva tumoral:** variable categórica definida por los valores ausente/presente. Del mismo modo se registró la localización de la recidiva como:
 - Recidiva loco-regional: la cual se entiende por la presencia de recidiva tumoral en la localización primaria del tumor o, la presencia de adenopatías mediastínicas.
 - Recidiva a distancia: presencia de metástasis sistémicas.
 - Segundo primario: según los criterios de Martini y cols.³⁰ (Tabla 3).

Tabla 3: Criterios diagnósticos de cáncer de pulmón múltiple.

Tumor metacrónico	Tumor sincrónico
I. Diferente tipo histológico. II. El mismo tipo histológico si: A. Intervalo libre entre tumores es al menos 2 años, o B. Se origina desde carcinoma in situ, o C. Segundo cáncer en diferente lóbulo o pulmón, pero: 1. No hay invasión linfática común. 2. Sin metástasis extrapulmonares al momento del diagnóstico.	I. Tumor separado físicamente. II. Tipo histológico: A. Diferente. B. Igual, pero diferente segmento, lóbulo o pulmón, si: 1. Se origina de un carcinoma in situ, o 2. No hay invasión linfática común, o 3. No hay metástasis extrapulmonar al momento del diagnóstico

Se estableció el tiempo libre de enfermedad (TLE) en años, desde la fecha de intervención hasta que el paciente desarrolló la recidiva o hasta que el caso fue censurado el 1 de enero 2018.

- **Estado del paciente:** variable categórica definida por el estado en el que se encontraba el paciente en el momento del cierre del estudio, categorizado como:

- Vivo.
- Éxito por CP.
- Éxito por causa desconocida (se asumió como muerte por CP).
- Éxito por causa distinta de CP.
- Pérdida de seguimiento.

Se definió la supervivencia global (SG) como el tiempo desde la fecha de la intervención hasta el fallecimiento del paciente o hasta el cierre del estudio, y la supervivencia cáncer específica (SCE) la de aquellos pacientes fallecidos sólo por el proceso del ADC propiamente dicho, excluyendo otras causas de muerte, incluidos los pacientes fallecidos por un segundo primario.

4.5. Análisis estadístico

Para facilitar el análisis de los datos y aplicar los métodos estadísticos que a continuación se describen, la información recogida se trasladó a soporte magnético y se analizó mediante el paquete estadístico para Windows® SPSS versión 22. Con la información obtenida se realizó un análisis estadístico tanto descriptivo como analítico.

Para la descripción de las variables cuantitativas continuas, se calcularon los estadísticos de centralización, media y mediana, y de dispersión, desviación estándar (DE) y rango. Para la descripción de las variables nominales, categóricas u ordinales, se calcularon las medidas de frecuencia absoluta y porcentaje¹⁶⁹.

El siguiente análisis estadístico consistió en realizar la prueba de Kolmogorow-Smirnov, para determinar si los datos presentaron o no una distribución normal. Para el análisis y comparación de medias en las variables cuantitativas continuas, se utilizó el método estadístico no paramétrico *U de Mann Whitney* para dos muestras independientes o la prueba de *Kruskall-Wallis* para comparar más de dos variables. Cuando se correlacionaron dos variables continuas se utilizó el test de correlación de *Spearman*. Para el análisis y comparación de las variables cualitativas, se utilizó el método de Chi^2 o el test exacto de *Fisher* cuando no se cumplieron los condicionantes de validez de Chi^2 ¹⁶⁹.

Para el cálculo de la SCE y el TLE, se utilizó el método de *Kaplan-Meier*¹⁷⁰. Para comparar las curvas de supervivencia, según los distintos factores pronósticos, se realizó el test de log-rank¹⁷¹. Previamente, las variables continuas fueron dicotomizadas buscando el punto de corte óptimo. Éste se definió como el valor umbral de la distribución de variables continuas que, utilizando criterios estadísticos, separa mejor a los pacientes de bajo y alto riesgo con respecto a algún evento, siendo en el presente estudio la aparición de recidiva o mortalidad. Se buscó el punto de corte según la media y los distintos percentiles y se comprobó, por regresión logística binaria, el punto con el valor de p mínimo al umbral establecido^{172,173}.

La determinación del valor predictivo de la expresión del VEGF y de la DMV, en la aparición de recidiva tumoral o de mortalidad por cáncer, se llevó a cabo mediante las curvas de funcionamiento características de operación del receptor (ROC)¹⁶⁹.

Para obtener resultados más significativos, se realizó el cálculo de un score combinando los diferentes marcadores. Se realizó un análisis univariante de regresión de Cox¹⁷⁴ para cada marcador de angiogénesis, aquellos con valor $p \leq 0,05$ fueron introducidos en un análisis multivariante de Cox “paso a paso” para obtener el coeficiente de regresión con el cual se realizó la ecuación para crear el score, llamado “**Angioscore**”. El valor predictivo del “**Angioscore**” se comprobó con la curva ROC para la recidiva tumoral y para la mortalidad por ADC. También se analizaron las curvas ROC para cada tipo de recidiva tumoral. Se buscó el punto de corte óptimo, al igual que el resto de las variables, y se crearon dos grupos: bajo “**Angioscore**” y alto “**Angioscore**”.

Se analizaron las curvas de supervivencia con el método de Kaplan-Meier y se compararon con el método de log-rank.

Por último, se buscaron las variables clínicas-patológicas como factores pronósticos independientes mediante el método multivariante de Cox “paso a paso”, utilizando aquellas variables que en el análisis univariante el nivel de significación fue $p \leq 0,25$. Posteriormente, aquellas variables clínico-patológicas que entraron en el modelo de regresión se analizaron en un nuevo modelo multivariante “paso a paso” junto con el **“Angioscore”**. En todos los casos se reporta la Hazard ratio (HR) con su intervalo de confianza al 95% (IC 95%)¹⁶⁹.

Se definió la significación estadística cuando el valor de p fue $\leq 0,05$.

RESULTADOS

5. Resultados

5.1. Características clínicas, morfológicas y de seguimiento

5.1.1. Características clínicas

Las características clínicas de la muestra se resumen en la Tabla 4. La edad media de la serie fue de 61,6 años (DE 8,5) (Fig. 24). El 77,3% de los pacientes fueron hombres y el 83,2% fueron fumadores o exfumadores. En cuanto al tipo de exéresis, el 93,3% fueron sometidos a lobectomía con muestreo ganglionar.

Tabla 4: Frecuencia de las características clínicas.

	N (119)	%
Sexo		
Mujer	27	22,7
Hombre	92	77,3
Media edad (DE)	61,6 (8,5)	
Tabaquismo		
No fumador	20	16,8
Fumador	66	55,5
Exfumador	33	27,7
Tipo de exéresis		
Segmentectomía típica	7	5,9
Lobectomía	111	93,3
Neumonectomía	1	0,8

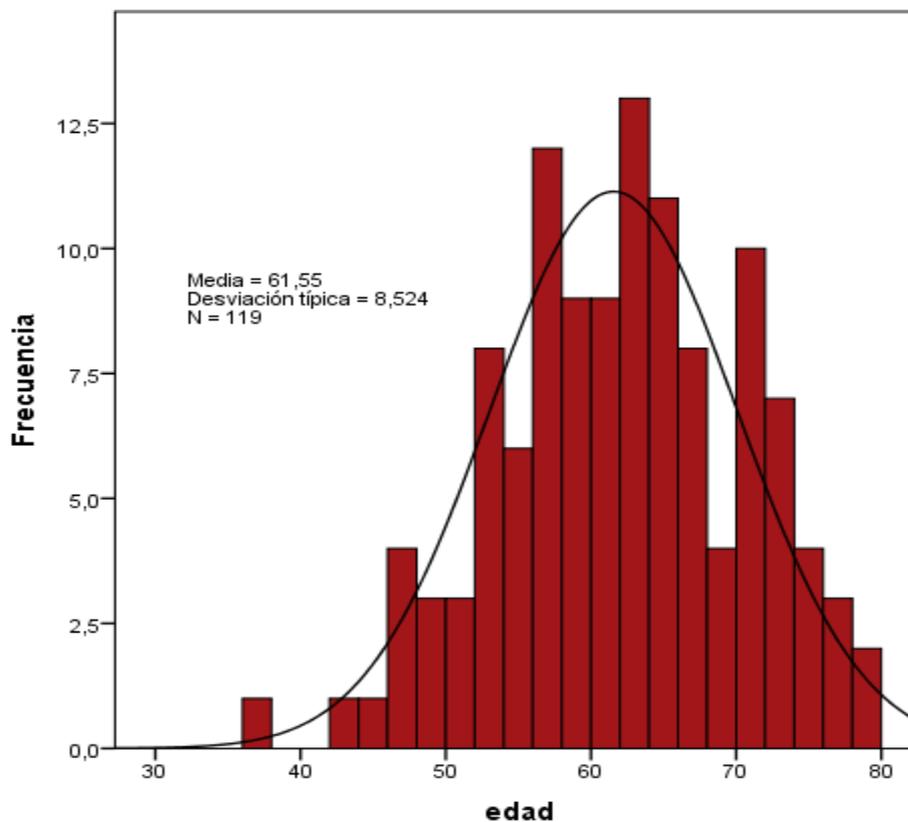


Figura 24: Distribución por edad.

5.1.2. Características morfológicas

Los ADC puros solo se encontraron en el 29,4% de los casos. Las lesiones preinvasivas tipo AIS fueron escasas, encontrando solo un 5,9%. Algo similar se observó con los ADC tipo MIA donde se evidenció un 6,7% de los casos. Entre los ADC invasivos se encontró que un 41,2% fueron clasificados como ADC subtipo acinar, siendo el segundo subtipo más frecuente el ADC sólido con un 24,4%. Entretanto, el ADC micropapilar fue el menos frecuente en la serie, con solo tres casos que representó un 2,5% (Tabla 5).

Tabla 5: Frecuencias del subtipo de ADC.

Subtipo ADC	N (119)	%
AIS	7	5,9
No mucinoso	4	3,4
Mucinoso	2	1,7
Mixto	1	0,8
MIA	8	6,7
No mucinoso	7	5,9
Mucinoso	1	0,8
ADC invasivo	104	87,4
Lepídico	18	15,1
Acinar	49	41,2
Papilar	5	4,2
Micropapilar	3	2,5
Sólido	29	24,4

En la Tabla 6 se expone la frecuencia de los distintos componentes celulares o patrones histológicos encontrados en los ADC analizados, en base a los cinco tipos histológicos descritos, objetivándose el patrón acinar como el más frecuente, representando el 84,9%, seguido del componente sólido con 58% (Fig. 25).

Tabla 6: Frecuencia del patrón histológico.

Patrón histológico	N	%
Patrón Lepídico	53	44,5
Patrón Acinar	101	84,9
Patrón Papilar	18	15,1
Patrón Micropapilar	12	10,1
Patrón Sólido	69	58,0

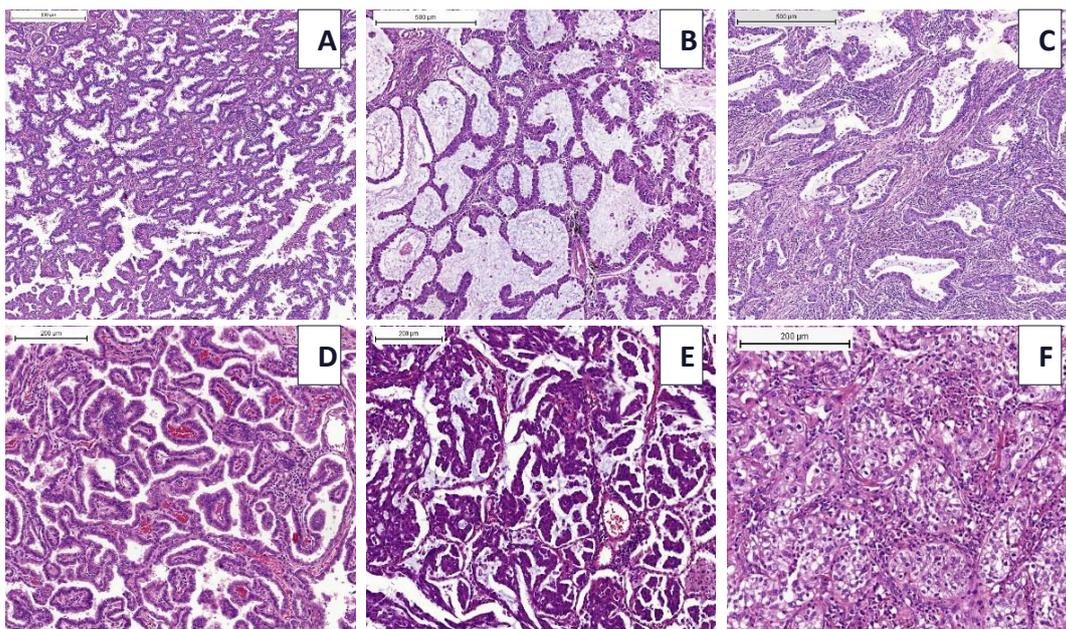


Figura 25: Imágenes histopatológicas de los diferentes patrones tumorales: patrón lepidico (A), patrón lepidico mucinoso (B), patrón acinar (C), patrón papilar (D), patrón micropapilar (E), patrón sólido(F). HE 40x y 100x.

El tamaño tumoral total medio fue de 21,9 mm (DE 6,4). Sin embargo, según la 8ª Edición del TNM, es el tamaño de la invasión tumoral el parámetro utilizado para clasificar el descriptor T de dicha clasificación y, consecuentemente, la estadificación final. Se halló que el tamaño de la invasión, en nuestra serie, fue de 16,9 mm (DE 9,4) y el estadio tumoral IA2 fue el más predominante con el 39,5% (Tabla 7).

Tabla 7: Frecuencia de la clasificación TNM y estadio.

TNM (Estadio)	N	%
Tis (I0)	7	5,9
T1a (IA1)	23	19,3
T1b (IA2)	47	39,5
T1c (IA3)	42	35,3

Otras características morfológicas quedan recogidas en la Tabla 8. Según el patrón arquitectónico pulmonar, los tumores con un GD II fueron los más frecuentes, 54 casos, seguido del grado III con 37 casos y del grado I con 28 casos. Con respecto al GN, también el GN 2 fue el más observado con 76 casos, seguido del GN 1 con 27 y, por último, el GN 3 con 16. La mediana del número de mitosis contabilizada fue de 6 con rango de 59. La IVM se halló en un 41,2% de los casos, encontrándose asociada la IV y la IL en 10 de los casos (8,4%). Igualmente, se objetivó necrosis tumoral en el 52,1% de los tumores analizados.

Tabla 8: Frecuencia grado nuclear, número de mitosis, IVM y necrosis tumoral.

		N	%
GD	I	28	23,5
	II	54	45,4
	III	37	31,1
GN	1	27	22,7
	2	76	63,9
	3	16	13,4
Nº Mitosis	Mediana (Rango)	6 (59)	
IV	Presente	30	25,2
	Ausente	89	74,8
IL	Presente	29	24,4
	Ausente	90	75,6
Necrosis tumoral	Presente	62	52,1
	Ausente	57	47,9

5.1.3 Evolución clínica y seguimiento

La mediana del tiempo de seguimiento fue de 7,2 años, con un rango desde 0,8 a 25,5 años. En la evolución de estos pacientes, se encontró que un 28,6% presentaron recidiva tumoral. De éstas un 70,6% (24/34) fueron metástasis a distancias, localizándose a nivel cerebral en 11 pacientes (45,8%). El tiempo de aparición de las

metástasis presentó una mediana de 2 años, con un mínimo de 0,3 y un máximo de 10 años (Tabla 9). De toda la serie, el 25,2% de los pacientes fallecieron por el ADC de pulmón, con una mediana de 4 años y un rango entre 1 y 13 años. Se evidenció un segundo tumor primario en 11 pacientes (9,2%), con una mortalidad de 9/11 y un tiempo de 9,4 años de mediana con un mínimo de 5,7 años y un máximo de 23,2 años. Treinta y siete pacientes fallecieron por otra causa. No hubo pérdida de seguimiento.

Tabla 9: Frecuencia de las recidivas y el estado de los pacientes.

	N (119)		%
Recidiva	34	28,6	(100)
Loco-regionales	7	5,9	(20,6)
Distancia	24	20,2	(70,6)
Ambas	3	2,5	(8,8)
Estatus			
Vivo	43	36,1	
Éxito por CP	30	25,2	
Éxito otra causa	37	31,1	
Éxito 2º primario	9	7,6	

Se realizó el análisis de la supervivencia para el TLE, la SCE y la SG de la serie. Los resultados se muestran en la Tabla 10 y las Fig. 26-28.

Tabla 10: Tabla supervivencia para TLE, SCE y SG.

Tiempo	TLE	SCE	SG
1 año	95,8%	99,1%	97,5%
2 años	83,6%	95,7%	90,8%
5 años	74,9%	82,7%	69,7%
10 años	65,7%	72,1%	47,2%

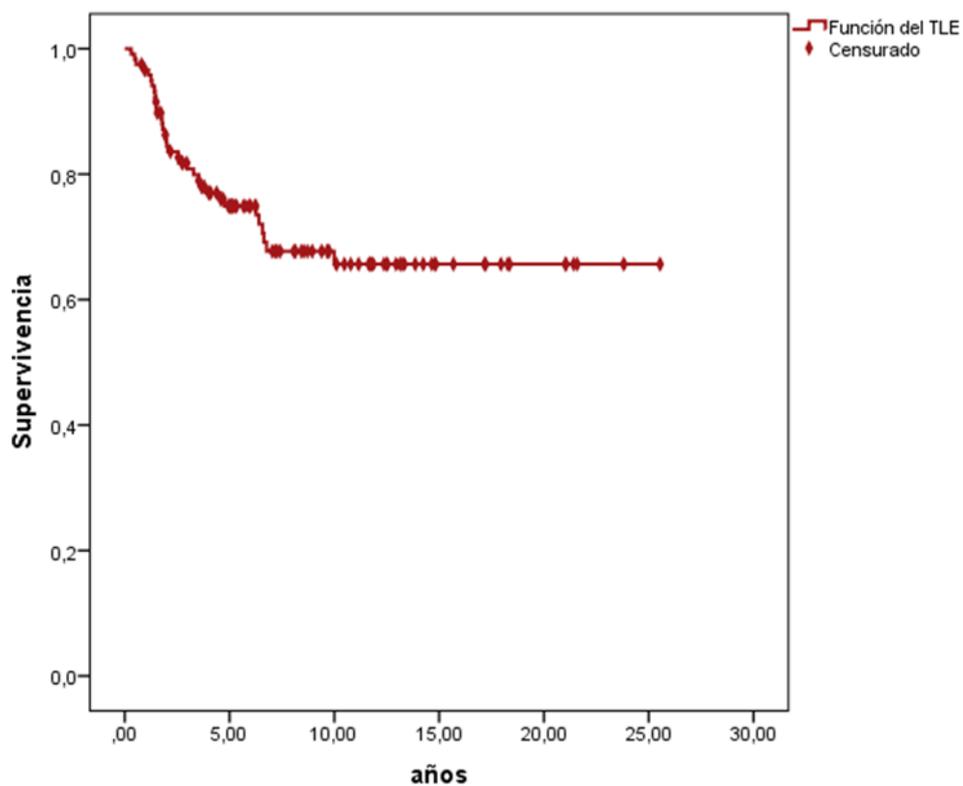


Figura 26: Curva de supervivencia para el tiempo libre de enfermedad.

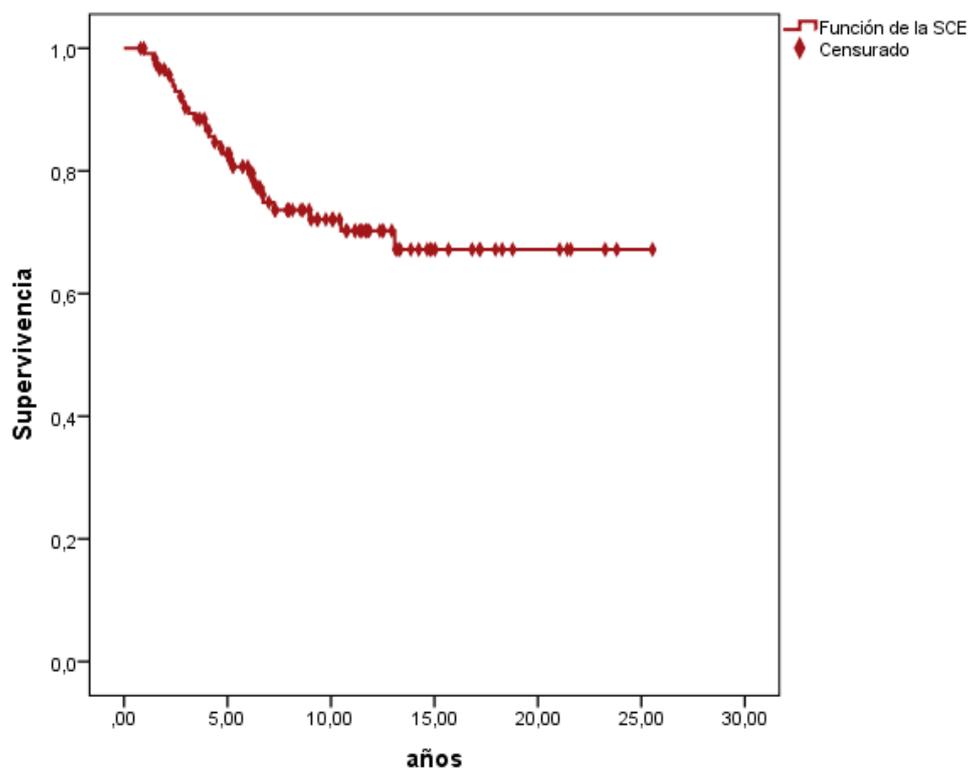


Figura 27: Curva de supervivencia cáncer específica.

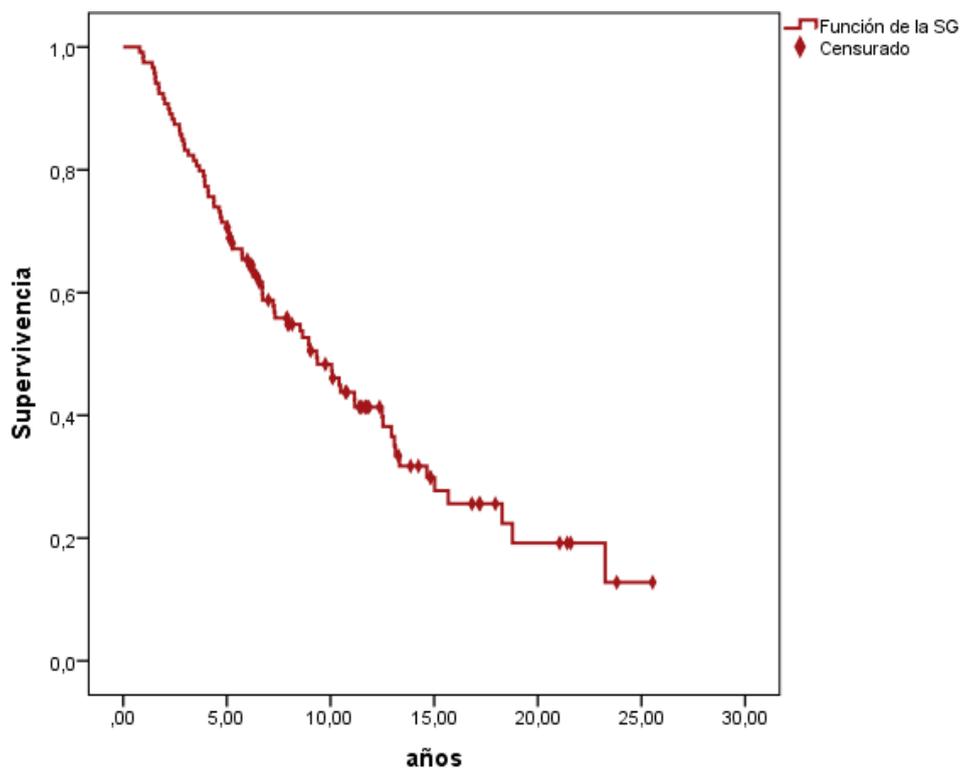


Figura 28: Curva de supervivencia general.

5.2 Expresión VEGF

El anticuerpo VEGF (anti-VEGF) se encontró en 64 pacientes (Fig. 29). La mediana del porcentaje de células teñidas fue de 41,4% (rango 45,2).

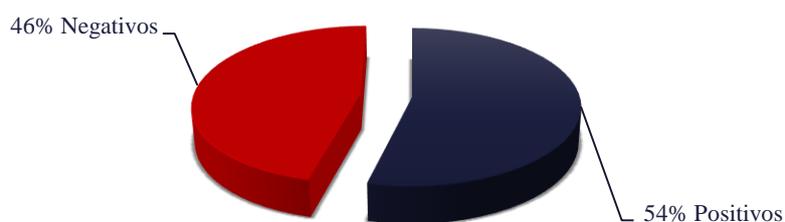


Figura 29: Frecuencia relativa anti-VEGF positivo y negativo.

En las siguientes figuras se muestra unos ejemplos iconográficos con la tinción anti-VEGF negativa y positiva (Fig. 30).

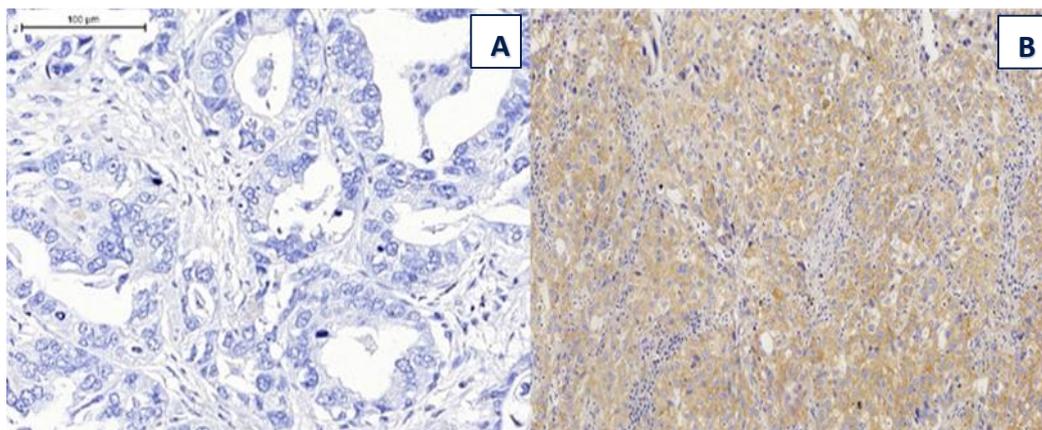


Figura 30: Inmunotinción de ADC pulmonar con anti-VEGF: negativo (A), patrón sólido positivo (B), con tinción citoplasmática en células tumorales. IHQ-VEGF 200x.

Se buscó la asociación de las características clínicas y patológicas con la expresión del anti-VEGF. Mediante el test de χ^2 , la expresión de VEGF observada fue significativamente mayor en la mujer, cuando el número de mitosis fue ≤ 6 y en ausencia de necrosis tumoral. Aunque limitando la significación estadística, ésta fue menor en los tumores clasificados como T1c (Tabla 11).

Se correlacionó, por medio del test de Spearman, la expresión del porcentaje de células positivas para el anti-VEGF con el componente histológico semicuantitativo y se encontró una relación, aunque débil, entre la positividad anti-VEGF y la presencia del componente lepidico ($r = 0,212$; $p = 0,021$).

Se analizó por el mismo método el tamaño de la invasión con el porcentaje de células positivas para el anti-VEGF y se encontró una correlación débil y negativa, estadísticamente significativa ($r = -0,256$; $p = 0,005$). Por el contrario, la correlación con el tamaño tumoral total no fue significativa.

La expresión del anti-VEGF y el número de mitosis como variables cuantitativas fueron igualmente correlacionadas y se encontró una correlación débil y negativa significativa estadísticamente ($r = -0,222$; $p = 0,015$).

Tabla 11: Relación entre características clínicas y expresión anti-VEGF.

N=119		Anti-VEGF negativo	Anti-VEGF positivo	Valor p
Sexo	Hombre	49 (53,3)	43 (46,7)	0,004
	Mujer	6 (22,2)	21 (77,8)	
Edad	≤ 62	29 (46,8)	33 (53,2)	0,899
	> 62	26 (45,6)	31 (54,4)	
Tabaquismo	No fumador	7 (35)	13 (65)	0,270
	Fumador o exfumador	48 (48,5)	51 (51,5)	
Subtipo ADC	AIS	3 (42,9)	4 (57,1)	0,548
	MIA	1 (12,5)	7 (87,5)	
	ADC lepidico	10 (55,6)	8 (44,4)	
	ADC acinar	23 (46,9)	26 (53,1)	
	ADC papilar	2 (40)	3 (60)	
	ADC micropapilar	2 (66,7)	1 (33,3)	
	ADC sólido	14 (48,3)	15 (51,7)	
TNM	Tis	3 (42,9)	4 (57,1)	0,070
	T1a	10 (43,5)	13 (56,5)	
	T1b	16 (34)	31 (66)	
	T1c	26 (61,9)	16 (38,1)	
GD	Grado I	10 (35,7)	18 (64,3)	0,340
	Grado II	25 (46,3)	29 (53,7)	
	Grado III	20 (54,1)	17 (45,9)	
GN	Grado 1	8 (29,6)	19 (70,4)	0,130
	Grado 2	38 (50)	38 (50)	
	Grado 3	9 (56,2)	7 (43,8)	
Mitosis	≤6	21 (33,9)	41 (66,1)	0,005
	>6	34 (59,6)	23 (40,4)	
IV	Ausente	40 (44,9)	49 (55,1)	0,631
	Presente	15 (50)	15 (50)	
IL	Ausente	40 (44,4)	50 (55,6)	0,494
	Presente	15 (51,7)	14 (48,3)	
Necrosis	Ausente	20 (35,1)	37(64,9)	0,020
	Presente	35 (56,5)	27 (43,5)	

Se realizó el análisis de supervivencia para la TLE y SCE, comparando las curvas entre los pacientes anti-VEGF negativo y positivo mediante el test de log-rank, sin encontrar relación estadísticamente significativa (Tabla 12 y Fig. 31-32).

Tabla 12: TLE y SCE según la expresión anti-VEGF.

Tiempo	TLE		SCE	
	Anti-VEGF negativo	Anti-VEGF positivo	Anti-VEGF negativo	Anti-VEGF positivo
1 año	96,4%	95,3%	100%	98,4%
2 años	77,7%	88,7%	96,3%	95,1%
5 años	69,4%	79,9%	78%	86,7%
10 años	66,3%	65,1%	70,4%	73,3%
	p=0,507		p=0,524	

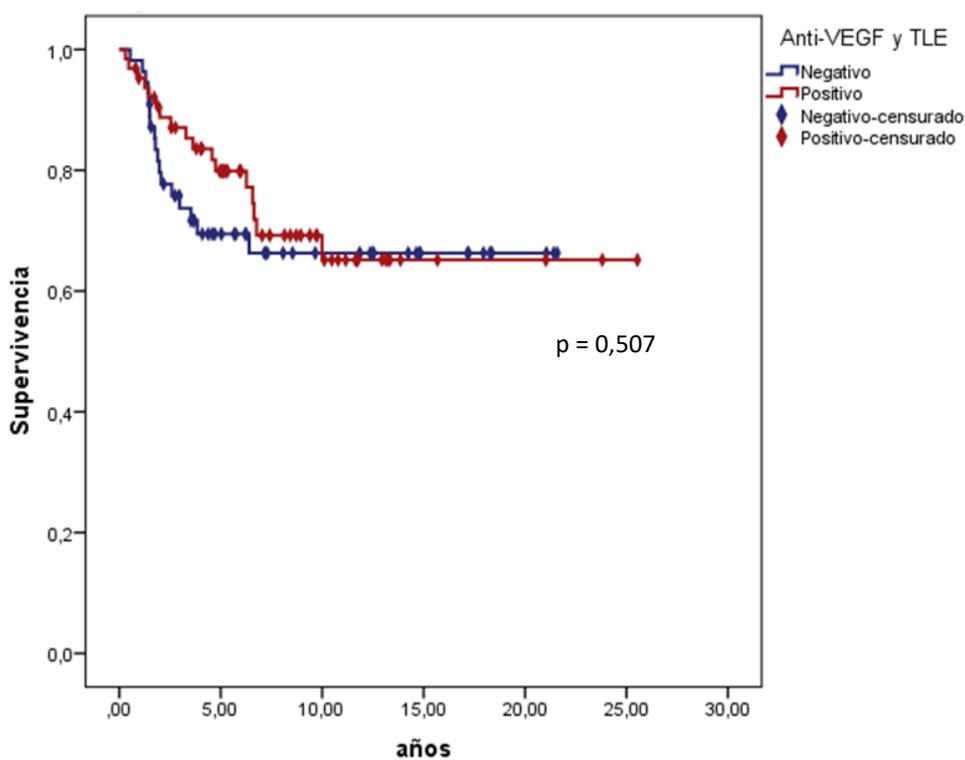


Figura 31: Expresión Anti-VEGF y TLE.

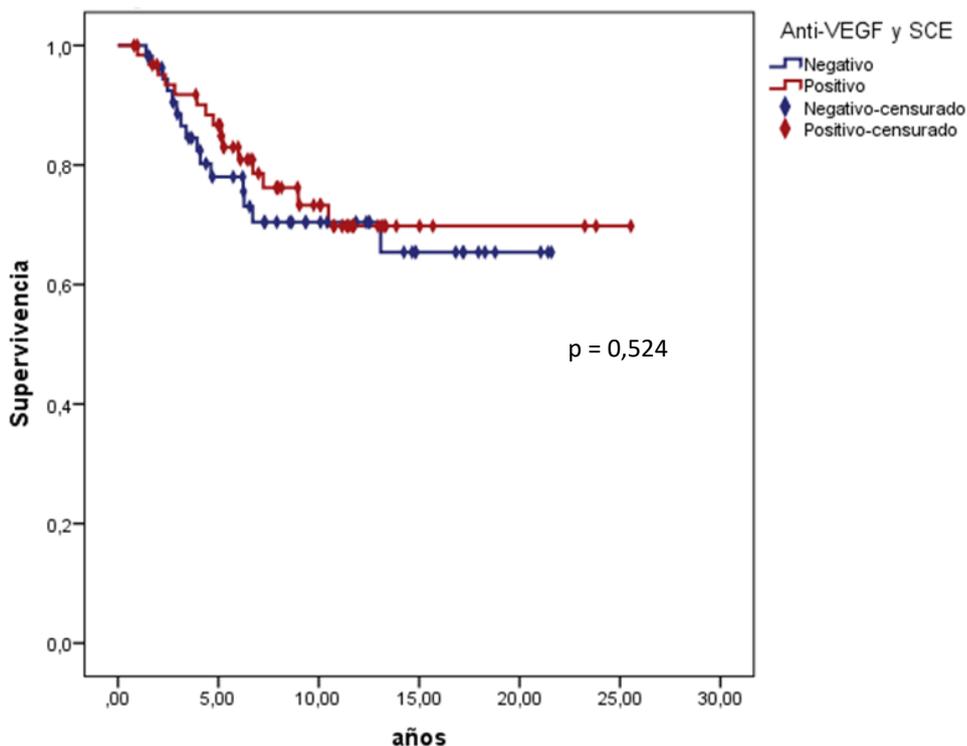


Figura 32: Expresión Anti-VEGF y SCE.

5.3 Marcadores endoteliales

Se realizó el estudio de cada muestra con el sistema de análisis de imagen (Pro-Plus 6.1 Media-Cybernetics®) y se obtuvieron tres parámetros, la DMV/mm², el área de tinción/mm² y el diámetro promedio de los vasos cuantificados en µm, de los marcadores CD34, CD31 y CD105.

5.3.1. CD34

El CD34 fue positivo en el 100% de las muestras, analizándose en la zona tumoral y peritumoral en cada caso. Así mismo, se analizó en siete casos de pacientes sin patología tumoral, en tejido pulmonar sano, siendo positivo en todos los casos (Fig. 33).

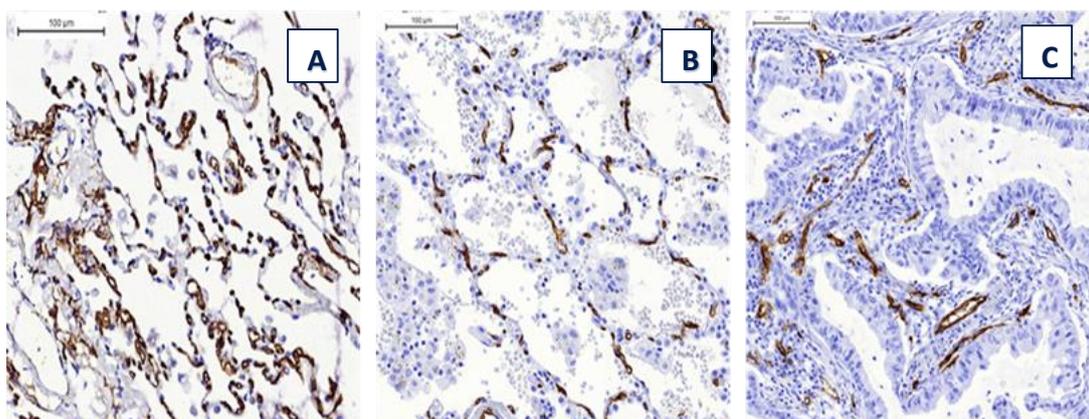


Figura 33: Expresión de anti-CD34 en tejido pulmonar: indemne de tumor (A), área peritumoral (B), intratumoral tipo ADC (C). IHQ-CD34 200x

Se encontró mayor cantidad de vasos por mm² en la zona peritumoral que en la tumoral ($p < 0,001$), aunque con menor área ($p = 0,002$) y menor diámetro de los vasos ($p = 0,013$). Mientras que, en las muestras de pulmón sin patología tumoral, se evidenció aún mayor cantidad de DMV, menor área ocupada y menor promedio en el diámetro de los vasos; $p < 0,001$, $p < 0,001$ y $p = 0,002$, respectivamente (Tabla 13, Fig. 34-36).

Tabla 13: DMV, área acumulada y diámetro promedio de los vasos con anti-CD34.

	DMV (nº/mm ²)	Área(μm/mm ²)	Diámetro(μm)
CD34 tumoral			
Media (DE)	273,7 (142,3)	312,3 (103,5)	5,6 (0,7)
Mediana (rango)	224,8 (687,7)	312,2 (475,5)	5,6 (3,4)
CD34 peritumoral			
Media (DE)	710,7 (213,3)	273,4 (110,8)	5,4 (0,8)
Mediana (rango)	706,1 (1124,5)	256,1 (522,9)	5,4 (3,5)
CD34 benigno			
Media (DE)	781,7 (521,2)	161,5 (82,8)	4,7 (0,7)
Mediana (rango)	841,4 (1597,8)	156,2 (229,2)	4,8 (1,9)

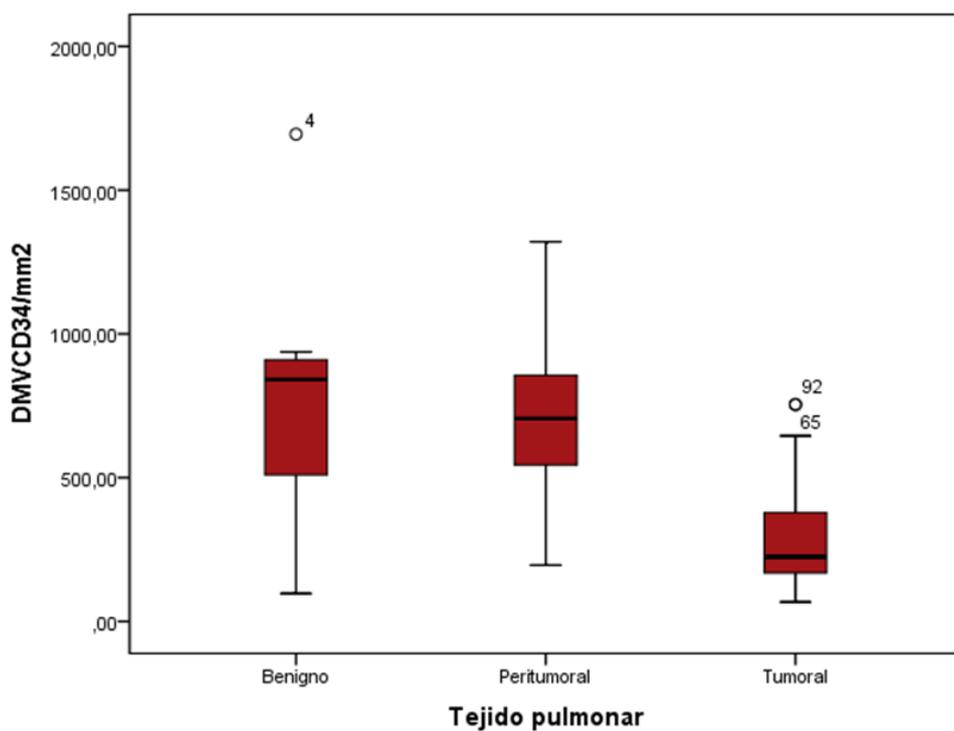


Figura 34: DMV con CD34 en tejido pulmonar indemne, tejido peritumoral y tumoral.

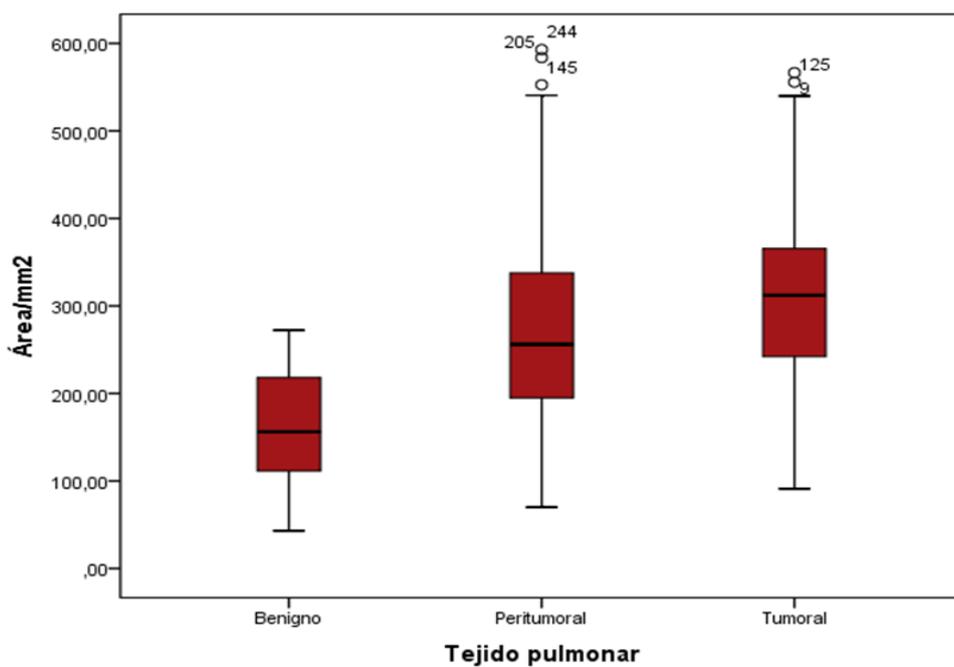


Figura 35: Área acumulada de los vasos con tinción CD34 en tejido pulmonar sano, tejido peritumoral y tumoral.

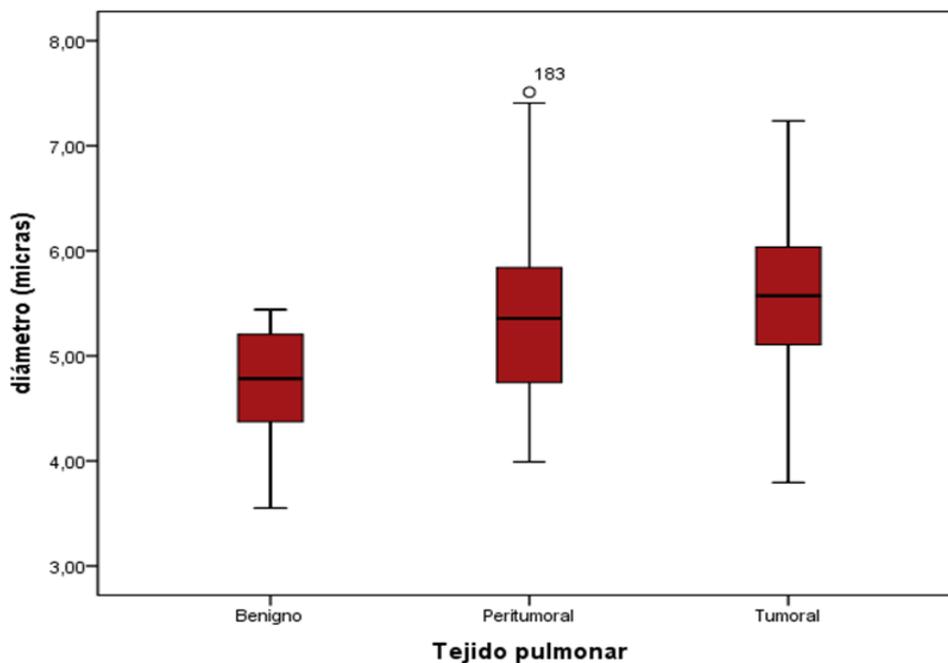


Figura 36: Diámetro promedio de los vasos con tinción CD34 en tejido no tumoral, tejido peritumoral y tumoral.

Se relacionó la DMV con CD34, como variable cuantitativa, con las características clínicas y patológicas de la serie. Se observó menor DMV en los pacientes con subtipos micropapilar y sólidos, tumores T1c, GDIII, GN3, tumores con más de 6 mitosis y en presencia de necrosis. Por otro lado, se encontró menor DMV en los pacientes fumadores o exfumadores, en presencia de IL y con el VEGF negativo con una relación cercana a la significancia (Tabla 14).

Se correlacionó la DMV con los patrones morfológicos de los ADC, encontrando significancia con el patrón lepidico ($r = 0,342$; $p = 0,000$) y con el patrón sólido ($r = -0,408$; $p = 0,000$). No se objetivó una correlación entre el tamaño tumoral total y la DMV, pero si se evidenció una correlación negativa y moderada con el tamaño de la invasión ($r = -0,334$; $p = 0,000$).

Se categorizó la DMV en el punto de corte óptimo, 192 vasos/mm², y se relacionó con las variables clínicas y patológicas. Al igual que con la variable cuantitativa, se evidenció relación significativa con el subtipo de ADC, el TNM, el GD, el GN, la mitosis y la necrosis, pero además en presencia de IL (Tabla 15).

Tabla 14: Relación DMV con CD34 y las características clínicas.

N=119		DMVCD34 Mediana (rango)	Valor p
Sexo	Hombre	224,8(687,7)	0,621
	Mujer	220,4 (460,8)	
Edad	≤ 62	209,7 (634,3)	0,856
	> 62	252,2 (687,7)	
Tabaquismo	No fumador	284,8 (408,5)	0,053
	Fumador o exfumador	209,7 (687,7)	
Subtipo ADC	AIS	290,6 (332)	0,005
	MIA	287,1 (320,3)	
	ADC lepidico	325 (402,5)	
	ADC acinar	252,2 (645,7)	
	ADC papilar	266,2 (367)	
	ADC micropapilar	204,4 (189,6)	
	ADC sólido	178,5 (347,7)	
TNM	Tis	290,6(332)	0,003
	T1a	295,2 (412,9)	
	T1b	261,8 (686,1)	
	T1c	189,8 (370,6)	
GD	Grado I	325 (412,9)	0,000
	Grado II	257 (645,7)	
	Grado III	189,9 (400,9)	
GN	Grado 1	338,9 (379,3)	0,001
	Grado 2	205,2 (687,7)	
	Grado 3	194,2 (684,3)	
Mitosis	≤ 6	282 (686,1)	0,006
	> 6	201,8 (686)	
IV	Ausente	243,6 (687,7)	0,363
	Presente	204 (350,3)	
IL	Ausente	255,5 (686)	0,055
	Presente	198,48 (638,8)	
Necrosis	Ausente	285,1 (684,3)	0,001
	Presente	197 (687,7)	
VEFG	Negativo	204,4 (665,6)	0,105
	Positivo	257 (687,7)	

Tabla 15: Relación baja y alta DMV con CD34 con las características clínicas y patológicas.

	N=119	Baja DMVCD34	Alta DMVCD34	Valor p
Sexo	Hombre	32 (34,8)	60 (65,2)	0,389
	Mujer	7 (25,9)	20 (74,1)	
Edad	≤62	21 (33,9)	41 (66,1)	0,790
	>62	18 (31,6)	39 (68,4)	
Tabaquismo	No fumador	3 (15)	17 (85)	0,063
	Fumador o exfumador	36 (36,4)	63 (63,6)	
Subtipo ADC	AIS	0 (0)	7 (100)	0,008
	MIA	0 (0)	8 (100)	
	ADC lepidico	4 (22,2)	14 (77,8)	
	ADC acinar	16 (32,7)	33 (67,3)	
	ADC papilar	1 (20)	4 (80)	
	ADC micropapilar	1 (33,3)	2 (66,7)	
	ADC sólido	17 (58,6)	12 (41,4)	
TNM	Tis	0 (0)	7 (100)	0,002
	T1a	3 (13)	20 (87)	
	T1b	14 (29,8)	33 (70,2)	
	T1c	22 (52,4)	20 (47,6)	
GD	Grado I	2 (7,1)	26 (92,9)	0,000
	Grado II	17 (31,5)	37 (68,5)	
	Grado III	20 (54,1)	17 (45,9)	
GN	Grado 1	1 (3,7)	26 (96,3)	0,001
	Grado 2	30 (39,5)	46 (60,5)	
	Grado 3	8 (50)	8 (50)	
Mitosis	≤6	14 (22,6)	48 (77,4)	0,013
	>6	25 (43,9)	32 (56,1)	
IV	Ausente	25 (28,1)	64 (71,9)	0,061
	Presente	14 (46,7)	16 (53,3)	
IL	Ausente	25 (27,8)	65 (72,2)	0,041
	Presente	14 (48,3)	15 (51,7)	
Necrosis	Ausente	9 (15,8)	48 (84,2)	0,000
	Presente	30 (48,4)	32 (51,6)	
VEGF	Negativo	22 (40)	33 (60)	0,119
	Positivo	17 (26,6)	47 (73,4)	

En la Fig. 37 se muestra ejemplos la tinción con anti-CD34 de los distintos patrones de ADC.

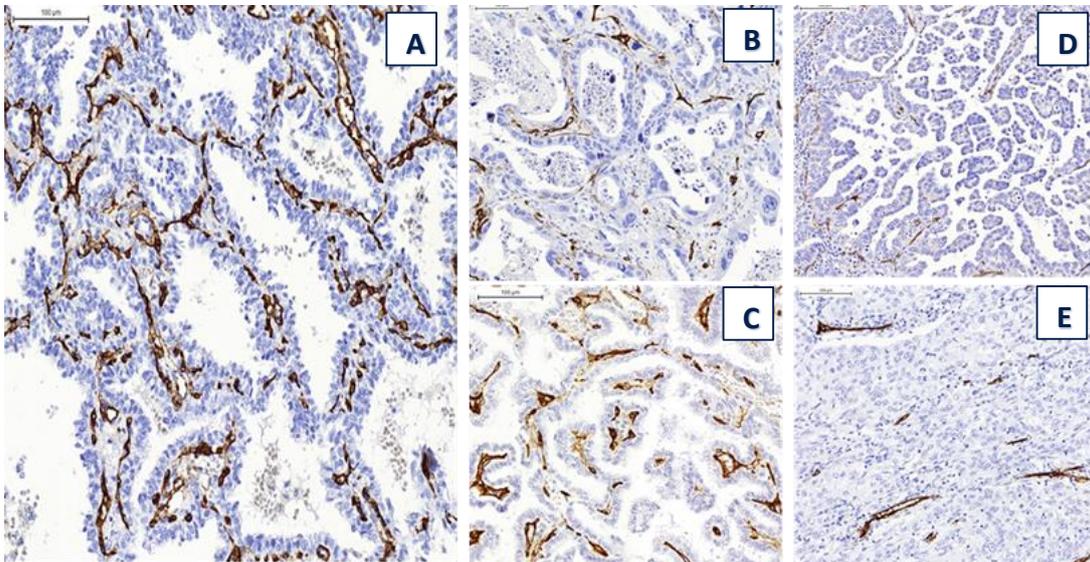


Figura 37: Expresión inmunohistoquímica de anti-CD34 según el subtipo morfológico de ADC: patrón lepidico (A), patrón acinar (B), patrón papilar (C), patrón micropapilar (D), patrón sólido (E). IHQ-CD34 200x.

Se realizó el análisis de supervivencia y la comparación de las curvas entre la “baja DMV con CD34” y la “alta DMV con CD34” con el método de log-rank, siendo mejor el pronóstico en los tumores con “alta DMV con CD34” (Tabla 16, Fig. 38-39).

Tabla 16: Relación DMV con CD34 con el TLE y la SCE.

Tiempo	TLE		SCE	
	baja DMVCD34	alta DMVCD34	baja DMVCD34	alta DMVCD34
1 año	92,3%	96,2%	100%	100%
2 años	76,7%	87%	94,8%	96,1%
5 años	67,3%	78,6%	73,7%	86,8%
10 años	48,6%	74,3%	58,2%	78,7%
	p=0,031		P=0,047	

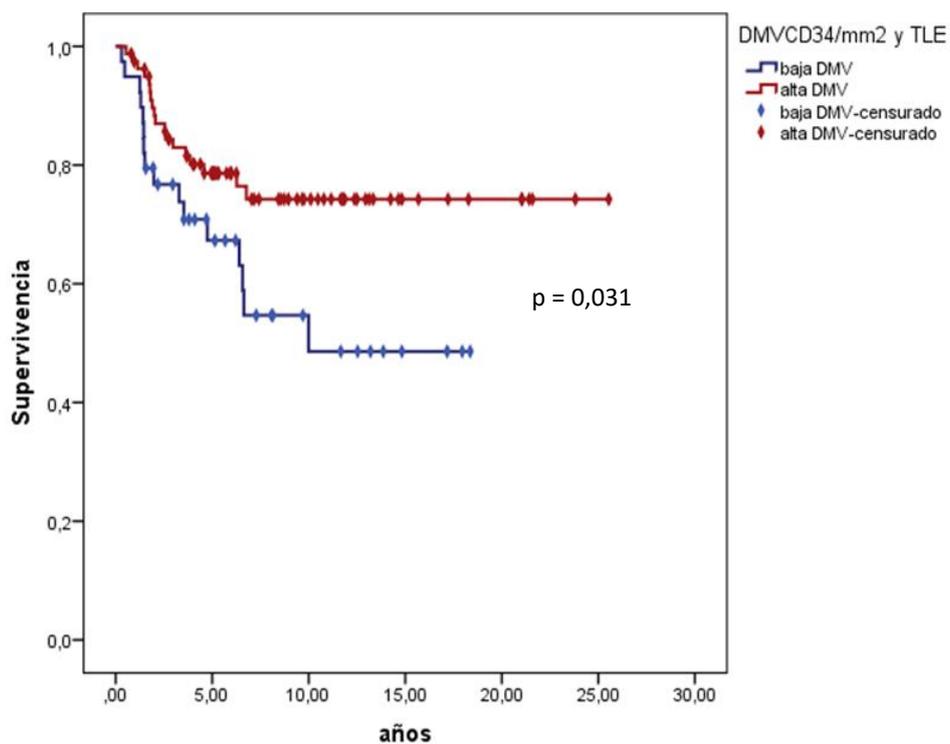


Figura 39: Relación DMV con CD34 con el TLE.

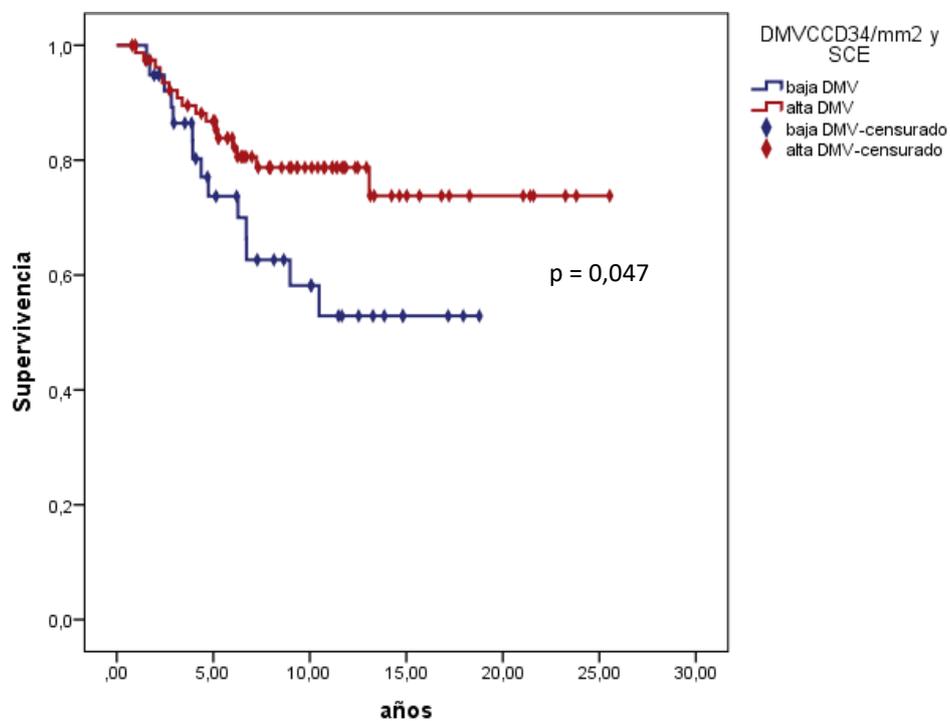


Figura 38: Relación DMV con CD34 con la SCE.

5.3.2. CD31 (PECAM-1)

Este marcador estuvo expresado en el 100% de la muestra, se evidenciaron diferencias significativas entre la DMV, el área y el diámetro de los vasos, con el mismo comportamiento que el CD34, es decir, mayor DMV empleando CD31 en pulmón sano con respecto al tumoral, pero menor área acumulada y diámetro ($p = 0,004$, $p = 0,011$ y $p = 0,033$, respectivamente) (Tabla 17).

Tabla 17: DMV, área acumulada y diámetro promedio de los casos con anti-CD31.

	DMV (nº/mm ²)	Área(µm/mm ²)	Diámetro(µm)
CD31			
Media (DE)	339,1 (181,3)	236,5 (96,3)	5,1 (0,7)
Mediana (rango)	302,7 (975,8)	215,4 (554,9)	5 (3,9)
CD31 benigno			
Media (DE)	378,3 (333,2)	154,5 (140,9)	4,7 (1)
Mediana (rango)	636,8 (995,4)	104,4 (399,5)	4,3 (3,1)

Se buscó la asociación de la DMV empleando CD31 con el resto de las variables clínicas y patológicas. Se mostró relación entre el GD con la DMV con CD31; ésta fue menor en el grado III con respecto al grado II y el I, siendo esta asociación estadísticamente significativa (Tabla 18).

Por otro lado, se correlacionó la DMV con CD31 con el conteo semicuantitativo de cada componente celular y se encontró solo correlación débil y negativa con el componente sólido ($r = -0,182$, $p = 0,048$).

Al igual que con la DMV con CD34 se buscó el punto de corte óptimo, el mismo coincidió con la media (339 vasos/mm²) y se relacionó con las diferentes variables clínicas y patológicas de la serie. Con las variables cualitativas se confirma la relación con el GD, sin encontrar alguna otra relación estadísticamente significativa (Tabla 19).

Tabla 18: Relación DMV con CD31 con las variables clínicas y patológicas.

	N=119	DMV CD31 Mediana (rango)	Valor p
Sexo	Hombre	321 (975,8)	0,385
	Mujer	260,2 (857,7)	
Edad	≤62	288,5 (795,1)	0,815
	>62	310,2 (975,8)	
Tabaquismo	No fumador	305,8 (592)	0,782
	Fumador o exfumador	303,9 (975,8)	
TNM	Tis	310,6 (552,5)	0,921
	T1a	310,2 (875,4)	
	T1b	287,1 (875,4)	
	T1c	298,1 (668,1)	
Subtipo ADC	AIS	310,6 (552,5)	0,423
	MIA	333,9 (829,2)	
	ADC lepidico	300,1 (860)	
	ADC acinar	374,2 (875,4)	
	ADC papilar	319,3 (153,4)	
	ADC micropapilar	215,8 (351,7)	
	ADC sólido	252 (538,6)	
GD	Grado I	338,8 (911,6)	0,016
	Grado II	332,4 (875,4)	
	Grado III	250,4 (582,9)	
GN	Grado 1	319,3 (911,6)	0,449
	Grado 2	296,9 (921,9)	
	Grado 3	275,5 (526,5)	
Mitosis	≤6	310,4 (975,8)	0,325
	>6	273,2 (877,6)	
IL	Ausente	310,4 (975,8)	0,410
	Presente	277,8 (795,1)	
IV	Ausente	292,2 (975,8)	0,932
	Presente	314,4 (875,4)	
Necrosis	Ausente	319,3 (911,6)	0,173
	Presente	271,5 (921,9)	
VEGF	Ausente	305,9 (860)	0,804
	Presente	302,7 (931,5)	

Tabla 19: Relación entre DMV con CD31 y las variables clínicas y patológicas.

	N=119	Baja DMVCD31	Alta DMVCD31	Valor p
Sexo	Hombre	51 (55,4)	41 (44,6)	0,166
	Mujer	19 (70,4)	8 (29,6)	
Edad	≤62	38 (61,3)	24 (38,7)	0,569
	>62	32 (56,1)	25 (43,9)	
Tabaquismo	No fumador	13 (65)	7 (35)	0,538
	Fumador o exfumador	57 (57,6)	42 (42,4)	
Subtipo ADC	AIS	4 (57,1)	3 (42,9)	0,341
	MIA	4 (50)	4 (50)	
	ADC lepidico	10 (55,6)	8 (44,4)	
	ADC acinar	24 (49)	25 (51)	
	ADC papilar	4 (80)	1 (20)	
	ADC micropapilar	2 (66,7)	1 (33,3)	
	ADC sólido	22 (75,9)	7 (24,1)	
TNM	Tis	4 (57,1)	3 (42,9)	0,897
	T1a	12 (52,2)	11 (47,8)	
	T1b	29 (61,7)	18 (38,3)	
	T1c	25 (59,5)	17 (40,5)	
GD	Grado I	14 (50)	14 (50)	0,042
	Grado II	28 (51,9)	26 (48,1)	
	Grado III	28 (75,7)	9 (24,3)	
GN	Grado 1	15 (55,6)	12 (44,4)	0,671
	Grado 2	44 (57,9)	32 (42,1)	
	Grado 3	11 (68,8)	5 (31,2)	
Mitosis	≤6	35 (56,5)	27 (43,5)	0,583
	>6	35 (61,4)	22 (38,6)	
IV	Ausente	54 (60,7)	35 (39,9)	0,480
	Presente	16 (53,3)	14 (46,7)	
IL	Ausente	52 (57,8)	38 (42,2)	0,683
	Presente	18 (62,1)	11 (37,9)	
Necrosis	Ausente	31 (54,4)	26 (45,6)	0,346
	Presente	39 (62,9)	23 (37,1)	
VEGF	Ausente	31 (56,4)	24 (43,6)	0,613
	Presente	39 (60,9)	25 (39,1)	

En la Fig. 40 se muestra ejemplos de la expresión de anti-CD31 en tejido pulmonar sano y tejido tumoral.

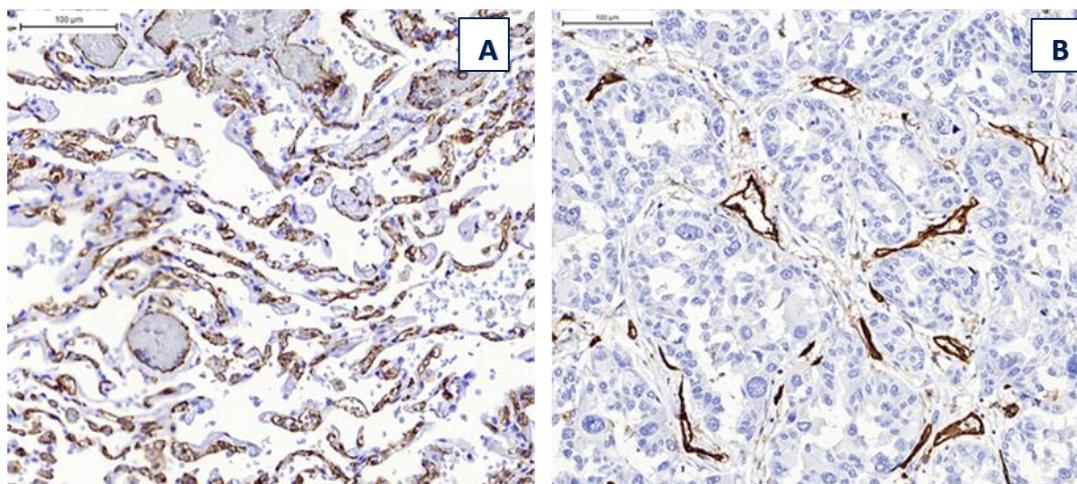


Figura 40: Expresión del marcador anti-CD31: tejido pulmonar indemne de tumor (A), ADC de pulmón (B). IHQ-CD31 200x

Se realizó el análisis de Kaplan-Meier con la expresión de “alta DMV con CD31” y “baja DMV con CD31”, comparando ambas curvas con el método de log-rank. Los tumores con una “baja DMV con CD31” condicionaron un pronóstico significativamente mejor (Tabla 20, Fig. 41-42).

Tabla 20: Relación DMV con CD31 con el TLE y la SCE.

Tiempo	TLE		SCE	
	baja DMVCD31	alta DMVCD31	baja DMVCD31	alta DMVCD31
1 año	97,1%	93,8%	100%	97,9%
2 años	90%	73,9%	95,7%	95,6%
5 años	82%	64%	84,8%	79,7%
10 años	73,1%	54,9%	79,9%	61,1%
	p=0,028		P=0,050	

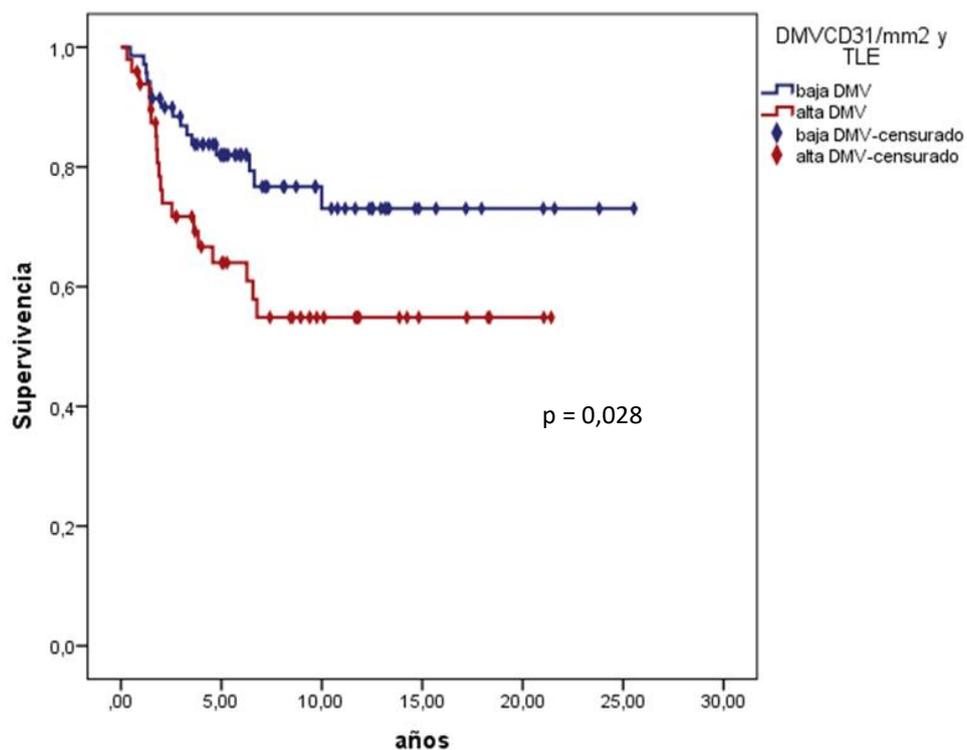


Figura 41: Relación DMV con CD31 con el TLE.

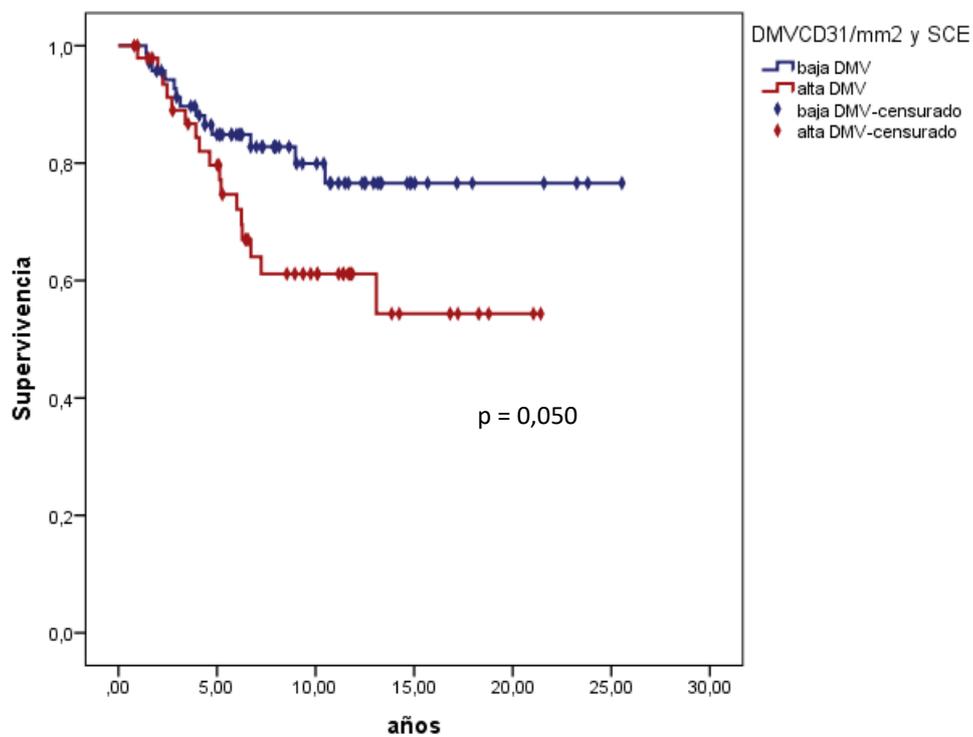


Figura 42: Relación DMV con CD31 con la SCE.

5.3.3. CD105 (Endogлина)

Con el marcador CD105 o endogлина se analizaron 115 muestras del ADC de pulmón, de las cuales el 87,8% de los casos (101) fueron positivos (Fig. 43). En la tabla 21 se expresa la DMV/mm², el área acumulada teñida y el diámetro promedio de los vasos. Del mismo modo que con los marcadores anteriores, se analizó este marcador en muestras de pulmón sin patología tumoral, siendo su expresión negativa en todos los casos.

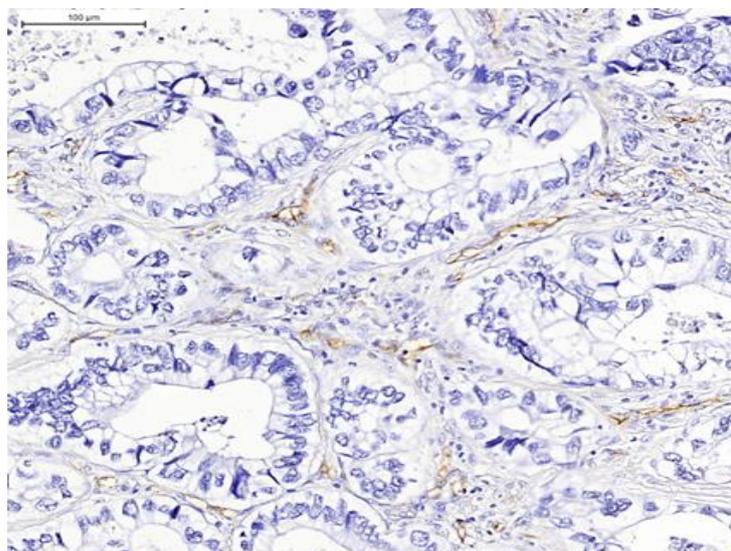


Figura 43: Expresión inmunohistoquímica de anti-CD105 en ADC de pulmón. IHQ-CD105 200x.

Tabla 21: DMV, área acumulada y diámetro promedio de los vasos con anti-CD105.

CD105	DMV (nº/mm ²)	Área(μm/mm ²)	Diámetro(μm)
Media (DE)	243,1 (215,1)	147 (109,3)	4,7 (2)
Mediana (rango)	187,7 (1035,9)	119,7 (463,5)	4,9 (10)

Se buscó asociación estadística de las características clínicas y patológicas con la DMV con CD105, sin encontrar ninguna relación (Tabla 22).

Igualmente, se buscó el punto de corte óptimo, el cual coincidió con la media y se relacionó con las variables clínicas y patológicas de la serie. A diferencia del análisis cuantitativo, se encontró asociación estadística cercana a la significancia con el número de mitosis, la IL y el VEGF (Tabla 23).

Tabla 22: Relación DMV con CD105 con las características clínicas y patológicas.

	N=115	DMV CD105 Mediana (rango)	Valor p
Sexo	Hombre	191,6 (1035,9)	0,163
	Mujer	169,3 (955,2)	
Edad	≤62	184,5 (955,17)	0,425
	>62	191,2 (1035,9)	
Tabaquismo	No fumador	186,4 (1035,9)	0,745
	Fumador o exfumador	187,7 (894,6)	
Subtipo ADC	AIS	145 (532,5)	0,855
	MIA	198,7 (762,8)	
	ADC lepidico	167,1 (890,7)	
	ADC acinar	188,4 (718,3)	
	ADC papilar	224,8 (1035,9)	
	ADC micropapilar	181,1 (289,3)	
	ADC sólido	198,4 (955,2)	
TNM	Tis	145 (532,5)	0,611
	T1a	175,9 (532,5)	
	T1b	184,5 (1035,9)	
	T1c	193,7 (894,6)	
GD	Grado I	165,7 (762,8)	0,425
	Grado II	190 (1035,9)	
	Grado III	193,9 (955,2)	
GN	Grado 1	167,9 (1035,9)	0,845
	Grado 2	185,5 (955,2)	
	Grado 3	201,4 (431,8)	
Mitosis	≤6	188,5 (1035,9)	0,394
	>6	186,6 (642)	
IV	Ausente	186,6 (1035,9)	0,914
	Presente	190 (600,5)	
IL	Ausente	187,7 (1035,9)	0,824
	Presente	186,4 (955,2)	
Necrosis	Ausente	170,8 (1035,9)	0,361
	Presente	198,4 (955,2)	
VEGF	Ausente	184,4 (890,7)	0,111
	Presente	197,2 (1035)	

Tabla 23: Relación DMV con CD105 con las características clínicas y patológicas

CD105	N=115	Baja DMVCD105	Alta DMVCD105	Valor p
Sexo	Hombre	62 (69,7)	27 (30,3)	0,472
	Mujer	20 (76,9)	6 (23,1)	
Edad	≤62	43 (72,9)	16 (27,1)	0,701
	>62	39 (69,6)	17 (30,4)	
Tabaquismo	No fumador	14 (70)	6 (30)	0,887
	Fumador o exfumador	68 (74,6)	27 (25,4)	
Subtipo ADC	AIS	4 (66,7)	2 (33,3)	0,647
	MIA	4 (57,1)	3 (42,9)	
	ADC lepidico	15 (83,3)	3 (16,7)	
	ADC acinar	36 (76,6)	11 (23,4)	
	ADC papilar	3 (60)	2 (40)	
	ADC micropapilar	2 (66,7)	1 (33,3)	
	ADC sólido	18 (62,1)	11 (37,9)	
TNM	Tis	4 (66,7)	2 (33,3)	0,986
	T1a	16 (72,2)	6 (27,3)	
	T1b	34 (72,3)	13 (27,2)	
	T1c	28 (70)	12 (28,7)	
GD	Grado I	19 (73,1)	7 (26,9)	0,566
	Grado II	39 (75)	13 (25)	
	Grado III	24 (64,9)	13 (35,1)	
GN	Grado 1	17 (68)	8 (32)	0,623
	Grado 2	52 (70,3)	22 (29,7)	
	Grado 3	13 (81,2)	3 (18,8)	
Mitosis	≤6	38 (63,3)	22 (36,7)	0,063
	>6	44 (80)	11 (20)	
IV	Ausente	62 (71,3)	25 (28,7)	0,987
	Presente	20 (71,4)	8 (28,6)	
IL	Ausente	58 (66,7)	29 (33,3)	0,058
	Presente	24 (85,7)	4 (14,3)	
Necrosis	Ausente	39 (72,2)	15 (27,8)	0,838
	Presente	43 (70,5)	18 (29,5)	
VEGF	Negativo	44 (80)	11 (20)	0,063
	Positivo	38 (63,3)	22 (36,7)	

Se realizó el análisis de supervivencia tanto para el TLE como para la SCE. Se objetivó un pronóstico significativamente mejor en los tumores con una “baja DMV con CD105” (Tabla 24 y Fig. 44-45).

Tabla 24: Relación DMV con CD105 con el TLE y la SC.

Tiempo	TLE		SCE	
	baja DMVCD105	alta DMVCD105	baja DMVCD105	alta DMVCD105
1 año	97,5%	87,9%	98,8%	97%
2 años	89,9%	69,7%	97,5%	87,8%
5 años	81,5%	59,9%	88,1%	64%
10 años	72,2%	50,7%	78,1%	54,8%
	p=0,005		p=0,019	

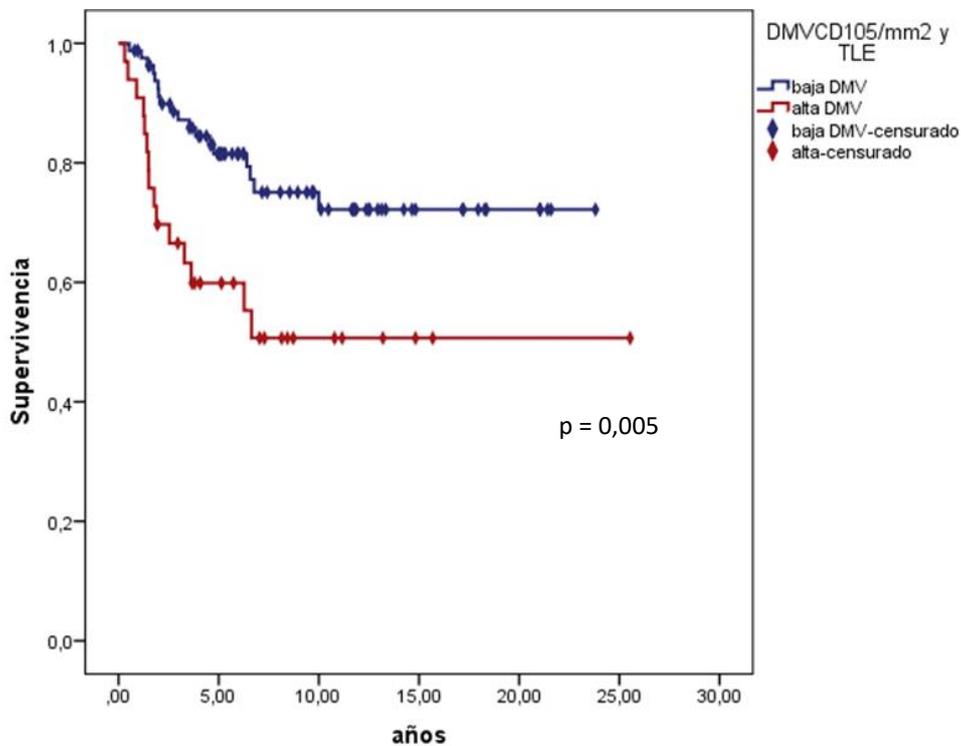


Figura 44: Relación DMV con CD105 con el TLE.

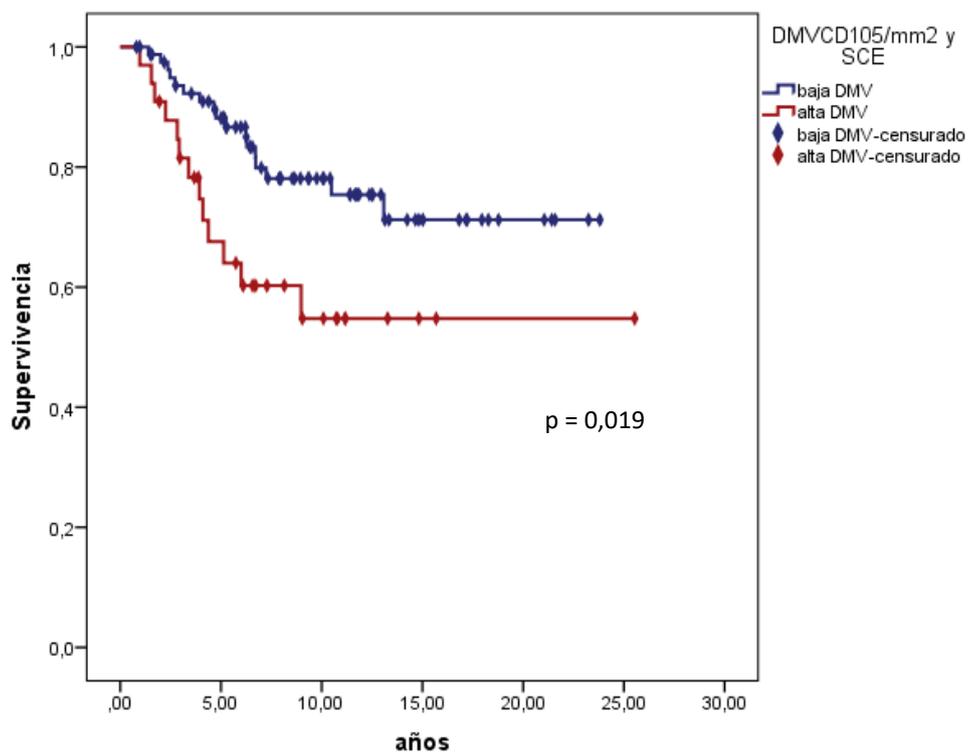


Figura 45: Relación DMV con CD105 con la SCE.

5.3.4. Valor predictivo de los marcadores de angiogénesis

Para valorar la capacidad predictiva de cada marcador de angiogénesis en el pronóstico, tanto en la recidiva tumoral como en la mortalidad por cáncer, se estimó el área bajo la curva (ABC) por medio de un análisis ROC (Fig. 46-53).

En nuestro análisis, dicha capacidad predictiva solo fue significativa en el caso de la DMV con CD105, pero con una baja exactitud (62,5% y 62,1% respectivamente) (Tabla 25).

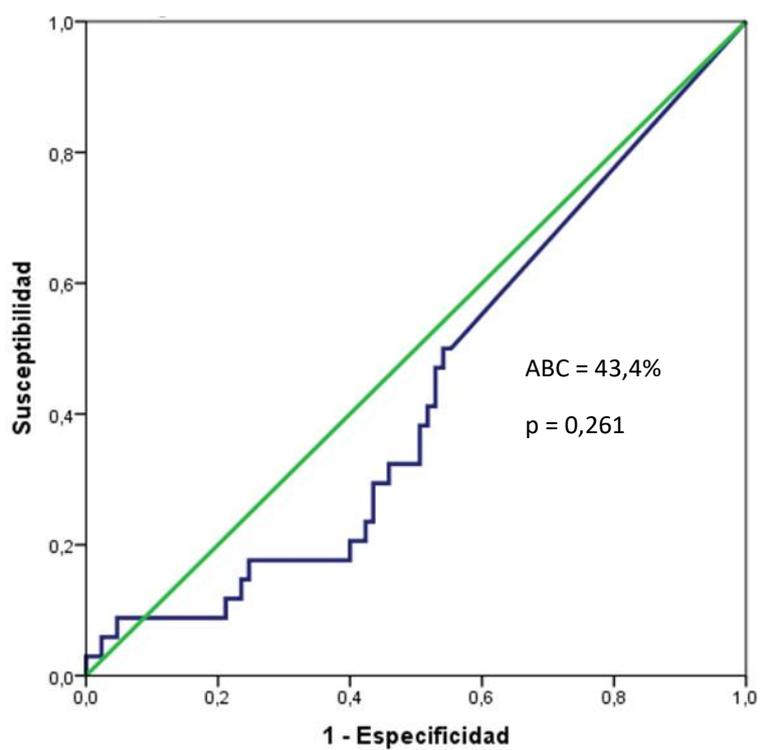


Figura 47: Curva ROC: anti-VEGF y recidivas tumorales.

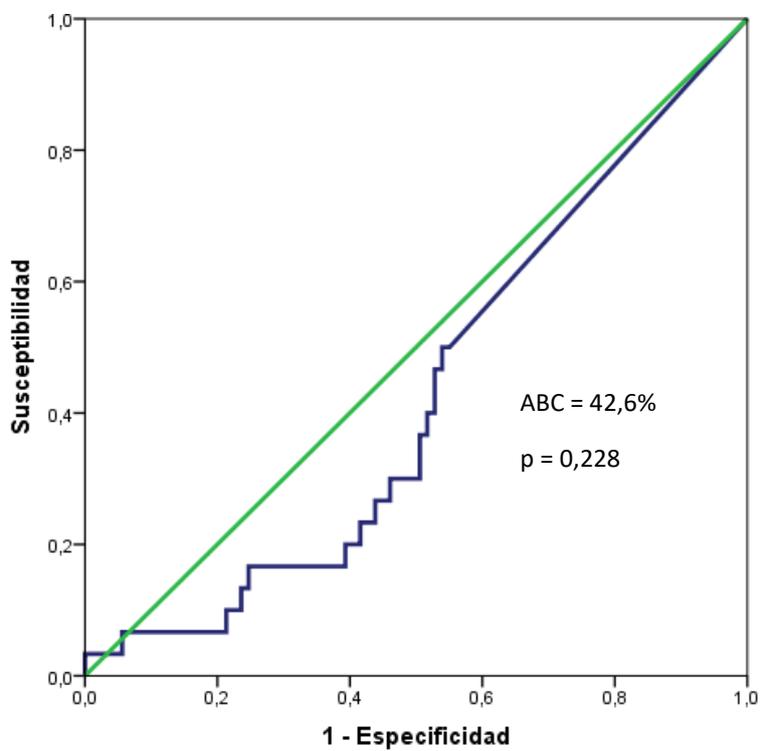


Figura 46: Curva ROC: anti-VEGF y mortalidad cáncer específica.

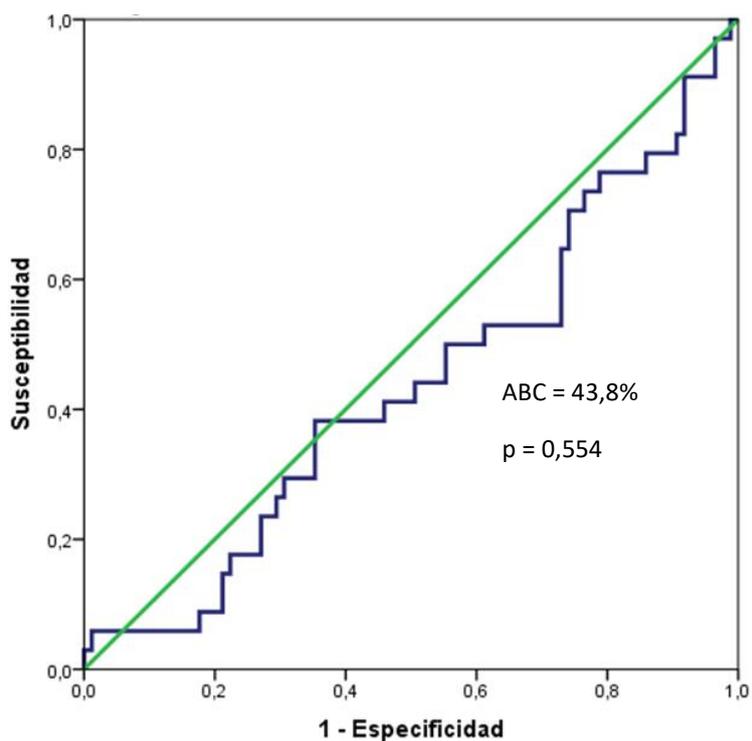


Figura 49: Curva ROC: DMV con anti-CD34 y recidivas tumorales.

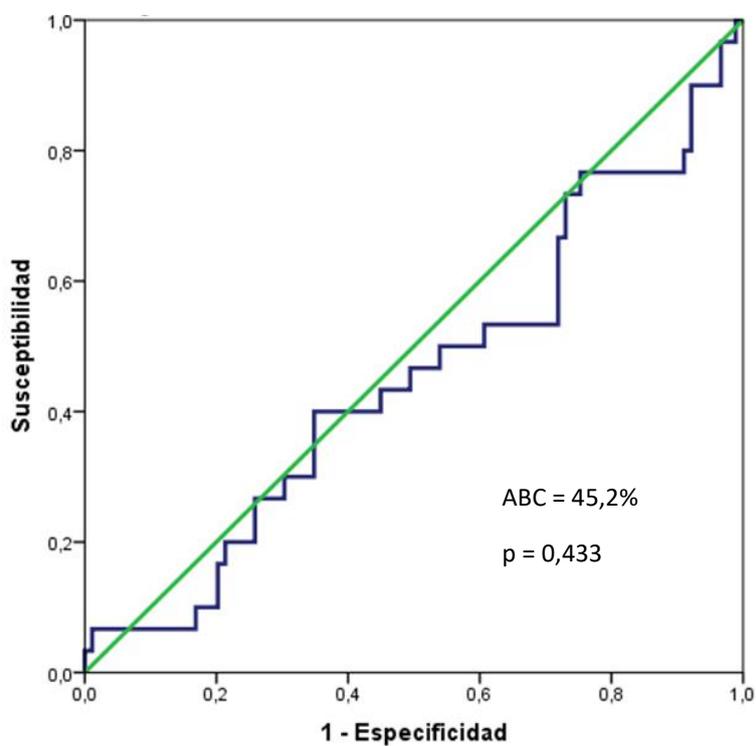


Figura 48: Curvas ROC: DMV con anti-CD34 y mortalidad cáncer específica.

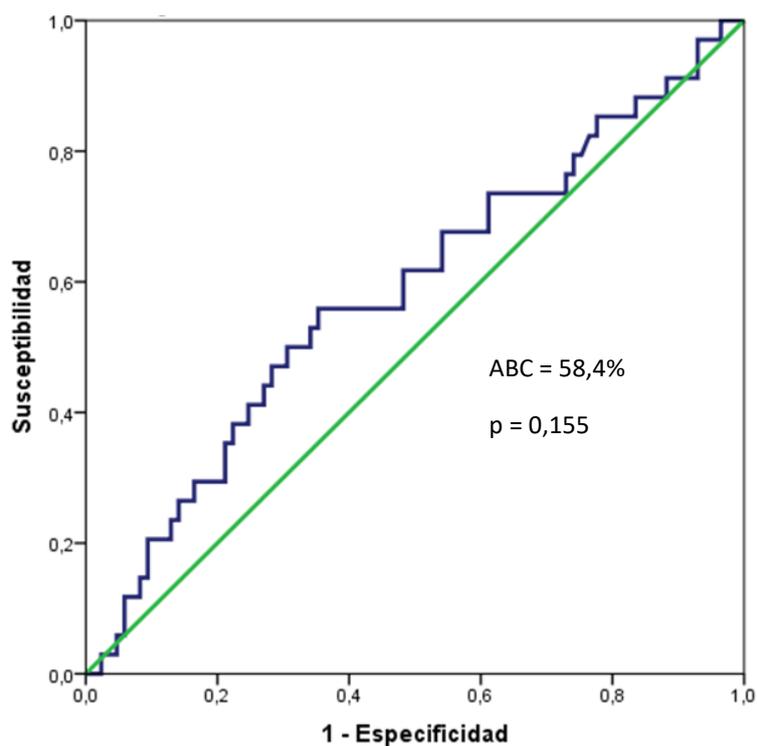


Figura 51: Curva ROC: DMV con anti-CD31 y recidivas tumorales.

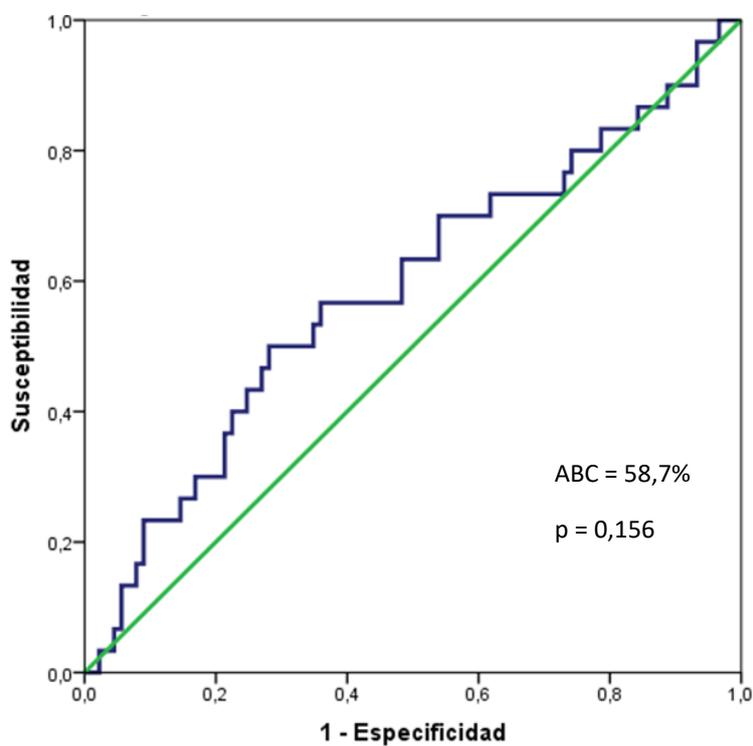


Figura 50: Curva ROC: DMV con anti-CD31 y mortalidad cáncer específica.

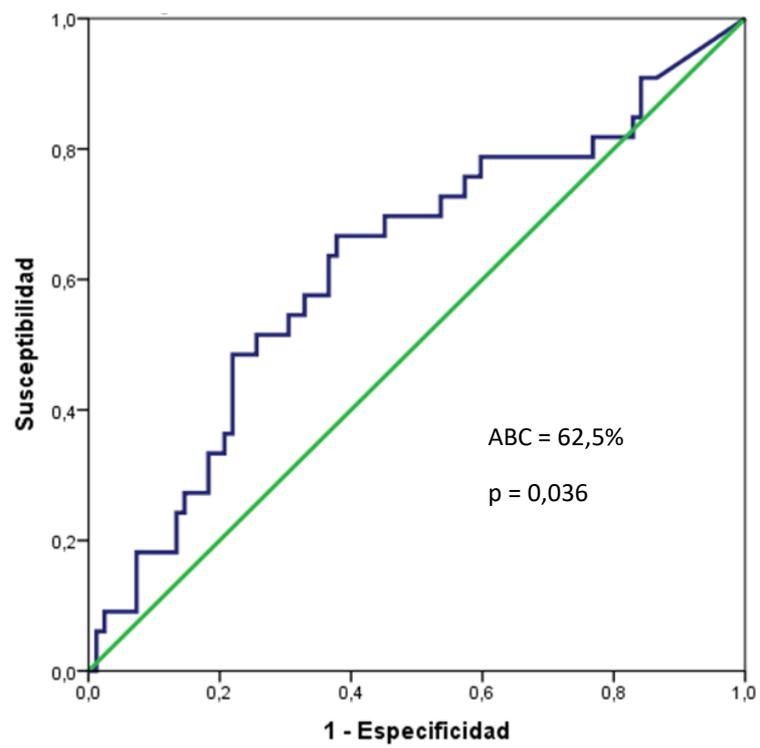


Figura 53: Curva ROC: DMV con CD105 y recidivas tumorales.

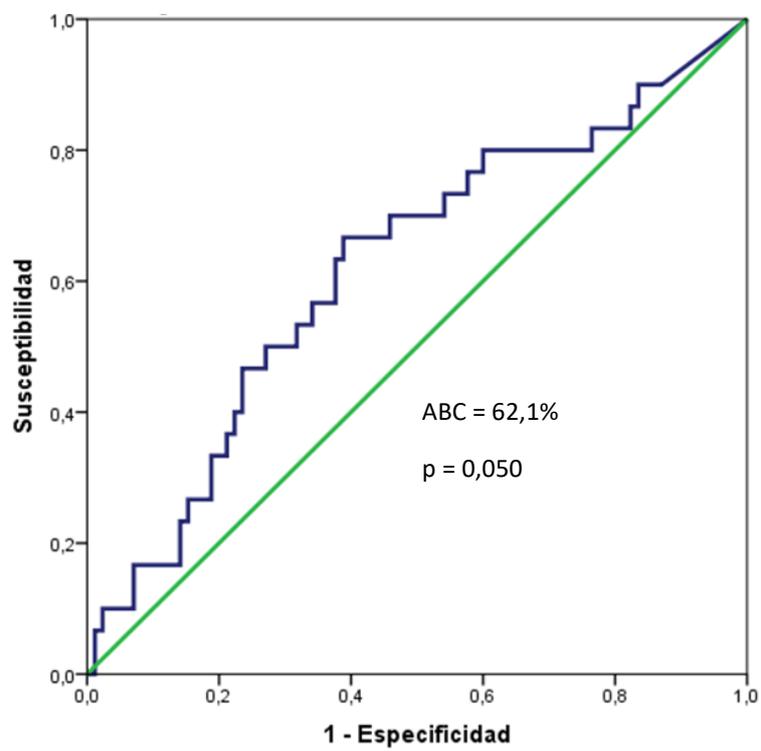


Figura 52: Curva ROC: DMV con CD105 y mortalidad cáncer específica.

Tabla 25: Valor predictivo de los marcadores de angiogénesis.

Marcador	Evento	ABC	IC 95%	Valor p
Anti-VEGF	Recidiva	0,434	0,323-0,545	0,261
	Mortalidad	0,426	0,314-0,539	0,228
CD34	Recidiva	0,438	0,322-0,554	0,554
	Mortalidad	0,452	0,329-0,575	0,433
CD31	Recidiva	0,584	0,467-0,700	0,155
	Mortalidad	0,587	0,463-0,711	0,156
CD105	Recidiva	0,625	0,508-0,742	0,036
	Mortalidad	0,621	0,501-0,740	0,050

Se decidió a partir de estos resultados establecer un “score”, que se denominó “**Angioscore**” que pudiera arrojar mejor información sobre el pronóstico de los pacientes. Para ello, se realizó, en primer lugar, un análisis univariante con cada marcador y, posteriormente, aquellos estadísticamente significativos fueron incluidos en el análisis multivariante usando el método de riesgo proporcional multivariante de Cox (Tabla 26 y 27).

Tabla 26: Análisis univariante de los marcadores de angiogénesis.

Marcador	HR	IC 95%	Valor p
VEGF	0,548	0,267-1,124	0,101
CD34	0,485	0,247-0,951	0,035
CD31	2,103	1,068-4,141	0,032
CD105	2,562	1,289-5,090	0,007

Tabla 27: Análisis multivariante de los marcadores CD34, CD31 y CD105.

	β	HR	IC 95%	Valor p
CD34	-1,256	0,285	0,131-0,620	0,002
CD31	1,705	5,502	2,392-12,657	0,000
CD105	1,300	3,671	1,753-7,687	0,001

La ecuación del modelo de regresión quedo establecida como sigue:

$$\text{ANGIOSCORE} = (\text{CD34} * -1,256) + (\text{CD31} * 1,705) + (\text{CD105} * 1,300)$$

Calculado el valor del “**Angioscore**” para cada paciente, la mediana del riesgo quedó establecida en 0,45 (rango 4,26), con un valor mínimo de -1,26 y un máximo de 3,01.

Su valor predictivo fue analizado con la curva ROC, obteniendo los resultados que se evidencian en la Tabla 28 y en las Fig. 54-55, donde se observa un valor predictivo mayor que el obtenido con cada marcador por separado y estadísticamente significativo.

Tabla 28: Valor predictivo del “Angioscore”.

	ABC	IC 95%	Valor p
Recidiva	0,748	0,638-0,857	0,000
Mortalidad	0,737	0,627-0,848	0,000

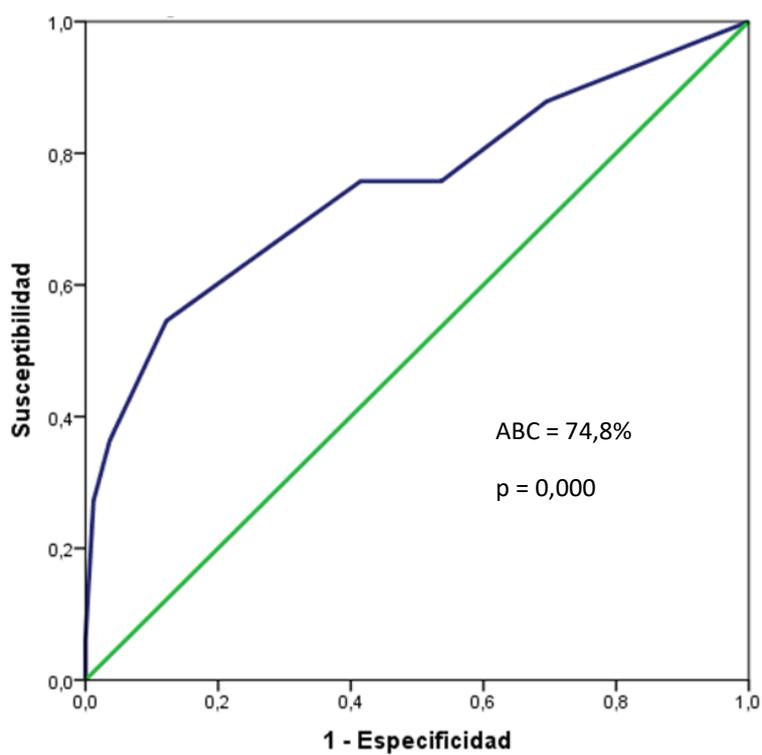


Figura 54: Curva ROC. "Angioscore" y recidiva tumoral.

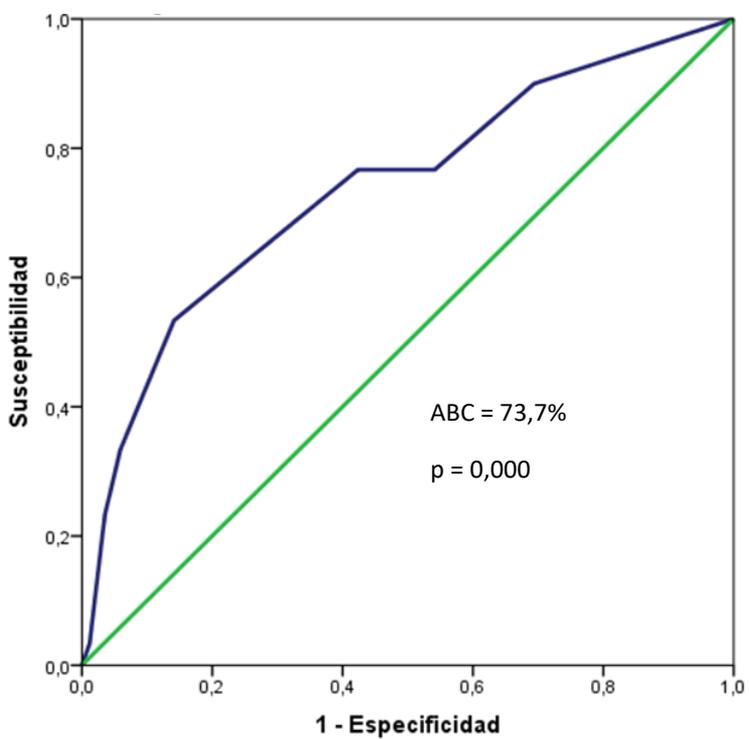


Figura 55: Curva ROC. "Angioscore" y mortalidad cáncer específica.

Se realizó, igualmente, el análisis de la curva ROC del “**Angioscore**” como predictor de recidivas cerebrales, pulmonares, loco-regionales y otras metástasis menos frecuentes agrupadas. Salvo en éstas últimas, los resultados fueron significativos como se exponen en la Tabla 29.

Tabla 29: Análisis ROC del “Angioscore” y el tipo de recidiva tumoral.

Recáidas	ABC	IC 95%	Valor p
Pulmonar	0,845	0,702-0,987	0,020
Cerebral	0,825	0,673-0,977	0,000
Loco-Regional	0,782	0,591-0,973	0,020
Otros	0,468	0,309-0,633	0,721

En las Figuras 56 y 57 se muestran las curvas ROC con respecto a las recidivas pulmonares y cerebrales.

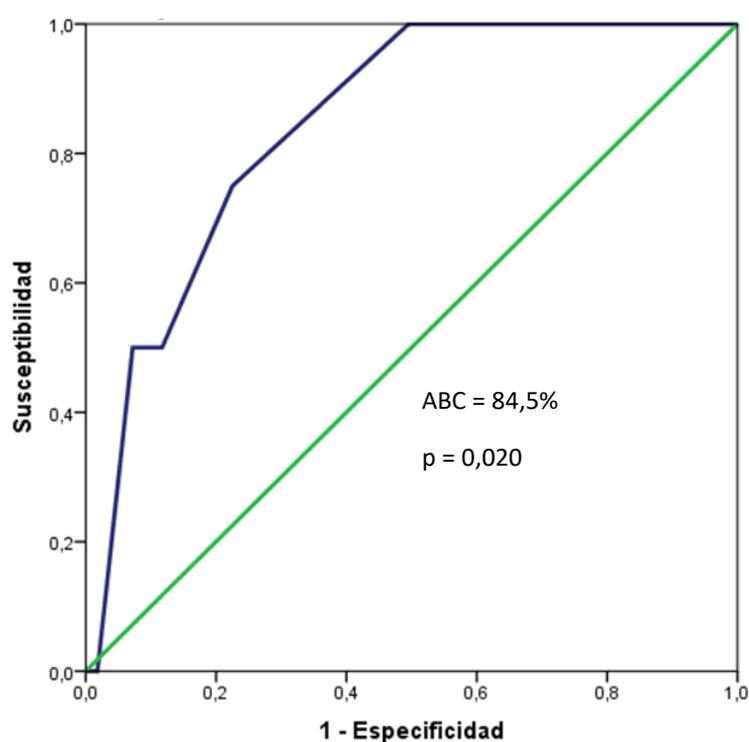


Figura 56: Curvas ROC “Angioscore” y recidiva pulmonar.

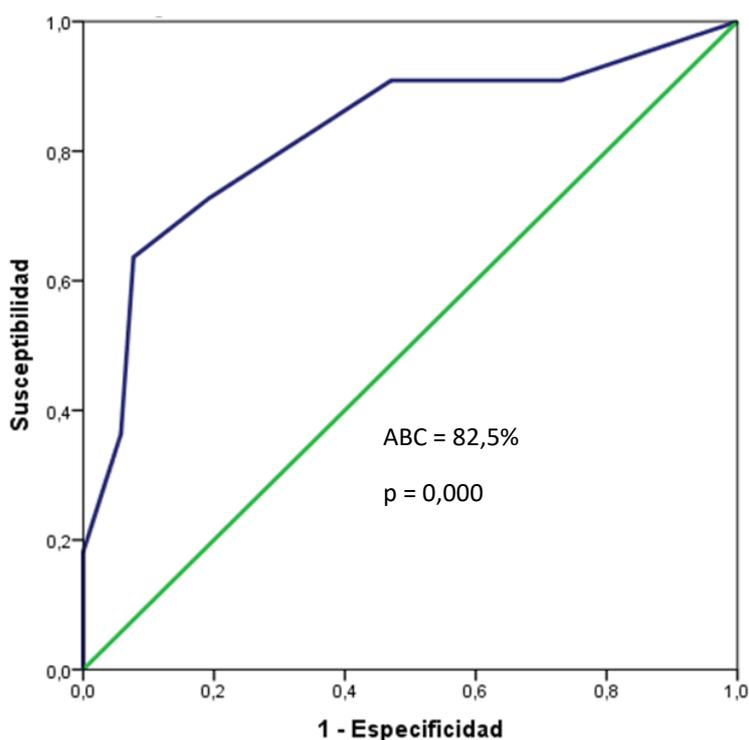


Figura 57: Curvas ROC “Angioscore” y recidiva cerebral.

El valor del riesgo obtenido mediante el “**Angioscore**” se dicotomizó, tomando como punto de corte la mediana, obteniendo 2 grupos, “bajo **Angioscore**” y “alto **Angioscore**”. En ambos grupos se aplicó el método de Kaplan-Meier para el análisis del TLE y la SCE y se compararon las curvas con el test de log-rank. Se objetivó una diferencia significativa en el pronóstico de ambos grupos (Tabla 30, Fig. 58-59).

Tabla 30: Relación “Angioscore” con el TLE y la SCE.

Tiempo	TLE		SCE	
	bajo Angioscore	alto Angioscore	bajo Angioscore	alto Angioscore
1 año	97,7%	85,7%	98,8%	96,4%
2 años	92,9%	56,9%	97,6%	85,6%
5 años	85%	44,6%	90,1%	52,9%
10 años	78,2%	29,7%	83,8%	32,6%
	p=0,000		p=0,000	

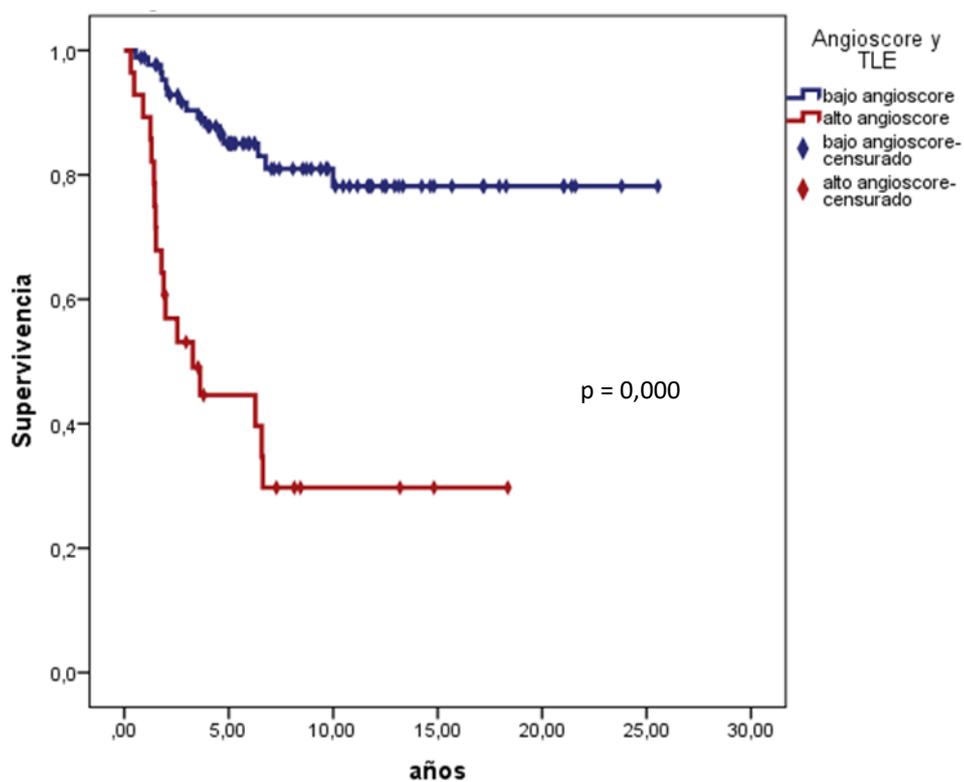


Figura 59: Curva de supervivencia, relación "Angioscore" con el TLE.

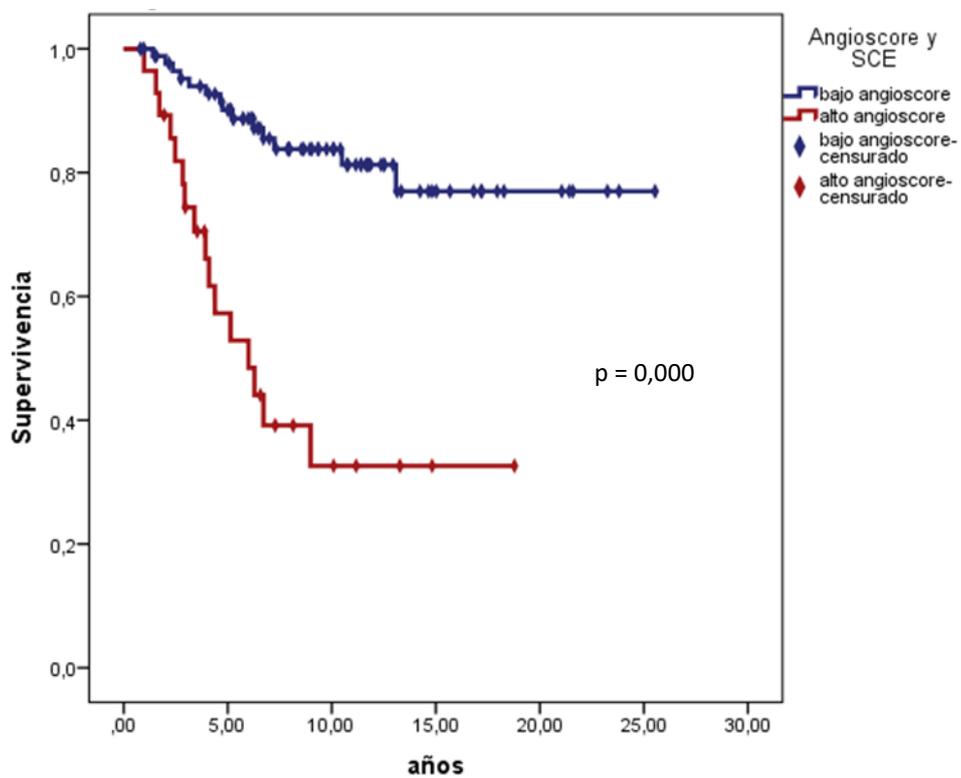


Figura 58: Curva de supervivencia, relación "Angioscore" con el SCE.

5.4. Análisis univariante y multivariante

Se analizaron las variables clínicas y patológicas como factores pronósticos en un modelo univariante de regresión de Cox, para el TLE y la SCE.

El TNM se dicotomizó en 2 variables agrupando los Tis y T1a comparados con los T1b y los T1c. Se valoró la presencia y ausencia de cada componente histológico. Los subtipos de ADC no se incluyeron de forma individual al estar agrupados en los GD según su arquitectura. Éstos a su vez se agruparon los grados I y II con respecto a los tipos más agresivos, sólido y micropapilar, asociados en el grado III. Por último, en el GN se unificaron los grados 2 y 3 para compararlo con respecto al grado menos agresivo. El GN y la necrosis tumoral condicionaron significativamente el TLE, limitando la significación el componente micropapilar, el cual sí que condicionó significativamente la SCE junto con la necrosis, limitando la significación el GN (Tabla 31).

Tabla 31: Análisis univariantes de las características clínicas y patológicas con el TLE y la SCE.

Variable	TLE			SCE		
	HR	IC95%	Valor p	HR	IC95%	Valor p
Sexo	0,770	0,335-1,769	0,537	0,720	0,294-1,764	0,473
Edad (≤62 vs >62)	1,111	0,567-2,178	0,759	1,048	0,511-2,147	0,898
Tabaquismo	1,069	0,441-2,592	0,882	1,177	0,449-3,086	0,740
TNM (Tis/mi/1a vs T1b/c)	1,794	0,742-4,334	0,194	1,521	0,621-3,723	0,358
Componente histológico						
Lepídico (Ausente/Presente)	0,671	0,336-1,341	0,258	0,756	0,364-1,570	0,453
Acinar	3,356	0,804-14,00	0,097	2,631	0,627-11,05	0,186
Papilar	0,568	0,173-1,864	0,351	0,712	0,215-2,353	0,577
Micropapilar	2,352	0,968-5,715	0,059	2,488	1,013-6,108	0,047
Sólido	1,260	0,640-2,482	0,505	1,399	0,682-2,870	0,360
GD (grado 1 y 2/grado 3)	1,015	0,495-2,082	0,968	1,094	0,512-2,339	0,816
GN (grado 1/grado 2 y 3)	3,634	1,111-11,89	0,033	3,017	0,915-9,948	0,070
Mitosis (≤6 vs >6)	0,841	0,427-1,656	0,617	0,658	0,317-1,368	0,263
IV	1,666	0,813-3,349	0,166	1,393	0,651-2,981	0,384
IL	1,297	0,620-2,714	0,490	1,286	0,588-2,812	0,529
Necrosis	2,645	1,263-5,540	0,010	2,520	1,153-5,506	0,020

Para valorar las variables que puedan ser factores pronósticos independientes se realizó el análisis multivariante de Cox con aquellas variables con $p \leq 0,25$. Las variables TNM, el componente acinar y el micropapilar, GD, GN, IL y necrosis se introdujeron en el modelo multivariable de Cox relacionado con TLE. Para la relación con la SCE las variables que se utilizaron en el modelo fueron el componente acinar y micropapilar, el GD, el GN y la necrosis. Los resultados se muestran en la Tabla 32, siendo las variables que entran en regresión como factores pronósticos independientes, el patrón micropapilar y la necrosis.

Tabla 32: Análisis multivariable de las características clínicas y patológicas con el TLE y la SCE.

Variable	TLE			SCE		
	HR	IC95%	Valor p	HR	IC95%	Valor p
Patrón micropapilar	3,890	1,495-10,12	0,005	3,370	1,339-8,484	0,010
Necrosis	3,433	1,557-7,568	0,002	2,995	1,340-6,694	0,008

En Fig. 60-63 se representa la curva de supervivencia de las variables que entraron en regresión.

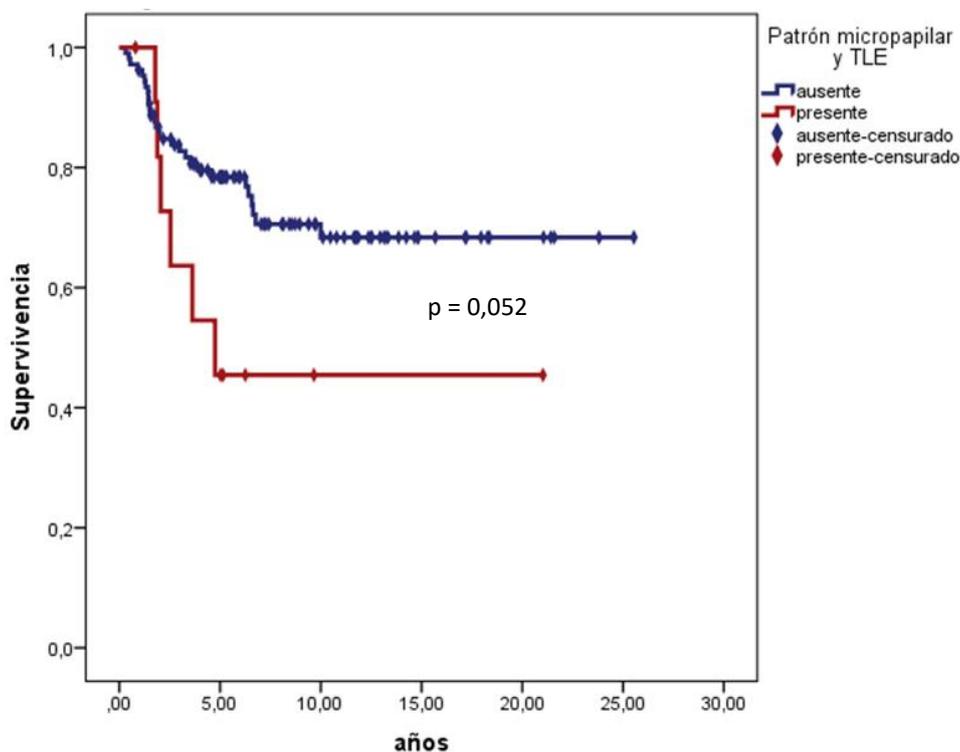


Figura 60: Curva de TLE relacionado con el componente micropapilar.

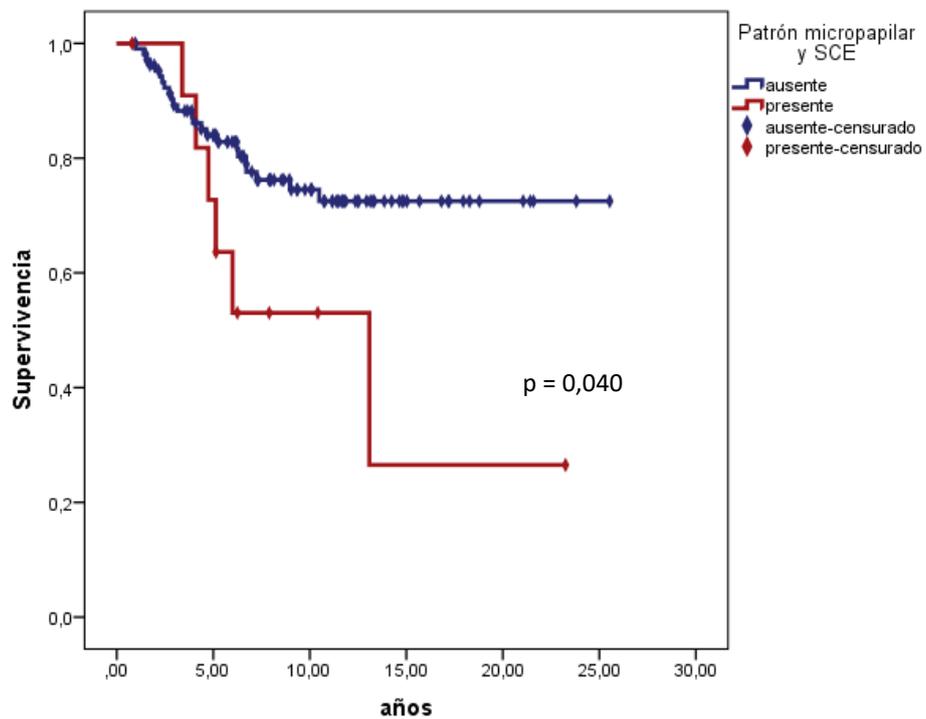


Figura 61: Curva de SCE relacionado con el componente micropapilar.

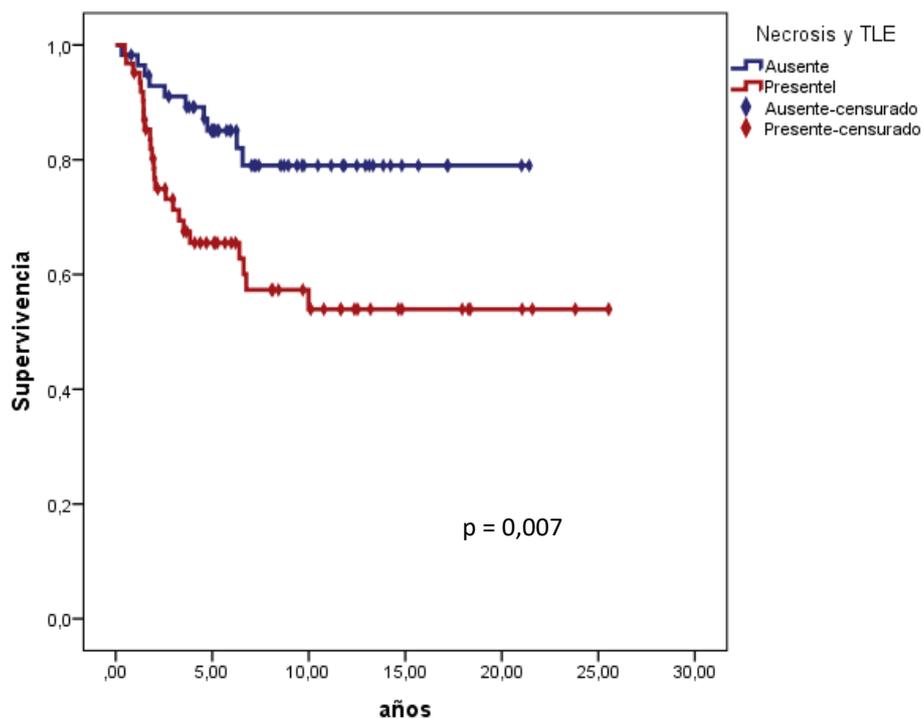


Figura 62: Curva de TLE relacionado con la necrosis tumoral.

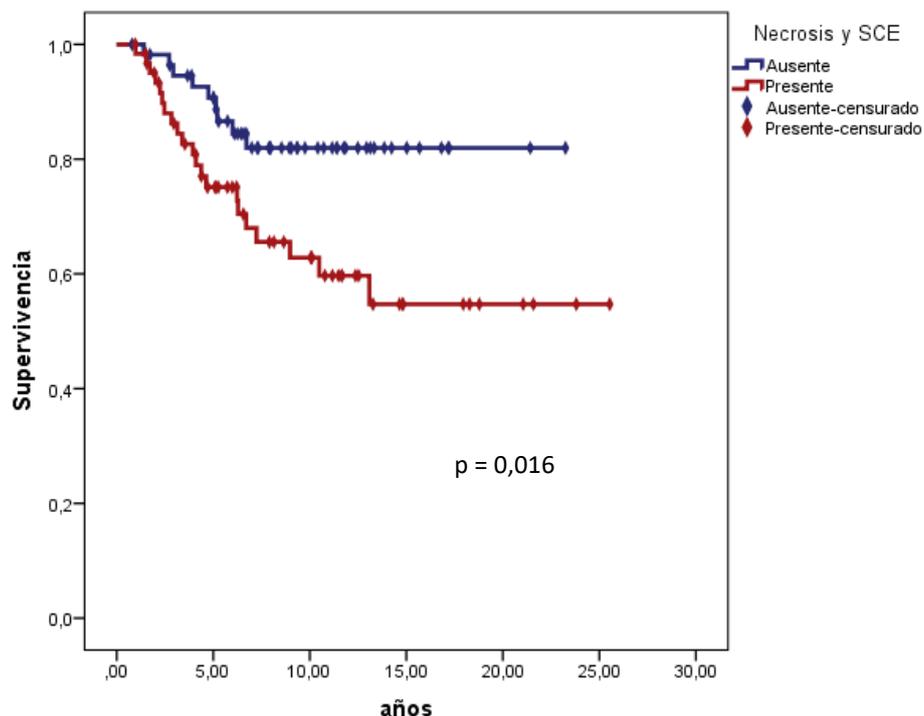


Figura 63: Curva de TLE relacionado con la necrosis tumoral.

Se decidió estudiar el patrón micropapilar y la necrosis junto con el “**Angioscore**” y se valoró, de esta forma, si son factores pronósticos independientes. El resultado en el análisis multivariante de Cox se muestra en la Tabla 33, siendo el “**Angioscore**” el único factor que entra en regresión como factor pronóstico independiente, tanto en el TLE como en la SCE.

Tabla 33: Análisis multivariable entre las características patológicas y el “Angioscore”.

Variable	TLE			SCE		
	HR	IC95%	Valor p	HR	IC95%	Valor p
“Angioscore”	5,748	2,878-11,481	0,000	5,169	2,507-10,657	0,000

DISCUSIÓN

6. *Discusión*

El CP es un serio problema de salud con un gran impacto tanto desde el punto de vista sanitario como socioeconómico. La gran complejidad y cantidad de factores implicados en su patogénesis, desarrollo y pronóstico hacen que continúe siendo un reto dado que es una enfermedad de mal pronóstico y con unas expectativas de supervivencia muy bajas. La cirugía es el tratamiento de elección en los estadios precoces de la enfermedad y es, en buena medida, la responsable de casi la totalidad de los pacientes que sobreviven a los cinco años.

En la actualidad, junto al aumento de la incidencia en la mujer y la aparición de este tumor en la población no fumadora, se ha objetivado un cambio en el patrón histológico, ya que en las últimas décadas el ADC ha desplazado al carcinoma epidermoide como estirpe histológica más frecuente.

Creemos de interés señalar que también se ha objetivado un cambio en la presentación del CP. Así, Leiro y cols.¹⁷⁵, en su estudio comparativo del CP en dos décadas, ha comprobado un mayor porcentaje de pacientes con diagnóstico en estadios localizados, esto lo atribuyen a un mayor acceso de la población a las especialidades médicas, a la implementación de circuitos rápidos de diagnóstico y a las nuevas técnicas de imagen, evidenciando un aumento significativo del CP como hallazgo incidental. Por otro lado, otro factor a tener en cuenta es la introducción de los programas de diagnóstico precoz. En un reciente estudio llevado a cabo por nuestro grupo se diagnosticaron 104 CP, siendo el diagnóstico histológico más frecuente el ADC, con un

79,5% del total de casos. El 79,8% de los pacientes fueron sometidos a resección quirúrgica, siendo el 63,8% de los tumores clasificados en estadio IA¹⁷⁶. Datos similares han sido observados en otros estudios de cribado¹⁷⁷⁻¹⁷⁹.

Aproximadamente, entre el 20 y el 75% de los pacientes sometidos a cirugía con intención curativa presentan recidiva durante su seguimiento con el consecuente impacto en la supervivencia^{180,181}. Este hecho está íntimamente relacionado con el estadio tumoral, siendo las tasas de fracaso mayor en los estadios avanzados de la enfermedad. Sin embargo, un número no despreciable de pacientes con tumores en estadios precoces fallecen por esta enfermedad. La tasa de recidiva en CPCNP en estadio I oscila entre el 10% y el 30% según los autores consultados^{22,28,29,31}. En este sentido, hay que recordar que las tasas de supervivencia a los cinco años comunicadas por la IASLC/ATS/ERS en los tumores T1a-b-cNOMO (Estadio IA1, IA2 y IA3) es del 90, 85 y 80%, respectivamente²⁷.

El ADC pulmonar se reconoce como una neoplasia muy variable y heterogénea en su patogénesis, su histología y su pronóstico^{32,34,35}, de aquí el interés acerca del impacto que los distintos subtipos histológicos del ADC pulmonar tienen en la supervivencia, incluso en tumores clasificados en el mismo estadio según la clasificación TNM^{36,44,119,182}.

En la actualidad, un gran desafío en el manejo de los pacientes con resección pulmonar por CPCNP es desarrollar nuevos marcadores que puedan ayudar a identificar sujetos con mayor riesgo de recidiva y mortalidad. En los últimos años, han aparecido líneas de investigación, no solo basadas en la propia lesión carcinomatosa tumoral, sino también en el estudio del estroma acompañante. En este sentido, se ha comprobado que el estudio de la angiogénesis juega un papel relevante, ya que está directamente implicada en el crecimiento y diseminación tumoral^{52,54,58,183}.

Este último punto ha sido el motivo de esta investigación en el que se han incluido una serie de 119 pacientes diagnosticados de ADC pulmonar localizados exclusivamente en el pulmón, sin afectación ganglionar o metastásica y clasificados en el estadio IA. Se analizó el impacto de la angiogénesis tumoral en el TLE y en la

supervivencia, junto a otros factores morfológicos tales como los distintos subtipos de ADC, el tamaño tumoral o de invasión, el GD, el GN, la IVM y la necrosis.

La evaluación de la angiogénesis tumoral en esta serie se investigó mediante la expresión del VEGF y la cuantificación, mediante morfometría, de la DMV por medio de los marcadores CD34, CD31 y CD105. Así mismo, se analizaron estas variables como factores pronósticos, se buscó el valor predictivo de cada uno de estos marcadores mediante la curva ROC y se realizó un sistema de puntuación (score) en busca de una mayor exactitud en la valoración de la angiogénesis como factor pronóstico.

En esta serie, limitada al estadio IA, y con un amplio período de tiempo de seguimiento, el 28,6% de los pacientes presentaron recidiva, de las cuales el 70,6% fueron metástasis a distancia, en su mayoría cerebrales, cifras similares a las informadas en otras publicaciones^{180,181}. La mediana de tiempo en la que aparecieron las recidivas en estos pacientes fue de 2 años, dato que coincide con Villar y cols.¹⁸¹, quienes describen tres picos de incidencia (a los 9 meses, 2 años y 4 años). La mediana de tiempo en la que ocurrieron los fallecimientos de los pacientes incluidos en este estudio fue de 4 años, resultados similares a los descritos en otras series españolas¹⁸⁴. El 25,2% de los pacientes fallecieron por esta enfermedad, describiéndose la SCE en el 99,1% al año, 82,7% a los 5 años y 72,1% a los 10 años, acorde con otras publicaciones^{27,31,184}. Sin embargo, la SG de la serie se estableció en el 97,5% al año y cae al 69,7% y al 47,2% a los 5 y 10 años, respectivamente. Esto podría explicarse por la mayor probabilidad de fallecer por otras causa distinta al tumor primario a partir de los 6 años, los denominados eventos competitivos, como exponen Jordá y cols.¹⁸⁵.

La bibliografía disponible en cuanto a papel de la angiogénesis tumoral en el CP es abundante. Igualmente, son innumerables los trabajos dedicados a la validación de la última edición de la estadificación tumoral, así como a la nueva clasificación del ADC pulmonar y su impacto en la supervivencia. Sin embargo, una de las limitaciones que presentan los estudios llevados a cabo hasta ahora al contrastar los resultados, es la inexistencia de investigaciones que evalúen el papel de la angiogénesis en el ADC pulmonar en estadio IA patológico. Se han consultado los trabajos de Yuang y cols.¹²⁶, Wang y cols.¹³² y Tsutani y cols.^{139,140} dedicados a la validación del descriptor T1 en ADC

en estadio IA, pero presentan la limitación de que los tumores fueron clasificados según el TNM clínico, y no patológico, incluyendo en estos estudios tumores con invasión de la pleura visceral, tumores clasificados como T2 y, por tanto, clasificados en el estadio IB patológico. Igualmente, Sakao y cols.¹⁸⁶ analizaron el impacto de los factores predictivos en la supervivencia en ADC en este estadio, pero igualmente desde una clasificación clínica, por lo que son incluidos pacientes en los que posteriormente se comprobó afectación ganglionar. Además, ninguno de estos estudios incluyó factores de angiogénesis en su análisis.

El análisis descriptivo de esta investigación refleja un poco la actualidad en el ADC de pulmón. La edad media, 61,6 años, se encontró en rango con lo descrito anteriormente en la literatura española^{106,175,184}. En este estudio, y coincidiendo con otros autores¹⁸⁷⁻¹⁸⁹, la edad del paciente no condicionó la supervivencia.

La relación hombre/mujer, que en la década de los años noventa del pasado siglo estaba establecida en una proporción de 10/1, ha ido decreciendo progresivamente. En esta serie, la relación observada fue de 3,4/1, comparable con otras publicaciones^{175,184}. Este dato es el resultado del incremento del tabaquismo en la mujer y, por consiguiente, el aumento de su diagnóstico en un 5,1%.^{12,175}. Como factor pronóstico, el sexo tampoco ha tenido impacto alguno en la evolución de los pacientes como han apuntado otros trabajos^{26,186,190}.

En el presente análisis solo el 16,8% de los pacientes no tenían antecedentes de tabaquismo. Estudios recientes publicados en nuestro país arrojan tasas de incidencia similares^{175,191}. Coincidiendo con Subramanian y cols.¹⁷ y con Meguid y cols.¹⁹², en trabajos desarrollados en la valoración del impacto del tabaquismo en la supervivencia del CP, tampoco se objetivó influencia pronóstica en estas series.

En lo que respecta a la resección quirúrgica, aportaciones recientes comienzan a proponer resecciones segmentarias anatómicas para los ADC menores de 2 cm periféricos^{193,194}, sin embargo, la lobectomía sigue siendo el tratamiento estándar en este tipo de tumor^{193,195}. Esta es la resección más frecuente en los pacientes incluidos en esta serie, representando el 93,3% de las exéresis practicadas.

En la actualidad, la estadificación basada en el TNM es la forma de estratificar a los pacientes para el manejo terapéutico y para la predicción del pronóstico. La última edición del TNM presenta grandes cambios, en especial para el ADC en estadios precoces, donde incluye el estadio 0 para los tumores Tis. El estadio IA, configurado por tumores con un diámetro máximo de 3 cm, se subdivide en tres subgrupos separados de centímetro en centímetro, estadio IA1, IA2 y IA3. El diámetro tumoral viene determinado por el tamaño de la invasión en lugar del tamaño total del tumor^{123,132,133,137}. En el presente trabajo se obtuvo un tamaño tumoral total medio de 21,9 mm, mientras que el tamaño de la invasión fue de 16,9 mm, resultados equiparables a los comunicados por Tsutani y cols¹³⁹.

Coincidiendo con los resultados recogidos en la nueva clasificación TNM²⁷, en esta población de estudio el estadio IA2 fue el más frecuente, 39,5%, seguido por el estadio IA3, 35,3%. Sin embargo, y a diferencia de lo comprobado por otros autores^{123,131,134,184}, no se objetivó que los subtipos de estadio IA propuestos en la 8ª clasificación del TNM²⁷ hayan influido en el TLE, así como en la SCE.

Al igual que lo referido en otras publicaciones^{124,196}, el componente acinar fue el más frecuente de los patrones morfológicos observados, 84,9%, siendo el subtipo más frecuente como patrón predominante (41,1%). Por el contrario, el subtipo micropapilar fue el menos común como patrón predominante (2,5%). La presencia de este último patrón se ha descrito entre el 9,5 y el 60,4% de los casos^{125,197}. En esta investigación se encontró este patrón en el 10,1% de los ADC. Se consiguió comprobar que la presencia de componente micropapilar favoreció la aparición de metástasis, estando en el límite de la significación estadística ($p = 0,059$). Igualmente, este patrón micropapilar condicionó de forma significativa la SCE ($p = 0,047$). Cuando se realizó el análisis multivariante de Cox fue la primera variable que entró en regresión, con una HR de 3,9 para el TLE y de 3,4 para la SCE.

Este patrón histológico micropapilar fue descrito por primera vez en el ADC de pulmón por Amin y cols.¹⁹⁸, en el año 2002, informando de un peor pronóstico de los ADC con dicho patrón. Más tarde, Miyosi y cols.¹⁹⁷ y Maeda y cols.¹⁹⁹, ratificaron estos hallazgos, encontrando asociación entre este componente y la invasión angiolinfática, la

carcinomatosis pleural, las metástasis a distancia y, consecuentemente, una peor supervivencia. En la actual clasificación, este patrón histológico se ha introducido y ha sido catalogado por varios autores como componente de mal pronóstico^{34,36,119,124}. Estudios más recientes confirman el mal pronóstico de este componente histológico, incluso por la presencia de mínimas proporciones y no por el hecho de ser el componente predominante^{125,128,200,201}, como se estableció en el presente estudio reafirmando este hallazgo.

Otras características histopatológicas están menos estandarizadas en las diferentes publicaciones consultadas. El GD aún no se encuentra bien establecido en el ADC³², aunque en los últimos estudios se ha relacionado con el patrón arquitectural predominante, como fue descrito anteriormente. El grupo moderadamente diferenciado, GDII, configurado por los tumores acinar y papilar, fue el más frecuente en esta serie, coincidiendo con otros autores^{33,119}. Contrariamente a lo comunicado por Yoshizawa y cols.^{119,122}, no se encontró relación entre el GD y la evolución de los pacientes.

En cuanto al GN no existen criterios lo suficientemente objetivos para llegar a establecer un sistema de gradación normalizado^{152,155}. El esquema que ha mostrado relación como factor pronóstico es el método descrito por Barletta y cols.¹⁴⁹, utilizado en este estudio. Al igual que el GD, el GN más común fue el grado 2. En este trabajo los tumores clasificados como G1 frente a los G2/3 mostraron una probabilidad significativamente menor de desarrollar metástasis ($p = 0,033$), limitando la significación estadística ($p = 0,070$) con respecto a la SCE.

En cuanto al número de mitosis, con una mediana de 6 en esta serie, no se objetivó impacto alguno en la evolución de los pacientes, coincidiendo con lo señalado por Barletta y cols.¹⁴⁹ y Kadota y cols.¹⁵².

La IVM es muy variable en cuanto a su valoración. Algunos estudios la analizan en conjunto, tanto la IV como la IL, mientras que otros la analizan por separado. En este trabajo se decidió valorar por separado la IV y la IL, encontrando presencia de IV en el 25,2% de los casos, y la presencia de IL el 24,4% de los casos. En un amplio metaanálisis

llevado a cabo por Wang y cols.¹⁴⁶, en el CP la presencia de IV osciló entre el 6 y el 77%, comportándose como un factor pronóstico independiente. En cuanto a la IL, la incidencia oscila entre el 15 y el 36%^{165,166}. Wang y cols.²⁰², también han llevado a cabo un metaanálisis en el que la presencia de IL se objetivó entre un 3 y 71% de los tumores analizados, siendo también un factor pronóstico determinante. En el actual estudio, sin embargo, ninguno de los dos factores condicionó la supervivencia.

Por último, la presencia de necrosis tumoral en el presente trabajo fue de 52,1%, porcentaje elevado en comparación con otras investigaciones realizadas en el mismo estadio, en las que oscila entre el 12 y el 27%^{147,164}. Es de destacar que la presencia de necrosis representó peor pronóstico con una HR de 3,4 para el TLE y de 3 para la SCE. Esta observación coincide con lo comunicado por Park y cols.¹⁴⁷, Fan y cols.¹⁶⁴ y Swinson y cols.¹⁶⁸ en estadios precoces de CPCNP.

6.1. VEGF en el ADC de pulmón

En cuanto a la angiogénesis tumoral, objetivo principal del presente estudio, la familia del VEGF, en especial el VEGFA, está descrita como el factor proangiogénico más importante^{64,66,203,204}. Su papel como factor pronóstico ha sido estudiado desde hace muchos años, siendo éste controvertido. Algunos estudios informan de una relación entre sobreexpresión del VEGF y peores resultados en la enfermedad tumoral, especialmente en el ADC²⁰⁴⁻²⁰⁸. Por el contrario, hay otros estudios que no encuentran esta relación^{41,209-212}.

La expresión del VEGF en el CPCNP se describe con una incidencia comprendida entre el 15 y el 96% por IHQ^{41,203-205,207-211,213,214}. En el ADC de pulmón, ésta se ha descrito en un porcentajes comprendido entre un 54 y el 89%^{41,203,205,206,208,213,214}.

En el presente estudio se encontró una expresión del VEGF en el 53,8% de los tumores. Se relacionó con las distintas variables clínicas y patológicas y se encontró una

mayor proporción de VEGF en la mujer. Se comprobó que el 77,8% de estas pacientes presentaron VEGF positivo, mientras que solo se confirmó en el 46,7% de los hombres. Esta relación no ha sido comunicada anteriormente en otras publicaciones^{41,205,214,215}.

Igualmente, se objetivó una correlación débil y negativa con el tamaño de la invasión, en contraste con el tamaño tumoral total donde no hubo ninguna correlación. Del mismo modo, se relacionó con el TNM y se encontró una asociación cercana a la significación estadística, con menor expresión positiva del anticuerpo en pacientes T1c. Algunos estudios afirman la relación del tamaño tumoral con la expresión del VEGF, pero éstos no lo describen dentro de los subgrupos del estadio IA.

Donnem y cols.²¹⁶, analizaron el tamaño tumoral con la expresión del VEGF y su relación con la supervivencia en el CPCNP, encontrando que el VEGF es un factor pronóstico en los tumores T2, es decir, aquellos con un tamaño mayor de 3 cm, para luego ser un factor incluso protector en los tumores mayores de 7 cm (T3 en la 7ª edición), mientras que, en los tumores menores de 3 cm no encontraron relación estadísticamente significativa. Seto y cols.²¹⁷, al igual que Ohta y cols.²⁰⁸, encontraron una mayor expresión de VEGF en los pacientes con tumores T2, mientras que en el análisis de supervivencia del VEGF, donde se incluyeron todos los pacientes en el estadio I (T1-T2), encontraron peor pronóstico. Mineo y cols.²⁰⁷, estudiaron la expresión del VEGF en estadio IB (T2N0M0) y IIA (T1N1M0) y encontraron relación entre alta expresión del VEGF y menor supervivencia con una OR=3,6. Por otra parte, Holash y cols.²¹⁸, comunican que una marcada expresión de VEGF ocurre en los estadios más tardíos de la progresión tumoral. Estos hallazgos concuerdan con los de Donnem y cols.²¹⁶ y Seto y cols.²¹⁷, quienes encuentran una mayor expresión de VEGF en los tumores mayores de 3 cm. En la presente investigación, no se objetivó impacto alguno de la expresión de VEGF y la supervivencia. Este hecho podría estar justificado porque nuestro estudio se centra en ADC en estadio IA, por lo que solo se incluyen aquellos tumores con un diámetro máximo de 3 cm y sin afectación ganglionar ni diseminación a distancia, siendo, por tanto, una población bastante homogénea y clasificada en el estadio más precoz del ADC pulmonar.

También se consideró la relación de la expresión del VEGF con los patrones histológicos de los ADC, así como con los subtipos de ADC. Se encontró relación débil y positiva entre la expresión del VEGF y el componente lepidico, aunque la expresión del VEGF no se relacionó con el subtipo de ADC en este estadio tumoral. No hay estudios recientes que describan estas relaciones, debido a la falta de trabajos con la última clasificación de los ADC. Igualmente, la mayoría de los estudios anteriormente citados incluyen pacientes con carcinoma de células escamosas y ADC en general^{41,65,68,204,205,207,208,216,217}.

En el ADC, Shibusa y cols.²¹⁴, encuentran por primera vez la relación entre peor pronóstico en el ADC de pulmón clasificado en el estadio I (T1-2N0M0) y la expresión VEGF positivo con técnicas de IHQ, siendo 2,8 veces más frecuentes las recaídas en estos pacientes. Nakashima y cols.²⁰⁵, encontraron peor supervivencia en pacientes con tumores VEGF positivos, en especial en aquellos con ADC de pulmón (HR=3,8), analizando pacientes con diferentes tamaños tumorales. En un metaanálisis realizado por Zhan y cols.²⁰⁴ se observó una relación más potente entre los estudios en los que se analizaron solo el estadio I de CPCNP que en aquellos que analizaron desde el estadio I al IV y cuando limitaron el estudio a los ADC, encontraron peor supervivencia en este grupo de pacientes.

Igualmente, se encontró una correlación débil y negativa con el número de mitosis, percibiendo que con menor número de mitosis hay mayor expresión de VEGF. Finalmente, la ausencia de necrosis se relacionó con una mayor expresión del VEGF. Estos hallazgos tampoco se han comunicado en otras publicaciones con anterioridad.

En cuanto a la relación con la supervivencia, en este análisis no se encontró diferencias estadísticamente significativas entre aquellos pacientes VEGF positivos y VEGF negativos, en concordancia con otros estudios^{41,209-212}. La diferencia entre estos resultados y otros estudios, anteriormente citados, en los que la expresión de VEGF determinó un peor pronóstico, pueden deberse a la variabilidad entre las técnicas de cuantificación de la expresión, al tipo de los anticuerpos utilizados para la IHQ (monoclonales o policlonales) o a la selección entre los puntos de corte o score utilizados en la literatura^{203,210}. Otro punto crítico es lo poco comparable que son los estudios,

dado lo heterogéneo de las series en cuanto al estadio tumoral analizado y el tipo de CPCNP. Hay que tener en cuenta que el proceso de crecimiento tumoral y de la angiogénesis es dinámico y muy complejo siendo, por lo tanto, el comportamiento de este marcador en los distintos tipos de CPCNP y en los diferentes estadios tumorales diferentes y debería por tanto valorarse por separado.

Donnem y cols.⁷², en una reciente revisión, sugieren la posibilidad de un crecimiento tumoral no angiogénico en algunos tumores y, por tanto, la utilización de otros mecanismos de vascularización, como es el caso de la coaptación de vasos sanguíneos del huésped. En estadios tempranos del CP se ha demostrado que es común encontrar en la periferia crecimiento tumoral no angiogénico, mientras que en la parte más profunda de la lesión se desencadena el remodelado vascular y la angiogénesis cuando el tumor es más grande^{72,218–220}.

Frezzetti y cols.⁷⁰, en un estudio con líneas celulares tumorales de CPCNP, demostraron que, aunque éstas expresan VEGFA, este factor no es capaz de sostener el crecimiento y la migración de estas líneas celulares en estadios precoces y, por tanto, su bloqueo no tuvo efecto en estos fenómenos, sugiriendo que el sistema ligando receptor VEGFR/VEGFA podría tener diferentes roles en los distintos tumores y probablemente sería dependiente de condicionantes genéticos. Koukourakis y cols.^{221,222} encuentran que la expresión de VEGF está asociada con aumento de angiogénesis en el CP. Sin embargo, la mitad de los pacientes que expresaron este marcador tenían una densidad vascular pobre, lo que demuestra que la angiogénesis inducida por VEGF puede ser dependiente de otros reguladores. Estos autores sugieren que la producción de VEGF por las células tumorales no siempre provoca actividad angiogénica VEGF/VEGFR²²¹. Por el contrario, hay otros autores que sugieren que el VEGFA induce otros factores de crecimiento capaces de sostener y potenciar la angiogénesis, pero en fases más tardías del tumor^{66,70,223}. Así pues, la redundancia de factores angiogénicos y las diferentes isoformas del VEGF, así como, la capacidad de las células del CP en activar otras vías alternativas proangiogénicas podrían ser las responsables de la falta de beneficios clínicos de la terapia anti-VEGF observadas en los pacientes con CPCNP^{70,220,224,225}. Todo

lo anterior podría justificar los resultados discordantes entre la expresión del VEGF y su potencialidad como factor pronóstico.

6.2. Marcadores endoteliales en el ADC de pulmón

La angiogénesis como factor pronóstico ha sido estudiada desde hace décadas y es de una gran utilidad en diferentes tipos tumorales. La medición indirecta de la misma, a través de la DMV, ha sido valorada por diferentes métodos de conteo y diferentes marcadores endoteliales con el interés de encontrar el más acertado.

El CD34 es una glicoproteína transmembrana altamente glucosilada que pertenece a la familia de las sialomucinas de las moléculas de superficie. Se expresa selectivamente en las CM precursoras, en las CEs de vasos pequeños y en algunas células estromales. Promueve la adhesión celular, coordina el reclutamiento de células inflamatorias y dirige la angiogénesis^{41,90,91,226}. Es un marcador panendotelial ampliamente estudiado como factor pronóstico en muchos tipos de tumores^{86,89}. Sin embargo, el papel de este marcador como factor pronóstico en el CP es controvertido. Algunos autores lo han identificado como factor de mal pronóstico, encontrando una relación entre el aumento de la DMV y un peor pronóstico^{41,89,207,214,227-229}, así como su relación con la aparición de metástasis a distancia^{41,230}. Por otro lado, otros autores no encuentran relación entre la DMV usando CD34 y la supervivencia o el TLE^{40,43}.

El CD31 o PECAM1, es una molécula de superficie celular principalmente expresada en plaquetas, en las CEs, en polimorfonucleares y en población circulante de linfocitos^{42,94,231}. Ha sido propuesta como marcador de IHQ estándar para la valoración de la angiogénesis, en un consenso internacional sobre criterios metodológicos para evaluar la DMV⁴². Igualmente, resultados contradictorios se han encontrado, con el uso de este marcador, como se comenta más adelante^{86,89}.

El CD105, una glucoproteína de membrana expresada en CEs activadas, se une al TGF β 1 y 3^{43,96-98}. Ha sido estudiada, igualmente, en muchos tipos de tumores como marcador de angiogénesis y como factor pronóstico^{43,98,101-103,211,232,233}.

En el presente estudio se realizó la valoración de estos tres marcadores endoteliales mediante el conteo de la DMV, el área acumulada teñida y el diámetro medio de los capilares tanto en pulmón sano no tumoral, como en zona peritumoral (sólo en el caso de CD34), y en los 119 casos de ADC.

Coincidiendo con Pusztaszeri y cols.⁹⁰ y Muller y cols.²³⁴, en este trabajo se observó una intensa expresión tanto del CD34 como del CD31 en los capilares pulmonares normales. Sin embargo, pocos son los estudios que han realizado la comparación entre estos parámetros morfológicos. La DMV para los marcadores CD34 y CD31 en pulmón sano fue muy alta y se observó una disminución progresiva desde el pulmón sano hacia la zona peritumoral, hasta alcanzar el ADC de pulmón. Por el contrario, tanto el área de la inmunotinción como el diámetro medio de los capilares, fue mayor en el ADC y menor en zona peritumoral y en el pulmón sano. Estos hallazgos pudieran ser el reflejo de las alteraciones existentes en los vasos tumorales, los cuales se encuentran dilatados y muy permeables^{76,82,83}.

Guedj y cols.²³⁵, en un estudio donde se comparó la expresión de CD34 entre pulmón normal y BAC, expresado en porcentaje de superficie teñida, encontraron una expresión similar entre ambos, 8 y 7% respectivamente. Koukourakis y cols.²²¹, estudiaron la expresión del CD31 en el CPCNP, encontrando una alta DMV con este marcador en el pulmón sano, mientras que en zona tumoral ésta fue menor. Incluso entre la zona central y periférica del tumor hallaron una disminución significativa de la DMV en la zona central con respecto a la periférica.

Discordante al CD34 y al CD31, en el presente trabajo, la expresión del CD105 fue nula en pulmón sano no tumoral. Contrariamente, en el ADC pulmonar se encontró una clara expresión de éste, con un 87,8% de positividad. Estos hallazgos son análogos con el estudio de Minhajat y cols.²³⁶.

Posteriormente, se relacionaron los resultados obtenidos en la DMV de cada uno de los marcadores con las características clínicas y patológicas de la serie, así como con el TLE y la SCE.

Al relacionar la DMV usando CD34 con estas características clínicas y patológicas se encontró una menor DMV en pacientes fumadores y exfumadores en comparación con pacientes no fumadores, con una relación en el límite de la significación estadística.

El tamaño tumoral total no tuvo ningún tipo de relación con la DMV. Sin embargo, a mayor tamaño de la invasión se observó menor expresión de la DMV usando CD34, aunque esta relación fue débil. En este sentido, la cuantificación y expresión de la DMV con CD34 fue menor en tumores clasificados como T1b y T1c, que en los pacientes T1a y Tis.

En este análisis también se encontró relación del marcador con el subtipo de ADC, siendo la DMV con CD34 mayor en los ADC lepidicos, así como en los MIA y AIS, mientras que en los subtipos sólido y micropapilar la expresión disminuyó significativamente. Al relacionar la DMV con CD34 de forma cuantitativa con el componente celular del tumor se encontró correlación positiva entre este marcador y el componente lepidico, mientras que se encontró una correlación negativa con el componente sólido. Obviamente, esta diferencia se confirmó en el GD, donde el grado III en el cual se engloba los ADC sólidos y micropapilares, la DMV con CD34 fue menor con respecto a los otros dos GDs. Aunque es escasa la literatura en este sentido, estos datos tienen concordancia con los publicados por Mlika y cols.²³⁷, donde se evaluó la expresión de CD34 en los actuales subtipos de ADC de pulmón en estadio I y II. Estos autores encontraron que el ADC sólido está menos vascularizado que los subtipos, papilar y acinar.

Con el GN igualmente, se objetivaron diferencias significativas, con una disminución de la DMV con CD34 en los pacientes con GN3 con respecto al GN2 y el GN1. Asimismo, se encontró relación de la DMV de este marcador con el número de mitosis, siendo el conteo menor en pacientes con más de seis mitosis. Por último, se

encontró menor DMV con CD34 entre los pacientes en presencia de necrosis que en ausencia de necrosis.

Por otro lado, en este análisis, se vio una asociación entre baja expresión de DMV con CD34 y peores resultados en estos pacientes. Este hecho podría estar justificado porque hemos comprobado que esta baja expresión se relacionó significativamente con factores de mal pronóstico como el ADC micropapilar y la necrosis tumoral.

Pocos son los estudios que coinciden con estos datos. Pomme y cols.²³⁸, valoraron la expresión de varios marcadores relacionados con la angiogénesis tumoral en CPCNP, encontrando que la DMV con CD34 $< 65/\text{mm}^2$ en el centro del tumor está relacionada con peor pronóstico. Xing y cols.²³⁹, en un reciente estudio, donde se relaciona la DMVCD34 y el flujo sanguíneo con ultrasonografía en injertos de tumor pulmonar en conejos, encontraron una relación entre mayor DMV con CD34 con mejor supervivencia. Estas contradicciones también se han observado en el carcinoma renal de células claras, donde Yildiz y cols.²⁴⁰ ha encontrado que la alta DMV con CD34 está relacionado con “estatus no metastásico, falta de IVM, tamaño tumoral pequeño y bajo estadio tumoral”. Mientras que Mineo y cols.²⁰⁷ y otros autores^{89,228,229} comprobaron que una alta expresión de este marcador se relacionó con un peor pronóstico.

La razón de que la baja expresión de DMV con CD34 esté relacionada con un peor pronóstico no está bien aclarada. Ya en 1955 Thomlinson y Gray²⁴¹ describieron que la arquitectura vascular pulmonar es única, ellos demostraron que el carcinoma bronquial utiliza los vasos sanguíneos preexistente. Pezzella y cols.²¹⁹, en 1997, sugirieron un patrón de crecimiento “no angiogénico”, sin destrucción del parénquima pulmonar y con evidencia de coaptación de vasos sanguíneos septales en una muestra de 500 pacientes con CPCNP. Passalidou y cols.²⁴² han confirmado este patrón no angiogénico en el CP y otros autores en hígado²⁴³, ganglios linfáticos²⁴⁴ y en metástasis pulmonares²⁴⁵. El prerrequisito principal de este patrón parece ser la capacidad del tumor de preservar la arquitectura del estroma del tejido y coaptar los vasos del huésped, creciendo en nidos entre los espacios alveolares^{219,246}. Por otro lado, al ser la DMV en el pulmón normalmente alta, las regiones hipóxicas del tumor son raras, por tanto, la concentración de oxígeno para inducir factores proangiogénicos no parecen

suficientes para estimular la formación de nuevos vasos, al menos en etapas iniciales del tumor⁴⁰. Holash y cols.²¹⁸, en un estudio experimental con varios tipos de tumores, informan de la capacidad del tumor de coaptar rápidamente los vasos del tejido huésped para formar un tumor inicialmente bien vascularizado y plantean la hipótesis de que tal vez, como parte de defensa del organismo, hay una regresión generalizada de los vasos coaptados, lo que conduce a un tumor avascular y posible disminución de la DMV hacia el centro del tumor, con pérdida masiva de células tumorales. Sin embargo, el tumor restante que sobrevive más tarde es rescatado por una firme angiogénesis en la periferia del tumor. Donnem y cols.⁷² confirman la existencia de otros tipos de vascularización en el CP, como la ya mencionada coaptación de vasos huésped. El hecho de que el CD34 sea un marcador panendotelial, significa que puede reaccionar con CEs activas y CEs de vasos atrapados dentro del tejido pulmonar⁴³, lo que podría explicar los hallazgos del presente estudio.

A diferencia del CD34, en este análisis la DMV con CD31 se relacionó significativamente solo con el GD tumoral, siendo menor la DMV en los ADC con GD III. Con respecto al resto de variables, como el TNM, el subtipo de ADC, el GN, el número de mitosis y la necrosis tumoral, no se evidenció relación alguna. Otros estudios tampoco encuentran relación significativa entre variables patológicas y la DMV determinada con CD31^{209,210}.

En cuanto a la relación entre este marcador y su valor pronóstico, como se comentó anteriormente, se observan resultados contradictorios. Pastorino y cols.²⁴⁷, en un estudio extenso de 515 pacientes con CPCNP, no encuentran relación entre la DMV con CD31 y el pronóstico de estos pacientes y apuntan que el patrón angiogénico o no angiogénico es más significativo que el estudio de la DMV. Duarte y cols.²⁴⁸ tampoco encuentran que el aumento de la DMV con CD31 se asocie con un peor pronóstico. Sin embargo, Giatromanolaki y cols.²⁴⁹, en su estudio con 107 pacientes con clasificación T1-2N0-1M0, sí relacionaron la DMV elevada con peor pronóstico. Kuang y cols.²³¹ coinciden con este hallazgo, siendo más evidente la significación pronóstica entre aquellos pacientes con ADC en estadios avanzados. Igualmente, Bacic y cols.²⁰⁹

confirman una peor supervivencia en pacientes con estadio IIIA de CPCNP y con DMV con CD31 elevada.

En el presente estudio se evidenció una relación apreciable entre peor pronóstico de esta patología y el aumento en la DMV con CD31.

Koukourakis y cols.²²¹ evaluaron la DMV con CD31 en tejido tumoral y evidenciaron que la DMV alta se relacionó con peor supervivencia. También comprobaron que la DMV era más intensa en la periferia que en la zona central de la tumoración y que la DMV de pulmón sano era mayor que en el tejido tumoral, hallazgos que concuerdan con nuestro estudio.

Sin embargo, un aumento de la DMV en el pulmón no indica que la actividad angiogénica sea más alta²²¹. Por ello, en este estudio se valoró la expresión del CD105, el cual es un marcador de CEs activadas. Como se comentó anteriormente, no se encontró expresión de éste en el pulmón normal. Estos resultados son análogos con el estudio de Minhajat y cols.²³⁶, quienes demuestran la expresión del CD105 en endotelio de nuevos vasos en zonas cancerosas, mientras que en áreas adyacentes al tumor, pero no cancerosas, no encuentra ninguna expresión. Este hallazgo no es exclusivo del CP ya que los describen en el cáncer de cerebro, mama, estómago y colon.

Al igual que en otros estudios^{43,207,211,250}, en el presente estudio no se encontró relación de la DMV con CD105 con las características clínicas y patológicas de la serie. Sin embargo, se encontró relación significativa entre alta expresión de la DMV con CD105 y un peor pronóstico, encontrando mayor recidiva de la enfermedad y mayor mortalidad por cáncer entre este grupo de pacientes.

En este sentido, Mineo y cols.²⁰⁷ también encontraron peor supervivencia entre pacientes con alta DMV con CD105. Sin embargo, en el análisis multivariante no entró en regresión, comportándose como variable independiente la DMV con CD34. Pomme y cols.²³⁸ encuentran asociación entre la expresión del CD105 y el ADC de pulmón, pero en el análisis como factor de peor pronóstico no hallaron significación estadística. Por el contrario, la DMV con CD105 ha sido relacionada como factor de mal pronóstico en el

cáncer de mama^{232,250,251}, en los cánceres del sistema digestivo (esófago, colon, gástrico)^{101-103,250,252}, en las neoplasias de cabeza y cuello^{250,253,254} y en el CP^{43,211,233,255}.

Por último y contrario a otros estudios^{43,211}, en este trabajo no se encontró asociación estadísticamente significativa entre la expresión del VEGF y la DMV con el CD34, CD31 y CD105.

En general, las distintas investigaciones intentan valorar cuál de los marcadores, de manera independiente, expresan mejor el estado vascular del tumor y su relación con los resultados de los pacientes. En el presente trabajo, mediante la curva ROC, se valoró, en cada marcador de angiogénesis, la capacidad de discriminar a los pacientes según sus resultados y se encontró que estos marcadores tienen muy poca exactitud en discernir el pronóstico de los pacientes con ADC pulmonar en estadio IA, tanto para la recidiva local o a distancia como para la mortalidad cáncer específica. El ABC para el VEGF fue de 43,4% para las recidivas y 42,6% para la mortalidad; para la DMV con CD34 fue de 43,8% para la primera y 45,2% para la segunda; y para la DMV con CD31 fue el 58,4% y el 58,7% respectivamente, ninguna estadísticamente significativas. Para la DMV con CD105, el ABC se encontró en 62,5% para las recidivas tumorales y 62,1% para la mortalidad cáncer específica, valores con nivel de significancia, pero considerada con muy baja exactitud.

La debilidad de estos marcadores está fundamentada en el hecho de que la vascularización tumoral es mucho más compleja y dinámica, en la cual hay participación de varios factores proangiogénicos y, esencialmente, donde la neoangiogénesis por brotes no es el único tipo de vascularización utilizada por el tumor^{72,78,81,82}. Por otro lado, la interacción entre las CEs pulmonares y las células tumorales es un hecho contrastado en algunas investigaciones^{39,256}. En este sentido, Kaesmeyer y cols.²⁵⁶ encontraron que las células tumorales mimetizan la vasculatura pulmonar y forman vasos mosaicos, donde además, las células tumorales CD31 negativas son capaces de convertirse en CD31 positivas al estar en contacto con las CEs. Este hecho también es observado en células de melanoma uveal, donde las células tumorales forman canales vasculares sin CEs pero expresan marcadores panendoteliales tipo CD31 y CD34^{78,257}. Otros tipos de vascularización ampliamente estudiados son la coaptación de vasos huésped

acompañado de remodelación vascular de los mismos por apoptosis, ya comentado anteriormente^{72,218}. Así como la vasculogénesis tumoral, demostrados en los estudios de Maeda y cols.²²⁷ y Bussolati y cols.⁸², quienes encuentran la participación de CPC endoteliales en la vascularización en el CP y su relación con un mal pronóstico de estos pacientes.

En base a la poca exactitud de los marcadores endoteliales analizados por separado para discriminar el pronóstico de los pacientes, y en busca de una mejor valoración del estado vascular del tumor y su relación con la evolución de los mismos se decidió establecer un sistema de puntuación, al que se denominó **“Angioscore”**, donde se combinaron los tres marcadores endoteliales y así poder estratificar los pacientes en alto y bajo riesgo de recidiva tumoral y de mortalidad por cáncer.

Estudios previos han utilizado la combinación de ciertos marcadores pro-angiogénicos como factor pronóstico. Sanmartin y cols.²⁵⁸ encontraron asociación entre una elevada expresión de mRNA VEGFA, baja expresión de mRNA VEGFB y baja expresión de mRNA VEGFD, con una peor evolución de los pacientes. Zhang y cols.²⁵⁹ identificaron que la combinación de la expresión del mRNA VEGFA/FLT1/KDR es altamente consistente como factor pronóstico en el CPCNP. Esta misma “firma génica” la establece el mismo autor en cáncer de colon y de cerebro^{260,261}. Sin embargo, las poblaciones de estudio de estas investigaciones son altamente heterogénea en cuanto a características clínicas, patológicas, tratamiento y resultados y el análisis se realizó mediante la expresión de mRNA, técnica no disponible en todos los centros.

En nuestro estudio el VEGF no fue un marcador a tener en cuenta en la elaboración del score debido a su baja expresión y a que no se encontró relación significativa con el TLE y la SCE. Además, mostró un poder predictivo muy bajo y no significativo en cuanto a pronóstico.

El **“Angioscore”** se calculó mediante una ecuación que relacionó los tres marcadores endoteliales según el análisis de regresión de Cox, entrando en regresión tanto la estimación de la DMV por CD34, CD31 y CD105. Se realizó el cálculo del riesgo para cada paciente y se valoró con la curva ROC su poder para discriminar entre

pacientes con o sin recidiva tumoral y pacientes fallecidos o no por el ADC de pulmón. Se encontró que la capacidad del **“Angioscore”** en discriminar entre un paciente con recidiva tumoral o los que fallecieron por ADC y los que no, fue del 74,8%, y 73,7% respectivamente, valores con una mayor precisión que cuando el análisis se realizó con cada uno de los marcadores por separado. Igualmente, se estimó la capacidad discriminatoria según el tipo de recidiva, siendo del 84,5% para las recidivas pulmonares y del 82,5% para las recidivas cerebrales.

En cuanto a la evolución de los pacientes, se dicotomizó el valor del riesgo obtenido por la mediana, obteniendo dos grupos de pacientes, siendo estadísticamente significativa la diferencia, tanto en el TLE como en la SCE, entre el grupo de bajo y alto riesgo.

Con posterioridad, se realizó un nuevo análisis multivariante de Cox evaluando el **“Angioscore”** conjuntamente con las variables morfológicas que entraron en regresión, ADC con patrón micropapilar y necrosis tumoral. En este nuevo análisis el **“Angioscore”** fue la única variable independiente en la evolución de los pacientes, con una HR = 5,748 para el TLE y una HR = 5,169 para la SCE. Es decir, aquellos pacientes con **“Angioscore”** elevado, tienen casi 6 veces más riesgo de presentar recidiva tumoral y 5 veces más de fallecer por este tipo de tumor que aquellos pacientes con un **“Angioscore”** bajo. Cabe destacar que el hecho de que el resto de las variables no entren en el modelo podría explicarse por las asociaciones encontradas entre la DMV con CD34, variable valorada en el **“Angioscore”**, y resto de variables patológicas.

Por tanto, los datos de este estudio sugieren que el **“Angioscore”** diseñado podría convertirse en una herramienta útil como factor pronóstico en el ADC de pulmón en estadio IA, a expensas de su validación clínica, con un valor predictivo aceptable para las recidivas en general (75%,) y un valor predictivo para las recidivas pulmonares y cerebrales de 84,5% y 82,5%, lo bastante potente como para valorar la realización de los seguimientos en estos pacientes, no solo con tomografía computarizada, sino con resonancia magnética cerebral, así como, en un futuro, valorar la conveniencia de tratamientos adyuvantes.

CONCLUSIONES

7. Conclusiones

El estudio llevado a cabo nos llevó a obtener las siguientes conclusiones:

1.- La expresión aumentada del anti-VEGF en el estadio IA del ADC se relacionó con las pacientes mujeres, el menor número de mitosis y la ausencia de necrosis, no siendo un marcador pronóstico.

2.- La determinación de DMV con CD34 y CD31 fue más elevada en el pulmón normal que en el neoplásico, mientras que la expresión de CD105 en el pulmón sano no fue demostrada.

3.- La baja expresión de la DMV con CD34 se relacionó con características patológicas de mal pronóstico (tumores T1c, subtipos micropapilar y sólidos, GD III, GN 3, mayor número de mitosis y presencia de necrosis). Se asoció a peor TLE y SCE, aunque sin valor predictivo con relación a la recidiva o la mortalidad.

4.- La baja expresión de la DMV con CD31 se relacionó con GD III. Mientras que la alta expresión de la DMV con CD31 se relacionó con el TLE y la SCE de forma significativa. El marcador no fue predictivo en la progresión tumoral.

5.- La alta expresión de la DMV con CD105 se asoció a peores resultados clínicos, siendo significativo su valor predictivo; aunque con baja exactitud como marcador.

6.- No se encontró correlación entre la DMV con CD34, CD31 y CD105 con la expresión del VEGF en este estadio tumoral.

7.- La agrupación de los marcadores de superficie de CEs mediante un **“Angioscore”** es una herramienta para valorar el estado vascular de los pacientes con ADC pulmonar en estadio IA. Éste presentó un valor predictivo más exacto para las recidivas y la mortalidad, permitiendo clasificar grupos de alto y bajo riesgo.

8.- La presencia de un patrón micropapilar y de necrosis tumoral supone un aumento en el riesgo de recidiva y una peor supervivencia.

9.- En un análisis multivariante el **“Angioscore”** fue el único factor pronóstico independiente en los pacientes con ADC de pulmón en estadio IA de esta serie.

BIBLIOGRAFÍA

8. Bibliografía

1. Boveri T. Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. *J Cell Sci.* 2008;121 Suppl 1:1–84.
2. Garraway LA, Lander ES. Lessons from the cancer genome. *Cell.* 2013;153:17–37.
3. Stratton M, Campbell P, Futreal P. The cancer genome. *Nature.* 2009;458:719–24.
4. Garcia-Barreno P. Cáncer. *Rev la Real Acad Ciencias Exactas, Físicas y Nat.* 2006;100:55–82.
5. Bray F, Felay J, Soerjomataram I, Siegel R, Torre L, Jermal A. global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68:394–424.
6. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015;136:E359–86.
7. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017;67:7–30.
8. Malvezzi M, Carioli G, Bertuccio P, Boffetta P, Levi F, La Vecchia C, et al. European cancer mortality predictions for the year 2017, with focus on lung cancer. *Ann Oncol.* 2017;28:1117–23.
9. López-Abente G, Núñez O, Pérez-Gómez B, Aragonés N, Pollán M. La situación del cáncer en España: informe 2015. I CN de EI de SC, editor. Madrid: Instituto de Salud Carlos III; 2015. 154 p.
10. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Las cifras del cáncer en España 2017. 2017. p. 1–28.
11. Galceran J, Ameijide A, Carulla M, Mateos A, Quirós JR, Rojas D, et al. Cancer incidence in Spain, 2015. *Clin Transl Oncol.* 2017;19:799–825.
12. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Las cifras del cáncer en España

2018. 2018.
13. Doll R, Hill AB. Smoking and carcinoma of the lung: preliminary report. *Br Med J.* 1950;2:739–48.
 14. Pesch B, Kendzia B, Gustavsson P, Jöckel K-H, Johnen G, Pohlabein H, et al. Cigarette smoking and lung cancer-relative risk estimates for the major histological types from a pooled analysis of case-control studies. *Int J Cancer.* 2012;131:1210–9.
 15. Devesa SS, Bray F, Vizcaino AP, Parkin DM. International lung cancer trends by histologic type: male:female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. *Int J Cancer.* 2005;117:294–9.
 16. Shaper AG, Wannamethee SG, Walker M. Pipe and cigar smoking and major cardiovascular events, cancer incidence and all-cause mortality in middle-aged British men. *Int J Epidemiol.* 2003;32:802–8.
 17. Subramanian J, Govindan R. Lung cancer in never smokers: a review. *J Clin Oncol.* 2007;25:561–70.
 18. Jenks S. Is lung cancer incidence increasing in never-smokers? *J Natl Cancer Inst.* 2016;108:3–4.
 19. Cufari ME, Proli C, De Sousa P, Raubenheimer H, Al Sahaf M, Chavan H, et al. Increasing frequency of non-smoking lung cancer: presentation of patients with early disease to a tertiary institution in the UK. *Eur J Cancer.* 2017;84:55–9.
 20. Wakelee HA, Chang ET, Gomez SL, Keegan TH, Clarke CA, Holmberg L, et al. Lung cancer incidence in never-smokers. *J Clin Oncol.* 2007;25:472–8.
 21. De Angelis R, Sant M, Coleman M, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO CARE-5 a population-based study. *Lancet Oncol.* 2014;15:23–34.
 22. Maeda R, Yoshida J, Ishii G, Hishida T, Nishimura M, Nagai K. Risk factors for tumor recurrence in patients with early-stage (stage I and II) non-small cell lung cancer: patient selection criteria for adjuvant chemotherapy according to the seventh edition TNM classification. *Chest.* 2011;140:1494–502.
 23. Padilla J, Peñalver JC, Jordá C, Calvo V, Escrivá J, Cerón J, et al. Carcinoma broncogénico no anaplásico de células pequeñas en estadio IA. Cirugía y patrones de mortalidad. *Arch Bronconeumol.* 2005;41:180–4.

24. Asamura H, Goya T, Koshiishi Y, Sohara Y, Tsuchiya R, Miyaoka E. How should the TNM staging system for lung cancer be revised? A simulation based on the Japanese Lung Cancer Registry populations. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006;132:316–9.
25. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, et al. The IASLC lung cancer staging project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (Seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol.* 2009;2:706–14.
26. Asamura H, Goya T, Koshiishi Y, Sohara Y, Eguchi K, Mori M, et al. A Japanese lung cancer registry study: prognosis of 13,010 resected lung cancers. *J Thorac Oncol.* 2008;3:46–52.
27. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WE, et al. The IASLC lung cancer staging project: proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (eighth) edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2016;11:39–51.
28. Goldstraw P. The 7th edition of TNM in lung cancer: what now? *J Thorac Oncol.* 2009;4:671–3.
29. Goodgame B, Viswanathan A, Miller CR, Gao F, Meyers B, Battafarano RJ, et al. A clinical model to estimate recurrence risk in resected Stage I non-small cell lung cancer. *Am J Clin Oncol.* 2008;31:22–8.
30. Martini N, Bains MS, Burt ME, Zakowski MF, McCormack P, Rusch VW, et al. Incidence of local recurrence and second primary tumors in resected stage I lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995;109:120–9.
31. Yang Y, Mao Y, Yang L, He J, Gao S, Mu J, et al. Prognostic factors in curatively resected pathological stage I lung adenocarcinoma. *J Thorac Dis.* 2017;9:5267–77.
32. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization classification of lung tumors. Impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. *J Thorac Oncol.* 2015;10:1243–60.
33. Travis WD, Brambilla E, Riely GJ. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol.* 2013;31:992–1001.

34. Van Schil PE, Sihoe ADL, Travis WD. Pathologic classification of adenocarcinoma of lung. *J Surg Oncol*. 2013;108:320–6.
35. Kerr KM. Pulmonary adenocarcinomas: classification and reporting. *Histopathology*. 2009;54:12–27.
36. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. WHO Classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. 4th ed. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG, editors. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2015. 410 p.
37. Russell P, Wainer Z, Wright GM, Daniels M, Conron M, Williams R. Does lung adenocarcinoma subtype predict patient survival? *J Thorac Oncol*. 2011;6:1496–504.
38. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*. 2018;553:446–54.
39. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646–74.
40. Offersen B V, Pfeiffer P, Hamilton-Dutoit S, Overgaard J. Patterns of angiogenesis in nonsmall-cell lung carcinoma. *Cancer*. 2001;91:1500–9.
41. 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;36:601–9.
42. Vermeulen P., Gasparini G, Fox S., Colpaert C, Marson L., Gion M, et al. Second international consensus on the methodology and criteria of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer*. 2002;38:1564–79.
43. Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, Kawano Y, Miyahara R, Li M, et al. Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. *Clin Cancer Res*. 2001;7:3410–5.
44. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours. Eighth. O’Sullivan B, Mason M, Asamura H, Lee A, Van Eycken E, Denny L, et al., editors. Union for International Cancer Control (UICC). 2017. 241 p.
45. Fong KM, Sekido Y, Gazdar a F, Minna JD. Lung cancer. 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax*. 2003;58:892–900.
46. Junttila MR, De Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment

- heterogeneity on therapeutic response. *Nature*. 2013;501:346–54.
47. Hanahan D, Weinberg R, Francisco S. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57–70.
 48. Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Molecular genetics of lung cancer. *Annu Rev Med*. 2003;54:73–87.
 49. Warburg O. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol*. 1927;8:519–30.
 50. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science (80-)*. 1956;124:269–70.
 51. Vander Heiden M, Cantley L, Thompson C. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science (80-)*. 2009;324:1029–33.
 52. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971;285:1183–6.
 53. Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn*. 2004;231:474–88.
 54. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407:249–57.
 55. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011;473:298–307.
 56. Ribatti D. Judah Folkman, a pioneer in the study of angiogenesis. *Angiogenesis*. 2008;11:3–10.
 57. Duran CL, Howell DW, Dave JM, Smith RL, Torrie ME, Essner JJ, et al. Molecular regulation of sprouting angiogenesis. *Compr Physiol*. 2018;8:153–235.
 58. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms review of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996;86:353–64.
 59. Folkman J. Angiogenesis research: from laboratory to clinic. *Forum (Genova)*. 1999;9:59–62.
 60. Gullino P. Angiogenesis and oncogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 1978;61:639–43.
 61. Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. Vol. 339, *Nature*. 1989. p. 58–61.
 62. Naumov GN, Akslen LA, Folkman J. Role of angiogenesis in human tumor dormancy. *Animal models of the angiogenic switch. Cell Cycle*. 2006;5:1779–87.
 63. Park SA, Jeong MS, Ha K-T, Jang SB. Structure and function of vascular endothelial

- growth factor and its receptor system. *BMB Rep.* 2018;51:73–8.
64. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 2004;25:581–611.
65. Cox G, Jones JL, Walker RA, Steward WP, Byrne KJO. Angiogenesis and non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2000;27:81–100.
66. Frezzetti D, Gallo M, Maiello MR, D'Alessio A, Esposito C, Chicchinelli N, et al. VEGF as a potential target in lung cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2017;21:959–66.
67. Alevizakos M, Kaltsas S, Syrigos KN. The VEGF pathway in lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013;72:1169–81.
68. 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;51:143–58.
69. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res.* 2000;60:203–12.
70. Frezzetti D, Gallo M, Roma C, D'Alessio A, Maiello MR, Bevilacqua S, et al. Vascular endothelial growth factor A regulates the secretion of different angiogenic factors in lung cancer cells. *J Cell Physiol.* 2016;231:1514–21.
71. Makanya AN, Hlushchuk R, Djonov VG. Intussusceptive angiogenesis and its role in vascular morphogenesis, patterning, and remodeling. *Angiogenesis.* 2009;12:113–23.
72. Donnem T, Reynolds AR, Kuczynski EA, Gatter K, Vermeulen PB, Kerbel RS, et al. Non-angiogenic tumours and their influence on cancer biology. *Nat Rev Cancer.* 2018;18:323–36.
73. Nagy JA, Chang SH, Shih SC, Dvorak AM, Dvorak HF. Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin Thromb Hemost.* 2010;36:321–31.
74. Welti J, Loges S, Dimmeler S, Carmeliet P. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J Clin Invest.* 2013;123:3190–200.
75. De Spiegelaere W, Casteleyn C, Van Den Broeck W, Plendl J, Bahramsoltani M, Simoens P, et al. Intussusceptive angiogenesis: a biologically relevant form of angiogenesis. *J Vasc Res.* 2012;49:390–404.

76. Carmeliet P, Jain RK. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10:417–27.
77. Fox SB, Harris AL. Histological quantitation of tumour angiogenesis. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* 2004;112:413–30.
78. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LMG, Pe'er J, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol.* 1999;155:739–52.
79. Auguste P, Lemièrre S, Larrieu-Lahargue F, Bikfalvi A. Molecular mechanisms of tumor vascularization. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2005;54:53–61.
80. Herbst RS, Onn A, Sandler A. Angiogenesis and lung cancer: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol.* 2005;23:3243–56.
81. Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci.* 2000;97:14608–13.
82. Bussolati B, Grange C, Camussi G. Tumor exploits alternative strategies to achieve vascularization. *FASEB J.* 2011;25:2874–82.
83. Baluk P, Hashizume H, McDonald DM. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2005;15:102–11.
84. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in angiogenic therapy. *Science (80-).* 2005;307:58–62.
85. Fukumura D, Duda DG, Munn LL, Jain RK. Tumor microvasculature and microenvironment: novel insights through intravital imaging in pre-clinical models. *Microcirculation.* 2010;17:206–25.
86. Trivella M, Pezzella F, Pastorino U, Harris AL, Altman DG. Microvessel density as a prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma: a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* 2007;8:488–99.
87. Chalkley H. Method for the quantitative morphologic analysis of tissues. *J Natl Cancer Inst.* 1943;4:47–53.
88. Weidner N, Semple J, Welch W, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991;324:1–8.
89. Meert AP, Paesmans M, Martin B, Delmotte P, Berghmans T, Verdebout JM, et al. The role of microvessel density on the survival of patients with lung cancer: a

- systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer*. 2002;87:694–701.
90. Puztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem*. 2006;54:385–95.
91. Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells*. 2014;32:1380–9.
92. Siemerink MJ, Klaassen I, Vogels IMC, Griffioen AW, Van Noorden CJF, Schlingemann RO. CD34 marks angiogenic tip cells in human vascular endothelial cell cultures. *Angiogenesis*. 2012;15:151–63.
93. Martin L, Holcombe C, Green B, Leinster SJ, Winstanley J. Is a histological section representative of whole tumour vascularity in breast cancer ? *Br Journal Cancer*. 1997;76:40–3.
94. Jackson DE. The unfolding tale of PECAM-1. *FEBS Lett*. 2003;540:7–14.
95. 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;3:2485–92.
96. García-Pozo L, Miquilena-Colina ME, Lozano-Rodríguez T, García-Monzón C. Endogлина: estructura, funciones biológicas y papel en la fibrogénesis. *Rev Esp Enfermedades Dig*. 2008;100:355–60.
97. Sánchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Langa C, Bernabéu C. Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor- β pathways. *J Biol Chem*. 2002;277:43799–808.
98. Takase Y, Kai K, Masuda M, Akashi M, Tokunaga O. Endoglin (CD105) expression and angiogenesis status in small cell lung cancer. *Pathol Res Pract*. 2010;206:725–30.
99. Tian F, Zhou AX, Smits AM, Larsson E, Goumans MJ, Heldin CH, et al. Endothelial cells are activated during hypoxia via endoglin/ALK-1/SMAD1/5 signaling in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;392:283–8.
100. Fonsatti E, Nicolay HJM, Altomonte M, Covre A, Maio M. Targeting cancer

- vasculature via endoglin/CD105: a novel antibody-based diagnostic and therapeutic strategy in solid tumours. *Cardiovasc Res.* 2010;86:12–9.
101. Saad RS, Liu YL, Nathan G, Celebrezze J, Medich D, Silverman JF. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. *Mod Pathol.* 2004;17:197–203.
 102. Jung I, Gurzu S, Raica M, Cîmpean AM, Szentirmay Z. The differences between the endothelial area marked with CD31 and CD105 in colorectal carcinomas by computer-assisted morphometrical analysis. *Rom J Morphol Embryol.* 2008;50:239–43.
 103. Goldiș DS, Sferdian MF, Tarță C, Fulger LO, Totolici BD, Neamțu C. Comparative analysis of microvessel density quantified through the immunohistochemistry expression of CD34 and CD105 in rectal cancer. *Rom J Morphol Embryol.* 2015;56:419–24.
 104. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2011;6:244–85.
 105. Janssen-Heijnen MLG, Coebergh JWW. The changing epidemiology of lung cancer in Europe. *Lung Cancer.* 2003;41:245–58.
 106. Sánchez de Cos Escuín J, Serra Mitjans M, Hernández Hernández J, Hernández Rodríguez H. Registro del grupo cooperativo de cáncer de pulmón-II de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica. Estudio descriptivo. *Arch Bronconeumol.* 2013;49:462–7.
 107. Lee PN, Forey BA, Coombs KJ, Lipowicz PJ, Appleton S. Time trends in never smokers in the relative frequency of the different histological types of lung cancer, in particular adenocarcinoma. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2016;74:12–22.
 108. Lewis DR, Check DP, Caporaso NE, Travis WD, Devesa SS. U.S. Lung cancer trends by histologic type. *Cancer.* 2014;120:2883–92.
 109. Gray N. The consequences of the unregulated cigarette. *Tob Control.* 2006;15:405–8.
 110. Lortet-Tieulent J, Soerjomataram I, Ferlay J, Rutherford M, Weiderpass E, Bray F. International trends in lung cancer incidence by histological subtype:

- adenocarcinoma stabilizing in men but still increasing in women. *Lung Cancer*. 2014;84:13–22.
111. Kenfield SA, Wei EK, Stampfer MJ, Rosner BA, Colditz GA. Comparison of aspects of smoking among the four histological types of lung cancer. *Tob Control*. 2008;17:198–204.
112. Samet JM, Avila-Tang E, Boffetta P, Hannan LM, Olivo-Marston S, Thun MJ, et al. Lung cancer in never smokers: clinical epidemiology and environmental risk factors. *Clin Cancer Res*. 2009;15:5626–45.
113. 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.
114. Lee HY, Lee KS. Ground-glass opacity nodules. *J Thorac Imaging*. 2011;26:106–18.
115. Kreyber L, Liebow AA, Uehlinger EA. Histological typing of lung tumours. International histological classification of tumours, No. 1. *Cancer Res*. 1967;27:48.
116. The World Health Organization histological typing of lung tumours: second edition. *Am J Clin Pathol*. 1982;77:123–36.
117. Travis WD, Colby T V., Corrin B, Shimosato Y, Brambilla E. Histological typing of lung and pleural tumours. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1999. XIII, 156.
118. Travis WD, Brambilla E, Müller-hermelink HK, Harris CC. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. 7th ed. Travis WD, Brambilla E, Müller-hermelink HK, Harris CC, editors. IARC Press. Lyon: World Health Organization; 2004. 344 p.
119. Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ, Sima CS, Gerald WL, Kris MG, et al. Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. *Mod Pathol*. 2011;24:653–64.
120. Chilosi M, Murer B. Mixed adenocarcinomas of the lung: place in new proposals in classification, mandatory for target therapy. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134:55–65.
121. Tsuta K, Kawago M, Inoue E, Yoshida A, Takahashi F, Sakurai H, et al. The utility of the proposed IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma subtypes for disease

- prognosis and correlation of driver gene alterations. *Lung Cancer*. 2013;81:371–6.
122. Yoshizawa A, Sumiyoshi S, Sonobe M, Kobayashi M, Fujimoto M, Kawakami F, et al. Validation of the IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification for prognosis and association with EGFR and KRAS gene mutations: Analysis of 440 Japanese patients. *J Thorac Oncol*. 2013;8:52–61.
123. Travis WD, Asamura H, Bankier AA, Beasley MB, Detterbeck F, Flieder DB, et al. The IASLC lung cancer staging project: proposals for coding T categories for subsolid nodules and assessment of tumor size in part-solid tumors in the forthcoming eighth edition of the TNM classification of lung cancer. Vol. 11, *Journal of Thoracic Oncology*. 2016. p. 1204–23.
124. Kadota K, Villena-Vargas J, Yoshizawa A, Motoi N, Sima C, Riely GJ, et al. Prognostic significance of adenocarcinoma in situ, minimally invasive adenocarcinoma, and nonmucinous lepidic predominant invasive adenocarcinoma of the lung in patients with stage I disease. *Am J Surg Pathol*. 2014;38:448–60.
125. Zhao ZR, To KF, Mok TSK, Ng CSH. Is there significance in identification of non-predominant micropapillary or solid components in early-stage lung adenocarcinoma? *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2017;24:121–5.
126. Yuan Y, Ma G, Zhang YQ, Chen H. Presence of micropapillary and solid patterns are associated with nodal upstaging and unfavorable prognosis among patient with cT1N0M0 lung adenocarcinoma: a large-scale analysis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018;144:743–9.
127. Li J, You W, Zheng D, Yan B, Ma X, Pan Y, et al. A comprehensive evaluation of clinicopathologic characteristics, molecular features and prognosis in lung adenocarcinoma with solid component. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018;144:725–34.
128. Zombori T, Nyári T, Tizslavicz L, Pálföldi R, Csada E, Géczi T, et al. The more the micropapillary pattern in stage I lung adenocarcinoma, the worse the prognosis— a retrospective study on digitalized slides. *Virchows Arch*. 2018;472:949–58.
129. Rusch V, Appleman H, Blackstone E, and et. Lung. In: Edge S, Byrd DR, Compton C., Fritz A., Greene F, Trotti A, editors. *AJCC Cancer Staging Handbook From the*

- AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. Springer; 2010. p. 299–323.
130. Goldstraw P. Manual de estadificación en oncología torácica. 2nd ed. Goldstraw P, editor. Madrid: Respira y Sociedad Española de neumología y cirugía torácica (SEPAR); 2011. 174 p.
131. Rami Porta R, Perez Ochoa F, González Pont G. Propuestas para la nueva clasificación TNM del cáncer de pulmón y clasificación anatomopatológica. In: Matilla González JM, editor. Monografía 4: Cáncer de pulmón. Barcelona: RESPIRA. FUNDACION ESPAÑOLA DEL PULMON. SEPAR; 2016. p. 25–38.
132. Wang L, Anraku M, Sato M, Nitadori JI, Nagayama K, Kitano K, et al. Impact of the 8th edition of the UICC-TNM classification on clinical stage 0-IA lung adenocarcinoma: does the new classification predict postoperative prognosis more precisely than the previous one? *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2018;24:223–9.
133. Nicholson AG, Tsao MS, Travis WD, Patil DT, Galateau-Salle F, Marino M, et al. Eighth edition staging of thoracic malignancies implications for the reporting pathologist for the members of the international association for the study of lung cancer staging and prognostic factors and pathology committees. *Arch Pathol Lab Med.* 2018;142:645–61.
134. Rami-Porta R, Bolejack V, Crowley J, Ball D, Kim J, Lyons G, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revisions of the T descriptors in the forthcoming eighth edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2015;10:990–1003.
135. Zhang J, Gold KA, Lin HY, Swisher SG, Xing Y, Jack Lee J, et al. Relationship between tumor size and survival in non-small-cell lung cancer (NSCLC): an analysis of the surveillance, epidemiology, and end results (SEER) registry. *J Thorac Oncol.* 2015;10:682–90.
136. Rami-Porta R, Ball D, Crowley J, Giroux DJ, Jett J, Travis WD, et al. The IASLC lung cancer staging project: proposals for the revision of the T descriptors in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2007;2:593–602.
137. Aokage K, Miyoshi T, Ishii G, Kusumoto M, Nomura S, Katsumata S, et al. Clinical and pathological staging validation in the eighth edition of the TNM classification

- for lung cancer: correlation between solid size on thin-section computed tomography and invasive size in pathological findings in the new T classification. *J Thorac Oncol.* 2017;12:1403–12.
138. Warth A, Muley T, Meister M, Stenzinger A, Thomas M, Schirmacher P, et al. The novel histologic International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification system of lung adenocarcinoma is a stage-independent predictor of survival. *J Clin Oncol.* 2012;30:1438–46.
139. Tsutani Y, Miyata Y, Mimae T, Kushitani K, Takeshima Y, Yoshimura M, et al. The prognostic role of pathologic invasive component size, excluding lepidic growth, in stage I lung adenocarcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2013;146:580–5.
140. Tsutani Y, Miyata Y, Yamanaka T, Nakayama H, Okumura S, Adachi S, et al. Solid tumors versus mixed tumors with a ground-glass opacity component in patients with clinical stage IA lung adenocarcinoma: prognostic comparison using high-resolution computed tomography findings. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2013;146:17–23.
141. Murakawa T, Konoeda C, Ito T, Inoue Y, Sano A, Nagayama K, et al. The ground glass opacity component can be eliminated from the T-factor assessment of lung adenocarcinoma. *Eur J Cardio-thoracic Surg.* 2013;43:925–32.
142. Burt BM, Leung AN, Yanagawa M, Chen W, Groth SS, Hoang CD, et al. Diameter of solid tumor component alone should be used to establish T stage in lung adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2015;22:1318–23.
143. Lee SH, Jo EJ, Eom JS, Mok JH, Kim MH, Lee K, et al. Predictors of recurrence after curative resection in patients with early-stage non-small cell lung cancer. *Tuberc Respir Dis (Seoul).* 2015;78:341–8.
144. Koo HK, Jin SM, Lee CH, Lim HJ, Yim JJ, Kim YT, et al. Factors associated with recurrence in patients with curatively resected stage I-II lung cancer. *Lung Cancer.* 2011;73:222–9.
145. Shimada Y, Saji H, Yoshida K, Kakihana M, Honda H, Nomura M, et al. Prognostic factors and the significance of treatment after recurrence in completely resected stage I non-small cell lung cancer. *Chest.* 2013;143:1626–34.
146. Wang J, Chen J, Chen X, Wang B, Li K, Bi J, et al. Blood vessel invasion as a strong

- independent prognostic indicator in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2011;6:e28844.
147. Park SY, Lee HS, Jang HJ, Lee GK, Chung KY, Zo JI. Tumor necrosis as a prognostic factor for stage IA non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*. 2011;91:1668–73.
148. Travis WD, Brambilla E, Geisinger KR. Histological grading in lung cancer: one system for all or separate systems for each histological type? *Eur Respir J*. 2016;47:720–3.
149. Barletta JA, Yeap BY, Chirieac LR. The prognostic significance of grading in lung adenocarcinoma. *Cancer*. 2010;116:659–69.
150. Zombori T, Furák J, Nyári T, Cserni G, Tizslavicz L. Evaluation of grading systems in stage I lung adenocarcinomas: a retrospective cohort study. *J Clin Pathol*. 2017;71:135–40.
151. Sica G, Yoshizawa A, Sima CS, Azzoli CG, Downey RJ, Rusch VW, et al. A grading system of lung adenocarcinomas based on histologic pattern is predictive of disease recurrence in stage I tumors. *Am J Surg Pathol*. 2010;34:1155–62.
152. Kadota K, Suzuki K, Kachala SS, Zabor EC, Sima CS, Moreira AL, et al. A grading system combining architectural features and mitotic count predicts recurrence in stage I lung adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 2012;25:1117–27.
153. Mäkinen J., Laitakari K, Johnson S, Mákitaro R, Bloigu R, Páákkó P, et al. Histological features of malignancy correlate with growth patterns and patient outcome in lung adenocarcinoma. *Histopathology*. 2017;71:425–36.
154. Dabbs DJ, Silverman JF. Prognostic factors from the fine-needle aspirate: breast carcinoma nuclear grade. *Diagn Cytopathol*. 1994;10:203–8.
155. Nakazato Y, Miyagi Maeshima A, Ishikawa Y, Yatabe Y, Fukuoka J, Yokose T, et al. Interobserver agreement in the nuclear grading of primary pulmonary adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2013;8:736–43.
156. Nakazato Y, Minami Y, Kobayashi H, Satomi K, Anami Y, Tsuta K, et al. Nuclear grading of primary pulmonary adenocarcinomas: correlation between nuclear size and prognosis. *Cancer*. 2010;116:2011–9.
157. Kim JH, Park SS, Park SH, Kim SJ, Mok YJ, Kim CS, et al. Clinical significance of immunohistochemically-identified lymphatic and/or blood vessel tumor invasion in gastric cancer. *J Surg Res*. 2010;162:177–83.

158. Mohammed RA, Ellis IO, Mahmmod AM, Hawkes EC, Green AR, Rakha EA, et al. Lymphatic and blood vessels in basal and triple-negative breast cancers: characteristics and prognostic significance. *Mod Pathol*. 2011;24:774–85.
159. Roxburgh CS, McMillan DC, Anderson JH, McKee RF, Horgan PG, Foulis AK. Elastica staining for venous invasion results in superior prediction of cancer-specific survival in colorectal cancer. *Ann Surg*. 2010;252:989–97.
160. Kato T, Kameoka S, Kimura T, Nishikawa T, Kobayashi M. The combination of angiogenesis and blood vessel invasion as a prognostic indicator in primary breast cancer. *Br J Cancer*. 2003;88:1900–8.
161. Arame A, Mordant P, Cazes A, Foucault C, Dujon A, Le Pimpec Barthes F, et al. Characteristics and prognostic value of lymphatic and blood vascular microinvasion in lung cancer. *Ann Thorac Surg*. 2012;94:1673–9.
162. Shimada Y, Saji H, Kato Y, Kudo Y, Maeda J, Yoshida K, et al. The frequency and prognostic impact of pathological microscopic vascular invasion according to tumor size in non-small cell lung cancer. *Chest*. 2016;149:775–85.
163. Kato T, Ishikawa K, Aragaki M, Sato M, Okamoto K, Ishibashi T, et al. Angiolymphatic invasion exerts a strong impact on surgical outcomes for stage I lung adenocarcinoma, but not non-adenocarcinoma. *Lung Cancer*. 2012;77:394–400.
164. Fan X, Zhang X, Wang H, Jin B. Reevaluation of survival and prognostic factors in pathologic stage I lung adenocarcinoma by the new 2009 TNM classification. *Tumor Biol*. 2014;35:5905–10.
165. Funai K, Sugimura H, Morita T, Shundo Y, Shimizu K, Shiiya N. Lymphatic vessel invasion is a significant prognostic indicator in stage IA lung adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2011;18:2968–72.
166. Rigau V, Molina TJ, Chaffaud C, Huchon G, Audouin J, Chevret S, et al. Blood vessel invasion in resected non small cell lung carcinomas is predictive of metastatic occurrence. *Lung Cancer*. 2002;38:169–76.
167. Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Chuanchieh H, Bigini D, Vignati S, et al. Blood vessel invasion by tumor cells predicts recurrence in completely resected T1N0M0 non-small-cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1993;106:80–9.
168. Swinson DE., Jones JL, Richardson D, Cox G, Edwards JG, O’Byrne KJ. Tumour

- necrosis is an independent prognostic marker in non-small cell lung cancer: correlation with biological variables. *Lung Cancer*. 2002;37:235–40.
169. Alonso A, Basterra-Gortari J, Bes-Rastrollo M, Calasanz MJ, de Irala Estévez J, Faulin Fajardo FJ. *Bioestadística amigable*. 2ª edición. Martínez-Gonzalez MA, Sánchez-Villegas A, Faulín Fajardo FJ, editors. España: Ediciones Díaz de Santos; 2006.
170. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc*. 1958;53:457–81.
171. Peto R, Pike MC. Conservatism of the approximation $\sigma(O-E)^2/E$ in the logrank test for survival data or tumor incidence data. *Biometrics*. 1973;29:579–84.
172. Williams B., Mandrekar J., Mandrekar S., Cha S., Furth A. Finding optimal cutpoints for continuous covariates with binary and time-to-event outcomes. Vol. 79, Technical Report Series. Rochester, Minnesota; 2006.
173. Liqueur B, Commenges D. Correction of the p-value after multiple coding of an explanatory variable in logistic regression. *Stat Med*. 2001;20:2815–26.
174. Cox DR. Regression models and life-tables. Vol. 34, *Journal of the Royal Statistical Society*. 1972.
175. Leiro-Fernández V, Mouronte-Roibás C, Ramos-Hernández C, Botana-Rial M, González-Piñeiro A, García-Rodríguez E, et al. Cambios en el estadio y presentación clínica del cáncer de pulmón a lo largo de dos décadas. *Arch Bronconeumol*. 2014;50:417–21.
176. De Aguiar Quevedo K, Arrarás Martínez M, Martínez Pérez E, Arana E, Mojarrieta JC, González Añó M, et al. Lung resections in the lung screening of International Early Lung Cancer Action Program (IELCAP): 6 years of experience. *Med Res Arch*. 2016;4:1–17.
177. Crestanello J a, Allen MS, Jett JR, Cassivi SD, Nichols FC, Swensen SJ, et al. Thoracic surgical operations in patients enrolled in a computed tomographic screening trial. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004;128:254–9.
178. Aberle DR, Abtin F, Brown K. Computed tomography screening for lung cancer: has it finally arrived? implications of the national lung screening trial. *J Clin Oncol*. 2013;31:1002–8.
179. The National Lung Screening Trial Research Team. Reduced lung-cancer mortality

- with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med.* 2011;365:395–409.
180. Subotic D, Mandaric D, Radosavljevic G, Stojic J, Gajic M, Ercegovac M. Relapse in resected lung cancer revisited: does intensified follow up really matter? A prospective study. *World J Surg Oncol.* 2009;7:1–11.
181. Villar Álvarez F, Muguruza Trueba I, Vicente Antunes SI. Apuntes sobre recidivas y segundos tumores en el cáncer de pulmón. *Arch Bronconeumol.* 2016;52:545–6.
182. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y, et al. Diagnosis of lung cancer in small biopsies and cytology: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Arch Pathol Lab Med.* 2013;137:668–84.
183. Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med.* 2006;57:1–18.
184. Pérez-Martínez O, Vidal-García I, Montero-Martínez C, Provencio M, Ruano-Ravina A. Características al diagnóstico y supervivencia de estadios I y II de cáncer de pulmón. *Arch Bronconeumol.* 2018;54:420–6.
185. Jordá Aragón C, Peñalver Cuesta JC, Mancheño Franch N, De Aguiar Quevedo K, Vera Sempere F, Padilla Alarcón J. Mortalidad en carcinoma pulmonar no microcítico reseado, con tamaño máximo de 3 cm y sin afectación ganglionar: análisis de riesgos competitivos. *Med Clin (Barc).* 2015;145:185–91.
186. Sakao Y, Sakuragi T, Natsuaki M, Itoh T. Clinicopathological analysis of prognostic factors in clinical IA peripheral adenocarcinoma of the lung. *Ann Thorac Surg.* 2003;75:1113–7.
187. Yamamoto K, Padilla Alarcón J, Calvo Medina V, García Zarza A, Pastor Guillen J, Blasco Armengod E, et al. Surgical results of stage I non-small cell lung cancer: comparison between elderly and younger patients. *Eur J Cardio-thoracic Surg.* 2003;23:21–5.
188. Goodgame B, Viswanathan A, Zoole J, Gao F, Miller CR, Subramanian J, et al. Risk of recurrence of resected stage I non-small cell lung cancer in elderly patients as compared with younger patients. *J Thorac Oncol.* 2009;4:1370–4.
189. Palma DA, Tyldesley S, Sheehan F, Mohamed IG, Smith S, Wai E, et al. Stage I non-

- small cell lung cancer (NSCLC) in patients aged 75 years and older: does age determine survival after radical treatment? *J Thorac Oncol.* 2010;5:818–24.
190. Campione A, Ligabue T, Luzzi L, Chiribelli C, Paladini P, Voltolini L, et al. Impact of size, histology, and gender on stage IA non-small cell lung cancer. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 2004;12:149–53.
191. Peñalver Cuesta JC, Jordá Aragón C, Cerón Navarro JA, Mancheño Franch N, de Aguiar Quevedo K, Arrarás Martínez M, et al. Factores pronóstico en el carcinoma bronquial no microcítico menor de 3 centímetros (análisis actuarial, incidencia acumulativa y grupos de riesgo). *Arch Bronconeumol.* 2015;51:431–9.
192. Meguid RA, Hooker CM, Harris J, Xu L, Westra WH, Sherwood JT, et al. Long-term survival outcomes by smoking status in surgical and nonsurgical patients with non-small cell lung cancer: comparing never smokers and current smokers. *Chest.* 2010;138:500–9.
193. Liu S, Wang R, Zhang Y, Li Y, Cheng C, Pan Y, et al. Precise diagnosis of intraoperative frozen section is an effective method to guide resection strategy for peripheral small-sized lung adenocarcinoma. *J Clin Oncol.* 2016;34:307–13.
194. Nakamura K, Saji H, Nakajima R, Okada M, Asamura H, Shibata T, et al. A Phase III randomized trial of lobectomy versus limited resection for small-sized peripheral non-small cell lung cancer (JCOG0802/WJOG4607L). *Jpn J Clin Oncol.* 2009;40:271–4.
195. Ginsberg RJ, Rubinstein L V. Sublobectomy versus lobectomy for stage IA (T1a) non-small-cell lung cancer: a meta-analysis study. *Ann Thorac Surg.* 1995;60:615–23.
196. Hung JJ, Yeh YC, Jeng WJ, Wu KJ, Huang BS, Wu YC, et al. Predictive value of the International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification of lung adenocarcinoma in tumor recurrence and patient survival. *J Clin Oncol.* 2014;32:2357–64.
197. Miyoshi T, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Shirakusa T, Tsuchiya E, et al. Early-stage lung adenocarcinomas with a micropapillary pattern, a distinct pathologic marker for a significantly poor prognosis. *Am J Surg Pathol.* 2003;27:101–9.
198. Amin MB, Tamboli P, Merchant SH, Ordóñez NG, Ro J, Ayala AG, et al. Micropapillary component in lung adenocarcinoma: a distinctive histologic

- feature with possible prognostic significance. *Am J Surg Pathol*. 2002;26:358–64.
199. Maeda R, Isowa N, Onuma H, Miura H, Harada T, Touge H, et al. Lung adenocarcinomas with micropapillary components. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2009;57:534–9.
200. Tsubokawa N, Mimae T, Sasada S, Yoshiya T, Mimura T, Murakami S, et al. Negative prognostic influence of micropapillary pattern in stage IA lung adenocarcinoma. *Eur J Cardio-Thoracic Surg*. 2015;49:293–9.
201. Yanagawa N, Shiono S, Abiko M, Katahira M, Osakabe M, Ogata SY. The clinical impact of solid and micropapillary patterns in resected lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2016;11:1976–83.
202. Wang J, Wang B, Zhao W, Guo Y, Chen H, Chu H, et al. Clinical significance and role of lymphatic vessel invasion as a major prognostic implication in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *PLoS One*. 2012;7:e52704.
203. Yuan XH, Yang J, Wang XY, Zhang XL, Qin TT, Li K. Association between EGFR/KRAS mutation and expression of VEGFA, VEGFR and VEGFR2 in lung adenocarcinoma. *Oncol Lett*. 2018;16:2105–12.
204. Zhan P, Wang J, Lv X, Wang Q, Qiu L, Lin X, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in patients with lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *J Thorac Oncol*. 2009;4:1094–103.
205. 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--BR165.
206. Saad RS, Liu Y, Han H, Landreneau RJ, Silverman JF. Prognostic significance of HER2/neu, p53, and vascular endothelial growth factor expression in early stage conventional adenocarcinoma and bronchioloalveolar carcinoma of the lung. *Mod Pathol*. 2004;17:1235–42.
207. Mineo TC, Ambrogi V, Baldi a, Rabitti C, Bollero P, Vincenzi B, et al. Prognostic impact of VEGF, CD31, CD34, and CD105 expression and tumour vessel invasion after radical surgery for IB-IIA non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol*. 2004;57:591–7.
208. Ohta Y, Tomita Y, Oda M, Watanabe S, Murakami S, Watanabe Y. Tumor

- angiogenesis and recurrence in stage I non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 1999;68:1034–8.
209. Bačić I, Karlo R, Zadro A, Zadro Z, Skitarelić N, Antabak A. Tumor angiogenesis as an important prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer (Stage IIIA). *Oncol Lett.* 2017;15:2335–9.
210. Rubio L, Vera-Sempere FJ, Lopez-Guerrero JA, Padilla J, Moreno-Baylach MJ. A risk model for non-small cell lung cancer using clinicopathological variables, angiogenesis and oncoprotein expression. *Anticancer Res.* 2005;25:497–504.
211. Medetoglu B, Gunluoglu MZ, Demir A, Melek H, Buyukpinarbasili N, Fener N, et al. Tumor angiogenesis in predicting the survival of patients with stage I lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010;140:996–1000.
212. Bonnesen B, Pappot H, Holmstav J, Skov BG. Vascular endothelial growth factor A and vascular endothelial growth factor receptor 2 expression in non-small cell lung cancer patients: Relation to prognosis. *Lung Cancer.* 2009;66:314–8.
213. Stefanou D, Batistatou A, Arkoumani E, Ntzani E, Agnantis NJ. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and association with microvessel density in small-cell and non-small-cell lung carcinomas. *Histol Histopathol.* 2004;19:37–42.
214. Shibusu T, Shijubo N, Abe S. Tumor angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in stage I lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 1998;4:1483–7.
215. Yuan A, Yu CJ, Chen WJ, Lin FY, Kuo SH, Luh KT, et al. Correlation of total VEGF mRNA and protein expression with histologic type, tumor angiogenesis, patient survival and timing of relapse in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer.* 2000;89:475–83.
216. Donnem T, Andersen S, Al-Saad S, Al-Shibli K, Busund LT, Bremnes RM. Prognostic impact of angiogenic markers in non-small-cell lung cancer is related to tumor size. *Clin Lung Cancer.* 2011;12:106–15.
217. Seto T, Higashiyama M, Funai H, Imamura F, Uematsu K, Seki N, et al. Prognostic value of expression of vascular endothelial growth factor and its flt-1 and KDR receptors in stage I non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2006;53:91–6.
218. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, et al.

- Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* (80-). 1999;284:1994–8.
219. Pezzella F, Pastorino U, Tagliabue E, Andreola S, Sozzi G, Gasparini G, et al. Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis. *Am J Pathol*. 1997;151:1417–23.
220. Hlushchuk R, Ehrbar M, Reichmuth P, Heinimann N, Styp-Rekowska B, Escher R, et al. Decrease in VEGF expression induces intussusceptive vascular pruning. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:2836–44.
221. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Thorpe PE, Brekken RA, Sivridis E, Kakolyris S, et al. Vascular endothelial growth factor/KDR activated microvessel density versus CD31 standard microvessel density in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2000;60:3088–95.
222. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Kakolyris S, Turley H, O’Byrne K, Scott PA, et al. Vascular endothelial growth factor, wild-type p53, and angiogenesis in early operable non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 1998;4:3017–24.
223. Ribatti D. Novel angiogenesis inhibitors: addressing the issue of redundancy in the angiogenic signaling pathway. *Cancer Treat Rev*. 2011;37:344–52.
224. Crinò L, Metro G. Therapeutic options targeting angiogenesis in nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir Rev*. 2014;23:79–91.
225. Boudria A, Abou Faycal C, Jia T, Gout S, Keramidas M, Didier C, et al. VEGF165b, a splice variant of VEGF-A, promotes lung tumor progression and escape from anti-angiogenic therapies through a β 1 integrin/VEGFR autocrine loop. *Oncogene*. 2019;38:1050–66.
226. Lo BC, Gold MJ, Scheer S, Hughes MR, Debruin E, Chu FSF, et al. Loss of vascular CD34 results in increased sensitivity to lung injury. *AJRCMB*. 2017;57:1–33.
227. Maeda R, Ishii G, Ito M, Hishida T, Yoshida J, Nishimura M, et al. Number of circulating endothelial progenitor cells and intratumoral microvessel density in non-small cell lung cancer patients. Differences in angiogenic status between adenocarcinoma histologic subtypes. *J Thorac Oncol*. 2012;7:503–11.
228. Pu D, Liu J, Li Z, Zhu J, Hou M. Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1), partly related to vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) and microvessel density, is an independent prognostic factor for non-small cell lung

- cancer. *Med Sci Monit.* 2017;23:247–57.
229. Fontanini G, Lucchi M, Vignati S, Mussi A, Ciardiello F, De Laurentiis M, et al. Angiogenesis as a prognostic indicator of survival in non-small-cell lung carcinoma: a prospective study. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89:881–6.
230. Dazzi C, Cariello A, Maioli P, Solaini L, Scarpi E, Rosti G, et al. Prognostic and predictive value of intratumoral microvessels density in operable non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer.* 1999;24:81–8.
231. Kuang BH, Wen XZ, Ding Y, Peng RQ, Cai PQ, Zhang MQ, et al. The prognostic value of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in non-small-cell lung cancer patients. *Med Oncol.* 2013;30:536.
232. Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM, et al. Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res.* 1999;59:856–61.
233. Brattström D, Bergqvist M, Wester K, Hesselius P, Ren Z-P, Scheibenpflug L, et al. Endothelial markers and circulating angiogenic factors and p53 may be potential markers for recurrence in surgically resected non-small cell lung cancer patients. *Med Sci Monit.* 2004;10:BR331-R338.
234. Müller AM, Hermanns MI, Skrzynski C, Nesslinger M, Müller KM, Kirkpatrick CJ. Expression of the endothelial markers PECAM-1, vWF, and CD34 in vivo and in vitro. *Exp Mol Pathol.* 2002;72:221–9.
235. Guedj N, Couvelard A, Arcangeli G, Dubois S, Thabut G, Lesèche G, et al. Angiogenesis and extracellular matrix remodelling in bronchioloalveolar carcinomas: distinctive patterns in mucinous and non-mucinous tumours. *Histopathology.* 2004;44:251–6.
236. Minhajat R, Mori D, Yamasaki F, Sugita Y, Satoh T, Tokunaga O. Organ-specific endoglin (CD105) expression in the angiogenesis of human cancers. *Pathol Int.* 2006;56:717–23.
237. Mlika M, Makhoulouf C, Boudaya MS, Haddouchi C, Tritar F, Mezni F. Evaluation of the microvessel density and the expression of metalloproteases 2 and 9 and TTF1 in the different subtypes of lung adenocarcinoma in Tunisia: a retrospective study of 46 cases. *J Immunoass Immunochem.* 2015;36:111–8.
238. Pomme G, Augustin F, Fiegl M, Drosler RA, Sterlacci W, Tzankov A. Detailed

- assessment of microvasculature markers in non-small cell lung cancer reveals potentially clinically relevant characteristics. *Virchows Arch.* 2015;467:55–66.
239. Xing J, He W, Ding YW, Li Y, Li YD. Correlation between contrast-enhanced ultrasound and microvessel density via CD31 and CD34 in a rabbit VX2 lung peripheral tumor model. *Med Ultrason.* 2018;1:37.
240. Yildiz E, Ayan S, Goze F, Gokce G, Gultekin EY. Relation of microvessel density with microvascular invasion, metastasis and prognosis in renal cell carcinoma. *BJU Int.* 2007;101:758–64.
241. Thomlinson RH, Gray LH. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *British J cancer.* 1955;9:539–49.
242. Passalidou E, Trivella M, Singh N, Ferguson M, Hu J, Cesario a, et al. Vascular phenotype in angiogenic and non-angiogenic lung non-small cell carcinomas. *Br J Cancer.* 2002;86:244–9.
243. Vermeulen PB, Colpaert C, Salgado R, Royers R, Hellemans H, Van Den Heuvel E, et al. Liver metastases from colorectal adenocarcinomas grow in three patterns with different angiogenesis and desmoplasia. *J Pathol.* 2001;195:336–42.
244. Vermeulen PB, Sardari Nia P, Colpaert C, Dirix LY, Van Marck E. Lack of angiogenesis in lymph node metastases of carcinomas is growth pattern-dependent. *Histopathology.* 2002;40:105–7.
245. Pezzella F, Manzotti M, Di Bacco A, Viale G, Nicholson AG, Price R, et al. Evidence for novel non-angiogenic pathway in breast-cancer metastasis. *Lancet.* 2000;355:1787–8.
246. Sardari Nia P, Colpaert C, Blyweert B, Kui B, Vermeulen P, Ferguson M, et al. Prognostic value of nonangiogenic and angiogenic growth patterns in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer.* 2004;91:1293–300.
247. Pastorino U, Andreola S, Tagliabue E, Pezzella F, Incarbone M, Sozzi G, et al. Immunocytochemical markers in stage I lung cancer: relevance to prognosis. *J Clin Oncol.* 1997;15:2858–65.
248. Duarte IG, Bufkin BL, Pennington MF, Gal AA, Cohen C, Kosinski AS, et al. Angiogenesis as a predictor of survival after surgical resection for stage I non-small-cell lung cancer. *Gen Thorac Surg.* 2011;115:652–9.
249. Giatromanolaki A, Koukourakis M, O'Byrne K, Fox S, Whitehouse R, Talbot DC, et

- al. Prognostic value of angiogenesis in operable non-small cell lung cancer. *J Pathol.* 1996;179:80–8.
250. Zhang J, Zhang L, Lin Q, Ren W, Xu G. Prognostic value of endoglin-assessed microvessel density in cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget.* 2018;9:7660–71.
251. Davidson B, Stavnes HT, Førsund M, Berner A, Staff AC. CD105 (Endoglin) expression in breast carcinoma effusions is a marker of poor survival. *Breast.* 2010;19:493–8.
252. Basilio-de-Oliveira RP, Nunes Pannain VL. Prognostic angiogenic markers (endoglin, VEGF, CD31) and tumor cell proliferation (Ki67) for gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol.* 2015;21:6924–30.
253. Zvrko E, Mikic A, Vuckovic L. Clinicopathologic significance of CD105-assessed microvessel density in glottic laryngeal squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx.* 2010;37:77–83.
254. Basnaker M, Shashikanth S, Satish B. Expression of endoglin (CD-105) and microvessel density in oral dysplasia and squamous cell carcinoma. *J Clin Diagnostic Res.* 2014;8:91–4.
255. Zhang C, Liu Y, Guo S, Zhang J. Different biomarkers in non-small cell lung cancer in blood vessel invasion. *Cell Biochem Biophys.* 2014;70:777–84.
256. Kaessmeyer S, Bhoola K, Baltic S, Thompson P, Plendl J. Lung cancer neovascularisation: cellular and molecular interaction between endothelial and lung cancer cells. *Immunobiology.* 2014;219:308–14.
257. Folberg R, Maniotis A. Vasculogenic mimicry. *APMIS.* 2004;112:508–25.
258. Sanmartín E, Sirera R, Usó M, Blasco A, Gallach S, Figueroa S, et al. A gene signature combining the tissue expression of three angiogenic factors is a prognostic marker in early-stage non-small cell lung cancer. *Ann Surg Oncol.* 2014;21:612–20.
259. Zhang SD, McCrudden CM, Kwok HF. Prognostic significance of combining VEGFA, FLT1 and KDR mRNA expression in lung cancer. *Oncol Lett.* 2015;10:1893–901.
260. Zhang SD, Leung KL, McCrudden CM, Kwok HF. The prognostic significance of combining VEGFA, FLT1 and KDR mRNA expressions in brain tumors. *J Cancer.* 2015;6:812–8.

261. Zhang S-D, Mc Crudden CM, Meng C, Lin Y, Fai Kwok H. The significance of combining VEGFA, FLT1, and KDR expressions in colon cancer patient prognosis and predicting response to bevacizumab. *Onco Targets Ther.* 2015;8:835–43.

ANEXOS

ANEXO 1

SECT
SOCIEDAD
ESPAÑOLA
DE CIRUGÍA
TORÁCICA

LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CIRUGÍA TORÁCICA

Fundación SECT

CERTIFICA QUE:

Karol de Aguiar, Juan Carlos Peñalver Cuesta, José Cerón Navarro, Carlos Jordá Aragón, Francisco José Vera Sempere, Amparo Ruiz Sauri y Julia Cruz Mojarrieta
han sido ganadores de la

**1º PREMIO DE LAS BECAS A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN
SECT 2016**

en la categoría de Grupos y/o Investigadores emergentes

por su proyecto titulado:

**“EVALUACIÓN DE MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS DE ANGIOGENÉSIS TUMORAL
COMO FACTOR PRONÓSTICO EN EL ADENOCARCINOMA PULMONAR EN ESTADIO IA
(T1a-bN0M0)”**

Nicolás Moreno Mata
Presidente de la SECT

Sergio Bolufer Nadal
Secretario de la SECT

premiado en el *VII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Cirugía Torácica*,
celebrado en Valencia, del 4 al 6 de Mayo de 2016.

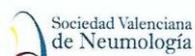
Y para que así conste se han efectuado los efectos, firman
en Valencia, a 6 de mayo de 2016

SECT
SOCIEDAD
ESPAÑOLA
DE CIRUGÍA
TORÁCICA

ANEXO 2



XXIV CONGRESO Sociedad Valenciana de Neumología



XXIV CONGRESO SOCIEDAD VALENCIANA DE NEUMOLOGÍA
31 MARZO 01 ABRIL 2017 HOTEL PRIMUS VALENCIA

SOCIEDAD VALENCIANA DE NEUMOLOGÍA



El **Dr. Francisco Sanz Herrero** como Secretario de la Sociedad Valenciana de Neumología y del Comité Organizador del Congreso

CERTIFICA

Que los autores

**KAROL DE AGUIAR, MIGUEL ARRARÁS MARTÍNEZ,
ENCARNACIÓN MARTÍNEZ, JULIA CRUZ, JOSÉ CERON,
CARLOS JORDÁ, NURIA MANCHENO, AMPARO RUIZ,
FRANCISCO VERA, JUAN CARLOS PEÑALVER**

han presentado en el **XXIV Congreso de la Sociedad Valenciana de Neumología**,
celebrado en Valencia, los días 31 de marzo y 1 de abril de 2017,
con el Póster titulado:

**DENSIDAD MICROVASCULAR EN ADENOCARCINOMA
DE PULMON ESTADIO IA**

Lo que firmo a los efectos oportunos
Valencia, a 1 de abril de 2017

Francisco Sanz Herrero
Secretario SVN/FNCV

ANEXO 3



Profesor Beltrán Bagueña, 8
46009 - VALENCIA
Tfno. 96 111 40 00
Fax 96 111 43 42

DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Título: EVALUACION DE MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS DE ANGIOGÉNESIS TUMORAL COMO FACTOR PRONÓSTICO EN EL ADENOCARCINOMA PULMONAR EN ESTADIO IA PATOLÓGICO (T1a-bN0M0)

Investigador Principal: Karol de Aguiar Quevedo

El Comité Ético de Investigación Clínica de la Fundación Instituto Valenciano de Oncología en su reunión del **02/06/2014** tras la evaluación de la propuesta del promotor relativa al estudio especificado, y teniendo en consideración las siguientes cuestiones:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del producto en relación con los objetivos del estudio.
- La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- Que se han evaluado las compensaciones económicas previstas (cuando las haya) y su posible interferencia con el respeto a los postulados éticos.
- Que se cumplen los preceptos éticos formulados en la Orden SAS 3470/2009 y la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos y en sus posteriores revisiones, así como aquellos exigidos por la normativa aplicable en función de las características del estudio.

Emite un **DICTAMEN FAVORABLE** para la realización de dicho estudio en la Fundación Instituto Valenciano de Oncología.

Lo que firmo a 3 de junio de 2014.

Dr. Carlos J. Andrés Blasco
Secretario CEIC
Fundación Instituto Valenciano de Oncología