



ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Año académico 2016/17

DOCTORANDO: **OLMEDO GARCÍA, MARÍA EUGENIA**

PROGRAMA DE DOCTORADO: **D420 CIENCIAS DE LA SALUD**
DEPARTAMENTO DE: **MEDICINA Y ESPECIALIDADES MÉDICAS**
TITULACIÓN DE DOCTOR EN: **DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ**

En el día de hoy 28/09/17, reunido el tribunal de evaluación nombrado por la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado de la Universidad y constituido por los miembros que suscriben la presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral, elaborada bajo la dirección de PILAR GARRIDO LÓPEZ.

Sobre el siguiente tema: *PAPEL DE LAS CELULAS TUMORALES CIRCULANTES EN EL CARCINOMA DE PULMÓN DE CÉLULAS PEQUEÑAS*

Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL⁶ de (no apto, aprobado, notable y sobresaliente): Sobresaliente

Alcalá de Henares, 28 de 9 de 2017

EL PRESIDENTE


Fdo.: M. Rey del Rey

EL SECRETARIO


Fdo.: JAVIER DE CASTEJÓN

EL VOCAL

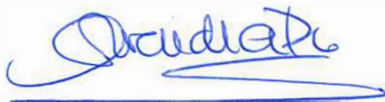

Fdo.: Bruno Saiz Andino


Con fecha 31 de octubre de 2017 la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

- Conceder la Mención de "Cum Laude"
- No conceder la Mención de "Cum Laude"

FIRMA DEL ALUMNO,

La Secretaria de la Comisión Delegada




Fdo.: M. EUGENIA OLMEDO GARCIA

⁶ La calificación podrá ser "no apto" "aprobado" "notable" y "sobresaliente". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad.

INCIDENCIAS / OBSERVACIONES:

POR AUSENCIA EXCUSADA DEL SECRETARIO TITULAR, DR D. J LUIS GONZALEZ LARRIBA,
ASISTE EL SECRETARIO SUPLENTE, DR D. JAVIER DE CASTRO CARPEÑO.



Universidad
de Alcalá

COMISIÓN DE ESTUDIOS OFICIALES
DE POSGRADO Y DOCTORADO

En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 31 de octubre, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por *OLMEDO GARCÍA, MARÍA EUGENIA*, el día 28 de septiembre de 2017, titulada *PAPEL DE LAS CELULAS TUMORALES CIRCULANTES EN EL CARCINOMA DE PULMÓN DE CÉLULAS PEQUEÑAS*, para determinar, si a la misma, se le concede la mención "cum laude", arrojando como resultado el voto favorable de todos los miembros del tribunal.

Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado **resuelve otorgar** a dicha tesis la

MENCIÓN "CUM LAUDE"

Alcalá de Henares, 2 de noviembre de 2017
EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE ESTUDIOS
OFICIALES DE POSGRADO Y DOCTORADO




Juan Ramón Velasco Pérez

Copia por e-mail a:

Doctorando: *OLMEDO GARCÍA, MARÍA EUGENIA*

Secretario del Tribunal: *JOSÉ LUIS GONZÁLEZ LARRIBA*.

Directora de Tesis: *PILAR GARRIDO LÓPEZ*.



Universidad
de Alcalá

ESCUELA DE DOCTORADO
Servicio de Estudios Oficiales de
Posgrado

DILIGENCIA DE DEPÓSITO DE TESIS.

Comprobado que el expediente académico de D./D^a _____
reúne los requisitos exigidos para la presentación de la Tesis, de acuerdo a la normativa vigente, y habiendo
presentado la misma en formato: soporte electrónico impreso en papel, para el depósito de la
misma, en el Servicio de Estudios Oficiales de Posgrado, con el nº de páginas: _____ se procede, con
fecha de hoy a registrar el depósito de la tesis.

Alcalá de Henares a _____ de _____ de 20 _____



Fdo. El Funcionario



Universidad de Alcalá

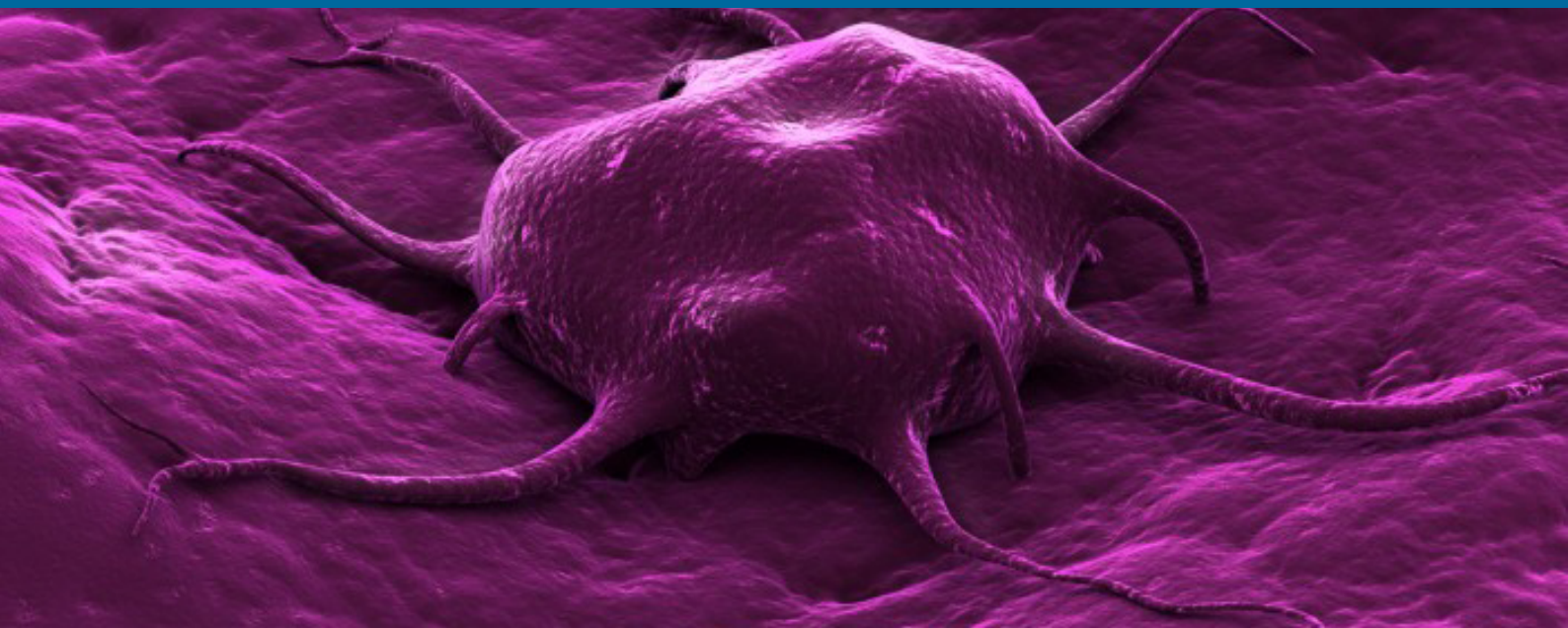
PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA

PAPEL DE LAS CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES EN EL CARCINOMA DE PULMÓN DE CÉLULAS PEQUEÑAS

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR
María Eugenia Olmedo García

DIRECTORA:
Dra. Pilar Garrido López

ALCALÁ DE HENARES, 2017





**Melchor Álvarez de Mon Soto, Catedrático de Medicina y Director del
Departamento de Medicina y Especialidades Médicas**

INFORMA QUE:

En su opinión, el trabajo de investigación presentado por D^a. **M^a Eugenia Olmedo García** titulado “**Papel de las células tumorales circulantes en el carcinoma de pulmón de células pequeñas**”, realizado bajo la dirección de la Dra. Pilar Garrido López, reúne los requisitos científicos, metodológicos, formales y de originalidad suficientes para ser defendido como Tesis Doctoral ante el Tribunal que legalmente proceda.

Y para que conste donde corresponda, a los efectos oportunos, se firma la presente en Alcalá de Henares a veinticuatro de abril de dos mil diecisiete.





Universidad de Alcalá

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina

La **Dra. Pilar Garrido López**, directora de la presente tesis y jefa del departamento de tumores torácicos del servicio de oncología médica del Hospital Universitario Ramón y Cajal,

Certifica:

Que el presente trabajo de investigación titulado: **“El papel de las células tumorales circulantes en el carcinoma de pulmón de células pequeñas”** ha sido realizado bajo su dirección por Dña. M^ª Eugenia Olmedo García, para optar al Grado de Doctora por la Universidad de Alcalá. Este trabajo reúne los criterios científicos, metodológicos y formales para ser presentado y defendido como tesis doctoral.

Madrid, a 24 de abril del 2017

Firma:

Dra Pilar Garrido López

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, debo dar las gracias, a la persona que debo todo lo que soy a nivel profesional, y a la que debo esta tesis, la Dra. Pilar Garrido. Y lo hago orgullosa de quien ha sido mi maestra, la responsable de mi formación desde residente y durante mi trayectoria como oncóloga. Sin duda, nada de lo que tienen entre manos hubiera sido posible sin la capacidad docente, mentora y amiga, de la Dra. Garrido. No puedo dejar de transmitir, mi profundo agradecimiento y admiración a unas de las mujeres que han cambiado la forma de hacer oncología en este país, que pelean cada día por un pronóstico distinto para sus pacientes y un papel distinto para nosotros. Eres una referencia para todos y una referencia para mí. Gracias a ti he conocido una oncología puntera de primer nivel, he visto evolucionar el tratamiento del cáncer y permanecer en esta profesión con la ilusión que necesitamos cada día para seguir en esto. Tu empuje, tu capacidad para la crítica, tu inconformismo con lo que te rodea, nos hace mejorar y avanzar a todos en nuestro día a día. Y yo, tengo la suerte de estar a tu lado.

Por supuesto, debo dar las gracias a la Dra. Julie Earl por su trabajo en la extracción de CTCs y en proporcionarme la base de esta tesis. Siempre colaboradora, ha sabido hacer esto bastante más fácil.

La vida me puso, afortunadamente, a grandes mujeres a mi lado. Mi primer y gran ejemplo fue mi madre. Ella fue la primera que me demostró que nada era suficiente difícil para no conseguirse, que el límite de la superación personal lo ponemos nosotros y que nada ni nadie se puede resistir, cuando estamos convencidos de algo. La que me demostró que una buena dosis de imaginación nos ayuda cada día a visualizar lo que nos gustaría, nuestras metas, sueños y objetivos futuros. Gracias por tus chistes malos y buenos, por tus consejos sublimes basados en una vida de trabajo y amor. Gracias por enfocar lo banal con un prisma distinto y por transformar lo cotidiano en algo mágico. Gracias por permanecer a mi lado cuando creí que te había perdido y por darme una familia maravillosa.

A mi hermano y cuñada, por sus ánimos en este tiempo, por su ayuda siempre y por proporcionarme a la pequeña Jimena que ha sabido alegrar mis días. A mi querida Flor, por trasladarse a mi lado y demostrarme que cuando algo se quiere, se pelea y se consigue. Sin vuestro cariño y vuestra “fe ciega” en mí, hubiese sido más complicado.

Gracias, al amor de mi vida por estar ahí. Tú has compartido conmigo momentos donde la desesperación tomaba partida, donde las tablas, los gráficos, me parecían imposibles e interminables. Gracias por recordarme continuamente las metas y los objetivos de mi vida, por hacer que no se me olvidase porqué lo hacía, y que incluso, hubiese momentos donde disfrutara haciéndolo. No me olvido de tu inestimable ayuda con la estadística. De tus ánimos, de tus consejos interminables y siempre acertados. Cada vez que estaba desesperada por encontrar las palabras adecuadas, salía del despacho, te buscaba, te miraba, me sentaba a tu lado y de repente, todo cambiaba. Gracias por darme una familia política encantadora y divertida que ha sabido comprender mis despistes y el tiempo dedicado a esto. Gracias por acompañarme en el mejor proyecto de mi vida: la pequeña Victoria.

Gracias al Dr Alfredo Carrato, por confiar en mí desde que soy residente, por sus ánimos cada vez que le comentaba mi lucha con esta tesis y su capacidad para prestar ayuda en todo momento.

Gracias a la Dra Gómez y a todo el equipo del que formo parte, porque han aliviado mis días de labor asistencial para que esto fuese posible.

Y por último, a todos los pacientes, y sus familiares, que han participado en este estudio, porque sin ellos, nada de esto hubiese sido posible. Gracias por vuestro interés en la investigación y por vuestro empeño en que todo saliera perfecto.

A mis abuelos,

que siempre pensaron que tenía poderes curativos.

Nunca creí tenerlos ni merecerlos,

Pero gracias a vosotros,

Siempre intentaré conseguirlos.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	12
1.-RESUMEN	14
2.-INTRODUCCIÓN	
2.1.-Situación y manejo del cáncer de pulmón	15
2.2.-Las células tumorales circulantes: generalidades	20
2.3.-Las células tumorales circulantes: valor pronóstico y predictivo en otros tumores	23
2.4.-Las células tumorales circulantes: Carcinoma pulmonar no células pequeñas (CPNCP)	24
2.5.-Las células tumorales circulantes: carcinoma pulmonar de células pequeñas (CPCP)	25
2.6.-Las células tumorales circulantes en el futuro del cáncer de pulmón.	26
3.-HIPÓTESIS DE TRABAJO	29
4.-OBJETIVOS	30
5.-METODOLOGÍA	
5.1.-Diseño	31
5.2.-Variables	31
5.3.-Método	32
5.4.-Procesamiento de las muestras y técnicas utilizadas	32
5.5.-Procesamiento de la información	35
5.6.-Análisis estadístico	35
5.7.-Implicaciones éticas	36
6.-ESTRUCTURA DE TRABAJO	
6.1.-Esquema de reclutamiento y seguimiento	37
6.2.-Cronograma temporal	37
7.-EXPOSICIÓN DE LOS RESULTADOS	
7.1.-Descripción de la población	38
7.1.1.-Características generales de la serie global	38
7.1.2.-CPNCP	40
7.1.2.1.-Características de la muestra	40
7.1.2.2.-Estadio y tratamiento en los pacientes CPNCP	40
7.1.3.3.-Respuesta al tratamiento en los pacientes CPNCP	42
7.1.3.4.-Supervivencia en los pacientes CPNCP	43
7.1.3.-CPCP	45
7.1.3.1.-Características de la muestra	45
7.1.3.2.-Estadio y tratamiento en los pacientes CPCP	47
7.1.3.3.-Respuesta al tratamiento en los pacientes CPCP	48
7.1.3.4.-Supervivencia en los pacientes CPCP	49
7.2.-Células tumorales circulantes (CTCs): Descriptivo	51
7.2.1.-Células tumorales circulantes en la serie global	51
7.2.2.-Células tumorales circulantes en pacientes con CPNCP	52
7.2.3.-Células tumorales circulantes en pacientes con CPCP	53
7.2.3.1.- Punto de corte y capacidad discriminativa en CPCP. Curvas ROC	54
7.2.3.2.-Probabilidad diagnóstica de las CTCs ≥ 50 . Estudio del valor predictivo de las CTCs ≥ 50	55
7.3.-CTCs basales en el CPCP	57
7.3.1.-Correlación entre las CTCs basales y las características clínicas de los pacientes con CPCP	57
7.3.2.-CTC basal: Valor pronóstico	66
7.3.3.-CTC basal: valor predictivo de respuesta a tratamiento	68

7.4.- CTCs tras 2 ciclos	70
7.4.1.- Valor pronóstico de las CTCs tras 2 ciclos	70
7.4.2.- Valor pronóstico de los cambios de las CTCs tras 2 ciclos	72
7.4.3.- Valor predictivo de respuesta de la presencia de CTCs tras 2 ciclos y los cambios experimentados con respecto al basal	75
7.5.- CTCs a la progresión	78
7.5.1.- Valor pronóstico de las CTCs a la progresión	78
7.5.2.- Valor pronóstico de los cambios en los niveles de CTCs entre el valor de CTC basal y CTC a la progresión	81
7.6.- Análisis univariante y multivariante	83
7.6.1.- Análisis univariante	83
7.6.2.- Análisis multivariante	86
<hr/>	
8.-DISCUSIÓN	
8.1.- Nuestra muestra de pacientes	89
8.2.- Células tumorales circulantes en nuestra población	90
8.3.- Punto de corte y capacidad discriminativa de las Células tumorales circulantes en el CPCP	92
8.4.- Células tumorales circulantes basales	95
8.4.1.- Correlación entre las CTCs basales y las características clínicas de los pacientes con CPCP	95
8.4.2.- CTC basal: Valor pronóstico	96
8.4.3.- CTC basal: valor predictivo de respuesta a tratamiento	98
8.5.- Células tumorales circulantes tras 2 ciclos	99
8.5.1.- CTCs tras 2 ciclos: Valor pronóstico	99
8.5.2.- Valor pronóstico de los cambios de las CTCs tras 2 ciclos	100
8.5.3.- Valor predictivo de respuesta de la presencia de CTCs tras 2 ciclos y los cambios experimentados con respecto al basal	102
8.6.- Células tumorales circulantes a la progresión en el CPCP	104
8.6.1.- Valor pronóstico de las CTCs a la progresión	104
8.6.2.- Valor pronóstico de los cambios en los niveles de CTCs entre el valor de CTC basal y CTC a la progresión	104
8.7.- Análisis univariante y multivariante para supervivencia global y supervivencia libre de progresión	105
<hr/>	
9.-LIMITACIONES Y FORTALEZAS	108
<hr/>	
10.-CONCLUSIONES	109
<hr/>	
ANEXOS	
ANEXO I. APROBACIÓN COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA	110
ANEXO II. HOJA DE INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO	111
<hr/>	
BIBLIOGRAFÍA	114

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS 271 PACIENTES CON CARCINOMA PULMONAR	39
TABLA 2. ALTERACIONES MOLECULARES ANALIZADAS EN LOS PACIENTES CON CPNCP	40
TABLA 3. RELACIÓN DE FÁRMACOS EMPLEADOS COMO TRATAMIENTO SISTÉMICO EN EL CPNCP EN TODOS LOS ESTADIOS	42
TABLA 4. RESPUESTAS OBTENIDAS POR RECIST V1.1 EN PACIENTES CON CPNCP	42
TABLA 5. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE 48 PACIENTES CON CPCP	46
TABLA 6. TRATAMIENTO DE LOS PACIENTES CPCP EN FUNCIÓN DE LA CLASIFICACIÓN VALG	48
TABLA 7. RESPUESTAS OBTENIDAS POR RECIST V1.1 EN PACIENTES CON CPCP	49
TABLA 8. BENEFICIO CLINICO EN PACIENTES CON CPCP	49
TABLA 9. NIVELES DE CTCs EN CPCP BASALES, TRAS 2 CICLOS Y A LA PROGRESIÓN	53
TABLA 10. RESPUESTAS DE LOS PACIENTES ANALIZADOS CON CPCP EN LOS 3 MOMENTOS (BASAL, TRAS 2 CICLOS Y A LA PROGRESIÓN)	54
TABLA 11. TABLA 2X2 DE EVALUACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS: CTC \geq 50	56
TABLA 12. RESULTADOS DE TABLA 2 X2	57
TABLA 13. TABLA DE CONTINGENCIA: SEXO – CTC BASAL \geq 1 VERSUS CTC = 0	58
TABLA 14. TABLA DE CONTINGENCIA: SEXO – CTC BASAL \geq 50 VERSUS CTC BASAL <50	58
TABLA 15. TABLA DE CONTINGENCIA: EDAD – CTC BASAL \geq 1 VERSUS CTC =0	59
TABLA 16. TABLA DE CONTINGENCIA: EDAD – CTC BASAL \geq 50 VERSUS CTC <50	59
TABLA 17. TABLA DE CONTINGENCIA: ECOG – CTC BASAL \geq 1 VERSUS CTC = 0	60
TABLA 18. TABLA DE CONTINGENCIA: ECOG – CTC BASAL \geq 50 VERSUS CTC <50	60
TABLA 19. TABLA DE CONTINGENCIA: ESTADIO DE ENFERMEDAD-CTC \geq 1 VERSUS CTC = 0	61
TABLA 20. TABLA DE CONTINGENCIA: ESTADIO DE ENFERMEDAD-CTC \geq 50 VERSUS CTC <50	61
TABLA 21. TABLA DE CONTINGENCIA: METÁSTASIS CEREBRALES – CTC BASAL \geq 1 VERSUS CTC =0	62
TABLA 22. TABLA DE CONTINGENCIA: METÁSTASIS CEREBRALES – CTC BASAL \geq 50 VERSUS CTC <50	62
TABLA 23. TABLA DE CONTINGENCIA: METÁSTASIS ÓSEAS – CTC BASAL \geq 1 VERSUS CTC =0	63
TABLA 24. TABLA DE CONTINGENCIA: METÁSTASIS ÓSEAS – CTC BASAL \geq 50 VERSUS CTC <50	63
TABLA 25. TABLA DE CONTINGENCIA: METÁSTASIS HEPÁTICAS – CTC BASAL \geq 1 VERSUS CTC =0	64
TABLA 26. TABLA DE CONTINGENCIA: METÁSTASIS HEPÁTICAS – CTC BASAL \geq 50 VERSUS CTC <50	64

TABLA 27. TABLA DE CONTINGENCIA: METÁSTASIS SUPRARRENALES – CTC BASAL ≥ 1 VERSUS CTC = 0	65
TABLA 28. TABLA DE CONTINGENCIA: METÁSTASIS SUPRARRENALES – CTC BASAL ≥ 50 VERSUS CTC < 50	65
TABLA 29. RELACIONES ENCONTRADAS ENTRE LOS SITIOS DE METASTASIS Y LOS NIVELES DE CTC BASAL	65
TABLA 30. ASOCIACIÓN DE CTCs BASALES=0 VERSUS CTCs BASALES ≥ 1 CON RESPUESTA AL TRATAMIENTO	69
TABLA 31. ASOCIACIÓN DE CTCs BASALES < 50 VERSUS CTCs BASALES ≥ 50 CON RESPUESTA AL TRATAMIENTO	69
TABLA 32. VALORES DE CTC TRAS 2 CICLOS DE LOS 25 PACIENTES	70
TABLA 33. CAMBIOS EXPERIMENTADOS EN EL NIVEL DE CTCs BASAL Y CTCs TRAS 2 CICLOS DE QUIMIOTERAPIA	73
TABLA 34. CATEGORÍAS DE LOS CAMBIOS EXPERIMENTADOS EN EL NIVEL DE CTCs BASAL Y CTCs TRAS 2 CICLOS DE QUIMIOTERAPIA	74
TABLA 35. RELACIÓN ENTRE EL TIPO DE RESPUESTA OBTENIDA Y LOS CAMBIOS EN LOS NIVELES DE CTCs	76
TABLA 36. ASOCIACIÓN DE CTCs TRAS 2 CICLOS =0 VERSUS CTCs TRAS 2 CICLOS ≥ 1 CON RESPUESTA AL TRATAMIENTO	78
TABLA 37. VALOR DE CTCs A LA PROGRESIÓN	79
TABLA 38. CAMBIOS EXPERIMENTADOS EN EL NIVEL DE CTCs BASAL Y CTCs A LA PROGRESIÓN	81
TABLA 39. CATEGORÍAS DE LOS CAMBIOS EXPERIMENTADOS EN EL NIVEL DE CTCs BASAL Y CTCs EN EL MOMENTO DE LA PROGRESIÓN	82
TABLA 40. ANÁLISIS UNIVARIANTE DE FACTORES PRONÓSTICOS DE SUPERVIVENCIA GLOBAL EN CPCP	84
TABLA 41. ANÁLISIS UNIVARIANTE DE FACTORES PRONÓSTICOS DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN EN CPCP	85
TABLA 42. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE FACTORES PREDICTIVOS DE SUPERVIVENCIA GLOBAL EN CPCP. MODELO 1	86
TABLA 43. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE FACTORES PREDICTIVOS DE SUPERVIVENCIA GLOBAL EN CPCP. MODELO 2	87
TABLA 44. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE FACTORES PREDICTIVOS DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN EN CPCP.	88

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA A.- DISTINTOS EJEMPLOS DE CTCs MARCADAS CON CK Y DAPI, IDENTIFICADAS MEDIANTE EL MÉTODO CELLSEARCH SYSTEM® (JANSSEN DIAGNOSTICS, LLC, 2016)	21
FIGURA B.- COMPONENTES DEL CELLSEARCH SYSTEM®	34
FIGURA 1: ESQUEMA DEL ESTUDIO	38
FIGURA 2: FUNCIÓN KAPLAN-MEIER DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN CPNCP	43
FIGURA 3: FUNCIÓN KAPLAN-MEIER DE SUPERVIVENCIA GLOBAL CPNCP	44
FIGURA 4: FUNCIÓN KAPLAN-MEIER PARA LA SLP EN PACIENTES CON CPNCP EN FUNCIÓN DEL ESTADIO	44
FIGURA 5: FUNCIÓN KAPLAN-MEIER PARA LA SG EN PACIENTES CON CPNCP EN FUNCIÓN DEL ESTADIO	45
FIGURA 6: FUNCIÓN KAPLAN-MEIER DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN CPCP	50
FIGURA 7: FUNCIÓN KAPLAN-MEIER DE SUPERVIVENCIA GLOBAL CPCP	50
FIGURA 8: FUNCIÓN KAPLAN-MEIER DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN CPCP EN FUNCIÓN DEL ESTADIO	51
FIGURA 9: FUNCIÓN KAPLAN-MEIER DE SUPERVIVENCIA GLOBAL CPCP EN FUNCIÓN DEL ESTADIO	51
FIGURA 10 : NÚMERO DE CTCs SEGÚN HISTOLOGÍA.	52
FIGURA 11: CAPACIDAD DISCRIMINATIVA DE LA CURVA ROC PARA LAS CTCs BASALES EN FUNCIÓN DE BENEFICIO CLÍNICO	55
FIGURA 12: FUNCIÓN KAPLAN-MEIER DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN EN CPCP. CTC ≥ 1 VERSUS CTC=0	66
FIGURA 13: FUNCIÓN KAPLAN-MEIER DE SUPERVIVENCIA GLOBAL EN CPCP. CTC ≥ 1 VERSUS CTC=0	67
FIGURA 14: FUNCIÓN KAPLAN-MEIER DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN EN CPCP. CTC < 50 versus ≥ 50	68
FIGURA 15: FUNCIÓN KAPLAN-MEIER DE SUPERVIVENCIA GLOBAL EN CPCP. CTC < 50 VERSUS CTC ≥ 50	68
FIGURA 16: FUNCIÓN KAPLAN-MEIER DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN EN CPCP. CTC TRAS 2 CICLOS < 50 VERSUS CTC TRAS 2 CICLOS ≥ 50	71
FIGURA 17: FUNCIÓN KAPLAN-MEIER DE SUPERVIVENCIA GLOBAL EN CPCP. CTC TRAS 2 CICLOS < 50 VERSUS CTC TRAS 2 CICLOS ≥ 50	71
FIGURA 18: FUNCIÓN KAPLAN-MEIER DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN EN CPCP. CTC TRAS 2 CICLOS =0 VERSUS CTC TRAS 2 CICLOS ≥ 1	72
FIGURA 19: FUNCIÓN KAPLAN-MEIER DE SUPERVIVENCIA GLOBAL EN CPCP. CTC TRAS 2 CICLOS =0 VERSUS CTC TRAS 2 CICLOS ≥ 1	72
FIGURA 20: FUNCIÓN KAPLAN-MEIER DE SUPERVIVENCIA GLOBAL EN CPCP. CAMBIO DE CTC (BASAL/TRAS 2 CICLOS)	75
FIGURA 21: FUNCIÓN KAPLAN-MEIER DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN EN CPCP. CAMBIO DE CTC (BASAL/TRAS 2 CICLOS)	75

FIGURA 22: RELACIÓN ENTRE BENEFICIO CLINICO Y LOS CAMBIOS EN EL NIVEL DE CTCs. 25 pacientes	76
FIGURA 22A: RELACIÓN ENTRE BENEFICIO CLINICO Y LOS CAMBIOS EN EL NIVEL DE CTCs. 5 pacientes con CTCs basales >100	77
FIGURA 22B: RELACIÓN ENTRE BENEFICIO CLINICO Y LOS CAMBIOS EN EL NIVEL DE CTCs. 20 pacientes con CTCs basales <100	77
FIGURA 23: FUNCIÓN KAPLAN-MEIER DE SUPERVIVENCIA GLOBAL. CTCs A LA PROGRESIÓN(AUSENCIA O PRESENCIA)	80
FIGURA 24: FUNCIÓN KAPLAN-MEIER DE SUPERVIVENCIA GLOBAL. CTCs A LA PROGRESIÓN (<50 VERSUS ≥50)	80
FIGURA 25: CAMBIOS ENTRE EL NIVEL DE CTCs BASALES Y EN EL MOMENTO DE LA PROGRESIÓN	82
FIGURA 26: FUNCIÓN KAPLAN-MEIER DE SUPERVIVENCIA GLOBAL. CAMBIOS DE VALOR ENTRE CTC BASAL/PROGRESIÓN	83

ABREVIATURAS

ALK	ANAPLASTIC LYMPHOMA KINASE
AUC	ÁREA BAJO LA CURVA
BRAF	B-RAF MURINE SARCOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG B1
CPCP	CARCINOMA PULMONAR DE CÉLULAS PEQUEÑAS
CPNCP	CARCINOMA PULMONAR NO CÉLULAS PEQUEÑAS
CTL4	CYTOTOXIC T LYMPHOCYTE-ASSOCIATED ANTIGEN 4
CK	CITOQUERATINAS DE LA MOLÉCULA EPITELIAL DE ADHESIÓN CELULAR
CTCs	CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES
DAPI	4',6-DIAMINO-2-FENILINDOL
ECOG	EASTERN COOPERATIVE ONCOLOGY GROUP
ED	ENFERMEDAD DISEMINADA
EE	ENFERMEDAD ESTABLE POR CRITERIOS RECIST v1.1
EGFR	EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR
EL	ENFERMEDAD LIMITADA
EML4-ALK	ECHINODERM MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN-LIKE 4- ANAPLASTIC LYMPHOMA KINASE
EPCAM	EPITHELIAL CELLULAR ADHESIÓN
EPOC	ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRONICA
FDA	FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION
HER2	HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR 2
HR	HAZART RATIO
IASLC	ASOCIACIÓN INTERNACIONAL PARA EL ESTUDIO DEL CÁNCER DE PULMÓN
ILE	INTERVALO LIBRE DE ENFERFEMEDAD
ISSET	AISLAMIENTO POR TAMAÑO DE LAS CÉLULAS TUMORALES EPITELIALES
ITK	INHIBIDORES TIROSIN-CINASA
KM	KAPLAN-MEIER

KRAS	KIRSTEN RAT SARCOMA 2 VIRAL ONCOGENE HOMOLOG
LDH	LACTATO DESHIDROGENASA
LR	RAZONES DE VEROSIMILITUD (LIKELIHOOD RATIOS)
MBE	MEDICINA BASADA EN LA EVIDENCIA
MUC1	MUCINA 1
NSE	ENOLASA NEUROESPECÍFICA
OR	ODDS RATIO
PCI	PROPHYLACTIC CRANIAL IRRADIATION
PD-1	PROGRAMMED CELL DEATH PROTEIN 1
PD-L1	PROGRAMMED DEATH-LIGAND 1
PG	PROGRESIÓN DE ENFERMEDAD SEGÚN CRITERIOS RECIST v1.1
PSA	ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO
QT	QUIMIOTERAPIA
RC	RESPUESTA COMPLETA POR CRITERIOS RECIST v1.1
RECIST 1.1	Response Evaluation Criteria for Solid Tumors
RO	TASA DE RESPUESTAS OBJETIVAS
RP	RESPUESTA PARCIAL POR CRITERIOS RECIST v1.1
RR	RIESGO RELATIVO
RT	RADIOTERAPIA
RT-PCR	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA TRANSCRIPTASA INVERSA
SG	SUPERVIVENCIA GLOBAL
SNC	SISTEMA NERVIOSO CENTRAL
SLP	SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN
TAC	TOMOGRAFIA AXIAL COMPUTERIZADA
VALG	VETERANS' ADMINISTRATION LUNG CANCER GROUP

1.- RESUMEN

El cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) es uno de los tumores sólidos más sensibles a quimioterapia y radioterapia, pero las respuestas son de escasa duración y la eficacia de tratamiento de rescate muy pobre.

El objetivo de este estudio es evaluar la presencia y el significado clínico de las células tumorales circulantes (CTCs) en pacientes con CPCP, determinadas mediante CellSearch System® (Janssen Diagnostics, LLC, 2016), mediante la extracción de sangre antes del tratamiento, tras dos ciclos de quimioterapia y a la progresión de enfermedad. Para ello hemos analizado 271 pacientes con cáncer de pulmón, de los cuales, 48 pacientes tenían CPCP, reclutados desde marzo de 2012 a septiembre de 2014 en el servicio de oncología médica del hospital Universitario Ramón y Cajal.

La tasa de detección de CTCs antes del tratamiento fue mayor en los pacientes con CPCP (66.6%) que en los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (21.5%). En los pacientes con CPCP, encontramos que el 66.6% tuvo al menos una CTC en la muestra basal, un 30% tuvo al menos una CTC tras 2 ciclos y el 71% de los pacientes tuvieron CTCs a la progresión. Los niveles basales de CTCs ≥ 50 se correlacionaron con enfermedad diseminada, las metástasis óseas, hepáticas, suprarrenales al diagnóstico y con peor ECOG (2 ó 3).

Los pacientes con CTCs basales ≥ 50 mostraron también peor supervivencia global (SG) (HR 2.13, p 0.04), peor supervivencia libre de progresión (SLP) (HR 2.2, p 0.017), así como un mayor riesgo de progresión frente al grupo con CTC <50 , (OR 6, p=0.007).

La presencia de CTCs tras 2 ciclos se asoció a una menor SG (HR 1.86; p 0.026) y a un mayor riesgo de progresión tumoral (OR 10.7, p 0.012), mientras que los valores de CTC tras 2 ciclos ≥ 50 se asociaron a peor SG (HR 32, p 0.003) y además a peor SLP (HR 9, p 0.007). Los incrementos en el valor basal de CTCs tras 2 ciclos de tratamiento se asociaron con peor SLP (HR 14, p 0.003), con una tendencia a peor SG (HR 2.79, p 0.12) y con menor respuesta tumoral (rs 0.7, p 0.0001).

Los valores de CTCs a la progresión ≥ 50 se asociaron a una menor SG con una HR 16; p 0.016.

En el análisis multivariante las CTCs tras 2 ciclos ≥ 50 fue una variable pronóstica independiente para la SG frente a factores tradicionales como el ECOG o el estadio, mientras que los incrementos de CTCs tras 2 ciclos con respecto al basal lo fueron para la SLP.

2.- INTRODUCCIÓN

2.1.-Situación y manejo del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es la primera causa de muerte por cáncer en el mundo falleciendo cada año más de un 1.500.000 de pacientes. Según los datos publicados por GLOBOCAN en 2012, en España se espera que haya 31123 casos incidentes de cáncer de pulmón para el año 2020 siendo la primera causa de muerte por cáncer en varones y la tercera en mujeres.¹⁻² El cáncer de pulmón clásicamente se divide en dos grandes grupos histológicos: carcinoma de pulmón de célula no pequeña (CPNCP) y carcinoma de pulmón de célula pequeña (CPCP).³ La tasa de incidencia de este último, se sitúa en torno al 10-15% del cáncer de pulmón, frente a los diagnosticados de CPNCP que en la actualidad son casi el 85%.⁴

El CPNCP engloba pacientes con diferentes subtipos histológicos (carcinoma epidermoide, adenocarcinoma y carcinoma de células grandes) que tradicionalmente se han tratado de la misma forma. Sin embargo, las diferencias en eficacia y toxicidad de tratamientos frecuentemente utilizados en pacientes con enfermedad avanzada han tenido como consecuencia un renovado interés por la histología, con cambios en la nueva clasificación⁵ que son aplicables fundamentalmente a pacientes con metástasis y divididos de cara al tratamiento en tumores escamosos y no escamosos. Todos los pacientes con CPNCP se estadifican de acuerdo a la clasificación TNM 8º edición, donde la T equivale a tumor, la N a la afectación ganglionar y la M a la afectación a distancia.⁶ Alrededor del 70% siguen debutando con estadios III (localmente avanzados) y IV (metastásicos) donde las actuales estrategias terapéuticas no son curativas

En los estadios avanzados, los regímenes de quimioterapia con platino mejoran la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes,⁷ aunque los fármacos más modernos como los agentes antiangiogénicos⁸ ó pemetrexed⁹ solo son una opción de tratamiento en pacientes con tumores de histología no escamosa.

Afortunadamente la supervivencia de algunos subgrupos de pacientes con CPNCP con enfermedad metastásica se ha visto mejorada con la identificación de alteraciones moleculares que permiten orientar el tratamiento. En particular, las mutaciones activadoras en el gen que codifica para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR *Epi-dermal Growth Factor Receptor*) nos definen un subgrupo de pacientes con sensibilidad a fármacos orales inhibidores de la tirosin-cinasa (ITK) de EGFR. Estas mutaciones están presentes en torno al 10%-15% de los CPCNP no escamosos aunque está aumentada en los pacientes no fumadores, mujeres y asiáticos.¹⁰ Otra alteración genética de importancia para la toma de decisiones en el tratamiento de estos pacientes, involucra a los reordenamientos del gen ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*), que permiten identificar pacientes sensibles a tratamiento con fármacos orales inhibidores de ALK. Están presentes en el 3-7% de los CPNCP no escamosos y son más frecuentes en no fumadores.¹¹

Con la excepción de los subgrupos de pacientes con alteraciones moleculares antes comentados, la progresión tras el tratamiento de primera línea suele acontecer a los pocos meses del debut de enfermedad, y en los pacientes que mantienen buen estado general (2/3 aproximadamente), se plantea tratamiento de segunda línea. Hasta hace 2 años, en pacientes con histología escamosa, solo teníamos dos fármacos con indicación aprobada (docetaxel y erlotinib) a lo que se añadía una tercera opción (pemetrexed) en pacientes con histología no escamosa.¹²⁻¹⁴ De ellos, erlotinib se utilizaba muy poco, salvo en tumores con mutaciones activadoras de EGFR y pemetrexed se utilizaba en primera línea.¹⁵⁻¹⁶

Desde esta fecha, el arsenal terapéutico de la segunda línea se ha modificado considerablemente, aprobándose varios fármacos inmunoterápicos (nivolumab y pembrolizumab) para ambas histologías y fármacos antiangiogénicos (nintedanib y ramucirumab) en combinación con docetaxel en el contexto de la histología no escamosa.^{17,18}

Los esfuerzos para restaurar la inmunidad antitumoral se han centrado en las intervenciones basadas en anticuerpos dirigidos CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4) y PD-1 (*Programmed cell death protein 1*) en linfocitos T y su principal ligando (PD-L1 *Programmed death-ligand 1*) en las células tumorales. El ipilimumab, un anticuerpo totalmente humanizado dirigido contra CTLA-4, restaura la inmunidad tumoral en fase inicial, mientras que los fármacos anti-PD-1 / anti-PD-L1 la restauran a nivel de microambiente tumoral. Aunque ipilimumab puede producir respuestas duraderas a largo plazo en pacientes con tumores avanzados, se asocia con una importante toxicidad relacionada con la inmunidad.²⁴⁻²⁹ En contraste, anticuerpos dirigidos contra PD-1 o PD-L1 han producido importante actividad antitumoral con una toxicidad considerablemente menor.¹⁹⁻²³

Tradicionalmente el manejo terapéutico ha sido diferente para los pacientes con el subtipo histológico de CPCP, debido a su comportamiento agresivo, su tendencia a la metastatización (70% de pacientes con enfermedad diseminada al diagnóstico) y la escasa duración de la respuesta a la quimioterapia (QT), lo que lo convierte en un tumor con una agresividad elevada. Sin tratamiento su curso es fatal en el plazo de pocas semanas.

A diferencia de otros tumores, la clasificación por estadios más utilizada es la VALG (*"Veterans' Administration Lung Cancer Group"*), según la cual más de dos tercios de los pacientes con CPCP tienen enfermedad diseminada (ED) en el momento del diagnóstico, que se define como el tumor que no se limita a un hemitórax o con derrame pleural maligno. El resto de los pacientes son diagnosticados como enfermedad limitada, definido como tumor que está confinado a un hemitórax, afecta a los ganglios ipsilaterales, los ganglios del mediastino, o supraclaviculares, y que entra dentro del campo de radiación.³⁰

En el 2016, la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC) aprobó los cambios propuestos en el sistema de estadificación TNM para el CPNCP. Estos cambios en el sistema TNM del cáncer de pulmón se han incorporado en la edición 8 de AJCC (2016), que recomienda la estadificación TNM para el CPCP, al igual que para

el CPNCP, basándose en una base de datos que comprende a 94.708 pacientes (6189 pacientes con CPCP) que fueron diagnosticados alrededor del mundo entre 1999-2010.³¹

Por lo tanto, cuando hablemos de enfermedad limitada, nos estaremos refiriendo a estadios del I-III de la clasificación TNM, mientras que enfermedad diseminada es equiparable a los estadios IV.

En los pacientes con enfermedad limitada, la radioterapia (RT) torácica se utiliza como parte del tratamiento combinado con quimioterapia, obteniéndose una menor tasa de recaídas locales y sobre todo, un mayor porcentaje de largos supervivientes (9% con QT sola y 20-25% con QT/RT)^{32,33}. La recomendación actual es realizar la irradiación de forma precoz y concurrente con la quimioterapia³⁴, de esta forma se consigue una supervivencia media de 12-20 meses. A pesar de ello, la progresión es la norma, de forma que no más del 6% -12% de pacientes están vivos a 5 años. La irradiación craneal profiláctica (PCI), empleada en pacientes sin afectación metastásica cerebral que alcanzan respuesta completa, es útil para disminuir la incidencia de progresiones en el sistema nervioso central (SNC) que desciende en más de un 50%. Un metaanálisis con 7 ensayos aleatorizados demuestra, además, incremento de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global con este tratamiento, de forma que se pasa del 15% de supervivencia global a tres años al 21%.³⁵

En la enfermedad diseminada, el tratamiento está basado en QT, siendo el régimen más habitual una combinación de 2 fármacos que contenga platino-etopósido, con una tasa de respuestas en torno al 75-80%. Entre los fármacos clásicos activos existen más combinaciones tales como el régimen CAV (ciclofosfamida, vincristina, adriamicina), ICE (ifosfamida, carboplatino y etopósido) y ACE (adriamicina, ciclofosfamida y etopósido) de las que existe mucha experiencia.³⁶ El hecho de que el régimen de platino-etopósido sea el más empleado, se debe a que tiene menos toxicidad cardiaca, mielosupresión y neurotoxicidad, comparado a los anteriores y a que el cisplatino continúa siendo el fármaco clave. El metaanálisis del año 2000 observó una reducción del 20% en la mortalidad a 1 año si se empleaba cisplatino comparado con combinaciones sin platino.³⁷

A pesar de conseguir un elevado número de respuestas, la mediana de duración de respuesta es corta, con una supervivencia media de 9-12 meses, y una tasa de supervivencia a 5 años de sólo el 2%.^{38,39} Entre los intentos de obtener mejores resultados de las combinaciones de primera línea, los resultados más alentadores procedían de un estudio fase III japonés, realizado en pacientes con enfermedad diseminada que comparaba cisplatino-etopósido con cisplatino-irinotecan. Este estudio obtuvo una mejoría significativa tanto en tasa de respuestas (84% vs 68%; $p:0,02$) como en supervivencia libre de enfermedad (6,9 meses vs 4,8 meses) y en supervivencia global (12,8 meses vs 9,4 meses).⁴⁰ Lamentablemente, dos estudios confirmatorios no han refrendado en población caucásica lo obtenido en población asiática, por lo que cisplatino-etopósido sigue siendo el estándar en nuestro medio.^{41,42}

En un ensayo aleatorizado con 784 pacientes, la combinación de topotecan oral administrado con cisplatino durante 5 días no se observó que fuera superior al etopósido y cisplatino.⁴³

Además de nuevas combinaciones de quimioterapia, otras estrategias han sido estudiadas con el fin de mejorar los resultados de la primera línea, en un intento de revertir la resistencia farmacológica como principal responsable del fracaso de los tratamientos. Algunos ejemplos son:

- Quimioterapia de mantenimiento: No ha mejorado los resultados frente al tratamiento estándar.⁴⁴
- Quimioterapia alternante: Aunque parece mejorar el porcentaje de respuestas objetivas, la toxicidad es excesiva y no mejora la supervivencia de pacientes con ED.^{45,46}
- Intensificación de dosis: De nuevo los resultados, incluido un metaanálisis sugieren que aunque aumente el porcentaje de respuestas, también lo hace la toxicidad.⁴⁷

Debido a los resultados negativos de estas estrategias, la recomendación de tratamiento de primera línea para pacientes con ED sigue siendo administrar entre 4 y 6 ciclos de platino y etopósido.

Tradicionalmente utilizada solo en pacientes con EL, la radioterapia torácica se ha convertido en parte del tratamiento de los pacientes con ED que consiguen una buena respuesta con quimioterapia. En un estudio reciente, Slotman y colaboradores, informan de beneficio en supervivencia libre de progresión a 6 meses para los tratados con radioterapia torácica frente a los no tratados (24% versus 7%, $p < 0.001$) pero no en supervivencia global a 1 año. En un análisis secundario se obtuvo beneficio en supervivencia a 2 años con 13% de pacientes vivos en la rama tratada con radioterapia versus 3% en la rama control, $p = 0.004$.⁴⁸ Por último, el uso de la PCI también se ha extendido a pacientes con ED que logran una respuesta completa o parcial a la quimioterapia. Un ensayo fase III mostró que, en pacientes que respondieron a la quimioterapia, la radioterapia craneal profiláctica disminuía la incidencia de metástasis en el SNC y mejoraba el control de síntomas con una tasa de supervivencia a 1 año del 13,3% en el grupo control y 27,1% en el grupo tratado ($p = 0,003$).⁴⁹

Como hemos mencionado anteriormente, el CPCP es uno de los tumores sólidos más sensibles a quimioterapia y radioterapia, pero a diferencia de los linfomas, las respuestas son de escasa duración y la eficacia de tratamiento de rescate muy pobre, lo que explica la escasa supervivencia de estos pacientes. La decisión de tratamiento de segunda línea (a la progresión/recaída) viene dada por variables como el estado general del paciente, la localización de la progresión/recaída, la respuesta obtenida a la primera línea, la modalidad terapéutica utilizada como primera línea y el intervalo libre de enfermedad (ILE) transcurrido desde entonces.⁵⁰

Como en otros tumores quimiosensibles, se han descrito dos categorías principales de pacientes que reciben quimioterapia de segunda línea: platino- sensibles y platino-re-

sistentes. Los pacientes sensibles presentan una respuesta a la primera línea que dura más de 90 días (intervalo libre de enfermedad > 90 días). Estos pacientes presentan los mayores beneficios ante la quimioterapia de segunda línea y responden al régimen inicial en aproximadamente un 50% de los casos.⁵¹ Entre los fármacos más estudiados en segunda línea destaca topotecan. Von Pawel y cols, compararon como regímenes de segunda línea ciclofosfamida, doxorrubicina y vincristina (CAV) versus topotecan (inhibidor de la topoisomerasa I) en pacientes con enfermedad sensible. No se notificaron diferencias significativas en las tasas de respuestas o supervivencia, pero la calidad de vida fue mejor con topotecan.⁵² En un ensayo en fase III en el que se comparó topotecan con los mejores cuidados de soporte en pacientes con recidiva de CPCP, se demostró que añadir topotecan oral a los cuidados de soporte aumentaba de forma significativa la supervivencia global y había un mejor control de los síntomas en comparación con los cuidados de soporte solos. En este estudio se habían incluido 141 pacientes de CPCP quimiosensible o quimiorresistente que no eran aptos para quimioterapia intravenosa estándar. La mediana de supervivencia en los pacientes que recibieron topotecan más cuidados de soporte fue 25,9 semanas versus 13,9 semanas con cuidados de soporte solos (P = 0,01).⁵³ Eckardt y cols, en un ensayo aleatorizado fase III con 304 pacientes, evaluaron el uso del topotecan oral (2,3 mg/m²/por día durante 5 días cada 21 días) frente a topotecan intravenoso (1,5 mg/m²/por día durante 5 días cada 21 días) como fármacos de segunda línea en CPCP. Las tasas de respuesta no mostraron diferencias estadísticamente significativas (18,3 y 21,9 %, respectivamente). Los criterios secundarios de valoración de mediana de supervivencia y tasas de supervivencia a 1 año también fueron similares (33 vs. 35 semanas y 33 vs. 29 %, respectivamente). Los pacientes que recibieron topotecan oral experimentaron menos neutropenia de grado 4 (47 vs. 64,2 %), pero más diarrea de todos los grados (35,9 vs. 19,9 %) que con topotecan intravenoso. El análisis de calidad de vida no mostró diferencias significativas entre los dos grupos.⁵⁴

Por lo tanto, en los pacientes con CPCP en segunda línea de tratamiento, se pueden utilizar fármacos no utilizados previamente, como los inhibidores de topoisomerasa I (topotecan). Las respuestas a segunda línea suelen oscilar entre 18 - 28% en recaída sensible y escasa en pacientes resistentes (menos del 10% de respuestas). La duración de la respuesta suele ser breve y las medianas de supervivencia inferiores a 3-6 meses.^{55,56}

A pesar de una ingente investigación, los avances en los últimos 20 años en este campo son escasos. En un intento de mejorar estos pobres resultados se han explorado diferentes estrategias tanto con fármacos quimioterápicos como con terapias dirigidas, pero ninguna ha tenido éxito hasta la fecha,^{57,58} si bien los resultados de los ensayos en marcha con estrategias de inmunoterapia son prometedores. El estudio fase II con ipilimumab más quimioterapia estándar sugiere un beneficio terapéutico adicional en CPCP⁵⁹ y ha abierto una puerta al tratamiento de CPCP con inmunoterapia. Un ensayo clínico fase III que compara la combinación de etopósido / platino asociado o no a ipilimumab ayudará a definir el papel de los inmunosupresores de este tipo de pacientes con CPCP y enfermedad diseminada. Así mismo, los estudios que comparan fármacos anti-PD1 como nivolumab +/- ipilimumab frente a quimioterapia se encuentran actualmente en fase II/III.⁶⁰

En cualquier caso, los resultados actuales del tratamiento son escasos y por ello, ahora que tenemos nuevas expectativas de tratamiento es importante identificar factores predictivos de respuesta o toxicidad que nos ayuden a identificar los subgrupos de pacientes que más se puedan beneficiar de los tratamientos, lo que sin duda además contribuirá a la sostenibilidad del sistema.

2.2.-Las células tumorales circulantes (CTC): generalidades

Las CTCs se han convertido actualmente en un área de investigación con gran potencial en cáncer. El proceso de metastatización de los cánceres epiteliales es complejo, provocando una gran variedad de cambios morfológicos y fenotípicos a nivel celular. Entre estos cambios destacan la separación de las células vecinas por pérdida de capacidad de adhesión, invasión y migración hacia áreas vascularizadas, supervivencia en entorno hostil y proliferación incontrolada en una localización diferente. Por ello es razonable pensar que la detección y monitorización de CTCs en pacientes con cáncer pueda proporcionar información clínica relevante. Sin embargo, y a pesar de que la primera descripción sobre la presencia de células malignas en el espacio vascular humano se realizó en 1869, han tenido que pasar más de 130 años para disponer de la tecnología necesaria.⁶¹ En la mayoría de tumores epiteliales malignos el número de células tumorales presente en el torrente sanguíneo es bastante pequeño. De hecho, se estima que el rango de células tumorales por 10 ml de sangre total oscila entre 1 y 100 comparada con billones de glóbulos rojos y millones de glóbulos blancos.

Entre las diferentes estrategias utilizadas para caracterizar CTC, hay bastante información sobre las que se basan en separación en virtud de diferente expresión génica. Así, la expresión de citoqueratinas (CK), de la molécula epitelial de adhesión celular (epithelial cellular adhesión EpCAM), mucina 1 (MUC1) y/o mamoglobina son características de células epiteliales y no de las células hematopoyéticas.

Utilizando un anticuerpo monoclonal conjugado con partículas magnéticas se pueden aislar las células que luego serán teñidas con marcadores epiteliales y con CD45 (marcador común leucocitario) para distinguir las CTCs de los leucocitos. Con esta técnica se identifican CTCs en la mitad de los pacientes que tienen enfermedad metastásica conocida en una cantidad aproximada de 1 CTC/ml y una pureza del 0.1%.^{62,63} Entre los problemas detectados con estas técnicas destaca que no hay ningún análisis morfológico de las células epiteliales detectadas, lo que no permite descartar contaminación y que no se puede analizar el fenotipo y/o genotipo de las células aisladas.

En la última década se ha desarrollado una tecnología altamente automatizada de inmuno separación y caracterización denominada CellSearch System® (Janssen Diagnostics, LLC, 2016). El componente de inmuno separación de este sistema se basa en las partículas de hierro microscópico que permanecen en suspensión y el uso de un anticuerpo monoclonal dirigido contra EpCAM (MabVU-1D9). EpCAM se expresa en el 50-100% de las células de aproximadamente el 80% de los tumores epiteliales malignos humanos.⁶⁴

Una vez recolectado, el material obtenido se incuba con partículas inmunoferosas que debido a un campo magnético permiten eliminar, si no todas, la mayoría de leucocitos. En un segundo paso, el material remanente es incubado con anticuerpos monoclonales marcados con fluorescencia dirigidos contra citoqueratinas (CK 4-6, 8, 10, 13, 18 y 19) así como CD 45 y DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) mediante un proceso completamente automático. **(Figura A)** Este sistema tiene la gran ventaja de la reproducibilidad entre diferentes laboratorios lo que ha permitido validar la técnica y obtener la aprobación de la FDA (Food and Drugs Administration) como monitorización en pacientes metastásicos.⁶⁵

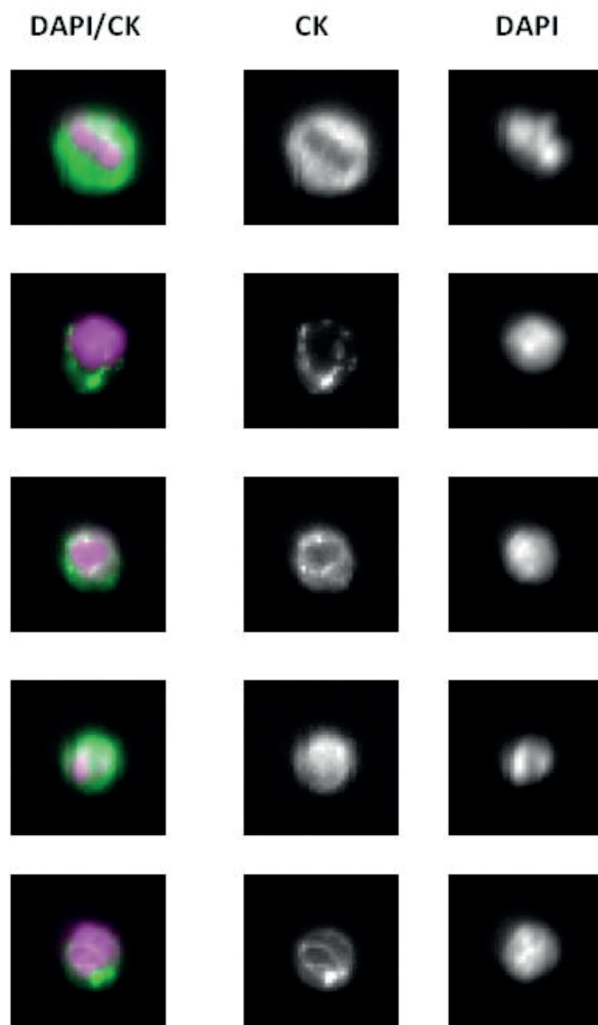


Figura A.- Distintos ejemplos de CTCs en CPNCP marcadas con CK y DAPI, identificadas mediante el método CellSearch System® (Janssen Diagnostics, LLC, 2016)

La identificación de las CTCs se ha vuelto menos compleja con el desarrollo de métodos de detección cada vez más sensibles. Como las CTCs se encuentran en concentraciones muy bajas en sangre periférica, se requiere enriquecimiento de la muestra, generalmente antes de la detección CTCs.^{66,67} Entre los diferentes métodos de enriquecimiento y detec-

ción destacan los que se basan en características físicas (tamaño, densidad, cargas eléctricas, deformabilidad) o en propiedades biológicas (expresión de proteínas de superficie celular) de las CTCs.

Después del enriquecimiento, la detección de CTC se logra comúnmente por inmunotinción y microscopía o métodos basados en PCR.^{68,69} Si bien, el CellSearch System® (Janssen Diagnostics, LLC, 2016) ha sido validado y demostrado ser fiable con un alto grado de precisión, se han detectado falsos positivos en relación a procesos benignos e inflamatorios.⁷⁰

Se están investigando métodos alternativos de enriquecimiento de CTC que son EpCAM independiente. El aislamiento de CTCs basado en la filtración por tamaño se basa en el tamaño celular diferencial de las células tumorales en comparación con los linfocitos circulantes (las células tumorales son de 1,5 a 4 veces más grandes).⁷¹ El método ISET (aislamiento por tamaño de las células tumorales epiteliales) detecta una sola célula tumoral en un mililitro de sangre utilizando un filtro microporoso para aislar las células más grandes después de la lisis de eritrocitos. Posteriormente, se realiza la identificación de las CTCs por características citopatológicas. En contraste con el método CellSearch System® (Janssen Diagnostics, LLC, 2016), ISET es capaz de detectar células con reducida o ausente expresión EpCAM.⁷² Sin embargo, esto puede ser a expensas de la reducción de la sensibilidad y especificidad ya que pequeñas CTC pueden escapar a la detección, mientras que los leucocitos de mayor tamaño pueden ser retenidos.

Los dispositivos de microfluidos se han utilizado también para aislar las CTCs. El sistema de chips de CTCs utiliza una plataforma de microfluidos que consiste en una matriz de 78.000 microposts recubiertas con anticuerpos anti-EpCAM para capturar las CTC en condiciones de flujo laminar. Los estudios han demostrado un 100% de sensibilidad con esta tecnología en la detección de las CTCs en pacientes con CPNCP con una pureza media de 50%.⁷³

Los métodos basados en ácidos nucleicos usando la reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa inversa (RT-PCR) se utilizan principalmente para inferir la presencia de CTCs. Se basan en la detección de transcripciones de ARNm específicos expresados diferencialmente por las células tumorales. La realidad es que este método es muy sensible pero indirecto y se basa en la suposición de que las CTCs son la fuente de transcripciones de ARNm. Además, las células no pueden ser visualizadas directamente para valorar su morfología o realizar una enumeración directa.⁷⁴

A pesar del aumento de la sensibilidad de estos métodos alternativos frente a la tecnología CellSearch System® (Janssen Diagnostics, LLC, 2016), la única con aprobación por parte de la FDA, es esta última.

2.3.-Las células tumorales circulantes: valor pronóstico y predictivo

Desde un punto de vista clínico las CTCs pueden ofrecer una información muy valiosa a distintos niveles tales como cribado, diagnóstico diferencial, pronóstico, y monitorización del estado de la enfermedad, e incluso como planteamos en nuestro estudio, predecir de forma temprana el comportamiento tumoral a la quimioterapia.

Uno de los ámbitos donde más estudios se han realizado es en el análisis del valor pronóstico de los niveles de CTCs en pacientes con cáncer de mama, colorectal y/o próstata. En pacientes con cáncer de mama, un elevado número de CTCs se asocia con menor tiempo a la progresión y menor supervivencia en distintos estudios.⁷⁵⁻⁸² Además de estudios individuales, disponemos de varios meta-análisis centrados en pacientes con cáncer de mama (2011, 2012 y 2016) y otro en carcinoma colorrectal evaluando la importancia pronóstica de la presencia de CTCs, y el valor de los cambios en el número de CTCs en relación a la administración de terapia estándar.

En los metaanálisis de cáncer de mama del 2011 y 2012 se incluyeron estudios de diferentes tecnologías para la detección de CTCs y diferentes estadios de enfermedad. La presencia de CTCs se asoció significativamente con una menor supervivencia en la población total, tanto en estadios iniciales como metastásicos y con una mayor carga de enfermedad tumoral (mayor T y mayor N). Los análisis adicionales de subgrupos demostraron que los resultados fueron independientes del método de detección y el momento de extracción de sangre para el análisis.^{83,84} En el metanálisis publicado en el año 2016, se incluyeron 13 estudios prospectivos y 11 retrospectivos que evaluaron el valor pronóstico y la relevancia clínica de las CTCs analizados por el sistema CellSearch en pacientes con cáncer de mama metastásico, para asegurar de este modo que los resultados fueran más precisos. En este metaanálisis, un mayor número de CTCs se asoció a la expresión de HER2 y con un aumento de los riesgos de progresión del cáncer y de muerte.

En el metaanálisis de carcinoma colorrectal, se incluyeron 36 estudios, con un total de 3094 pacientes. En el análisis se combinaron todos los sitios de extracción de CTCs (sangre periférica, sangre portal/mesentérica o médula ósea) evidenciándose una asociación significativa entre la presencia de CTCs y una menor supervivencia libre de recurrencia y supervivencia global.^{86,87}

Así mismo, hay experiencia en pacientes con cáncer de próstata. El estudio pivotal fue realizado en 231 pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración. Los pacientes con CTCs basales ≥ 5 o postratamiento presentaron una peor supervivencia global que los pacientes con < 5 CTCs. El número de CTCs fue mejor predictor para SG que los niveles de PSA (antígeno prostático específico) para la curva de ROC. Estos datos han llevado a la FDA a su aprobación en estos 3 tumores como herramienta de monitorización y ayuda en la determinación de la eficacia del tratamiento.⁸⁸⁻⁹⁵

Uno de los temas más estudiados en los últimos años ha sido el valor predictivo y/o pronóstico de los cambios en el número de las CTCs durante el tratamiento.⁹⁶ Coumans y cols han publicado un estudio sobre este tema en pacientes con cáncer de mama (n=111)

y próstata metastásicos (n=185). En este estudio se concluye que el objetivo del tratamiento en estos pacientes debe ser la eliminación de todas los CTCs. De hecho, la reducción a cero de CTC se podía ver después 4 a 6 semanas de iniciar el tratamiento, aunque algunos pacientes podían necesitar 10 a 12 semanas de terapia para alcanzar este objetivo. Además concluían que si el número de CTCs no disminuye dentro de este lapso de tiempo, el tratamiento no es eficaz.⁹⁷

2.4.-Las células tumorales circulantes: cáncer de pulmón no células pequeñas

A pesar de su elevada incidencia y mortalidad, hasta el momento hay poca literatura sobre el papel de CTCs, en pacientes con cáncer de pulmón. Como consecuencia de ello, aspectos como la frecuencia de CTCs basales, el número de CTC con valor pronóstico o el significado de los cambios en el número de CTCs sean aún materia de debate.

Esto se puede deber a que el número de CTCs aisladas de pacientes de CPNCP es bajo (en comparación con otros tumores).⁹⁸ Esta baja tasa de detección puede ser debido a su dependencia de la tinción de EpCAM, que se cree que se debe a la alteración de la transición epitelio-mesenquimal. La transición epitelio-mesenquimal implica la pérdida progresiva de antígenos epiteliales (incluyendo CK) con un cambio hacia un fenotipo mesenquimal, lo que es un prerrequisito para la invasión tumoral y la metástasis.⁹⁹ La presencia de marcadores mesenquimales se ha demostrado que es un factor pronóstico de la disminución de la supervivencia libre de progresión (SLP) en pacientes con CPNCP resecaado.¹⁰⁰

Por lo tanto, uno de los temas a debate es la capacidad para la detección de CTCs en los pacientes con cáncer de pulmón.

Utilizando el sistema CellSearch System® (Janssen Diagnostics, LLC, 2016) en CPNCP metastásico se han descrito tasas de detección de CTCs que oscilan del 20 al 30% en los pacientes con CPNCP, con un 15% de pacientes con ≥ 5 CTCs.^{70, 81, 101, 102} Esta tasa de detección puede ser mayor del 80% si el método de elección es otra técnica diferente,^{103, 104} como viene a demostrar una comparación directa del CellSearch System® y sistemas ISET realizado por Krebs y cols, en pacientes con cáncer de pulmón estadio III ó IV, donde las tasas de detección fueron 23% y 80%, respectivamente.¹⁰⁸

Un gran número de estudios han examinado el valor pronóstico y predictivo de las CTCs en el CPNCP localmente avanzado / metastásico. Sin embargo, no todos los estudios han obtenido resultados en la misma línea.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ Un metaanálisis realizado sobre 20 estudios con 1576 pacientes señaló que las CTCs no se correlacionaban con la histología (adenocarcinoma vs carcinoma de células escamosas) (odds ratio [OR] = 0.88; p = 0.545) pero si con la afectación ganglionar (OR = 2.06; p = 0.027) y con el estadio tumoral (OR = 1.95; p = 0.011). De la misma manera, la presencia de CTCs se asoció significativamente con menor supervivencia global (riesgo relativo [RR] = 2.19; 0.0001) y supervivencia libre de progresión / libre de enfermedad (RR = 2.14; 0.0001).¹⁰⁸

Respecto al punto de corte de CTCs con valor pronóstico o predictivo es difícil llegar a conclusiones ya que los estudios en muchas ocasiones sugieren puntos de corte diferentes que oscilan entre ≥ 2 ó ≥ 50 .¹⁰⁹⁻¹¹¹

Además de su valor pronóstico en el momento del diagnóstico, el estudio de CTCs puede ser útil en otros momentos de la enfermedad. La capacidad para detectar precozmente una recaída de la enfermedad utilizando un método de enriquecimiento negativo para agotar los eritrocitos, leucocitos y proteínas de suero de la sangre periférica ha sido estudiada por Wu y cols en cáncer de pulmón (27 adenocarcinomas, 7 escamosos y 13 CPCP) evidenciando una alta sensibilidad para las CTCs para detectar progresión/recurrencia de enfermedad (sensibilidad 83%). Se realizó un estudio de seguimiento de CTCs a pequeña escala en 12 pacientes después de 2 ciclos de quimioterapia de primera línea, demostrando una buena correlación de la enumeración de CTCs con la respuesta radiográfica. Los resultados de este estudio sugieren una potencial utilidad en la evaluación rápida del efecto de la quimioterapia y seguimiento de la recurrencia del cáncer de pulmón.¹¹²

En lo que respecta a la asociación entre respuesta y presencia de CTCs en cáncer de pulmón existe muy poca información publicada. Hirose y cols mostraron en 33 pacientes que recibieron quimioterapia de primera línea para el CPNCP metastásico, que la probabilidad de progresión de la enfermedad con quimioterapia fue significativamente mayor en pacientes con CTCs (66.7%) que en pacientes sin CTCs (23.8%, $p = 0.02$). Los autores concluyen que la presencia de CTCs podría ser un factor predictivo de la eficacia de la quimioterapia en pacientes con CPNCP metastásico y que el número de CTC se puede usar como un factor de estratificación para la selección de estrategias de tratamiento en estos pacientes.¹¹³ Así mismo, en el estudio de Krebs y cols, se contabilizó el número de CTCs en muestras de sangre con CellSearch System® (Janssen Diagnostics, LLC, 2016) de un total de 101 pacientes con cáncer de pulmón, tomadas antes y después de someterse a un ciclo de quimioterapia. En el análisis multivariante, el número de CTCs antes de la quimioterapia fue el predictor más fuerte para la SG (HR 7.92; $p < 0.001$) incluso por delante de factores tradicionales como estadio y estado general. La estimación de la HR se incrementaba cuando se añadía un valor de CTCs ≥ 5 tras un ciclo de quimioterapia (HR 15.65, $p < 0.001$). Los resultados sugieren que el recuento de CTC tras un ciclo de tratamiento podría ser una forma sencilla para saber si un paciente está respondiendo al tratamiento a las pocas semanas de iniciarlo.¹¹⁴

2.5.-Las células tumorales circulantes: carcinoma pulmonar de células pequeñas

En el momento actual disponemos de muy pocos estudios sobre el papel de CTCs en CPCP en comparación con la información de la que disponemos en otros tumores incluido el CPCNP. Además, los resultados de los diferentes estudios aportan información discordante en algunos aspectos, especialmente en relación al valor de la monitorización utilizando CTCs.¹¹⁵⁻¹¹⁸

En relación al nivel de corte para la detección de CTCs considerados como clínicamente significativos o con valor pronóstico, están aún por determinar. Algunos estudios que utilizan el sistema CellSearch System® (Janssen Diagnostics, LLC, 2016) plantean la detección de 1 ó 2 CTCs como significativas, aunque se han comunicado otros puntos de corte tan variados como 3, 5, 8 y 50 CTCs, lo que dificulta los análisis comparativos.¹¹⁶⁻¹¹⁸

La tasa de detección de CTC basales en pacientes con CPCP no tratados previamente está entre el 60% y el 70% (incluyendo pacientes con enfermedad limitada y diseminada). Sin embargo, y a pesar de que el número es superior al comunicado con esta tecnología en otros subtipos de cáncer de pulmón,^{119,120} nos sucede de manera similar, ya que no disponemos aún de información suficiente para concretar cuál es el punto de corte con valor pronóstico, su independencia de otros factores tradicionales pronósticos de supervivencia, como el estadio o el ECOG o su utilidad como biomarcador de respuesta temprana a tratamiento con independencia de la imagen.^{116,117,121}

2.6.-Las células tumorales circulantes en el futuro del cáncer de pulmón.

El diagnóstico histológico y también el molecular se obtiene en la actualidad en los tumores sólidos a partir de especímenes quirúrgicos o de pequeñas biopsias. Sin embargo, no siempre puede llevarse a cabo debido a su carácter invasivo. Además, la información obtenida a partir de una sola biopsia proporciona una instantánea espacial y temporalmente limitada que podría no reflejar su heterogeneidad. Más allá de la heterogeneidad espacial, tumores sólidos también exhiben heterogeneidad temporal, que evoluciona con el tiempo bajo la selección del tratamiento.^{123,124} Por lo tanto, existe un mayor reconocimiento de que el enfoque de la enfermedad metastásica debe basarse en el análisis de tejido tumoral actualizado, en lugar del análisis del tumor diagnosticado en el pasado.

Sin embargo, la obtención de muestras reiteradas de tejido metastásico es compleja y en ocasiones requieren pruebas invasivas que pueden suponer un riesgo para el paciente. Como alternativa a la muestra tisular, hay un creciente interés en el estudio de biopsias líquidas (muestra sanguínea del paciente), ya que permiten la caracterización molecular de células tumorales circulantes (CTCs) y el escrutinio del ADN libre circulante (cDNA) en el suero.¹²⁵⁻¹²⁷ Teóricamente estas técnicas facilitan un seguimiento más sensible de la eficacia del tratamiento y con ello orientar la selección de medicamentos.

Las peculiaridades del CPCP (elevada tasa de respuestas, recaída precoz, escaso índice de curaciones) y la similar eficacia de los distintos regímenes terapéuticos nos indican la importancia de identificar subgrupos pronósticos. Hasta el momento se han relacionado con supervivencia diferentes factores como estado general medido con la escala ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group), estadio, pérdida de peso, edad, sexo, niveles de hemoglobina, número de metástasis, LDH (lactato deshidrogenasa) o niveles basales de enolasa neuroespecífica (NSE) si bien, sólo los dos primeros han sido validados en todos los análisis multivariantes.¹²²

Un factor predictivo es aquel que es capaz de identificar a los pacientes que se beneficiarán de un tratamiento específico o bien aquellos que tendrán mayor toxicidad. En ambos casos ayuda a individualizar la decisión terapéutica. En pacientes con CPNCP avanzado, las mutaciones sensibilizantes en el gen EGFR o la traslocación del gen ALK, son factores predictivos de respuesta a inhibidores tirosin-kinasa dirigidos a estas dianas. Sin embargo, hasta el momento, no se ha identificado ningún factor predictivo que nos oriente en la toma de decisiones en pacientes con CPCP. Es por ello que urge identificar determinaciones que puedan servirnos en este sentido, como por ejemplo la determinación de CTCs.

De este modo el estudio de las CTCs en el CPCP, pudiera proporcionarnos un nuevo biomarcador pronóstico y en la monitorización de la respuesta a tratamientos, dado que una de las ventajas de esta herramienta es su rápida accesibilidad, y que sólo se requieren 7 ml de sangre periférica.¹²³⁻¹²⁷

Las terapias basadas en la utilización del sistema inmune contra el cáncer están obteniendo resultados prometedoras, pero existe aún mucha discusión sobre el papel de la expresión de PD-L1 como biomarcador predictivo de eficacia.¹²⁸⁻¹³² A esto hay que añadir la débil correlación entre la tinción del tumor primario y la de la una metástasis, lo que sugiere que el tumor primario no es el más adecuado para predecir la expresión de PD-L1. Esta heterogeneidad en la expresión de PD-L1 en tejido sugiere que una sola biopsia podría no ser suficiente, lo que avala el estudio de CTC en sangre periférica también para la determinación de la expresión real de PD-L1 en cada momento evolutivo del tumor.¹³³

En el momento actual disponemos de datos sobre el valor de CTCs como biomarcador predictivo para el uso de terapias dirigidas en pacientes con CPNCP avanzado con mutación de HER2,¹³⁴ EGFR¹³⁵ o traslocación ALK¹³⁶ mientras que la información relativa a la determinación de PDL-1 proviene de un estudio en cáncer de mama publicado en junio de 2015, en el que se seleccionaron dieciséis pacientes con cáncer de mama Her2 negativas. El estudio combinó la tecnología CellSearch System® (Janssen Diagnostics, LLC, 2016) para la detección de CTC con un anticuerpo dirigido frente a PD-L1. Los autores encontraron CTC PD-L1 (+) en 11 de los 16 pacientes (68,8%). La fracción de PD-L1 +/- CTC varió de 0,2 al 100% por paciente.¹³⁷ Sin duda estos hallazgos abren un interesante campo de investigación en el cáncer de pulmón donde los resultados de la inmunoterapia están siendo tan alentadores.

Otra línea de futuro es la creación de tumores en ratones inmunocomprometidos, a partir de sangre enriquecida de CTCs de pacientes con CPCP tal y como ha publicado recientemente el grupo de investigación de Manchester. Las CTCs eran tumorogénicas cuando presentaban niveles de ≥ 400 CTCs en 7,5 ml de sangre. Los tumores generados no sólo mostraban perfiles genómicos similares a las de CTCs de los pacientes, sino que reflejaban con precisión la respuesta del donante a la quimioterapia con cisplatino / etopósido,¹³⁸ abriendo una nueva vía de investigación centrada en los xenoinjertos derivados de las líneas celulares de CTCs.

Por último, otra línea de investigación es el estudio de las microembolias tumorales circulantes. Aunque la mayoría de las CTCs están aisladas, se han identificado grupos de CTCs en muestras de sangre de pacientes con cáncer metastásico. Estas microembolias tumorales circulantes se han capturado utilizando plataformas CellSearch System® (Janssen Diagnostics, LLC, 2016) identificándose en más de 30% de los pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas y parecen carecer de apoptosis o de proliferación celular, lo que quizás pueda traducir una ventaja en la supervivencia.⁶⁷ En ese sentido disponemos de un nuevo dispositivo, el Cluster-Chip, que permite aislar grupos de CTCs mediante pilares triangulares de microfluidos, que actúan como trampas para los microembolos de CTCs facilitando su estudio y su asociación con otras células como plaquetas, células estromales o macrófagos.¹³⁹

Como hemos expuesto aquí, el cáncer de pulmón es una patología tumoral muy frecuente con una evidente necesidad de mejora. Los datos publicados por GLOBOCAN para el año 2020, pronostican 31123 casos incidentes de cáncer de pulmón en España, lo que supone al menos 3112 casos nuevos de CPCP sólo en este país para esta fecha. Por lo tanto, parece claro que necesitamos avanzar en la búsqueda de nuevas estrategias que redefinan el riesgo individual y permitan diseñar tratamientos personalizados.

3.- HIPÓTESIS

Nuestra hipótesis es que la determinación seriada de CTCs mediante el método Cell-Search System® (Janssen Diagnostics, LLC, 2016) es una herramienta útil en el diagnóstico, monitorización de la respuesta al tratamiento y seguimiento en los pacientes con cáncer de pulmón, particularmente en los pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas.

4.- OBJETIVOS

Objetivo principal:

- Evaluar si la determinación seriada de células tumorales circulantes en pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas tiene valor predictivo.

Objetivos particulares:

- Evaluar la correlación entre la tasa de detección basal de CTCs y la histología en pacientes con cáncer de pulmón (CPCP versus CPNCP).
- Determinar si existe correlación entre el estadio clínico inicial y la presencia de CTCs en los pacientes con CPCP.
- Determinar si hay correlación entre variables clínicas y la presencia de CTCs basales en sangre periférica en todos los pacientes diagnosticados de CPCP.
- Correlacionar la presencia y/o número de CTCs basales con el perfil de enfermedad metastásica en pacientes con CPCP.
- Analizar si las CTCs basales tienen valor pronóstico en pacientes con CPCP.
- Determinar si la presencia o número de CTCs basales es un factor predictivo de eficacia del tratamiento en pacientes con CPCP.
- Determinar el punto de corte de CTCs con mejor capacidad discriminativa como factor predictivo.
- Analizar si la presencia o cifra de CTCs tras 2 ciclos de tratamiento tienen valor pronóstico en pacientes con CPCP en pacientes con CPCP.
- Analizar el valor pronóstico de los cambios en la cifra de CTCs tras 2 ciclos de tratamiento con respecto a las CTCs basales.
- Determinar si la segunda determinación de CTCs tienen valor predictivo.
- Analizar si la presencia o número de CTCs en el momento de la progresión tienen valor pronóstico.
- Analizar si el cambio en la cifra de CTCs en el momento de la progresión tiene valor pronóstico.

5.- METODOLOGÍA

5.1.-Diseño

Estudio transversal, prospectivo que se basa en la detección de CTCs en sangre periférica en pacientes con cáncer de pulmón en el momento del inicio del tratamiento (determinación basal), tras 2 ciclos (solo en pacientes con CPCP) y a la progresión (solo en pacientes con CPCP).

En todos los pacientes se realizaron, al menos, las siguientes exploraciones basales: historia clínica, exploración física, hemograma, bioquímica sanguínea con perfil hepático, creatinina, sodio, potasio y glucemia, fibrobroncoscopia, Tomografía Axial Computarizada (TAC) de tórax y abdomen, gammagrafía ósea y TAC SNC. El seguimiento en la consulta de oncología médica se realizó cada 3 semanas - coincidiendo con la fecha prevista de administración de quimioterapia - e incluyó anamnesis, exploración física y analítica completa,. Las extracciones para el análisis de CTCs fueron realizadas a la vez que la extracción de sangre rutinaria. La evaluación de respuesta al tratamiento fue realizada mediante TAC utilizando los criterios RECIST v1.1 (Response Evaluation Criteria for Solid Tumors¹²⁰) cada seis semanas durante el tratamiento y cada 2 meses una vez finalizado el tratamiento.

5.2.-Variables

Para este estudio se incluyeron las variables descritas a continuación

- a) Datos de filiación: edad y sexo.
- b) Variables clínicas: etnia, tabaquismo (índice de paquete año, tiempo desde abandono del tabaquismo), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), cardiopatía, enfermedad vascular periférica, estado general según escala ECOG.
- c) Características del tumor: histología, estudio molecular, estadio según clasificación VALG (CPCP) o TNM (CPNCP).
- d) Tratamiento recibido: sistémico (esquema de QT o tratamiento dirigido), número de ciclos de QT, radioterapia (torácica y/o craneal), tratamiento combinado (concurrente o secuencial).
- e) Variables bioquímicas: NSE (enolasa neuroespecífica), LDH (lactato deshidrogenasa).
- f) Tasa de respuestas objetivas (RO) por TAC definida como el porcentaje de respuestas parciales (RP) y el de respuestas completas (RC) obtenidas mediante criterios RECIST v1.1.

- g) Beneficio clínico definido como la suma de los porcentajes de respuestas parciales, completas y estabilizaciones obtenidos mediante criterios RECIST v1.1.
- h) Presencia y número de CTCs previo al inicio del primer tratamiento (determinación basal), tras 2 ciclos de tratamiento y en el momento de la progresión de enfermedad.
- i) Supervivencia libre de progresión definido como el tiempo transcurrido desde la fecha de inclusión en el estudio hasta la fecha de la progresión, fallecimiento, o el último control.
- j) Fecha de progresión y tipo (local, a distancia, ambas).
- k) Supervivencia global definida como el tiempo trascurrido desde la fecha de inclusión en el estudio hasta la fecha de muerte o último control.
- m) Fecha de éxitus y causa (enfermedad, toxicidad, comorbilidad, otros).

5.3.-Método de determinación de CTC

La tecnología utilizada ha sido CellSearch System® (Janssen Diagnostics, LLC, 2016) que se basa en la inmuno separación y caracterización automatizada de las CTCs. Para la realización de esta técnica se requieren 7.5 mL de sangre periférica.

El componente de inmuno separación de este sistema se basa en las partículas de hierro microscópico que permanecen en suspensión y el uso de un anticuerpo monoclonal dirigido contra EpCAM (MAbVU-1D9). Una vez recolectado, el material obtenido se incubaba con partículas inmunoferosas que debido a un campo magnético permiten eliminar, si no todas, la mayoría de leucocitos.

En un segundo paso, el material remanente es incubado con anticuerpos monoclonales marcados con fluorescencia dirigidos contra citoqueratinas (CK 4-6, 8, 10, 13, 18 y 19) así como CD 45 y DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) mediante un proceso completamente automático.

Se consideran CTCs, las células que son identificadas como Fenotipo: CK- positivo, DAPI positivo, CD45- negativo.

5.4.-Procesamiento de las muestras y técnicas utilizadas.

Los componentes del sistema CellSearch® incluyen: tubos conservadores exclusivos de CellSave, CellSearch® Kit de células tumorales circulantes, CellSearch® Kit de control de células tumorales circulantes, Sistema automatizado Celltracks® Autoprep®, Cartuchos MAGNEST® y el sistema Celltracks Analyzer II®. (**Figura B**)

Las CTCs son frágiles y tienden a degradarse en unas pocas horas cuando se recogen en tubos de recogida de sangre estándar. Así que nuestras muestras se recogieron en tubos con reactivos específicos CellSave® de 7,5 mL. Estos tubos proporcionan un conservante celular optimizado que estabiliza las CTCs hasta 96 horas a temperatura ambiente, lo que mejora la reproducibilidad y fiabilidad del análisis de CTCs.

El kit CellSearch® está diseñado para la selección inmunomagnética, identificación y enumeración de CTCs de origen epitelial en sangre mediante el sistema Celltracks® Autoprep® y analizado en el sistema Celltracks Analyzer II®. Los componentes del kit incluyen: reactivo de captura basado en ferrofluido y reactivos inmunofluorescentes listos para usar, la bandeja de reactivos precargada para una fácil carga en el sistema Celltracks® Autoprep®, botón de datos incrustados en el soporte del reactivo para ayudar en el seguimiento del lote del kit, así como la monitorización del uso de los reactivos y cartuchos especialmente diseñados para un aislamiento y análisis óptimo de CTCs.

La preparación de muestras inmunomagnéticas está totalmente automatizada (no se requiere preparación manual), gracias a que se procesan en el sistema Celltracks® Autoprep®:

- Aspiración del plasma; adicción de ferrofluido anti-EpCAM y tampón
- Incubación magnética
- Aspiración de células no marcadas
- Eliminación del imán con células resuspendidas en tampón
- Etiquetado celular con reactivos de tinción: anti-citoqueratinas que identifica citoqueratinas intracelulares 8, 18 y / o 19; DAPI; anti-CD45 que identifica los leucocitos
- Transferencia a MAGNEST® Cartridge Holder
- Revisión con el sistema CELLTRACKS ANALYZER II®

Las células capturadas y teñidas se dispensan en el cartucho de muestra que se encuentra dentro de un soporte de cartucho MAGNEST® y migran a la superficie analítica del cartucho debido al campo magnético del soporte del mismo.

Por último, los datos de una muestra son realizados por el CellTracks Analyzer II® que es un analizador de fluorescencia óptica que proporciona análisis y enumeración rápida, precisa de las CTCs seleccionadas inmunomagnéticamente. Sus características incluyen una interfaz fácil de usar basada en Linux con comandos sencillos en pantalla, carpetas intuitivas y tablas uniformes con funciones de clasificación y exportación

- Análisis rápido de cada cartucho en aproximadamente 10 minutos
- Procedimiento de exploración automatizada

- Función de análisis automático de fondo para agilizar el flujo de trabajo
- Clasificación de datos de control de calidad
- Presentación de imágenes fluorescentes candidatas de CTC en circulación en formato de galería para la clasificación final por el usuario
- Presentación de informes y archivo a largo plazo de múltiples galerías de imágenes de muestra

Este sistema semiautomático permite identificar las células epiteliales tumorales mediante anticuerpos anti-citoqueratina fluorescentes y tinción para ácidos nucleicos (DAPI), y anti-CD 45 para desechar los leucocitos.

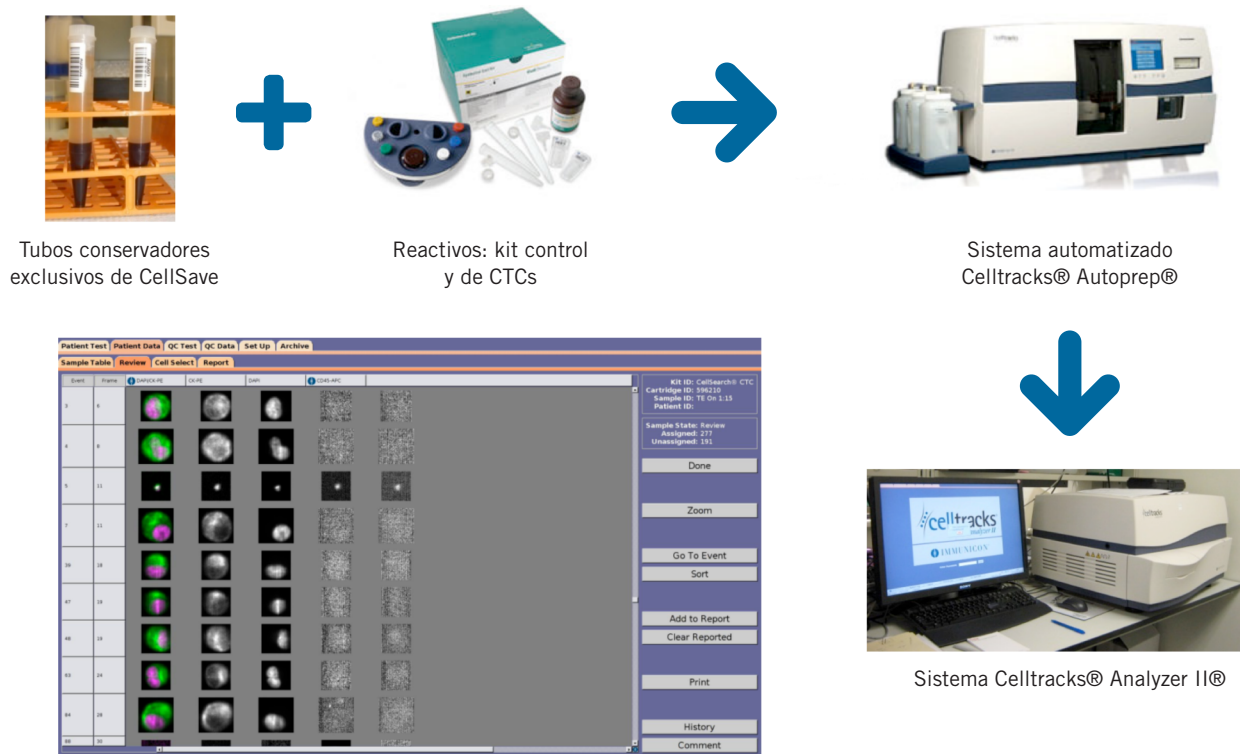


Figura B.- Componentes del CellSearch System®

5.5.-Procesamiento de la información

Todos los datos del estudio se han recogido en una base de datos específicamente diseñada para esta investigación, cumplimentada por el investigador principal y aprobada por el CEIC del HURYC.

5.6.-Análisis estadístico

La unidad de análisis básica será el paciente. En este caso para responder determinados objetivos se utilizarán métodos estadísticos convencionales, bivariantes (T de Student, Chi cuadrado, test exacto de Fisher, etc.) y multivariantes (modelos de regresión lineal y logística múltiple). Se calcularán como medida de asociación las Odds ratio (OR) y sus correspondientes intervalos de confianza del 95% mediante regresión logística incondicional. Los coeficientes de correlación de Pearson y de Spearman se utilizarán para la valoración de la asociación entre CTCs y respuesta.

El análisis de curvas ROC (receiver operating characteristic curve)¹⁴¹ se utilizará para determinar la exactitud diagnóstica de test que utilizan variables continuas, como es el caso de las CTCs. En este caso, tendrán 2 propósitos específicos: determinar el punto de corte de una escala continua (valor de CTC basal) en el que se alcanza la sensibilidad y especificidad más alta y evaluar la capacidad discriminativa del test diagnóstico.

Nosotros escogimos realizar nuestro estudio en base a diferentes puntos de corte basados en los metaanálisis de la literatura previa ($CTC \geq 1$) y al análisis de las curvas de ROC en función del beneficio clínico ($CTCs \geq 50$), frente a la supervivencia global, dado que existían pacientes con enfermedad limitada con claro mejor pronóstico que los de enfermedad diseminada.

Las probabilidades diagnósticas de nuestro punto de corte para las CTCs basales, se presentarán según las recomendaciones que utiliza la medicina basada en la evidencia (MBE)¹⁴² para estudiar la eficacia de las pruebas diagnósticas. Se ha calculado el valor predictivo positivo, el valor predictivo negativo, la razón de verosimilitud para positivos (LR+) y para negativos (LR-).

Para las estimaciones de la SLP y la SG se utilizó el método de Kaplan-Meier, y para las diferencias de las mismas la prueba de log-rank. Para los objetivos de evaluar el valor pronóstico y predictivo de los distintos eventos contemplados tanto de las CTC como de los factores pronósticos habituales (edad, estado funcional, estadio, metástasis (sitio y número), tratamiento recibido, etc.) se han realizado sendos análisis univariantes de riesgos proporcionales (Cox). De estos análisis se ha obtenido un modelo de supervivencia multivariante para valorar el valor pronóstico independiente de las CTCs basales y las CTCs durante el seguimiento ajustado por otros factores asociados. Además, para la selección de variables nos hemos apoyado en el método de Forward Stepwise, que controlan la y exclusión de variables en el modelo, en función de los valores de p en nuestra muestra.¹⁴³

El nivel de significación para todas las pruebas del estudio será del 5% ($\alpha=0.05$) y se utilizarán en todos los casos test bilaterales.

Se utilizarán dos programas estadísticos: STATA 13 (StataCorp LP, Texas, USA) y SPSS versión 15 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.).

5.7.-Implicaciones éticas

El estudio, aprobado por el comité ético de investigación clínica del hospital Ramón y Cajal, se ha llevado a cabo de acuerdo a las recomendaciones que figuran en la Declaración de Helsinki, revisada en Tokio, Venecia, Hong-Kong, Sudáfrica y Edimburgo (2.000) y en la actual Legislación Española.

Los datos se recogieron de forma anónima identificando al paciente mediante un código numérico y el tratamiento de los mismos se realizó de acuerdo a la Ley Orgánica de Protección de Datos 15/1999.

A todos los pacientes se le entregó una hoja de información y firmaron consentimiento informado (anexos I y II).

6.- ESTRUCTURA DE TRABAJO

6.1.-Esquema de reclutamiento y seguimiento

	Visita de selección	Visita cada 3 semanas	Visita tras 2 ciclos	Visita fin de tratamiento	Visita seguimiento cada 2 meses	Visita de progresión/recaída	Fin de estudio
Criterios de inclusión y exclusión	X						
Consentimiento informado	X						
Variables clínicas y del tumor	X						
Exploración Física	X	X	X	X	X	X	
Análítica	X	X	X	X	X	X	
Extracción CTCs	X		X CPCP			X CPCP	
Enolasa neuroespecífica y LDH (CPCP)	X		X		X	X	
TAC tórax-abdomen y SNC	X		X	X	X	X	
PROGRESION MUERTE o PERDIDA DE SEGUIMIENTO							X

6.2.-Cronograma temporal

OBJETIVO	FECHAS
Aprobación de proyecto de tesis doctoral	10 de febrero de 2012
Aprobación del comité de ética de investigación clínica	8 de marzo de 2012
Periodo de reclutamiento de 2014	15 de marzo de 2012-30 de septiembre de 2014
Periodo de seguimiento	1 de octubre de 2014-enero de 2016
Análisis estadístico	Febrero 2016-abril 2016
Redacción de tesis doctoral	Enero de 2016-Febrero de 2017

7.-EXPOSICIÓN DE LOS RESULTADOS

7.1.-Descripción de la población

Este estudio incluye un total de 271 pacientes, de los cuales, 223 son carcinomas de pulmón no microcítico (CPNCP) y 48 son carcinomas de pulmón de células pequeñas (CPCP). El periodo de inclusión ha comprendido desde marzo de 2012 a septiembre de 2014, con un seguimiento hasta la el 17 de agosto de 2015 (mediana de seguimiento de 28,3 meses). **Figura 1.**

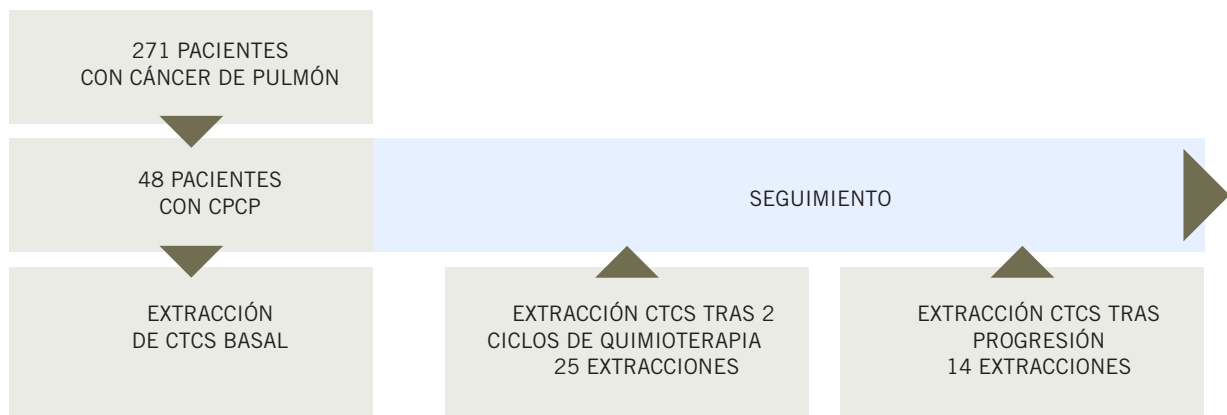


Figura 1: Esquema del estudio

7.1.1.-Características generales de la serie global

En nuestra población global, 191 pacientes son varones y 80 son mujeres con una mediana de edad de 66,5 años (36-85). Ciento diecisiete pacientes presentaban ECOG 0, 83 pacientes ECOG 1, 61 pacientes ECOG 2 y 10 pacientes eran ECOG 3. La distribución por estadio fue de 18 pacientes estadio I, 22 pacientes estadio II, 69 pacientes estadio III y 162 pacientes estadio IV. 146 pacientes eran fumadores activos, 88 ex –fumadores y 37 nunca fumadores. En cuanto a la histología, 49 tenían CPCP, 138 adenocarcinomas, 63 pacientes de histología escamosa, 3 células grandes y 19 de otras histologías (3 carcinomas pleomórficos, 6 neuroendocrinos de células grandes, 3 carcinomas adenoescamosos y 7 no microcíticos sin especificar). **(Tabla 1)**

El estudio molecular se realizó en 147/223 pacientes con CPNCP, de los cuales, 44 tuvieron alguna alteración molecular. Veintitrés pacientes tenían una mutación de EGFR (13 exón 19, 7 exón 21 y 3 exón 20), 3 pacientes tenían traslocación ALK, 16 pacientes mutación KRAS, 1 mutación BRAF y 1 mutación Her2. No se realizó determinación molecular a los pacientes con CPCP y carcinoma escamoso, ya que no procedía en el contexto de estas histologías. (**Tabla 2**).

CARACTERÍSTICAS DE PACIENTES	N=271
Edad años	
Mediana	66.5 años
Rango	36-85
Género, n(%)	
Varones	191(70)
Mujeres	80(30)
ECOG, n(%)	
0-1	200(74)
2-3	71(26)
Estadio al diagnóstico, n(%)	
Estadio I	18(7)
Estadio II	22(8)
Estadio III	69(25)
Estadio IV	162(60)
Histología, n(%)	
CPCP	48(18)
Adenocarcinoma	138(51)
Epidermoide	63(23)
Células Grandes	3(1)
Otras	19(7)

Tabla 1. Características clínicas de los 271 pacientes con carcinoma pulmonar: ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group.

ALTERACIONES MOLECULARES ANALIZADAS EN CPNCP, N 223 (%)

SI	147(66)
Presencia de alteración	44(20)
EGFR	23(15.6)
ALK	3(2)
KRAS	16(11)
BRAF	1(0.7)
HER2	1(0.7)
Sin presencia de alteración	124(80)

Tabla 2. Alteraciones moleculares analizadas en los pacientes con CPNCP: EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor; ALK, Anaplastic lymphoma kinase; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; BRAF, v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1; KRAS, Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog.

7.1.2.-CPNCP

7.1.2.1.-Características de la muestra

En el caso de CPNCP, 161 pacientes eran varones y 62 eran mujeres con una mediana de edad de 66,6 años (36-85). Ciento diez pacientes tenían ECOG 0, 61 ECOG 1, 48 pacientes eran ECOG 2 y 4 ECOG 3. La distribución por estadio fue de 18 pacientes estadio I, 22 pacientes estadio II, 60 pacientes estadio III y 123 pacientes estadio IV. Ciento cuatro pacientes eran fumadores activos, 82 ex –fumadores y 37 nunca fumadores. En cuanto a la histología, en 138 pacientes fue adenocarcinoma, en 63 carcinoma escamoso, en 3 carcinomas de células grandes y en 19 otras histologías.

7.1.2.2.-Estadio y tratamiento en los pacientes CPNCP

De los 40 pacientes con estadio I y II de la clasificación TNM (estadios localizados), 26 pacientes eran ECOG 0, 12 pacientes ECOG 1 y 2 paciente ECOG 2. En el estadio III (localmente avanzado), 60 pacientes del total, 34 pacientes eran ECOG 0, 17 eran ECOG 1 y 9 eran ECOG 2.

En el estadio IV, 123 pacientes del total, 50 pacientes eran ECOG 0, 32 eran ECOG 1, 37 eran ECOG 2 y 4 eran ECOG 3.

Las modalidades terapéuticas empleadas han sido la cirugía, la radioterapia paliativa o radical, esta última secuencial o concurrente con la quimioterapia y el tratamiento sistémico con quimioterapia o bien con fármacos dirigidos, con función paliativa o radical.

En nuestra serie, la resección quirúrgica fue el tratamiento de elección en el 65% de los pacientes con estadio I y II (26/40,) siendo radical en 25 pacientes. La radioterapia se empleó en el 20% de los casos, de forma concurrente con quimioterapia en 6 pacientes, tras quimioterapia en un paciente y adyuvante en otro caso. El 52.5% de los pacientes (21/40) recibió quimioterapia bien con intención adyuvante (12 pacientes), combinados con radioterapia (7 casos) o de carácter neoadyuvante (2 pacientes). El tratamiento de soporte fue el único tratamiento administrado en un paciente (2,5%) (**Tabla 3**).

De los 60 pacientes con estadio III, 53 (88%) recibieron quimioterapia, bien con intención neoadyuvante (2 casos), concurrente con radioterapia (16), secuencial (14), adyuvante a cirugía (6) o bien como único tratamiento (15 pacientes). La radioterapia se empleó en 42/60 pacientes (70%). En 30 pacientes se utilizó combinada con quimioterapia (en 16 de forma concurrente y en 14 secuencial), en 4 pacientes como único tratamiento, en 3 adyuvante a la cirugía y en 5 con intención paliativa, Respecto a la cirugía 16 pacientes fueron intervenidos (27%) consiguiéndose resección radical en 15, El tratamiento de soporte fue el único tratamiento empleado en 1 paciente (1,66%).(**Tabla 3**).

En el estadio IV, 14/123 fue realizado tratamiento de soporte (11.5%). La cirugía fue empleada en 17 de los 123 pacientes (13,8%), siendo incompleta en 3 pacientes. La radioterapia se empleó en 38 pacientes, siendo el mayor porcentaje con intención paliativa (35 pacientes/92%). En 10 pacientes fue el único tratamiento administrado. En 3 pacientes se utilizó en el contexto del manejo de metástasis única reseçada y manejo con quimioterapia secuencial/concurrente del primario pulmonar. El tratamiento sistémico se empleó en 99/123 pacientes (81%), en cualquiera de las modalidades descritas en la tabla 3.

FÁRMACO	N PACIENTES	%
Ninguno	50	22
CARBOPLATINO-PACLITAXEL	48	21
CDDP-VP16	29	13
CDDP-PEMETREXED	30	14
CARBOPLATINO-PEMETREXED	18	8
CDDP-GEMCITABINA	11	5
CARBOPLATINO-GEMCITABINA	6	3
CDDP-VINORELBINA	11	5
ERLOTINIB	13	6
GEFITINIB	1	0.4
CRIZOTINIB	1	0.4
CDDP-DOCETAXEL	1	0.4
OTRAS	4	1.8
	223	100

Tabla 3. Relación de fármacos empleados como tratamiento sistémico en CPNCP en todos los estadios: CDDP, cisplatino

7.1.3.3.-Respuesta al tratamiento en los pacientes CPNCP

En los 223 pacientes CPNCP, tras la evaluación de la respuesta por criterios RECIST v1.1, se han obtenido 29 estabilizaciones (EE), 75 respuestas parciales (RP), 38 respuestas completas (RC) y 46 progresiones de enfermedad (PG). De estos 223 pacientes, 16 pacientes recibieron sólo terapia de soporte, 10 pacientes sólo radioterapia paliativa y en 9 la evaluación de respuesta no pudo realizarse porque 5 fallecieron antes de la evaluación y 4 sufrieron deterioro clínico que imposibilitó la misma. (**Tabla 4**)

RESPUESTAS OBTENIDAS POR RECIST V1.1

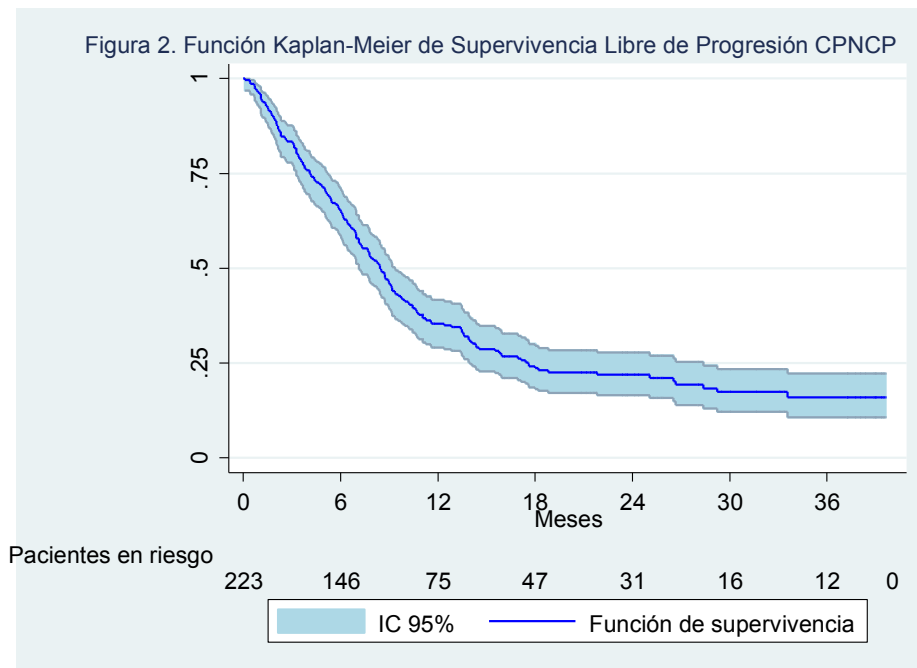
ESTADIO(n)	EE	RP	RC	PG	NO EVALUABLE	Total
I y II	5	5	24	3	3	40
III	6	26	10	13	5	60
IV	18	44	4	30	27	113
Suma	29	75	38	46	35	223

Tabla 4. Respuestas obtenidas por RECIST v1.1 en pacientes con CPNCP

7.1.3.4.-Supervivencia en los pacientes CPNCP

En el momento del análisis, la mediana de seguimiento de los pacientes con CPNCP es de 444 días. 146 pacientes (65.5%) han muerto y 133 (59.7%) han progresado, resultando en una mediana de supervivencia libre de progresión de 9.8 meses (IC95%, 8.64-11) para todos los estadios (**Figura 2**) y una mediana de supervivencia global de 17.8 meses (IC 95%, 15-21.2) (**Figura 3**).

En función del estadio TNM, la función de Kaplan-Meier para la supervivencia libre de progresión se muestra en la **figura 4**. La mediana de SLP para el estadio I y II no fue alcanzada, mientras que para el estadio III fue de 11 meses (IC 95% 8.7-17) y para el IV de 7 meses (IC 95% 6.8-9). La mediana de SG para el estadio I y II no fue alcanzada, mientras que para el estadio III fue de 20 meses (IC95% 14-24) y para el estadio IV fue de 14 meses (IC95% 11-17) (**Figura 5**).



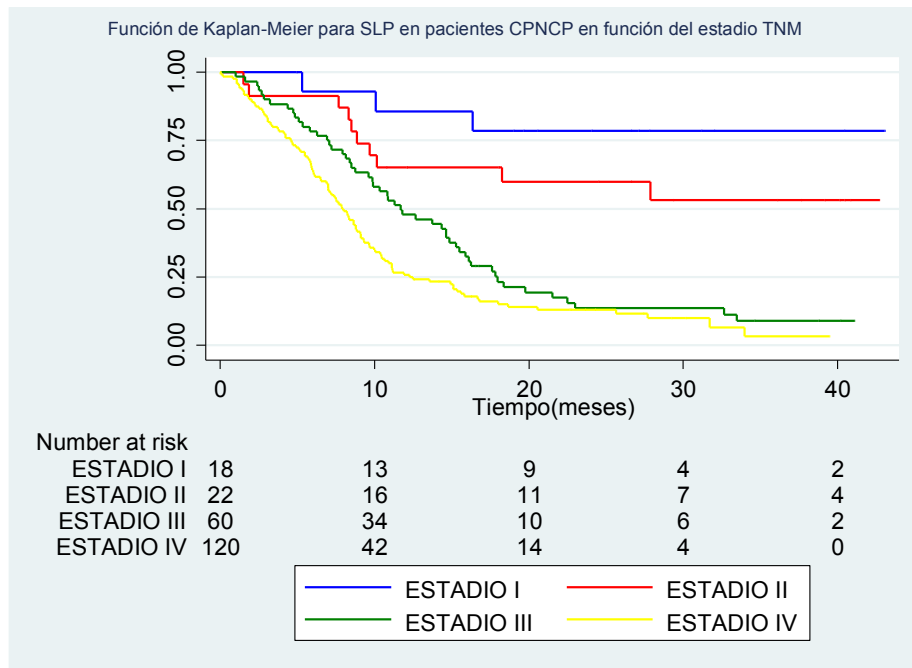
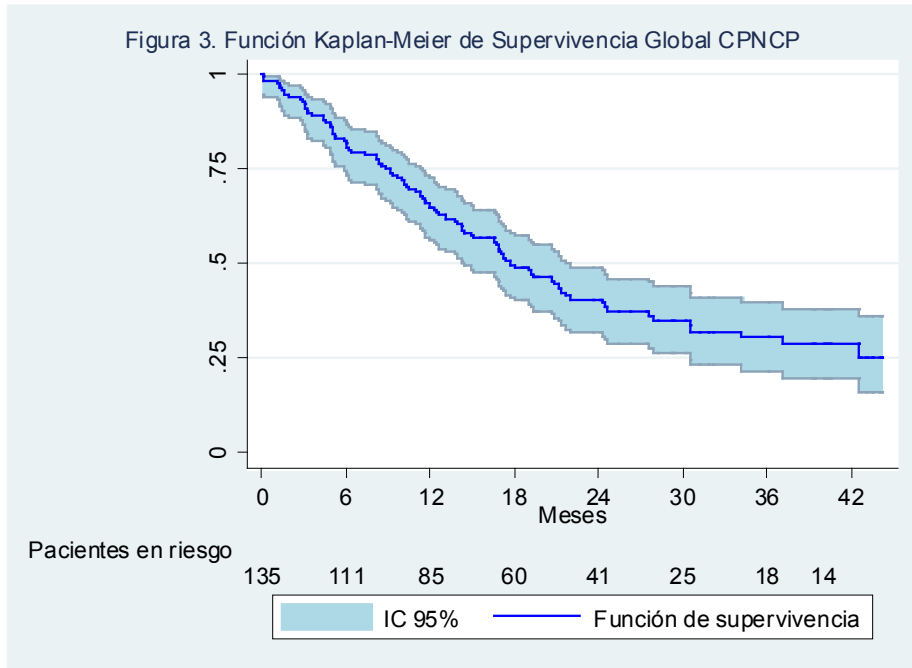


Figura 4.-Función Kaplan-Meier para la SLP en pacientes con CPNCP en función del estadio TNM

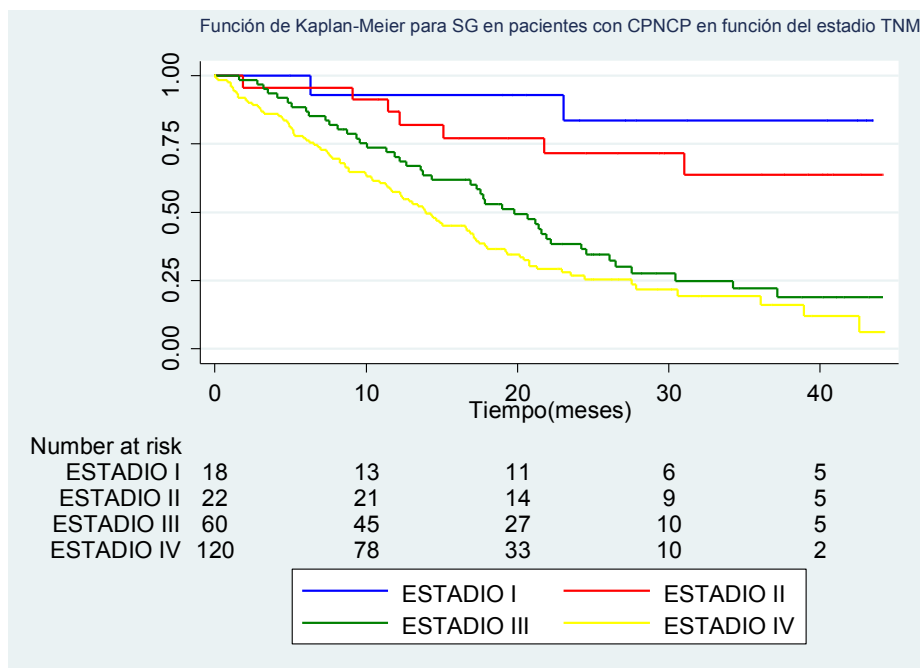


Figura 5.-Función Kaplan-Meier para la SG en pacientes con CPNCP en función del estadio TNM

7.1.3.-CPCP

7.1.3.1.-Características de la muestra

En este estudio nos hemos centrado en los 48 pacientes con CPCP.

Treinta pacientes eran varones y 18 mujeres, con una mediana de edad de 63.45 años (45-81), con un ECOG 0 al diagnóstico en 7 pacientes, 22 pacientes ECOG 1, 13 pacientes ECOG 2 y 6 pacientes ECOG 3. Comorbilidad cardíaca o pulmonar severa presentaban 34 de 48 pacientes. La estadificación según la clasificación VALG fue enfermedad limitada (EL) en 9 pacientes y enfermedad diseminada (ED) en 39. Al diagnóstico de la enfermedad, 9/39 pacientes presentaban metástasis cerebrales (23%), 16/39 pacientes presentaban metástasis hepáticas (41%), 19/39 pacientes tenían metástasis óseas (49%), 9/39 pacientes tenían metástasis suprarrenales (23%), 20/39 pacientes tenían metástasis pulmonares (51%) y 11/39 pacientes tenían metástasis en otras localizaciones (28%). En cuanto a la sensibilidad a platinos, 33 pacientes presentaron progresión más allá de los 3 meses (69%) frente a 15 pacientes que progresaron antes de los 3 meses (31%).

Todos los pacientes tenían antecedentes de exposición al tabaco, 42 pacientes eran fumadores activos, 6 ex – fumadores. En ningún caso se evidenciaron datos de histologías mixtas.(**Tabla 5**)

CARACTERÍSTICAS DE PACIENTES	N=48
Edad años	
Mediana	63.45 años
Rango	45-81
Género, n(%)	30(62.5)
Varones	18(37.5)
Mujeres	
Clasificación VALG al diagnóstico, n(%)	
Enfermedad Limitada	9(18.7)
Enfermedad diseminada	39(81.25)
Metástasis cerebrales	9(23)
Metástasis hepáticas	16(41)
Metástasis óseas	19(49)
Metástasis suprarrenales	9 (23)
Metástasis pulmonares	20(51)
Otras	11(28)
ECOG, n(%)	
0-1	29(60)
2-3	19(40)
Tratamiento recibido de primera línea, n(%)	
SI	
Cisplatino-Etopósido	26(53.75)
Carboplatino-Etopósido	19(40)
NO	3(6.25)
Progresión platino sensible, ≥ 3 meses n(%)	
SI	33 (69%)
NO	15(31%)
Exposición al tabaco, n(%)	
NO	0
SI	48
Ex - fumadores	42(87.5)
Fumadores activos	6(12.5)
LDH basal, n(%)	
<240 U/L	13(27)
≥ 240 U/L	35(73)
Enolasa neuroespecífica basal, n(%)	
<12.5 ng/ml	
≥ 12.5 ng/ml	48(100)

Tabla 5. Características clínicas de 48 pacientes con CPCP confirmado por histología o citología: ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; VALG, Veterans' Administration Lung Cancer Group ; LDH, lactato deshidrogenasa

7.1.3.2.-Estadio y tratamiento en los pacientes CPCP (Tabla 6)

De los 9 pacientes con EL, 2 pacientes presentaban ECOG 0, 6 pacientes ECOG 1 y sólo 1 tenía ECOG 2. De los 39 pacientes con ED, 5 tenían ECOG 0, 16 ECOG 1, 12 ECOG 2 y 6 ECOG 3.

Cuarenta y cinco de los 48 pacientes recibieron tratamiento sistémico con quimioterapia (94%): 9 pacientes con EL (100%) y 36 pacientes con ED (92%). 26 pacientes (56%) recibieron quimioterapia según esquema cisplatino-etopósido (5 EL/ 21 ED), mientras que 19 pacientes (44%) fueron tratados con carboplatino-etopósido (4 EL/ 15 ED). 3 pacientes con enfermedad diseminada y ECOG 3 (8%) no llegaron a recibir tratamiento.

8 de los 9 pacientes con enfermedad limitada (89%) fueron tratados con tratamiento combinado de quimioterapia/radioterapia, 5 de forma concomitante (62.5%) y 3 secuencial (37.5%). En un paciente no se pudo administrar radioterapia por mala función pulmonar. Cinco de los 39 pacientes con enfermedad diseminada recibieron radioterapia torácica de consolidación tras quimioterapia (13%).

El 25% de los pacientes recibieron radioterapia holocraneal profiláctica (PCI), en concreto 5 de los 9 pacientes con enfermedad limitada (55.5%) y 7 de los 39 pacientes con enfermedad diseminada (18%). Así mismo, el 23% (11/48) requirieron radioterapia craneal paliativa.

**TRATAMIENTO DE LOS PACIENTES CPCP EN FUNCIÓN DE LA CLASIFICACIÓN VALG
N(%)**

	ENFERMEDAD LIMITADA	ENFERMEDAD LIMITADA
ECOG 0-1	8(88.9)	8(88.9)
ECOG 2-3	1(11.1)	1(11.1)
<hr/>		
Tratamiento quimioterapia		
SI	9(100)	9(100)
Cisplatino-Etopósido	5 (55.5%)	5 (55.5%)
Carboplatino-Etopósido	4(45.5%)	4(45.5%)
NO	0	0
<hr/>		
Radioterapia torácica		
SI	8(89)	8(89)
Secuencial	3(37.5)	3(37.5)
Concurrente	5(62.5)	5(62.5)
NO	1(11%)	1(11%)
<hr/>		
PCI		
SI	5 (55.5)	5 (55.5)
NO	4(45.5)	4(45.5)

Tabla 6. Tratamiento de los pacientes CPCP en función de la clasificación VALG: ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group ; PCI, Prophylactic Cranial Irradiation.

7.1.3.3.-Respuesta al tratamiento en los pacientes CPCP

En los 48 pacientes CPCP, tras la evaluación de la respuesta por criterios RECIST v1.1, se ha obtenido 1 estabilización, 24 RP, 3 RC y 11 PG. En 9 pacientes no ha sido evaluable la respuesta por los siguientes motivos: 3 pacientes no llegaron a recibir ningún tratamiento por deterioro clínico y 6 pacientes fallecieron por toxicidad antes de la evaluación (4 pacientes por toxicidad relacionada con esquema carboplatino-etopósido y 2 por toxicidad relacionada con esquema cisplatino-etopósido). Los 9 pacientes no evaluados tenían todos al diagnóstico ED, y eran todos ECOG 2-3. (**Tabla 7**)

RESPUESTAS OBTENIDAS POR RECIST V1.1						
Clasificación VALG	EE	RP	RC	PG	NO EVALUADOS	Total
EL	0	6	2	1	0	9
ED	1	18	1	10	9	39
Suma N (%)	1(2)	24(50)	3(6.25)	11(23)	9(18.75)	48

Tabla 7. Respuestas obtenidas por RECIST v1.1 en pacientes con CPCP

Hemos agrupado a los pacientes en dos categorías atendiendo a la existencia o no de beneficio clínico. Hemos definido beneficio clínico como la suma de RC + RP + EE. La ausencia de beneficio engloba pacientes con progresión como mejor respuesta y pacientes no evaluados. (**Tabla 8**)

RECIST v1.1	N pacientes	Categoría (N)
EE	1	BENEFICIO CLINICO (28)
RP	24	
RC	3	
PG	11	NO BENEFICIO (20)
NO EVALUADOS	9	

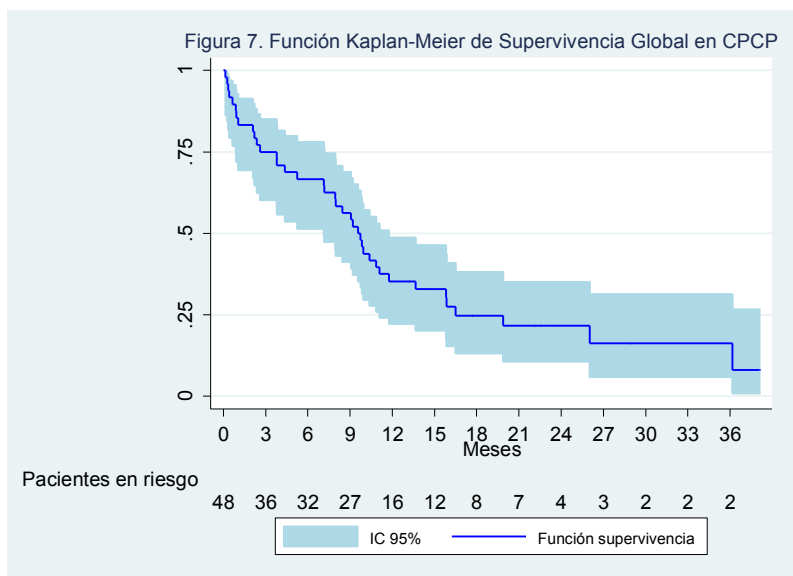
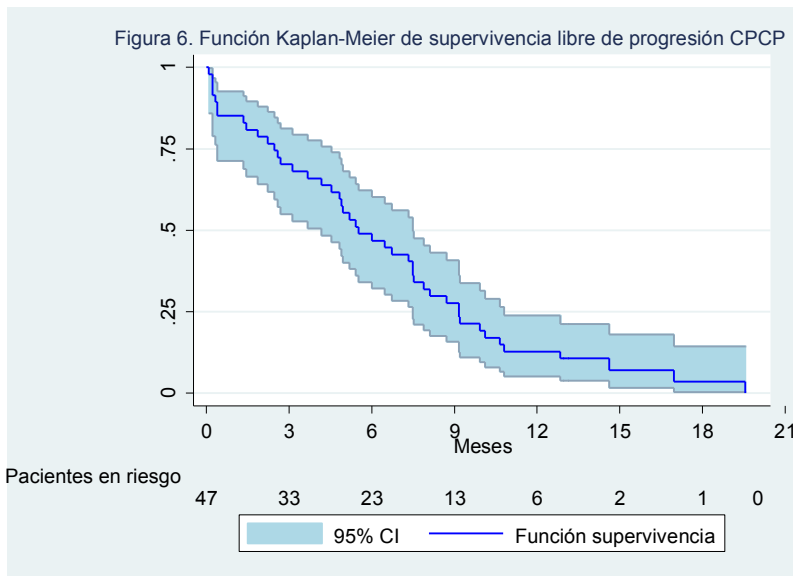
Tabla 8. Beneficio clínico frente a NO BENEFICO en pacientes con CPCP

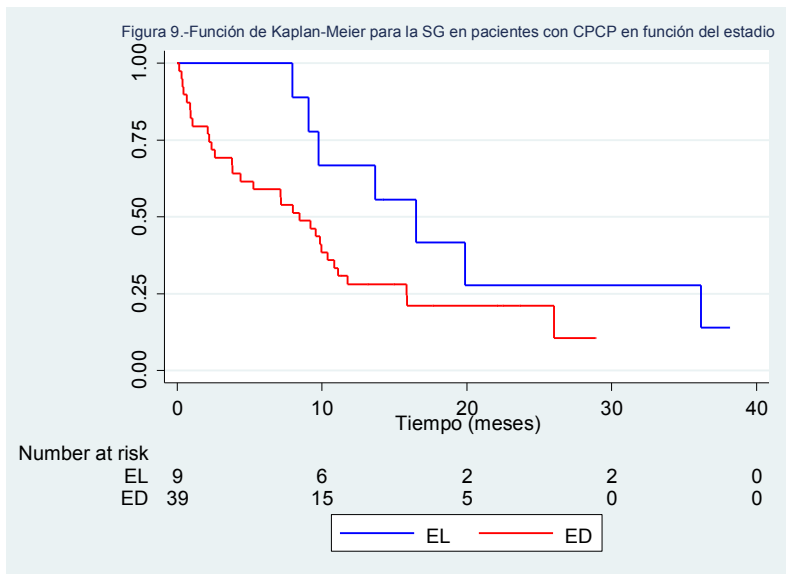
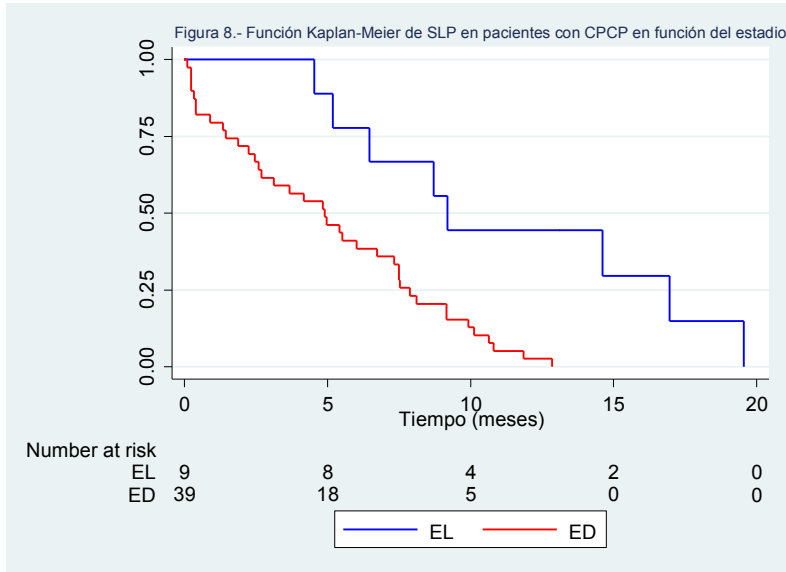
7.1.3.4.-Supervivencia en los pacientes CPCP

En el momento del análisis, la mediana de seguimiento de los pacientes con CPCP es de 330 días y la mayoría han muerto (38 pacientes, 80%). Sólo un paciente no ha progresado, resultando en una mediana de supervivencia libre de progresión de 5.5 meses (IC 95%, 4.17-7.49) (**Figura 6**) y una mediana de supervivencia global de 9.5 meses (IC 95%, 7.1-11.7) (**Figura 7**).

La mediana de SLP para los pacientes con los 9 pacientes con enfermedad limitada fue de 9 meses (IC 95% 4.5-17) , mientras que para los 39 pacientes con enfermedad diseminada fue de 5 meses (IC 95% 2.5-7), siendo esta diferencia estadísticamente significativa; HR 4 (IC 95% 1.5-10), p 0.004 (**Figura 8**).

La mediana de SG para los 9 pacientes con enfermedad limitada fue de 16 meses (IC95% 8-36), mientras que para los 39 pacientes con enfermedad diseminada fue de 8 meses (IC 95% 4-10), siendo esta diferencia no estadísticamente significativa; HR 2 (IC 95% 0.8-5), p 0.11 (**Figura 9**)





7.2.-Células tumorales circulantes (CTCs): descriptivo

7.2.1.-Células tumorales circulantes en la serie global

Se ha determinado el número y la presencia de CTCs en todos los pacientes a la inclusión en el estudio (determinación basal).

El 30% de los pacientes con cáncer de pulmón de nuestra serie global (80/271 pacientes) tuvieron al menos una CTC en la determinación basal con un rango que osciló entre 1-6192, siendo la mediana 59 CTCs (IC 95% 3-437). Solo 17 pacientes tuvieron CTCs basales ≥ 50 (7%).

En cuanto a la distribución por histología, de los 80 pacientes con CTCs basales, 32 pacientes eran CPCP y 48 CPNCP.

7.2.2.-Células tumorales circulantes en pacientes con CPNCP

En el 21.5% de los pacientes (48/223) con CPNCP se encontraron CTC en la determinación basal, siendo la media de 2 CTCs y el rango 1-136. Únicamente en 2 pacientes se detectaron más de 50 CTC basales. (**Figura 10**)

La distribución de CTC basal por estadio según la clasificación TNM fue de 0/16 pacientes para estadio I, 1/22 pacientes en el estadio II (4.5%), 8/62 pacientes en estadio III (12.9%) y 39/123 pacientes en el estadio IV (31.4%).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la asociación de la presencia de CTCs basales y el estadio tumoral IV, calculado por el test de Chi-cuadrado ($p < 0.0001$), con una OR de 4.7 (IC 95% 2-10).

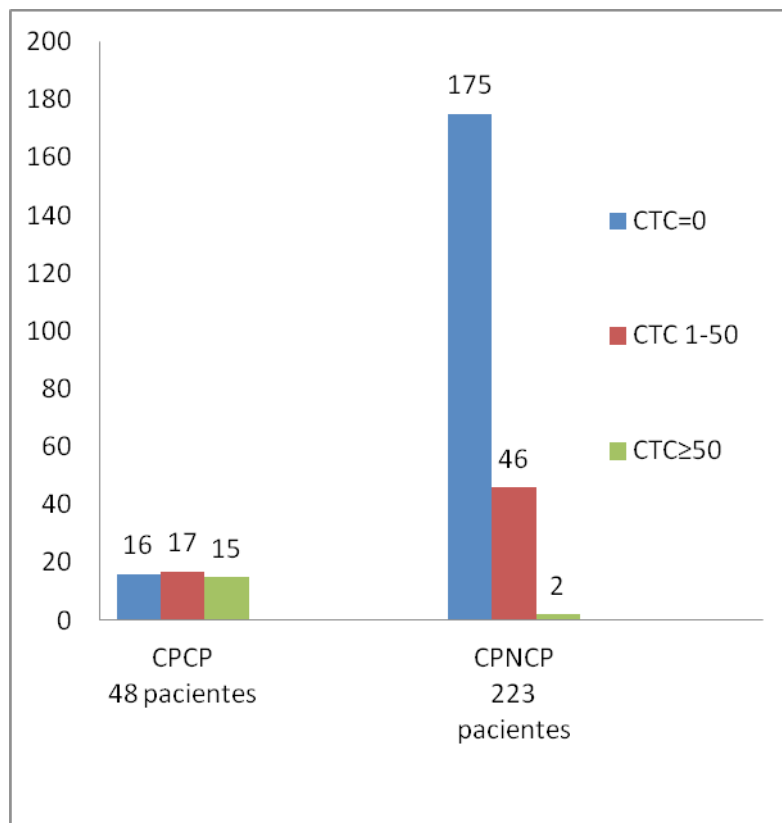


Figura 10: Número de CTCs según histología.

7.2.3.-Células tumorales circulantes en pacientes con CPCP

El 66% de los pacientes con CPCP tenían CTCs en la determinación basal (32/48 pacientes), con una media de 320 CTCs (IC 95% 28-612) y un rango entre 1 y 6192 CTCs. Quince pacientes (31%) tenían CTCs basales ≥ 50 .

En cuanto a la distribución según estadio VALG, se encontraron CTC basales en el 66.6%, de pacientes con EL (6/9 pacientes) y en el 66.7% de pacientes con ED (26/29)

Además de la determinación basal, se planificó un análisis de CTCs tras el segundo ciclo de tratamiento y otro en el momento de la progresión de enfermedad.

La determinación correspondiente a la evaluación tras el segundo ciclo solo fue posible en 25 pacientes (52% del total), correspondientes a 5/9 pacientes con EL y a 20/39 ED. No se detectaron CTCs en ninguno de los 5 pacientes con EL y estuvieron presentes en sólo 6 de los 20 pacientes analizados con ED (tasa de detección del 30%). La media de CTCs fue de 132,5 CTCs con un rango de 1-2176.

En cuanto a la determinación en el momento de la progresión, fue posible en 14 pacientes, la mayoría con ED al diagnóstico (11 pacientes). La tasa de detección fue del 71% (10/14)., correspondientes a 8 pacientes con ED y 2 con EL al diagnóstico. La media fue de 565 CTCs y el rango de 1-4594 CTCs. (Tabla 9)

Tabla 9: Niveles de CTCs en CPCP basales, tras 2 ciclos y a la progresión

	CTCs basal	CTCs tras 2 ciclos	CTCs a la progresión
Total pacientes evaluados	48	25	14
	EL/ED 9/39	EL/ED 5/20	EL/ED 3/11
Mediana CTCs detectadas	17	0	7
Media CTCs detectadas	320	132,5	565
	EL/ED 17/390	EL/ED 0/165	EL/ED 3/718
Rango CTCs detectadas	1-6192	1-2176	1-4584
	EL/ED 4-48/3-6192	EL/ED 0/1-2176	EL/ED 1-7/2-4584

En la siguiente tabla se muestran las respuestas obtenidas por criterios RECISTv1.1 para los pacientes analizados en los 3 momentos y la subdivisión en enfermedad limitada/diseminada. (**Tabla 10**)

Tabla 10: Respuestas de los pacientes analizados con CPCP en los 3 momentos (basal, tras 2 ciclos y a la progresión)

	CTCs basal	CTCs tras 2 ciclos	CTCs a la progresión
Total pacientes evaluados	48	25	14
	EL/ED 9/39	EL/ED 5/20	EL/ED 3/11
BENEFICIO CLINICO	28	18	8
	EL/ED 8/20	EL/ED 5/13	EL/ED 3/5
NO BENEFICIO CLINICO	20	7	6
	EL/ED 1/19	EL/ED 0/7	EL/ED 0/6

7.2.3.1- Punto de corte y capacidad discriminativa en CPCP.

Curvas ROC

El análisis de curvas ROC (receiver operating characteristic curve) 141 constituye un método estadístico para determinar la exactitud diagnóstica de test que utilizan variables continuas, como es el caso de las CTCs, siendo utilizadas con este caso con 2 propósitos específicos: determinar el punto de corte de una escala continua (valor de CTC basal) en el que se alcanza la sensibilidad y especificidad más alta y evaluar la capacidad discriminativa del test diagnóstico.

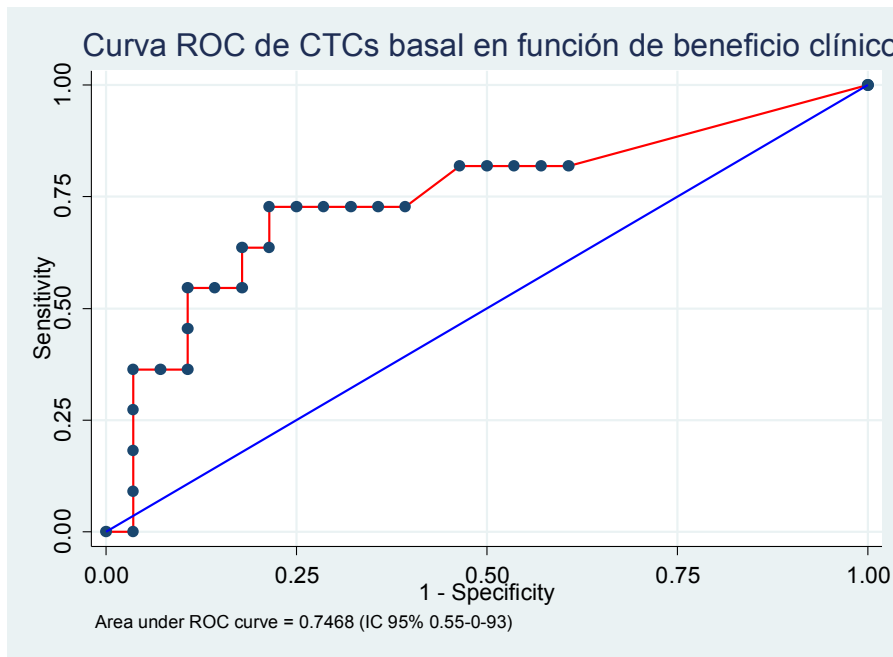
La capacidad discriminativa de la curva ROC para CTCs se ha realizado en función del beneficio clínico obtenido, definido como la suma de respuestas parciales, respuestas completas y estabilizaciones frente a no beneficio definido como progresión y pacientes no evaluados.

La curva de ROC reveló que el valor basal de 391 CTC por 7.5 ml de muestra de sangre (el cuartil más alto) mostraba una buena especificidad para discriminar beneficio clínico (100%), pero una baja sensibilidad (33%). A 50 CTC (mediana de cuartil) la especifici-

dad baja al 89% (IC 95% 77,8%-100%) y la sensibilidad sube a 55% (IC 95% 33,2%-76,8%). Tras múltiples evaluaciones, 50 CTC fue elegida como el punto de corte, por tener la mejor especificidad con una aceptable sensibilidad.

El área bajo la curva de las CTCs basales de nuestro estudio es de 0.7468; IC 95% 0.55-0.93. (**Figura 11**)

Figura 11. Capacidad discriminativa de la Curva ROC para las CTCs basales en función de beneficio clínico



7.2.3.2.-Probabilidad diagnóstica de las CTCs ≥ 50 . Estudio del valor predictivo de las CTCs ≥ 50

Para el análisis de la exactitud diagnóstica de una prueba, primero se debe conocer el resultado de la prueba (+ ó -), en nuestro contexto, (≥ 50 ó < 50), y a partir de esta información interesa conocer la probabilidad del que el paciente presente o no la enfermedad según el resultado de la prueba, o como en nuestro caso, predecir el curso de la enfermedad (beneficio clínico o no). Estas probabilidades son lo que se denominan valores predictivos de la prueba y vienen dadas por una tabla 2x2, representadas en la **tabla 11**.

Estas probabilidades se presentan según las recomendaciones que utiliza la medicina basada en la evidencia (MBE) para estudiar la eficacia de las pruebas diagnósticas (**Tabla 12**).¹²²

Tabla 11. Tabla 2x2 de evaluación de pruebas diagnósticas: CTCs \geq 50

	PROGRESIÓN DE ENFERMEDAD		TOTAL
	PRESENTE (PROGRESIÓN= PG + ENFERMEDAD NO EVALUABLE)	AUSENTE (BENEFICIO CLINICO= RC+RP+EE)	
CTC \geq 50	11	3	14
CTC <50	9	25	34
TOTAL	20	28	48

La clave del enfoque radica en relacionar los dos pilares que sostienen la formulación de la MBE: la habilidad clínica individual (concepto asociado al de probabilidad previa o pre-test de una enfermedad) y la mejor evidencia externa disponible sobre la eficacia de las pruebas (noción que se vincula a los conceptos de sensibilidad y especificidad). Fruto de esta relación se obtienen valoraciones sobre la probabilidad posterior o post-test, que coincide con el valor predictivo para positivos, con objeto de orientar al clínico a emitir un juicio final.

Además de la exactitud diagnóstica de una prueba se debe evaluar su comportamiento cuando se usa en diferentes contextos clínicos, de este modo nosotros hemos analizado el valor predictivo positivo, que para las CTCs \geq 50 en nuestro estudio es del 78,57% (IC 95% 57,08%-100%). El valor predictivo negativo de las CTCs < 50 tiene unos valores similares al valor predictivo positivo de las CTCs \geq 50, con un 73,53% (IC 95% 58.70%-88,36%). El valor de LR+ en nuestro estudio es 5.13 (IC 95% 1,64-16,06), mientras que LR-, es de 0.5 (IC 95% 0,31-0,83). (**Tabla 12**)

Tabla 12. Resultados de la tabla 2 x2

Índice		IC 95%
Sensibilidad	55,00%	33,20% a 76,80%
Especificidad	80,29%	77,83% a 100,00%
Valor predictivo positivo	78,27%	57,08% a 100,00%
Valor predictivo negativo	73,53%	58,70% a 88,36%
Razón de verosimilitud + (LR+)	5,13	1,64-16,06
Razón de verosimilitud – (LR-)	0.5	0,31-0,83

7.3.- CTCs basales en el CPCP

7.3.1.-Correlación entre el valor de CTC basal y las características clínicas de los pacientes con CPCP

Se ha descrito la relación entre las principales características clínicas de los pacientes con CPCP y 2 puntos de corte distintos para el valor basal de las CTCs: la presencia o no de CTCs basales (CTC \geq 1 versus CTC=0) y CTC \geq 50 versus CTC < 50.

La utilización de 2 puntos de corte distintos se debe a que la presencia o no de CTCs basales tiene valor pronóstico en estudios previos. El punto de corte de 50 es el proporcionado por las curvas ROC de nuestro trabajo.

A. SEXO

No hemos encontrado relación entre el valor de las CTCs basales y el sexo, ya sea en función del punto de corte de CTC \geq 1, $p=0.23$ (**TABLA 13**) ó el valor de CTC basal \geq 50, $p=0.28$ (**TABLA 14**).

Recuento	SEXO		Total
	VARON	MUJER	
CTC basal = 0	11	5	16
CTC basal \geq 1	19	13	32
Total	30	18	48

p=0,23

Tabla 13. Tabla de contingencia: Sexo – CTC basal \geq 1 versus CTC = 0

Recuento	SEXO		Total
	VARON	MUJER	
CTC basal < 50	19	14	33
CTC basal \geq 50	11	4	15
Total	30	18	48

p=0,28

Tabla 14. Tabla de contingencia: Sexo – CTC basal \geq 50 versus CTC basal <50

B. EDAD

La edad media de nuestra muestra es de 64 años, por lo que basándonos en ello, hemos elegido 65 años como punto de corte. No hemos encontrado relación entre el valor de las CTCs basales y la edad (\geq 65 años ó < 65 años), ya sea en función del punto de corte de CTC \geq 1, p=0.32 (TABLA 15) ó el valor de CTC basal \geq 50, p=0.34 (TABLA 16).

Recuento	EDAD		Total
	Menor 65 años	Mayor o igual a 65 años	
CTC basal = 0	8	8	16
CTC basal \geq 1	20	12	32
Total	28	20	48

p= 0.32

Tabla 15. Tabla de contingencia: EDAD – CTC basal \geq 1 versus CTC =0

Recuento	EDAD		Total
	Menor 65 años	Mayor o igual a 65 años	
CTC basal < 50	18	15	33
CTC basal \geq 50	10	5	15
Total	28	20	48

p=0.34

Tabla 16. Tabla de contingencia: EDAD – CTC basal \geq 50 versus CTC <50

C. ECOG

No hemos encontrado relación entre la presencia de CTC basal (CTC \geq 1) y el ECOG al diagnóstico (**TABLA 17**), pero sí hemos encontrado correlación entre el valor de CTC basal \geq 50 y deterioro del estado general medido según la escala ECOG (2-3) con una p significativa (p=0.012) calculada por Chi Cuadrado con una OR 4.32. (**TABLA 18**)

Recuento	ECOG		Total
	ECOG 0-1	ECOG 2-3	
CTC basal = 0	12	4	16
CTC basal \geq 1	17	15	32
Total	29	19	48

p= 0.13

Tabla 17. Tabla de contingencia: ECOG – CTC basal \geq 1 versus CTC = 0

Recuento	ECOG		Total
	ECOG 0-1	ECOG 2-3	
CTC basal < 50	24	9	33
CTC basal \geq 50	5	10	15
Total	29	19	48

p= 0.012; OR 4.32 (IC 95% 1.15-16)

Tabla 18. Tabla de contingencia: ECOG – CTC basal \geq 50 versus CTC <50

D. ESTADIO

En nuestro estudio, no hemos encontrado relación entre estadio al diagnóstico y presencia de CTCs basales, (**TABLA 19**) pero si hemos encontrado una relación estadísticamente significativa entre enfermedad diseminada y cifras de CTCs \geq 50, p 0.025; con un riesgo relativo (RR) de 1.36. (**TABLA 20**) En ninguno de los 9 pacientes con EL se encontraron niveles de CTCs \geq 50 frente a los 15/39 pacientes con ED, por lo que no se ha podido calcular la OR y se ha realizado el RR.

Recuento	ESTADIO		Total
	EL	ED	
CTC =0	3	13	16
CTC ≥1	6	26	32
Total	9	39	48

p=0.15

Tabla 19. Tabla de contingencia: Estadio de enfermedad-CTC ≥ 1 versus CTC = 0

Recuento	ESTADIO		Total
	EL	ED	
CTC <50	9	24	33
CTC ≥50	0	15	15
Total	9	39	48

p=0.025; RR= 1.36 (IC95% 1.11-1.66)

Tabla 20. Tabla de contingencia: Estadio de enfermedad-CTC ≥ 50 versus CTC <50

E. METASTASIS CEREBRALES

Hemos encontrado una relación inversa entre la presencia de CTC basal (CTC ≥1) y las metástasis cerebrales al diagnóstico, es decir, los 9 pacientes con metástasis cerebrales tuvieron menos frecuencia de presentar valores de CTC ≥1 de forma significativa (p=0.027), con una OR 0.17 (**TABLA 21**). Cinco de los 9 pacientes sólo presentaban esta localización metastásica y 4 presentaban metástasis cerebrales en el contexto de enfermedad sistémica. No se ha encontrado una relación entre valores de CTC por encima de 50 y la presencia de metástasis cerebrales (p=0.58) (**TABLA 22**).

Recuento	Metástasis cerebrales		Total
	NO	SI	
CTC basal = 0	10	6	16
CTC basal ≥ 1	29	3	32
Total	39	9	48

$p=0.027$; OR 0.17 (IC95% 0.036-0.82)

Tabla 21. Tabla de contingencia: Metástasis cerebrales – CTC basal ≥ 1 versus CTC =0

Recuento	Metástasis cerebrales		Total
	NO	SI	
CTC basal <50	27	6	33
CTC basal ≥ 50	12	3	15
Total	39	9	48

$p=0.58$

Tabla 22. Tabla de contingencia: Metástasis cerebrales – CTC basal ≥ 50 versus CTC <50

F. METASTASIS ÓSEAS

En nuestro estudio, hemos encontrado una relación estadísticamente significativa entre la presencia de CTC basal al diagnóstico (CTC ≥ 1) y la presencia de metástasis óseas ($p=0.007$) con una OR=8 (**TABLA 23**). En los pacientes con valores de CTC ≥ 50 ($p=0.0001$) también encontramos una relación estadísticamente significativa con la presencia de metástasis óseas con una OR=23. (**TABLA 24**).

Recuento	Metástasis óseas		Total
	NO	SI	
CTC basal= 0	14	2	16
CTC basal ≥ 1	15	17	32
Total	29	19	48

p=0.007;OR 8 (IC 95% 1.5-40)

Tabla 23. Tabla de contingencia: Metástasis óseas – CTC basal ≥ 1 versus CTC =0

Recuento	Metástasis óseas		Total
	NO	SI	
CTC basal <50	26	7	33
CTC basal ≥ 50	3	12	15
Total	29	19	48

P=0.0001: OR 23 (IC 95% 4-128)

Tabla 24. Tabla de contingencia: Metástasis óseas – CTC basal ≥ 50 versus CTC <50

G. METASTASIS HEPÁTICAS

No encontramos significación estadística cuando analizamos la relación entre metástasis hepáticas al diagnóstico y la presencia de CTC >1 basal (p=0.11) (**TABLA 25**), pero sí cuando consideramos el punto de corte en > 50 CTC (p=0.0001) con una OR 45. (**TABLA 26**)

Recuento	Metástasis hepáticas		Total
	NO	SI	
CTC basal= 0	13	3	16
CTC basal ≥ 1	19	13	32
Total	32	16	48

p= 0.116

Tabla 25. Tabla de contingencia: Metástasis hepáticas – CTC basal ≥ 1 versus CTC =0

Recuento	Metástasis hepáticas		Total
	NO	SI	
CTC basal <50	30	3	33
CTC basal ≥ 50	2	13	15
Total	32	16	48

p=0.0001: OR 45 (IC 95% 7-279)

Tabla 26. Tabla de contingencia: Metástasis hepáticas – CTC basal ≥ 50 versus CTC <50

H. METASTASIS SUPRARRENALES

Hemos encontrado relación entre la presencia de metástasis suprarrenales y los valores basales de CTC > 50 (p=0.018) con una OR de 32. (**TABLA 28**), pero no con la presencia de CTC >1 (p=0.358) (**TABLA 27**).

Recuento	Metástasis suprarrenales		Total
	NO	SI	
CTC basal = 0	14	2	16
CTC basal \geq 1	25	7	32
Total	39	9	48

p=0.358

Tabla 27. Tabla de contingencia: Metástasis suprarrenales – CTC basal \geq 1 versus CTC = 0

Recuento	Metástasis suprarrenales		Total
	NO	SI	
CTC basal < 50	30	3	33
CTC basal \geq 50	9	6	15
Total	39	9	48

p=0.018; OR 6.6 (1.4-32)

Tabla 28. Tabla de contingencia: Metástasis suprarrenales – CTC basal \geq 50 versus CTC <50

I. RESUMEN: En la siguiente tabla resumimos las relaciones encontradas entre las localizaciones de metástasis y los valores de CTC basal. (**TABLA 29**)

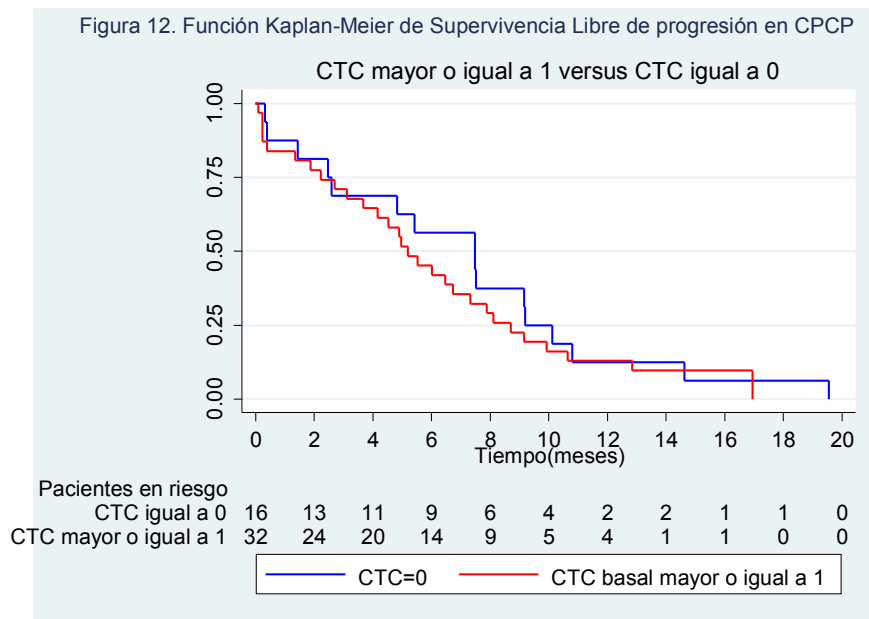
TABLA 29		
Localización metástasis	Presencia de CTC basal (CTC \geq 1)	Valor de CTC basal \geq 50
Cerebral	P=0.027	P=0.50
Ósea	P=0.007	P=0.0001
Hepática	P=0.116	P=0.0001
Suprarrenal	P=0.358	P=0.018
Pulmonar	P=0.85	P=0.45

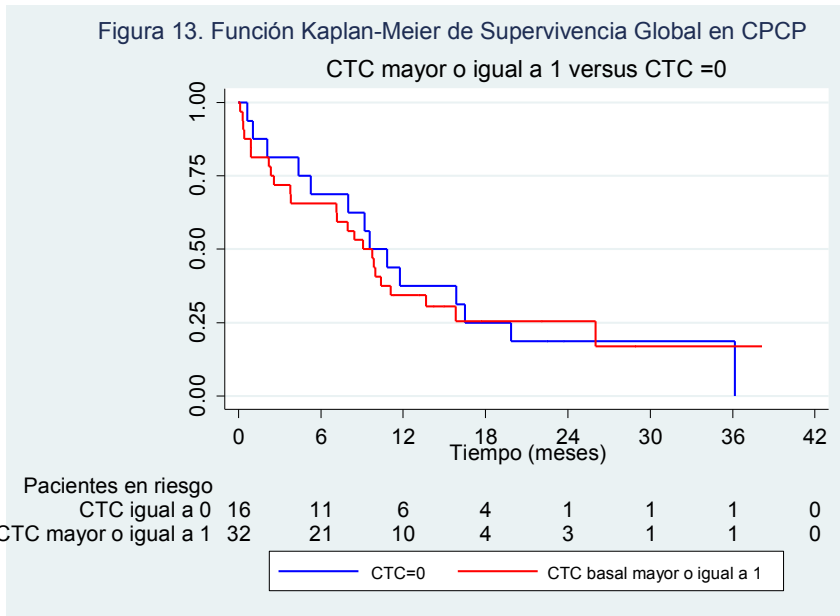
7.3.2-CTC basal: valor pronóstico

A.- Supervivencia Global y Supervivencia Libre de Progresión en función CTC basal ≥ 1 o CTC basal =0.

No hemos observado diferencias estadísticamente significativas en la SLP en función de la presencia o no de CTC basales. La mediana de SLP fue de 5.19 meses (IC95% 3.12-7.32) en los 32 pacientes con CTC ≥ 1 mientras que en los 16 pacientes con CTC basales=0 fue de 7.49 meses (IC95% 2.46-9.19), HR 1.26, log-rank p=0.47. (**Figura 12**)

Respecto a la SG, tampoco hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas. La mediana de SG en el grupo con CTC ≥ 1 fue de de 9.5 meses (IC 95% 4.3-16.4) frente a 9 meses (IC 95% 3.7-13.6).en el grupo CTC=0 HR 1.045 (IC 95% 0.54-2) (log-rank p=0.89) (**Figura 13**).





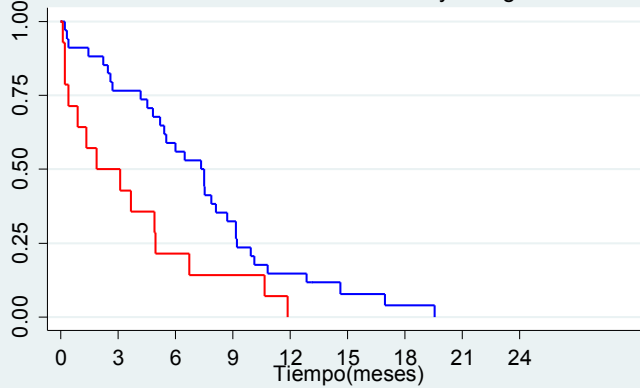
B.-Supervivencia Global y Supervivencia libre de progresión en función CTC basal ≥ 50 versus CTC basal < 50 .

Escogiendo como punto de corte CTC ≥ 50 si se encuentran diferencias estadísticamente significativas tanto en SLP como en SG. La mediana de SLP en los 34 pacientes con CTC basales < 50 fue de 7.3 meses (IC 95% 4.8-8.7) frente a los 1.8 meses (IC 95% 0.22-5) de mediana de los 14 pacientes con CTC basal ≥ 50 . Esta diferencia fue estadísticamente significativa con una HR 2.2 (IC 95% 1.15-4.2), $p=0.017$. (**Figura 14**)

La mediana de SG fue de 9.8 meses (IC 95% 8-16) para los 34 pacientes con CTC basal < 50 frente a los 2.6 meses (IC 95% 0.42-10) de los 14 pacientes con CTC basal ≥ 50 . Esta diferencia también fue estadísticamente significativa (HR 2.13 (IC 95% 1.2-4.46), $p=0.044$). (**Figura 15**)

Figura 14. Función Kaplan-Meier Supervivencia Libre de Progresión CPCP

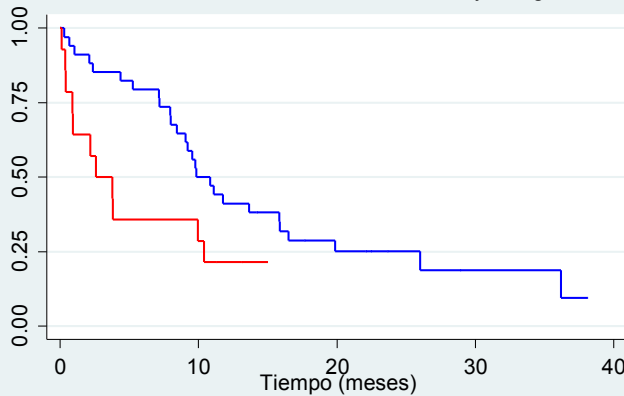
CTC menor a 50 versus CTC mayor o igual a 50



Pacientes en riesgo	
CTC menor a 50	34 26 20 11 5 2 1 0 0 0 0
CTC mayor o igual a 50	14 7 3 2 0 0 0 0 0 0 0

Figura 15. Función Kaplan-Meier de Supervivencia Global en CPCP

CTC basal menor a 50 versus CTC basal mayor o igual a 50



Pacientes en riesgo	
CTC menor a 50	34 29 27 22 14 12 8 7 4 3 2
CTC mayor o igual a 50	14 7 5 5 2 0 0 0 0 0 0

7.3.3.-CTC basal: valor predictivo de respuesta a tratamiento

En esta sección, hemos analizado las medidas de asociación entre las respuestas por criterios RECIST v1.1 y nuestros 2 puntos de corte (la presencia o ausencia de CTCs basales y el punto de corte de CTC 50 basal).

Recordemos que un 50% de nuestros pacientes alcanzaron respuesta parcial por criterios RECIST v1.1 tras 2 ciclos de tratamiento (24 pacientes), 3 pacientes alcanzaron respuesta completa, 1 estabilización y 11 pacientes progresaron a pesar de la quimioterapia.

9 pacientes no fueron valorables radiológicamente (ver Tabla 7). Por lo tanto, 28 pacientes obtuvieron un beneficio clínico (RP+RC+EE) con el tratamiento de quimioterapia y 20 pacientes no obtuvieron beneficio (PG+No evaluados). (ver **Tabla 8**)

A.-Asociación de respuesta con presencia o ausencia de CTCs basales.

Diez de los 16 pacientes con CTC=0 experimentaron beneficio clínico con la terapia frente a 18 de 32 pacientes con CTC ≥ 1 . Esta diferencia no alcanzó significación estadística ($p=0.68$). (**TABLA 30**) La OR de esta asociación fue de 1.29 (IC 95% 0.37-4.443).

TABLA DE CONTINGENCIA 2X2:

RESPUESTA	CTC =0	CTC ≥ 1	Total
BENEFICIO CLINICO	10	18	28
PROGRESIÓN +NO EVALUABLE	6	14	20
Suma	16	32	48

$X^2=0.17, p=0.68$

Tabla 30. Asociación de CTCs Basales=0 versus CTCs Basales ≥ 1 con respuesta al tratamiento

B.-Asociación de respuesta con punto de corte de CTCs basales 50.

Veinticuatro de los 34 pacientes con CTC<50 experimentaron beneficio clínico con el tratamiento frente a 4 de 14 pacientes con CTC ≥ 50 . Esta diferencia sí fue estadísticamente significativa ($X^2=7.02, p=0.007$) siendo la OR 6 (IC 95% 1.5-23.7). (Tabla 31)

ASOCIACIÓN DE CTCs BASALES <50 & CTCs BASALES ≥ 50 CON RESPUESTA AL TRATAMIENTO:

RESPUESTA	CTC <50	CTC ≥ 50	Total
BENEFICIO CLINICO	24	4	28
PROGRESIÓN +NO EVALUABLE	10	10	20
Suma	34	14	48

$X^2=7.02, P=0.007; OR=6$

Tabla 31. Asociación de CTCs Basales<50 versus CTCs Basales ≥ 50 con respuesta al tratamiento

7.4.-CTCs tras 2 ciclos

7.4.1.-Valor pronóstico de las CTCs tras 2 ciclos

El segundo análisis de CTCs en pacientes con CPCP solo pudo ser realizado tras 2 ciclos de tratamiento en 25 de los 48 pacientes iniciales (52%), incluyendo 5/9 pacientes con EL y 20/39 ED. No hubo presencia de CTCs en ninguno de los 5 pacientes con EL (tasa de detección 0%) y estuvieron presentes en 6 pacientes de los 20 pacientes analizados con ED (tasa de detección del 30%). La media fue de 132,5 CTCs con un rango de 0-2176. (ver **TABLA 9**).

Los valores de CTCs tras 2 ciclos se describen a continuación. (**TABLA 32**)

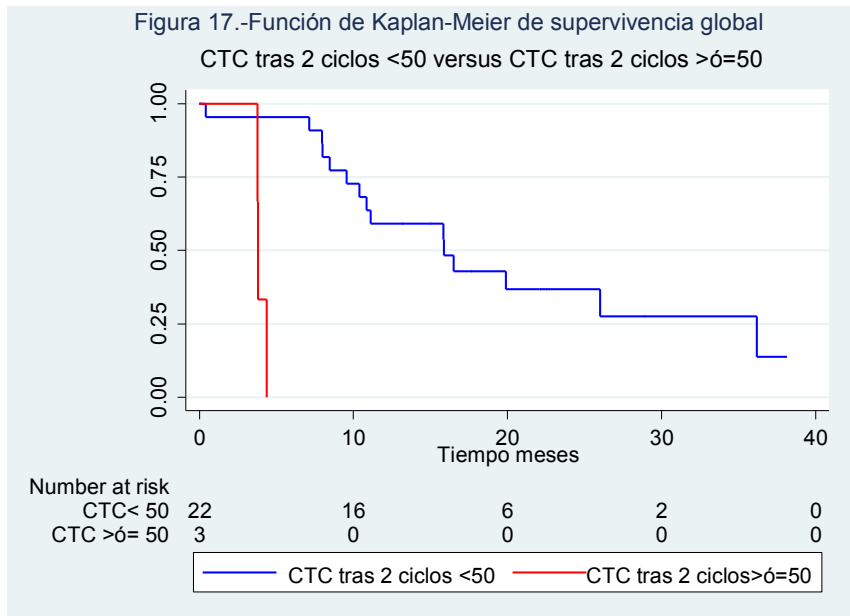
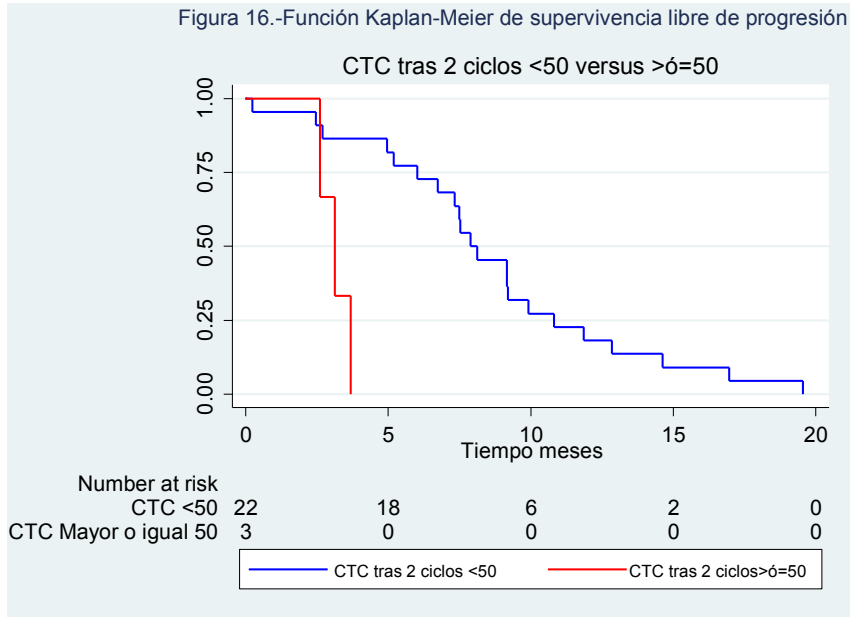
CTC tras 2 ciclos	N	%
0	19	76
3	1	4
8	1	4
17	1	4
60	1	4
1049	1	4
2176	1	4
Total	25	100

Tabla 32. Valores de CTCs tras 2 ciclos de los 25 pacientes

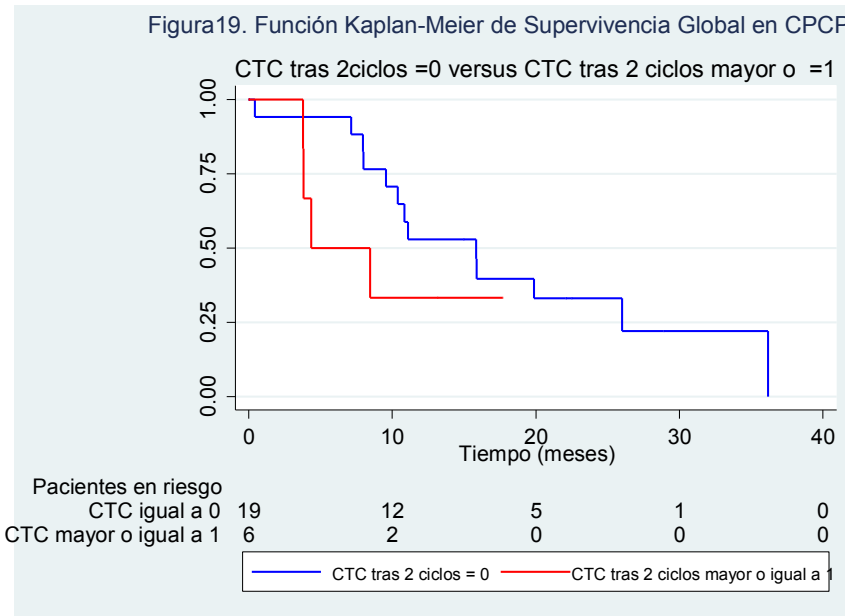
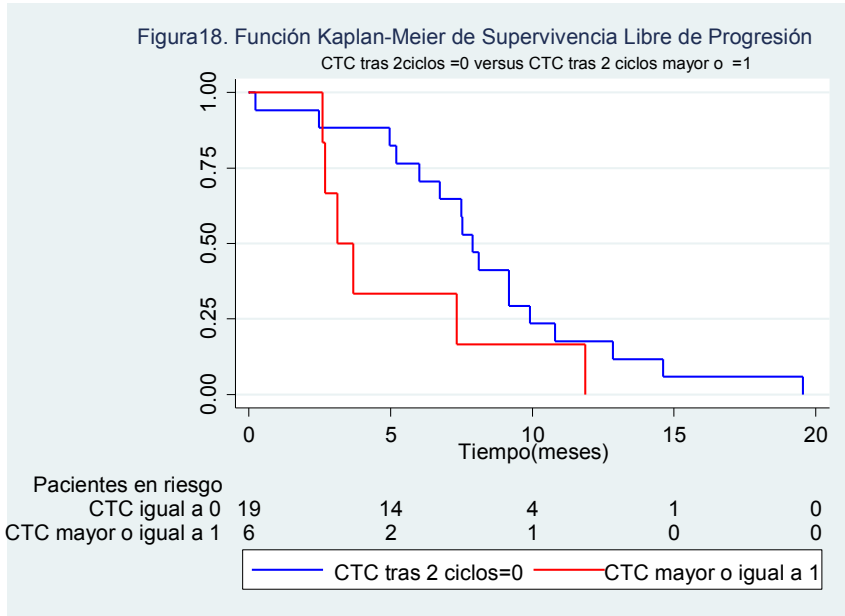
El valor numérico de CTCs tras 2 ciclos se ha dividido en 2 niveles para el análisis del valor pronóstico, por un lado la presencia o no de CTCs, y por otro, de acuerdo al valor extraído previamente en la curva de ROC (CTC <50 y CTC ≥50).

La mediana de SLP de los 22 pacientes con CTC tras 2 ciclos <50 fue de 7.8 meses (IC 95% 6-10) frente a los 3 pacientes con CTC ≥ 50 que fue de 3.1 meses (IC 95% 2.7-4). Esta diferencia fue estadísticamente significativa (HR 9 (IC 95%1.41-46), p 0.007) (**Figura 16**)

La mediana de supervivencia global de los 22 pacientes con CTC tras 2 ciclos <50 fue de 15.8 meses (IC95% 9.6-36) frente a los 3 pacientes con CTC ≥50 que fue de 3.8 meses (IC 95% 3.77-4.5). Esta diferencia también fue estadísticamente significativa; HR 32 (IC95% 3-326), p 0.003. (**Figura 17**)



Al considerar el punto de corte en CTC tras 2 ciclos=0 ó ≥ 1 , las diferencias en SLP no fueron estadísticamente significativas pero sí en SG. La mediana de SLP de los 19 pacientes con CTC tras 2 ciclos=0 fue de 8 meses (IC 95% 5.2-9.9) frente a los 6 pacientes con CTC ≥ 1 que fue de 3 meses (IC 95% 2.5-5), HR 2.17, p: 0.10 (**Figura 18**). La mediana de supervivencia global del grupo de 19 pacientes que no presentaba CTC tras 2 ciclos fue de 16 meses (IC 95%, 8-26) frente al grupo de 6 pacientes que presentaba CTC ≥ 1 , que fue de 4.3 meses (IC 95%, 3.77-5.6), siendo esta diferencia estadísticamente significativa; HR 1.86, p=0.029. (**Figura 19**)



7.4.2.-Valor pronóstico de los cambios en el valor de CTCs tras 2 ciclos

A continuación mostramos los cambios experimentados en el nivel de CTCs, en los 25 pacientes con CTCs tras 2 ciclos con respecto al basal.

Como podemos observar 11 pacientes han negativizado en la segunda determinación (CTCs tras 2 ciclos =0) (representados por color azul en la **Tabla 33**), 2 pacientes han reducido el valor de CTCs en la segunda determinación (representados por color verde), en 8 pacientes el valor de CTCs basal de 0 se ha mantenido en 0 (representados por color amarillo) y 4 pacientes han experimentado un incremento (representados por color rojo).

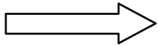
De 5 pacientes que presentaban valores de CTCs basales >100, 2 experimentaron incremento en el valor de CTCs tras 2 ciclos, 1 reducción y en dos no se detectaron CTCs tras el segundo ciclo.

		CTC tras 2 ciclos						Total	
		0	3	8	17	60	1049		2176
CTC Basal	0	8				1			9
	3	1							1
	7	1							1
	13	1			1				2
	14	1							1
	20			1					1
	25	1							1
	29	1							1
	36	1							1
	48	1							1
	90	1							1
	180		1						1
	424	1							1
	967						1		1
	2021							1	1
	2792	1							1
Total		19	1	1	1	1	1	1	25

Tabla 33.-Cambios experimentados en el nivel de CTCs basal y CTCs tras 2 ciclos de quimioterapia

El cambio entre el valor basal de CTC y tras 2 ciclos se ha dividido en 2 categorías, en función del aumento de CTC tras 2 ciclos (incremento) o bien el valor de las CTCs ha permanecido estable o inclusive reducido. Sus frecuencias se muestran a continuación. (Tabla 34)

Cambio de CTC	Frecuencia
Incremento	4
Estabilización	8
Reducción	13(11negativizaciones + 2 reducciones)
Total	25



Cambio de CTC	
	Frecuencia
Incremento	4
Reducción+ Estabilización	21
Total	25

34.-Categorías de los cambios experimentados en el nivel de CTCs basal y CTCs tras 2 ciclos de quimioterapia

Aunque la mediana de SG fue superior en el grupo de 21 pacientes con reducciones y estabilizaciones (16 meses (IC 95% 8.4-36)) frente al grupo de 4 pacientes con incremento de CTC tras 2 ciclos en los que la mediana de SG fue de 4 meses (IC 95% 3.7- 5), la diferencia no fue estadísticamente significativa HR 2.79 (IC 95%, 0.76-10) $p=0.12$. (**Figura 20**). En cuanto a SLP, la mediana fue 7.8 meses (IC 95%, 6-10) en el grupo con reducciones o estabilizaciones frente a 2.7 meses (IC 95%,0.26-2.59) en el grupo de incremento, siendo esta diferencia estadísticamente significativa: HR 14 (IC95%, 2.46-81) $p=0.003$. (**Figura 21**)

Figura 20.-Función Kaplan-Meier de Supervivencia Global

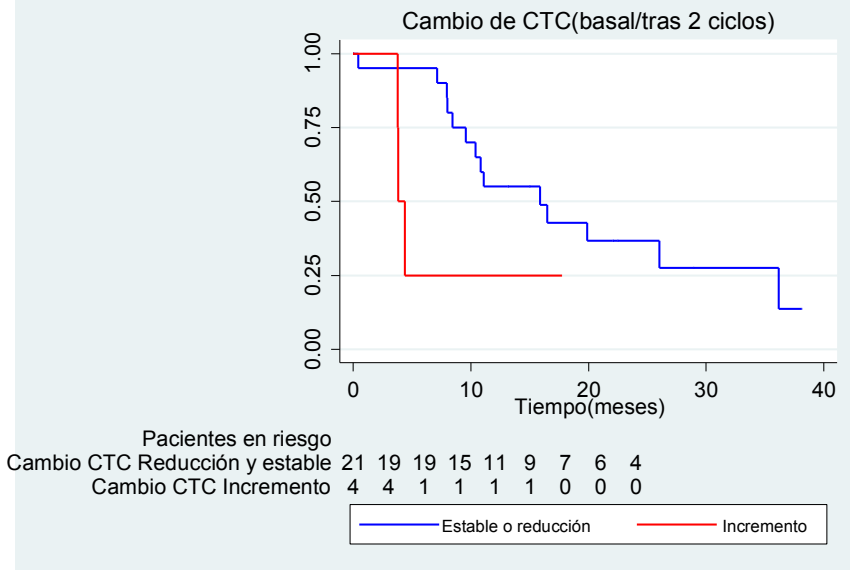
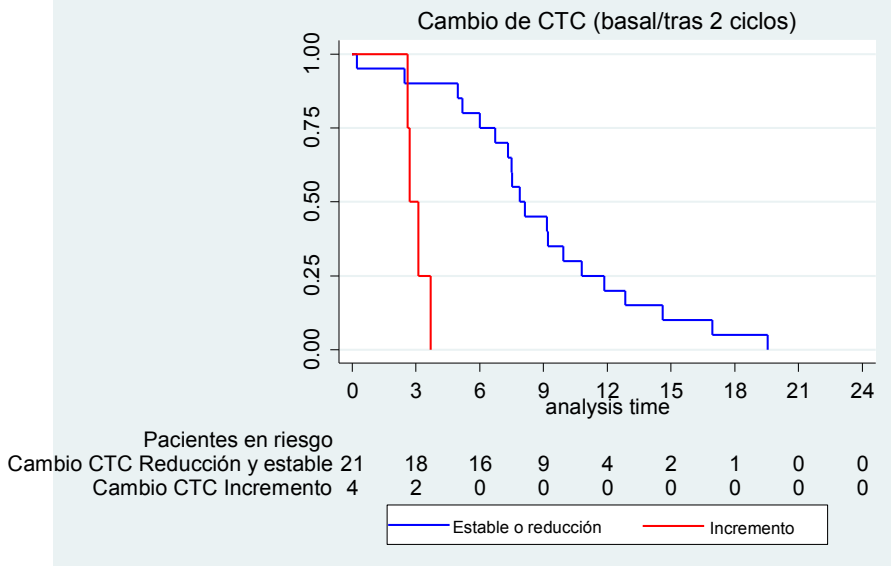


Figura 21.-Función Kaplan-Meier de Supervivencia Libre de Progresión



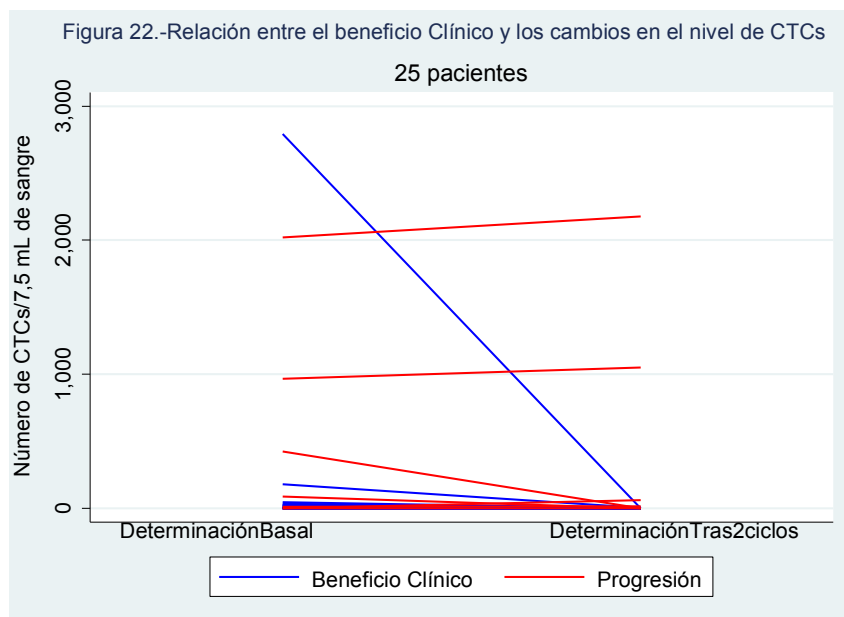
7.4.3-Valor predictivo de respuesta de la presencia de CTCs tras 2 ciclos y los cambios experimentados con respecto al basal

Dieciocho de los 25 pacientes en los que disponemos de determinación de CTCs tras 2 ciclos experimentaron beneficio clínico con el tratamiento administrado mientras que 7 experimentaron progresión. Dos de los 18 pacientes con beneficio clínico recibieron tratamiento con radioterapia concurrente con la quimioterapia. En 1 de ellos el valor de CTCs basal partía de 0 y no cambió, mientras que en el otro se negativizó (CTCs basal=13). La tabla que muestra la relación entre la respuesta obtenida al tratamiento, definida en nuestro estudio como beneficio clínico (RP+RC+EE) y los cambios en los niveles de CTCs tras 2 ciclos, se muestra a continuación. (Tabla 35)

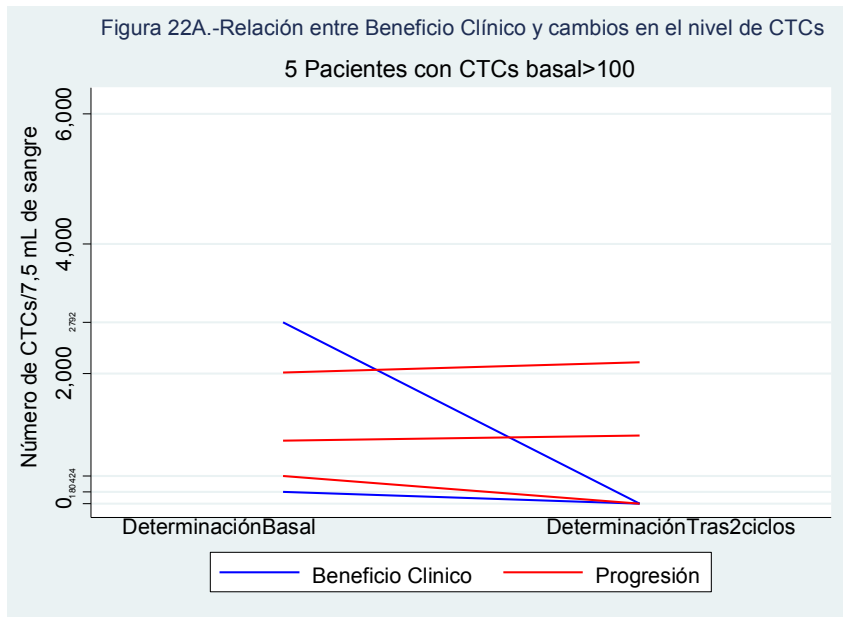
Tabla 35 Cambio de CTC tras 2 ciclos

Tipo de respuesta	ESTABLE	REDUCCIÓN	INCREMENTO	Total
Beneficio clínico (RC+RP+EE)	7	11	0	18
No Beneficio Clínico (PG+ no evaluados)	1	2	4	7
Total	8	13	4	25

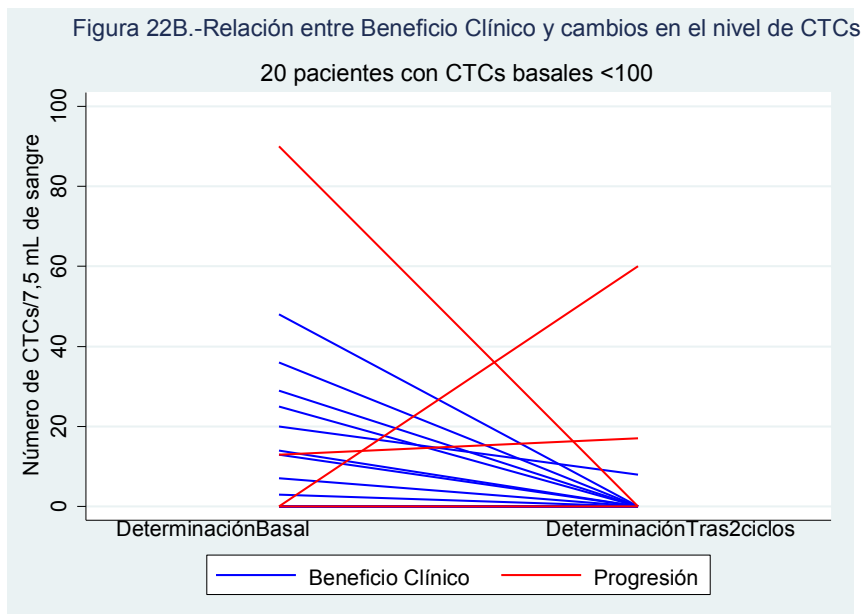
En la **figura 22**, se describen los cambios dinámicos experimentados en los niveles de CTCs en nuestros 25 pacientes y su relación con la respuesta obtenida. El color rojo representa los pacientes con progresión a tratamiento, mientras que la línea azul incluye los pacientes con beneficio clínico. Dado que esta figura se presenta a gran escala, es difícil de apreciar los cambios en función del nivel de CTCs basales, sobre todo en los niveles más bajos, por lo que hemos dividido en 2 secciones esta figura: Figura 22A y Figura 22B.



La figura **22A** representa los 5 pacientes con niveles de CTCs basales >100. Tres de los 5 pacientes experimentaron progresión (2 con incremento del valor de CTCs y 1 reducción) y 2 obtuvieron beneficio clínico (negativizaciones del valor de CTCs).



Dado que el mayor número de pacientes se concentra en niveles de CTCs basales por debajo de 100, la figura **22B** permite analizarlos en más detalle. De los 20 pacientes, 4 de ellos experimentaron progresión como mejor respuesta y de ellos, solo en dos de ellos se observó incremento de la cifra de CTC, permaneciendo sin cambios en otro (CTC=0 basal y tras segundo ciclo) y evolución paradójica con mejoría de la cifra basal de CTC en el cuarto paciente.



A.-Asociación de respuesta con presencia o ausencia de CTCs tras 2 ciclos.

Solo en 3 pacientes se observaron valores de CTC > ó igual a 50 tras el segundo ciclo.

Considerando el punto de corte en CTC > 1, 16 de los 19 pacientes con CTC=0 experimentaron beneficio clínico con la terapia frente a 2 de 6 pacientes con CTC ≥1. Esta diferencia fue estadísticamente significativa (p=0.012). (**Tabla 36**) La OR de esta asociación fue de 10.7 (IC 95% 1.3-87) , por lo que podemos decir que existe una probabilidad 10.7 veces superior de obtener beneficio clínico cuando no identificamos CTCs tras 2 ciclos.

TABLA 36. ASOCIACIÓN DE CTCS TRAS 2 CICLOS =0 VERSUS CTCS TRAS 2 CICLOS ≥1 CON RESPUESTA AL TRATAMIENTO

RESPUESTA	CTC =0	CTC≥1	Total
BENEFICIO CLINICO	16	2	18
PROGRESIÓN +NO EVALUABLE	3	4	7
Suma	19	6	25

X²=5.85, P=0.012

B.-Asociación de respuesta con los cambios experimentados en el valor de CTCs tras 2 ciclos

La reducción-estabilización de las CTCs basales después de 2 ciclos de quimioterapia (n=25) se correlacionó en nuestro trabajo con la respuesta tumoral (rs=0.7, p=0.0001).

7.5.- CTCs a la progresión

7.5.1.-Valor pronóstico de las CTCs a la progresión

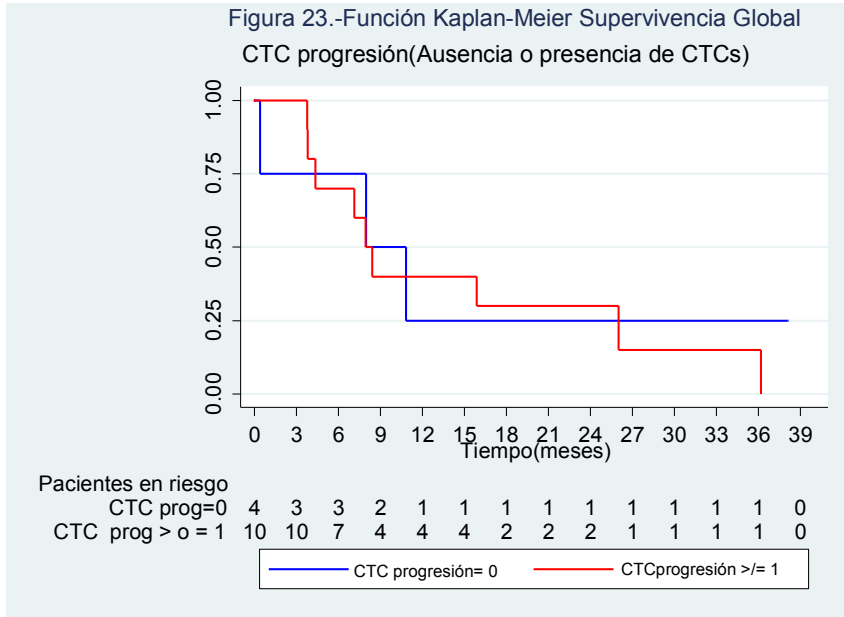
De los 14 pacientes en los que fue posible realizar una tercera determinación coincidiendo con el momento de la progresión clínica y radiológica, en 10 pacientes se detectaron CTCs en el análisis efectuado en la visita clínica confirmatoria de la progresión, lo que supone una tasa de detección del 71%. (**ver Tabla 9**).

Los valores de CTCs a la progresión se describen a continuación. (**Tabla 37**)

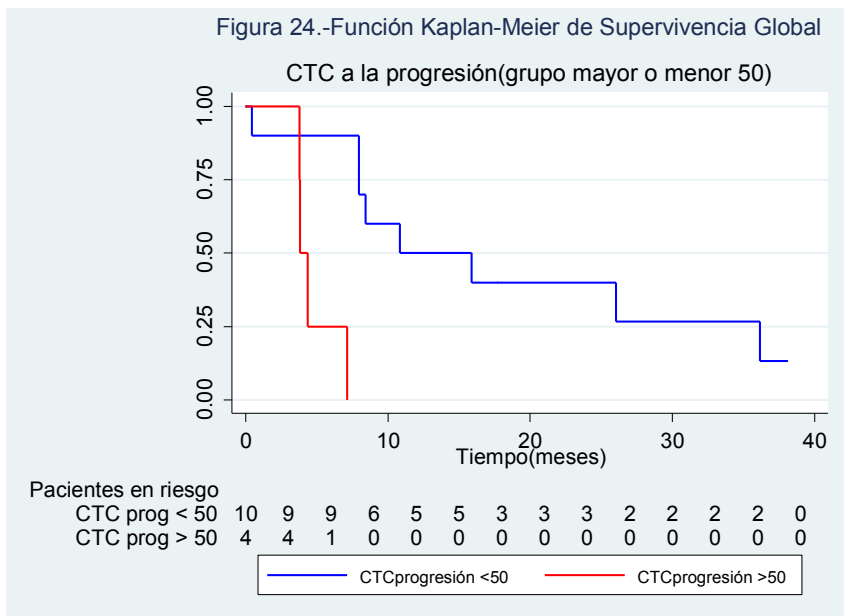
TABLA 37 CTC progresión (cel/7,5ml)	Frecuencia (n)	%
0	4	28.57
1	1	7.14
2	1	7.14
7	2	14.29
10	1	7.14
17	1	7.14
60	1	7.14
1049	1	7.14
2176	1	7.14
4584	1	7.14
Total	14	100

El valor numérico de CTCs se ha dividido en 2 niveles para el análisis del valor pronóstico, por un lado la presencia o no de CTCs, y por otro, de acuerdo al valor extraído previamente en la curva de ROC ($CTC < 50$ y $CTC \geq 50$).

No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en supervivencia global, cuando comparamos el grupo de 4 pacientes con ausencia de CTC a la progresión ($CTC=0$), con el grupo de 10 pacientes que tienen $CTC \geq 1$. (**Figura 23**)



La mediana de supervivencia global del grupo de 10 pacientes que al momento de la progresión presentaba <50 CTC fue de 11 meses (IC 95%, 2.42-36) frente al grupo de 4 pacientes que presentaba CTC≥50 , que fue de 2.7 meses (IC 95% 1.68-5), siendo esta diferencia estadísticamente significativa; HR 16 (IC 95% 1.68-150), p=0.016. (Figura 24)

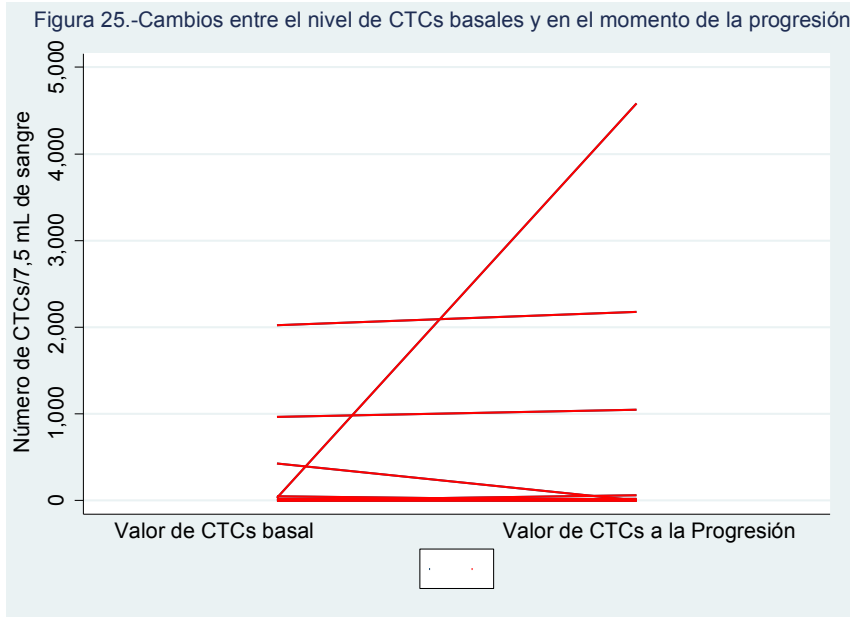


7.5.2.-Valor pronóstico de los cambios en los niveles de CTCs entre el valor de CTC basal y CTC a la progresión

A continuación mostramos los cambios experimentados en el nivel de CTCs, en los 14 pacientes con CTCs a la progresión con respecto al basal. Seis de los 14 pacientes analizados tenían como mejor respuesta obtenida progresión de enfermedad. Como podemos observar en la Tabla 38, 2 pacientes han negativizado el valor de CTCs a la progresión (CTCs a la progresión =0) (representados por color azul), 3 pacientes han reducido el valor de CTCs (representados por color verde), en 2 pacientes el valor de CTCs basal de 0 se ha mantenido en 0 (representados por color amarillo) y 7 pacientes han experimentado un incremento (representados por color rojo). 3 de nuestros pacientes presentaban valores de CTCs basales >100. 2 de ellos experimentaron incremento en el valor de CTCs a la progresión y 1 no mostró CTCs en el momento de la progresión. 1 paciente presentó un ascenso especialmente marcado en el valor de CTCs en el momento de la progresión, con valor de CTC basal de 29 (CTC a la progresión 4584). (**Figura 25**)

	CTC a la progresión										Total
	0	1	2	7	10	17	60	1049	2176	4584	
CTC Basal 0	2	1		1			1				5
13				1		1					2
14			1								1
20					1						1
29										1	1
48	1										1
424	1										1
967								1			1
2021									1		1
Total	4	1	1	2	1	1	1	1	1	1	14

Tabla 38.-Cambios experimentados en el nivel de CTCs basal y CTCs a la progresión



Observamos que existe un aumento del valor de CTC a la progresión de enfermedad con respecto al basal en un 50% de los pacientes con 2 pacientes estables (14.3%) y que el resto de los pacientes muestran reducción de CTC con respecto al basal (35.7%). De un lado, los pacientes con valores estables se han agrupado con los de reducción y por otro han ido los que muestran incremento. (Tabla 39)

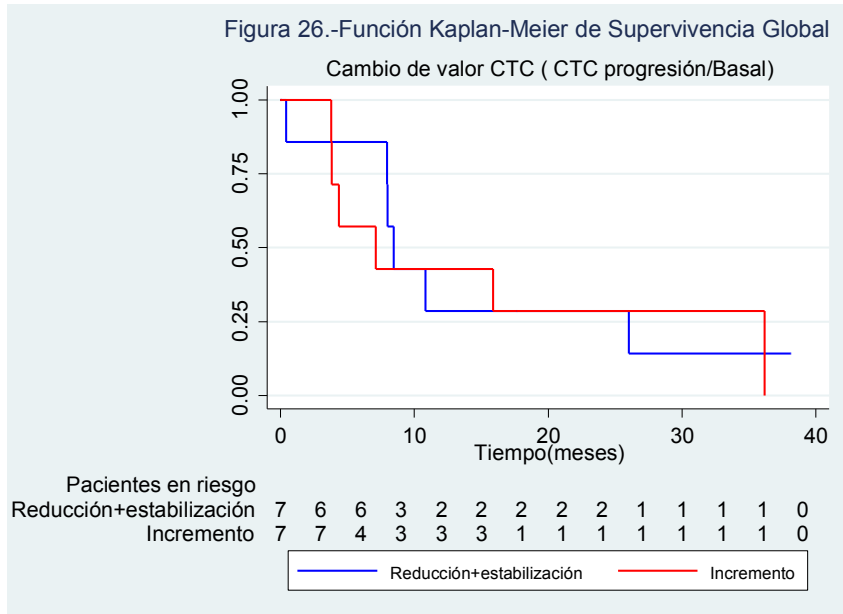
Cambio de CTC progresión y basal	Frecuencia	%
Incremento	7	50
Estabilización	2	14,3
Reducción	5	35,7
Total	14	

Cambio de CTC	
	Frecuencia
Incremento	7
Reducción+ Estabilización	7
Total	14

Tabla 39.-Categorías de los cambios experimentados en el nivel de CTCs basal y CTCs en el momento de la progresión

El valor pronóstico del cambio de CTC progresión -CTC basal se ha analizado mediante Kaplan-Meier de supervivencia global.

El grupo de 7 pacientes con reducciones y estabilizaciones no mostró diferencias en mediana de supervivencia global con 8 meses (IC 95% 0.4-26) con respecto al grupo de 7 pacientes, con incremento de CTC a la progresión, que fue de 7 meses (IC 95% 3.7- 5); HR 1.20, p=0.75 (**Figura 26**)



7.6.-Análisis univariante y multivariante

7.6.1.-Análisis univariante

Las variables incluidas en el análisis univariante se muestran en la tabla 40. Los factores clínicos que fueron identificados como significativos en relación con el tiempo de supervivencia global en el análisis univariante fueron: ECOG 2-3, la respuesta tumoral definida como beneficio clínico, cifra de enolasa neuroespecífica al diagnóstico, LDH >240 U/L al diagnóstico, niveles de CTC basal ≥ 50 , tras 2 ciclos y a la progresión, así como la presencia de metástasis hepáticas al diagnóstico (**Tabla 40**).

Tabla 40. Análisis univariante de factores pronósticos de supervivencia global en CPCP

Variable (n/n)	Valor- p	HR	Intervalo de confianza 95%
Sexo (mujer /varón) (18/30)	0.67	0.86	0.44-1.67
Edad (≥65/<65 años) (20/28)	0.068	1.8	0.95-3.48
Comorbilidad (SI/NO) (14/24)	0.11	0.72	0.87-3.4
ECOG (0-1 versus 2-3) (29/19)	0.013	2.22	1.18-4.39
Estadio al diagnóstico Clasificación VALG (localizado/diseminado) (9/29)	0.11	2	0.84-5
Respuesta tumoral (Beneficio clínico versus progresión) (21/20)	0.0001	5.37	2.65-11
Metástasis al diagnóstico Cerebrales (SI/NO) (9/39)	0.98	0.99	0.43-2.27
Hepáticas (SI/NO) (16/32)	0.048	2.02	1.11-4
Hueso (SI/NO) (19/29)	0.79	1.09	0.55-2.15
Suprarrenales (SI/NO) (9/39)	0.85	0.9	0.38-2.2
Pulmonares (SI/NO) (20/28)	0.36	1.36	0.7-2.61
Enolasa neuroespecífica basal ng/ml	0.04	1.001	1.00005-1.002
LDH U/L	0.001	1.001	1.0004-1.002
LDH ≥240 U/L versus <240 U/L (35/13)	0.047	2.23	1.1-4.5
Valor absoluto CTC basal	0.047	1.0003	1.00005-1.0007
CTC ≥50 versus <50 en 7.5mL de sangre (14/34)	0.044	2.13	1.1-4.46
CTC ≥1 versus CTC=0 en 7.5mL de sangre (32/16)	0.89	1.04	0.53-2
Valor absoluto CTC tras 2 ciclos CTC ≥50 versus <50 en 7.5mL de sangre (3/22)	0.29 0.003	1.86 32	0.57-6 3.21-326
CTC ≥1 versus CTC=0 en 7.5mL de sangre (6/19)	0.23	2	0.6-6
Valor absoluto CTC a la progresión CTC ≥50 versus <50 en 7.5mL de sangre (4/10)	0.1 0.016	1.0003 16	0.99-10003 1.68-150
CTC ≥1 versus CTC=0 en 7.5mL de sangre (10/4)	0.66	1.34	0.35-5
Cambios de CTCs tras 2 ciclos con respecto a basal (Incremento versus reducción-estabilización) (4/21)	0.13	2.66	0.73-9
Cambios de CTCs a la progresión con respecto a basal (Incremento versus reducción-estabilización) (7/7)	0.75	1.2	0.38-3.78

ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; LDH, lactato deshidrogenasa; CTC, Células tumorales circulantes; VALG, Veterans' Administration Lung Cancer Group .

Los factores clínicos que fueron identificados como significativos en relación con el tiempo de supervivencia libre de progresión en el análisis univariante fueron los mismos que para la supervivencia global, a los que hay que añadir: estadio al diagnóstico (localizado versus diseminado) y los cambios de CTCs tras 2 ciclos con respecto a basal (**Tabla 41**).

Tabla 41. Análisis univariante de factores pronósticos de supervivencia libre de progresión en CPCP

Variable (n/n)	Valor- p	HR	Intervalo de confianza 95%
Sexo (mujer /varón) (18/30)	0.42	0.78	0.42-1.44
Edad (≥65/<65 años) (20/28)	0.44	1.01	0.97-1.05
Comorbilidad (SI/NO) (14/24)	0.26	1.45	0.75-2.8
ECOG (0-1 versus 2-3) (29/19)	0.025	1.97	1.08-3.59
Estadio al diagnóstico Clasificación VALG (localizado/diseminado) (9/29)	0.004	4	1.56-10
Metástasis al diagnóstico Cerebrales (SI/NO) (9/39)	0.76	1.12	0.53-2.34
Hepáticas (SI/NO) (16/32)	0.048	1.88	1.04-3.5
Hueso (SI/NO) (19/29)	0.12	1.6	0.88-2.9
Suprarrenales (SI/NO) (9/39)	0.37	1.4	0.66-2.9
Pulmonares (SI/NO) (20/28)	0.24	1.42	0.78-2.6
Enolasa neuroespecífica basal ng/ml	0.011	1.001	1.0002-1.002
LDH U/L	0.0001	1.001	1.000-1.002
LDH ≥240 U/L versus <240 U/L (35/13)	0.019	2.37	1.14-4.9
Valor absoluto CTC basal	0.003	1.0005	1.0002-1.0009
CTC ≥50 versus <50 en 7.5mL de sangre (14/34)	0.017	2.2	1.15-4.2
CTC ≥1 versus CTC=0 en 7.5mL de sangre (32/16)	0.36	1.33	0.7-2.48
Valor absoluto CTC tras 2 ciclos	0.061	1.001	0.99-1.001
CTC ≥50 versus <50 en 7.5mL de sangre (3/22)	0.007	9.19	31.8-46
CTC ≥1 versus CTC=0 en 7.5mL de sangre (6/19)	0.075	2.4	0.9-6.34
Cambios de CTCs tras 2 ciclos con respecto a basal (Incremento versus reducción-estabilización) (4/21)	0.002	15	2.6-86

ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; LDH, lactato deshidrogenasa; CTC, Células tumorales circulantes; VALG, Veterans' Administration Lung Cancer Group .

7.6.2.-Análisis multivariante

Para el análisis multivariante se han seleccionado variables de especial interés clínico o teórico para la supervivencia. En nuestro caso, las variables de especial interés clínico han sido el estadio y el ECOG y las variables de especial interés teórico los valores de las CTCs a nivel basal y tras dos ciclos. Se ha elegido el punto de corte de 50, ya que en el análisis univariante fue el mejor predictor de supervivencia.

Si realizamos un modelo predictivo para supervivencia global con sólo con 4 variables clínicas utilizadas en el momento del diagnóstico, en este caso ECOG, estadio, valor absoluto de CTCs basales y valor basal de CTCs con punto de corte ≥ 50 , el único factor pronóstico independiente es el ECOG 2-3. (**Tabla 42**).

Si realizamos un modelo predictivo para supervivencia global con las CTCs en 2 momentos, el valor de CTCs tras 2 ciclos ≥ 50 fue el único factor pronóstico independiente si tenemos en cuenta ECOG, estadio al diagnóstico (enfermedad localizada o diseminada), la respuesta obtenida (beneficio clínico o progresión) y las CTCs basales ≥ 50 . (**Tabla 43**)

Las CTCs basales no han mostrado en ninguno de nuestros modelos ser un factor pronóstico independiente para supervivencia global.

Tabla 42. Análisis multivariante de factores predictivos de supervivencia global en CPCP. Modelo 1

Variable (n/n)	Valor-p	HR	Intervalo de confianza 95%	
ECOG (0-1 versus 2-3) (29/19)	0.019	2.244557	1.144865	4.400554
Estadio al diagnóstico Clasificación VALG Enfermedad Limitada versus diseminada (9/29)	0.288	1.650364	.6548644	4.159183
CTC Basal valor absoluto	0.214	1.000304	.9998243	1.000784
CTC basales ≥ 50 versus < 50 en 7.5mL de sangre (14/34)	0.552	1.319899	.5283689	3.297189

ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; CTC, Células tumorales circulantes; VALG, Veterans' Administration Lung Cancer Group.

Tabla 43. Análisis multivariante de factores predictivos de supervivencia global en CPCP. Modelo 2

Variable (n/n)	Valor-p	HR	Intervalo de confianza 95%	
ECOG (0-1 versus 2-3) (29/19)	0.875	1.099976	.336708	3.593464
Estadio al diagnóstico Clasificación VALG Enfermedad Limitada versus diseminada (9/29)	0.635	1.390505	.3563869	5.425296
Respuesta tumoral Beneficio clínico versus progresión (21/20)	0.259	2.239823	.5517464	9.092599
CTC basales ≥ 50 versus < 50 en 7.5mL de sangre (14/34)	0.576	1.464936	.3848056	5.576941
CTC tras 2 ciclos ≥ 50 versus < 50 en 7.5mL de sangre (3/22)	0.034	15.07302	1.222339	185.8697

ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; CTC, Células tumorales circulantes; VALG, Veterans' Administration Lung Cancer Group .

En el análisis multivariante de supervivencia libre de progresión se ha tenido en cuenta el cambio de CTCs tras 2 ciclos con respecto al basal, seleccionado por el análisis univariante como factor predictivo, además de las variables seleccionadas previamente (ECOG, estadio, CTC basal y tras 2 ciclos con punto de corte 50). Dado que la respuesta tumoral obtenida es redundante con la progresión, se ha suprimido de nuestro modelo predictivo.

En nuestro modelo multivariante, el estadio al diagnóstico, definido según la clasificación VALG (enfermedad localizada o diseminada) y los cambios en los valores de CTCs tras 2 ciclos con respecto al basal (incrementos) han resultado ser factores independientes para la supervivencia libre de progresión. **(Tabla 44)**

(n/n)				
ECOG (0-1 versus 2-3) (29/19)	0.830	0.898762	0.33916	2.381687
Estadio al diagnóstico Clasificación VALG Enfermedad Limitada versus diseminada (9/29)	0.037	5.124543	1.105881	23.74663
CTC basales ≥ 50 versus < 50 en 7.5mL de sangre (14/34)	0.775	1.185002	0.3693813	3.80157
CTC tras 2 ciclos ≥ 50 versus < 50 en 7.5mL de sangre (3/22)	0.753	0.6613338	0.5	8.7
Cambios de CTCs tras 2 ciclos con respecto a basal (Incremento versus reducción-estabilización) (4/21)	0.038	15.3	1.15	202

ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; CTC, Células tumorales circulantes; VALG, Veterans' Administration Lung Cancer Group .

8.-DISCUSIÓN

Este trabajo de tesis doctoral ha permitido conocer las tasas de detección de CTCs basales en una población de pacientes con cáncer de pulmón y explorar el valor pronóstico y predictivo de respuesta mediante la monitorización seriada de CTCs en pacientes con CPCP. Así, nuestros resultados son acordes a la mayoría de estudios que realizados en esta histología, aunque ha sido difícil establecer comparativas directas, ya que existe, como veremos a continuación, una gran heterogeneidad de los mismos.

8.1.-Nuestra muestra de pacientes

Creemos que la muestra global de pacientes es fielmente representativa de los pacientes con cáncer de pulmón que se valoran en un servicio de oncología médica. La mayor parte de estos pacientes eran varones (70%), tenían estadios avanzados al diagnósticos (60% estadio IV) y el 70% presentaban ECOG 0-1. En el 30% restante, cuyo ECOG era 2-3, las opciones terapéuticas fueron muy limitadas. Sólo el 10% de los pacientes, presentó una alteración molecular susceptible de tratamiento dirigido con carácter asistencial (EGFR y ALK).

Habitualmente el CPCP representa el 10-15% de todos los cánceres de pulmón.^{4,144} En nuestro estudio representa un 17% (48/271 pacientes), lo que es sólo ligeramente superior a la media y por ello creemos que no significativo. En cualquier caso, puede guardar relación con las características de la población atendida en nuestro medio, aún muy fumadora. El CPCP se caracteriza por ser un tumor agresivo, presentándose en un 60-70% con enfermedad diseminada de inicio.¹⁴⁵ En nuestra serie, solo 9 pacientes presentaron enfermedad limitada en el momento del diagnóstico (18.75%) siendo una posible explicación el retraso en el diagnóstico, lo que en una enfermedad tan agresiva tiene una importante implicación.

En el contexto de CPNCP la división por estadios fue similar a la media con 18 pacientes estadio I, 22 pacientes estadio II, 60 pacientes estadio III y 123 pacientes estadio IV según la clasificación TNM. La mediana de SLP para el estadio I y II no fue alcanzada, para el estadio III fue de 11 meses (IC 95% 8.7-17) y para el IV de 7 meses (IC 95% 6.8-9). La mediana de SG para el estadio I y II no fue alcanzada, mientras que para el estadio III fue de 20 meses (IC95% 14-24) y para el estadio IV fue de 14 meses (IC95% 11-17). Todas estas cifras están en el rango de lo esperado para esa población.

En los 9 pacientes con CPCP EL, la mediana de SLP fue de 9 meses (IC 95% 4.5-17), mientras que para los 39 pacientes con enfermedad diseminada fue de 5 meses (IC 95% 2.5-7), siendo esta diferencia estadísticamente significativa; HR 4 (IC 95% 1.5-10), $p = 0.004$. Aunque la mediana de SG fue de 16 meses (IC95% 8-36) para los pacientes con enfermedad limitada y de 8 meses (IC 95% 4-10) para los pacientes con enfermedad diseminada, la diferencia no fue estadísticamente significativa con HR 2, ($p = 0.11$), lo que

probablemente sea debido al pequeño número de eventos. En cualquier caso, de nuevo todas las cifras son similares a las publicadas en otras series.

8.2.-Células tumorales circulantes en nuestra población

La detección de CTCs por el sistema CellSearch System® (Janssen Diagnostics, LLC, 2016) se ha demostrado útil en el diagnóstico, pronóstico y evaluación de la eficacia terapéutica en tumores sólidos y es la tecnología que hemos utilizado en nuestro estudio.⁷⁵⁻⁹⁷ Con respecto al carcinoma pulmonar, aunque existen pocos estudios, en general se reporta que un mayor recuento de CTCs detectadas por este método, se asocia a una menor supervivencia.¹⁰⁸

El 30% de los pacientes con cáncer de pulmón de nuestra serie global (80/271 pacientes) tenían CTCs \geq 1 en la determinación basal, y sólo un 7% (17 pacientes del total) presentaron niveles de CTCs \geq 50. En cuanto a la distribución de las CTCs basales por histología, de los 80 pacientes con CTCs, 32 pacientes tenían CPCP y 48 CPNCP.

Es decir, la tasa de detección basal en pacientes con CPCP fue del 66.6% mientras que en pacientes con CPNCP fue solo del 21.5%. Respecto a la correlación con estadios, la tasa de detección basal fue similar en EL y EE (66.6% versus 66.7%) en los pacientes con CPCP mientras que sí hubo diferencias según estadio en CPNCP (0/16 pacientes estadio I, 1/22 pacientes estadio II (4.5%), 8/62 pacientes estadio III (12.9%) y 39/123 pacientes estadio IV (31.4%), Por último, la media de CTCs fue 320 (rango 1-6192) en CPCP frente a frente una media 2 CTCs y un rango de 1-136 en CPNCP.

Llama la atención la similar tasa de detección de CTC basales en CPCP y la falta de correlación con el estadio según la clasificación VALG (ED o EL). Es importante remarcar que a todos los pacientes se les realizó el mismo estudio de extensión. En cualquier caso el escaso de número de pacientes con EL no permite sacar ninguna conclusión al respecto. Respecto a los pacientes con CPNCP, como hemos mencionado arriba, la tasa de detección basal si guardó relación con el estadio, aunque sólo fue estadísticamente significativas en la asociación entre la presencia de CTCs basales y el estadio IV (p 0.0001; OR 4.7 (IC 95% 2-10).

Con respecto al número de CTCs basales, 17 pacientes con CPCP (35.5%) tuvieron entre 1-50 CTCs mientras que 15 pacientes (31%) tuvieron \geq 50 CTCs. Estas cifras contrastan con el número de CTCs basales encontradas en pacientes con CPNCP, ya que únicamente 2 pacientes con estadio IV al diagnóstico tuvieron $>$ 50.

Si comparamos nuestros datos con los publicados en la literatura podemos observar que son similares. Un estudio llevado a cabo por Allard y cols, analizó 964 muestras de pacientes con todos los tipos de cáncer, incluyendo 90 pacientes con cáncer de pulmón de

subtipo no especificado mediante el sistema CellSearch System® (Janssen Diagnostics, LLC, 2016). En su serie, sólo en el 20% de las muestras de cáncer de pulmón se aislaron CTCs. Dado que no estaba identificado el subtipo histológico, los autores sugerían que la histología predominantemente pudiera ser CPNCP, al ser el subtipo más frecuente, y que por lo tanto, no serían datos extrapolables al CPCP, algo que han confirmado estudios posteriores.⁷⁰ En concreto, Krebs y cols¹¹⁴, publicaron una tasa de CTCs basales global en CPNCP del 21%, siendo del 32% en el estadio IV. También el estudio de Tanaka y cols,¹²⁰ encontró una asociación positiva entre la tasa de detección de CTCs en CPNCP y el estadio IV. Por último, un metaanálisis publicado en 2013, encontró una asociación significativa entre la presencia de CTCs y un mayor estadio tumoral en pacientes con CPNCP, de manera similar a nuestro estudio.¹⁰⁸

En relación a los pacientes con CPCP, los estudios holandés¹¹⁷ y japonés¹¹⁶, comunicaron una tasa de detección de CTCs basales mayor que la nuestra, 73% y 68.7% tenían ≥ 2 CTCs, respectivamente, frente a un 66.6% de CTCs basales ≥ 1 en el nuestro. En el estudio de Hiltermann, había 21 pacientes con EL frente a 38 en ED, y en el de Naito y cols, había una mayor proporción de EL (27 pacientes) frente a 24 en ED.

Sorprendentemente estudios más recientes, como el de Wang y cols, realizado en 96 pacientes (64 EL y 32 ED) presentan una tasa de detección más baja con CTCs basales en 49% de pacientes. En este caso, el escaso número de pacientes con EE pudiera explicar las diferencias.¹²¹

En resumen, los hallazgos en pacientes con CPCP en nuestra serie están en la línea de lo publicado, en cuanto al porcentaje de pacientes con presencia de CTCs basales. Sin embargo, en nuestra serie no hemos encontrado diferencias en función del estadio (66.6% de pacientes EL con CTCs basales frente a 66.7% de pacientes con ED). Los estudios previos demostraron una relación significativa entre ellos, con un 64.4% de los pacientes con ED versus 35.6% con EL en el estudio de Hiltermann¹¹⁷ y un 68% en los pacientes con ED frente a un 32% en los pacientes con EL en el estudio de Hou y cols.¹¹⁵ A diferencia de los anteriores, sorprendentemente en el estudio de Wang y cols del 2016, se encontró mayor porcentaje de CTCs en pacientes con EL que con ED (un 66.7% 33.3% frente a un 33.3% respectivamente).¹²¹

En el caso de los pacientes con CPCP, se realizó una segunda determinación de CTCs tras el segundo ciclo. Lamentablemente solo pudo llevarse a cabo en 25 de los 48 pacientes (52%), incluyendo 5 de las 9 pacientes con EL de inicio y 20 de los 39 con ED. Respecto a la tasa de detección en esta segunda muestra, globalmente fue del 24%. No hubo CTCs en ninguno de los 5 pacientes con EL (tasa de detección 0%) pero si estuvieron presentes en 6 de los 20 pacientes analizados con ED, lo que supone una tasa de detección del 30%. A pesar del escaso número de pacientes con alto número de CTCs (solo 3 pacientes tuvieron CTCs ≥ 50 en esta segunda determinación) la media de CTCs fue de 132,5 (mediana igual a 0)

El tercer análisis, previsto para el momento de la progresión solo fue posible en 14 pacientes, 11 con ED al diagnóstico y 3 con EL. En 10 de los 14 pacientes analizados en el momento de la progresión se detectaron CTCs, de los cuales 8 tenían ED al diagnóstico y 2 EL. Por tanto, la tasa de detección a la progresión fue del 71%. Solo 4 pacientes presentaron niveles de CTCs ≥ 50 siendo la media 565 CTCs y la mediana 7 CTCs.

Tanto los datos obtenidos en la segunda como en la tercera determinación en nuestra serie son similares a los publicados por otros grupos. En el estudio de Cheng y cols, que incluyó 91 pacientes con ED para la determinación basal 84 para la segunda determinación y 60 pacientes en el momento de la progresión, las medianas de CTCs fueron 30 basal (0-2210), 1 tras 2 ciclos (rango 0-1674) y 4 en la progresión (0-4617). En el estudio de Naito y cols con 51 pacientes (27 EL y 24 ED), la mediana basal fue de 4 CTCs (0-5648), 0 CTCs tras completar el tratamiento en 49 pacientes (0-253) y 1 a la recaída/progresión de la enfermedad en 37 pacientes (0-510).

Los cambios dinámicos en las cifras de CTCs parecen traducir la actividad de los tratamientos pero no solo en CPCP ya que esta evolución temporal es similar también a la reportada en otros tumores como los de próstata o mama ^{75,78,95,96}.

8.3-Punto de corte y capacidad discriminativa de las Células tumorales circulantes en el CPCP

Para determinar el punto de corte con capacidad discriminativa es necesario valorar la gravedad de un falso negativo y de un falso positivo y establecer el punto que minimice los costes de estos errores. Galen y Gambino (1975) proponen elegir una prueba muy sensible cuando la enfermedad sea muy grave pero curable con un tratamiento, y una prueba muy específica cuando la enfermedad sea grave e incurable. ¹⁴³ También se debe utilizar un punto de corte que proporcione una alta especificidad cuando la prueba sea invasiva, muy cara o el tratamiento de un falso positivo puede ocasionar perjuicios importantes al paciente. Basado en esas premisas hemos elegido el punto de corte de 50 CTCs cuya especificidad es del 89% (IC 95% 77.8%-100%) y cuya sensibilidad es del 55% (IC 95% 33.2%-76.8%).

Debido a que el número de pacientes con EL en nuestra serie es muy limitado, hemos calculado la curva ROC para la predicción de beneficio al tratamiento. Hemos definido beneficio clínico como la suma de respuestas parciales, respuestas completas y estabilizaciones obtenidas con el tratamiento y ausencia de beneficio como la suma de pacientes con progresión como mejor respuesta y pacientes no evaluables por criterios RECIST v1.1. Hemos utilizado el punto de corte seleccionado para discriminar entre grupos con beneficio clínico favorable o desfavorable. ¹⁴¹

El valor predictivo positivo se define como la probabilidad de que un sujeto de nuestra población con una prueba positiva tenga la enfermedad, dicho de otro modo, la probabilidad de que un paciente con CPCP y con unos valores de CTCs ≥ 50 tenga progresión de enfermedad como mejor respuesta al tratamiento. El valor predictivo positivo para las CTCs ≥ 50 en nuestro estudio es del 78.57% (IC 95% 57.08%-100%). El valor predictivo negativo se define como la probabilidad de que un sujeto de con una prueba negativa no tenga la enfermedad. En nuestro estudio, se definiría como la probabilidad de que un paciente con CPCP y con unos valores CTCs < 50 , obtenga beneficio clínico con el tratamiento. El valor predictivo negativo de las CTCs < 50 es del 73.53% (IC 95% 58.70%-88.36%).

Con estas premisas y eligiendo el punto de corte en > 50 , el área bajo la curva ROC es 0.7468 (IC 95% 0.55-0.9, $p < 0.0001$). A diferencia de nosotros, Tanaka y cols¹⁰⁴ establecieron un área bajo la curva ROC de 0.783 para el recuento de CTCs en la predicción de metástasis a distancia, siendo el punto de corte ≥ 1 . Cuando se consideró que los pacientes con uno o más CTC tenían enfermedad metastásica, la sensibilidad y la especificidad de la prueba de CTC fueron 71% y 83%, respectivamente si bien ellos incluyeron 150 casos, 25 individuos sanos y 125 pacientes con cáncer de pulmón.

Los resultados del estudio de Tanaka indican que la prueba de CTCs se caracteriza por una baja sensibilidad y valor predictivo negativo, así como alta especificidad y valor predictivo positivo.¹²⁰ En este estudio, con un punto de corte de 1, debe prestarse atención al hecho de que la especificidad fue del 88% y el valor predictivo positivo del 92.7%. Un verdadero resultado falso positivo, puede deberse: (a) la contaminación de las células epiteliales en las muestras de sangre (b) tinción con falsos positivos de células no epiteliales contaminadas para CK / DAPI durante el procesamiento de la muestra, (c) juicio inapropiado en la identificación de CTCs por los investigadores.

Las razones de verosimilitud (likelihood ratios, LR) relacionan conceptos de sensibilidad y especificidad en un sólo índice. La razón de verosimilitud para positivos (LR+) se calcula dividiendo la proporción de enfermos con resultado positivo en la prueba (% de verdaderos positivos) entre la proporción de no enfermos también con resultado positivo. Cuando el valor es > 10 hay un importante aumento de la verosimilitud de la enfermedad, entre 5-10 es un moderado aumento de la verosimilitud, 2-5 es un pequeño aumento, 1-2 es un mínimo aumento y 1 es un valor nulo de verosimilitud. En nuestro estudio, equivale a dividir los pacientes con CTCs ≥ 50 con progresión como mejor respuesta al tratamiento entre los pacientes con CTCs ≥ 50 que obtenían beneficio clínico. El valor en nuestro estudio es 5.13 (IC 95% 1.64-16.06). Este valor indica que en el grupo de sujetos con progresión, la probabilidad de encontrar un valor de CTCs basal ≥ 50 , es más de 5 veces más probable que en el grupo que obtiene beneficio clínico, o dicho de otro modo, si un sujeto tiene un valor de CTCs ≥ 50 , es 5 veces más probable que el resultado que obtengamos del tratamiento sea progresión en lugar de beneficio clínico.

La razón de verosimilitud para negativos (LR-) se calcula dividiendo la proporción de enfermos con resultado negativo entre la proporción de no enfermos con resultado negativo. En nuestro estudio, equivale a dividir los pacientes con CTCs <50 que presentan progresión como mejor respuesta al tratamiento entre los pacientes con beneficio clínico que tenían CTCs <50. Cuanto menor sea el valor de LR- respecto a 1 es la certidumbre de que un sujeto con un valor CTC<50, presentará beneficio clínico como mejor respuesta al tratamiento. El valor en nuestro estudio es de 0,5 (IC 95% 0.31-0.83), lo que supone que existe la mitad de la probabilidad de encontrar CTC <50 en el grupo con progresión frente al grupo con beneficio clínico.

En la mayoría de estudios se utiliza la curva ROC para discriminar entre poblaciones con diferente supervivencia si bien no hay acuerdo sobre el punto de corte, que depende de la población de pacientes analizada, el rango de CTCs encontrado y el método de selección del punto de corte. En el cáncer de mama, colon metastásico y CPNCP, los metanálisis han elegido como punto de corte la presencia o no de CTCs.^{83-86,108} Sin embargo, otros estudios, como el de Cristofanilli y cols, en pacientes de cáncer de mama⁸⁰, en cáncer de próstata hormono-resistente⁹⁶ o incluso en algún estudio en CPNCP^{103,114} seleccionan el punto de corte en 5 CTCs. Por último, un estudio en cáncer colorrectal metastásico⁸⁷, el nivel de corte de 3 CTCs fue el que mejor se correlacionó con la respuesta cuando se calculó por la curva de ROC, técnica similar a la empleada en nuestro estudio pero con otro nivel. Esto se puede deber a la tasa de detección de CTCs obtenida en este estudio, ya que 48 de 420 pacientes presentaban CTCs basales (11%) y sólo uno de ellos presentaba un valor mayor de 100 CTCs.

También en los estudios en CPCP se han utilizado una gran variedad de puntos de corte. El estudio de Naito y cols, el punto de corte elegido fue 8 basado en la curva ROC para supervivencia global¹¹⁶. En el primer estudio publicado de CTCs en CPCP (Hou y cols), el punto de corte fue la presencia de CTCs¹¹⁵ y en los estudios más modernos con métodos más sensibles, como el publicado por Igawa y cols, utilizando el método de OBP-401 assay (TelomeScan®), el punto de corte fue de CTC ≥ 2 .¹¹⁹ En el estudio de Wang¹²¹, se realizó análisis descriptivo para los puntos ≥ 1 , ≥ 2 , ≥ 3 , ≥ 5 , ≥ 8 y ≥ 50 . Por el contrario en el estudio de Hiltermann y cols¹¹⁷, en 59 pacientes con CPCP, la elección del punto de corte fue realizado mediante la curva de ROC, como modelo discriminativo para supervivencia con una AUC 0.73. El punto de corte elegido fue de ≥ 2 , pero dando mayor importancia a la sensibilidad (87%) que a la especificidad (41%).

8.4.-Células tumorales circulantes basales

8.4.1.-Correlación entre las CTCs basales y las características clínicas de los pacientes con CPCP

Como hemos mencionado anteriormente, en los metanálisis realizados en CPNCP, cáncer de mama y colon, la presencia de CTCs está considerado como un factor pronóstico para la supervivencia en la enfermedad metastásica. Cuando se ha intentado establecer relación con los diferentes parámetros que nos informan de la extensión de la enfermedad no tiene una significación clínica clara.^{83-86,108} Shaffer y cols,⁹⁰ demostraron que a pesar de que existía una fuerte asociación entre el punto de corte elevado de CTCs y la supervivencia, cuando estudiaban su relación con el PSA y el número de metástasis óseas la asociación era baja. Nosotros hemos realizado un análisis comparativo mediante el test de Chi cuadrado o el test de Fischer, de las CTCs basales con las variables clínicas de especial interés.

En nuestra serie, la presencia de CTCs no se correlaciona con el estadio en el momento del diagnóstico pero sí hemos encontrado una relación estadísticamente significativa entre enfermedad diseminada y cifras de CTCs ≥ 50 , ($p = 0.025$; RR= 1.36 (IC95% 1.11-1.66). Un sesgo potencial es el escaso número de pacientes con EL (9 pacientes) si bien otras series como la de Hou y cols, llegan a la misma conclusión.¹¹⁵

También hemos encontrado una relación inversa entre la presencia de CTC basal (CTC ≥ 1) y presencia de metástasis cerebrales al diagnóstico. De nuevo, el escaso número de pacientes es un factor limitante aunque también se ha descrito en otras series como la de Naito.¹¹⁶

Cuando analizamos la correlación entre la presencia de CTC basal al diagnóstico y las metástasis óseas, encontramos que tanto la presencia de CTCs ($p = 0.0001$) como valores de CTCs ≥ 50 son estadísticamente significativas ($p = 0.007$). Por el contrario, no encontramos significación estadística cuando analizamos la relación entre la presencia de metástasis hepáticas al diagnóstico y la presencia de CTC basal ($p = 0.11$), pero sí cuando lo comparamos con CTC ≥ 50 ($p = 0.0001$). Así mismo, encontramos una relación estadísticamente significativa entre la presencia de metástasis suprarrenales y los valores de CTC ≥ 50 ($p = 0.018$), pero no con la presencia de CTC ($p = 0.358$). No hemos encontrado asociación entre las metástasis pulmonares y la presencia o valores de CTCs ≥ 50 .

En el estudio de Naito, no se encontró asociación entre la presencia de CTCs basales y la presencia de metástasis óseas, cerebrales pero sí con metástasis hepáticas.¹¹⁶ Pensamos que estas diferencias se deben, a que en nuestra población existe un mayor número de pacientes en enfermedad diseminada que el estudio japonés (40% de pacientes con EL frente a 18.7% en el nuestro).

En nuestra serie, ni el sexo, ni la edad ni la presencia de comorbilidades se relacionaron con la presencia o el número de CTCs. Estos hallazgos son similares a los reportados en otras series como la de Wang y cols.¹²¹

Tampoco encontramos relación entre la presencia de CTC basal y el estado general medido según la escala ECOG al diagnóstico, pero sí se ha hallado relación estadísticamente significativa ($p=0.012$, OR 4.32) entre el valor de CTC basal ≥ 50 y mal estado general (ECOG 2-3). Esta asociación ha sido reportada en otros estudios como el de de Normanno y cols,¹¹⁸ que incluyó 60 pacientes con cáncer de pulmón de célula pequeña, si bien hay series como la de Krebs en la que no se encontró asociación entre el ECOG y los niveles de CTCs basales de 2,3,4 y 5 en 101 pacientes con CPNCP.¹¹⁴ Tras una exhaustiva revisión, esta asociación no está descrita en otros tumores como cáncer de mama, colon o próstata.⁸³⁻⁸⁷

8.4.2.-CTC basales: Valor pronóstico

En nuestra serie no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en SLP ni en SG en función de la presencia o no de CTCs (CTC ≥ 1 versus CTC=0), pero sí cuando establecemos el punto de corte en 50 CTCs (CTCs basales ≥ 50 versus CTC < 50). En base a nuestros datos, podemos decir que los 14 pacientes con CTCs basales ≥ 50 duplican el riesgo de muerte (HR 2.13; p 0.044) y progresión (HR 2.2; p 0.017) frente a los pacientes con valor basal de CTC < 50 (34 pacientes).

En el metaanálisis realizado en pacientes con CPNCP, donde se incluían 20 estudios con diferentes métodos de detección, la presencia de CTCs basales se asoció de manera significativa con una SG y SLP más cortas (RR 2.19, p 0.0001 y RR = 2.14, p 0.0001; respectivamente).¹⁰⁸ Los metaanálisis publicados en otros tumores (mama, colorrectal) también han evidenciado un incremento del riesgo de progresión y muerte asociado a la presencia de CTCs basales.⁸³⁻⁸⁶

Sin embargo, no hay acuerdo sobre el punto de corte de CTCs con valor pronóstico, que como veremos a continuación abarcan desde 1 hasta el 50.

Existen varios estudios centrado en cáncer de pulmón, tanto en CPNCP como en CPCP.

Uno de los pocos estudios que no han encontrado diferencias estadísticamente significativas en supervivencia en función de las CTCs basales en pacientes con CPNCP es un estudio español llevado a cabo por Juan y cols. En este estudio no encontraron diferencias ni en SLP ni en SG eligiendo un punto de corte de ≥ 2 CTCs basales aisladas mediante tecnología (Janssen Diagnostics, LLC, 2016). En su serie sólo 9 de 37 pacientes con CPNCP (24%), tenían ≥ 2 CTC en la determinación basal. La mediana de la supervivencia libre de progresión (SLP) fue de 4.3 meses para pacientes con CTC 0-1, en comparación

con 9.4 meses para los que tenían CTC ≥ 2 ($p = 0.3506$) mientras que la mediana de la supervivencia global (SG) fue de 8.1 y 12.2 meses (para pacientes con ≥ 2 y 0-1 CTC), respectivamente ($p = 0.7639$).¹⁰⁵

Otro estudio español, analizó CTCs en 43 pacientes con CPNCP, antes del inicio de la quimioterapia, antes del segundo ciclo y antes del 5^a ciclo. Al inicio del estudio, 18 (41.9%) pacientes fueron positivos para el recuento de CTCs y 10 (23.2%) de ellos tenían ≥ 5 CTCs. El grupo de pacientes con CTC ≥ 5 al inicio del estudio presentó peor SLP ($p = 0.034$) y SG ($p = 0.008$), que aquellos con <5 CTC.¹⁰⁶

En relación al CPCP, el primer estudio que utilizó la tecnología CellSearch System® (Janssen Diagnostics, LLC, 2016) fue publicado por Jian-Mei Hou, y cols en 2009. Un mayor número de CTC se asoció con una menor supervivencia y la ausencia de CTC se asoció con una supervivencia prolongada (HR 3.4; $p \leq 0.001$). La supervivencia media de los pacientes con CTC > 300 (cuartil superior) fue de 134 días, en comparación con 443 días para un recuento de CTC <2 (cuartil inferior).¹¹⁵ Esto mismo sucedió en el estudio de Hiltermann y cols, donde la ausencia de CTCs basales se asoció a una mejor supervivencia (HR 3.4, $p 0.001$).¹¹⁷ En el estudio de Naito y cols, los pacientes con CTCs basales ≥ 8 tenían peor supervivencia que aquellos con <8 CTCs al inicio del estudio ($p = 0.0014$).¹¹⁶ A diferencia de los anteriores, en un estudio reciente con 91 pacientes con CPCP y ED, Cheng y cols, no han encontrado diferencias estadísticamente significativas en SLP pero sí en cuanto a SG, para el punto de corte de CTCs ≥ 10 calculado por la curva de ROC para supervivencia.¹⁴⁵

En la mayoría de estudios publicados hasta el momento, el punto de corte basal con valor pronóstico es inferior al nuestro. En el estudio de Cheng,¹⁴⁵ realizado en 91 pacientes con ED, la mediana fue de 30 (0–2210), pero el punto de corte elegido fue CTCs ≥ 10 . En el estudio de Hiltermann,¹¹⁷ realizado en 59 pacientes, la mediana fue 28 CTCs, y el rango, 0-44 eligiendo como punto de corte CTC ≥ 1 .

El único estudio que utiliza el mismo punto de corte que nosotros (CTCs basales ≥ 50), es el estudio de Wang y cols, donde 8 de los 96 pacientes con CPCP presentaban CTCs basales superior o igual a este valor. Sin embargo, es un estudio meramente descriptivo donde no se realiza ningún análisis pronóstico.¹²¹

Recordemos que en nuestro estudio, 50 CTCs por 7,5 ml de sangre fue elegido como el punto de corte, mediante la curva de ROC, por tener la mejor especificidad con una buena sensibilidad para discriminar entre grupos con favorable versus desfavorable beneficio clínico obtenido.

8.4.3.-CTC basal: valor predictivo de respuesta a tratamiento

Recordemos que la evaluación de respuesta se realizó por criterios RECIST v1.1 cada 2 ciclos de tratamiento quimioterápico y que 28 pacientes (8 EL y 20 ED) obtuvieron beneficio clínico (24 RP+ 3 RC+ 1 EE) frente a 20 pacientes (1 EL y 19 ED) que no obtuvieron beneficio (11 PG+ 9 No evaluados). Los 9 pacientes no evaluados tenían todos al diagnóstico ED, y eran todos ECOG 2-3. Las razones de no evaluar fueron : 3 pacientes no llegaron a recibir ningún tratamiento por deterioro clínico y 6 pacientes fallecieron por toxicidad antes de la evaluación.

En cuanto a la asociación de la presencia de CTCs basales (CTCs ≥ 1 versus CTC=0) con la respuesta al tratamiento, podemos decir que en nuestro estudio no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas. Diez de los 16 pacientes con CTC=0 experimentaron beneficio clínico con la terapia frente a 18 de 32 pacientes con CTC ≥ 1 (OR 1.29, $p=0.68$). Sí hemos encontrado asociación entre la respuesta al tratamiento y la presencia de ≥ 50 CTCs basales. Veinticuatro de los 34 pacientes con CTC <50 experimentaron beneficio clínico con el tratamiento frente a 4 de 14 pacientes con CTC ≥ 50 . Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p=0.007$). La OR de esta asociación fue de 6, por lo que podemos decir, que existe una probabilidad 6 veces superior de obtener beneficio clínico cuando las CTCs basales son menores de 50.

El metaanálisis realizado en pacientes con cáncer de mama metastásico, respondió a esta cuestión basándose en 4 estudios, que incluían 303 pacientes con cáncer de mama metastásico. El análisis demostró una correlación estadísticamente significativa entre tener ≥ 5 CTCs basales y una mayor probabilidad de progresión al tratamiento.⁸⁵

En el estudio de Thalgott y cols, realizado en 122 pacientes con cáncer de próstata, no se encontró asociación entre respuesta y determinación de CTCs basales independientemente del análisis como variable continua o bien categórica (punto de corte ≥ 5 versus <5).⁹⁶

En lo que respecta a la asociación entre respuesta y presencia de CTCs en cáncer de pulmón existe muy poca información publicada. A diferencia de nuestro estudio, en los dos estudios asiáticos,^{116, 121} no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de CTCs basales (≥ 1 , ≥ 2 , ≥ 3 , ≥ 5 , ≥ 8 y ≥ 50) y la respuesta al tratamiento.

Sin embargo, Hirose y cols evidenciaron en 33 pacientes que recibieron quimioterapia de primera línea para el CPNCP metastásico, que la probabilidad de progresión de la enfermedad era significativamente mayor en pacientes con CTC-positivo (66.7%) que en pacientes con CTC-negativos (23.8%, $p = 0.02$), en línea con nuestro estudio.¹¹³

8.5.- Células tumorales circulantes tras 2 ciclos

En nuestra serie, un segundo análisis de CTCs, tras el segundo ciclo de tratamiento, pudo ser realizado en 25 pacientes. La tasa de detección fue del 24 % para todo el conjunto de la población (30% en ED), incluyendo 5/9 pacientes con EL y 20/39 ED.

No se detectaron CTCs en ninguno de los 5 pacientes con EL (tasa de detección 0%) y estuvieron presentes en 6 de los 20 pacientes con ED. La media fue de 132,5 CTCs con un rango de 0-2176, inferior a la media de CTCs basales (320 CTCs , rango 0-6192).

8.5.1.-CTCs tras 2 ciclos: Valor pronóstico

Al considerar el punto de corte en CTC tras 2 ciclos ≥ 1 versus CTC=0, las diferencias en SLP no fueron estadísticamente significativas pero sí en SG. La mediana de supervivencia global del grupo de 19 pacientes que no presentaba CTC tras 2 ciclos fue de 16 meses frente al grupo de 6 pacientes que presentaba CTC ≥ 1 , que fue de 4.3 meses, siendo esta diferencia estadísticamente significativa; HR 1.86, p=0.029.

Al considerar el punto de corte de ≥ 50 versus CTC <50 , también se encontraron diferencias estadísticamente significativas tanto en SLP como en SG. Las medianas de SLP y SG de los 22 pacientes con CTC tras 2 ciclos <50 fueron de 7.8 meses y 15.8 meses respectivamente, frente a los 3 pacientes con CTC ≥ 50 en los que fue de 3.1 meses (HR 9, p 0.007) y 3.8 meses (HR 32, p 0.003), respectivamente.

Los estudios publicados hasta la fecha, en CPNCP y CPCP coinciden con nuestro trabajo en el valor pronóstico de las CTCs tras tratamiento, si bien el momento que se ha escogido para el análisis de la segunda determinación es muy variable: tras 1 ciclo de quimioterapia, tras 2 ciclos, tras 4, tras finalizar el tratamiento, etc,. Así mismo, el punto de corte también es variable. En algunos trabajos se mantiene el mismo corte de las CTCs basales, pero en otros es menor. Posiblemente el menor número de CTCs tras tratamiento pueda explicarlo, así como el descenso del número de pacientes reclutados debido a fallecimientos o pérdidas de seguimiento.

En el estudio español de Muinelo-Romay y cols, con 43 pacientes con CPNCP, se realizó la determinación de CTCs antes del inicio de la quimioterapia, antes del segundo ciclo y antes del 5^a ciclo. Al inicio del estudio, 18 (41,9%) pacientes eran positivos para el recuento de CTCs y 10 (23,2%) de ellos tenían ≥ 5 CTCs, antes del segundo ciclo sólo 9 fueron positivos para CTCs y 6 antes del 5^o ciclo. El punto de corte que escogieron para el análisis de supervivencia de esta segunda determinación fue el de ≥ 2 CTCs, dado que el número de pacientes a analizar se redujo y la media con ella. Los pacientes con <2 CTCs presentaban una SLP más larga de manera estadísticamente significativa (8.5 meses; IC95%, 6.4- 10.5) comparado a los pacientes con ≥ 2 CTCs (4.2 meses; IC 95%,

2.2- 6.1). Así mismo, los pacientes con CTCs ≥ 2 en la tercera determinación (antes del 5º ciclo) presentaban mayor riesgo de muerte y progresión de manera estadísticamente significativa.¹⁰⁶

Así mismo, Krebs y cols,¹¹⁴ sugieren que el recuento de las células tumorales tras un ciclo de quimioterapia en pacientes con cáncer de pulmón puede tener valor pronóstico. En este estudio, se contabilizó el número de CTCs en muestras de sangre con CellSearch System® (Janssen Diagnostics, LLC, 2016) en un total de 101 pacientes con CPNCP, tomadas antes y después de someterse a un ciclo de quimioterapia. La segunda determinación se obtuvo de 70 pacientes y el punto de corte se mantuvo con respecto al basal. Los pacientes con < 5 CTCs (65 pacientes) presentaban una SLP (6.9 vs 2.4 meses; HR 5.15, $p = 0.012$) y SG (8.8 vs 3.9; HR 8.3, $p = 0.003$) más larga que los pacientes con ≥ 5 CTCs (5 pacientes).

En los estudios, de CPCP la elección del momento de la determinación es bastante dispar. Hou y cols¹¹⁵, realizaron una 2ª determinación de CTCs a los 22 días de iniciar la terapia en 24 de los 50 pacientes con CPCP, evidenciando una peor supervivencia para los pacientes que presentaban un mayor número de CTCs (variable continua), similar al estudio holandés de Hiltermann. Este estudio también realizó la determinación después de un ciclo de quimioterapia en 37 pacientes frente a los 59 iniciales, pero utilizó como punto de corte CTC 2 igual al basal de su estudio. Los 29 pacientes con CTCs < 2 vivieron más tiempo que los pacientes con CTCs ≥ 2 , con una SLP de 10,7 frente a 2,9 meses ($p \leq 0,001$) y una SG de 12,3 frente a 8,1 meses ($p \leq 0,001$). En contraposición, el estudio japonés de Naito, realizó la segunda determinación en 49 de los 50 pacientes incluidos, tras finalizar el tratamiento, manteniendo el punto de corte del basal. Los 7 pacientes con ≥ 8 CTCs mostraron una peor supervivencia que los 42 pacientes con < 8 CTC ($p = 0,0096$).

De forma similar al nuestro, el estudio de Cheng y cols, realiza la segunda extracción tras el segundo ciclo, en 80 de los 91 iniciales, manteniendo el punto de corte de 10 CTCs y evidenciando una peor SLP (3.1 versus 5.6 meses, $p = 0.0002$) y SG (6.9 versus 12.7, $p < 0.0001$) para el grupo con ≥ 10 CTCs tras 2 ciclos (21 pacientes) frente al grupo de < 10 CTCs (61 pacientes).¹⁴⁵

8.5.2.- Valor pronóstico de los cambios de las CTCs tras 2 ciclos

En nuestro estudio, 11 pacientes negativizaron en la segunda determinación (CTCs tras 2 ciclos = 0), dos pacientes redujeron la cifra de CTCs en la segunda determinación, en 8 pacientes el valor de CTCs basal de 0 se mantuvo y en 4 pacientes se experimentó un incremento. El cambio entre el valor basal de CTC y tras 2 ciclos se ha dividido en 2 categorías, en función del aumento versus estabilización o reducción.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en SG en función de la cifra de CTC en el grupo de 21 pacientes con mostraron una cifra menor o igual a la previa cuando se comparó con el grupo de 4 pacientes con incremento de CTCs tras 2 ciclos (16 meses versus 4 meses; HR 2.79, p 0.12) mientras que en SLP, la mediana fue 7.8 meses (IC 95%, 6-10) en el grupo con reducciones o estabilizaciones frente a 2.7 meses (IC 95%, 0.26-2.59) en el grupo de incremento, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. HR 14 (IC95%, 2.46-81)p=0.003.

En otros tumores (cáncer de mama, próstata y colon), las reducciones en el número de CTCs parecen tener impacto en supervivencia global, con un pronóstico similar a la de los pacientes con niveles favorables de inicio^{84,86,96,97}.

El escaso número de pacientes de nuestra serie con incremento de CTCs (4), pudiera ser una explicación a la ausencia de significación encontrada (medianas de supervivencia de 16 meses versus 4 meses; HR 2.79, p 0.12) aunque la diferente definición de cambio significativo en el número de las CTCs puede ser también otra explicación.

Coumans y cols, investigaron el valor de una reducción en el número de CTCs, después de la administración de la terapia en 111 pacientes con cáncer metastásico de mama y 185 pacientes con cáncer de próstata metastásico⁹⁷ En este estudio se evaluaron diferentes métodos para expresar los cambios en los recuentos de CTC y su valor predictivo y pronóstico concluyendo que para los pacientes que con CTCs basales ≥ 5 , un recuento por debajo de ese corte después de 6 a 8 semanas de tratamiento era el mejor indicador del éxito del tratamiento y que el mejor pronóstico lo tenían los pacientes con negativización de CTCs. Interesantemente, estos autores plantean que el objetivo del tratamiento debe ser la eliminación de todas las CTCs. La reducción a cero se puede ver después de 4 a 6 semanas, pudiendo ser necesario de 10 a 12 semanas de tratamiento para algunos pacientes. Plantean además que si el número de CTC no disminuye dentro de este lapso de tiempo, se puede concluir que el tratamiento no es efectivo. De hecho, en base a esta hipótesis se ha diseñado un estudio fase III, que plantea un cambio en la estrategia terapéutica en función de si permanecen o no elevadas las CTCs en pacientes con cáncer de mama metastásico (SWOG 0500—NCT00382018).¹⁴⁶

En pacientes con CPNCP, Krebs y cols realizaron 2 categorías con puntos de corte estáticos, en este caso CTCs ≥ 5 . Una primera categoría donde 61 pacientes tenían niveles de CTC < 5 en los 2 momentos (basal y tras 1 ciclo de tratamiento) y 9 pacientes con CTCs ≥ 5 en cualquiera de los 2 puntos. Los pacientes con < 5 CTCs presentaban una SLP (7.6 versus 2.4 meses; HR 5.98, p 0.001) y SG (8.8 versus 4.3 meses; HR 9.37, p 0.001) claramente superior al grupo con CTC ≥ 5 en cualquiera de los 2 puntos.¹¹⁴

En el estudio japonés llevado a cabo en paciente con CPCP, se utilizan puntos de corte estáticos para categorizar los cambios en las CTCs. En este caso se agruparon en 3 categorías distintas en función del cambio experimentado con respecto al punto de corte de 8 CTC. Un grupo A que partía de <8 y la segunda determinación seguía siendo <8 , el grupo B que partía de un valor de CTCs ≥ 8 y descendía a un punto de corte <8 y el grupo C que abarcaba los ≥ 8 basal y seguían siendo de 8 y los que eran <8 y aumentaban a ≥ 8 . En este estudio se evidenció que el grupo A cuya determinación basal y después del tratamiento mostraban niveles de CTC <8 tendían a mostrar una mejor supervivencia que aquellos cuyo nivel de CTC era ≥ 8 basal (B) sin alcanzar la significación estadística ($p = 0.0288$) pero sí la alcanzaban cuando el nivel de CTC post-tratamiento fue ≥ 8 células ($p = 0.0047$).¹¹⁶

Cheng y cols, en pacientes con CPCP con ED, también encontraron una mejor SLP y SG para los pacientes que presentaba CTC <10 basales o una reducción de CTC a <10 tras el segundo ciclo de la quimioterapia frente a los pacientes con ≥ 10 CTCs tras el segundo ciclo de quimioterapia o los pacientes en los que las CTC incrementaron su valor ≥ 10 CTCs. Diseñan 3 categorías de pacientes que incluyen las diferencias en los recuentos de CTCs antes y después del tratamiento, evidenciando también un valor pronóstico de dichos cambios.¹⁴⁵ En la misma línea, un estudio realizado por Normanno y cols en pacientes con ED, mostró que una reducción del recuento de CTCs superior al 89% después de la quimioterapia mejoró significativamente la precisión pronóstica ($p = 0.009$) y se asoció con un menor riesgo de muerte (HR 0.24, $p = 0.09$).¹¹⁸

Finalmente, el estudio holandés de Hiltermann y cols dividió los cambios de manera similar a la nuestra si bien ellos realizaron la correlación con la respuesta y no con la supervivencia.¹¹⁷

8.5.3- Valor predictivo de respuesta de la presencia de CTCs tras 2 ciclos y los cambios experimentados con respecto al basal

En nuestro estudio, 18 de los 25 pacientes en los que se realizó la determinación de CTCs tras 2 ciclos experimentaron beneficio clínico con el tratamiento mientras que 7 experimentaron progresión. Solo en 3 pacientes se observaron valores de CTC ≥ 50 tras el segundo ciclo, por lo que para la correlación con la respuesta, sólo se ha utilizado el punto de corte en CTC > 1 .

Dieciséis de los 19 pacientes con CTC=0 experimentaron beneficio clínico con la terapia frente a 2 de 6 pacientes con CTC ≥ 1 . Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p=0.012$, OR 10.7), por lo que podemos decir que existe una probabilidad 10.7 veces superior de obtener beneficio clínico cuando no identificamos CTCs tras 2 ciclos. Estos resultados coinciden con lo publicado en cáncer de mama, donde la respuesta al tratamiento se asoció con el nivel de CTC en el momento de la valoración de la respuesta¹⁴⁷. Estudios en otros tumores como el de Thalgott en cáncer de próstata metastásico

en tratamiento (n=33) también apoyan el valor predictivo de las CTCs tras tratamiento. En este caso la segunda determinación se realizaba tras 1 ciclo y se correlacionaba con la respuesta tras el cuarto ciclo. Los pacientes con puntos de corte ≥ 5 CTCs tras 1 ciclo presentaron mayor riesgo de progresión, que de respuestas objetivas (OR 14.9, p 0.02) ó beneficio clínico (OR 19.4, p = 0.01).⁹⁶

Por el contrario, en cáncer colorrectal, el nivel de CTC medido a las 3-5 semanas tras el inicio del tratamiento tuvo una sensibilidad relativamente baja para predecir PG (27%)⁸⁷.

En cuanto a los cambios en las CTCs tras 2 ciclos con respecto al basal, la reducción-estabilización de las CTCs se correlacionó en nuestro trabajo con la respuesta tumoral (rs=0.7, p=0.0001).

Estos resultados en CPCP, no van en la línea del estudio japonés o el holandés, donde sorprendentemente, la disminución de CTCs después de completar el tratamiento o bien tras un ciclo de quimioterapia, respectivamente, no se correlacionaron con la respuesta. En concreto en el estudio de Hiltermann, la disminución de CTCs tras un ciclo de quimioterapia y los valores absolutos de CTCs tras un ciclo de quimioterapia no se correlacionaron con la respuesta tumoral (respectivamente rs = 0.18, p = 0.24 y rs = -0.27, p = 0.08). En el estudio de Naito y cols, la asociación se realizó mediante el test de Wilcoxon. El número de pacientes con CTCs postratamiento indetectables o con niveles de CTC inferiores a los niveles basales fue de 4/6 pacientes en el grupo con RC, 24/ 27 en el grupo con RP, 4/5 en el grupo con EE y 7/12 en el grupo con PG, sin diferencias significativas entre los grupos que mostraron las diversas respuestas al tratamiento.^{116,117}

Para estos autores, y a diferencia de nuestros datos, el valor de la segunda determinación de CTCs y de los cambios que experimentan es pronóstico para supervivencia pero no predictivo de respuesta al tratamiento. Estas discrepancias pueden deberse al momento de elección de la segunda determinación o incluso el método de categorización de la segunda determinación. A este respecto, en el estudio de Cheng y cols,¹⁴⁵ se han realizado grupos basados en el punto de corte tras 2 ciclos y los cambios en las CTCs. La SG en los pacientes con respuestas parciales y enfermedad estable en el grupo A (<10 CTCs antes y después del tratamiento o una diferencia en CTCs después del tratamiento de > 150 CTCs) fue mejor que el del grupo B (≥ 10 CTC por 7,5 ml o una diferencia de ≤ 150 CTC por 7,5 ml) con 16.8 y 12.6 meses versus 8.9 y 6.8 meses, respectivamente, p <0.0001. Para este grupo de investigadores, los cambios en las CTCs y las CTCs tras 2 ciclos tienen un valor pronóstico mayor que la valoración de respuesta de acuerdo a los criterios RECISTv 1.1 en el análisis multivariante, aunque no comunicaron los datos de correlación de estos grupos con la respuesta alcanzada.

8.6.-Células tumorales circulantes a la progresión en el CPCP

De los 14 pacientes en los que fue posible realizar una tercera determinación coincidiendo con el momento de la progresión clínica y/o radiológica, en 10 pacientes se detectaron CTCs en el análisis efectuado en la visita clínica confirmatoria de la progresión (8 eran ED y 2 EL), lo que supone una tasa de detección del 71%. Once pacientes eran ED al diagnóstico y 4 eran EL. La media fue de 565 CTCs (1-4584). Cuatro pacientes presentaron niveles de CTCs ≥ 50 . En nuestra muestra observamos un aumento de la media con respecto a las CTCs basales y tras 2 ciclos de tratamiento.

8.6.1.-Valor pronóstico de las CTCs a la progresión

En nuestro trabajo, hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en SG para el punto de corte de CTCs $> \text{ó} = 50$ a la progresión. La mediana de SG del grupo de 10 pacientes que en el momento de la progresión presentaba < 50 CTC fue de 11 meses frente al grupo de 4 pacientes que presentaba $\text{CTC} \geq 50$, que fue de 2.7 meses (HR 16, $p=0.016$). Sin embargo, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en SG, cuando comparamos el grupo de 4 pacientes en los que no se detectan CTC en el momento de la progresión ($\text{CTC}=0$) con el grupo de 10 pacientes que tienen $\text{CTC} \geq 1$.

Dos estudios han realizado han analizado el valor pronóstico de las CTCs a la progresión en pacientes con CPCP. En el estudio de Cheng y cols¹⁴⁵, se realizó la tercera determinación en 60 pacientes (frente a 91 del basal, y 84 tras 2 ciclos). En su estudio la mediana fue 4 CTCs (0-4617), frente al nuestro en el que la mediana fue de 7. Los pacientes con ≥ 10 CTCs en el momento de la progresión ($n = 25$) tuvieron una mediana de SG significativamente más corta en comparación con los pacientes con < 10 CTCs ($n=35$) (8.3 meses frente a 13.1 meses respectivamente ($p = 0,0053$)). En el estudio de Naito, y cols,¹¹⁶ se realizó la tercera determinación al momento de la progresión en 37 pacientes, con una mediana de 1 CTCs (0-510), encontrándose que los pacientes que tenían valores de CTCs ≥ 8 , presentaban una peor supervivencia con respecto a los que tuvieron niveles de CTCs < 8 ($p 0.0001$).

8.6.2.-Valor pronóstico de los cambios en los niveles de CTCs entre el valor de CTC basal y CTC a la progresión

Sorprende ver que solo existe un aumento del valor de CTC en el momento de la progresión de enfermedad con respecto al basal en un 50% de los pacientes, siendo la cifra estable en 2 pacientes (14.3%) y menor que la basal en el resto (35.7%).

En base a ello, se han realizado 2 categorías de pacientes en función de si experimentan incremento de CTCs a la progresión o bien presentan valores reducidos-estables, sin que se encuentren diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia en

función del cambio en la cifra de CTCs. El grupo de 7 pacientes sin aumento de CTCs tuvo una mediana de SG de 8 meses (IC 95% 0.4-26) mientras que en el grupo de 7 pacientes, con incremento de CTC a la progresión, fue de 7 meses (IC 95% 3.7- 5); HR 1.20, $p=0.75$

En cualquier caso, el escaso número de pacientes ($n=14$) y las dificultades para la agrupación en categorías no nos permiten concluir nada definitivo sobre el valor pronóstico de los cambios en las CTCs en el momento de la progresión. En ese sentido, tampoco disponemos de estudios en la literatura que refuercen o refuten esta hipótesis

8.7.-Análisis univariante y multivariante para supervivencia global y supervivencia libre de progresión

En el análisis univariante, se incluyeron las siguientes variables: sexo, edad (≥ 65 años versus <65 años), comorbilidad, ECOG (0-1 versus 2-3), estadio al diagnóstico (limitado versus diseminado), respuesta tumoral (beneficio clínico versus progresión), metástasis al diagnóstico (cerebrales, hepáticas, hueso, suprarrenales y pulmonares), enolasa neuroespecífica basal, lactato deshidrogenasa basal, CTC basal ≥ 50 versus <50 , CTC basal ≥ 1 versus $=0$, CTC tras 2 ciclos ≥ 50 versus <50 , CTC tras 2 ciclos ≥ 1 versus $=0$, CTC a la progresión ≥ 50 versus <50 , CTC a la progresión ≥ 1 versus $=0$.

Los factores clínicos que fueron identificados como significativos en relación con la supervivencia global fueron: ECOG 2-3 versus 0-1, la respuesta tumoral definida como beneficio clínico frente a progresión, valores continuos de enolasa neuroespecífica al diagnóstico, LDH >240 U/L al diagnóstico frente a LDH <240 , la presencia de metástasis hepáticas al diagnóstico y los niveles de CTC basales, tras 2 ciclos y a la progresión con punto de corte ≥ 50 .

Los factores clínicos que fueron identificados como significativos en relación con la supervivencia libre de progresión fueron los mismos que para la supervivencia global, a los que hay que añadir: estadio al diagnóstico (localizado versus diseminado) y los cambios de CTCs tras 2 ciclos con respecto a basal.

Los factores encontrados como significativos en el análisis univariante de nuestra serie coinciden con los publicados en la literatura sobre cáncer de pulmón. Las metástasis hepáticas han resultado ser la única localización con valor pronóstico en nuestro análisis mientras que en otros estudios, además lo han sido las metástasis óseas o adrenales.^{106,114} En nuestra serie llama la atención que el estadio, uno de los factores pronósticos de mayor peso en todos los tumores solo salga significativo para SLP en el análisis univariante, lo que pudiera estar en relación con el escaso número de pacientes. La mediana de SG para los 9 pacientes con enfermedad limitada fue de 16 meses (IC95% 8-36), mientras que para los 39 pacientes con enfermedad diseminada fue de 8 meses (HR 2, $p 0.11$).

Dado que el número de pacientes es inferior a 50, el número de variables a incluir en el análisis multivariante no puede ser superior a 5. Por ello, se han seleccionado variables de especial interés como el estadio, el estado general según la escala ECOG y variables de especial interés teórico como son los valores de CTCs basal ≥ 50 y tras dos ciclos ≥ 50 .

Hemos realizado 2 modelos predictivos para supervivencia global. En el primero, incluimos variables disponibles en el momento del diagnóstico: ECOG, estadio, valor absoluto de CTCs basales y valor basal de CTCs con punto de corte ≥ 50 . En este modelo, el único factor pronóstico independiente fue el ECOG 2-3. En el segundo modelo hemos tenido en cuenta variables seleccionadas mediante el método de *stepwise*: ECOG, estadio tumoral al diagnóstico (ED versus EL), respuesta tumoral (beneficio clínico versus progresión), CTCs basales ≥ 50 y el valor de CTCs tras 2 ciclos ≥ 50 . En este modelo, las CTCs tras 2 ciclos con punto de corte ≥ 50 fue el único factor pronóstico independiente.

En el análisis multivariante para supervivencia libre de progresión se ha tenido en cuenta el cambio de CTCs tras 2 ciclos con respecto al basal, seleccionado por el análisis univariante como factor predictivo, además de las variables seleccionadas previamente (ECOG, estadio, CTC basal y tras 2 ciclos con punto de corte 50). En nuestro modelo multivariante, el estadio al diagnóstico, definido según la clasificación VALG (enfermedad localizada o diseminada) y los cambios en los valores de CTCs tras 2 ciclos con respecto al basal (incrementos) han resultado ser factores independientes para la supervivencia libre de progresión.

En el análisis multivariante de nuestro trabajo para SG y SLP destaca, que las CTCs basales no sean un factor pronóstico independiente en ninguno de los modelos. Esto coincide con el primer estudio publicado en CPCP, con una muestra similar de pacientes, donde las CTCs basales tuvieron un valor pronóstico en el análisis univariante pero no tuvieron valor pronóstico independiente y sí lo fue la LDH.¹¹⁵ Las muestras de ambos estudios eran similares lo que podría explicar esta coincidencia.

Nuestras conclusiones también son similares a las del estudio holandés del 2012. En éste, llevado a cabo por Hiltermann y col en 59 pacientes con CPCP,¹¹⁷ el estado general según la escala ECOG fue el único factor pronóstico independiente en un modelo predictivo de SG donde se tenía en cuenta la edad, el sexo, la respuesta tumoral, las CTC basales con punto de corte en 2 y las CTCs tras 1 ciclo con punto de corte en 2. Al igual que hemos hecho en nuestro trabajo, cuando las variables se seleccionaron con ayuda del modelo de *stepwise*, al ECOG (HR 4.6, p 0.03) se añadió las CTCs tras 2 ciclos con punto de corte en 2 con mayor potencia estadística en el modelo predictivo (HR 5.7, p 0.004). Las CTCs basales fueron significativas en el modelo univariante pero no en el multivariante.

Por el contrario, otros estudios en CPCP han considerado también las CTCs basales como un factor pronóstico independiente tanto para SLP como SG¹¹⁹. También nos encontramos en la literatura estudios con mayor muestra que los anteriores o el nuestro (n=91),

que consideran las CTC basales como factor pronóstico independiente sólo para SG, pero no para SLP. Esto puede ser atribuido, al menos en parte, a factores tales como que los pacientes eran todos estadios diseminados de enfermedad y que la muestra era mayor. Para estos autores las CTCs tras 2 ciclos ≥ 10 fue el factor pronóstico independiente más importante para SG y SLP, y que de los 3 puntos analizados (basal, tras 2 ciclos y progresión), este es el que provee mayor valor pronóstico.¹⁴⁵

En el estudio del grupo de Manchester (Krebs y cols¹¹⁴) realizado en 101 pacientes con CPNCP estadio III y IV, la determinación de CTCs se realizó antes y después de someterse a un ciclo de quimioterapia. En el análisis multivariante, el número de CTCs ≥ 5 antes de la quimioterapia fue el predictor más fuerte para la SG (HR 7.92; $p < 0.001$). También encontraron que las CTCs (≥ 5) tras un ciclo de quimioterapia tenían valor predictivo (HR, 15.65, $p < 0.001$). En este estudio, el ECOG y el estadio fueron factores pronósticos independientes pero de menor peso que las CTCs basales.

En el cáncer de mama, las CTCs tras 1 mes de tratamiento han demostrado ser un mejor predictor de SG que el seguimiento radiológico con TAC a las 12 semanas.⁸² y en el cáncer gástrico avanzado, las CTCs tras el primer ciclo de quimioterapia fueron el mejor predictor de SG.¹⁴⁸

Por lo tanto, para nosotros la evaluación de CTCs tras tratamiento nos informan de manera temprana del estado de la enfermedad, incluso mejor que la evaluación de respuesta por criterios RECIST como hemos visto en el análisis multivariante y podrían determinar cambios terapéuticos tumorales mejor que las imágenes. Por supuesto, estas conclusiones deben ser validadas en estudios con mayor número de pacientes.

9.- LIMITACIONES Y FORTALEZAS

Como fortalezas hay que destacar que ha sido un estudio prospectivo y que se ha realizado en un solo centro, lo que garantiza homogeneidad por la atención y seguimiento uniforme así como precisión en los datos recogidos.

La mayor limitación del estudio es el escaso número de pacientes reclutados. La razón principal ha sido la incidencia decreciente de esta patología así como la limitación para el seguimiento de algunos pacientes, consecuencia del deterioro clínico en el momento del diagnóstico. A esto hay que añadir la limitación económica derivada tanto de la técnica empleada como de la complejidad puesto se requiere analizar la muestra en un máximo de 96 horas tras la extracción lo que obliga a una mayor inversión en personal de apoyo. Por último, las características inherentes a la propia enfermedad han condicionado las extracciones seriadas lo que dificulta la interpretación de resultados de monitorización.

10.- CONCLUSIONES

- I. Hasta el momento, es el mayor estudio español que analiza CTCs en pacientes con cáncer de pulmón.
- II. Los resultados del presente estudio mostraron que la tasa de detección de CTCs mediante el método de CellSearch System® es mayor en pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas que en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (66.6% versus 21.5%).
- III. La presencia de CTCs basales en nuestro estudio, se asoció a metástasis óseas y de forma inversa con las metástasis cerebrales. Los niveles basales de CTCs ≥ 50 se correlacionaron con enfermedad diseminada, con las metástasis óseas, hepáticas, suprarrenales al diagnóstico y con peor estado general según la escala ECOG (2 ó 3).
- IV. Los pacientes con CTCs basales ≥ 50 mostraron peor supervivencia global (SG) (HR 2.13, p 0.04), peor supervivencia libre de progresión (SLP) (HR 2.2, p 0.017), así como un mayor riesgo de progresión frente al grupo con CTC <50 , (OR 6, p=0.007).
- V. La presencia de CTCs tras 2 ciclos se asoció a una menor SG (HR 1.86; p 0.026) y a un mayor riesgo de progresión tumoral (OR 10.7, p 0.012). De igual forma, los valores de CTC tras 2 ciclos ≥ 50 se asociaron a peor SG (HR 32, p 0.003) y a peor SLP (HR 9, p 0.007).
- VI. Los incrementos en el valor basal de CTCs tras 2 ciclos de tratamiento se asociaron con peor SLP (HR 14, p 0.003), con una tendencia a peor SG (HR 2.79, p 0.12) y con menor probabilidad de respuesta tumoral (rs 0.7, p 0.0001).
- VII. Los valores de CTCs ≥ 50 a la progresión se asociaron a una peor SG con una HR 16; p 0.016, pero no sus cambios con respecto al basal.
- VIII. En el análisis multivariante las CTCs tras 2 ciclos ≥ 50 fue una variable pronóstica independiente para la SG frente a factores tradicionales como el ECOG o el estadio, mientras que los incrementos de CTCs tras 2 ciclos con respecto al basal lo fueron para la SLP.
- IX. Dado el escaso número de pacientes de nuestro estudio pertenecientes a un único centro, se requiere un estudio de validación multi-institucional prospectivo para confirmar estos resultados.

ANEXO I

APROBACIÓN COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

 SaludMadrid	Hospital Universitario Ramón y Cajal Comité Ético de Investigación Clínica	 Comunidad de Madrid
--------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------

Dra. ITZIAR DE PABLO LÓPEZ DE ABECHUCO, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Ramón y Cajal

CERTIFICA

Que el Comité Ético de Investigación Clínica, ha evaluado el **PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:**

Título:

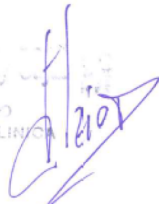
CORRELACIÓN DEL TIEMPO A LA PROGRESIÓN EN CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULA PEQUEÑA CON EL NÚMERO DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES TRAS TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO. (CTCS). ESTUDIO PILOTO.

Investigador Principal: **Dra. María Eugenia Olmedo García**

Servicio: **Oncología Médica**

Y ha decidido su **APROBACIÓN.**

Lo que firmo en Madrid a 08 de Marzo de 2012


COMITÉ ÉTICO
INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Fdo.: Dra. Itziar de Pablo López de Abechuco
Secretaria del CEIC

ANEXO II

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del estudio: Papel de las células tumorales circulantes en el carcinoma de pulmón de células pequeñas

Investigador principal: M^a Eugenia Olmedo García. Servicio de oncología médica. Hospital Ramón y Cajal. Teléfono 913368263

INTRODUCCIÓN

Nos dirigimos a usted para informarle sobre el desarrollo del estudio en el que se le propone participar. Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación.

Su participación es voluntaria y puede revocar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio en sus cuidados médicos. En caso de retirar el consentimiento para participar en el estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos y puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de un nuevo análisis.

FUNDAMENTO

el estudio que se va a llevar a cabo es un estudio promovido por Dra. Eugenia Olmedo con el fin de identificar células tumorales en sangre periférica e intentar correlacionarlo con el estadio de su enfermedad, la respuesta que ha tenido su enfermedad al tratamiento y el tiempo a la progresión.

Por lo tanto, el objetivo final del estudio es intentar hallar células tumorales circulantes mediante un análisis de sangre y correlacionarlo con su enfermedad.

Cualquier nueva información referente a las técnicas utilizadas en el estudio, que se descubra durante su participación, le será comunicada.

BENEFICIOS ESPERADOS E INCONVENIENTES

Este estudio no tiene ningún beneficio para usted, pero sí que podría reportar en un beneficio para otros pacientes si se evidencia algún tipo de relación entre estos análisis y su enfermedad.

Como posibles inconvenientes son los vinculados con la donación y obtención de la muestra, incluida la posibilidad de ser contactado con posterioridad con el fin de recabar nuevos datos u obtener otras muestras.

Su participación consiste en una extracción de sangre al inicio del tratamiento, al finalizar y cada 3 meses en el seguimiento, a la vez que se extraen analíticas de rutina, por lo que no tiene que reportarle molestias mayores. En alguna ocasión, que haya problemas con la extracción, puede ser necesario volver a repetirla. No precisa de visitas extras.

CONFIDENCIALIDAD

Las muestras sanguíneas recogidas para el presente estudio serán utilizadas para la determinación de las células tumorales circulantes. Las muestras son extraídas en la consulta de enfermería de la -2D y llevadas en mano al laboratorio (Dra Earl) que se encuentra en la misma planta en mano. Serán necesarios 10 ml de sangre realizándose la determinación en el laboratorio de oncología médica (Dra Earl) y almacenándose en este laboratorio durante los 2 años de proyecto. No se utilizarán las muestras fuera del proyecto.

Todos los datos recogidos para el estudio, procedentes de su Historia Clínica o facilitados por usted mismo, serán tratados con las medidas de seguridad establecidas en cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de carácter personal. Debe saber que tiene derecho de acceso, rectificación y cancelación de los mismos en cualquier momento. Sólo aquellos datos de la historia clínica que estén relacionados con el estudio serán objeto de comprobación. Esta comprobación la realizará el Investigador Principal/Investigadores Colaboradores, responsables de garantizar la confidencialidad de todos los datos de las historias clínicas pertenecientes a los sujetos participantes en el estudio. Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y sólo el investigador principal/colaboradores podrá relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica.

Todas las muestras sanguíneas que se obtengan para el estudio serán codificadas de forma que no sea posible su identificación y no será posible establecer de nuevo el nexo con sus datos personales.

OTROS ASPECTOS DE INTERÉS

En caso de necesitar cualquier información o por cualquier otro motivo no dude en contactar con los investigadores principales del estudio en el teléfono 913368263 Así mismo, en caso de dudas respecto a sus derechos debe dirigirse al Servicio de Atención al Paciente del hospital.

Firma del paciente:

Firma del investigador:

Nombre:

Nombre:

Fecha:

Fecha:

Este documento se firmará por duplicado quedándose una copia el investigador y otra el paciente

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(2):87-108.
- 2.- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year.
- 3.- Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. In: World Health Organization classification of tumours, Travis, WD, Brambilla, E, Muller-Hermlink, HK, Harris, CC (Eds), IARC Press, Lyon 2004
- 4.- Riaz SP, Lüchtenborg M, Coupland VH, et al. Trends in incidence of small cell lung cancer and all lung cancer. *Lung Cancer.* 2012 ;75(3):280-4
- 5.- Travis W, Brambilla E, Noguchi M, et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society / European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2001; 6: 244-285
- 6.- Rami-Porta R, Asamura H, Travis WD, et al. Lung cancer - major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017 67(2):138-155
- 7.- Schiller JH, Harrington D, Belani CP, et al.: Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2002; 346 (2): 92-8
- 8.- Sandler A, Gray R, Perry MC, et al.: Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006; 355 (24): 2542-50.
- 9.- Paz-Ares LG, de Marinis F, Dediu M, et al.: PARAMOUNT: Final overall survival results of the phase III study of maintenance pemetrexed versus placebo immediately after induction treatment with pemetrexed plus cisplatin for advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2013; 31 (23): 2895-902.
- 10.- Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al.: Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009; 361 (10): 947-57.
- 11.- Solomon BJ, Mok T, Kim DW, et al.: First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2014; 371 (23): 2167-77.
- 12.- Shepherd FA, Dancey J, Ramlau R, et al.: Prospective randomized trial of docetaxel versus best supportive care in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; 18 (10): 2095-103.
- 13.- Hanna N, Shepherd FA, Fossella FV, et al.: Randomized phase III trial of pemetrexed versus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with chemotherapy. *J Clin Oncol* 2004; 22 (9): 1589-97.
- 14.- Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, et al.: Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 353 (2): 123-32, 2005
- 15.- Trigo JM, Garrido P, Felip E, Isla D. SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small-cell lung cancer (NSCLC): un updated edition. *Clin Transl Oncol.* 2010; 12(11):735-41.
- 16.- Crino L, Weder W, van Meerbeeck J, Felip E; Early stage and locally advanced (non-metastatic) non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2010; 21 Suppl 5:v103-15

- 17.- Reck M, Kaiser R, Mellempgaard A, et al. Docetaxel plus nintedanib versus docetaxel plus placebo in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (LUME-Lung 1): a phase 3, double-blind, randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2014 Feb;15(2):143-55.
- 18.- Garon EB, Ciuleanu TE, Arrieta O, et al. Ramucirumab plus docetaxel versus placebo plus docetaxel for second-line treatment of stage IV non-small-cell lung cancer after disease progression on platinum-based therapy (REVEL): a multicentre, double-blind, randomised phase 3 trial. *Lancet.* 2014 Aug 23;384(9944):665-73.
- 19.- Shin, DS., Ribas, A. The evolution of checkpoint blockade as a cancer therapy: what's here, what's next? *Curr. Opin.Immunol.* 2015;33C, 23e35.
- 20.- Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012;366:2443-54
- 21.- Spigel DR, Reckamp KL, Rizvi NA, et al. A phase III study (CheckMate 017) of nivolumab (NIVO; anti-programmed death-1 [PD-1]) vs docetaxel (DOC) in previously treated advanced or metastatic squamous (SQ) cell non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 2015;33:abstr 8009
- 22.- Hossein Borghaei, Luis Paz-Ares, Leora Horn, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2015; 373:1627-1639
- 23.- Reck M, Rodríguez-Abreu Delvys, Robinson AG, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2016; 375:1823-1833
- 24.- Lynch TJ, Bondarenko I, Luft A, et al. Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line treatment in stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer: results from a randomized, double-blind, multicenter phase II study. *J Clin Oncol* 2012;30:2046-54
- 25.- Bristol-Myers Squibb. Phase 3 Trial in Squamous Non Small Cell Lung Cancer Subjects Comparing Ipilimumab Plus Paclitaxel and Carboplatin Versus Placebo Plus Paclitaxel and Carboplatin In: *ClinicalTrials.gov* [Internet]. 2000 - [cited 2017 Jan]. Available from [http:// clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02279732](http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02279732) NLM Identifier: NCT02279732
- 26.- Bristol-Myers Squibb. Ipilimumab and Stereotactic Body Radiation Therapy (SBRT) in Advanced Solid Tumors. In: *ClinicalTrials.gov* [Internet]. 2000 - [cited 2016 Dec]. Available from [http:// clinicaltrials.gov/ct2/show/ NCT02239900](http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02239900) NLM Identifier: NCT02239900
- 27.- Bristol-Myers Squibb. Study of Combined Ionizing Radiation and Ipilimumab in Metastatic Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC). In: *ClinicalTrials.gov* [Internet]. 2000 - [cited 2016 Dec]. Available from [http:// clinicaltrials.gov/ct2/show/ NCT02221739](http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02221739) NLM Identifier: NCT02221739
- 28.- Merck Sharp & Dohme Corp. A Study of Pembrolizumab (MK-3475) in Combination With Chemotherapy or Immunotherapy in Participants With Lung Cancer (MK-3475-021/KEYNOTE-021)In: *ClinicalTrials.gov* [Internet]. 2000 - [cited 2017 Jan]. Available from [http:// clinicaltrials.gov/ct2/show/ NCT02039674](http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02039674) NLM Identifier: NCT02039674
- 29.- Hoffmann-La Roche. A Study to Assess the Safety and Tolerability of MPDL3280A in Combination With Other Immune-modulating Therapies in Patients With Locally Advanced or Metastatic Solid TumorsIn: *ClinicalTrials.gov* [Internet]. 2000 - [cited 2017 Jan]. Available from [http:// clinicaltrials.gov/ct2/show/ NCT02174172](http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02174172) NLM Identifier: NCT02174172
- 30.- Patel AM, Dunn WF, Trastek VF. Staging systems of lung cancer. *Mayo Clin Proc* 1993; 68:475-82.
- 31.- Rami-Porta R, Bolejack V, Crowley J, 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 Jul;10(7):990-1003.

- 32.- Takada M, Fukuoka M, Kawahara M, et al.: Phase III study of concurrent versus sequential thoracic radiotherapy in combination with cisplatin and etoposide for limited-stage small-cell lung cancer: results of the Japan Clinical Oncology Group Study 9104. *J Clin Oncol* 2002. 20 (14): 3054-60.
- 33.- Spiro SG, James LE, Rudd RM, et al.: Early compared with late radiotherapy in combined modality treatment for limited disease small-cell lung cancer: a London Lung Cancer Group multicenter randomized clinical trial and meta-analysis. *J Clin Oncol*. 2006. 24 (24): 3823-30.
- 34.- De Ruysscher D, Pijls-Johannesma M, Vansteenkiste J, et al.: Systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials of the timing of chest radiotherapy in patients with limited-stage, small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2006. 17 (4): 543-52
- 35.- Aupérin A, Arriagada R, Pignon JP, et al.: Prophylactic cranial irradiation for patients with small-cell lung cancer in complete remission. Prophylactic Cranial Irradiation Overview Collaborative Group. *N Engl J Med* 1999. 341 (7): 476-84.
- 36.- Sandler A. Chemotherapy for small cell lung cancer. *Semin Oncol* 2003;30:9-25.
- 37.- Ihde D, Souhami B, Comis R, et al. Small cell lung cancer: consensus report. *Lung Cancer* 1997;17 (Suppl I): S19-S219.
- 38.- Rosti G, Bevilacqua G, Bidoli P, et al. Small cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2006;17(Suppl 2):ii5–10.
- 39.- Behera M, Ragin C, Kim S, et al. Trends, predictors, and impact of systemic chemotherapy in small cell lung cancer patients between 1985 and 2005. *Cancer*. 2016;122(1):50-60.
- 40.- Noda K, Nishiwaki Y, Kawahara M, et al.: Irinotecan plus cisplatin compared with etoposide plus cisplatin for extensive small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2002;346 (2): 85-91
- 41.- Lara P, Redman M, Lenz H, et al. Cisplatin (Cis)/etoposide (VP16) compared to cis/irinotecan (CPT11) in extensive-stage small cell lung cancer (E-SCLC): Pharmacogenomic (PG) and comparative toxicity analysis of JCOG 9511 and SWOG 0124. *Journal of Clinical Oncology*, 2007 (June 20 Supplement):7524
- 42.- Natale RB, Lara P, Chansky L, et al. A randomized phase III comparing irinotecan/cisplatin with etoposide/cisplatin in patient with previously untreated extensive stage small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: (May 20 suppl;abstr 1712)
- 43.- Eckardt JR, von Pawel J, Papai Z, et al.: Open-label, multicenter, randomized, phase III study comparing oral topotecan/cisplatin versus etoposide/cisplatin as treatment for chemotherapy-naïve patients with extensive-disease small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24 (13): 2044-51.
- 44.- Giaccone G, Dalesio O, McVie G. Maintenance chemotherapy in small cell lung cancer: long term results of a randomized trial. *J Clin Oncol* 1993;1:1230-1240
- 45.- Roth B, Johnson D, Einhorn L. Randomized study of cyclophosphamide plus doxorubicin plus vincristine versus etoposide plus cisplatin versus alternation of these two regimens in extensive small cell lung cancer: a phase III of a Southeastern Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1992; 10:282-291
- 46.- Fukuoka M, Furuse K, Saijo N. Randomized trial of cyclophosphamide, doxorubicin and vincristine versus cisplatin and etoposide versus alternation of these regimens in extensive small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:855-861
- 47.- Klasa R, Murray N, Coldman A. Dose-intensity metaanalysis of chemotherapy regimens in small cell carcinoma of lung. *J Clin Oncol* 1991; 9:499-508

- 48.- Slotman BJ, van Tinteren H, Praag JO, et al.: Use of thoracic radiotherapy for extensive stage small-cell lung cancer: a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 2015. 385 (9962): 36-42.
- 49.- Slotman B, Faivre-Finn C, Kramer G, et al. EORTC Radiation Oncology Group and Lung Cancer Group. Prophylactic cranial irradiation in extensive small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2007; 357:664-72.
- 50.- Postmus PE, Berendsen HH, van Zandwijk N, et al. Retreatment with the induction regimen in small cell lung cancer relapsing after an initial response to short term chemotherapy. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1987;23 (9): 1409-11.
- 51.- Murray N, Turrisi AT. A review of first-line treatment for small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2006, 1:270–278.
- 52.- Von Pawel J, Schiller JH, Shepherd FA, et al.: Topotecan versus cyclophosphamide, doxorubicin, and vincristine for the treatment of recurrent small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1999;17 (2): 658-67.
- 53.- O'Brien ME, Ciuleanu TE, Tsekov H, et al.: Phase III trial comparing supportive care alone with supportive care with oral topotecan in patients with relapsed small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2006;24 (34): 5441-7.
- 54.- Eckardt JR, von Pawel J, Pujol JL, et al.: Phase III study of oral compared with intravenous topotecan as second-line therapy in small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2007;25 (15): 2086-92.
- 55.- Davies AM, Evans WK, Mackay JA, et al.: Treatment of recurrent small cell lung cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 18 (2): 387-416, 2004.
- 56.- Adjei AA, Marks RS, Bonner JA. Current guidelines for the management of small cell lung cancer. *Mayo Clin Proc* 1999; 74:809-16.
- 57.- Blackhall FH, Shepherd FA. Small cell lung cancer and targeted therapies. *Curr Opin Oncol* 2007, 19:103–108.
- 58.- Riethdorf S, Wikman H, Pantel K. Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. *Int. J. Cancer* 2008; 123 (9), 1991–2006.
- 59.- Spigel DR, Socinski MA. Rationale for chemotherapy, immunotherapy, and checkpoint blockade in SCLC: beyond traditional treatment approaches. *J Thorac Oncol*. 2013;8:587-98.
- 60.- Bristol-Myers Squibb. Trial in Extensive-Disease Small Cell Lung Cancer (ED-SCLC) Subjects Comparing Ipilimumab Plus Etoposide and Platinum Therapy to Etoposide and Platinum Therapy Alone. In: *ClinicalTrials.gov* [Internet]. 2000 - [cited 2015 Aug 15]. Available from <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01450761> NLM Identifier: NCT01450761
- 61.- Ashworth TR. A case of cancer in wich cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death. *Australian Med J*. 1869;14:146.
- 62.- Kagan M, Howard D, Bendele T, et al. A sample preparation and analysis system for identification of circulating tumor cells. *J Clin Ligand Assay*. 2002;25:104—10.
- 63.- Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat. Rev. Cancer* 2008; 8, 329–340
- 64.- Pantel K, Alix-Panabières C, Riethdorf S. Cancer micrometastases. *Nat. Rev. Clin. Oncol*.2009; 6, 339–351.
- 65.- Yu N, Zhou J, Cui F, et al. Circulating Tumor Cells in Lung Cancer: Detection Methods and Clinical Applications. *Lung* .2015; 193:157–171

- 66.- Young R, Pailler E, Billiot F, et al. Circulating tumor cells in lung cancer. *Acta Cytol* 2012;56:655–60
- 67.- Bednarz-Knoll N, Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical relevance and biology of circulating tumor cells. *Breast Cancer Res* 2011;13:228
- 68.- Alix-Panabières C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem* 2013;59:110–8.
- 69.- Liberko M, Kolostova K, Bobek V. Essentials of circulating tumor cells for clinical research and practice. *Crit Rev Oncol Hematol* 2013;88:338–56
- 70.- Allard WJ, Matera J, Miller MC, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with non malignant diseases. *Clin Cancer Res* 2004;10:6897–904.
- 71.- Yasaka T, Mantich NM, Boxer LA, et al. Functions of human monocyte and lymphocyte subsets obtained by counter current centrifugal elutriation: differing functional capacities of human monocyte subsets. *J Immunol* 1981;127:1515–8.
- 72.- Hou JM, Krebs MG, Lancashire L, et al. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2012;30:525–32.
- 73.- Sequist LV, Nagrath S, Toner M, et al. The CTC-chip: an exciting new tool to detect circulating tumor cells in lung cancer patients. *J Thorac Oncol* 2009;4:281–3.
- 74.- Krebs MG, Hou J-M, Ward TH, et al. Circulating tumour cells: their utility in cancer management and predicting outcomes. *Ther Adv Med Oncol* 2010;2:351–65
- 75.- Pierga JY, Bonneton C, Vincent-Salomon A, et al. Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(4):1392-1400.
- 76.- Gilbey AM, Burnett D, Coleman RE, et al. The detection of circulating breast cancer cells in blood. *J Clin Pathol* 2004; 57(9):903-11.
- 77.- Smerage JB, Hayes DF. The measurement and therapeutic implications of circulating tumour cells in breast cancer. *Br J Cancer*. 2006; 94(1):8-12.
- 78.- Braun S, Marth C. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer-toward individualized treatment? *N Engl J Med*. 2004; 351(8):824-26.
- 79.- Alix-Panabieres C, Brouillet JP, Fabbro M, et al. Characterization and enumeration of cells secreting tumor markers in the peripheral blood of breast cancer patients. *J Immunol Methods*. 2005; 299(1-2):177-88.
- 80.- Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005; 23(7):1420-30.
- 81.- Cristofanilli M, Budd T, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cell, disease progression and survival metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351: 781—91.
- 82.- Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells versus imaging predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12:6403—9.
- 83.- Zhao S, Liu Y, Zhang Q, et al. The prognostic role of circulating tumor cells (CTCs) detected by RT-PCR in breast cancer: a meta-analysis of published literature. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;130(3):809–16

- 84.- Zhang L, Riethdorf S, Wu G, et al. Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer. *Clin Cancer Res*(2012) 18: 5701–5710.
- 85.- Lv Q, Gong L, Zhang T, et al. Prognostic value of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: a systemic review and meta-analysis. *Clin Transl Oncol*. 2016;18(3):322-30
- 86.- Rahbari NN, Aigner M, Thorlund K, et al. Meta-analysis shows that detection of circulating tumor cells indicates poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010; 138: 1714–1726.
- 87.- Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:3213–3221.
- 88.- Ligthart ST, Coumans FA, Bidard FC, et al. Circulating Tumor Cells Count and Morphological Features in Breast, Colorectal and Prostate Cancer. *PLoS One*. 2013 ;8(6): e67148.
- 89.- Moreno JG, O'Hara SM, Gross S, et al. Changes in circulating carcinoma cells in patients with metastatic prostate cancer correlate with disease status. *Urology*. 2001;58:386—92.
- 90.- Shaffer DR, Leversha MA, Danila DC, et al. Circulating tumor cell analysis in patients with progressive castration-resistant prostate cancer. *Clinical Cancer Research*. 2007;13:2023—9.
- 91.- Maestro ML, Sastre J, Rafael S, et al. Circulating tumor cells in solid tumor in metastatic and localized stages. *Anticancer Res*. 2009;29: 3—7.
- 92.- Resel Folkersma L. Cuantificación inmunomagnética de células tumorales circulantes en pacientes con cáncer de próstata: correlación clínica y patológica. *Arch Esp Urol*. 2010;63: 23—31.
- 93.- Ghossein RA, Bhattacharya S. Molecular detection and characterisation of circulating tumour cells and micro-metastases in solid tumours. *Eur J Cancer*. 2000;36:1681—94.
- 94.- Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, et al: Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 2007; 450:1235-1239.
- 95.- de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:6302– 6309.
- 96.- Thalgott M, Rack B, Eiber M, et al. Categorical versus continuous circulating tumor cell enumeration as early surrogate marker for therapy response and prognosis during docetaxel therapy in metastatic prostate cancer patients. *BMC Cancer*. 2015 Jun 9;15:458
- 97.- Coumans FA, Ligthart ST, Terstappen LW. Interpretation of changes in circulating tumor cell counts. *Transl Oncol*. 2012 Dec;5(6):486-91
- 98.- Fusi A, Metcalf R, Krebs M, Dive C, et al. Clinical utility of circulating tumour cell detection in non-small-cell lung cancer. *CurrTreat Options Oncol* 2013;14:610–22
- 99.- Denlinger CE, Ikonomidis JS, Reed CE, et al. Epithelial to mesenchymal transition: the door way to metastasis in human lung cancers. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010;140:505–13.
- 100.- Soltermann A, Tischler V, Arbogast S, et al. Prognostic significance of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transition protein expression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:7430–7
- 101.- Isobe K, Hata Y, Kobayashi K, et al. Clinical significance of circulating tumor cells and free DNA in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2012;32:3339–44,

- 102.- Punnoose EA, Atwal S, Liu W, et al. Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: association with clinical endpoints in a phase II clinical trial of pertuzumab and erlotinib. *Clin Cancer Res* 2012;18:2391–401
- 103.- Krebs MG, Hou JM, Sloane R, et al. Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and independent approaches. *J Thorac Oncol* 2012;7:306–15.
- 104.- Tanaka F, Yoneda K, Kondo N, et al. Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:6980–6.
- 105.- Juan O, Vidal J, Gisbert R, et al. Prognostic significance of circulating tumor cells in advanced non-small cell lung cancer patients treated with docetaxel and gemcitabine. *ClinTransl Oncol* 2014;16:637–43.
- 106.- Muinelo-Romay L, Vieito M, Abalo A, et al. Evaluation of circulating tumor cells and related events as prognostic factors and surrogate biomarkers in advanced NSCLC patients receiving first line systemic treatment. *Cancers* 2014;6:153–65.
- 107.- Tognela A, Spring KJ, Becker T, et al. Predictive and prognostic value of circulating tumor cell detection in lung cancer: a clinician's perspective. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2015;93(2):90-102
- 108.- Huang J, Wang K, Xu J, et al. Prognostic significance of circulating tumor cells in non-small-cell lung cancer patients: a meta-analysis. *PLoS One.* 2013;8(11):e78070
- 109.- Das M, Riess JW, Frankel P, et al. ERCC1 expression in circulating tumor cells (CTCs) using a novel detection platform correlates with progression-free survival (PFS) in patients with metastatic non small-cell lung cancer (NSCLC) receiving platinum chemotherapy. *Lung Cancer(2012) 77:* 421–426
- 110.- Hofman V, Bonnetaud C, Ilie MI, et al. Preoperative circulating tumor cell detection using the isolation by size of epithelial tumor cell method for patients with lung cancer is a new prognostic biomarker. *Clin Cancer Res (2011)17:* 827–835
- 111.- Zhang Z, Xiao Y, Zhao J, et al. Relationship between circulating tumour cell count and prognosis following chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Respirology.* 2016 Apr;21(3):519-25.
- 112.- Wu C, Hao H, Li L, et al. Preliminary investigation of the clinical significance of detecting circulating tumor cells enriched from lung cancer patients. *J Thorac Oncol* 2009;4:30–6.
- 113.- Hirose T, Murata Y, Oki Y, et al. Relationship of circulating tumor cells to the effectiveness of cytotoxic chemotherapy in patients with metastatic non-small-cell lung cancer. *Oncol Res* 2012;20:131–7.
- 114.- Krebs MG, Sloane R, Priest L, et al. Evaluation and Prognostic Significance of Circulating Tumor Cells in Patients With Non–Small-Cell Lung Cancer. *JCO* 2011 29: 1556-1563
- 115.- Hou JM, Greystoke A, Lancashire L, et al: Evaluation of Circulating Tumor Cells and Serological Cell Death Biomarkers in Small Cell Lung Cancer Patients Undergoing Chemotherapy. *Am J Pathol* August 2009;175 (2):808-16
- 116.- Naito T, Tanaka F, Ono A, et al. Prognostic Impact of Circulating Tumor Cells in Patients with Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2012;7(3):512-9
- 117.- Hiltermann TJN, Pore MM, van den Berg A, et al. Circulating tumor cells in small-cell lung cancer: a predictive and prognostic factor. *Ann Oncol* 2012;23:2937–42.
- 118.- Normanno N, Rossi A, Morabito A, et al. Prognostic value of circulating tumor cells reduction in patients with extensive small-cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2014; 85(2):314-9

- 119.- Igawa S, Gohda K, Fukui T, et al. Circulating tumor cells as a prognostic factor in patients with small cell lung cancer. *Oncol Lett* 2014;7:1469–73
- 120.- Tanaka F, Yoneda K, Kondo N, et al. Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:6980–6.
- 121.- Wang X, Ma K, Wang , et al. Evaluation of Circulating Tumor Cells in Predicting Therapeutic Response in Small Cell Lung Cancer Patients. *Archives of Medical Research* 2016;47: 454-459
- 122.- Garrido P, Guillén C, Gómez A. Factores pronósticos en el carcinoma microcítico de pulmón. En *Factores pronósticos en Oncología*. 2º edición McGraw-Hill Interamericana 2005;57-64.
- 123.- Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multi-region sequencing. *N Engl J Med* 2012;366:883–892.
- 124.- Hiley C, de Bruin EC, McGranahan N, et al. Deciphering intratumor heterogeneity and temporal acquisition of driver events to refine precision medicine. *Genome Biol* 2014;15:453
- 125.- Zhang Z, Ramnath N, and Nagrath S. Current Status of CTCs as Liquid Biopsy in Lung Cancer and Future Directions. *Front Oncol*. 2015; 5: 209.
- 126.- Hanssen A, Loges S, Pantel K, et al. Detection of Circulating Tumor Cells in Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Oncol*. 2015 Sep 22;5:207.
- 127.- Ignatiadis M, Lee M, and Jeffrey S. Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA: Challenges and Opportunities on the Path to Clinical Utility. *Clin Cancer Res*; 2015; 21: 4785-4800
- 128.- D'Angelo, Larkin J, Weber J., et al. Efficacy and Safety of Nivolumab vs Investigator's Choice Chemotherapy (ICC J.) in Subgroups of Patients with Advanced Melanoma after Prior Anti-CTLA-4 Therapy SMR (2014) (Abstract LBA)
- 129.- Powles, J.P. Eder, G.D. Fine, et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature*, 2014; 515: 558–562
- 130.- Garon EB, Gandhi L, Rizvi N, et al. Antitumor activity of pembrolizumab (Pembro; MK-3475) and correlation with programmed death ligand 1 (PD-L1) expression in a pooled analysis of patients (pts) with advanced non-small cell lung carcinoma (NSCLC). ESMO (2014) (abstract LBA43)
- 131.- Robert C., Schachter J, Long GV. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 2015; 372:2521-2532
- 132.- Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al. Pembrolizumab for the Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2015; 372:2018-2028
- 133.- Jilaveanu, L.B., Shuch, B., Zito C, et al,. PD-L1 expression in Clear cell renal cell carcinoma: an analysis of Nephrectomy and sites of metastases. *J. Cancer* 2014;5, 166e172.
- 134.- Bidard, F.C., Fehm, T., Ignatiadis, M, et al. Clinical application of circulating tumor cells in breast cancer: overview of the current interventional trials. *Cancer Metastasis Rev*. 2013;32, 179e188
- 135.- Marchetti A, Del Grammastro M, Felicioni L, et al. Assessment of EGFR mutations in circulating tumor cell preparations from NSCLC patients by next generation sequencing: toward a real-time liquid biopsy for treatment. *PLoS One*. 2014 Aug 19;9(8).

- 136.- Pailler E, Adam J, Barthélémy A, et al. Detection of circulating tumor cells harboring a unique ALK rearrangement in ALK-positive non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2013 Jun 20;31(18):2273-81
- 137.- Mazel M, Jacot W, Pantel K, et al. Frequent expression of PD-L1 on circulating breast cancer cells. *Mol Oncol*. 2015 Nov;9(9):1773-82
- 138.- Hodgkinson CL, Morrow CJ, Li Y, et al. Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer. *Nat Med* 2014;20:897–903.
- 139.- Sarioglu AF, Aceto N, Kojic N, et al. A microfluidic device for label-free, physical capture of circulating tumor cell clusters. *Nat Methods* 2015;12:685–91.
- 140.- Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009; 45(2):228-47)
- 141.- DeLong E R, DeLong D M, Clarke-Pearson D L. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 1988; 44: 837-45.
- 142.- Sackett DL, Rosenberg WM, Muir Gray JA, et al. Evidence based medicine: what it is and what it isn't. *Br Med J*, 1996; 312: 71-72
- 143.- Galen, R. S. y Gambino, S. R. (1975) *Beyond normality: the predictive value and efficiency of medical diagnoses*. New York: J Wiley and Sons, Inc.
- 144.- Jackman DM, Johnson BE. Small-cell lung cancer. *Lancet* 2005;366:1385–1396.
- 145.- Govindan R, Page N, Morgensztern D, et al. Changing epidemiology of small-cell lung cancer in the United States over the last 30 years: analysis of the surveillance, epidemiologic, and end results database. *J Clin Oncol* 2006;24:4539-4544.
- 145.- Cheng Y, Liu XQ , Fan Y, et al. Circulating tumor cell counts/change for outcome prediction in patients with extensive-stage small-cell lung cancer. *Future Oncol*. 2019; 12(6): 789 – 799
- 146.- SWOG. A Randomized Phase III Trial to Test the Strategy of Changing Therapy Versus Maintaining Therapy for Metastatic Breast Cancer Patients Who Have Elevated Circulating Tumor Cell Levels at First Follow-Up Assessment. In: *ClinicalTrials.gov* [Internet]. 2000 - [cited 2016 Aug]. Available from [http:// clinicaltrials.gov/ct2/show/ NCT00382018](http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00382018) NLM Identifier: NCT00382018
- 147.- Liu MC, Shields PG, Warren RD, et al. Circulating tumor cells: a useful predictor of treatment efficacy in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:5153–5159.
- 148.- Matsusaka S, Chìn K, Ogura M et al. Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining response to chemotherapy in patients with advanced gastric cancer. *Cancer Sci* 2010; 101: 1067–1071



Universidad de Alcalá
