



UNIVERSIDAD DE MURCIA

**ESCUELA INTERNACIONAL DE
DOCTORADO**

**Análisis del sistema hemostático en neoplasias
avanzadas**

D^a. Pilar de la Morena Barrio

2016



**UNIVERSIDAD
DE MURCIA**

DEPARTAMENTO
DE MEDICINA INTERNA
Facultad de Medicina

D. Javier Corral de la Calle y **D. Enrique González Billalabeitia**,
Profesores Doctores de la Universidad de Murcia del Área de Hematología en
el Departamento de Medicina Interna de la Universidad de Murcia,

CERTIFICAN:

Que la tesis Doctoral titulada **“Análisis del sistema hemostático en neoplasias avanzadas”**, realizada por D^a. **Pilar de la Morena Barrio** bajo su inmediata dirección y supervisión, se presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 26 de junio de 2016

Fdo: Dr. Javier Corral de la Calle

Fdo: Dr. Enrique González Billalabeitia

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que han colaborado en este trabajo y a las que me gustaría mencionar para mostrarles mi más sincero agradecimiento, ya que sin ellas no habría sido posible. A ellas quiero dedicar los resultados aquí presentados y reconocer tantas cosas que me han aportado, no solo a nivel académico y profesional sino también a nivel personal.

Al Dr. Vicente Vicente, por haberme dado la oportunidad de trabajar y aprender en su equipo, donde siempre he encontrado un lugar agradable y exigente, impulso constante para continuar mejorando día a día, para no frenarme ante las dificultades o el esfuerzo y enfrentarme a cosas nuevas. Con la mirada siempre puesta en los pacientes, que es lo que motiva todas las investigaciones.

Al Dr. Ayala, mi gran mentor, por la confianza que ha depositado en mí durante estos años, dándome la oportunidad de desarrollarme profesionalmente a su lado. De él, siempre alegre, entregado, incansable en el esfuerzo por mejorar, compañero atento a prestar ayuda a quien le necesite, he aprendido infinidad de cosas que no se pueden enumerar. Un jefe que siempre va por delante, impulsando a los de su equipo desde su exigencia personal. Quiero agradecerle de modo particular, haberme lanzado al mundo de la investigación y haberme dejado un tiempo para poder formarme en el laboratorio. Y, cómo no, sus siempre acertados consejos, durante los años de trabajo en esta tesis.

A Enrique, co-director de esta tesis y tutor de residentes. Con él hice mis primeros trabajos de investigación durante la residencia y con él, he podido realizar este trabajo. Le quiero agradecer el haberme transmitido la inquietud por la investigación, uno de los pilares básicos de la medicina, necesario para mantener el afán de hacer las cosas un poco mejor cada día y de comprender los mecanismos que subyacen las enfermedades para conseguir mejorar los tratamientos.

A Javier Corral, que fue quien me propuso iniciar este ambicioso trabajo. En primer lugar, quisiera agradecerle esta enriquecedora experiencia: trabajar en un grupo con gente de investigación básica y poder realizar discusiones integrando la ciencia básica y la clínica. En segundo lugar, quisiera agradecerle especialmente lo que transmite con su persona: honradez, entusiasmo, inquietud, ganas de pensar y de llegar más allá, tiene un modo de hacer que impulsa a los que tiene a su alrededor. De él he aprendido grandes cosas en estos años de trabajo, que más allá de los resultados que finalmente hayamos podido presentar, han sido ampliamente enriquecedores: la inquietud, la observación, la reflexión, el trabajo en equipo, la escucha atenta e interesada a los demás valorando sus aportaciones e ideas y creando nuevas líneas de trabajo.

A M^a. Eugenia, mi hermana. Con su elegante discreción ha sido una gran ayuda para mí en todo momento. Ha colaborado más de lo que piensa y quiero agradecerle especialmente sus sugerencias siempre oportunas, sus indicaciones acertadas, sus aportaciones en la genómica y en los trastornos de glicosilación, su paciencia para explicarme cualquier cosa. Siempre la he tenido al lado a cualquier hora. Ha sido una suerte haber podido compartir esta experiencia con ella.

A Antonia Miñano. La persona que siempre he encontrado dispuesta a cualquier cosa por ayudarme, siempre con una sonrisa y un ánimo envidiable. Muchas gracias por haber sido mi tutora y maestra durante el año que estuve en el laboratorio. Gracias por su paciencia y dedicación al enseñarme todo lo básico de laboratorio y especialmente aquellas cosas que no están en los libros: la importancia del orden, de la metodología y de ser muy meticuloso en cada paso, la discreción y el trabajo en equipo. Para mí ha sido una gran maestra.

A Ginés, biólogo en esencia. También quiero dedicarle un agradecimiento especial, porque fue mi segundo maestro en el laboratorio. Durante ese año que estuvimos juntos me enseñó todo lo que pudo con gran paciencia y entusiasmo. Además de eso, es alguien que me ha hecho infinidad de favores, gracias a sus conocimientos como biólogo y sus conocimientos

informáticos. Siempre con la disposición abierta a quien pueda necesitar algo de él. Pedirle un favor era como hacerle uno.

De forma especial quisiera mostrar mi más sincero agradecimiento a mis compañeros de la Sección de Oncología. Todos ellos han participado en este estudio, reclutando pacientes, recogiendo datos clínicos, participando con sus sugerencias y siempre mostrando apoyo y aliento incondicional. Especialmente quisiera agradecer a Marta Zafra y a Elena Vicente, que fueron las que empezaron el proyecto. A Jose, el data manager, que ha tenido un papel fundamental en el almacenamiento de las muestras. A Alberto Martínez, el técnico de laboratorio, con quien pude contar en todo momento en las fases finales del estudio. Y como no, a Teresa, Macías, Alberto, Inma, M Ángeles, Maribel, Helena y Elisa. Este trabajo es el resultado del esfuerzo de cada uno.

A mis padres, referente para mí en todo y pilar fundamental. Quisiera agradecerles su incondicionalidad, su ejemplo, su disponibilidad, sus consejos y sus innumerables detalles. Es una suerte para mi, compartir profesión con ellos y haber tenido la oportunidad de trabajar en algunos momentos a su lado. He podido descubrir su servicio humilde, su entrega, su sabiduría, su justicia, su tenacidad y su compañerismo. He percibido en las personas que les conocen una gran admiración y cariño y para mí ha sido y es siempre, el mejor de los regalos que nunca agradeceré suficiente y el mejor de los ejemplos.

Por último, quisiera nombrar a los que han compartido conmigo todos los esfuerzos que han llevado esta tesis: mis amigos. Son innumerables las cosas que han hecho, entre ellas, facilitar que pudiera dedicar el tiempo necesario, mostrar siempre apoyo y ánimo, especialmente en los momentos más difíciles y derrochar paciencia conmigo en cada paso.

No podía terminar sin nombrar y agradecer a los pacientes que han participado en el estudio y a sus familias. Son, en definitiva, los que más motivan todos nuestros esfuerzos y a quienes van dirigidos. Ellos son de quienes más aprendo día a día en el desarrollo de mi profesión.

A mis hermanos

ABREVIATURAS

α1AT	Alfa-1-antitripsina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN circulante
ARNm	ARN mensajero
CATS	"The Viena Cancer and Thrombosis Study"
CEA	Antígeno carcinoembrionario
CEIC	Comité ético de investigación clínica
CMP	Carcinoma microcítico de pulmón
CNMP	Carcinoma no microcítico de pulmón
CTC	Células tumorales circulantes
DD	Dímero D
DTT	Ditiotretiol
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EPO	Eritropoyetina
ETE	Evento tromboembólico
FA	Fosfatasa alcalina
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FT	Factor tisular
FvW	Factor von Willebrand
Hb	Hemoglobina
HBPM	Heparina de bajo peso molecular
HTA	Hipertensión arterial

HPLC	High Performance Liquid Chromatography. Cromatografía líquida de alta presión
HNF	Heparina no fraccionada
HR	Hazard Ratio. Razón de riesgo
IC	Intervalo de confianza
IMC	Índice de masa corporal
LDH	Lactato deshidrogenasa
MLPA	Multiplex Ligation-depent Probe. Sonda dependiente de ligamiento múltiple
MMP	Metaloproteasas de matriz
MP	Micropartículas procoagulantes
NGS	Next generation sequencing. Secuenciación de última generación
NET	Neutrophil extracellular trap. Red extracelular de neutrófilos
NK	Natural killer. Asesino natural
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno
PAR	Protease-activated receptor. Receptor activado por proteasa
PBS	Tampón de fosfato salino
PCR	Polymerase chain reaction. Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Platelet-derived growth factor. Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PSA	Prostate specific antigen. Antígeno específico de próstata
PVDF	Polofluoruro de vinilideno

QT	Quimioterapia
RR	Riesgo relativo
SG	Supervivencia global
SLP	Supervivencia libre de progresión
T-AT	Complejos trombina-antitrombina
TBS	Tampón tris borato salino (hidroximetil aminometano)
TEP	Tromboembolismo pulmonar
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor. Inhibidor de factor tisular
TGF	Transforming growth factor. Factor de crecimiento transformante
TP	Tiempo de protrombina
TVP	Trombosis venosa profunda
TTPA	Tiempo de tromboplastina parcial activada
VEGF	Vascular endothelial growth factor. Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor. Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
WB	Western blot
WES	Whole exome sequencing. Secuenciación del exoma completo
WGS	Whole genome sequencing. Secuenciación del genoma completo

Índice

	Página
RESUMEN	21
ABSTRACT	23
INTRODUCCIÓN	27
1. El sistema Hemostático	29
2. Cáncer y trombosis	31
3. Epidemiología	31
4. Evento trombótico y pronóstico	33
5. Profilaxis y tratamiento de la trombosis en pacientes oncológicos	34
6. Efecto antitumoral de la heparina de bajo peso molecular y su papel en supervivencia	35
7. Factores de riesgo de trombosis y modelos pronósticos	38
8. Interacción entre sistema hemostático y cáncer	39
8. 1. Factor tisular y micropartículas	40
8. 2. Trombina y sus productos de degradación	41
8. 3. Plaquetas	43
9. Nuevos y viejos elementos hemostáticos con potencial relevancia en pacientes con cáncer	43
9. 1. Antitrombina	44
9. 2. Ruta de contacto	45
9. 3. Trastornos de glicosilación	46
9. 4. Ácidos nucleicos circulantes	47
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	51
PACIENTES Y MÉTODOS	55
1. Población de estudio	57
2. Extracción y preparación de las muestras	60
3. Análisis de los parámetros clásicos de la coagulación	60
4. Estudio de los nuevos elementos implicados en el sistema hemostático	

4. 1. Antitrombina plasmática	62
4. 1. 1. Análisis funcionales: sistema cromogénico	62
4. 1. 2. Western Blot	62
4. 2. Caracterización de la ruta de contacto	63
4. 3. Análisis de glicofomas de transferrina	64
4. 4. Cuantificación de la concentración de ADN circulante en plasma	65
5. Análisis genético	66
5. 1. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)	66
5. 2. Secuenciación	66
6. Análisis estadístico	68
RESULTADOS	69
1. Descripción de la serie clínica	71
1. a. Serie global	72
1. b. Descripción clínica de cada cohorte de pacientes	72
2. Descripción de los análisis de laboratorio realizados	79
2. 1. Hemograma	80
2. 2. Estudios clásicos de la coagulación	82
2. 2. a. En la serie global	82
2. 2. b. Diferencias entre los distintos tumores	82
2. 2. c. Descripción en cada cohorte de pacientes	83
2. 3. Nuevos elementos implicados en el sistema hemostático	85
2. 3. 1. Antitrombina	86
2. 3. 2. Ruta de contacto	95
2. 3. 3. Trastornos de glicosilación	96
2. 3. 4. ADN circulante	98
2. 4. Resumen de las principales alteraciones observadas en cada cohorte	105

3. Análisis de los eventos trombóticos	107
3. 1. Descripción de los eventos trombóticos	108
3. 2. Relación entre los factores clínicos y la trombosis	109
3. 3. Relación entre las alteraciones de laboratorio y los eventos trombóticos	113
3. 3. 1. Hemograma	113
3. 3. 2. Parámetros clásicos de la coagulación	115
3. 3. 3. Antitrombina	117
3. 3. 4. Ruta de contacto	118
3. 3. 5. Trastornos de glicosilación	119
3. 3. 6. Relación de la concentración de ADN circulante con la trombosis	119
3. 4. Relación entre el desarrollo del evento trombótico y la evolución tumoral	120
4. Efecto de la quimioterapia sobre el sistema hemostático en cáncer colorrectal	121
5. Correlación entre los parámetros estudiados del sistema hemostático y la evolución de la enfermedad	129
5. 1. Hemograma	130
5. 2. Parámetros clásicos de la coagulación	133
5. 3. Nuevos elementos del sistema hemostático: ADN circulante	
5. 3. 1. Valor pronóstico de la concentración de ADN circulante según el tipo de tumor	139
DISCUSIÓN	145
1. Hemograma y parámetros clásicos de la coagulación	149
1. 1. Factor von Willebrand	149
1. 2. Dímero D	150
2. Nuevos elementos del sistema hemostático	152
2. 1. Antitrombina	152

2. 2. Ruta de contacto	153
2. 3. Trastornos de glicosilación	154
2. 4. ADN circulante	154
3. Estudio de trombosis	155
3. 1. Eventos trombóticos y factores clínicos	155
3. 2. Trombosis y supervivencia	156
3. 3. Elementos del sistema hemostático y trombosis	156
4. Cáncer de próstata	158
5. Valor pronóstico del ADN circulante	160
CONCLUSIONES	169
BIBLIOGRAFÍA	173
ANEXO	187

RESUMEN

Introducción

La relación entre sistema hemostático y cáncer es bidireccional. Los pacientes con cáncer tienen 4-7 veces más riesgo de desarrollar trombosis, especialmente en estadios avanzados de la enfermedad porque los tratamientos, las comorbilidades y las propias células tumorales, especialmente ciertos tipos, provocan diferentes alteraciones en el sistema hemostático que generan un estado de hipercoagulabilidad. Por otra parte, diferentes elementos del sistema hemostático juegan un papel importante en el crecimiento tumoral, progresión y metastatización.

Hipótesis y objetivos

La hipótesis que generó este trabajo fue que las distintas neoplasias, por el tipo de tumor o por los tratamientos recibidos, podrían provocar una alteración diferencial del sistema hemostático que podría tener relación con el desarrollo de trombosis y con la progresión tumoral.

Por ello, el objetivo de nuestro estudio fue evaluar diferentes elementos del sistema hemostático en pacientes con 3 de las 4 neoplasias más frecuentes (cáncer de próstata, colorrectal y pulmón). Los objetivos específicos fueron:

1. Estudiar si existe una activación diferente del sistema hemostático en distintas neoplasias avanzadas.
2. Analizar la relación entre alteraciones del sistema hemostático y el desarrollo de eventos trombóticos en pacientes con cáncer.
3. Estudiar el efecto de la quimioterapia basada en fluoropirimidinas sobre el sistema hemostático en pacientes con cáncer colorrectal.
4. Estudiar el valor pronóstico de las principales alteraciones del sistema hemostático en pacientes con cáncer.

Material y métodos

Se incluyeron muestras basales de 157 pacientes consecutivos; 32 con cáncer de próstata resistente a castración; 43 con cáncer colorrectal y 82 con carcinoma de pulmón.

Se estudiaron: plaquetas y leucocitos; marcadores de muerte celular (lactato deshidrogenasa –LDH-); hipercoagulabilidad (Dímero D) y de daño endotelial (Factor von Willebrand –FvW-) y tiempos de coagulación (Tiempo de protrombina). Se analizaron la antitrombina y los dos elementos de la ruta de contacto (FXI y FXII) mediante métodos funcionales cromogénicos y/o western blot. Finalmente se estudiaron dos elementos recientemente implicados en trombosis: trastornos de glicosilación y ADN circulante (estudiados mediante electroforesis y HPLC; y por un método de cuantificación fluorescente, respectivamente). En casos excepcionales se realizaron estudios genéticos: secuenciación de genes (*SERPINC1* y *PMM2*) o detección de grandes deleciones mediante MLPA.

Resultados y Conclusiones

1. El sistema hemostático se encuentra afectado en pacientes con cáncer. Aunque hay elementos alterados comunes en las distintas neoplasias estudiadas, como son la elevación basal de LDH, DD y FvW, hay otros que varían entre ellas. En cáncer de próstata observamos una tendencia a una mayor activación de FXII que no se acompaña de activación de FXI. En cáncer colorrectal, se observó elevación de FvW y DD, sin activación de la ruta de contacto. En pacientes con CNMP, observamos una mayor incidencia de deficiencia de antitrombina que probablemente sea por consumo como lo sugiere la detección de complejos trombina-antitrombina.
2. La presencia de elevación del FvW en pacientes con cáncer de próstata se asocia con el desarrollo de eventos trombóticos en nuestra serie. No se ha encontrado relación entre el desarrollo de fenómenos trombóticos y otras alteraciones del sistema hemostático.
3. La quimioterapia basada en fluoropirimidinas no provoca alteraciones relevantes del sistema hemostático en pacientes con cáncer colorrectal.
4. Determinadas alteraciones del sistema hemostático, como el aumento de FvW, DD y ADN circulante, se asocian con peor pronóstico en las neoplasias estudiadas. La elevación de FvW se asocia a peor pronóstico en tres de los cuatro tumores estudiados: cáncer de próstata, cáncer colorrectal y CNMP. La

elevación de DD se asocia con peor pronóstico en cáncer de próstata. Finalmente, la presencia de concentraciones elevadas de ADN circulante se asocia con peor supervivencia en pacientes con cáncer de próstata y CNMP avanzado.

ABSTRACT

Introduction

There is a strong relationship between the hemostatic system and cancer. Patients with cancer have increased risk (4-7-fold) to develop thrombosis, particularly in advanced stages of the disease, because the treatments, the associated co-morbidities and the features of cancer cells can modify the hemostatic balance, triggering a prothrombotic state. But also the different hemostatic elements play a key role in tumor growth, tumor progression and metastasis.

Hypothesis and objectives

We propose that the disturbance of the hemostatic system may be different depending of the type of cancer. The type of tumor cell or the treatment used in each tumor may have distinct consequences on the hemostatic balance with potential and different consequences on the risk of thrombosis and the progression of the tumor.

Accordingly, the main objective of our study was to evaluate different elements of the haemostatic system in patients with three out of four more prevalent cancer (prostate, colorectal, and lung cancer). The specific objectives were:

1. To study a potential activation of the hemostatic system in different advanced tumors.
2. To analyse the relationship between changes in the hemostatic system and the development of thrombotic events in patients with cancer.
3. To evaluate the effect of chemotherapy based on fluoropyrimidines on the hemostatic system in patients with colorectal cancer.

4. To study the prognostic value of the main variations of the hemostatic system identified in patients with cancer.

Material and methods

Our study included basal samples of 157 consecutive patients with cancer: 32 with prostate cancer resistant to castration; 43 with colorectal cancer; and 82 with lung cancer.

These were the parameters analyzed: platelets and leukocytes; markers of cell death (Lactate dehydrogenase –LDH-); hypercoagulability (D Dimer) and vascular damage (von Willebrand Factor –vWF-). Clotting times (prothrombin time and activated partial thromboplastin time) were also evaluated. Additionally, antithrombin and two elements of the contact pathway of coagulation (FXI and FXII) were also evaluated by functional chromogenic methods and/or Western blot. Finally, two elements recently associated with thrombosis: disorders of glycosylation and circulating DNA, were also analyzed in this study by electrophoresis and HPLC and by a fluorogenic method, respectively. Exceptional cases required genetic analysis that included sequencing of genes (*SERPINC1* or *PMM2*) or detection of gross gene defects by MLPA.

Results and conclusions

1. The haemostatic system is altered in cancer patients. Several common alterations are observed, including high levels of LDH, D-dimers and von Willebrand Factor (vWF). However, several distinct alterations are observed: in prostate cancer we observe activation of Factor XII; in colo-rectal cancer no activation of the contact route is observed and in non-small cell lung cancer we observed lower levels of antithrombin factor probably caused by consumption, as these patients also had remarkable levels of thrombin-antithrombin complexes.
2. The presence of higher levels of vWF is associated with the development of thromboembolic events in prostate cancer. We did not observe other associations between thrombosis and alteration of the haemostatic system.

3. Fluoropyrimidine-based chemotherapy did not cause relevant disturbances on the hemostatic system in patients with colorectal cancer.
4. Some variations of the hemostatic system such as the increase of vWF, D dimer or circulating DNA, associated with a poor prognosis in cancer. Thus, increased levels of vWF associated with a poor prognosis in three out of four tumors evaluated in this study: prostate, colorectal and non microcytic lung cancer. Rise level of D dimer was also a marker of bad prognosis in prostate cancer. Finally, high values of circulating DNA associated with low survival in patients with prostate and non microcytic lung cancer.

Introducción

1. El sistema hemostático

Los organismos pluricelulares poseen un sistema capaz de responder de manera rápida, simple e inmediata a las lesiones del endotelio vascular para minimizar las consecuencias potencialmente letales de la hemorragia derivada: el sistema hemostático.¹ Este sistema está formado por elementos celulares: las plaquetas y el endotelio, y elementos plasmáticos que incluyen una serie de proteínas procoagulantes, anticoagulantes pro y anti-fibrinolíticas. El resultado final es un sistema hemostático que se orchestra como un delicado equilibrio, un fino balance entre los inhibidores plasmáticos y la actividad coagulante que queda restringida al lugar y momento necesario (cuando y donde se produce el daño endotelial). De hecho, los elementos anticoagulantes impiden una activación sistémica de la coagulación cuando se desencadena una activación local. Este delicado equilibrio es sin embargo sensible incluso a pequeñas alteraciones en cualquiera de sus elementos con consecuencias patológicas antagónicas como el síndrome hemorrágico o un estado de hipercoagulabilidad.

Cuando se produce el daño endotelial el factor tisular (FT) queda expuesto al torrente sanguíneo induciendo la activación en cadena de un conjunto de enzimas proteolíticas con actividad serín proteasa, que culmina con la formación de trombina. La trombina es la última serín proteasa procoagulante de la cascada de la coagulación, responsable de la formación del coágulo de fibrina a partir del fibrinógeno. Su función procoagulante también incluye la activación del factor XIII, que estabiliza las interacciones de la fibrina, haciéndola más resistente a la degradación, y actúa como principal agonista plaquetario. Por todo ello la trombina tiene un papel crucial en las reacciones procoagulantes y proagregantes. Este potente procoagulante necesita ser controlado en espacio y tiempo, ya que de otro modo, la generación incontrolada de trombina conduciría al desarrollo de eventos trombóticos. Una vez reparado el daño endotelial, el sistema fibrinolítico se encarga de disolver el coágulo de fibrina.

Finalmente, los inhibidores de proteasas son quizás los elementos de control del sistema hemostático. Entre estos elementos identificamos tanto anticoagulantes como antifibrinolíticos. Los elementos anticoagulantes más relevantes en el sistema hemostático son tres, y actúan en diferentes momentos de la cascada de coagulación, tanto en su inicio, como el inhibidor de factor tisular (TFPI), como especialmente inhibiendo a la trombina, con dos sistemas diferentes: la proteína C y la antitrombina (Figura 1). Dentro de los inhibidores de la fibrinólisis, destacamos al inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), otra serpina (inhibidor de serín proteasas) hemostática (Figura 1).

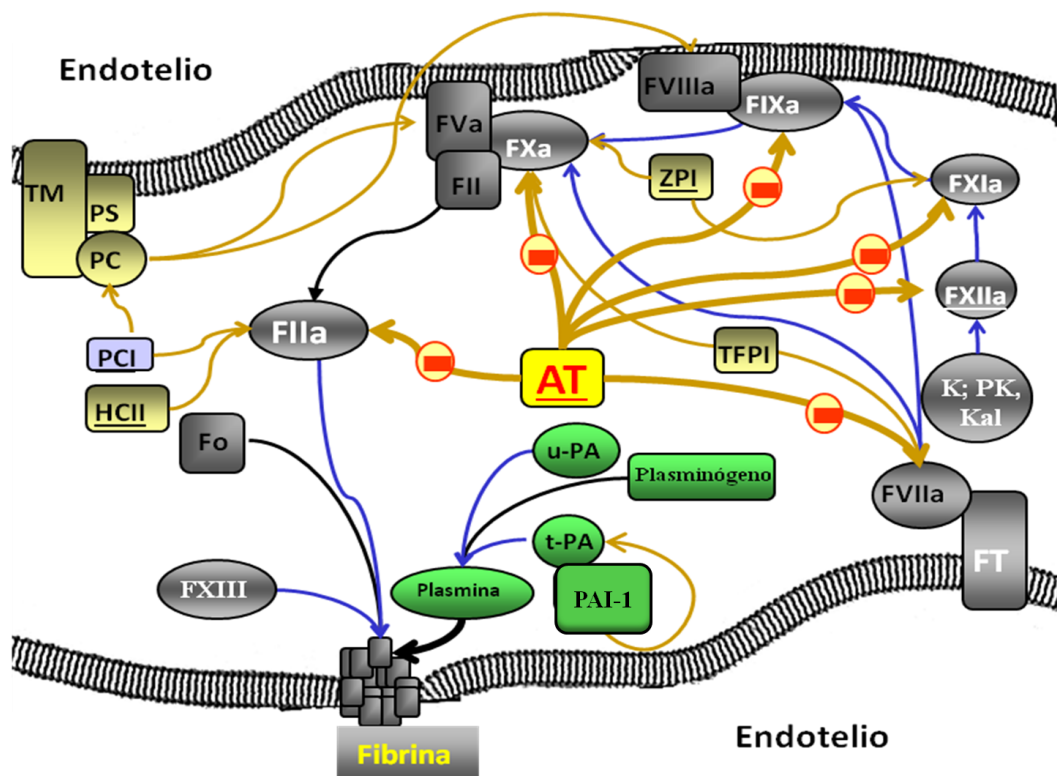


Figura 1. Cascada de la coagulación (gris) y fibrinólisis (verde) y moléculas anticoagulantes (amarillo). Las serpinas hemostáticas están subrayadas. TM: trombomodulina; PS: proteína S; PC: proteína C; PCI: inhibidor de la proteína C; HCII: cofactor II de heparina; Fo: fibrinógeno; ZPI: inhibidor de proteasa dependiente de proteína Z; TFPI: Inhibidor de la ruta del factor tisular; TF: factor tisular; K: kininógeno, PK: prekalikreina; uPA: activador del plasminógeno tipo uroquinasa; tPA: activador tisular del plasminógeno; PAI-I: inhibidor del activador del plasminógeno; AT: antitrombina.

2. Cáncer y trombosis

La observación clínica ha llevado a deducir que existe una estrecha relación entre el sistema hemostático y el cáncer. En 1865 A. Trousseau describió la presencia de neoplasias ocultas en una serie de individuos con trombosis.² El hecho de que la trombosis sea más frecuente en individuos con cáncer, que tener un evento trombotico empeore la supervivencia en estos pacientes, y que tratamientos anticoagulantes puedan aumentar la supervivencia en cáncer, indica que hay una estrecha relación entre el sistema hemostático y el cáncer. Las células tumorales (especialmente ciertos tipos) pueden provocar cambios significativos en múltiples moléculas del sistema hemostático, de manera que generan un estado de hipercoagulabilidad en el que mínimos factores estresantes pueden romper el equilibrio hemostático y generar tanto trombosis como hemorragias. Por otro lado, las moléculas que participan en el sistema hemostático, juegan también un papel importante en mecanismos de crecimiento tumoral, progresión y metastatización como veremos a continuación.

3. Epidemiología

La incidencia de eventos tromboticos en pacientes oncológicos oscila entre un 2% y un 20% según las series y tener un tumor supone un aumento del riesgo trombotico 4-7 veces mayor respecto a la población general.³⁻⁶ Los datos quizás más contundentes por incluir gran número de sujetos son los de Kristine Blix y colaboradores que en 2014 presentaron el resultado del seguimiento de 144950 individuos sin cáncer ni trombosis, durante una mediana de 11 años.⁷ En este estudio, el 19% de los eventos tromboembólicos (ETE) ocurrieron en pacientes con diagnóstico de cáncer, lo que supone una tasa de ETE de 8,7 por cada 1000 pacientes/año, Hazard Ratio (HR)= 4.8, IC 95%: 4.3-5.4. El 2% de los ETE ocurrían durante el primer año tras el diagnóstico de cáncer y los tumores con mayor incidencia de eventos fueron páncreas, pulmón y cáncer gástrico.

El riesgo de padecer un ETE varía en función del momento de la enfermedad. Es mayor en los 3 primeros meses tras el diagnóstico,

posteriormente hay un descenso en el que la incidencia disminuye con la respuesta al tratamiento y después, hacia el final de la enfermedad, de nuevo aumenta el riesgo que es mayor que al inicio (Figura 2).^{8,9}

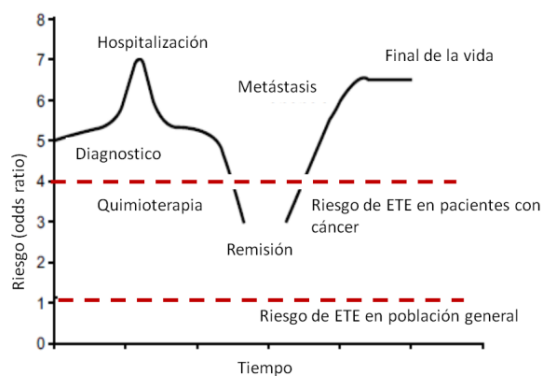


Figura 2. Cambios en el riesgo de presentar evento trombotico a lo largo de la enfermedad oncológica. Figura tomada de Khorana, Cancer 2007.⁹

El evento trombotico se ha asociado a estadios más avanzados de la enfermedad. En la serie Danesa, publicada en 2010, se observó una mayor tasa de eventos en pacientes estadio IV respecto a estadios más tempranos: estadio I (RR= 2.9, IC 95%: 1.5-5.5), estadio II (RR=2.9, IC 95%:2.4-3.5) estadio III (RR= 7.5, IC 95%: 6.0-9.4) y estadio IV (RR= 17, IC 95%: 12.6-23.3).¹⁰ En 2014, se presentaron los resultados preliminares del estudio STAC, con una cohorte prospectiva de 148044 pacientes con diagnóstico de cáncer, de los cuales 2444 presentaron un ETE (1,65%) antes o después del diagnóstico de cáncer, aunque la mayoría de los eventos ocurrieron después del diagnóstico.¹¹ En la Tabla 1 se muestra la incidencia de eventos tromboticos registrados en función del tipo de tumor. Esta tabla también muestra el riesgo asociado al estadio expresado en HR, en relación al estadio localizado. Los estadios más avanzados pueden aumentar el riesgo trombotico hasta 6,6 veces como ocurre en cáncer de recto con metástasis.

Tabla 1. Incidencia de eventos tromboticos registrados en el estudio STAC en relación con el tipo de tumor. El riesgo trombotico (expresado como HR) en relación al estadio localizado.

	Pulmón	Colon	Recto	Páncreas	Gástrico	Mama	Próstata	SNC	Vejiga
N	1384	1452	837	345	509	2430	2122	587	726
%ETE	6,6	4,7	2,8	7,5	4,1	3,2	3,6	5,1	4,8
Afectación ganglionar*	1,8	1,3	3,2	2,4	1,1	0,8	1,1	0,9	4,2
Estadio IV*	2,6	1,6	3	1,8	1,4	3,6	2,2	-	2
Metástasis de primario desconocido*	2,6	2,6	6,6	1,5	1,3	0,9	1,1	0,7	1,8

*Hazard Ratio de cada estadio comparado con estadio localizado

4. Evento trombotico y pronóstico

El evento trombotico es un factor de mal pronóstico independientemente del estadio tumoral y del tipo de cáncer y supone un deterioro en la calidad de vida del paciente.¹² La trombosis es la segunda causa de muerte en pacientes con cáncer junto con las infecciones y esto es especialmente relevante cuando el ETE ocurre durante el primer año desde el diagnóstico.^{12,13} De hecho, una serie publicada en 2005 presentaba unas frecuencias de muerte durante el primer año en pacientes que habían presentado un ETE entre el 25% y el 93,8% según el tipo de tumor.³ Además, a pesar de una correcta anticoagulación, la tasa de recurrencias de trombosis oscila entre el 7% y el 10,5%, 3 veces mayor que la observada en pacientes sin cáncer.¹⁴ Por todo ello y por la necesidad de tratamientos prolongados, a veces hospitalizaciones y retrasos del tratamiento quimioterápico, los ETE suponen un deterioro significativo de la calidad de vida del paciente oncológico.¹⁵

No obstante, se desconoce si el ETE es un factor pronóstico independiente o bien el reflejo de una mayor agresividad tumoral y es el propio tumor el que limita la esperanza de vida de los pacientes debido a la progresión tumoral.

5. Profilaxis y tratamiento de la trombosis en pacientes oncológicos

5. 1. Profilaxis

Los ETE se pueden prevenir gracias al tratamiento profiláctico primario anticoagulante. Este tratamiento no está exento de complicaciones hemorrágicas, especialmente en pacientes oncológicos, debido a que tienen un sistema hemostático altamente inestable. Dada la elevada incidencia y la morbimortalidad que supone el ETE así como las complicaciones de su profilaxis, se han elaborado modelos pronósticos para intentar clasificar a los pacientes según su riesgo trombótico y poder identificar aquellos que se beneficiarían del tratamiento profiláctico. Sin embargo, la incidencia de trombosis en cáncer es altamente heterogénea y las últimas guías clínicas solo indican la profilaxis antitrombótica en situaciones especiales como la hospitalización o la cirugía y en pacientes ambulatorios, sólo en casos seleccionados.¹⁶⁻¹⁸ De esta forma, las indicaciones de tratamiento profiláctico son:

1. En todos los pacientes hospitalizados siempre que no haya contraindicaciones (indicación 1B).
2. En todos los pacientes que van a ser intervenidos, siempre que no haya contraindicaciones. Se debe iniciar antes de la cirugía o lo antes posible tras ella (indicación 1A) y se debe mantener entre 7-10 días y cuando se trata de una cirugía mayor abdominal o pélvica, se debe considerar mantenerla hasta 4 semanas (indicación 1A).
3. En pacientes ambulatorios se debe considerar en aquellos de alto riesgo según el modelo de Khorana como los pacientes con cáncer de páncreas con una puntuación ≥ 3 . No está indicado, en general, en los pacientes en curso de tratamiento activo oncológico.

5. 2. Tratamiento

Una vez establecido el ETE sintomático o incidental, ya sea trombosis venosa profunda (TVP) o tromboembolismo pulmonar (TEP), se recomienda el uso de heparina de bajo peso molecular (HBPM) ajustado al peso en los

primeros 5-10 días (indicación 1A). La duración del tratamiento debe ser al menos 6 meses y se debe mantener de manera indefinida en pacientes de alto riesgo que son aquellos con tumor activo y en tratamiento quimioterápico.¹⁹⁻²¹

La tasa de retrombosis en pacientes anticoagulados es 7-10,5%. Los factores de riesgo descritos para desarrollar un nuevo evento son sexo femenino, tipo de tumor (el cáncer de pulmón es el que mayor riesgo de recurrencia presenta) y estadio (avanzado). En este contexto siempre se debe descartar la progresión tumoral. En caso de retrombosis se recomienda aumentar 20-25% la dosis, pasar a dosis cada 12 horas o cambiar de tipo de heparina, pero no hay evidencias suficientes para recomendar un tipo de actuación u otro.

6. Efecto antitumoral de la heparina de bajo peso molecular y su papel en supervivencia

Desde hace 20 años estudios *in vitro* y en modelos animales han descrito diversos mecanismos que demuestran que la HBPM tiene una actividad antitumoral independientemente de su función anticoagulante, por ello ha desplazado a las heparinas no fraccionadas (HNF) en el tratamiento profiláctico. Las HBPM son capaces de inhibir la angiogénesis mediante la reducción de la expresión de FT y la disminución del crecimiento endotelial inhibiendo el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y al factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), mecanismo que es dependiente del tipo de heparina.^{22,23} Por otro lado, la HBPM ejerce un efecto antiproliferativo en células endoteliales, epiteliales, fibroblastos y músculo liso vascular e induce la diferenciación y apoptosis celular. Finalmente, la HBPM impide o dificulta el mecanismo de metastatización porque reduce la capacidad de invasión de las células tumorales inhibiendo la acción de componentes de la matriz extracelular como las heparanasas e interfiriendo con la interacción de la célula tumoral con plaquetas, leucocitos y endotelio uniéndose a las selectinas P y L.²⁴

El papel de la HBPM en la prevención del evento trombótico no cabe duda y su actividad antitumoral *in vitro* tampoco. Ahora bien, el impacto que pueda tener la HBPM en la supervivencia todavía no está claro. Hay varios

estudios publicados con resultados dispares, mientras los resultados de algunos estudios aleatorizados y meta-análisis demuestran beneficios estadísticamente significativos para la HBPM en supervivencia, otros estudios no confirman dicho efecto.²⁵⁻²⁷ Las causas pueden ser varias: la disparidad en el diseño de los estudios, la heterogeneidad en las características de los pacientes en cuanto a tipo tumoral, estadio, tratamiento, y también en el tipo de tratamiento con heparina y la dosis administrada, además de la falta de datos de las complicaciones derivadas del uso de la heparina.

En 2014 se publicaron los resultados de un meta-análisis de la Cochrane en el que se analizaron 7013 pacientes de 13 estudios seleccionados.²⁸ En este trabajo se observó un discreto beneficio en supervivencia a un año en pacientes tratados con HBPM (RR= 0.97, IC 95%: 0.92-1.01). Entre los estudios más representativos con resultados positivos en cuanto a beneficio en supervivencia encontramos cuatro, realizados en pacientes con carcinoma microcítico de pulmón (CMP): el más antiguo publicado en 1994 por Lebeau y colaboradores con 277 pacientes,²⁹ refiere un beneficio en supervivencia a 1, 2 y 3 años en el grupo que recibió HBPM. El trabajo de Altinbas y colaboradores publicado en 2004,³⁰ incluía 84 pacientes con CMP en todos los estadios que fueron aleatorizados a recibir tratamiento con dalteparina durante 18 semanas. Este trabajo mostró un aumento significativo en la supervivencia de 13 meses frente a 8 meses. El estudio ABEL, en el que participó nuestro grupo, y publicado en 2013 por Lecumberri y colaboradores,³¹ incluyó 38 pacientes con CMP y enfermedad limitada que fueron aleatorizados a recibir bemiparina 3500 UI de manera concurrente con el tratamiento de quimio-radioterapia, frente a no tratamiento, durante 26 semanas. Este estudio observó un aumento en supervivencia global (HR= 2.96, IC 95%: 1.22-7.21; $p= 0.017$) y supervivencia libre de progresión (HR= 2.58, IC 95%: 1.15-5.8; $p= 0.022$) en el grupo con heparina, sin aumento de toxicidad. Finalmente, en 2014, el grupo de Altinbas publicó un estudio retrospectivo en el que se recogían 67 pacientes con CMP, tratados con quimioterapia en primera línea con cisplatino-etopósido y dalteparina.³² Compararon los resultados en supervivencia en función del tiempo de tratamiento con dalteparina: menos de 4 meses (grupo A), de 4 a 6 meses (grupo B) y más de 6 meses (grupo C). En los dos últimos grupos se

observó mayor supervivencia global frente a pacientes del grupo A de forma significativa ($p < 0,001$). Sin embargo este estudio tiene las limitaciones de ser retrospectivo y no tener una rama control con placebo, por lo tanto los resultados son solo orientativos.

Por el contrario, en los últimos meses se han publicado los resultados de un estudio con 2202 pacientes con cáncer de pulmón (incluyendo todas las histologías), la mayoría de ellos estadio III-IV, aleatorizado 1:1 a recibir dalteparina 5000 UI/24h vs no tratamiento. Este estudio no confirma un beneficio en supervivencia global y supervivencia libre de metástasis en pacientes tratados con dalteparina frente a no dar heparina.³³ Pero en el análisis por subgrupos, observamos una tendencia a beneficio en supervivencia en CMP con enfermedad limitada, que por otro lado están infrarrepresentados.

Lo que reflejan los resultados de los estudios mencionados, es que quizá la población que más se beneficie del tratamiento con HBPM es el grupo de pacientes con CMP y enfermedad limitada. Hay una revisión publicada en 2013, de los estudios realizados en pacientes con cáncer de pulmón que incluye 2185 pacientes, y que constata un beneficio en supervivencia a 1 y 2 años especialmente en el subgrupo de pacientes con CMP y enfermedad limitada.³⁴ Sin embargo, los estudios realizados con varios tipos de tumores en enfermedad avanzada, no han podido demostrar beneficio de la HBPM en supervivencia.^{35,36} Únicamente el análisis por subgrupos del estudio FAMOUS³⁷ y del estudio MALT,³⁸ demostraron un beneficio en aquellos pacientes de mejor pronóstico.

Están pendientes de publicar los resultados de un estudio con tinzaparina en pacientes con cáncer de pulmón en estadios precoces, donde podría ser que se observara algún beneficio como sugieren los resultados de otros estudios. Hasta la fecha, las guías clínicas no recomiendan el uso de heparina profiláctica en pacientes oncológicos.¹⁶

7. Factores de riesgo de trombosis y modelos pronósticos

Son muchos los mecanismos que están implicados en el desarrollo del evento trombotico relacionado con cáncer. Entre los factores de riesgo comunes a la población general destaca la edad y la obesidad, además de la hospitalización y el encamamiento. De los factores relacionados con el tumor destacan el tipo de tumor y el estadio ^{39,40} como se ha descrito en apartados anteriores y, además, pueden intervenir otros factores relacionados con el tratamiento: la cirugía, el tipo de quimioterapia y los tratamientos antiangiogénicos.^{4,5,9,41-44} Recogiendo todos estos factores conocidos, en 2008, el grupo de Khorana publicó un modelo pronóstico para pacientes que van a recibir tratamiento quimioterápico de forma ambulatoria.⁴⁴ Este modelo fue diseñado con los datos obtenidos en una serie que incluía 4066 pacientes ambulatorios que iban a iniciar tratamiento quimioterápico. En esta cohorte, se analizaron datos previos al inicio de la quimioterapia y se combinaron factores clínicos del paciente y del tumor con biomarcadores circulantes, con el objetivo de identificar pacientes ambulatorios con alto riesgo de trombosis asociado a quimioterapia. Con ello se elaboró un sistema de clasificación pronóstico de puntos con datos fácilmente accesibles en la práctica clínica habitual (Tabla 2).

Tabla 2. Modelo pronóstico de Khorana: riesgo trombotico en pacientes con cáncer que reciben tratamiento quimioterápico de forma ambulatoria.

Características del paciente	Puntuación
Localización del tumor:	
- Muy alto riesgo: gástrico, páncreas	2
- Alto riesgo: pulmón, linfoma, ginecológico, testicular, vejiga	1
Nº plaquetas preQT $\geq 350 \times 10^9/L$	1
Nivel Hb $\leq 10g/L$ o uso de EPO	1
Leucocitos preQT $> 11 \times 10^9/L$	1
IMC $\geq 35 \text{ kg/m}^2$	1

QT: Quimioterapia. Hb: Hemoglobina. EPO: Eritropoyetina. IMC: Índice de masa corporal.

De acuerdo con este modelo, los pacientes con cáncer se clasifican en bajo riesgo: 0 puntos; riesgo intermedio: 1-2 puntos y alto riesgo: 3 o más puntos. La incidencia de ETE en la serie de validación fue del 0,3%, 2% y 6,7% respectivamente en cada uno de los tres grupos definidos.

8. Interacción entre sistema hemostático y cáncer

La patogénesis de la trombosis en el contexto de la neoplasia es altamente compleja y se debe no solamente a los factores clínico-patológicos antes mencionados, sino fundamentalmente a las interacciones entre la célula tumoral, el sistema hemostático y el sistema inmune, que genera un estado de hipercoagulabilidad.⁴⁵ La célula tumoral tiene actividad procoagulante e interactúa con el sistema hemostático por diferentes mecanismos.⁴⁶ Ciertas células tumorales ejercen un efecto paracrino sobre el sistema hemostático y el sistema inmunitario: son capaces de liberar sustancias procoagulantes, fibrinolíticas y citocinas proinflamatorias, haciéndoles capaces de adherirse a las células del huésped y activar el sistema hemostático (Figura 3).^{45,47}

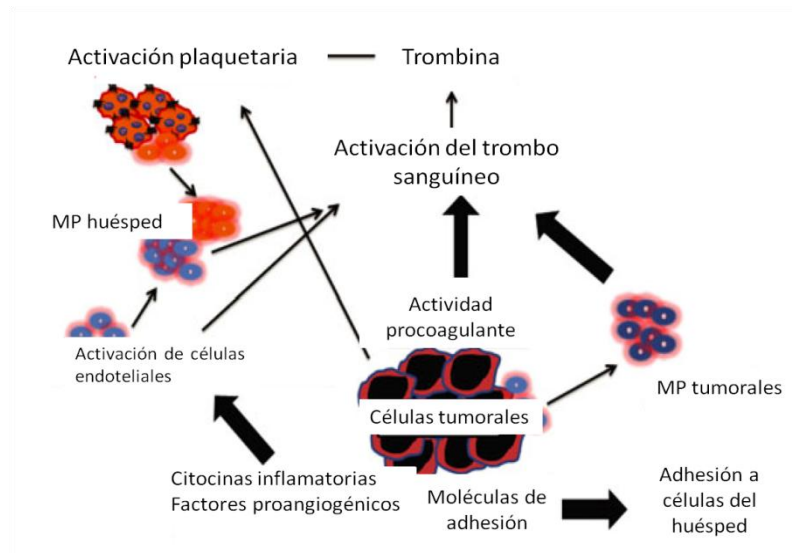


Figura 3. Efectos procoagulantes de las células tumorales. Las células tumorales activan el sistema hemostático de diferentes formas: pueden expresar factor tisular y generar micropartículas procoagulantes (MP) que pueden activar directamente la cascada de coagulación. Las células tumorales también pueden activar directa o indirectamente a células endoteliales y plaquetas, aumentando aún más la activación de la coagulación. Figura tomada de Falanga et al. 2013.⁴⁵

Paralelamente hay una respuesta inflamatoria del huésped al tumor y la mayoría de los mecanismos activados en este proceso, además de favorecer la trombosis, promueven el crecimiento tumoral y la metástasis, algunos de ellos de manera independiente al evento trombótico como ahora veremos.⁴⁸

8. 1. Factor tisular y micropartículas

El FT y las micropartículas procoagulantes (MP) circulantes, son los factores más conocidos y estudiados en pacientes con cáncer. La célula tumoral expresa FT en su membrana y libera e induce la liberación plaquetaria de micropartículas. Las micropartículas son vesículas de 0,1-1 μm cuya superficie está cargada negativamente y expresan FT, lo que les confiere alta capacidad de activar la coagulación.⁴⁹ A pesar de ello, el papel del FT y las MP en el fenómeno trombótico, en pacientes con cáncer, no está del todo claro a día de hoy pues los resultados de los estudios disponibles son contradictorios.

En el estudio "the Viena Cancer and Thrombosis Study" (CATS) se cuantificaron los niveles de MP en 728 pacientes. Aunque no se observó asociación con trombosis, los niveles fueron más elevados en pacientes con cáncer en relación al grupo control (sanos) y se asociaban a mayor mortalidad en pacientes con cáncer de páncreas y cáncer gástrico.⁵⁰

También se ha explorado el papel de las MP con expresión de FT en su superficie. Existen estudios con resultados positivos para la asociación con trombosis, como el publicado por Tesselaar⁵¹ en pacientes con cáncer de páncreas y cáncer de mama, o el estudio de Manly y colaboradores.⁵² Sin embargo, otras series más amplias en mieloma múltiple no demostraron dicha asociación.⁵³ Esto hace pensar que, aunque las MP que expresen FT puedan activar la vía extrínseca, no son suficientemente relevantes *in vivo* porque son otros muchos los mecanismos que intervienen. La presencia de niveles elevados de FT en MP de pacientes con neoplasias más avanzadas e indiferenciadas y su asociación con peor supervivencia⁵⁴ y el estudio de las MP enriquecidas con propiedades protrombóticas y angiogénicas en el contexto de la neoplasia, sugieren que existe un papel de estos elementos hemostáticos en el crecimiento tumoral así como en los procesos de invasión y metastatización como ahora veremos.⁴⁵

Las MP facilitan la progresión tumoral por diferentes mecanismos jugando un papel esencial en la promoción del crecimiento tumoral y la diseminación metastásica.⁵⁵ Esta función la ejercen fundamentalmente

mediante la transferencia entre las células de microARN, ARNm, ADN genómico, retrotransposones (capaces de promover inestabilidad genómica e inducir la tumorigénesis⁵⁶), proteínas y componentes lipídicos. La transmisión de ácidos nucleicos les hace capaces de promover la resistencia a tratamientos al transferir genes de resistencia a fármacos de células multirresistentes a células sensibles. Las MP también intervienen en el proceso de metastatización, fundamentalmente de dos maneras: mediante la activación de metaloproteinasas y la transferencia de enzimas proteolíticas entre las células tumorales, e interactuando con el estroma tumoral, fundamentalmente los fibroblastos.

Además de esto las MP tienen otras propiedades: participan en la evasión del sistema inmune, bloqueando las fases iniciales de la respuesta del sistema inmune al tumor por diferentes mecanismos.⁵⁷ Promueven la angiogénesis tumoral y la actividad de las células endoteliales mediante la alteración de la expresión de factores angiogénicos como VEGF y VEGFR, CD147, FGF-2 u otros mediadores de la angiogénesis.⁵⁸⁻⁶⁰ Y por último, algunas MP expresan FT con lo que contribuyen a la modulación proangiogénica de células tumorales.⁶¹

El FT es el principal protagonista en la activación de la coagulación y hay estudios que han demostrado que niveles elevados se asocian a mayor número de eventos trombóticos en pacientes con cáncer.⁶² El FT es responsable de la formación de trombina y del depósito de fibrina en el microambiente tumoral, lo cual favorece la interacción entre la célula tumoral y las células del huésped en el proceso de metastatización.⁶³⁻⁶⁵ También activa el crecimiento de las células tumorales y la presencia de FT aumenta la expresión de sus receptores (VIIa, PAR1 y PAR2) mediante un mecanismo de inducción de la transcripción.⁶⁶ La unión de FT al factor VIIa activa PAR2 de las células tumorales, induciendo la progresión, supervivencia y angiogénesis tumoral.⁶⁴

8. 2. Trombina y sus productos de degradación

La activación de la coagulación, en particular la formación de trombina, está implicada en el proceso de invasividad, crecimiento y diseminación

metastásica. La trombina es la enzima central en la cascada de la coagulación que cataliza el paso de fibrinógeno a fibrina. La interacción de fibrina, plaquetas y células tumorales lleva a la formación de agregados que promueven la adhesión endotelial y la diseminación metastásica así como el crecimiento tumoral y la supervivencia de la célula tumoral.⁶⁷ La trombina se une al receptor PAR desencadenando un aumento en la expresión de factores de crecimiento como VEGF, angiopoetina-1 y 2, metaloproteinasas de matriz 1 y 2 (MMP-1 y MMP-2) en las células endoteliales, de este modo activa la angiogénesis tumoral. Además estimula la adhesión tumoral, el crecimiento, la síntesis de ADN y la proliferación celular.⁶⁸

Dímero D

El dímero D (DD) es un biomarcador que refleja la activación de la hemostasia y la fibrinólisis. Niveles altos de DD se han asociado a mayor riesgo de recurrencia trombótica y a peor pronóstico en algunas neoplasias.⁶⁹⁻⁷¹ Aunque hay algunas series donde también se observó la asociación de niveles altos de DD con la presencia de eventos trombóticos, su valor clínico no está del todo claro.^{43,72,73} Nuestro grupo presentó un trabajo en ASCO 2009 que incluía 84 pacientes ambulatorios con cáncer de mama, colon y genitourinario, el 66% con enfermedad avanzada y el 34% localizada. Nuestro estudio sugería que el DD elevado podría asociarse con aumento de eventos trombóticos (HR= 6.3, IC 95%:1.3-29.3; $p= 0.047$).⁷⁴

El grupo de Cihan y colaboradores, incorporaron los niveles elevados de DD junto con niveles elevados de selectina P al modelo pronóstico de Khorana en la serie de validación prospectiva del estudio CATS.⁴³ De este modo se mejoró el modelo previo llegando a alcanzar una sensibilidad del 96% para identificar pacientes de bajo riesgo y del 98% para identificar los de alto riesgo, con un valor predictivo negativo (VPN) entre el 94% y 99%.⁴³ Dos años después se publicaron los resultados de supervivencia, observando que niveles basales altos de DD se asociaban con peor supervivencia global y con aumento del riesgo de mortalidad, independientemente del tipo de cáncer, edad, sexo y presencia o no de evento trombótico.⁶⁹ Además, los niveles eran

mayores en pacientes con presencia de metástasis a distancia al diagnóstico. Hay otros trabajos que apoyan esta observación, por ejemplo en una serie de pacientes con cáncer de mama, los niveles de DD se correlacionaban con estadio tumoral, afectación ganglionar y presencia de invasión linfovascular.^{75,76} Esta observación es de particular interés ya que refleja que la activación de la coagulación y la fibrinólisis es un dato más de agresividad tumoral y mal pronóstico, independientemente de la trombosis.

8. 3. Plaquetas

Las plaquetas intervienen en el proceso de invasión y desarrollo de metástasis. La agregación plaquetaria alrededor de las células tumorales las protegen de la defensa del sistema inmune, especialmente de la lisis mediada por células NK, y facilitan su circulación por el torrente sanguíneo y la adhesión a los lugares donde asientan las metástasis. Por otro lado, las plaquetas secretan factores como TGF β , PDGF, VEGF y angiopoyetina, que activan a la célula tumoral para la metastatización y, mediante contacto directo con la célula tumoral, inducen la expresión de genes mediadores de la transformación epitelio-mesénquima, promoviendo la extravasación y la metastatización.⁶⁷

9. Nuevos y viejos elementos hemostáticos con potencial relevancia en pacientes con cáncer

La mayoría de los estudios que han abordado la relación entre sistema hemostático y cáncer se centran en mecanismos protrombóticos inducidos por la célula tumoral y se restringen al análisis de uno o como mucho dos elementos del sistema hemostático. Son pocos los trabajos que han realizado un estudio más completo del sistema hemostático, y más escasos los que han estudiado nuevos elementos como los ácidos nucleicos circulantes, cuyo papel en el sistema hemostático está cobrando creciente peso.⁷⁷⁻⁷⁹

No podemos olvidar que el sistema hemostático incluye una serie de elementos de control encargados de restringir la actividad procoagulante espacio y temporalmente a la zona donde se produzca el daño y en el momento en que se produce el daño endotelial. Los anticoagulantes naturales tienen como función evitar una trombosis descontrolada, espontánea y

generalizada en el torrente sanguíneo. Son por tanto responsables de mantener el sistema hemostático en equilibrio. Por ello, alteraciones incluso menores en los niveles o en la función de estas moléculas anticoagulantes incrementan significativamente el riesgo trombótico y podrían jugar un papel relevante en el contexto de pacientes con cáncer.

9. 1. Antitrombina

La antitrombina, el principal anticoagulante fisiológico, es un miembro de la superfamilia de inhibidores de serín proteasas (SERPINA), capaz de inhibir a la trombina, al factor Xa y a otras proteasas procoagulantes como el FVIIa, FIXa, FXIa y FXIIa, mediante un eficiente mecanismo que comparte con el resto de las serpinas. Por ello, la reducción, incluso moderada, de los niveles o de la actividad anticoagulante de la antitrombina aumenta significativamente el riesgo trombótico, y su deficiencia completa causa letalidad embrionaria.⁸⁰ De hecho, la deficiencia de antitrombina fue la primera trombofilia identificada en 1965.

La antitrombina se sintetiza en el hígado y alcanza unos valores plasmáticos de 150 mg/L. Además de los déficits congénitos causados por mutaciones en el gen *SERPINC1*, puede haber deficiencias adquiridas, generadas por diferentes factores: consumo (como el que se produce durante la coagulación intravascular diseminada) o deficiencias en la síntesis (como ocurre con algunos tratamientos quimioterápicos como L-Asparaginasa⁸¹ o en situaciones de malnutrición o enfermedad hepática). Por lo tanto en el paciente oncológico y especialmente en aquellos con enfermedad avanzada, hay más riesgo de que los niveles circulantes de antitrombina pudieran verse afectados y con ello, incrementarse el riesgo trombótico.

Además de su papel fundamental en la hemostasia como anticoagulante, se han descrito otras funciones para la antitrombina. Posee una importante actividad antiinflamatoria derivada no solo de la inhibición de FXa y trombina, sino porque desencadena la liberación de prostaciclina. Recientemente nuestro grupo ha sugerido una actividad antiapoptótica para la antitrombina.⁸² Los resultados obtenidos en varios estudios realizados en

diferentes tumores como cáncer de ovario,⁸³ cáncer de próstata⁸⁴ y cáncer de pulmón,⁸⁵ en los que se observa que niveles bajos de antitrombina y niveles altos de DD se asocian a peor pronóstico de supervivencia, hace pensar que la antitrombina juega algún papel en cáncer. Por un lado, es posible que tenga actividad antiangiogénica en tumores^{86,87} y por otro, podría inhibir la invasión tumoral por su capacidad de inhibir proteasas como la tripsina o la calicreína. Por lo tanto, el hecho de que niveles bajos de antitrombina se asocien a peor pronóstico, podría ser debido a que su ausencia favorezca procesos como carcinogénesis, crecimiento y progresión tumoral. Sin embargo, no hemos encontrado estudios que hayan evaluado el efecto del tumor en este anticoagulante. Tampoco conocemos cual es la relevancia clínica de la deficiencia de antitrombina en este grupo de pacientes o si los tratamientos oncológicos utilizados en neoplasias sólidas pueden alterarla de alguna manera.

9. 2. Ruta de contacto

La cascada de la coagulación está dividida en vía extrínseca, intrínseca y vía común. La presencia de FT en plasma induce la activación de la vía extrínseca. El FT forma un complejo con el factor VII al que activa y desencadena la activación a su vez del factor X y XI. La vía intrínseca está formada por tres proteasas, FXIIa, FXIa y FIXa y un cofactor, el FVIIIa. De manera fisiológica, la ruta intrínseca se activa por ácidos nucleicos, heparina y polifosfatos plaquetarios y juega un papel en la degradación de la fibrina, acción que realiza el FXI, así como en la densidad del coágulo de fibrina, ya que el FXII aumenta su densidad (Figura 1). La vía común está formada por el FXa, FXIa, trombina y el FVa, que actúa como cofactor y es responsable de la amplificación de la generación de trombina. Por ello, las proteasas de esta vía son las principales dianas de recientes tratamientos anticoagulantes.

In vitro, el FXII es activado por sustancias cargadas negativamente, sin embargo se desconoce el mecanismo exacto de activación *in vivo* (superficie de bacterias, etc.). Desde hace años se han descrito diferentes mecanismos y factores que provocan la activación del FXII. Fuchs y colaboradores presentaron datos que apoyan que los ácidos nucleicos libres en plasma se

unen al FXI activando la vía intrínseca de la coagulación.^{77,88} Otros polímeros activadores del FXII y FXI son los polifosfatos.⁸⁸⁻⁹¹ Finalmente, la heparina también puede activar la ruta extrínseca.⁹¹

9. 3. Trastornos de glicosilación

Recientemente nuestro grupo ha descrito un nuevo mecanismo trombofílico relacionado con trastornos de la N-glicosilación mediante el estudio de pacientes con déficit de antitrombina, sin deleciones ni mutaciones en su gen codificante, *SERPINC1*. Se trata de un desorden de herencia autosómica recesiva ligado principalmente al gen *PMM2*, aunque puede afectar a otros genes implicados en la ruta de la N-glicosilación.^{92,93} También la combinación de alcoholismo o alteraciones de la función hepática con una sola mutación en un gen de N-glicosilación pueden provocar el mismo fenotipo y riesgo trombótico.⁹⁴

Resultados de nuestro grupo demuestran que un defecto en la N-glicosilación afecta a la antitrombina, provocando la aparición de formas hipoglicosiladas y una reducción global de este anticoagulante que incrementa el riesgo de eventos trombóticos. Estos resultados han despertado el interés en estudiar potenciales defectos de glicosilación en pacientes con cáncer, no solo porque puede suponer otra causa de deficiencias funcionales de antitrombina todavía no explorada en este contexto, sino porque la glicosilación participa en numerosos procesos biológicos de interacción celular que tienen lugar en la adhesión, crecimiento y señalización celular y podrían estar alterados en los procesos de progresión, invasión y metastatización.⁹⁵ Además, han sido descritas alteraciones de la glicosilación inducidas por el cáncer: aumento de N-glicanos, aumento de la densidad de O-glicanos y síntesis incompleta de glicanos.⁹⁶ De hecho, la modificación post-traducciona l quizás mejor conocida en el contexto del cáncer es precisamente la N-glicosilación. Esta modificación parece que juega un papel importante en la transición epitelio-mesénquima.^{97,98} Donde más se ha estudiado y detectado alteraciones de glicosilación es en tumores del tracto gastrointestinal, especialmente en cáncer de colon.^{95,99-101}

9. 4. Ácidos nucleicos circulantes

En los últimos años ha cobrado particular interés el estudio de la relación entre inmunidad y cáncer. El tumor desarrolla mecanismos de evasión del sistema inmune y éste, a su vez, es crucial en la defensa del organismo frente al tumor. En los últimos años, se han aprobado fármacos que estimulan el sistema inmune y revierten la evasión inducida por el tumor con resultados espectaculares en tasas de respuesta, tiempos largos de control de la enfermedad y aumento de supervivencia fundamentalmente en melanoma y cáncer de pulmón, y su aplicación está en estudio en otras neoplasias.¹⁰²⁻¹⁰⁴

En relación con el sistema hemostático y su posible asociación con complicaciones tromboembólicas destacamos los trabajos que demuestran que el tumor induce la activación de neutrófilos para la liberación de ácidos nucleicos al plasma, mediante un proceso llamado netosis.^{78,105} La implicación de los ácidos nucleicos en el sistema hemostático es fuente de reciente investigación. Los ácidos nucleicos circulantes tienen capacidad protrombótica debido a su carga negativa y suponen una nueva vía de activación del sistema hemostático que ha sido demostrada en modelos preclínicos pero que todavía ha sido poco explorada en series clínicas.^{77,78,105}

Los ácidos nucleicos circulantes activan la cascada de la coagulación mediante la unión al factor XII. La activación del FXII inicia la ruta de contacto de la coagulación que culmina con la formación de fibrina.¹⁰⁶ Por otro lado, las histonas, proteínas nucleares que van acopladas al material genético liberado, activan las plaquetas e inducen su agregación, dando estabilidad al trombo plaquetario.⁷⁹ Los trabajos publicados hasta la fecha deducen que los ácidos nucleicos libres en plasma están implicados en la trombosis pero no son suficientes *per se* para inducir un evento trombótico, sino que necesitan otros factores concurrentes.⁷⁸

El ADN libre en plasma puede ser liberado en diferentes situaciones aparte de la netosis. Estudios en el contexto de ejercicio físico, traumatismo, infarto o cirugía han demostrado que la concentración de ADN circulante (ADNc) aumenta de manera importante con el daño celular y la necrosis. En el

contexto de la neoplasia, se cree que las células tumorales pueden liberar su ADN intranuclear mediante secreción al plasma o bien mediante apoptosis y necrosis celular, motivo por el cual las cadenas de ADN aisladas en plasma son fragmentos cortos.¹⁰⁷ El ADNc tumoral supone menos del 1% de la fracción del ADNc en plasma, pero en pacientes con estadios avanzados y con alta carga tumoral, la concentración es suficientemente alta para poder detectar mutaciones somáticas del tumor. Además el desarrollo reciente de sistemas de secuenciación especialmente las técnicas de secuenciación de última generación (Next Generation Sequencing -NGS-) permiten la detección de mutaciones tumorales en el ADNc con mayor sensibilidad, lo que ha propiciado un aumento del número de investigaciones en este campo y con buenas expectativas para la aplicación clínica en los próximos años.

La identificación de las mutaciones adquiridas en tejido tumoral tras la resistencia a tratamientos ha hecho posible el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales eficaces. Pero la obtención de tejido tumoral mediante biopsias tiene varios problemas: por un lado es un procedimiento invasivo, no exento de complicaciones y morbilidad para el paciente, por otro lado el manejo de la muestra es complicado y extremadamente delicado para poder extraer cantidad suficiente de ADN para la detección de mutaciones. Además, los tumores a lo largo de la evolución de la enfermedad se van haciendo cada vez más heterogéneos, en cada masa tumoral y en cada localización metastásica dentro del mismo paciente, por lo tanto, la muestra obtenida de la biopsia puede dar una información parcial y de difícil interpretación. El análisis del ADNc tumoral permite detectar mutaciones en genes como *EGFR* o *KRAS*, reordenamientos como los de *EML4-ALK* y amplificaciones como las identificadas en *HER2* y *MET* con alta concordancia con respecto a las alteraciones detectadas en tejido sólido. Además, permite detectar mutaciones de resistencia a tratamientos, por todo ello, el análisis del ADNc tumoral podría llegar a sustituir a la biopsia sólida.¹⁰⁸

Por otro lado, parece ser que el ADNc se correlaciona con la carga tumoral pudiendo ser de utilidad como biomarcador pronóstico al igual que otros marcadores como el antígeno prostático específico (PSA), CA-125 o el antígeno carcinoembrionario (CEA), con la ventaja de ser más específico. Otra

ventaja que aporta el ADNc es su corta vida media plasmática, que permite ver la evolución tumoral prácticamente en tiempo real. Así, podría ser útil para monitorizar respuesta a tratamientos mejor que las pruebas de imagen y quizá sería especialmente útil en situaciones difíciles de interpretar como estabilizaciones de la enfermedad o respuestas disociadas. También se está probando su uso para la detección de enfermedad mínima residual, tras la cirugía, de manera que puede ayudar a la toma de decisiones en cuanto al tratamiento adyuvante. Hasta la fecha los datos que tenemos sobre el ADNc en este contexto proceden de ensayos clínicos en mama,¹⁰⁹ pulmón, colon y próstata.¹¹⁰ Se desconoce el valor pronóstico que pudiera tener la concentración de ADNc en plasma basal y si éste podría ser un buen marcador subrogado de la carga tumoral y ser de utilidad en la monitorización de la respuesta al tratamiento.¹¹¹⁻¹¹³

Con todo ello, son pocos y heterogéneos los estudios publicados hasta la fecha en cuanto a población de estudio y métodos de cuantificación, en los que se analiza el valor pronóstico de la concentración basal de ADNc.

Hipótesis y objetivos

HIPÓTESIS

La hipótesis que motivó el presente trabajo es que podría existir una activación diferencial del sistema hemostático en las distintas neoplasias, por el tipo de tumor o por los tratamientos recibidos. Dicha activación provocaría unas alteraciones hemostáticas, especialmente en las fases avanzadas de la enfermedad, que podrían tener relación con el desarrollo de trombosis y con la progresión tumoral.

OBJETIVOS

1. Estudiar si existe una activación diferente del sistema hemostático en distintas neoplasias avanzadas.
2. Analizar la relación entre la presencia de alteraciones del sistema hemostático y el desarrollo de eventos trombóticos en pacientes con cáncer.
3. Estudiar el efecto de la quimioterapia basada en fluoropirimidinas sobre el sistema hemostático en pacientes con cáncer colorrectal.
4. Estudiar el valor pronóstico de las principales alteraciones del sistema hemostático en pacientes con cáncer.

Pacientes y métodos

Consideraciones éticas

Este trabajo forma parte del estudio “Hemostasia y cáncer”. Este estudio se realizó cumpliendo la legislación española (Ley de Investigación Biomédica 14/2007), los requisitos éticos internacionales de investigación clínica (Declaración de Helsinki) y fue aprobado por el Comité ético de investigación clínica (CEIC) del Hospital Morales Meseguer. Todos los pacientes fueron debidamente informados y firmaron el consentimiento informado previo a su inclusión. Las muestras fueron guardadas inicialmente en el Servicio de Hematología y Oncología Médica y posteriormente depositadas en el nodo 3 del Biobanco en red de la Comunidad Autónoma de Murcia (Biobancmur-Nodo 3), que corresponde al nodo del Hospital Morales Meseguer.

1. Población de estudio

Se incluyeron de manera prospectiva pacientes con diagnóstico histológico de cáncer de próstata, colorrectal y pulmón, recogidos de manera consecutiva entre julio 2007 y marzo 2014, que eran remitidos al Servicio de Hematología y Oncología Médica del Hospital Morales Meseguer y Hospital Reina Sofía de Murcia. Los criterios de inclusión fueron: edad mayor de 18 años, diagnóstico histológico de cáncer de las patologías previamente establecidas: cáncer de próstata resistente a castración, cáncer de colon y recto y cáncer de pulmón de cualquier estadio y seguimiento en el Servicio de Hematología y Oncología Médica. Los criterios de exclusión fueron: edad menor de 18 años, seguimiento en otro centro, antecedentes de trombosis y estar recibiendo tratamiento anticoagulante en el momento de inclusión en el estudio.

En el estudio de glicosilación, se incluyeron pacientes PMM2-CDG y controles sanos para comparar los resultados del contenido de N-glicanos. Así mismo se utilizó una población control para niveles normales de antitrombina y de ADNc.

Fueron seleccionados 165 pacientes, de los cuales 6 estaban recibiendo tratamiento anticoagulante por fibrilación auricular y un paciente se trasladó a

otro centro para continuar seguimiento, por lo que fueron excluidos del estudio. Un paciente con cáncer de próstata remitido desde el Servicio de Urología por refractariedad hormonal sin estudio de extensión, finalmente era un estadio temprano y fue tratado de manera radical con radioterapia, sin progresión posterior, por lo que fue excluido para el estudio. Finalmente contamos con 157 pacientes, 82 con cáncer de pulmón, 43 con cáncer colorrectal y 32 con cáncer de próstata.

Se recogieron todos los datos demográficos y los datos clínico-patológicos relevantes por tipo de tumor de la historia clínica hospitalaria en papel e informática, del programa informático de Farmacia (Farmis) y de los datos de laboratorio del Hospital Morales Meseguer. En todos los pacientes se recogieron datos de supervivencia (progresión, muerte y causa de muerte y fecha de última visita), respuesta a tratamiento según criterios RECIST 1.1,¹¹⁴ presencia de evento trombótico, fecha y tipo de evento trombótico.

Se recogieron los siguientes datos:

1. Del paciente:

Estado funcional según clasificación ECOG (0: vida activa, sin restricción para las actividades de la vida diaria, 1: algún síntoma pero que no interfiere con las actividades de la vida diaria y puede realizar un trabajo, 2: ambulatorio y capaz de autocuidado, pero no capaz de realizar un trabajo, pasa en cama o sillón menos del 50% del día, 3: autocuidado limitado, pasa más del 50% del día en cama o sillón, 4: incapaz de autocuidado, encamado las 24 horas del día),¹¹⁵ sexo, datos antropométricos: peso, talla, índice de masa corporal (IMC); hábitos tóxicos: tabaco, alcohol (clasificado como ex-bebedor, bebedor leve, moderado y severo), factores de riesgo cardiovascular: hipertensión arterial (HTA), diabetes, dislipemia, cardiopatía isquémica y función hepática (transaminasas y bilirrubina) en el momento de la inclusión en el estudio.

2. De la enfermedad:

2. a. Datos generales: fecha de diagnóstico, histología, cirugía del tumor primario y fecha de cirugía, estadio según clasificación TNM, localización de las metástasis: pulmonar, hepática, extensión de la enfermedad hepática (lesión

única, afectación extensa cuando era mayor o igual al 70% del parénquima hepático afectado o bien afectación de 6 o más lóbulos o afectación no extensa en el resto de los casos) y ósea.

2. b. Datos específicos por patología:

- Cáncer de próstata: Gleason, PSA en el momento de inclusión en el estudio, fosfatasa alcalina (FA) en el momento de inclusión, la localización de la metástasis se clasificó como visceral (pulmonar o hepática) y ósea.¹¹⁶ Las metástasis óseas fueron clasificadas según alto riesgo: tener >4 metástasis óseas y al menos 1 de ellas fuera del esqueleto axial, o bajo riesgo en los demás casos.¹¹⁷ Posteriormente se clasificaron a los pacientes como enfermedad metastásica agresiva cuando tenían afectación visceral u ósea de alto riesgo y enfermedad metastásica poco agresiva, en el resto de los casos.
- Cáncer de pulmón: subtipo histológico (adenocarcinoma, epidermoide, microcítico, otros), mutación EGFR y reordenamiento EML4-ALK.¹¹⁸
- Cáncer de colon y recto: estatus mutacional KRAS, cirugía hepática de la metástasis y la fecha de la misma. Con el fin de poder observar los cambios inducidos por la quimioterapia en el sistema hemostático, y en particular para ver el papel de las fluoropirimidinas en los trastornos de glicosilación, se escogieron un grupo de pacientes con cáncer colorrectal a los que se cogió una muestra basal, previa al inicio de la quimioterapia y otra durante el tratamiento con una media de 12 semanas.

2. c. Datos de la enfermedad tromboembólica:

Evento trombótico, localización (trombosis venosa profunda, tromboembolismo de pulmón, otros) y fecha del evento.

Para el estudio de supervivencia se establecieron las siguientes variables:

- Tiempo de seguimiento: calculado como tiempo desde la fecha de inclusión hasta la fecha de última visita, en meses.
- Supervivencia global (SG): establecido como tiempo desde inclusión hasta fecha de última visita o muerte, en meses.

- Supervivencia libre de progresión (SLP): calculada como tiempo desde la fecha de inclusión hasta la fecha de progresión o muerte, en meses.
- Tiempo hasta el evento trombótico: calculado como tiempo entre la fecha de inclusión y fecha del evento.
- Supervivencia desde evento trombótico: tiempo entre la fecha del evento y fecha de última visita o fecha de muerte.

2. Extracción y preparación de las muestras

A todos los pacientes se les extrajo, mediante venopunción, dos tubos de EDTA, dos tubos de citrato y dos tubos de suero en el día 1 de quimioterapia previo a la administración de la misma. La muestra post-quimioterapia consistió en dos tubos de citrato y dos de suero. Una muestra de cada tipo fue enviado para estudio de hemograma, bioquímica y coagulación automatizadas en el laboratorio del Hospital General Universitario Morales Meseguer. El segundo tubo, el de EDTA, fue congelado a -80° hasta la posterior utilización. Los de citrato y suero se centrifugaron a 15.000 rpm durante 15 minutos y se obtuvieron tres alícuotas de citrato y dos de suero que posteriormente fueron congelados a -80°C hasta su utilización.

El ADN genómico fue purificado mediante el método "salting out" usando el kit Puregen Blood Core KitB (Quiagen) y siguiendo el protocolo especificado. El ADN obtenido se almacenó a -20°C .

3. Análisis de los parámetros clásicos de la coagulación

En el laboratorio de coagulación del Hospital General Universitario Morales Meseguer, se determinaron los siguientes parámetros en las muestras de los pacientes:

- a) La lactato deshidrogenasa (LDH), enzima citosólica que cataliza la reducción del piruvato por NADH. Se determina a partir de la velocidad de desaparición del NADH, medido a 340 nm. Es un parámetro de muerte celular.



- b) Recuento celular, se realizó en un contador automatizado (modelo dxh1600 de Becton Dickinson).
- c) El dímero D se determinó mediante la técnica de aglutinación por látex. Consiste en la utilización de micropartículas de látex recubiertas con anticuerpos monoclonales específicos para el DD, de manera que la aglutinación producida es directamente proporcional al DD presente en la muestra del paciente. El procedimiento, realizado en el servicio de hemostasia del Hospital General Universitario Morales Meseguer emplea un sistema comercial (0020008500, HemosIL®, Intrumentation Laboratory) y un analizador automático ACL TOP 700.
- d) El tiempo de protrombina (TP) (0020002950, HemosIL®, Intrumentation Laboratory) se determinó en un coagulómetro automatizado, ACL TOP 700, en el Hospital General Universitario Morales Meseguer.
- e) El estudio de fibrinógeno se realizó mediante el fibrinógeno derivado y en algunos casos mediante el método Claus. Para el fibrinógeno derivado se utilizó el sistema comercial RecombiPlasTin 2G (0020003050, HemosIL®, Intrumentation Laboratory), y se analizó mediante un coagulómetro automatizado ACL TOP 700, en el Hospital General Universitario Morales Meseguer. El fibrinógeno claus utilizando el sistema comercial Fibrinogen-C 002031100, HemosIL®, Intrumentation Laboratory.
- f) La actividad de FvW como cofactor de la ristocetina en plasma humano citratado se determinó de forma cuantitativa mediante inmunoensayo automatizado utilizando el sistema comercial Hemosil von Willebrand Factor Ristocetin Cofactor Activity (VWF:RCo, 0020300900, HemosIL®, Intrumentation Laboratory) y un analizador automático ACL TOP 700 del Hospital General Universitario Morales Meseguer.

En la siguiente tabla presentamos el número de pacientes a los que se realizó cada uno de los parámetros según el tipo de tumor y el estadio.

Tabla 3. Número de pacientes a los que se realizó cada una de las determinaciones de los parámetros clásicos de la coagulación atendiendo al tipo de tumor y al estadio.

	Próstata		CCR		CNMP			CMP		
	IV N=32	Todos N=43	II-III N=13	IV N=30	Todos N=65	II-III N=26	IV N=39	Todos N=17	II-III N=9	IV N=8
LDH	31	31	10	21	42	16	26	11	5	6
Fibrinógeno	30	37	10	27	60	24	36	17	9	8
DD	30	39	12	27	62	26	36	17	9	8
FvW	27	38	13	25	54	23	31	13	6	7
TP	19	24	6	22	13	2	9	1	4	1

4. Estudio de los nuevos elementos implicados en el sistema hemostático

4. 1. Antitrombina plasmática

4. 1. 1. Análisis funcionales: Sistema cromogénico

La actividad funcional de la antitrombina se determinó estudiando la inhibición del factor Xa mediante un sistema cromogénico en presencia de heparina siguiendo el protocolo descrito por nuestro grupo.¹¹⁹ La actividad residual de factor Xa se cuantificó midiendo la paranitroanilina liberada del sustrato cromogénico (S-2765) durante 10 minutos a 37 °C evaluando la densidad óptica a una longitud de onda de 405 nm. Los datos se expresaron en porcentaje respecto al resultado de un pool de plasma de referencia generado con 100 individuos sanos (100%). Si la técnica se realiza en unas condiciones de alta fuerza iónica (1.1 M NaCl), el ensayo evalúa exclusivamente la actividad de la glicofoma β de antitrombina.¹²⁰

Los experimentos se realizaron por triplicado para cada muestra.

4. 1. 2. Western Blot

Los niveles antigénicos, así como la presencia de diferentes formas de antitrombina se determinaron mediante western blot tras la separación electroforética en diferentes condiciones: 1) Nativas, en presencia o ausencia de urea (6M), o 2) en geles desnaturizantes con SDS, en presencia o

ausencia de agentes reductores (Ditiotreitol: DTT), siguiendo el protocolo desarrollado por nuestro grupo.¹²¹ Después de la transferencia a membranas de polivinilideno fluoruro (PVDF), se identificó la antitrombina mediante el uso de un anticuerpo policlonal de conejo anti-antitrombina humana (A-9522, Sigma). Para evitar la unión inespecífica se utilizó una solución de bloqueo en tampón de fosfato con sal (PBS) con Tween-20 (0,1%) suplementado con 5% de leche desnatada en polvo, incubando la membrana en esta solución toda la noche a 4°C. A continuación, la membrana se lavó tres veces durante 10 minutos con PBS para eliminar el anticuerpo no unido a la proteína y se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (A-0185, Sigma). Tras 3 nuevos lavados con PBS-Tween, se detectó la peroxidasa con un sistema de quimioluminiscencia (GE™ Healthcare Amersham™ ECL™) en un equipo ImageQuant LAS4000mini (Exon Biotec, GE Healthcare).

Además de la recta patrón, los experimentos se realizaron con un control de plasma de referencia generado con plasma de 100 controles sanos de la población.

4. 2. Caracterización de la ruta de contacto

Los niveles y características de los factores XI y XII en plasma se determinaron mediante SDS-PAGE en condiciones reducidas y western blot siguiendo el procedimiento indicado anteriormente. Si la membrana de PVDF había sido empleada anteriormente para estudiar por western blot otras proteínas, eliminamos los anticuerpos empleados anteriormente mediante un proceso de limpieza de anticuerpos unidos a membrana: incubando la membrana durante 1 hora con “stripping buffer” compuesto por NaCl (10 mM) y glicina (500 mM).

El anticuerpo anti-FXII es un anticuerpo monoclonal de ratón (Thermo Scientific) que detecta una molécula de 80 kDa en geles de SDS en condiciones reducidas.

El anticuerpo anti-FXI es policlonal generado en cabra (Enzyme Research Laboratories) y detecta una molécula de 160 kDa en geles de SDS

en condiciones no reducidas, correspondiente a dos moléculas de FXI unidas por puentes disulfuro formando un homodímero.

Como control positivo de activación de la ruta de contacto, incubamos un plasma control con cefalina o fosfatidiletanolamina, un fosfolípido de membrana, y kaolina, una superficie cargada negativamente que provoca la activación del FXII y la subsecuente activación del FXI.

El análisis densitométrico de las bandas se realizó con el programa Image J versión 1.44 (Way Rasband, NIH, USA).¹²² Los resultados del análisis densitométrico se muestran como porcentaje respecto a la media de densidad observada en los plasmas control de referencia.

4. 3. Análisis de glicoformas de transferrina

Dos pacientes, presentaron bandas anómalas de antitrombina en western blot, por lo que se realizó estudio de glicoformas de transferrina mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

La transferrina sérica se saturó completamente con hierro añadiendo a 100 µl de suero, 20 µl de 1.67 mM de Fe-NTA (Nitrilotriacetato Férrico), conocido compuesto donador de hierro. Cada molécula de transferrina es capaz de unir un máximo de dos iones de hierro, sin embargo, la transferrina se encuentra normalmente parcialmente saturada (30%). Las lipoproteínas séricas fueron precipitadas añadiendo 20 µl de dextrán sulfato-CaCl₂ (10% dextrán sulfato, 1 mM CaCl₂). Esta mezcla se incubó posteriormente a 4°C durante 30-60 minutos y fue centrifugada a 3.500 g a 4°C durante 5 minutos. Se recogieron 130 µl del sobrenadante, que fue concentrado a 3.500 g a 4°C con un filtro Microcon YM-10 (Millipore, Darmstadt, Alemania). La muestra concentrada se diluyó con 260 µl de agua y se transfirió a los viales de cristal del HPLC.

Se inyectaron 100 µl de las muestras tratadas de suero en el sistema HPLC (cromatógrafo líquido Agilent 1100 Series Liquid Chromatography, Agilent Technologies, Madrid, Spain), donde tuvo lugar la separación de las glicoformas de transferrina. Para ello se empleó la columna de intercambio aniónico SOURCE 15Q pe 4.6/100 (Amersham Biosciences) a 22 °C, mediante un gradiente lineal de sal a 1.0 mL/min de flujo. La composición de los

tampones empleados fue la siguiente: buffer A 10 mM Bis-Tris, ajustado a pH 7.0 con 2 M HCl; buffer B misma composición que el buffer A conteniendo 0.5 M NaCl, pH 6.2; y buffer C 10 mM Bis-Tris, pH 6.2. Tras la inyección de cada muestra, la columna se lavó y regeneró con 2.0 M NaCl (buffer D) y finalmente fue re-equilibrada con el buffer A. Por último, la cuantificación de las glicofomas de transferrina se obtuvo mediante la absorbancia selectiva de los complejos hierro-transferrina a 470 nm durante 40 minutos, referido como el área.¹²³

4. 4. Cuantificación de la concentración de ADN circulante en plasma

La concentración de ADNc en plasma se determinó mediante un método de cuantificación fluorescente que emplea Sytox (Invitrogen, S7020), un colorante de ácidos nucleicos de alta afinidad, siguiendo de forma general el protocolo indicado por SYTOX® Green Nucleid Acid Stain (S7020, Invitrogen), con variaciones desarrolladas en nuestro laboratorio. Ajustamos el volumen de plasma empleado (10 µL), la cantidad de Sytox (1 µM en tampón TBS) y la recta patrón, que se estableció con ADN de esperma de salmón (D1626, Sigma-Aldrich) con rango de concentraciones que oscila entre 4,8 y 2500 ng/mL. Además, el plasma se diluye en TBS, un buffer que no contiene fosfatos para obtener mejores resultados. La medida de fluorescencia se realizó a 485 nm (excitación) y 538 nm (emisión) empleando un fluorímetro (Synergy HT, BioTek) a 37°C.

En la siguiente tabla, representamos el número de pacientes en cada cohorte, a los que se realizó cada uno de los estudios.

Tabla 4. Número de pacientes a los que se realizó cada uno de los estudios de los nuevos elementos del sistema hemostático atendiendo al tipo de tumor y al estadio.

	Próstata		CCR		CNMP			CMP		
	IV N=32	Todos N=43	II-III N=13	IV N=30	Todos N=65	II-III N=26	IV N=39	Todos N=17	II-III N=9	IV N=8
Actividad antitrombina	32	43	13	30	65	26	39	17	9	8
Gel antitrombina	27	37	13	24	57	22	35	17	9	8
FXII	28	32	13	19	61	25	36	15	9	6
FXI	17	24	8	16	55	23	32	15	9	6
ADNc	32	43	13	30	65	26	39	17	9	8

5. Análisis genético

5. 1. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

Esta técnica permite detectar grandes alteraciones genéticas, deleciones o duplicaciones. En nuestro estudio se utilizó para detectar duplicaciones o deleciones del gen *SERPINC1* en dos pacientes con déficit de antitrombina (anti-FXa) mantenida a lo largo del tiempo en varias determinaciones. Para ello, empleamos el sistema comercial *SALSA*[®] *MLPA*[®] kit P227 SerpinC1 (MRC-Holland) en un secuenciador capilar (3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

5. 2. Secuenciación

La búsqueda de alteraciones genéticas en los genes *SERPINC1* y *PMM2*, que codifican para la antitrombina^{124,125} y la enzima fosfomutasa 2¹²⁶ implicada en los primeros pasos de la ruta de *N*-glicosilación⁹² se realizó secuenciando los productos de PCR generados con los oligonucleótidos indicados en las Tablas 5 y 6.

Tabla 5. Oligonucleótidos usados para amplificación del gen *SERPINC1* mediante PCR.

Amplificón	Nombre del Primer	Secuencia oligonucleótido (5'-3') (Tm°C)	Tamaño (pb)
Exon 1	AT1F	CTCTGGAACCTCTGCGAGA	197
	AT1B	GAAAGCTCACCCCTCTTAC (54)	
Exon 2	AT2F	TGCAGCCTAGCTTAACTTGGCA	500
	AT2R	GGTTGAGGAATCATTGGACTTG (54)	
Exon 3	AT3F	TGTGCTCACCACCCATGTTA	320
	AT3R	ATGCTGTTTCTCCACCTCCT (54)	
Exon 4	AT4F	AAGCCAATTGAATAGCACAGG	210
	AT4R	AAGGGGGTAAGCTGAAGAG (54)	
Exon 5	AT5F	TGTGTTCTTACTTTGTGATTCTCT	402
	AT5R	AAGGGAGGAAACTCCTTCCTAG (54)	
Exon 6	AT6F	TTCTCCCATCTCACAAAGAC	232

	AT6R	CCACAGGCCTGCTATAATACAG (59)	
Exon 7	AT7F	CTGTGGATGATTTACCTGCC	351
	AT7R	GCCCCAATAGCATGTTTCCCC (54)	

Tm: temperatura de melting; Pb: pares de bases

Tabla 6. Oligonucleótidos usados para amplificación del gen *PMM2* mediante PCR.

Amplicón	Nombre del Primer	Secuencia oligonucleótido (5´-3´) (Tm°C)	Tamaño (pb)
Exon 1	PMM2_Ex1F	CCTCCTCTTCCCGACGTGCC (62.5)	254
	PMM2_Ex1R	CTACCCTGGGTGGTCGATAGC (59.1)	
Exon 2	PMM2_Ex2F	GACTTATGTACTTGTGTTACCC (50.7)	266
	PMM2_Ex2R	CTTGGCAACAATATCCTCATAAG (51.6)	
Exon 3	PMM2_Ex3F	CTGGAGTTTAGCGGTTTTATTG (51.9)	261
	PMM2_Ex3R	CCTAGAGGCATTCATTGTG (53.4)	
Exon 4	PMM2_Ex4F	GCTCCTGCTAAATCAAGTAAC (51.2)	218
	PMM2_Ex4R	CCTATTTGGAGAATGCCAC (53.4)	
Exon 5	PMM2_Ex5F	GGAGAACTCTGTCACCCTT (54.1)	173
	PMM2_Ex5R	CATAAACCCAGCCATTCACC (53.9)	
Exon 6	PMM2_Ex6F	CCTACCTTTGTGGCCAGTAG (55.1)	208
	PMM2_Ex6R	CTCTGGGAAATGGGTATCCAAG (55.1)	
Exon 7	PMM2_Ex7F	CACCTTTTGCCTTTGTGTGC (55.5)	205
	PMM2_Ex7R	CCATCAAGCGCAAATGCAAC (55.9)	
Exon 8	PMM2_Ex8F	CCAGGGTCACATCAGCAATG (56.2)	260
	PMM2_Ex8R	TGAGCACGTGTGGGAGGACC (61.9)	

Tm: Temperatura de melting. Pb: pares de bases.

Los productos de PCR se purificaron y secuenciaron empleando el método Sanger (ABI Prism Big Dye Terminator v3.1) en un secuenciador

automático (3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Spain). Se comparó con la secuencia de referencia (ENSG00000117601) mediante el software SeqScape v2.5 (Applied Biosystems).

6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Statistical Package for Social Science (IBM SPSS Statistics for Windows, Versión 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.). Los valores de variables continuas se expresan como mediana y rango. Se consideró significancia estadística con $p < 0,05$. Se comprobó la distribución de las variables mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. En aquellas variables que seguían una distribución normal se utilizó la prueba T-Student para la comparación de medias y para las variables que no seguían una distribución normal se utilizó el método no paramétrico de Mann-Whitney. Se utilizó el método χ^2 para la comparación con variables cuantitativas discretas o cualitativas. Los estudios de correlación se realizaron mediante el test de Pearson o la Rho de Spearman según procediera. Los estudios de supervivencia se realizaron mediante el método de Kaplan-Meier. Se utilizó el método de regresión de Cox para comparar el efecto de las variables en la supervivencia.

Resultados

1. Descripción de la serie clínica

1. Descripción de la serie clínica

Se incluyeron 3 cohortes de pacientes con diagnóstico de cáncer de próstata metastásico (Cohorte A), cáncer colorrectal (Cohorte B) y cáncer de pulmón (Cohorte C), incluyendo una cohorte de carcinoma microcítico de pulmón (CMP) y otra de carcinoma no microcítico (CNMP). Las distintas cohortes se describen de manera independiente.

1. a. Serie global

En la Tabla 7 se describen las características clínicas generales y la evolución en cada cohorte de pacientes.

1. b. Descripción clínica de cada cohorte de pacientes

Cohorte A: Cáncer de próstata metastásico

Se seleccionaron 32 pacientes, con diagnóstico de adenocarcinoma de próstata metastásico que fueron remitidos al Servicio de Oncología según los criterios previamente establecidos. La mayoría de ellos eran resistentes a la castración (28 pacientes), únicamente 4 pacientes eran sensibles a deprivación androgénica. La mediana de meses desde el diagnóstico hasta que fueron remitidos al Servicio de Oncología fue de 32 (rango 0.7-177). Todos los pacientes, excepto uno, fueron incluidos en el estudio sin haber recibido tratamiento previamente en nuestro Servicio (considerando cualquier tipo de tratamiento como quimioterapia, abiraterona o bloqueo androgénico). La mediana de seguimiento fue de 13,5 meses (0.6-42.2), con una mediana de supervivencia global de 17,1 meses (IC 95%: 11.3-22.9). 23 pacientes (68,8%) fallecieron durante el seguimiento, 15 pacientes por progresión (65,2%), 2 por toxicidad (8,7%), 2 por causas desconocidas (8,7%) y 4 pacientes por causas diferentes a la enfermedad o al tratamiento (17,4%). No hubo muertes secundarias al evento trombótico. La mediana de supervivencia libre de progresión fue de 13,7 meses (IC 95%: 9.8-17.65). En la Tabla 8 se describen las características específicas de esta cohorte.

Tabla 7. Descripción de la serie clínica.

	Próstata N (%)	CCR N (%)	CNMP N (%)	CMP N (%)
N	32	43	65	17
Edad Mediana (rango)	71 (57-79)	66 (33-85)	65 (36-80)	63 (46-80)
Índice de masa corporal Mediana (rango)	31 (22-31)	27 (21-37)	27 (20-51)	26 (19-36)
Sexo				
Hombre	32 (100)	24 (55,8)	59 (90,8)	15 (88,2)
Mujer	0	19 (44,2)	6 (9,2)	2 (11,8)
ECOG				
<2	21 (65,6)	35 (81,4)	50 (76,9)	12 (70,6)
≥2	11 (34,3)	5 (11,6)	13 (20,0)	5 (29,4)
Desconocido	0	3 (7)	2 (3,1)	0 (0)
Alcohol				
Si	6 (18,8)	2 (4,6)	20 (30,8)	4 (23,5)
No	25 (78,1)	38 (88,4)	45 (69,2)	13 (76,5)
Desconocido	1 (3,1)	3 (7,0)	0	0
Tabaco				
Si	19 (59,4)	15 (34,9)	58 (89,2)	17 (100)
No	13 (40,6)	28 (65,1)	7 (10,8)	0 (0)
Dislipemia				
Si	11 (34,4)	11 (25,6)	24 (36,9)	7 (41,2)
No	21 (65,6)	32 (74,4)	41 (63,1)	10 (58,8)
Estadio				
II	0	6 (14)	6 (9,2)	3 (17,6)
III	0	7 (16,3)	20 (30,8)	6 (35,3)
IV	32 (100)	30 (69,8)	39 (60)	8 (47,1)
Evento trombótico				
Si	10 (31,2)	6 (14,0)	11 (16,9)	2 (11,8)
No	22 (68,8)	37 (86,0)	54 (83,1)	15 (88,2)
Tipo de evento trombótico				
TVP	6 (60,0)	3 (49,9)	3 (27,3)	1 (50,0)
TEP	2 (20,0)	1 (16,7)	7 (63,6)	1 (50,0)
Trombosis portal	1 (10,0)	1 (16,7)	1 (9,1)	0 (0)
Otros	1 (10,0)*	1(16,7)**	0	0
Respuesta				
Respuesta completa	1 (3,1)	13 (30,2)	2 (3,1)	0 (0)
Respuesta parcial	12 (37,5)	13 (30,2)	32 (50,0)	12 (70,6)
Enfermedad estable	7 (21,9)	10 (23,3)	14 (21,9)	1 (5,8)
Progresión	9 (28,1)	6 (14,0)	9 (14,1)	2 (11,8)
No evaluable	3 (9,4)	1 (2,3)	7 (10,9)	2 (11,8)
Progresión				
Si	27 (84,4)	27 (62,8)	45 (70,3)	12 (75,0)
No	5 (15,6)	16 (37,2)	19 (29,7)	4 (25,0)
Exitus				
Si	23 (71,9)	22 (51,2)	43 (66,2)	13 (76,5)
No	9 (28,1)	21 (48,8)	22 (33,8)	4 (23,5)
Causa de muerte				
Progresión	15 (65,2)	18 (81,8)	33 (76,7)	9 (69,2)
Toxicidad	2 (8,7)	2 (9,2)	0	0
Trombosis	0 (0)	0 (0)	2 (4,7)	0 (0)
Desconocido	2 (8,7)	1 (4,5)	4 (9,3)	2 (15,4)
Otros	4 (17,4)	1 (4,5)	4 (9,3)	2 (15,4)

*Trombosis esplénica; ** Trombosis arterial aguda miembro inferior

Tabla 8. Características específicas de la cohorte de cáncer de próstata metastásico.

	N (%)
N	32
Resistente a castración	
Si	43 (100)
No	0
Gleason	
<7	1 (3,1)
7	7 (21,9)
>7	20 (62,5)
Desconocido	4 (12,5)
PSA Mediana (rango)	78 (0,2-855)
Fosfatasa alcalina Mediana (rango)	276 (89-2135)
Metástasis hepáticas	
Si	2 (6,2)
No	30 (93,8)
Metástasis pulmonar	
Si	5 (15,6)
No	27 (84,4)
Metástasis óseas	
No	8 (25,0)
Si y bajo riesgo	13 (40,6)
Si y alto riesgo	11 (34,4)
Enfermedad de alto riesgo	
Si	14 (43,8)
No	18 (56,2)
Tratamiento	
Docetaxel	24 (75,0)
Abiraterona	3 (9,4)
Bloqueo androgénico	4 (12,5)
No tratamiento	1 (3,1)

Cohorte B: Cáncer colorrectal

En esta cohorte fueron seleccionados 43 pacientes según los criterios de inclusión previamente establecidos, de los cuales, 13 (30,2%) tenían enfermedad localizada y eran candidatos a tratamiento adyuvante y 30 (69,8%) tenían enfermedad metastásica (estadio IV). El tratamiento adyuvante de quimioterapia consistió en capecitabina, una fluoropirimidina oral, y oxaliplatino en pauta bisemanal o trisemanal según protocolo. En casos seleccionados se utilizó 5-fluorouracilo en infusión continua de 48 horas en lugar de capecitabina. El tratamiento para la enfermedad metastásica fue a elección del médico responsable, en general se utilizaron combinaciones de oxaliplatino, 5-fluorouracilo o capecitabina y CPT-11, asociado o no a algún anticuerpo monoclonal como cetuximab (anticuerpo monoclonal anti-EGFR) o bevacizumab (anticuerpo monoclonal anti-VEGFR con actividad

antiangiogénica). De los 30 pacientes metastásicos, 21 (70%) recibieron bevacizumab en combinación con quimioterapia. La mediana de seguimiento fue de 13,7 meses (rango 0,8-75,4).

Las características clínicas y patológicas se describen con detalle en la Tabla 7. De los pacientes con enfermedad metastásica es importante resaltar que el 70% fueron incluidos sin haber recibido ningún tratamiento previamente, antes de empezar la primera línea de quimioterapia, mientras que 9 pacientes (30%) habían recibido alguna línea de quimioterapia previa a la inclusión en el estudio: 5 pacientes (55,6%) habían recibido 1 línea previa, 3 pacientes (33,3%) habían recibido 2 líneas y un paciente había recibido 4 líneas de tratamiento. Por otro lado, puede ser relevante el hecho de que 7 pacientes fueron sometidos a cirugía de resección de metástasis hepáticas como se verá en la discusión.

Tabla 9. Características específicas de los pacientes con cáncer colorrectal.

	N (%)
N	43
Estatus mutacional KRAS	
Mutado	9 (20,9)
No mutado	9 (20,9)
Desconocido	25 (58,2)
Metástasis hepáticas	
Si	18(41,9)
No	25 (58,1)
Metástasis pulmonar	
Si	9 (20,9)
No	34 (79,1)
Extensión metástasis hepáticas	
Extensa (70% o ≥ 6 lóbulos)	10 (38,8)
No extensa	7 (55,6)
Desconocido	1 (5,6)
Tratamiento	
Fluoropirimidinas	12 (27,9)
Fluoropirimidinas + oxaliplatino	30 (69,8)
CPT11	1 (2,3)
Bevacizumab	
Si	21 (48,8)
No	22 (51,2)

La mediana de supervivencia libre de progresión fue de 18,3 meses (IC 95%: 13.2-23.3) y la mediana de supervivencia global de 21,1 meses (IC 95%: 11.4-30.7). De los 22 pacientes que fallecieron, 18 (81,8%) fue por progresión, 2

(9,2%) por toxicidad secundaria a quimioterapia, un paciente (4,5%) por otra causa y otro por causa desconocida (4,5%). No hubo muertes secundarias al evento trombótico. En la Tabla 9 se describe las características específicas de esta cohorte.

Cohorte C: Cáncer de pulmón

En la cohorte C, correspondiente a pacientes con diagnóstico histológico de cáncer de pulmón fueron seleccionados 82 pacientes, 17 (20,7%) con CMP y 65 (79,3%) con CNMP. Todos ellos fueron incluidos previamente al inicio del tratamiento quimioterápico. La mediana de seguimiento fue de 11,5 meses (rango 0,13-33,58). El análisis de resultados se realizó de manera independiente en los dos grupos, puesto que se consideran entidades clínicas diferentes. En la Tabla 7 se describen las características clínicas y en la Tabla 10 las características específicas de este grupo. Todos los pacientes recibieron la primera línea de tratamiento quimioterápico con un doblete de platino a elección del médico responsable y siguiendo el protocolo del Servicio. Fueron reevaluados tras 3 ciclos de tratamiento.

En este grupo, 6 pacientes eran estadio II, de los cuales 3, fueron tratados con cirugía del tumor primario e incluidos en el estudio previo al inicio de quimioterapia adyuvante. De los pacientes estadio III, dos fueron tratados con cirugía del tumor primario, uno recibió quimioterapia adyuvante y otro neoadyuvante. La mediana de supervivencia global fue de 13,6 meses (IC 95%: 9.6-17.6) y la supervivencia libre de progresión de 13,5 meses (IC 95%: 10.2-16.9).

En el grupo de pacientes con CMP, todos recibieron tratamiento de primera línea a criterio del médico responsable según el protocolo y las guías establecidas, con un doblete de platino asociado a otro fármaco: 14 pacientes con etopósido, uno con vinorelbina y dos con paclitaxel. La mediana de supervivencia global fue de 11,4 meses (IC 95%: 8.1-14.7) y la mediana de supervivencia libre de progresión fue de 9,1 meses (IC 95%: 6.3-11.8).

Tabla 10. Características específicas del grupo de pacientes con CNMP y CMP.

	CNMP N (%)	CMP N (%)
N	65	17
Perfil genético		
EGFR no mutado	15 (23,1)	NA
EGFR mutado	1 (1,5)	NA
Reordenamiento EML4-ALK	0 (0)	NA
Desconocido	49 (75,4)	NA
Histología		
Adenocarcinoma	32 (49,3)	NA
Epidermoide	24 (36,9)	NA
Otros (no microcítico)	9 (13,8)	NA
Microcítico	0 (0)	17 (100)
Cirugía del tumor primario		
Si	5 (7,7)	0 (0)
No	60 (92,3)	17 (100)
Tratamiento		
Platino-taxano	28 (43,1)	2 (11,8)
Platino-vinorelbina	20 (30,8)	1 (5,9)
Platino-gemcitabina	5 (7,7)	0 (0)
Platino-pemetrexed	10 (15,4)	0 (0)
Platino-etopósido	0 (0)	14 (82,3)
Anti-EGFR	1 (1,5)	NA
No tratamiento	1 (1,5)	0

NA: no aplicable

2. Descripción de los análisis de laboratorio realizados

2. Descripción de los análisis de laboratorio realizados

2. 1. Hemograma

2. 1. a. Serie global

Los elementos celulares del sistema hemostático en la serie global de pacientes estaban dentro del rango de la normalidad, incluso cuando diferenciamos por estadios (Tabla 11). No se observaron diferencias significativas en pacientes con enfermedad metastásica frente a pacientes en estadios II-III. En la Tabla 11 se describen los resultados.

Tabla 11. Hemograma basal en pacientes con cáncer en relación con los parámetros de referencia de laboratorio en la serie global de pacientes y diferencias en función del estadio (II-III vs IV).

	TODOS N=157 Mediana (rango)	ESTADIO II-III N=48 Mediana (rango)	ESTADIO IV N=109 Mediana (rango)	P*	Valores referencia
Hemoglobina (g/dL)	12,5 (8,6-17,6)	12,4 (9,0-16,0)	12,5 (8,6-17,6)	0,28	13-17,5
Leucocitos (x10 ³ /uL)	8,6 (1,1-190)	8,7 (4,3-101)	8,55 (1,1-190)	0,99	4,2-10,6x10 ³
Plaquetas (x10 ³ /uL)	256 (35,7-659)	258 (35,7-549)	254 (95-659)	0,72	140-400x10 ³

*La P indica la diferencia entre estadio II-III vs IV.

2. 1. b. Descripción en cada cohorte de pacientes

El estudio de cada cohorte en particular reveló que los pacientes con cáncer colorrectal tenían una mediana de hemoglobina basal por debajo de los niveles de referencia de laboratorio. Por otro lado, observamos que había diferencias significativas en los valores basales de leucocitos atendiendo al tipo de tumor, como podemos ver en la Tabla 12.

En el análisis por estadios (II-III vs IV) en cada cohorte de pacientes observamos los siguientes resultados: los pacientes con cáncer colorrectal estadio IV tenían leucocitos basales más elevados de forma significativa frente a los pacientes con enfermedad localizada (Tabla 13). Sin embargo, en las series de CNMP y CMP, no observamos diferencias (Tabla 14 y 15).

Tabla 12. Comparación de las tres series hematológicas en cada cohorte de pacientes.

	Próstata N=32 Mediana (rango)	CCR N=43 Mediana (rango)	CNMP N=65 Mediana (rango)	CMP N=17 Mediana (rango)	P	Valores ref.
Hemoglobina (g/dL)	12,7 (8,8-15,9)	11,9 (8,6-14,4)	13,0 (8,7-17,6)	12,7 (10-15)	0,06	13-17,5
Leucocitos (x10³/uL)	7,15 (3,2-1,76)	6,65 (3,1-16,7)	9,5 (1,1-190)	7,4 (4,6-110)	<0,01	4,2-10,6x10 ³
Plaquetas (x10³/uL)	217,5 (125-432)	275 (35,7-481)	260 (90-659)	264 (154-479)	0,12	140-400x10 ³

ref.: referencia; P (test Anova para la comparación de todos los grupos)

Tabla 13. Comparación de los valores de hemograma basal en pacientes con CCR estadio II-III frente estadio IV.

	ESTADIO II-III N=13		ESTADIO IV N=30		P	Valores referencia
	Mediana	Rango	Mediana	Rango		
Hemoglobina (g/dL)	12,2	10,6-14,0	11,4	8,6-14,4	0,09	13-17,5
Leucocitos (x10³/uL)	6100	4,6-10,3	8500	3,1-16,7	0,05	4,2-10,6x10 ³
Plaquetas (x10³/uL)	244	35,7-324	288	111-481	0,12	140-400x10 ³

Tabla 14. Comparación del hemograma basal en CNMP en estadio II-III vs IV.

	ESTADIO II-III N=26		ESTADIO IV N=39		P	Valores referencia
	Mediana	Rango	Mediana	Rango		
Hemoglobina (g/dL)	13,0	9,0-16,0	12,6	8,7-17,6	0,83	13-17,5
Leucocitos (x10³/uL)	9,3	4,3-10,1	9,8	1,1-190	0,39	4,2-10,6x10 ³
Plaquetas (x10³/uL)	260	90-549	260	95-659	0,40	140-400x10 ³

Tabla 15. Valores de hemograma basal en CMP en función del estadio.

	ESTADIO II-II N=9		ESTADIO IV N=8		P	Valores referencia
	Mediana	Rango	Mediana	Rango		
Hemoglobina (g/dL)	12,0	11,0-15,0	12,9	10-13,5	0,96	13-17,5
Leucocitos (x10³/uL)	9,6	4,9-14,8	7,35	4,6-110	0,67	4,2-10,6x10 ³
Plaquetas (x10³/uL)	284	183-479	238,5	154-421	0,34	140-400x10 ³

2. 2. Estudios clásicos de la coagulación

2. 2. a. En la serie global

En la Tabla 16 se describen los valores de la serie global con respecto a los valores de referencia. Se observó que los pacientes con cáncer tenían niveles más altos de LDH, DD y FvW frente a la población general. Además es interesante resaltar, que los niveles de DD y FvW se asociaban a la carga tumoral, siendo significativamente más elevados en enfermedad metastásica frente a enfermedad localizada (Tabla 17).

Tabla 16. Parámetros clásicos de la coagulación en pacientes con cáncer (serie global) en relación con los parámetros de referencia de laboratorio.

	N (N total=157)	Mediana	Rango	Valores referencia
LDH (UI/L)	115	414	216-3954	208-378
Fibrinógeno (g/L)	144	4,22	0,78-7,26	2-4
DD (mg/L)	148	0,307	0,008-9,79	0-0,278
FvW (%)	132	199,35	45,7-734,5	75-150
TP (seg)	57	23,8	9,1-41,7	

Tabla 17. Comparación de los parámetros clásicos de la coagulación en función del estadio tumoral.

	ESTADIO II-III N= 48		ESTADIO IV N=109		P
	N	Mediana (rango)	N	Mediana (rango)	
LDH (UI/L)	31	396,0 (222-822)	84	429,0 (216-3954)	0,11
Fibrinógeno (g/L)	43	4,6 (1,67-7,04)	101	4,2 (0,78-7,26)	0,13
DD (mg/L)	47	0,202 (0,037-9,359)	101	0,369 (0,008-9,790)	<0,01
FvW (%)	42	170,1 (70-277)	90	214,2 (45,7-734,5)	<0,01
TP (seg)	6	26,5 (17,3-41,7)	51	22,3 (9,1-32,8)	0,04

2. 2. b. Diferencias entre los distintos tumores

En la Tabla 18 se resumen las principales diferencias observadas entre las cohortes estudiadas. DD, FvW y TP estaban alterados en pacientes con cáncer de próstata y CCR frente a cáncer de pulmón de forma significativa. DD y FvW estaban más elevados y sin embargo el TP estaba más bajo ($p=0,08$; $p=0,03$ y $p=0,04$ respectivamente). Al hacer el análisis por separado de CNMP

y CMP, estas diferencias no se observaban para DD y había una tendencia en los niveles de FvW como se ve en la Tabla 18.

Tabla 18. Comparación de los parámetros clásicos de la coagulación entre las cuatro cohortes de pacientes.

	Próstata N=32 Mediana (rango)	CCR N=43 Mediana (rango)	CNMP N=65 Mediana (rango)	CMP N=17 Mediana (rango)	P*	Valores ref
LDH (UI/L)	432 (216-756)	366 (216-3918)	402 (222-3954)	618 (330-756)	0,10	208-378
Fibrinógeno (g/L)	4,1 (0,8-7,2)	4,0 (1,9-7,0)	4,7 (1,9-7,3)	4,6 (1,7-6,8)	0,22	2-4
DD (mg/L)	0,323 (0,008-2,677)	0,388 (0,074-9,790)	0,282 (0,019-9,359)	0,311 (0,053-1,309)	0,16	0-0,278
FvW (%)	231,0 (45,7-364)	210,7 (49,6-571)	187,3 (48,8-734,5)	191,4 (74-613,1)	0,08	75-150
TP (seg)	13,6 (9,1-28,4)	19,9 (10,2-32,2)	26,4 (10-41,7)	31,7	0,05	

ref: referencia; P* Anova

Seleccionando únicamente los pacientes con enfermedad metastásica, observamos que no había diferencias entre los distintos tumores (Tabla 19). En las cuatro cohortes se observó que los pacientes tenían LDH, DD y FvW más elevados con respecto a la población general.

Tabla 19. Comparación de los parámetros clásicos de la coagulación entre las cuatro cohortes de pacientes, seleccionando únicamente los pacientes con estadio IV.

	Próstata N=32 Mediana (rango)	CCR IV N=30 Mediana (rango)	CNMP IV N=39 Mediana (rango)	CMP IV N=8 Mediana (rango)	P*	Valores ref
LDH (UI/L)	432 (756-216)	462 (3918-216)	402 (3954-240)	636 (756-396)	0,24	208-378
Fibrinógeno (g/L)	4,08 (7,26-0,78)	3,96 (6,24-1,88)	4,67 (7,26-2,37)	4,26 (6,15-3,06)	0,60	2-4
DD (mg/L)	0,323 (2,677-0,008)	0,584 (9,79-0,180)	0,305 (3,592-0,019)	0,329 (1,309-0,122)	0,10	0-0,278
FvW (%)	231 (364-45,7)	234 (571-49,6)	194,5 (734,5-48,8)	195,9 (613,1-86,8)	0,39	75-150
TP (seg)	13,6 (28,4-9,1)	15,9 (32,2-10,2)	26,4 (32,8-10,0)	31,7 (31,7-31,7)	0,14	

ref: referencia; P* Anova

2. 2. c. Descripción en cada cohorte de pacientes

COHORTE A: Cáncer de próstata metastásico

En la cohorte de pacientes con cáncer de próstata metastásico, se observó que el DD, FvW y la LDH estaban elevados con respecto a la población general (Tabla 18). Observamos que DD y FvW se correlacionaban

con PSA de forma significativa ($R=0,61$; $p=0,001$ y $R=0,41$; $p=0,04$ respectivamente).

COHORTE B: Cáncer colorrectal

Como vemos en la Tabla 18, los pacientes con cáncer colorrectal presentaban DD y FvW elevados con respecto a la población general. Y es interesante observar que esto ocurría fundamentalmente en enfermedad metastásica cuando lo comparamos con estadios más tempranos (estadio II-III). Los pacientes estadio II-III estaban dentro del rango de la normalidad, mientras que aquellos con enfermedad diseminada, presentaban niveles basales más elevados de forma significativa (Tabla 20).

Tabla 20. Parámetros clásicos de la coagulación en la cohorte de CCR, comparando estadio II-III frente a estadio IV.

	ESTADIO II-III N=13		ESTADIO IV N=30		P	Valores referencia
	Mediana	Rango	Mediana	Rango		
LDH (UI/L)	345	264-600	462	216-3918	0,15	208-378
Fibrinógeno (g/L)	4,1	2,4-7,0	3,9	1,9-6,2	0,07	2-4
DD (mg/L)	0,222	0,074-2,704	0,587	0,180-9,790	<0,01	0-0,278
FvW (%)	159,7	70-277	234	49,6-571	0,02	75-150
TP (seg)	25,8	23,7-27,9	15,9	10,2-32,2	0,09	

COHORTE C: Cáncer de pulmón

En general, los pacientes con cáncer de pulmón, tenían niveles de LDH basales más elevados con respecto a la población general. Al comparar los grupos de cáncer de pulmón según su histología se observó que los pacientes con CMP tenían LDH más alta que los pacientes con CNMP de forma significativa ($p= 0,03$). No observamos diferencias significativas en función del estadio (Tabla 21 y 22).

Tabla 21. Descripción de los parámetros clásicos de la coagulación en pacientes con CNMP en todos los pacientes y comparación entre estadio II-III frente a estadio IV.

	TODOS N=65	Estadio II-III N=26	Estadio IV N=39		Valores referencia
	Mediana (rango)	Mediana (rango)	Mediana (rango)	P	
LDH (UI/L)	402 (222-3954)	396 (222-822)	402 (240-3954)	0,69	208-378
Fibrinógeno (g/L)	4,7 (1,9-7,2)	4,76 (1,95-6,81)	4,68 (2,37-7,26)	0,53	2-4
DD (mg/L)	0,282 (0,019-9,359)	0,198 (0,37-9,359)	0,305 (0,19-3,592)	0,12	0-0,278
FvW (%)	187,3 (48,8-734)	175,1 (71,7-227)	194,5 (48,8-734,5)	0,16	75-150
TP (seg)	26,4	26, (17,3-41,7)	26,4 (10,0-32,8)	0,49	

Tabla 22. Descripción de los parámetros clásicos de la coagulación en pacientes con CMP en todos los pacientes y comparación entre estadio II-III frente a estadio IV.

	Todos N=17	Estadio II-III N=9	Estadio IV N=8		Valores referencia
	Mediana (rango)	Mediana (rango)	Mediana (rango)	P	
LDH (UI/L)	618 (330-756)	462 (330-684)	636 (396-756)	0,43	208-378
Fibrinógeno (g/L)	4,6 (1,7-6,8)	4,56 (1,67-6,81)	4,26 (3,06-6,15)	0,85	2-4
DD (mg/L)	0,311 (0,053-1,309)	0,272 (0,053-0,730)	0,329 (0,122-1,309)	0,36	0-0,278
FvW (%)	191 (74-613)	158,75 (74,00-203,50)	195,90 (86,80-613,10)	0,19	75-150
TP (seg)	31,7	-	31,70 (31,70-31,70)	-	

2. 3. Nuevos elementos implicados en el sistema hemostático

En la Tabla 23 resumimos los resultados observados en cada cohorte de pacientes. Se observa una activación diferencial de la ruta de contacto y diferencias significativas en la concentración basal de ADNc en función del tipo de tumor. Por el contrario, cuando analizamos solo los pacientes estadio IV por separado, no encontramos diferencias en la concentración de ADNc que fueran significativas, siendo, en general, las concentraciones más elevadas (Tabla 24). En los apartados siguientes se comentará cada uno de los elementos estudiados con detalle.

Tabla 23. Descripción de los nuevos elementos implicados en el sistema hemostático en cada cohorte de pacientes.

	Próstata N=32	CCR N=43	CNMP N=65	CMP N=17	P
Antitrombina % Mediana (rango)	100,28 (78-111,6)	98,9 (38,6-112,1)	97,16 (3,1-114,1)	93,81 (74,8-106,2)	0,15
Déficit antitrombina N (%)*	2 (6,3)	4 (9,3)	11 (16,9)	2 (11,8)	0,43
Complejos T-AT N (%)**	0/27	0/37	6/57 (10,5)	0/17	<0,01
Ruta contacto FXIIa** FXIa	5/28 (17,9) 0/17	3/32 (9,4) 0/24	4/61 (6,2) 0/55	0/15 1/15 (5,9)	0,05 0,96
Trastornos Glicosilación N(%)	0/27	0/37	7/63 (12,3)	4/17 (23,5)	<0,01
ADNc Mediana (rango)	64 (14-208)	66,5 (22-2090)	46 (13-334)	58,5 (27-823)	<0,01

* % del total de pacientes con deficiencia de antitrombina (Anti-FXa <80%).

**número de pacientes con activación de FXII o FXI con respecto a los pacientes analizados y %.

Tabla 24. Descripción de los nuevos elementos implicados en el sistema hemostático en pacientes estadio IV.

	Próstata N=32	CCR N=30	CNMP N=39	CMP N=8	P
Antitrombina % Mediana (rango)	100,3 (111,6-78,1)	99,2 (112,1-38,6)	99,8 (114,1-3,6)	93,9 (106,2-79,7)	0,68
Déficit antitrombina N (%)*	2/32(6,3)	4/30 (13,3)	7/39 (17,9)	1/8 (12,5)	0,54
Complejos T-AT N (%)**	0/27	0/24	5/35 (14,3)	0/8	<0,01
Ruta contacto FXIIa** FXIa	5/28 (17,9) 0	2/19 (10,5) 0	3/36 (8,3) 0	0/6 0	0,51 -
Trastornos Glicosilación N (%)	0/27	0/24	4/35 (11,4)	2/8 (25)	<0,01
ADNc Mediana (rango)	64 (208-14)	72 (2090-22)	56 (334-16)	60 (200-41)	0,32

* % del total de pacientes con deficiencia de antitrombina (Anti-FXa <80%).

**número de pacientes con activación de FXII o FXI con respecto a los pacientes analizados y %.

2. 3. 1. Antitrombina

2. 3. 1. a. Serie global

El estudio de la antitrombina no mostró alteraciones globales relevantes en el conjunto global de pacientes, ni en la actividad anticoagulante ni en los niveles o características electroforéticas. La mediana de actividad funcional estaba dentro de los límites de la normalidad (98,6%; rango 3,6-114).

Detectamos 19 pacientes con déficit de actividad funcional de antitrombina (por debajo del 80%), de los cuales, 13 tenían diagnóstico de cáncer de pulmón (68,4%), 2 cáncer de próstata (10,5%) y 4 cáncer colorrectal (21,1%). De todos ellos, solo 2 pacientes presentaron trombosis a lo largo del seguimiento. Hubo un paciente con una actividad antitrombina extremadamente baja: 3,6%. Se trataba de un hombre de 73 años, fumador, con CNMP (histología epidermoide) estadio IV al diagnóstico (T4N0M1a por afectación pulmonar contralateral) que presentó un tromboembolismo de pulmón al mes de ser incluido en el estudio.

Para averiguar la causa de la deficiencia de antitrombina en estos pacientes, se analizaron las diferentes características del paciente o de la enfermedad que pudieran estar afectando a la funcionalidad de la antitrombina: la presencia de metástasis hepáticas, la alteración de la función hepática, el alcoholismo o haber recibido tratamiento quimioterápico previamente, etc. En la Tabla 25 mostramos la mediana de actividad antitrombina en cada una de las características estudiadas. De todas ellas, solo el ECOG y el estadio mostraron un posible efecto sobre los niveles de antitrombina, pero este fue muy moderado y en cualquier caso, dentro de los rangos de la normalidad (Tabla 25).

Tabla 25. Análisis de características clínico-patológicas en relación con los niveles funcionales de antitrombina en el grupo general de pacientes y en cada cohorte.

	TODOS		PRÓSTATA		CCR		CNMP		CMP	
	Anti-FXa (%) Mediana (rango)	P	Anti-FXa (%) Mediana (rango)	P	Anti-FXa (%) Mediana (rango)	P	Anti-FXa (%) Mediana (rango)	P	Anti-FXa (%) Mediana (rango)	P
Edad										
>70 años	99,18 (3,6-112,1)		102,1 (79,4-111,6)		102,6 (66,4-112,1)		94,4 (3,6-110,7)		88,6 (74,8-99,4)	
<70 años	98,3 (38,6-114,1)	0,85	98,7 (78,1-108,4)	0,31	93,2 (38,6-111,7)	0,21	99,0 (44,7-114,2)	0,19	96,4 (79,7-106,2)	0,14
Tabaco										
Si	98,5 (3,6-114,1)		100,3 (91,8-111,6)	0,82	101,1 (64,5-112,1)	0,62	96,9 (3,6-114,2)		93,8 (74,8-106,2)	
No	99,1 (38,6-111,7)	0,58	100,3 (78,1-106,7)		93,6 (38,6-111,7)		101,8 (78,3-105,7)	0,45	-	-
ECOG										
<2	97,6 (3,6-111,7)		99,1 (78,1-111,6)		98,9 (38,6-111,7)		96,9 (3,6-109,4)		93,3 (74,8-106,2)	
≥2	102,1 (50,2-114,1)	0,01	103,8 (79,4-108,4)	0,22	104,7 (86,1-112,1)	0,48	105,7 (50,2-114,2)	0,24	94,0 (92,5-101,6)	0,32
Alcohol										
Si	97,1 (44,7-114,1)		98,5 (79,4-108,4)		103,6 (94,2-105,3)		95,84 (44,74-114,15)		89,9 (83,3-101,6)	
No	98,9 (3,6-112,1)	0,97	100,3 (78,1-111,6)	0,56	93,6 (38,6-112,1)	0,36	97,6 (3,6-105,6)	0,75	96,5 (74,8-106,2)	0,45
Estadio										
II-III	94,8 (44,7-111,7)		NA		94,3 (83,6-111,7)		96,9 (3,6-109,4)		93,3 (74,8-106,2)	
IV	99,6 (3,6-114,1)	0,03			99,2 (38,6-112,1)	0,72	105,7 (50,2-114,2)	0,24	94,0 (92,5-101,6)	0,32
QT previa										
Si	99,6 (38,6-106,5)		NA		97,5 (38,6-106,5)		NA		NA	
No	98,5 (3,6-114,1)	0,73			98,9 (66,4-112,1)	0,39				
F. hepat.										
Normal	98,6 (3,6-114,1)		100,3 (79,4-111,6)		99,2 (38,6-112,1)		96,7 (3,6-107,6)		93,82 (74,8-106,2)	
Alterada	96,2 (66,4-110,4)	0,84	89,9 (78,01-101,7)	0,34	90,7 (66,4-110,4)	0,71	105,0 (105,-105,0)	0,30	-	
Mts hepat										
Si	102,4 (50,2-112,1)		104,6 (103,1-106,2)		99,2 (66,4-112,1)		103,4 (50,2-107,3)		103,0 (83,3-106,2)	
No	97,6 (3,6-114,1)	0,22	99,9 (78,1-111,6)	0,26	94,3 (38,6-111,7)	0,78	96,9 (3,6-114,2)	0,87	93,7 (74,8-105,4)	0,48

NA: no aplicable

El estudio electroforético de la antitrombina plasmática tampoco identificó pacientes con formas aberrantes de antitrombina, incremento significativo de formas latentes o presencia de complejos trombina-antitrombina, salvo en excepciones que se comentarán posteriormente.

2. 3. 1. b. En cada cohorte de pacientes

COHORTE A: Cáncer de próstata metastásico

No se observaron alteraciones relevantes, ni en la actividad anticoagulante ni en los niveles o características electroforéticas de la antitrombina plasmática en este grupo de pacientes. Tampoco identificamos ningún parámetro clínico-patológico que pudiera estar afectando la funcionalidad de la antitrombina (datos no mostrados).

Solo hubo dos pacientes que presentaron una actividad funcional baja, menor del 80%, aunque no se detectaron formas aberrantes mediante western blot en ninguno de los dos casos. Ninguno de los dos pacientes desarrolló trombosis durante el seguimiento ni presentó eventos antes de la inclusión en el estudio.

COHORTE B: Cáncer colorrectal

Tampoco observamos asociación de ningún parámetro clínico-patológico analizado con la funcionalidad de la antitrombina en este grupo de pacientes (datos no mostrados).

Solo 4 pacientes tuvieron actividad de antitrombina por debajo del 80% y fueron estudiados de manera individual.

A) Paciente 159. Se trata de una mujer de 70 años, con función hepática normal en el momento de la inclusión en el estudio y con antecedentes de diabetes mellitus tipo 2 e HTA. Fue diagnosticada en 2002 de un adenocarcinoma mucinoso de colon descendente T3NxM0. Fue intervenida en julio de ese año mediante resección segmentaria de colon izquierdo y posteriormente recibió tratamiento adyuvante con 5-Fluorouracilo-ácido folínico según esquema de la clínica Mayo (6 ciclos entre agosto 2002 y enero 2003). En mayo 2004 presentó recaída peritoneal que fue intervenida. Posteriormente recibió 3 líneas de tratamiento para enfermedad avanzada, antes de su inclusión en el estudio, con estabilizaciones de la enfermedad de larga duración. Entre los fármacos que recibió están CPT11, capecitabina, bevacizumab, gemcitabina y cetuximab, todos ellos con buena tolerancia.

Fue incluida en el estudio en enero 2010, cuando iba a comenzar la quinta línea de tratamiento quimioterápico con oxaliplatino-capecitabina-bevacizumab, con enfermedad exclusivamente a nivel peritoneal. Se recogieron muestras antes del primer ciclo y en las semanas 2, 4 y 9 de tratamiento. Recibió 9 ciclos con escasa respuesta y se suspendió el tratamiento en diciembre 2010, momento en el cual se decide tratamiento exclusivamente sintomático. Fallece debido a progresión tumoral el 11 agosto de 2011. No desarrolló eventos trombóticos durante la evolución de la enfermedad.

En la Figura 4, se describe la evolución de la actividad anti-FXa durante el tratamiento, que permanece por debajo del 60% en todo momento. Mediante el estudio de western blot de diferentes proteínas, se observó que en todas las muestras había un déficit de antitrombina.

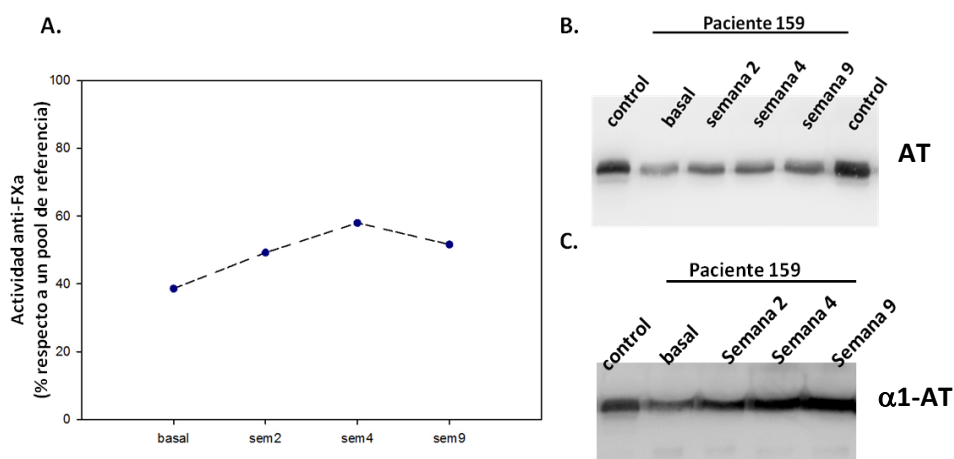


Figura 4. A. Evolución de la actividad anti-FXa en la paciente 159, con cáncer de colon estadio IV en 5ª línea de tratamiento. B. Estudios de western blot de diferentes proteínas plasmáticas, separando las proteínas mediante SDS-PAGE se observa que en todas las muestras hay un déficit de antitrombina (AT), sin tanta alteración en los niveles de otra serpina hepática alfa1-antitripsina (α 1-AT) como observamos en figura C.

Ante sospecha de déficit de antitrombina tipo 1 debido a la persistencia de la deficiencia y al hecho de que hay un descenso paralelo de los niveles antigénicos y funcionales, se realizó secuenciación del gen *SERPINC1*. El análisis de los 7 exones y regiones flanqueantes de este gen no identificó ninguna anomalía molecular destacable. El estudio de MLPA tampoco reveló

grandes deleciones o duplicaciones que afecten a los exones del gen que codifica para la antitrombina.

B) Paciente 83. Se trata de un hombre de 72 años, con sobrepeso (IMC 27 kg/m²), antecedentes de diabetes mellitus tipo 2, dislipemia y aumento de transaminasas en el momento de la inclusión en el estudio. ECOG 1. Fue diagnosticado en agosto de 2008 de adenocarcinoma de colon T4N1M1 estadio IV (con afectación hepática no extensa) y KRAS no mutado. Fue incluido en el estudio previo al inicio de la primera línea de tratamiento que consistió en un doblete de quimioterapia con oxaliplatino y capecitabina, presentando respuesta parcial radiológica. Posteriormente se realizó metastasectomía hepática el 17 de julio de 2009. Desde entonces el paciente está en respuesta completa, sin evidencia de recaída y no ha presentado eventos trombóticos durante el seguimiento.

Se recogió una muestra antes de recibir el primer ciclo de quimioterapia (día +1) y en los días +8, +26 y +47 (tras 3 ciclos). La evolución de los niveles de actividad anti-FXa se muestra en la Figura 5. Sólo la muestra basal presentaba deficiencia de antitrombina.

En el estudio electroforético no se observaron alteraciones en la proteína en ninguna de las muestras (figura no mostrada). Estos datos sugieren una deficiencia adquirida de antitrombina.

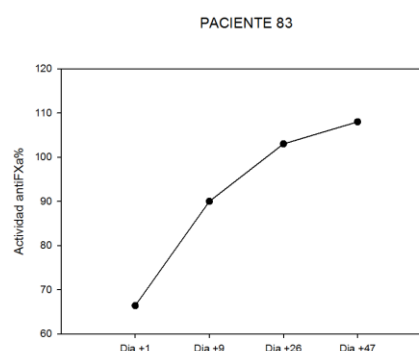


Figura 5. Evolución de la actividad anti-FXa en el paciente 83, cáncer de colon estadio IV en 1ª línea de tratamiento de quimioterapia. Se observa que la actividad antitrombina se restituye con el tratamiento.

C) Paciente 182. Hombre de 64 años, fumador, sin comorbilidades de interés. Fue diagnosticado de adenocarcinoma de colon T3N2M1 (con carcinomatosis peritoneal y sin metástasis a nivel hepático) en noviembre de 2008, KRAS no mutado. Había recibido dos líneas de tratamiento quimioterápico previo a la inclusión en el estudio. Fue incluido antes de empezar la tercera línea de tratamiento con CPT11, capecitabina y bevacizumab que recibió entre el 13 de

julio de 2010 y el 29 de noviembre de 2010. En la reevaluación de diciembre de 2010 presentaba progresión tumoral y falleció el 30 de diciembre de 2010. No presentó trombosis durante todo el seguimiento, ni previo a su inclusión en el estudio.

La primera muestra se tomó antes de recibir el primer ciclo de la tercera línea de tratamiento y posteriormente se tomaron muestras cada 15 días previo a la administración de cada ciclo de quimioterapia. En la Figura 6, mostramos la evolución de la actividad antitrombina en este paciente, solo la muestra basal presentaba deficiencia de antitrombina, aunque se objetiva una gran fluctuación de la actividad anti-FXa en las distintas muestras analizadas.

El análisis electroforético solo confirmó la deficiencia tipo I en la muestra basal (datos no mostrados).

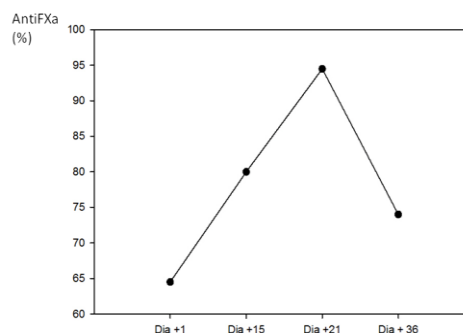


Figura 6. Evolución de la actividad antitrombina en el paciente nº 182, con cáncer de colon estadio IV en 3ª línea de tratamiento de quimioterapia.

Estos resultados, de nuevo sugieren una deficiencia adquirida con diferente intensidad en distintos momentos.

D) Paciente F3-C-395. Se trata de un hombre de 48 años, fumador y sin comorbilidades. Fue diagnosticado el 21 de abril del 2013 de adenocarcinoma de colon T4NxM1 (sin metástasis hepáticas). Fue incluido en el estudio previo al inicio de tratamiento de quimioterapia de primera línea y se recogió solo una muestra, previo al primer ciclo, en la que presentaba una actividad antitrombina inicial de 69%. Entre el 16 de mayo de 2013 y el 30 de septiembre de 2013, recibió la primera línea de quimioterapia con oxaliplatino-capecitabina, presentando progresión tumoral en octubre de 2013, por lo que se cambió de tratamiento. El paciente falleció el 5 de junio de 2014 por progresión de su enfermedad neoplásica. No presentó eventos trombóticos durante el seguimiento. El estudio de la antitrombina plasmática mediante western blot solo confirmó la deficiencia tipo I, con reducción de niveles antigénicos, en la muestra que presentaba deficiencia funcional. La ausencia de muestras

adicionales no nos permite definir si la deficiencia fue adquirida o pudiera ser congénita, aunque no existen datos sobre historia familiar de trombosis que avalaran la alternativa congénita.

COHORTE C: Cáncer de pulmón

En esta cohorte 13 pacientes presentaron actividad antitrombina por debajo del 80% y de ellos, hubo dos pacientes que presentaron trombosis (15,4%) un porcentaje similar al observado en pacientes con niveles normales de antitrombina al diagnóstico (16,9%) ($p= 0,96$). Se analizaron las características clínicas y patológicas que podrían estar relacionadas con la actividad antitrombina, pero no se observó que existiera asociación (Tabla 25).

Entre los pacientes con déficit de antitrombina, dos eran CMP (15,4%) y 11 CNMP (84,6%). Se analizaron las diferentes características clínico-patológicas que pudieran alterar la funcionalidad de la antitrombina atendiendo a la histología CMP y CNMP, pero no observamos déficit funcional en ninguna de ellas (Tabla 26).

Tabla 26. Características clínicas y patológicas en pacientes con CNMP y CMP, en función de presencia de déficit antitrombina.

		CNMP N=65			CMP N=17		
		Deficiencia anti-FXa N (%)	Anti-FXa normal N (%)	P	Deficiencia anti-FXa N (%)	Anti-FXa normal N (%)	P
Sexo	Hombre	10 (16,9)	49 (83,1)	0,99	2 (13,3)	13 (86,7)	0,58
	Mujer	1 (16,7)	5 (83,3)		0	2 (100)	
Edad	<70 años	7 (14,6)	41 (85,4)	0,39	1 (7,7)	12 (92,3)	0,35
	>70 años	4 (23,5)	13 (76,5)		1 (25,0)	3 (75,0)	
ECOG	<2	9 (18,0)	41 (82,0)	0,83	2 (16,7)	10 (83,3)	0,33
	≥2	2 (15,4)	11 (84,6)		0	5 (100)	
Tabaco	Si	10 (17,2)	48 (82,8)	0,84	NA	NA	
	No	1 (14,3)	6 (85,7)				
Alcohol	Si	2 (10,0)	18 (90,0)	0,32	0	4 (100)	0,41
	No	9 (20,0)	36 (80,0)		2 (15,4)	11 (84,6)	
Función hepática	Normal	11 (17,5)	52 (82,5)	0,52	NA	NA	
	Alterada	0	2 (100)				
Estadio	II-III	4 (15,4)	22 (84,6)	0,79	1 (11,1)	8 (88,9)	0,93
	IV	7 (17,9)	32 (82,1)		1 (12,5)	7 (87,5)	
Mts. hepáticas	Si	2 (16,9)	4 (66,7)	0,26	0	3 (100)	0,49
	No	9 (15,3)	50 (84,7)		2 (14,3)	12 (85,7)	

Mts: metástasis; NA: no aplicable

En el estudio electroforético de la antitrombina, observamos 6 pacientes que presentaban complejos trombina-antitrombina (T-AT), todos ellos CNMP. La Figura 7 muestra dos ejemplos representativos (casos 122 y 132). Ninguno de los pacientes en los que se detectó T-AT presentó trombosis, y uno de ellos progresó a las pocas semanas.

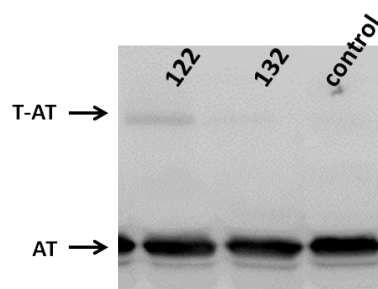


Figura 7. Estudio electroforético (SDS-PAGE en condiciones no reducidas) de la antitrombina plasmática mediante Western blot en el que se identifican complejos trombina-antitrombina (T-AT) en dos pacientes con CNMP, 122 y el 132.

2. 3. 2. Ruta de contacto

El estudio de la ruta de contacto se realizó mediante western blot tras separación electroforética del FXI y FXII en todos aquellos pacientes de los que disponíamos muestra (136 pacientes de los 157 incluidos en el estudio). Como

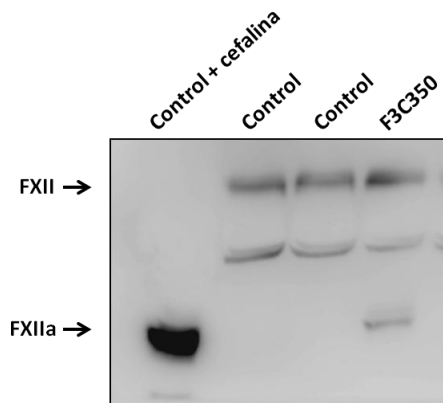


Figura 8. Western blot del FXII plasmático en muestras controles (con y sin activación por cefalina/kaolina) y un paciente (F3C350) que presentaba la banda de activación del FXII (FXIIa).

controles, empleamos plasma de sujetos sanos tratados con cefalina y kaolina, en las que se identifica las formas activadas de FXI (FXIa) y FXII (FXIIa). Dos fueron las alteraciones que observamos en los pacientes con cáncer: reducción de los niveles de proteína intacta y presencia de débiles bandas de activación. La Figura 8 es un ejemplo de las bandas de activación de FXII observadas.

Encontramos mayor frecuencia de bandas de activación de FXII en pacientes con cáncer de próstata (17,9%), siendo el cáncer de pulmón el que menor incidencia de activación de FXII presentaba de forma basal (5,3%) (Tabla 23 y 24). Llamativamente, en los pacientes que presentaban bandas de activación de FXII, no observamos activación del FXI. Por otro lado, únicamente un paciente con cáncer de pulmón microcítico presentó formas activadas de FXI (Tabla 23 y 24).

COHORTE A: Cáncer de próstata metastásico

En el grupo de pacientes con cáncer de próstata, de los 5 pacientes con bandas de activación del FXII hubo uno que presentó un evento trombótico. Respecto a los parámetros bioquímicos que pueden ser relevantes, se observó que los pacientes que presentaron activación del FXII tenían una mediana de concentración de ADN, un potencial activador de la ruta de contacto, mayor que aquellos en los que no observamos bandas de activación, aunque estos

resultados no fueron estadísticamente significativos (89 ng/ml vs 59 ng/ml; $p=0,31$).

COHORTE B: Cáncer colorrectal

En el grupo de pacientes con cáncer colorrectal, de los tres pacientes con activación del FXII, ninguno de ellos presentó trombosis durante el seguimiento. Dos pacientes eran estadio IV y uno de ellos estadio II-III. La mediana de concentración de ADNc fue de 47 ng/ml (40-1227) en pacientes con activación FXII y 67 ng/ml (22-2090) en pacientes sin activación.

COHORTE C: Cáncer de pulmón

En el grupo de pacientes con cáncer de pulmón observamos bandas de activación de FXII en 4 pacientes con CNMP y en ninguno de los pacientes con CMP. Sin embargo, el único paciente que presentó activación del FXI era un paciente con CMP y curiosamente no presentaba formas activadas de FXII. De los 4 pacientes con FXII activado (FXIIa), dos presentaron trombosis (50%). En cuanto a la histología, dos eran carcinoma escamoso, uno adenocarcinoma y otro carcinoma no microcítico de histología no definida. Tres de ellos eran estadio IV. La mediana de concentración de ADNc en el grupo con activación de FXII fue de 72,5 ng/ml (36-329) mientras que en los demás pacientes fue de 44 ng/ml (13-334), $p=0,15$.

2. 3. 3. Trastornos de glicosilación

Este estudio se inició con el análisis electroforético de la antitrombina y α 1-antitripsina en plasma empleando geles de SDS en condiciones no reducidas y reconocimiento mediante métodos inmunológicos. El objetivo fue identificar formas hipoglicosiladas de estas N-glicoproteínas. Aunque en varios pacientes que se describen más adelante se identificó un ligero aumento de la banda de antitrombina compatible con las glicofomas de 3 N-glicanos, la hibridación de las mismas membranas con anticuerpo anti- α 1-antitripsina no reveló grandes incrementos en formas hipoglicosiladas y el estudio de glicofomas de transferrina mediante HPLC tampoco determinó aumentos

significativos de asialo o disialo transferrina. La Figura 9 muestra un ejemplo representativo de estos resultados.

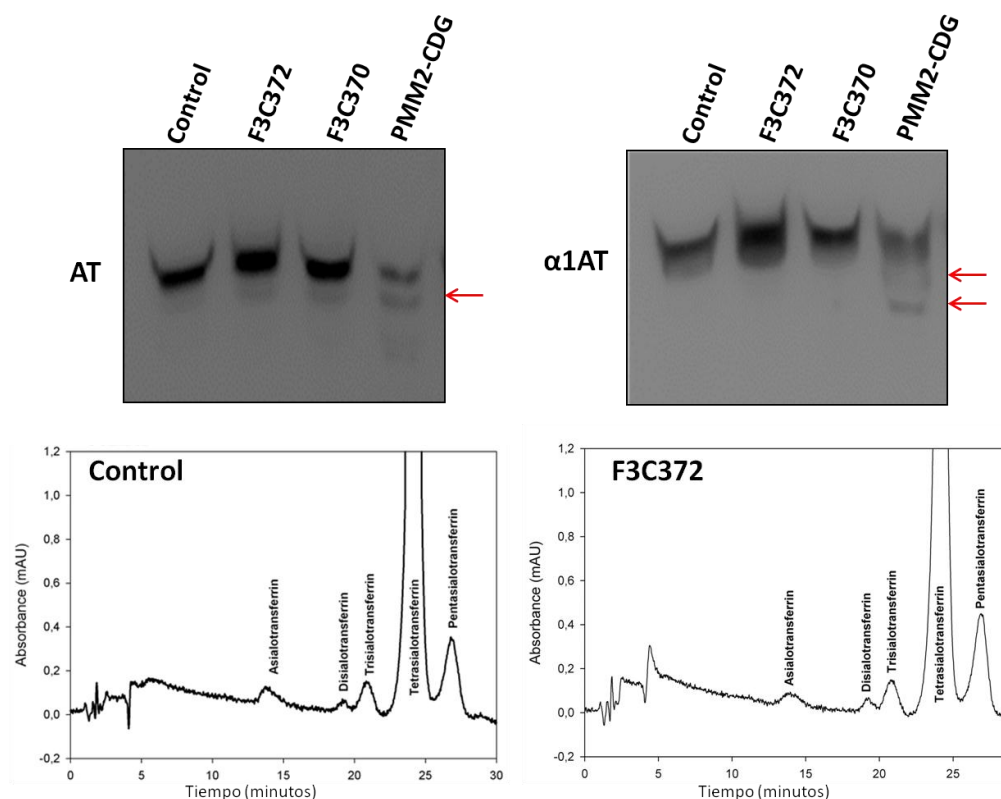


Figura 9. Detección de formas hipoglicosiladas (flechas) de antitrombina (AT). (A); mediante western blot, (B) α 1-antitripsina y (C) transferrina mediante HPLC. El estudio se realizó en pacientes con cáncer (de pulmón F3C370 y F3C372), controles sanos y pacientes con trastornos de glicosilación (PMM2-CDG y CDG-like).

Finalmente, ninguno de los pacientes con aumento de las formas hipoglicosiladas presentaba mutación destacable en *PMM2*.

COHORTE A: Cáncer de próstata metastásico

Solo encontramos un paciente con cáncer de próstata que presentaba un ligero incremento de una forma de antitrombina hipoglicosilada en el estudio electroforético. Sin embargo, el posible trastorno de glicosilación no se confirmó con el estudio de la α 1-antitripsina mediante western blot (datos no mostrados).

COHORTE B: Cáncer colorrectal

En las muestras basales de los pacientes con cáncer de colon, no observamos alteraciones de la glicosilación.

COHORTE C: Cáncer de pulmón

En el estudio electroforético en esta cohorte de pacientes, observamos la presencia de bandas de hipoglicosilación de baja intensidad en 11 pacientes (4 pacientes con CMP y 7 con CNMP), ninguno desarrolló complicaciones trombóticas (Figura 9). De todos ellos, llama la atención que 3 de los 7, eran bebedores moderados en el momento de la inclusión en el estudio, todos eran fumadores, 4 pacientes eran estadio IV y solo uno tenía afectación hepática.

2. 3. 4. ADN circulante

2. 3. 4. a. Concentración del ADN circulante y su relación con la carga tumoral y con factores pronósticos

La concentración basal de ADN circulante que presentaban los pacientes de nuestra serie, fue significativamente superior a la detectada en población sana de referencia (pacientes con cáncer 55,5 ng/ml vs 45,5 ng/ml en controles sanos, $p= 0,001$).

COHORTE A: Cáncer de próstata metastásico

La mediana de concentración de ADNc en este grupo fue de 64 ng/mL (rango 14-208). No se observó relación entre las diferentes características clínico-patológicas del paciente y de la enfermedad, con la concentración de ADNc en plasma (Tabla 27).

Tabla 27. Concentración de ADN circulante en pacientes con cáncer de próstata estadio IV y cáncer colorrectal en función de diferentes variables clínicas y patológicas.

	PROSTATA N=32			CCR N=43		
	Mediana (ng/mL)	Rango (ng/mL)	P	Mediana (ng/mL)	Rango (ng/mL)	P
Edad						
>70 años	63,5	14,0-126,0		62,0	24,0-2090,0	
≤70 años	65,0	28,0-208,0	0,29	67,0	22,0-1489,0	0,95
ECOG						
<2	43,5	14,0-208,0		64,0	22,0-2090,0	
≥2	84,0	46,0-130,0	0,10	95,0	61,0-199,0	0,29
Sexo						
Hombre	NA	NA		62,0	24,0-2090,0	
Mujer				67,0	22,0-230,0	0,85

Estadio						
II-III	NA	NA		62,0	43,0-110,0	
IV				72,0	22,0-2090,0	0,47
CPI						
Si	72,0	23,0-100,0		66,0	22,0-110,0	
No	64,0	14,0-208,0	0,99	66,5	24,0-2090,0	0,65
Diabetes						
Si	53,0	32,0-96,0		54,0	24,0-137,0	
No	72,0	14,0-208,0	0,42	83,0	22,0-2090,0	0,08
Tabaco						
Si	59,0	14,0-130,0		64,5	22,0-1227,0	
No	75,0	19,0-208,0	0,36	66,5	24,0-2090,0	0,55
Dislipemia						
Si	79,0	38,0-102,0		47,0	22,0-88,0	
No	45,5	14,0-208,0	0,26	72,0	28,0-2090,0	0,01
Gleason						
7	46,0	23,0-102,0		NA	NA	
>7	63,5	14,0-208,0	0,72			
Enf. alto riesgo						
Si	75,0	19,0-108,0		NA	NA	
No	53,0	14,0-100,0	0,13			
Metástasis hepáticas						
Si	69,5	64,0-75,0		72,0	24,0-1227,0	
No	63,0	14,0-208,0	0,96	62,0	22,0-2090,0	0,31
Metástasis óseas						
No	75,5	14,0-102,0		NA	NA	
Si, bajo riesgo	48,5	23,0-100,0				
Si, alto riesgo	64,0	19,0-208,0	0,44			
Progresión						
Si	63,5	14,0-208,0		72,0	22,0-2090,0	
No	86,0	38,0-130,0	0,59	62,0	35,0-172,0	0,35
QT previa						
Si	NA	NA		70,0	40,0-2090,0	
No				66,5	22,0-1489,0	0,92

CPI: cardiopatía isquémica; NA: no aplicable

Sin embargo, la concentración de ADNc se asociaba con los valores de PSA y de LDH. Los pacientes con PSA elevado, por encima de 78 µg/L (mediana observada), tenían concentraciones más elevadas de ADNc (84 ng/mL; rango 28-208) que los pacientes con PSA bajo, por debajo de 78 µg/L (42 ng/mL; rango 14-102); $p < 0,01$ (Figura 10).

Igualmente, pacientes con niveles de LDH por encima de la mediana (432 UI/L), presentaron casi el doble de la concentración de ADNc (84,5; rango 23-208), frente a los pacientes con LDH por debajo de la mediana (46 ng/mL; rango 14-102); $p= 0,03$ (Figura 10).

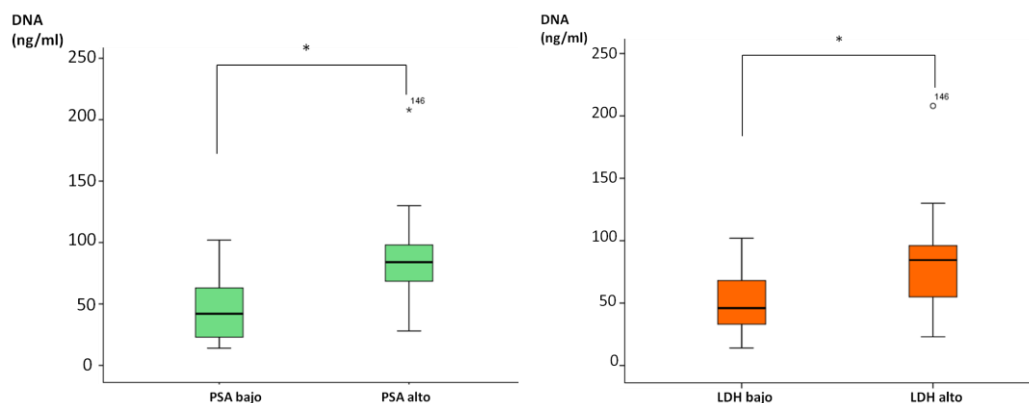


Figura 10. Concentración de ADN circulante según el valor de PSA basal en pacientes con cáncer de próstata metastásico (figura de la izquierda) y según el valor de LDH basal (figura de la derecha).

COHORTE B: Cáncer colorrectal

A pesar de que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, es interesante resaltar que la concentración de ADNc fue mayor en pacientes estadio IV frente a estadio II-III (72 ng/mL, rango 22-2090 vs 62 ng/mL, rango 43-110; $p= 0,47$) y en pacientes que progresaron frente a los que no lo hicieron (72 ng/mL, rango 22-2090 vs 62 ng/mL, rango 35-172; $p= 0,35$).

Como se puede observar, los pacientes con estadio IV tenían un amplio rango de valores en cuanto a la concentración de ADNc, esto es debido a que había tres pacientes con concentraciones por encima de 1000 ng/mL en el momento de la inclusión en el estudio. En la Tabla 28 se describe brevemente las características de cada paciente y su evolución. Ninguno de ellos presentó eventos trombóticos durante el seguimiento. Además, en los dos pacientes de los que disponemos muestra de seguimiento, la concentración de ADN descendió drásticamente hasta valores <70 ng/mL tras el tratamiento, presentando en la reevaluación por TAC, una respuesta radiológica en un paciente y estabilización de la enfermedad en otro.

Tabla 28. Descripción de los pacientes con cáncer de colon estadio IV que presentaron concentración de ADN circulante basal mayor de 1000 ng/mL.

ID paciente	Antecedentes personales	Historia oncológica	Muestra 1	Muestra 2
87	Hombre 73 años HTA, no hábitos tóxicos IMC 25 ECOG 1	Diagnostico en noviembre 2006 adenocarcinoma de colon estadio IV (metástasis óseas, no hepáticas) KRAS desconocido. Entra en estudio previo al inicio de 3ª línea de QT con CPT11-cetuximab que recibe entre octubre/07 y abril/08. Enfermedad estable tras 4 ciclos. Progresión en julio 2008. Exitus 5 noviembre 2008. No eventos tromboticos.	Fecha: 16/10/07 Fibrinógeno: 6,2g/L LDH 3852 UI/L FvW 549 DD 9,790mg/L TP 15,7 seg FXa 102,6 DNA 2090ng/ml	No
58	Hombre 69 años Fumador No bebedor HTA, aumento ALT/AST en el momento de inclusión ECOG 1	Diagnostico en marzo 2008 de adenocarcinoma de colon estadio IV (afectación hepática extensa) KRAS mutado. 1ª línea: entre 10/06/08 y 29/09/08 con XELOX-bevacizumab. Respuesta parcial tras 4 ciclos. Progresión el 16/03/2009 Exitus 1/08/09 No eventos tromboticos	Fecha 10/06/08 Fibrinógeno: 4,7g/L LDH 3918 UI/L FvW 172 DD 0,71mg/L TP 12 seg FXa 90% DNA 1227ng/ml	Fecha 23/07/08 Fibrinógeno 4,02g/L LDH 300 UI/L FVW 190 DD 0,23 mg/L FXa 87% DNA 68ng/ml
F3-C-500	Hombre 53 años HTA IMC 24 Sin antecedentes de interés ECOG 0	Diagnóstico en noviembre 2013 de adenocarcinoma de colon estadio IV (afectación peritoneal, no hepática) KRAS no mutado 1ª línea: entre 29/11/13 y 13/01/14 recibe XELOX-bevacizumab con enfermedad estable tras 3 ciclos Progresión marzo 2014 No eventos tromboticos	Fecha 29/11/13 FXa 106% DNA 1489 ng/ml	Fecha 30/05/14 FXa 102% DNA 50ng/ml

COHORTE C: Cáncer de pulmón

a. Carcinoma no microcítico de pulmón

En el grupo de pacientes con CNMP la mediana de concentración de ADNc fue de 46 ng/mL (rango 13-334). Se estudiaron diferentes variables que podían influir en la concentración de ADNc y los resultados se presentan en la Tabla 29.

Tabla 29. Concentración de ADN circulante según diferentes características clínicas y patológicas en CNMP y CMP.

		CNMP N=65			CMP N=17		
		Mediana (ng/mL)	Rango (ng/mL)	<i>p</i>	Mediana (ng/mL)	Rango (ng/mL)	<i>P</i>
Edad							
>70 años		46,0	14,0-334,0		38,5	27,0-60,0	
≤70 años		45,0	13,0-329,0	0,75	68,0	37,0-823,0	0,03
ECOG							
<2		40,5	13,0-334,0		57,0	27,0-823,0	
≥2		71,0	26,0-329,0	0,02	65,0	41,0-122,0	0,91
Sexo							
Hombre		46,0	13,0-334,0		58,0	27,0-823,0	
Mujer		33,0	19,0-38,0	0,08	64,0	57,0-71,0	0,82
Cardiopatía isquémica							
Si		74,0	14,0-329,0		NA	NA	
No		46,0	16,0-334,0	0,66			
Diabetes							
Si		46,0	14,0-291,0		53,5	41,0-200,0	
No		45,0	13,0-334,0	0,39	62,5	27,0-823,0	0,86
Tabaco							
Si		46,0	13,0-334,0		NA	NA	
No		22,0	16,0-128,0	0,12			
Dislipemia							
Si		46,0	13,0-329,0		71,0	41,0-823,0	
No		45,0	16,0-334,0	0,62	56,0	27,0-144,0	0,17
Estadio							
II-III		44,0	13,0-89,0		56,0	27,0-823,0	
IV		56,0	16,0-334,0	0,02	60,0	41,0-200,0	0,47
Metástasis hepáticas							
Si		162,5	16,0-291,0		60,0	57,0-200,0	
No		44,0	13,0-334,0	0,03	56,0	27,0-823,0	0,44
Progresión							
Si		46,5	16,0-334,0		65,5	36,0-823,0	
No		42,0	13,0-89,0	0,37	50,0	27,0-65,0	0,18
Cirugía del primario							
Si		26,0	13,0-44,0		NA	NA	
No		46,5	14,0-334,0	0,04			

Se observó que había una correlación entre la concentración de ADNc y la carga tumoral ya que era significativamente mayor en pacientes estadio IV frente a pacientes estadio II-III (56 ng/mL vs 44 ng/mL; $p=0,02$), así como en aquellos con metástasis hepáticas frente a los que no las tuvieron (162,5 ng/mL vs 44 ng/mL; $p= 0,03$) (Figura 11). Respecto al resto de factores clínicos estudiados, se observó que el ECOG elevado y la presencia de tumor activo

(pacientes no operados frente a los que fueron operados) se asociaba con concentraciones más elevadas de ADNc (Tabla 29).

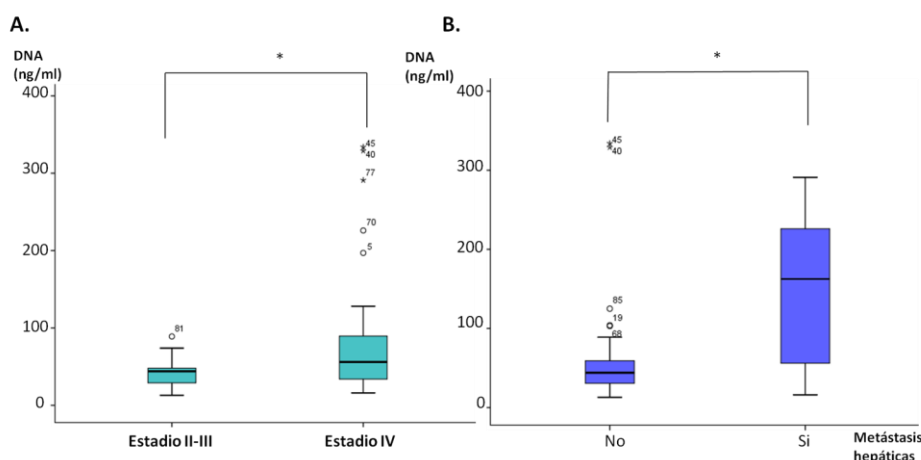


Figura 11. Concentración de ADN circulante en pacientes con CNMP atendiendo al estadio tumoral (A) o la presencia de metástasis hepáticas (B).

b. Carcinoma microcítico de pulmón

Solo un parámetro clínico-patológico mostró asociación significativa con los niveles de ADNc: la edad. Los pacientes menores de 70 años tenían concentraciones de ADNc plasmático más elevadas de manera significativa que los mayores de 70 años (Tabla 29). Es llamativo el mayor nivel de ADNc en plasma que presentan los dos únicos pacientes con trombosis comparado con los niveles detectados en los pacientes sin trombosis, pero el escaso número de pacientes con trombosis no permite que estas diferencias alcancen la significación estadística (Tabla 29).

2. 3. 4. b. Correlación entre la concentración de ADN circulante y los parámetros de la coagulación

En general se observó que la concentración de ADNc se correlacionaba con los niveles de LDH, FvW y de forma más débil con fibrinógeno y DD. En la Tabla 30 mostramos la correlación observada en pacientes estadio IV.

Tabla 30. Correlación de la concentración de ADN circulante con otros parámetros de laboratorio y del sistema hemostático atendiendo al tipo de tumor, en pacientes estadio IV.

	Próstata			CCR estadio IV			CNMP estadio IV			CMP estadio IV			TODOS		
	R	P	N	R	P	N	R	P	N	R	P	N	R	P	N
Fibrinógeno	0,34	0,08	27	0,58	<0,01	20	0,17	0,33	34	0,50	0,25	7	0,34	<0,01	88
LDH	0,46	0,01	28	0,86	<0,01	16	0,24	0,25	24	0,09	0,87	6	0,54	<0,01	74
FvW	0,43	0,03	24	0,35	0,14	19	0,37	0,05	29	0,14	0,79	6	0,40	<0,01	78
DD	0,41	0,03	27	0,40	0,08	20	-0,003	0,99	34	0,32	0,48	7	0,22	0,04	88
TP	-0,03	0,92	16	0,21	0,45	15	-0,17	0,69	8			1	0,06	0,68	40
Antitrombina	0,16	0,42	28	0,24	0,27	23	-0,06	0,72	35	0,36	0,43	7	0,09	0,35	93

Se observó una correlación entre la concentración de ADNc y LDH, y la concentración de ADNc y fibrinógeno, en cáncer de próstata y cáncer colorrectal, siendo en este último grupo donde observamos una correlación lineal más fuerte.

En el grupo de pacientes con CNMP, se observó correlación de los niveles de ADNc únicamente con el FvW. Cuando analizamos por separado pacientes con enfermedad metastásica, observamos que era en este grupo donde había asociación y no en el grupo de pacientes con estadio II-III.

2. 4. Resumen de las principales alteraciones observadas en cada cohorte

A continuación presentamos una tabla que resume las principales alteraciones observadas en los elementos que intervienen en el sistema hemostático analizados en cada cohorte de pacientes.

Tabla 31. Tabla resumen de los principales resultados observados.

Cohorte	Rutinario	Anti-FXa	Ruta contacto	T. Glicosilación	ADNc
Próstata N=32	Correlación DD y FvW con PSA DD↑, FvW↑: valor pronóstico FvW↑ asociación con trombosis	Normal	17,9% FXIIa No FXIa	No	Correlación con PSA y LDH. Valor pronóstico (SG y SLP)
CCR N=43	FvW correlación con carga tumoral DD ↑ y FvW↑: valor pronóstico Anemia y trombocitosis asociado a trombosis	Déficit: 9,3% (4 pacientes)	9,4% FXIIa No FXIa	No	Valor pronóstico
CNMP N=65	Leucocitosis valor pronóstico FvW↑ y DD↑: valor pronóstico	Déficit: 16,9% (11 pacientes) Complejos T-AT	5,3% FXIIa No FXIa	16,9% (11 pacientes)	Correlación con estadio Valor pronóstico (SG y SLP)
CMP N=17	Leucocitosis, trombocitosis: valor pronóstico	Déficit: 11,8% (2 pacientes)	5,8% (1 paciente) activación FXIa No FXIIa	No	
TODOS N=157	Aumento basal de LDH, DD y FvW DD y FvW mayor en estadio IV vs II-III DD y FvW valor pronóstico	19 (29,8%) con déficit AntiFXa: 68,4% pulmón 10,5% próstata 21,1% CCR	Mayor activación en cáncer de próstata	No	Elevado respecto a sanos Correlación con carga tumoral y pronóstico No relación con trombosis

3. Análisis de los eventos trombóticos

3. Análisis de los eventos trombóticos

3. 1. Descripción de los eventos trombóticos

En los 157 pacientes estudiados se observó una incidencia de eventos trombóticos del 18,5%, de los cuales 13 (44,8%) fueron trombosis venosa profunda, 11 (37,9%) tromboembolismo pulmonar y 5 (17,3%) en otras localizaciones: 2 trombosis en el territorio portal, una en el territorio esplénico y dos eventos arteriales (uno en el territorio de la arteria mesentérica superior y una trombosis arterial de miembro inferior). Según la localización del tumor primario, se observó una mayor incidencia de trombosis en el grupo de pacientes con cáncer de próstata con un 31,2% de eventos, mientras que en los demás grupos la incidencia fue del 14% al 15,9%. Llama la atención que en el grupo de pacientes con CNMP, la mayoría de trombosis (63,6%) fueron en el árbol vascular pulmonar, mientras que en los demás grupos la frecuencia fue mayor a nivel vascular periférico. Además, es interesante resaltar que de los 7 pacientes con CNMP que presentaron un tromboembolismo pulmonar, dos pacientes habían sido intervenidos del tumor primario mediante lobectomía (lo que supone el 40% de los pacientes con CNMP operados) y presentaron el evento trombótico durante el tratamiento adyuvante (un paciente 3 meses tras la cirugía y el otro 7 meses después de la cirugía). En la Tabla 32, se detallan los resultados.

Tabla 32. Eventos trombóticos y localización de los mismos en los diferentes grupos de pacientes con tumor incluidos en este estudio.

	Próstata N=32 N (%)	Colon N=43 N (%)	CNMP N=65 N (%)	CMP N=17 N (%)	TOTAL N=157 N (%)	
Trombosis	10 (31,2)	6 (14)	11 (16,9)	2 (11,8)	29 (18,5)	
No trombosis	22 (68,8)	37 (86)	54 (83,1)	15 (88,2)	128 (81,5)	
Localización	TVP	6 (60)	3 (50,0)	3 (27,3)	1 (50)	13 (44,8)
	TEP	2 (20)	1 (16,7)	7 (63,6)	1 (50)	11 (37,9)
	Otros	2 (20)	2 (33,3)	1 (9,1)	0	5 (17,3)

En el grupo total de pacientes, la mediana de tiempo al evento trombotico fue de 11,4 meses desde la inclusion en el estudio (IC 95%: 10.3-12.6). Cuando analizamos el tiempo al evento trombotico en cada cohorte de

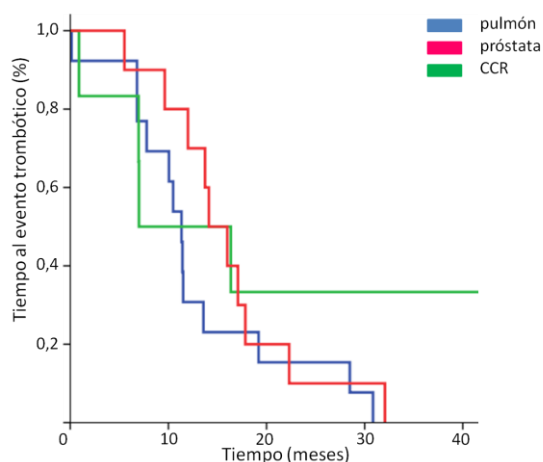


Figura 12. Tiempo al evento trombotico según la localización del tumor primario.

pacientes, seleccionando aquellos con estadio IV, se observó que en el grupo de cáncer colorrectal fue de 6,9 meses (IC 95%: 0-18.3), en cáncer de próstata de 13,7 meses (IC 95%: 7.5-19.9) y en cáncer de pulmón estadio IV de 10,1 meses (IC 95%: 4.9-15.1), sin encontrar diferencias significativas entre los grupos ($p= 0,17$) (Figura 12).

3. 2. Relación entre los factores clínicos y la trombosis

Estudiamos la relación entre las características clínico-patológicas y la trombosis en la serie global de pacientes y en cada cohorte por separado.

3. 2. a. En la serie global

En la Tabla 33 se describen las características clínicas y patológicas que presentaban los pacientes con trombosis frente a aquellos que no tuvieron trombosis, se observó que el evento trombotico se asociaba a ECOG ≥ 2 . De los pacientes que presentaron trombosis, el 82,8% eran estadio IV (24 pacientes), el 13,8% estadio III (4 pacientes) y un 3,4% estadio II (1 paciente).

Tabla 33. Descripción de las características clínico-patológicas en relación con la trombosis en la cohorte global de pacientes.

	Trombosis N=29 N (%)	No trombosis N=128 N (%)	P
Edad mediana (rango)	70 (41-85)	67 (33-83)	0,54
Sexo			
Hombre	24 (18,5)	106 (81,5)	0,99
Mujer	5 (18,5)	22 (81,5)	
IMC (kg/m²)			
>35	2 (22,2)	7 (77,8)	0,76
<35	27 (18,2)	121 (81,8)	
ECOG			
<2	17(14,4)	101(85,6)	<0,01
≥2	12(35,3)	22(64,7)	
HTA			
Si	13 (18,1)	59 (81,9)	0,91
No	16 (18,8)	69 (81,2)	
Diabetes			
Si	8(17,0)	39(83,0)	0,76
No	21(19,1)	89 (80,9)	
Tabaco			
Si	21(19,3)	88(80,7)	0,69
No	8 (16,7)	40 (83,3)	
Dislipemia			
Si	13(24,5)	40(75,5)	0,16
No	16(15,4)	88(84,6)	
Quimioterapia previa			
Si	0(0,0)	10(100)	0,12
No	29 (19,7)	118(80,3)	
Metástasis hepáticas			
Si	6(20,7)	23(79,3)	0,73
No	23 (18,0)	105 (82,0)	
Metástasis pulmonares			
Si	8(23,5)	26(76,5)	0,48
No	21(18,1)	95(81,9)	
Bevacizumab			
Si	3(13,0)	20(87,0)	0,47
No	26 (19,4)	108 (80,6)	

3. 2. b. En cada cohorte de pacientes

COHORTE A: Cáncer de próstata metastásico

En la Tabla 34 se describe la relación de las características clínicas con la presencia de trombosis. Se observó que la trombosis se asociaba con el tratamiento quimioterápico de forma significativa y había una tendencia a la asociación con los niveles de PSA ($p=0,07$).

Tabla 34. Relación entre las características clínico-patológicas y la presencia de trombosis en pacientes con carcinoma de próstata metastásico.

	Trombosis N=10 N (%)	No trombosis N=22 N (%)	P
Edad (mediana, rango)	72 (57-77)	72 (63-79)	0,43
IMC>35 kg/m²			
Si	2 (40,0)	3 (60,0)	0,65
No	8 (29,6)	19 (70,4)	
ECOG			
<2	5 (23,8)	16 (76,2)	0,21
≥2	5 (45,5)	6 (54,5)	
HTA			
Si	4 (26,7)	11 (73,3)	0,59
No	6 (35,5)	11 (64,7)	
Diabetes			
Si	3 (42,9)	4 (57,1)	0,45
No	7 (28,0)	18 (72,0)	
Tabaco			
Si	7 (36,8)	12 (63,2)	0,41
No	3 (23,1)	10 (76,9)	
Dislipemia			
Si	4 (36,4)	7 (63,6)	0,65
No	6 (28,6)	15 (71,4)	
Gleason			
<7	0	1 (100)	0,74
7	2 (28,6)	5 (71,4)	
>7	7 (35,0)	13 (65,0)	
Enfermedad alto riesgo			
Si	1 (7,1)	13 (92,9)	<0,01
No	9 (50,0)	9 (50,0)	
Metástasis visceral			
Si	1 (20,0)	4 (80,0)	0,55
No	9 (33,3)	18 (66,7)	
Metástasis ósea			
Alto riesgo	1 (9,1)	10 (90,9)	0,05
Bajo riesgo	6 (46,2)	7 (53,8)	
PSA (mediana, rango)	140 (61-697)	49(0,2-855)	0,07
FA (mediana, rango)	253,2 (89-1378,8)	289,8 (133,8-2135,4)	0,71
Tratamiento			
Docetaxel	10 (41,7)	14 (58,3)	0,04
Hormonoterapia	0	7 (100)	

COHORTE B: Cáncer colorrectal

En este grupo se observó que todos los eventos trombóticos ocurrieron en los pacientes con enfermedad metastásica (estadio IV) y no hubo trombosis en pacientes con enfermedad localizada (estadios II y III), sin embargo no se alcanzó la significación estadística aunque había una tendencia ($p= 0,08$). Además, el evento trombótico se asoció de manera significativa a la presencia de metástasis hepáticas como vemos en la Tabla 35. No se encontró asociación con las demás variables estudiadas.

Tabla 35. Relación de características clínico-patológicas con la presencia de trombosis en la cohorte de pacientes con cáncer colorrectal.

	Trombosis N=6 N (%)	No trombosis N=37 N (%)	P
Edad (mediana, rango)	65 (49-85)	66 (33-83)	0,63
Sexo			
Hombre	2 (8,3)	22 (91,7)	0,23
Mujer	4 (21,1)	15 (78,9)	
IMC>35 kg/m²			
Si	0	1 (100)	0,68
No	6 (14,3)	36 (85,7)	
ECOG			
<2	5 (14,3)	30 (85,7)	0,74
≥2	1 (20,0)	4 (80,0)	
HTA			
Si	2 (9,1)	20 (90,9)	0,35
No	4 (19,0)	17 (81,0)	
Diabetes			
Si	2 (14,3)	12 (85,7)	0,97
No	4 (13,8)	25 (86,2)	
Tabaco			
Si	1 (6,7)	14 (93,3)	0,31
No	5 (17,9)	23 (82,1)	
Dislipemia			
Si	2 (18,2)	9 (81,8)	0,64
No	4 (12,5)	28 (87,5)	
Quimioterapia previa			
Si	0	9 (100)	0,17
No	6 (17,6)	28 (82,4)	
Estadio			
II-III	0	13 (100)	0,08
IV	6 (20,0)	24 (80,0)	
Metástasis hepáticas			
Si	5 (27,8)	13 (72,7)	0,03
No	1 (4,0)	24 (96,0)	
Metástasis pulmonares			
Si	2 (22,2)	7 (77,8)	0,42
No	4 (11,8)	30 (88,2)	
Bevacizumab			
Si	3 (14,3)	18 (85,7)	0,95
No	3 (13,6)	19 (86,4)	

COHORTE C: Cáncer de pulmón

En el grupo de pacientes con cáncer de pulmón, solo observamos asociación de ECOG ≥ 2 con la presencia de trombosis especialmente en el grupo de pacientes con CNMP (Tabla 36).

Tabla 36. Relación de parámetros clínico-patológicos con la trombosis en la cohorte de pacientes con cáncer de pulmón (CNMP y CMP).

	CNMP			CMP		
	Trombosis N=11 N (%)	No Trombosis N=54 N (%)	P	Trombosis N=2 N (%)	No Trombosis N=15 N (%)	P
Edad mediana (rango)	70 (41-80)	64,5 (36-79)	0,77	59 (56-62)	64 (46-80)	0,36
Sexo						
Hombre	10 (16,9)	49 (83,1)	0,99	2 (13,3)	13 (86,7)	0,58
Mujer	1 (16,7)	5 (83,3)		0	2 (100)	
ECOG						
<2	6 (12,0)	44 (88,0)	0,02	1 (8,3)	11 (91,7)	0,49
≥2	5 (38,5)	8 (61,5)		1 (20,0)	4 (80,0)	
IMC>35 kg/m²						
Si	0	2 (100)	0,52	0	1 (100)	0,71
No	11(17,5)	52 (82,5)		2 (12,5)	14 (87,5)	
HTA						
Si	6 (21,4)	22 (78,6)	0,39	1 (14,3)	6 (85,7)	0,78
No	5 (13,5)	32 (86,5)		1 (10,0)	9 (90,0)	
Diabetes						
Si	3 (13,6)	19 (86,4)	0,61	0	4 (100)	0,40
No	8 (18,6)	35 (81,4)		2 (15,4)	2 (15,4)	
Tabaco						
Si	11 (19,0)	47 (81,0)	0,21	2 (11,8)	15 (88,2)	-
No	0	7 (100)		0	0	
Dislipemia						
Si	5 (20,8)	19 (79,2)	0,52	2 (28,6)	5 (71,4)	0,07
No	6 (14,6)	35 (85,4)		0	10 (100)	
Estadio						
II-III	4 (15,4)	22 (84,6)	0,79	1 (11,1)	8 (88,9)	0,93
IV	7 (17,9)	32 (82,1)		1 (12,5)	7 (87,5)	
Metástasis hepáticas						
Si	0	6 (100)	0,25	0	3 (100)	0,49
No	11 (18,6)	48 (81,4)		2 (14,3)	12 (85,7)	

3. 3. Relación entre las alteraciones de laboratorio y los eventos trombóticos

3. 3. 1. Hemograma

En la serie global de pacientes no observamos diferencias significativas en los valores basales del hemograma en función de la presencia o no de trombosis, como se observa en la Tabla 37.

Tabla 37. Relación de las tres series hematológicas con la presencia de trombosis en la serie global de pacientes.

	Trombosis N=29		No trombosis N=128		P
	Mediana	Rango	Mediana	Rango	
Hemoglobina (g/dL)	11,900	9,5-17,6	12,600	8,6-16,0	0,45
Leucocitos (x10 ³ /uL)	9,2	4,4-59,6	8,6	1,1-190	0,94
Plaquetas (x10 ³ /uL)	275	95-659	254	35,7-575	0,41

Sin embargo, en el análisis por cada cohorte por separado, observamos que en el grupo de cáncer colorrectal, los que presentaron trombosis se asociaban a niveles más bajos de Hb de forma significativa. Y en los pacientes con cáncer de próstata, observamos que aquellos que presentaron trombosis tenían plaquetas más elevadas de forma significativa (Tabla 38).

Tabla 38. Valores de hemograma basal en cada cohorte de pacientes seleccionando solo aquellos con enfermedad metastásica y en CNMP (estadio III-IV no operados).

	Próstata			CCR		
	Trombosis Mediana (rango) N=10	No Trombosis Mediana (rango) N=22	P	Trombosis Mediana (rango) N=6	No Trombosis Mediana (rango) N=37	P
Hemoglobina (g/dL)	12,1 (9,5-15,9)	12,9 (8,8-14,3)	0,54	10,4 (9,5-11,9)	11,6 (8,6-14,4)	0,06
Leucocitos (x10 ³ /uL)	7,15 (4,9-17,6)	6,9 (3,2-12,7)	0,15	7,9 (4,4-167)	8,55 (3,1-15,5)	0,49
Plaquetas (x10 ³ /uL)	249,5 (144-432)	209,5 (125-349)	0,08	298 (259-481)	287 (111-467)	0,14
	CNMP			CMP		
	Trombosis Mediana (rango) N=11	No Trombosis Mediana (rango) N=54	P	Trombosis Mediana (rango) N=2	No Trombosis Mediana (rango) N=15	P
Hemoglobina (g/dL)	12,0 (9,8-17,6)	13,0 (8,7-16)	0,75	12,4 (12-12,7)	13 (10-15)	0,79
Leucocitos (x10 ³ /uL)	9,8 (4,9-596)	9,3 (1,1-190)	0,78	4,75 (4,6-4,9)	9 (5,4-110)	0,01
Plaquetas (x10 ³ /uL)	262 (95-659)	259 (90-575)	0,71	203 (156-250)	284 (154-479)	0,25

3. 3. 2. Parámetros clásicos de la coagulación

3. 3. 2. a. En todos los pacientes

En el grupo global de pacientes, no observamos alteraciones relevantes en los parámetros basales de laboratorio que se asociaran a la presencia de trombosis como se observa en la Tabla 39.

Tabla 39. Parámetros clásicos de la coagulación en función de la presencia de trombosis en la serie global de pacientes.

	Trombosis N=29		No trombosis N=128		P
	Mediana	Rango	Mediana	Rango	
LDH (UI/L)	456	216-930	408	216-3954	0,29
Fibrinógeno (g/L)	4,01	0,78-6,15	4,42	1,88-7,26	0,33
DD (mg/L)	0,380	0,02-4,49	0,285	0,01-9,79	0,14
FvW (%)	227,5	97,0-613,1	197,1	45,7-734,5	0,26
TP (seg)	24,4	9,1-32,2	22,3	10,0-41,7	0,71

3. 3. 2. b. En cada cohorte de pacientes

En el grupo de cáncer de próstata se observó que los pacientes que desarrollaron trombosis tenían FvW más elevado frente a los pacientes que no presentaron trombosis de forma significativa (267% vs 199%, $p=0,02$) (Tabla 40). En el resto de grupos no se observó ninguna asociación destacada.

Tabla 40. Relación de parámetros de laboratorio basales con el evento trombotico en pacientes con cáncer de próstata estadio IV.

	Trombosis N=10		No Trombosis N=22		P
	Mediana	Rango	Mediana	Rango	
LDH (UI/L)	462	216-756	414	312-726	0,94
Fibrinógeno (g/L)	4,0	0,8-5,7	4,1	3-7,3	0,13
DD (mg/L)	0,545	0,2-1,496	0,240	0,008-2,677	0,30
FvW (%)	267	225-364	199,3	45,7-358	0,02
TP (seg)	22,8	9,1-28,4	13,4	10-28,4	0,42

Tabla 41. Relación de parámetros de laboratorio con el evento trombótico en pacientes con cáncer colorrectal (todos los pacientes).

	Trombosis N=6		No trombosis N=37		P
	Mediana	Rango	Mediana	Rango	
LDH (UI/L)	336,00	300,00-930,00	390,00	216,00-3918,00	0,89
Fibrinógeno (g/L)	3,33	2,54-5,58	4,08	1,88-7,04	0,25
DD (mg/L)	0,484	0,388-4,496	0,313	0,074-9,790	0,15
FvW (%)	223,00	97,00-232,00	207,35	49,60-571,00	0,72
TP (seg)	23,80	10,60-32,20	16,20	10,20-32,20	0,61

Tabla 42. Relación de parámetros de laboratorio basales con el evento trombótico en pacientes con cáncer colorrectal estadio IV.

	Trombosis N=6		No trombosis N=24		P
	Mediana	Rango	Mediana	Rango	
LDH (UI/L)	336	300-930	480	216-3918	0,49
Fibrinógeno (g/L)	3,3	2,5-5,6	4,1	1,9-6,2	0,28
DD (mg/L)	0,484	0,388-4,496	0,587	0,180-9,790	0,48
FvW (%)	223	97-232	239	49,6-571	0,38
TP(seg)	23,8	10,6-32,2	15,7	10,2-32,2	0,49

En el grupo de pacientes con cáncer de pulmón, se realizó el análisis en el grupo global y en pacientes con enfermedad avanzada (III-IV) en CNMP (Tabla 43) y en la cohorte de CMP se incluyeron todos los pacientes dado el pequeño tamaño de la muestra (Tabla 44). No se observaron diferencias en función de la presencia de trombosis.

Tabla 43. Parámetros analíticos en función de la presencia de trombosis en CNMP.

	TODOS			ESTADIO III-IV		
	Trombosis Mediana (rango) N=11	No Trombosis Mediana (rango) N=54	P	Trombosis Mediana (rango) N=10	No Trombosis Mediana (rango) N=49	P
LDH (UI/L)	444 (306-534)	396 (222-3954)	0,81	462 (312-534)	402 (222-3954)	0,81
Fibrinógeno (g/L)	4,22 (2,37-5,50)	4,71 (1,95-7,26)	0,25	4,3 (2,4-5,5)	4,7 (1,9-7,3)	0,48
DD (mg/L)	0,314 (0,019-3,390)	0,274 (0,024-9,359)	0,73	0,328 (0,019-3,390)	0,274 (0,024-9,359)	0,79
FvW (%)	167,35 (106-303)	193,15 (48,80-734,50)	0,48	167,4 (106-303)	274 (0,024-9,359)	0,51
TP (seg)	26,40 (26,30-31,20)	26,50 (10,00-41,70)	0,58	26,4 (26,3-31,2)	26,5 (10-41,7)	0,58

Tabla 44. Relación de parámetros de laboratorio basales con el evento trombotico en pacientes con CMP.

	Trombosis N=2		No trombosis N=15		P
	Mediana	Rango	Mediana	Rango	
LDH (UI/L)	312	228	402	3732	0,36
Fibrinógeno (g/L)	3,9	1,7-6,1	4,6	3,1-6,8	0,81
DD (mg/L)	0,791	0,272-1,309	0,311	0,053-0,730	0,37
FvW (%)	613,1	613,1-613,1	187,4	74-388,3	0,15
TP (seg)	-	-	31,7	31,7	-

3. 3. 3. Antitrombina

No se observaron diferencias en la actividad antitrombina en pacientes con o sin trombosis, ni en la serie global de pacientes ni en cada cohorte atendiendo al tipo de tumor como se puede ver en la Tabla 45. Sorprendentemente, los pacientes con deficiencia de antitrombina, no presentaron mayor número de eventos tromboticos.

Tabla 45. Mediana de actividad de antitrombina (%) en pacientes con o sin trombosis, en cada cohorte.

	Próstata			CCR			CNMP			CMP		
	ETE N=10	No ETE N=22	P	ETE N=6	No ETE N=37	P	ETE N=11	No ETE N=54	P	ETE N=2	No ETE N=15	P
Anti-FXa mediana %(rango)	101,9 (95,2- 111,6)	99,9 (78,1- 108,4)	0,47	95,9 (88,8- 99,2)	100,9 (38,6- 112,1)	0,61	91,7 (3,6- 101,4)	97,5 (44,7- 114,2)	0,16	95,3 (89,3- 101,4)	93,8 (74,8- 106,2)	0,83

Tabla 46. Relación entre deficiencia de antitrombina y trombosis atendiendo al tipo de tumor.

Anti-FXa	Próstata			CCR			CNMP			CMP		
	ETE N=10	No ETE N=22	P	ETE N=6	No ETE N=37	P	ETE N=11	No ETE N=54	P	ETE N=2	No ETE N=15	P
Deficiente N (%)	0	2 (100)		0	4 (100)		2 (18,82)	9 (81,8)		0	2 (100)	
Normal N (%)	10 (33,3)	20 (66,7)	0,32	6 (15,4)	33 (84,6)	0,39	9 (16,7)	45 (83,8)	0,91	2 (13,3)	13 (86,7)	0,58

3. 3. 4. Ruta de contacto

De los doce pacientes que presentaron activación de la ruta de contacto con bandas activadas de FXIIa, se observaron 3 eventos tromboticos, uno en un paciente con cáncer de próstata y dos en pacientes con CNMP (50%). No se observó asociación entre la activación de la ruta de contacto y la trombosis.

Tabla 47. Relación de pacientes que presentaron trombosis en función de la presencia de activación de FXII en cada cohorte. No se incluye CMP porque no hubo pacientes con activación de FXII.

	Próstata			CCR			CNMP		
	ETE N=10	No ETE N=22	P	ETE N=6	No ETE N=37	P	ETE N=11	No ETE N=54	P
FXIIa	1 (20%)	4 (80%)	0,52	0	3 (100%)	0,49	2 (50%)	2 (50%)	0,08

3. 3. 5. Trastornos de glicosilación

En este apartado fue interesante el hallazgo que se observó en el paciente número 1, que presentó una banda de hipoglicosilación tras recibir tratamiento con quimioterapia y coincidiendo con el momento agudo de la trombosis. Fue también interesante la evolución posterior, puesto que desde el inicio del tratamiento con HBPM, las bandas de hipoglicosilación fueron haciéndose cada vez menos intensas hasta ser prácticamente indetectables. Más adelante se desarrollará este caso particular.

No hubo eventos trombóticos en los demás pacientes a los que se detectaron bandas de hipoglicosilación, ni en aquellos que las tenían en la muestra basal, ni en los que las presentaron tras la administración de quimioterapia.

3. 3. 6. Relación de la concentración de ADN circulante con la trombosis

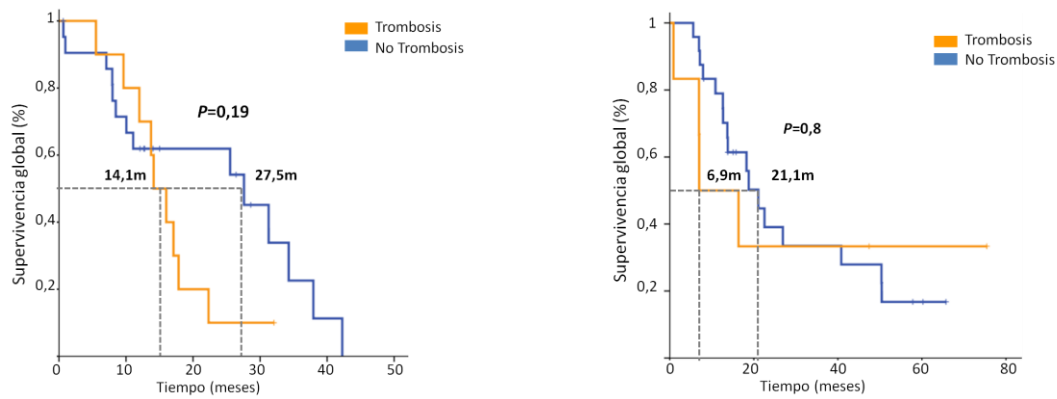
No hubo diferencias significativas en la concentración de ADNc entre los pacientes que habían tenido trombosis y los que no tuvieron. La mediana en los pacientes con trombosis fue de 53,5 ng/mL (rango 23-823) frente a 56 ng/mL (rango 13-2090), en los pacientes sin trombosis; $p= 0,68$. Cuando se analiza según el tipo de tumor, tampoco se observaron diferencias significativas en los niveles de ADNc, como vemos en la Tabla 48. Únicamente llama la atención que los pacientes con CMP que desarrollaron trombosis tenían una concentración elevada, 472 ng/mL, sin que las diferencias llegaran a alcanzar la significación estadística, probablemente por el bajo número de pacientes (solo dos pacientes presentaron trombosis en este grupo).

Tabla 48. Concentración de ADN circulante en estadios avanzados de cada cohorte de pacientes en función de la presencia o no de trombosis.

	Próstata			CCR estadio IV			CNMP estadio III-IV			CMP estadio III-IV		
	ETE N=10	No ETE N=22	P	ETE N=6	No ETE N=24	P	ETE N=10	No ETE N=49	P	ETE N=2	No ETE N=13	P
ADNc	65	64	0,98	111	72	0,99	46	47	0,86	472	60	0,09
Median. (rango)	(23-100)	(14-208)		(35- 230)	(22- 2090)		(30- 329)	(14- 334)		(122- 823)	(41- 200)	
ng/mL												

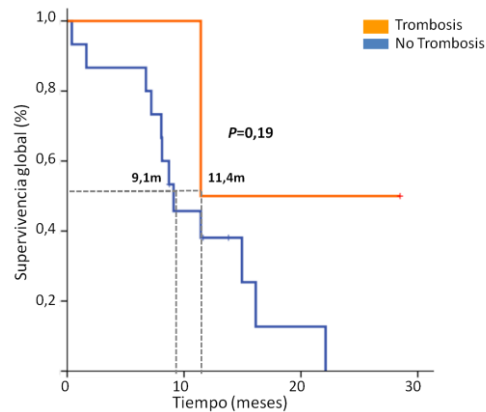
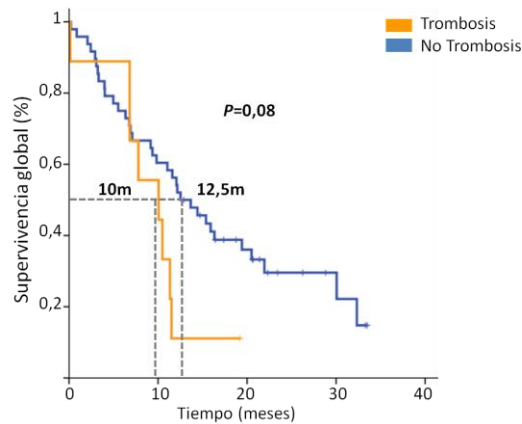
3. 4. Relación entre el desarrollo del evento trombótico y la evolución tumoral

Aunque hay que tener en cuenta que este estudio no fue diseñado para observar el impacto de la trombosis en la supervivencia, no se observó diferencias en supervivencia en función de la presencia o no de trombosis, ni en el análisis de la población general, ni en cada cohorte de pacientes (Figura 13).



Cohorte A: Próstata

Cohorte B: cáncer colorrectal



Cohorte C a: CNMP

Cohorte C b: CMP

Figura 13. Gráficas de supervivencia global en función de la presencia de trombosis. La gráfica de arriba a la izquierda corresponde a la cohorte de cáncer de próstata estadio IV, la de arriba a la derecha a CCR estadio IV, la de abajo a la izquierda CNMP estadio III-IV y la de abajo a la derecha CMP.

4. Efecto de la quimioterapia sobre el sistema hemostático en cáncer colorrectal

4. Efecto de la quimioterapia sobre el sistema hemostático en cáncer colorrectal

Este estudio se realizó en 25 pacientes con cáncer de colon, 13 (52%) eran estadio II-III e iban a recibir tratamiento adyuvante y 12 (48%) eran estadio IV. Se recogió muestra previa al inicio de quimioterapia y tras administración de la misma, con el objetivo de observar los cambios inducidos por el tratamiento en los parámetros del sistema hemostático analizados. Las muestras pre y post-tratamiento estaban separadas una media de 15 ± 6 semanas en el grupo de pacientes estadio II-III y 8 ± 10 semanas en el grupo de pacientes estadio IV, que en muchos casos coincidía con la reevaluación. En la Tabla 49 se describen las características clínicas de este grupo de pacientes:

Tabla 49. Características clínicas de los pacientes con cáncer de colon con muestras pre y post tratamiento.

	N (%)
N	25
Edad (años) Mediana (rango)	67 (38-83)
IMC Mediana (rango)	27 (23-37)
Sexo	
Hombre	13 (52)
Mujer	12 (48)
ECOG	
<2	25 (100)
≥2	0 (0)
Estadio	
II-III	13 (52)
IV	12 (48)
Cardiopatía isquémica	
Si	1 (4)
No	24 (96)
Diabetes	
Si	10 (40)
No	15 (60)
Habito enólico	
Si	1 (4)
No	24 (96)
Tabaco	
Si	8 (32)
No	17 (68)
Dislipemia	
Si	8 (32)
No	17 (68)
HTA	
Si	14 (56)
No	11 (44)
Quimioterapia previa	
Si	3 (12)
No	22 (88)
Nº líneas previas	0-4

Metástasis hepáticas		
Si		7 (28)
No		18 (72)
Cirugía de metástasis hepáticas		
Si		4 (16)
No		21 (84)
Evento tromboembólico		
Si		2 (8)
No		23 (92)
Tratamiento		
Fluoropirimidina		7 (28)
Oxaliplatino-fluoropirimidina		18 (72)
Respuesta a tratamiento		
Respuesta completa		11 (44)
Respuesta parcial		6 (24)
Enfermedad estable		5 (20)
Progresión		3 (12)
Progresión		
Si		11 (44)
No		14 (56)
Exitus		
Si		6 (24)
No		19 (76)
Causa de muerte		
Progresión		5 (83)
Toxicidad		0 (0)
Enfermedad tromboembólica		0 (0)
Otros		1 (17)

El análisis estadístico se realizó en todos los pacientes en general, aunque algunos pacientes fueron estudiados de manera individual debido a las alteraciones observadas. Los resultados se muestran en la Tabla 50, se observó un ligero descenso del valor FvW y de la concentración de ADNc. Nos llamó la atención que los pacientes con enfermedad localizada que partían de niveles altos de fibrinógeno y FvW, éstos disminuían tras el tratamiento hasta casi valores normales. Sin embargo, había un aumento de LDH y DD tras el tratamiento (aunque no significativo) como reflejo de la lisis celular. En contraposición, fue llamativo que en pacientes estadio IV, que tenían niveles basales más elevados de LDH y ADNc, éstos disminuían con el tratamiento. No mostramos los resultados porque el número de pacientes es muy pequeño y no se alcanzó la significación estadística.

Tabla 50. Parámetros del sistema hemostático en muestras pre y post-quimioterapia en pacientes con cáncer colorrectal.

	Muestra preQT Media±desv típica	Muestra postQT Media±desv típica	Diferencia Media±desv típica	P
Fibrinógeno (g/L)	4,34±1,42	3,9±6,1	0,44±1,3	0,48
LDH (UI/L)	771,0±1271,8	366,0±49,1	405,0±1298,7	0,16
FvW (%)	190,0±68,9	155,1±76,4	34,9±102,9	0,67
DD (mg/L)	0,362±0,166	0,620±0,604	-0,257±0,654	0,31
TP (seg)	20,68±7,6	20,66±6,01	0,02±4,8	0,50
Anti-FXa (%)	92,8±16,9	94,4±14,2	-1,6±7,2	0,37
ADNc (ng/ml)	169,1±360,7	75,8±52,5	93,3±369,4	0,75

El estudio electroforético mediante western blot de diferentes proteínas plasmáticas del sistema hemostático mostró que la quimioterapia en general no provocaba cambios significativos en ninguna de las proteínas hemostáticas analizadas. En antitrombina, tampoco observamos formas aberrantes o incremento de la forma latente. Sin embargo, en el grupo de pacientes estadio IV, observamos dos casos puntuales, en los que aparecían bandas hipoglicosiladas de antitrombina, tras la administración de quimioterapia y que detallamos a continuación:

Paciente 1

Se trata de un hombre de 58 años, sin antecedentes médico-quirúrgicos de interés, ni hábitos tóxicos (nunca bebedor ni fumador). Fue diagnosticado en marzo 2007 de un adenocarcinoma de colon T3N1M1 estadio IV con metástasis hepáticas. Fue incluido en el estudio antes de iniciar primera línea de tratamiento, que recibió con quimioterapia esquema oxaliplatino, capecitabina y bevacizumab, entre septiembre 2007 y febrero 2008. Presentó buena tolerancia al tratamiento e hizo una respuesta parcial según criterios RECIST. Después de la primera reevaluación fue sometido a cirugía el tumor primario mediante hemicolectomía derecha y resección de la metástasis hepática única que tenía, quedando en respuesta completa hasta diciembre de 2013, fecha de la última visita. Se recogió muestra antes de cada ciclo de quimioterapia que se administraba cada 15 días. Presentó un evento trombótico en octubre 2007, que coincide con el momento de la muestra número 3 (previo al ciclo 3).

Aunque el estudio de antitrombina, mediante gel SDS en condiciones reducidas, no detectaba incremento significativo de formas hipoglicosiladas (Figura 14), sí presentaba aumento de formas hipoglicosiladas de α 1-antitripsina, siendo la muestra del ciclo 3, cuando presentó el evento trombótico la que mayor niveles de formas hipoglicosiladas presentaba. Las muestras posteriores mantienen las formas hipoglicosiladas aunque con bandas de hipoglicosilación de menor intensidad. El patrón electroforético observado fue muy similar aunque más suave que el que presentan los pacientes con trastornos de glicosilación congénita, en concreto los pacientes PMM2-CDG, el desorden más frecuente dentro de su rareza (Figura 14).

El estudio de un potencial desorden de glicosilación en este paciente se completó con el análisis de las glicofomas de transferrina (otra N-glicoproteína hepática) mediante HPLC. Este procedimiento es el empleado para diagnosticar los trastornos de glicosilación congénitos.⁹² Aunque los niveles de asialo y disialo transferrina son menores que los encontrados en pacientes PMM2-CDG, la proporción di-tri sialotransferrina es elevada, lo que junto al patrón electroforético sugieren la existencia de un desorden de glicosilación tipo 1 (Figura 14).

La secuenciación del gen *PMM2* en este paciente, no mostró alteraciones moleculares relevantes en los exones y regiones flanqueantes.

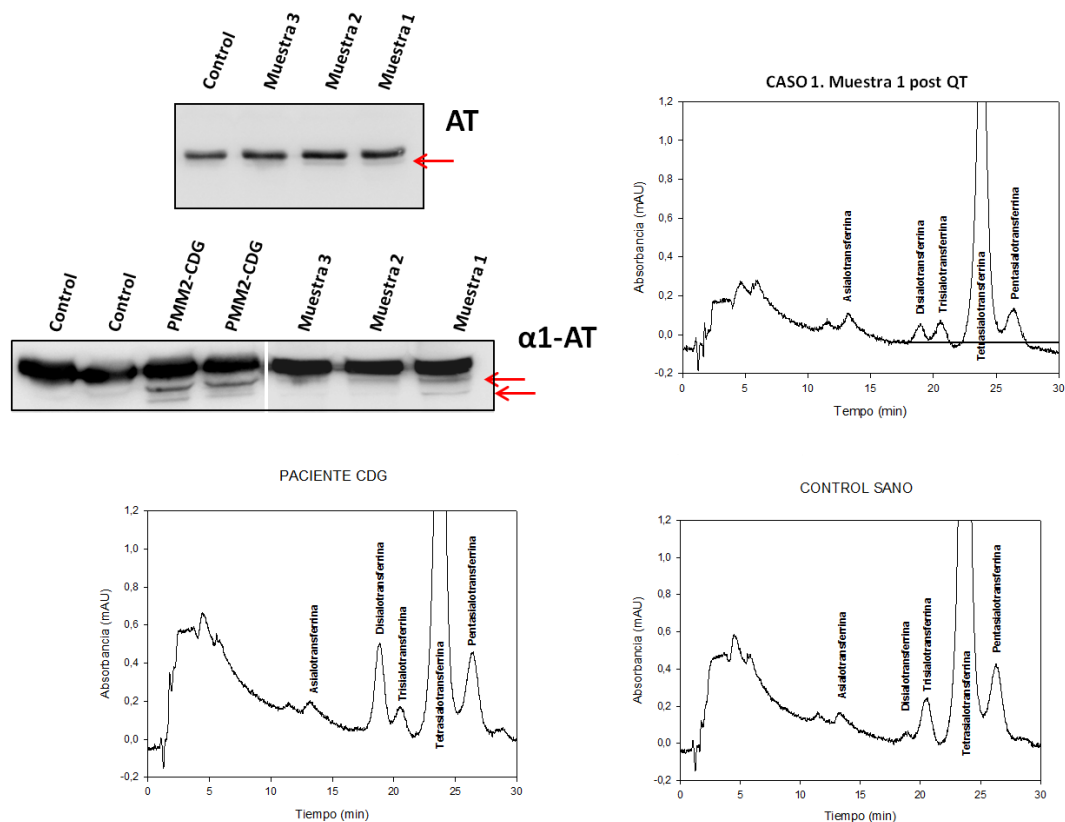


Figura 14. Detección de formas hipoglicosiladas (flechas) de antitrombina (AT), α 1-antitripsina (detectadas mediante western blot) y transferrina (identificadas mediante HPLC) en plasma del paciente 1, con cáncer de colon en diferentes momentos pre y post-quimioterapia (QT). Como controles se emplean pacientes PMM2-CDG con trastorno congénito de glicosilación y controles sanos.

Paciente 126

Se trata de una mujer de 61 años, sin antecedentes de interés, sin hábitos tóxicos y con función hepática normal. Fue diagnosticada en mayo 2009 de un adenocarcinoma de colon T3N1M1, estadio IV, con metástasis hepáticas extensas y metástasis pulmonares. El estatus mutacional KRAS era desconocido. Fue incluida en el estudio previo al inicio de la primera línea de tratamiento, que recibió con capecitabina y oxaliplatino entre junio y noviembre de 2009. La tolerancia al tratamiento fue buena pero la respuesta escasa, ya que solo se consiguió estabilización de la enfermedad. En enero 2010 presentó progresión tumoral y se cambió el tratamiento a CPT11-bevacizumab. En esta ocasión no hubo respuesta objetiva y falleció en mayo 2010, a los 5 meses. No presentó eventos tromboticos durante la evolución de su enfermedad.

Se recogió muestra para el análisis antes del ciclo 1 y a las 4 semanas de tratamiento. Los parámetros de la coagulación estudiados no presentaron cambios relevantes tras la administración del tratamiento. Llamaba la atención los niveles altos de DD mantenidos (1,4mg/L y 1,2mg/L en la muestra pre y post-tratamiento). La actividad antitrombina fue normal en todo momento, sin cambios relevantes entre ambas muestras (104% y 90%, pre y post-tratamiento).

La presencia de formas hipoglicosiladas de α 1-AT se detectaron en la segunda muestra, recogida a las 4 semanas de iniciar el tratamiento de quimioterapia (Figura 15) y de nuevo, el patrón electroforético fue muy similar aunque más suave que el que presentan los pacientes con trastornos de glicosilación congénita, en concreto los pacientes PMM2-CDG (Figura 15). El estudio de las glicofomas de transferrina mediante HPLC mostró un sutil defecto de glicosilación tipo 1 (Figura 15).

Finalmente, tampoco identificamos alteraciones moleculares relevantes en los exones y regiones flanqueantes de *PMM2*.

Por otro lado, no se observó activación de la ruta de contacto inducida por el tratamiento, no se detectaron formas activadas de FXII o FXI.

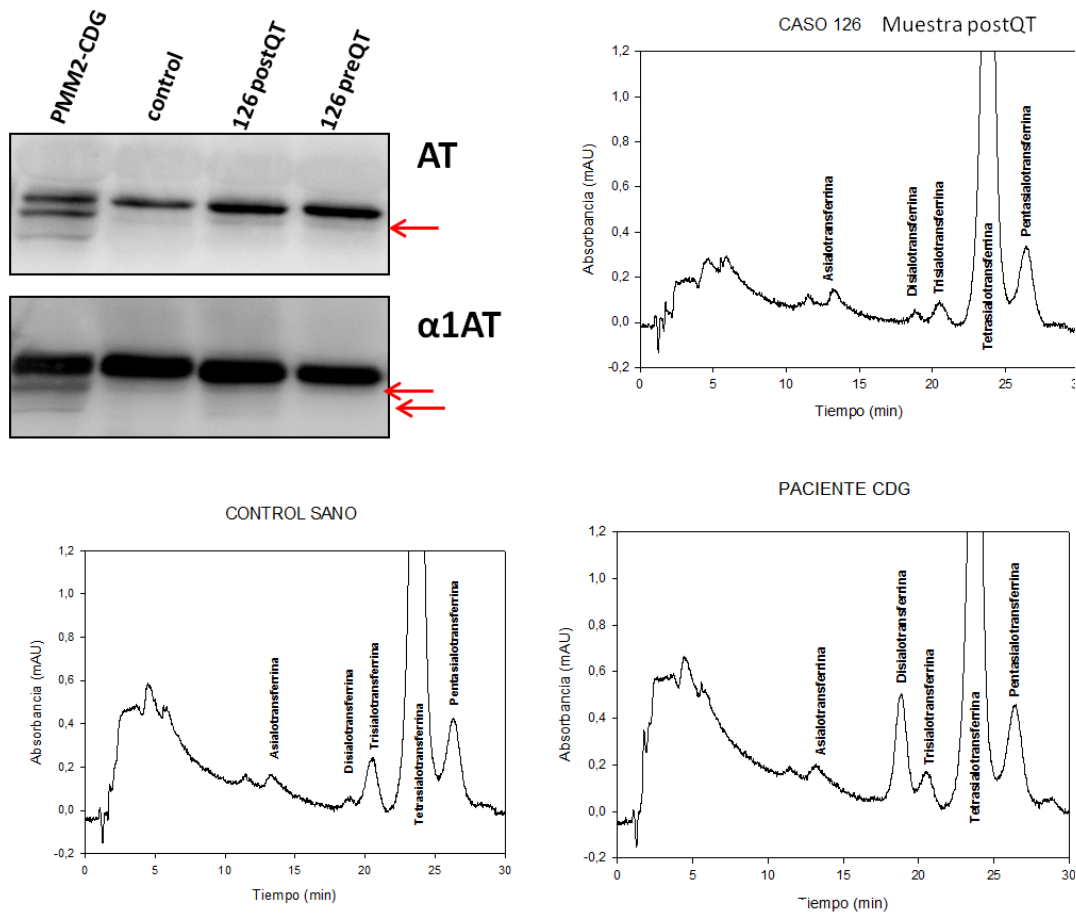


Figura 15. Detección de formas hipoglicosiladas (flechas) de antitrombina (AT), $\alpha 1$ -antitripsina (detectadas mediante western blot) y transferrina (identificadas mediante HPLC) en plasma del paciente 126, con cáncer de colon pre y post-quimioterapia (QT). Como controles se emplean pacientes PMM2-CDG con trastorno congénito de glicosilación y controles sanos.

5. Correlación entre los parámetros estudiados del sistema hemostático y la evolución de la enfermedad

5. Correlación entre los parámetros estudiados del sistema hemostático y la evolución de la enfermedad

5.1. Hemograma

En las tablas 51 y 52 se detalla el valor pronóstico de supervivencia global y libre de progresión de las principales alteraciones observadas en las tres series hematológicas: Hb<10g/dL, leucocitos altos (por encima del rango de la normalidad establecido en el laboratorio) y plaquetas altas (por encima del rango de laboratorio). En los pacientes con cáncer de próstata observamos que la trombocitosis tenía valor pronóstico de supervivencia global (Tabla 51) y libre de progresión (Tabla 52). Sin embargo, estos resultados fueron a expensas de un único paciente que presentaba trombocitosis en el momento de inclusión en el estudio y tuvo una supervivencia de 5,5 meses, mucho más corta que la mediana de supervivencia de la cohorte de estudio que fue 17,7 meses. Por este motivo, estos resultados deberían ser confirmados en series más amplias.

Tabla 51. Valor pronóstico de supervivencia global de las alteraciones del hemograma en cada cohorte de pacientes.

	Próstata		CCR		CNMP		CMP	
	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P
Hb< 10 (g/dL)	0,8 (0,6-1,04)	0,31	0,6 (0,8-2,2)	0,48	3,2 (0,9-10,7)	0,06	7,5 (0,7-82,6)	0,10
Leucocitos altos	0,9 (0,3-2,9)	0,93	1,6 (0,6-4,4)	0,37	3,1(1,7-5,9)	<0,01	9,8 (1,7-55,6)	0,01
Plaquetas altas	14,5 (1,3-159,9)	0,03	0,7 (0,2-2,5)	0,62	1,9 (0,9-4,5)	0,10	10,4 (1,7-63,5)	0,01

Tabla 52. Valor pronóstico de supervivencia libre de progresión de las alteraciones del hemograma en cada cohorte de pacientes.

	Próstata		CCR		CNMP		CMP	
	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P
Hb< 10 (g/dL)	0,8 (0,6-1,04)	0,12	1,1 (0,4-2,7)	0,99	3,5 (0,8-15,5)	0,09	0,04 (0-<0,01)	0,85
Leucocitos altos	0,7 (0,24-2,04)	0,51	2,3 (0,9-5,4)	0,05	2,4 (1,3-4,7)	<0,01	9,8 (1,7-55,6)	0,01
Plaquetas altas	14,5 (1,3-159,9)	0,03	0,7 (0,2-2,1)	0,53	2,1 (0,9-4,9)	0,06	10,4 (1,7-63,5)	0,01

En los pacientes con cáncer colorrectal se observó que los leucocitos altos al diagnóstico se asociaban con peor supervivencia libre de progresión (Figura 16).

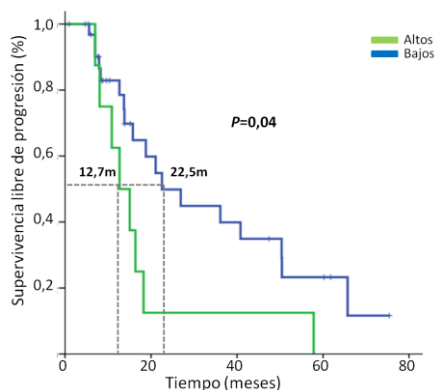


Figura 16. Curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de progresión en CCR en función de tener leucocitos altos al diagnóstico o no. Mediana de SLP fue de 12,7 meses frente a 22,5 meses, HR=2.3, IC 95%: 0.9-5.4; $p=0.05$.

En el grupo de pacientes con CNMP, se observó que los niveles altos de leucocitos al diagnóstico se asociaban con peor supervivencia global y peor supervivencia libre de progresión (Figura 17). Además, esta asociación se mantenía cuando analizamos sólo los pacientes estadios III-IV no operados (N= 60) (Figura 18).

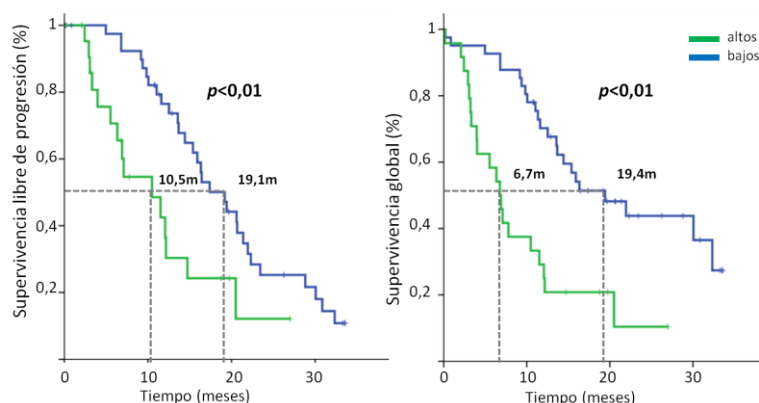


Figura 17. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia libre de progresión (izquierda) y global (derecha) en pacientes con CNMP, en función de tener un recuento elevado o bajo de leucocitos al diagnóstico. La mediana de supervivencia libre de progresión fue de 10,5 meses en grupo con leucocitos altos y 19,1 meses en grupo con leucocitos bajos, HR= 2.4, IC 95%:1.3-4.7; $p< 0.01$. La mediana de supervivencia global fue de 6,7 meses en el grupo con leucocitos altos y 19,4 meses en el grupo con leucocitos bajos, HR= 3.1, IC 95%: 1.7-5.9; $p< 0.01$.

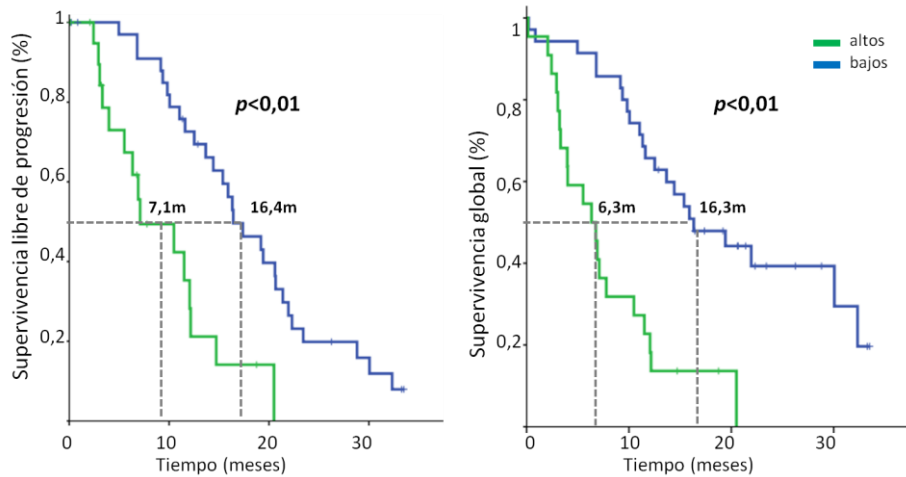


Figura 18. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia libre de progresión (izquierda) y global (derecha) para pacientes con CNMP estadio III-IV no operados, en función de tener un recuento elevado o bajo de leucocitos al diagnóstico. La mediana de supervivencia libre de progresión fue de 7,1 meses en pacientes con leucocitos altos basales frente a 16,4 meses en los demás pacientes, HR= 3.5, IC 95%:1.7-7.1; $p < 0.01$. La mediana de supervivencia global fue de 6,3 meses en el grupo de pacientes con leucocitos altos basales, frente a 16,3 meses en los demás pacientes, HR= 3.8, IC 95%: 1.9-7.3; $p < 0.01$.

En el grupo de CMP se observó que tanto las plaquetas altas como los leucocitos altos al diagnóstico, se asociaban con peor supervivencia global y supervivencia libre de progresión (Figura 19).

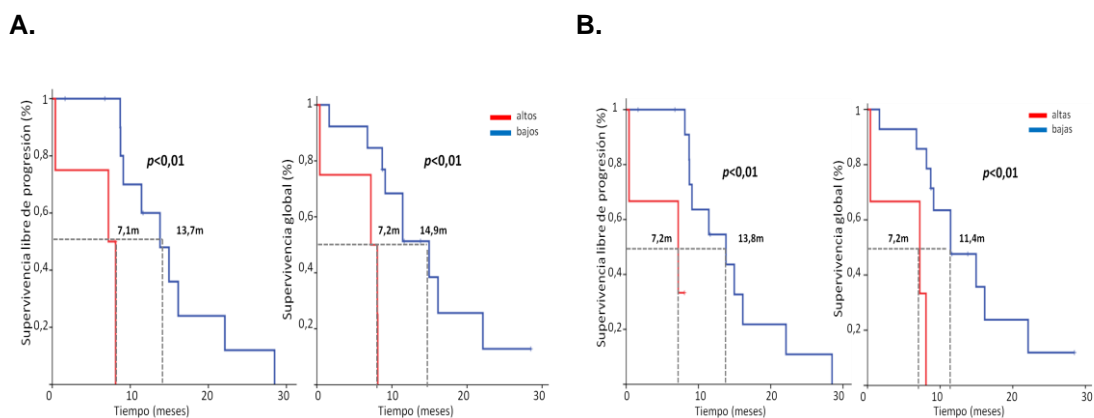


Figura 19. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia (libre de progresión y supervivencia global) en CMP, en función de tener leucocitos altos al diagnóstico (A) o plaquetas altas al diagnóstico (B). Los pacientes con leucocitos altos al diagnóstico tenían una mediana de supervivencia de 7,2 meses frente a 14,9 meses en los pacientes sin leucocitos altos, HR= 9.8, IC 95%: 1.7-55.6; $p = 0.01$. Los pacientes con plaquetas altas al diagnóstico tuvieron una mediana de supervivencia de 5,2 meses frente a 12,9 meses en el resto de los casos, HR= 10.4, IC 95%: 1.7-63.5; $p = 0.01$.

5. 2. Parámetros clásicos de la coagulación

En este apartado analizamos la asociación con la supervivencia global (Tabla 53) y libre de progresión (Tabla 54) de las alteraciones de los parámetros clásicos de la coagulación observadas, en todos los pacientes y en los pacientes con enfermedad avanzada (CCR estadio IV, CNMP estadios III-IV no operados y CMP estadios III-IV). Para los parámetros LDH, DD y FvW, tomamos como punto de corte, la mediana observada en cada cohorte de pacientes y estudiamos la asociación de tener niveles por encima de la mediana con la supervivencia. Para el fibrinógeno se tomó como punto de corte el 4 (límite alto de la normalidad).

Tabla 53. Parámetros clásicos de la coagulación y valor pronóstico de supervivencia global en cada cohorte de pacientes.

	Próstata		CCR		CNMP		CMP	
	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P
LDH alta (UI/L)	2,9 (1,1-7,3)	0,02	0,4 (0,2-1,1)	0,08	1,4 (0,7-2,7)	0,30	2,1 (0,5-7,5)	0,28
Fibrinógeno alto (g/L)	1,4 (0,6-3,6)	0,43	1,1 (0,7-1,5)	0,69	1,3 (0,7-2,6)	0,37	1,6 (0,6-5,8)	0,45
DD alto (mg/L)	3,1 (1,1-8,2)	0,02	1,8 (0,8-4,3)	0,17	1,7 (0,9-3,2)	0,08	1,7 (0,5-5,2)	0,38
FvW alto (%)	2,9 (1,1-7,5)	0,03	3,7 (1,1-12,6)	0,04	2,9 (1,6-5,6)	<0,01	1,4 (0,5-4,1)	0,56
TP (seg)	0,9 (0,9-1,05)	0,77	1,1 (0,9-1,1)	0,52	0,9 (0,9-1,1)	0,81	-	-

Tabla 54. Parámetros clásicos de la coagulación y valor pronóstico de supervivencia global en pacientes con enfermedad avanzada.

	Próstata		CCR estadio IV		CNMP estadio III- IV		CMP estadio III-IV	
	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P
LDH alta (UI/L)	2,9 (1,1-7,3)	0,02	0,5 (0,2-1,3)	0,16	1,4 (0,7-2,7)	0,30	1,3 (0,3-4,8)	0,71
Fibrinógeno alto (g/L)	1,4 (0,6-3,6)	0,43	1,9 (0,8-4,6)	0,14	1,2 (0,6-2,4)	0,59	2,1 (0,6-7,7)	0,25
DD alto (mg/L)	3,1 (1,1-8,2)	0,02	1,5 (0,6-3,8)	0,36	2,1 (1,1-3,9)	0,02	1,6 (0,5-5,1)	0,40
FvW alto (%)	2,9 (1,1-7,5)	0,03	1,9 (0,8-4,7)	0,17	2,7 (1,4-5,1)	<0,01	1,01 (0,3-3,1)	0,99
TP (seg)	0,9 (0,9-1,05)	0,77	1,1 (0,9-1,1)	0,23	0,99 (0,9-1,1)	0,81	-	-

Tabla 55. Valor pronostico de supervivencia libre de progresión de las alteraciones de los parámetros clásicos de la coagulación en cada cohorte de pacientes.

	Próstata		CCR		CNMP		CMP	
	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P
LDH alta (UI/L)	2,8 (1,2-6,5)	0,01	0,3 (0,1-0,8)	0,01	1,3 (0,7-2,5)	0,38	5,3(0,7-41,9)	0,11
Fibrinógeno alto (g/L)	0,9 (0,4-2,1)	0,93	1,1 (0,8-1,5)	0,66	1,3 (0,7-2,5)	0,38	3,9 (0,9-16,9)	0,06
DD alto (mg/L)	2,3 (1,01-5,2)	0,04	1,4 (0,6-2,9)	0,46	1,5 (0,8-2,8)	0,16	1,1 (0,4-3,9)	0,83
FvW alto (%)	1,3 (0,6-2,7)	0,55	1,7 (0,7-4,1)	0,23	2,4 (1,3-4,4)	<0,01	0,8 (0,2-2,7)	0,69
TP (seg)	0,9 (0,9-1,05)	0,78	1,1 (0,9-1,1)	0,39	1,1 (0,9-1,2)	0,15	-	-

Tabla 56. Valor pronostico de supervivencia libre de progresión de las alteraciones de los parámetros clásicos de la coagulación en estadios avanzados.

	Próstata		CCR estadio IV		CNMP estadio III-IV		CMP estadio III-IV	
	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P
LDH alta (UI/L)	2,8 (1,2-6,5)	0,01	0,35 (0,1-0,8)	0,02	1,3 (0,7-2,5)	0,38	34,6 (0,04->1000)	0,29
Fibrinógeno alto (g/L)	0,9 (0,4-2,1)	0,93	2,1 (0,9-4,8)	0,07	1,2 (0,6-2,3)	0,61	3,9 (0,9-17,8)	0,08
DD alto (mg/L)	2,3 (1,01-5,2)	0,04	1,2 (0,5-2,7)	0,64	2,0 (1,1-3,7)	0,03	1,3 (0,4-4,5)	0,69
FvW alto (%)	1,3 (0,6-2,7)	0,55	1,3 (0,6-2,8)	0,56	1,9 (1,1-3,7)	0,03	0,6 (0,2-2,3)	0,52
TP (seg)	0,9 (0,9-1,05)	0,78	1,1 (0,9-1,1)	0,29	1,1 (0,9-1,2)	0,15	-	-

COHORTE A: Cáncer de próstata metastásico

En el grupo de pacientes con cáncer de próstata metastásico se observó que la LDH presentaba valor pronóstico. Se tomó como punto de corte el valor de la mediana de la serie, 432 UI/L, de manera que pacientes con LDH por encima de dicho valor tenían peor pronóstico: peor supervivencia libre de progresión con una mediana de 12,1 meses frente a 25,5 meses (HR= 2.8, IC 95%: 1.2-6.5; $p= 0.01$) y peor supervivencia global con una mediana de 10,1 meses vs 27,6 meses (HR= 2.9, IC 95%: 1.1-7.3; $p= 0.02$) como podemos observar en la Figura 20.

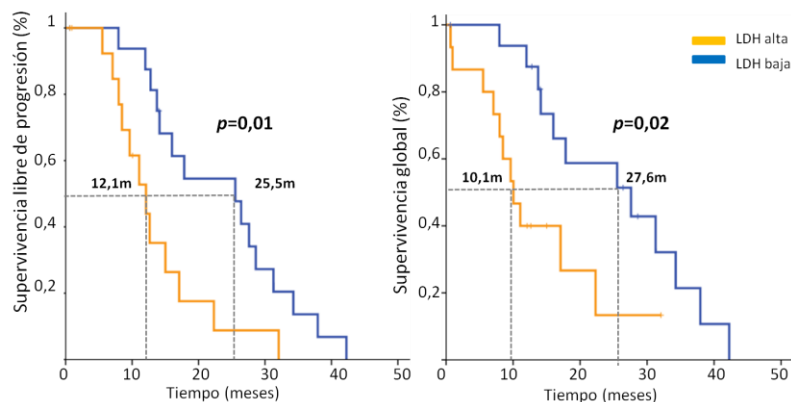


Figura 20. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia libre de progresión y supervivencia global en pacientes con cáncer de próstata en función de tener LDH alta o baja, tomando como punto de corte la mediana (432 UI/L).

El DD tenía valor pronóstico. Tomando como punto de corte el valor de la mediana, 0,322 mg/L, los pacientes que tenían DD elevado presentaron peor supervivencia global frente a los que tenían DD por debajo de la mediana: 10,1 meses frente a 27,6 meses con HR= 3.1, IC 95%:1.1-8.2; $p= 0.02$ y peor supervivencia libre de progresión con una mediana de 12,1 meses frente a 25,5 meses, HR= 2.3, IC 95%:1.01-5.2; $p= 0.04$ (Tabla 53-55 y Figura 21).

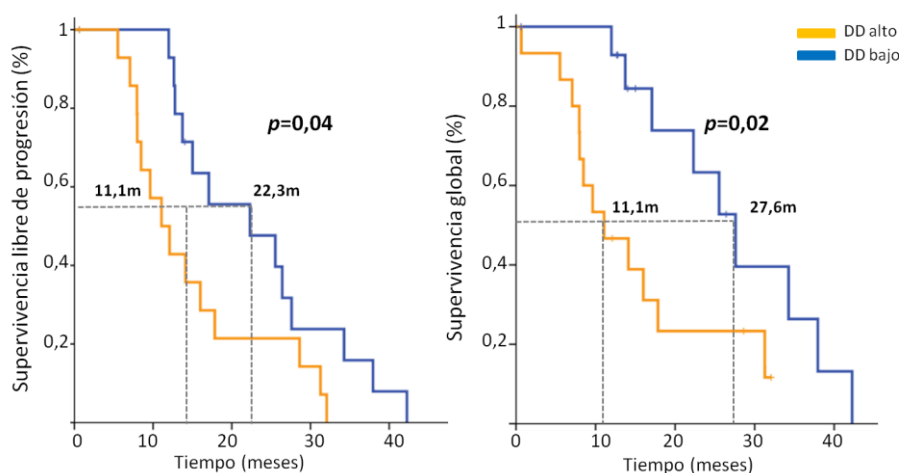


Figura 21. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia libre de progresión y supervivencia global en pacientes con cáncer de próstata en función de tener dímero D alto (por encima de 0,322mg/L) o bajo (por debajo de 0,322 mg/L).

Además, los niveles de DD se correlacionaron con el valor de PSA en el mismo momento de la extracción de la muestra de forma significativa, pero no con los valores de fosfatasa alcalina (Figura 22).

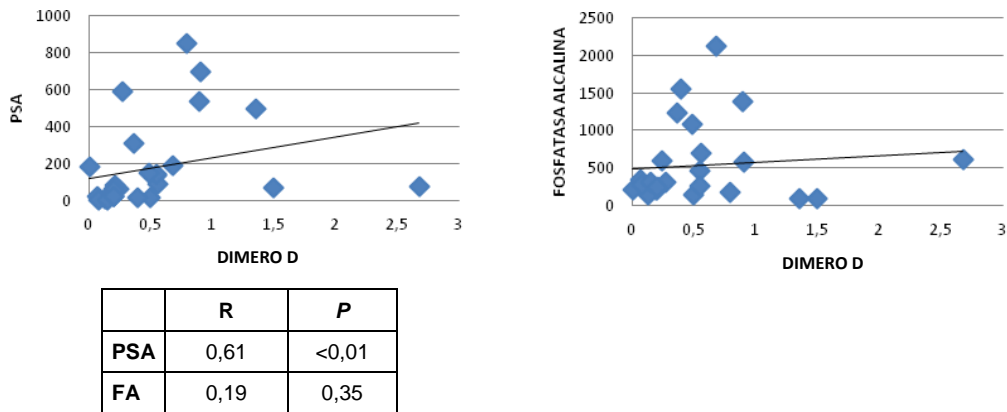


Figura 22. Correlación entre los niveles de dímero D y PSA (derecha) y los niveles de dímero D y Fosfatasa Alcalina (izquierda).

Finalmente, también el FvW tenía valor pronóstico en cuanto a supervivencia global. Tomando como punto de corte el valor de la mediana, 231%, los pacientes que tenían FvW elevado presentaron peor supervivencia global frente a los que tenían FvW por debajo de la mediana: 11,1 meses frente a 34,2 meses con HR= 2,9, IC 95%:1.1-7.5; $p= 0.03$ (Tabla 53 y Figura 23). Sin embargo no hubo diferencias significativas en la supervivencia libre de progresión.

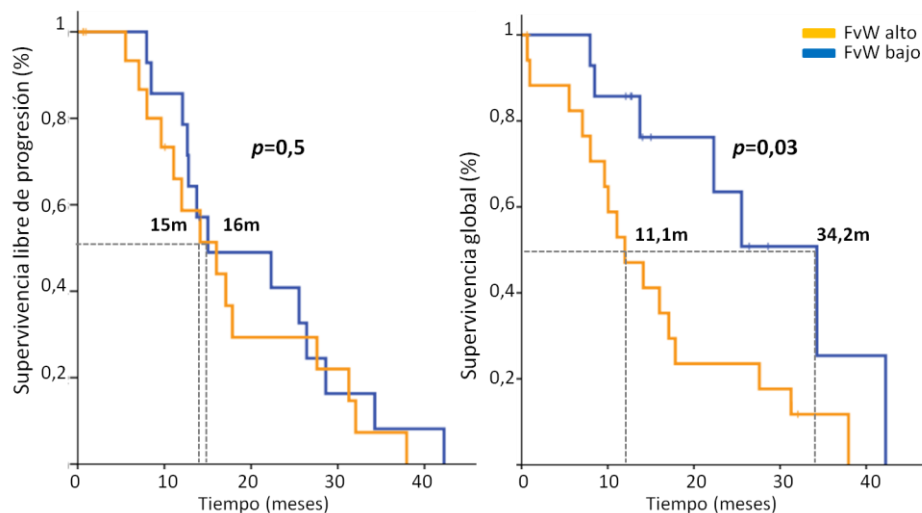


Figura 23. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia libre de progresión y supervivencia global en pacientes con cáncer de próstata en función de tener FvW alto (por encima de 231%) o bajo (por debajo de 231%).

COHORTE B: Cáncer colorrectal

Se observó que tener FvW alto (por encima de 210%, mediana observada) se asociaba a peor supervivencia global con HR= 3.7, IC 95%: 1.1-12.6; $p= 0.04$ (Tabla 53), pero no se observó asociación con supervivencia libre de progresión (Tabla 55). Sin embargo, cuando analizamos los pacientes estadio IV no observamos asociación con la supervivencia (Tabla 54 y 56). En pacientes estadio II-III no se encontró dicha asociación con la supervivencia (datos no mostrados).

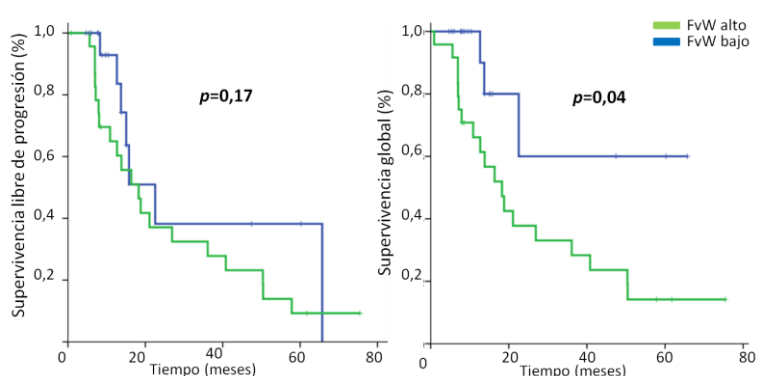


Figura 24. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia libre de progresión y supervivencia global en pacientes con cáncer colorrectal en función de tener FvW alto (por encima de 210%) o bajo (por debajo de 210%).

COHORTE C: Cáncer de pulmón

a. Carcinoma no microcítico de pulmón

La mediana de DD en CNMP fue de 0,282mg/L. En este grupo se observó que valores elevados de DD se asociaban a peor supervivencia global y libre de progresión en estadios avanzados (Tabla 54 y 56) (Figura 25)

La mediana de FvW fue 187%. Tener valores por encima de la mediana al diagnóstico se asoció a peor supervivencia global (Tabla 53 y 54) y peor supervivencia libre de progresión (Tabla 55 y 56), tanto en la cohorte global como en estadios avanzados (Figura 26).

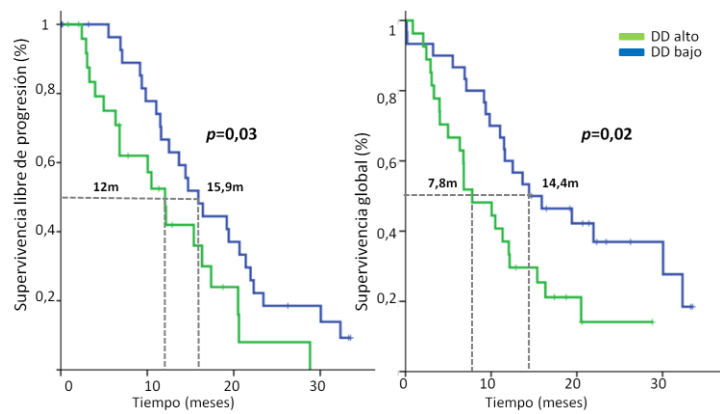


Figura 25. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia libre de progresión y supervivencia global en pacientes con cáncer CNMP estadio III-IV no operado en función de tener DD alto o bajo.

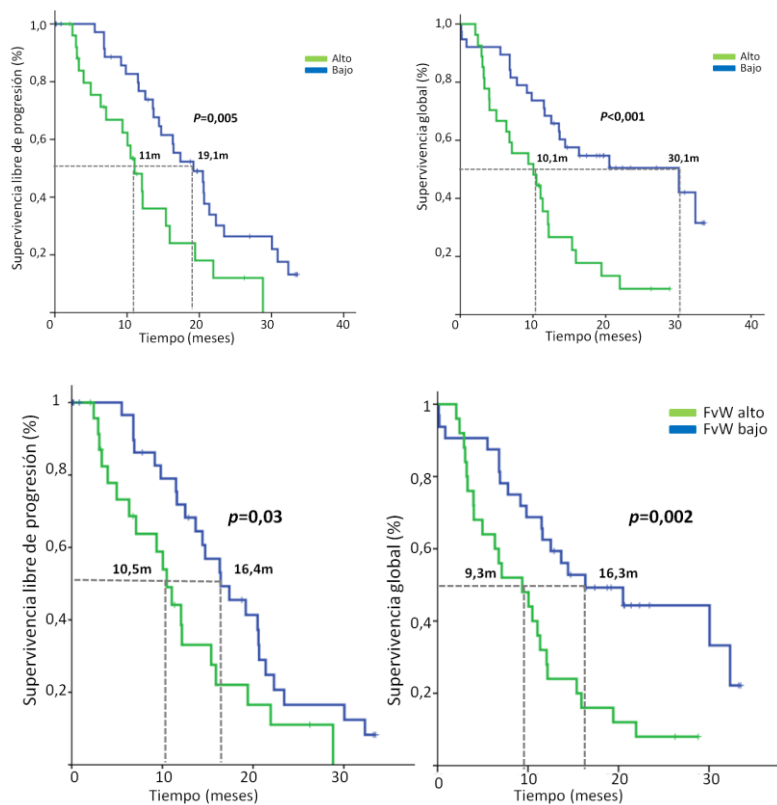


Figura 26. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia libre de progresión y supervivencia global en función de tener FvW alto o bajo al diagnóstico en la cohorte global de CNMP (arriba) y en estadios avanzados (abajo).

5. 2. Nuevos elementos del sistema hemostático: ADN circulante

En este apartado realizamos solo el estudio en el ADNc puesto que en los demás elementos estudiados las alteraciones encontradas son puntuales y no hay suficiente número de pacientes para poder realizar estudios de supervivencia.

5. 2. 1. Valor pronóstico de la concentración del ADN circulante según el tipo de tumor

Para analizar el valor pronóstico de la concentración basal de ADNc se tomó, como punto de corte, la mediana de concentración en cada cohorte de pacientes.

COHORTE A: Cáncer de próstata metastásico

La mediana de ADNc en plasma en este grupo de pacientes fue de 64 ng/mL. Los pacientes con niveles de ADNc superiores tenían peor supervivencia libre de progresión, con una mediana de 9,6 meses frente a los 25,5 meses de los pacientes con niveles de ADNc inferiores (HR= 6.7, IC 95%: 2.5-18.5; $p < 0.01$) y peor supervivencia global, con una mediana de 9,6 meses frente a los 34,3 meses de los pacientes con niveles de ADNc inferiores (HR= 8.04, IC 95%: 2.4-26.8; $p < 0.01$) (Figura 27).

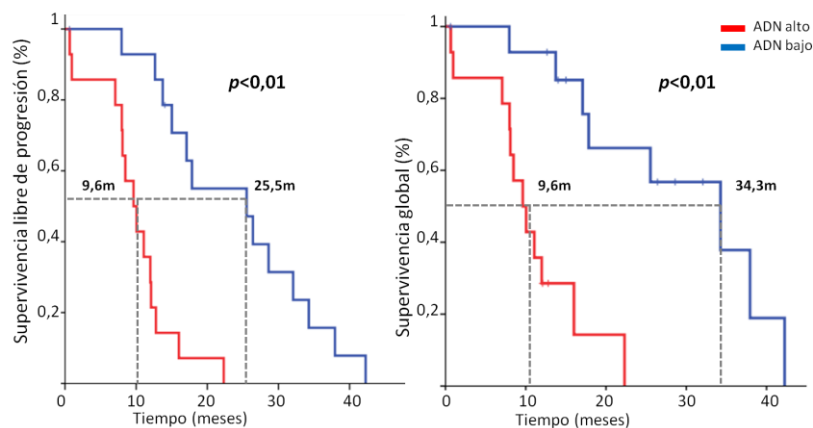


Figura 27. Grafica de Kaplan-Meier de supervivencia libre de progresión (izquierda) y supervivencia global (derecha) en función de la concentración basal de ADN circulante en pacientes con cáncer de próstata estadio IV.

La concentración elevada de ADNc se mantuvo como factor pronóstico independiente en el análisis mediante regresión múltiple de Cox tanto para supervivencia libre de progresión como para supervivencia global (Tabla 57).

Tabla 57. Análisis mediante regresión múltiple de Cox para supervivencia libre de progresión y para supervivencia global en pacientes con cáncer de próstata.

	Supervivencia libre de progresión			Supervivencia global		
	HR	IC 95%	P	HR	IC 95%	p
Edad	1,14	1,02-1,27	0,02	1,26	1,06-1,51	0,01
ECOG	2,35	0,90-6,15	0,08	7,16	1,62-31,59	<0,01
PSA	0,99	0,99-1,00	0,34	0,99	0,99-1	0,09
FA	1	1-1,01	0,34	1,01	0,99-1	0,29
Enf alto riesgo	0,80	0,25-2,55	0,71	0,49	0,12-1,96	0,31
ADNc alto	18,56	3,45-99,99	<0,01	64,55	4,72-882,49	<0,01

COHORTE B: Cáncer colorrectal

La mediana de concentración del ADNc en pacientes con cáncer colorrectal fue de 66 ng/mL. En este grupo de pacientes no se observó asociación entre la concentración de ADNc y la supervivencia libre de progresión (HR= 1.6, IC 95%: 0.7-3.6; $p= 0.25$), ni con supervivencia global (HR= 1.4, IC 95%: 0.5-3.7; $p= 0.54$) (Figura 28). Sin embargo, cuando estudiamos solo los pacientes con estadio IV observamos que había una tendencia a la asociación con peor supervivencia libre de progresión (HR=2.5, IC 95%: 0.9-6.7; $p=0.07$) (Figura 29).

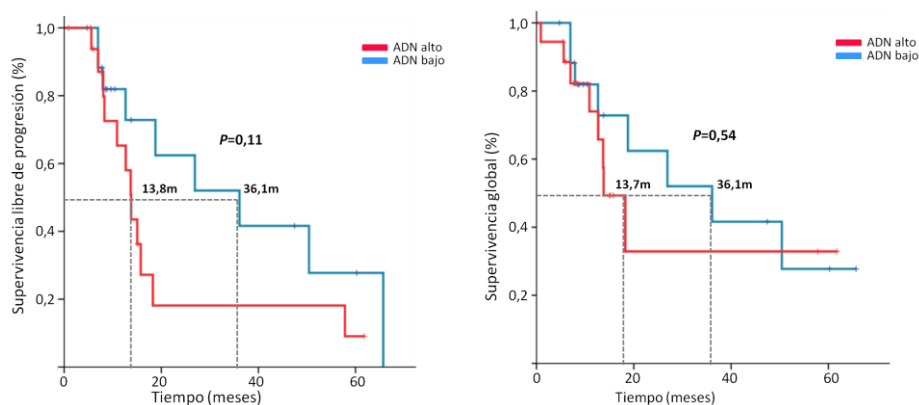


Figura 28. Valor pronóstico de la concentración de ADN circulante en pacientes con CCR.

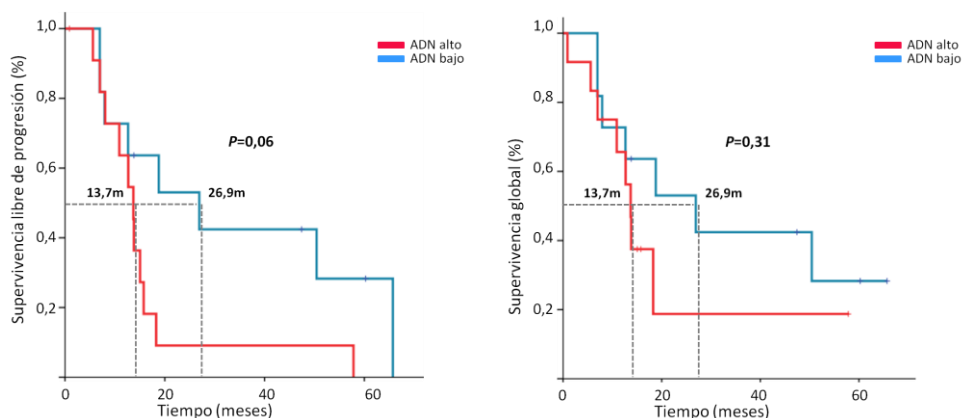


Figura 29. Valor pronóstico de la concentración de ADN circulante en pacientes con CCR estadio IV.

En el análisis mediante regresión múltiple de Cox, en el que se incluyó la edad, ECOG>2, la presencia de metástasis hepáticas, FvW alto y ADNc alto, se observó que la presencia de FvW elevado tenía valor pronóstico independiente tanto para supervivencia global como libre de progresión en pacientes estadio IV (Tabla 59).

Tabla 58. Análisis mediante regresión múltiple de Cox donde se incluyen variables con factor pronóstico conocido en la cohorte global de pacientes con CCR.

	Supervivencia libre de progresión			Supervivencia global		
	HR	IC 95%	P	HR	IC 95%	P
Edad	0,9	0,9-1,1	0,20	0,9	0,9-1,1	0,86
ECOG>2	0,7	0,2-3,1	0,60	0,6	0,1-3,4	0,59
Mts hepáticas	1,1	0,3-3,1	0,96	1,6	0,5-5,4	0,46
FvW alto	2,2	0,7-6,7	0,16	5,4	1,2-24,8	0,03
ADNc alto	1,7	0,6-4,7	0,32	1,0	0,3-3,1	0,99

Tabla 59. Análisis mediante regresión múltiple de Cox donde se incluyen variables con factor pronóstico conocido en la cohorte global de pacientes con CCR estadio IV.

	Supervivencia libre de progresión			Supervivencia global		
	HR	IC 95%	P	HR	IC 95%	P
Edad	0,99	0,9-1,0	0,61	1,1	0,9-1,1	0,87
ECOG>2	0,5	0,1-2,6	0,41	0,6	0,1-3,1	0,51
Mts hepáticas	0,5	0,2-1,7	0,31	0,8	0,2-2,7	0,69
FvW alto	3,6	1,1-13,2	0,05	5,8	1,2-27,6	0,03
ADNc alto	2,4	0,7-7,6	0,14	1,4	0,4-4,6	0,61

COHORTE C: Cáncer de pulmón

a. Carcinoma no microcítico de pulmón

La mediana de concentración en pacientes con enfermedad avanzada fue de 56ng/mL. El análisis de supervivencia se realizó en la cohorte global de pacientes y en el subgrupo de pacientes estadio III-IV (Figura 30). En ambos casos se observó que pacientes con ADNc alto tenían peor supervivencia libre de progresión y peor supervivencia global.

En el análisis mediante regresión múltiple de Cox para supervivencia global y para supervivencia libre de progresión (Tabla 60), observamos que ADNc elevado permanece como variable independiente cuando es incluida en un modelo de regresión multinomial junto a otras variables con valor pronóstico conocido: ECOG \geq 2, estadio, edad e histología epidermoide vs adenocarcinoma.

A. CNMP (todos los pacientes)

B. CNMP estadio III-IV

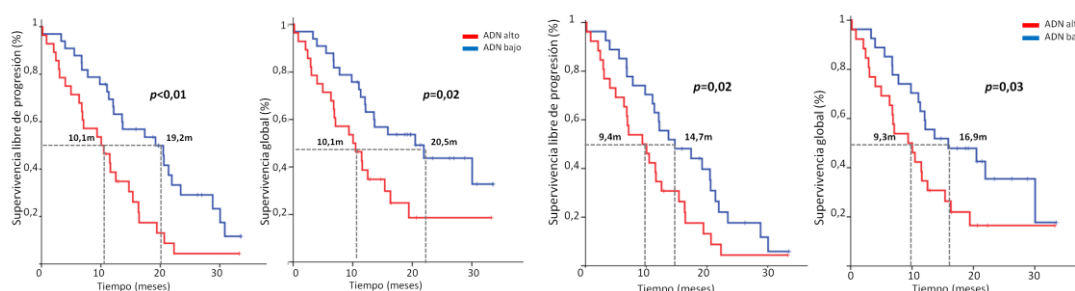


Figura 30. Valor pronóstico de la concentración de ADN circulante en pacientes con CNMP (A). Curva de supervivencia en el grupo de pacientes CNMP estadios III-IV (B).

Tabla 60. Análisis mediante regresión múltiple de Cox donde se incluyen variables con factor pronóstico conocido. La concentración elevada de ADNc permanece como variable independiente de mal pronóstico.

	Supervivencia libre de progresión			Supervivencia global		
	HR	IC 95%	P	HR	IC 95%	P
Edad	1,01	0,97-104	0,77	1,01	0,97-1,05	0,79
Estadio	2,69	1,33-5,4	<0,01	1,95	0,94-4,01	0,07
ECOG	2,66	1,41-5,04	<0,01	3,82	1,9-7,7	<0,01
Epidermoide	2,37	1,18-4,74	0,02	2,75	1,27-5,97	0,01
ADNc alto	2,32	1,17-5,59	0,02	2,51	1,18-5,34	0,02

b. Carcinoma microcítico de pulmón

En este grupo de pacientes no se hizo el análisis de supervivencia dado que el tamaño de la muestra es demasiado pequeño para extraer conclusiones: 2 pacientes estadio II, 7 pacientes estadio III y 8 pacientes estadio IV.

Discusión

La hipótesis que motivó nuestro trabajo fue que debía existir una activación diferencial del sistema hemostático entre las diferentes neoplasias. Para ello nos planteamos realizar un trabajo fundamentalmente descriptivo analizando tanto los elementos clásicos de la coagulación, como los nuevos elementos implicados en el sistema hemostático y que han sido poco explorados en series clínicas de pacientes oncológicos. La oportunidad de tener un grupo pionero en el estudio de la antitrombina y de los trastornos de glicosilación, entre otros elementos del sistema hemostático, podría aportar un conocimiento más profundo de este complejo sistema y plantear cuestiones interesantes. Además, el análisis del sistema hemostático en pacientes con cáncer puede ser un modelo de estudio de este complejo equilibrio que puede asistir en la identificación de nuevos elementos o mecanismos implicados en el incorrecto funcionamiento del mismo.

El primer objetivo propuesto ha sido ampliamente detallado, con la descripción tanto a nivel global como en cada cohorte de pacientes de todos los elementos estudiados del sistema hemostático. Con respecto a la población general, observamos que los pacientes con cáncer tenían niveles de LDH, DD y FvW más elevados, como ya se había descrito en estudios anteriores.^{127,128}

Hemos observado, como pensábamos, que existen diferencias entre los distintos tumores. A nivel celular, había diferencias significativas en dos de las tres series hematológicas entre cada tipo de tumor (hemoglobina y leucocitos). En cuanto a los parámetros clásicos de la coagulación, observamos que los pacientes con cáncer de próstata y cáncer colorrectal, tenían niveles basales de DD y FvW más elevados con respecto a los pacientes con cáncer de pulmón (sin diferenciar por histología CNMP y CMP), mientras que el TP era significativamente más bajo. El cáncer de próstata es el tumor en el que hemos detectado más alteraciones hemostáticas y además, el que mayor incidencia de eventos tromboticos ha presentado. Por este motivo, se le dedicará un apartado más adelante.

Los estudios publicados hasta la fecha en búsqueda de factores predictivos de trombosis en pacientes oncológicos tienen resultados muy dispares y a pesar de las numerosas investigaciones durante años, a día de

hoy, todavía no se ha encontrado ningún parámetro útil *per se* para predecir trombosis. Una de las causas que pueden justificarlo es el diseño de los estudios: en la mayoría de ellos hay falta de datos sobre la enfermedad neoplásica en cuanto a histología, estadio tumoral (dato de crucial importancia ya que se sabe que la enfermedad metastásica asocia un mayor riesgo trombótico), los tratamientos recibidos y la situación de la enfermedad en el momento de la inclusión. Nos parece que estos datos son muy relevantes por la hipótesis que se plantea en el presente trabajo, dado que cada tumor se comporta de una forma diferente y ejerce una influencia distinta en el microambiente que le rodea y en el sistema hemostático. Además, el contexto en que nos centramos fue en la fase avanzada de la enfermedad, en la que se sabe que hay una mayor incidencia de trombosis^{10,11,129} y probablemente un mayor número de alteraciones hemostáticas subyacentes. Nuestro trabajo, aunque con una muestra pequeña, aporta homogeneidad en cuanto a tipo de tumor, estadio y situación de la enfermedad y los análisis se han realizado atendiendo a todos estos factores, especialmente tipo de tumor y estadio.

El sistema hemostático es altamente inestable, son numerosas las vías y los elementos implicados para mantener el equilibrio trombosis-hemorragia y este sistema está sujeto a multitud de impactos que lo alteran. Esto hace que el sistema hemostático sea muy cambiante a lo largo del tiempo, especialmente en pacientes y situaciones lábiles, como el enfermo oncológico. Por ello, pretender un estudio estático de este complejo y sensible equilibrio nos va a dar una información muy parcial de lo que realmente sucede. Además, los estudios *in vitro* de este sistema cuentan también con importantes limitaciones y los resultados obtenidos pocas veces se pueden confirmar en series clínicas. El momento en el tiempo en que se realiza el estudio nos puede dar diferentes informaciones y puede hacer difícil la reproductibilidad de los resultados. Sin embargo, se desconoce cuándo es el momento adecuado para el análisis y toma de muestras en un paciente y cuál es el punto de corte a partir del cual considerar un valor patológico. Todo ello supone que debemos ser prudentes en la extrapolación e interpretación de resultados en estudios de este tipo. Las observaciones que hemos hecho en nuestro trabajo son meramente

descriptivas y no deben ser extrapolables a la población general, sino generadoras de hipótesis para nuevos trabajos.

En la relación con la trombosis, diríamos que son pocas las alteraciones relevantes observadas. Únicamente la elevación de FvW se asoció a trombosis en pacientes con cáncer de próstata.

1. Hemograma y parámetros clásicos de la coagulación

Las diferencias que hemos observado, en el hemograma y en los parámetros clásicos de la coagulación, se relacionaban fundamentalmente con la enfermedad metastásica, lo que refleja el efecto de las células tumorales sobre el sistema hemostático. Además las alteraciones observadas son reflejo del daño que induce el tumor en los tejidos circundantes, en los procesos de invasión, crecimiento, neoangiogénesis y metastatización.

1. 1. Factor von Willebrand

Se sabe por estudios clínicos y modelos celulares, que el FvW es un marcador de daño endotelial y tiene un papel fundamental en mecanismos de progresión y metastatización, ya que es mediador de la adhesión entre las plaquetas y las células endoteliales con la célula tumoral, participa en la angiogénesis tumoral, en la degradación de la matriz extracelular y de forma indirecta, permite al tumor evadirse de la respuesta inmune.¹³⁰⁻¹³² El hallazgo de niveles más elevados de FvW en cáncer colorrectal frente a población general ya había sido descrito en trabajos anteriores.¹³³⁻¹³⁵ En los trabajos de Wang¹³⁴ y Gil-Bazo¹³⁶ en 2005, observaron una asociación significativa del FvW con el estadio tumoral, de modo que estaba más elevado en enfermedad metastásica frente a localizada, igual que observamos en nuestra serie, en la cohorte de cáncer colorrectal.

En nuestro trabajo el hallazgo más relevante fue el valor pronóstico de supervivencia del FvW. Observamos que la elevación de FvW basal se asociaba a peor supervivencia e intervalos libres de progresión más cortos en 3 de las 4 neoplasias estudiadas: cáncer colorrectal, próstata y CNMP. Nuestros

resultados confirman los resultados observados en el trabajo de Liu y colaboradores, en cáncer colorrectal.¹³⁷ Sin embargo no se había descrito previamente en cáncer de próstata y CNMP.

Por otro lado, éste fue el único parámetro asociado a trombosis en nuestra serie, en los pacientes con cáncer de próstata.

1. 2. Dímero D

En los pacientes con cáncer de próstata y CCR observamos que los niveles de DD se correlacionaban con la carga tumoral. En la cohorte de cáncer de próstata, pacientes con niveles elevados de DD tenían peor supervivencia global y libre de progresión, sin embargo no encontramos esta asociación con la supervivencia en la cohorte de CCR. En la serie de CNMP avanzado, aunque no observamos asociación de DD con la carga tumoral, los pacientes con niveles elevados al diagnóstico vivían menos y tenían tiempos a la progresión más cortos. Estos resultados apoyan lo presentado en trabajos anteriores como ahora veremos.

El DD fue validado como factor de pronóstico de supervivencia en la serie independiente del estudio de Viena en 2014.⁶⁹ En este estudio se observó que niveles elevados de DD (dos veces por encima del valor normal) se asociaban con mayor riesgo de muerte tanto en el análisis univariante como en el multivariante (HR= 1.3, IC 95%:1.2-1.4; $p < 0.01$) y que los niveles de DD eran mayores en pacientes con metástasis frente a pacientes con enfermedad localizada (0,99 $\mu\text{g/ml}$ vs 0,50 $\mu\text{g/ml}$). En este estudio, de los 1178 pacientes incluidos, había 133 con cáncer colorrectal, 133 con cáncer de próstata y 182 con cáncer de pulmón (no diferencia por histología), pero no se hizo análisis por subgrupos de pacientes atendiendo al tipo de tumor.

Hay otros estudios que habían descrito la asociación de DD con la carga tumoral en cáncer de próstata,^{128,138} sin embargo éste es el primero en el que se describe una correlación positiva entre DD y PSA, y DD y LDH. Ambos parámetros se asocian a la carga tumoral y aportan información relevante en enfermedad avanzada especialmente en situaciones de enfermedad no medible, como es la afectación ósea, muy frecuente en este tipo de tumor.

La asociación de DD con la carga tumoral en CCR ya había sido previamente descrita. Destacamos un trabajo publicado en 2004,¹³⁹ en el que se estudiaron 100 pacientes con cáncer colorrectal estadio IV. Los niveles basales elevados de DD se correlacionaron con la carga tumoral, el número de sitios de metástasis y la presencia de metástasis hepáticas. También se observó que tenía valor pronóstico independiente de supervivencia global en el análisis mediante regresión múltiple (HR= 1.18, IC 95%: 1.02-1.37, $p= 0.03$). Sin embargo, en nuestra serie, no hubo asociación con la supervivencia, quizá por el pequeño tamaño de la muestra y porque hubo gran variedad en los tratamientos posteriores que recibieron los pacientes.

En CNMP hay varios trabajos que demuestran el valor pronóstico del DD y apoyan los resultados que observamos en nuestra serie. Uno de los trabajos más recientes es el publicado por Wang en 2015.¹⁴⁰ Recoge la serie más larga publicada hasta la fecha con 1931 pacientes con CNMP estadio IV, con una mediana de seguimiento de 18 meses. Observaron que el 72,1% de los pacientes tenían niveles basales de DD por encima de la normalidad. En el análisis multivariante, en el que se incluyó la edad, el sexo, el tabaco, la histología, el estado funcional ECOG, el estadio TNM y el DD, fue precisamente el DD un factor pronóstico independiente de peor supervivencia junto con el ECOG y el TNM, con HR= 1.25, IC 95%: 1.12–1.38; $p < 0.001$. Además, estos resultados confirman los presentados en un meta-análisis publicado en 2014¹⁴¹ que incluye 11 estudios de pacientes con cáncer de pulmón y en el que se observó que el DD tenía valor pronóstico de supervivencia.

Aunque en nuestra serie en CNMP no observamos asociación de DD con la carga tumoral, hay trabajos en los que se ha observado una correlación con la afectación ganglionar,¹⁴² con estadio tumoral y la respuesta a tratamiento.^{143,144}

Como conclusión a este apartado diremos que, la asociación observada de los niveles de DD con la carga tumoral y con mayor riesgo de mortalidad, independientemente de la trombosis, apoya la hipótesis de que puede ser un marcador subrogado de otros mecanismos de progresión, como podría ser la

remodelación del estroma tumoral, y metastatización tumoral como han sugerido algunos autores.^{145,146} Por otro lado, puede ser reflejo de un correcto funcionamiento del sistema hemostático, fibrinolítico, impidiendo que el estímulo procoagulante desemboque en el desarrollo de trombosis.

2. Nuevos elementos implicados en el sistema hemostático

2. 1. Antitrombina

En el estudio de antitrombina no observamos diferencias significativas entre los distintos tumores, sin embargo hay hallazgos que merece la pena resaltar.

El grupo de pacientes con CNMP presentó una mayor incidencia de deficiencia de antitrombina que podría ser por un consumo aumentado de esta proteína, ya que se acompañó de la presencia de complejos T-AT. Esto ya había sido observado en trabajos anteriores como el publicado en 2007,¹⁴⁷ en el que se estudiaron pacientes con cáncer de pulmón y controles sanos y se observó que antes de empezar el tratamiento de quimioterapia, los pacientes con cáncer de pulmón tenían menor actividad antitrombina. Otros dos estudios más antiguos habían observado una deficiencia de antitrombina en cáncer de pulmón relacionada con el consumo de esta proteína,¹⁴⁸ de hecho, en uno de ellos, se detectó un aumento en los niveles de complejos T-AT en este tipo de tumor, lo que podría explicar la deficiencia y se correlaciona con lo que observamos en nuestra serie.¹⁴⁹ Sin embargo este es el primer trabajo en el que se observa una diferencia frente a otros tumores y atendiendo a la histología tumoral. En principio tanto el descenso de los niveles de antitrombina como la detección de complejos T-AT mediante western blot se podría considerar como el reflejo de un estado de hipercoagulabilidad. No obstante, son escasos los pacientes con esta situación que hayan desarrollado trombosis (2 de 11 pacientes con déficit de antitrombina y ninguno de los 6 pacientes con complejos T-AT) y además, la trombosis fue posterior a la detección de estos parámetros. Es por tanto razonable plantear que estos resultados sean

manifestación de una respuesta controlada del sistema hemostático a un estado hipercoagulable.

Por otro lado, fue interesante lo sucedido en algunos casos concretos en cáncer colorrectal que fueron estudiados de forma individual. Estos pacientes, a pesar de tener deficiencia severa y mantenida de antitrombina, asociado a otros factores de riesgo, no desarrollaron trombosis a lo largo de la evolución de la enfermedad. Esto nos lleva a reflexionar, que si un paciente con una deficiencia significativa de uno de los anticoagulantes más relevantes y que en sujetos sanos induce un incremento significativo del riesgo trombótico (hasta 20 veces superior)⁸⁰ no ha tenido trombosis a pesar del tumor y de su tratamiento, los mecanismos trombóticos asociados al cáncer, posiblemente ausentes en estos pacientes, deben ser incluso más potentes que la deficiencia de antitrombina. También podemos especular que en pacientes con cáncer podría existir un mecanismo de protección antitrombótico (el sistema de la fibrinólisis no ha sido poco estudiado en este proyecto) que proteja a los pacientes con cáncer, a pesar de tener numerosos factores de riesgo trombótico.

Finalmente, no encontramos factores clínicos o del tumor que pudieran justificar estas deficiencias observadas. Quizá este déficit se deba a un efecto paracrino del tumor que explique otro mecanismo por medio del cual se desarrolla un estado de hipercoagulabilidad.

2. 2. Ruta de contacto

El estudio de la ruta de contacto se realizó evaluando la presencia de formas activadas de FXII y FXI en el plasma. Esta aproximación tiene importantes limitaciones, ya que las muestras no se analizan en fresco, ni el estudio genera resultados cuantitativos. No obstante ofrece una información que puede ser útil si se plantean estudios posteriores. En primer lugar, las bandas de activación se identificaron en pocos pacientes y curiosamente la mayoría tenían cáncer de próstata. Además, las formas activadas son minoritarias. Y finalmente no observábamos una amplificación de la ruta que pudiera insinuar un efecto trombótico. Es decir, los pacientes con FXIIa no tenían FXIa, lo que podría explicar por qué estos pacientes no desarrollaron

trombosis. Sin embargo, sí llama la atención el hecho de que la mayoría de los pacientes con formas activadas de estos elementos, especialmente FXIIa, presentaban niveles altos de ADNc. Se sabe que *in vitro*, el FXII es activado por superficies cargadas negativamente, y los ácidos nucleicos (ADN y ARN) son moléculas cargadas negativamente capaces de activar al FXII,^{79,150} aunque no esté claro el mecanismo que induce su activación *in vivo* ni las consecuencias en el sistema hemostático.

2. 3. Trastornos de glicosilación

Los trastornos de glicosilación no fueron relevantes, ni se asociaron a trombosis. Donde encontramos este tipo de alteraciones fue en el grupo de pacientes con cáncer colorrectal, tras la administración de quimioterapia. En todos los casos, la hipoglicosilación se restringía a la antitrombina, no se detectaba en α 1-antitripsina ni en transferrina. Tampoco el estudio molecular del gen *PMM2*, el más afectado en trastornos de glicosilación congénitos,¹⁵¹ estaba afectado en ninguno de los pacientes estudiados, al menos en las zonas codificantes y regiones flanqueantes analizadas. Por todas estas razones, el aumento de la banda de hipoglicosilación de la antitrombina podría representar una liberación de la glicofoma beta de antitrombina, una forma con 3 glicanos que se elimina de la circulación y se localiza a nivel vascular.^{152,153} También es posible que la tendencia al consumo alcohólico entre los que presentaban esta alteración, un factor que tiene un efecto deletéreo sobre la N-glicosilación,⁹⁴ pudiera propiciar una pequeña deficiencia en la ruta de N-glicosilación que provocase un ligero aumento de proteínas hipoglicosiladas. Independientemente de si se trata de una hipoglicosilación global inducida por el consumo de alcohol o de la liberación de glicofomas beta de antitrombina, esta alteración no estaba relacionada con mayor número de eventos trombóticos, ni tampoco encontramos asociación con la carga tumoral.

2. 4. ADN circulante

Los resultados obtenidos en cuanto a este parámetro han sido muy interesantes y merecen ser comentados en un apartado específico. Se observó que la concentración basal en la serie oncológica era mayor con respecto a la

concentración de la serie de controles sanos. Tanto en cáncer de próstata como en CNMP se asoció a carga tumoral y se observó que tener concentraciones elevadas al diagnóstico se asociaba a peor supervivencia global y a intervalos libres de progresión más cortos.

3. Estudio de trombosis

3. 1. Eventos tromboticos y factores clínicos

En nuestra serie observamos una incidencia de trombosis del 18,5%, que está dentro de los valores más altos descritos. La razón que justifica esta alta incidencia puede ser que la mayoría de pacientes incluidos en nuestro estudio fueron estadio IV (69,4%) en tratamiento activo. La enfermedad metastásica es un factor de riesgo de trombosis conocido.^{10,11,129} De hecho, el 82,8% de los pacientes que desarrollaron trombosis eran estadio IV (24 pacientes de los 29 con trombosis), mientras que el 13,8% eran estadio III (4 pacientes) y un 3,4% estadio II (1 paciente).

En el estudio de la serie clínica observamos que ECOG \geq 2, el tratamiento de quimioterapia y la presencia de metástasis (en cáncer colorrectal) se asociaban con la presencia de trombosis.

Con respecto al ECOG, la inmovilización es uno de los factores de riesgo trombotico más antiguo conocido y el ECOG es una buena herramienta para caracterizar el grado de movilidad de los pacientes. Aunque observamos asociación de ECOG \geq 2 con la trombosis, cuando se realizó el estudio en cada cohorte por separado, esta asociación solo se mantuvo en la cohorte de cáncer de pulmón. No obstante, debemos tener en cuenta que la mayoría de los pacientes incluidos en nuestro estudio tenían ECOG \leq 1. Estos resultados son acordes a los publicados en trabajos anteriores.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ Es importante destacar que en el modelo de Khorana esta variable no fue incluida porque no tenía tanto peso como las otras.⁴⁴

Respecto al tratamiento quimioterápico, ya es conocido desde hace años su potencial efecto protrombotico. En el cáncer de próstata es destacable que

solo presentaron trombosis aquellos pacientes que habían sido tratados con docetaxel. Sin embargo hay que tener en cuenta que el estudio no fue diseñado para comparar quimioterapia frente a no quimioterapia o frente a hormonoterapia. En general, los pacientes en tratamiento con quimioterapia en este grupo, son pacientes resistentes a castración y suelen tener mayor carga tumoral que los pacientes en tratamiento hormonal. Por lo tanto, el hecho de que haya más eventos trombóticos en este grupo podría ser también debido al efecto del tumor sobre el sistema hemostático y no necesariamente atribuido al efecto de la quimioterapia.

Por último, en el grupo de cáncer colorrectal, se observó que la enfermedad metastásica se asociaba a mayor incidencia de trombosis que la enfermedad localizada. En particular, la presencia de metástasis hepáticas era la que se asociaba con mayor número de eventos trombóticos, posiblemente porque afecta al principal órgano de producción de factores hemostáticos. Esta observación también había sido descrita en trabajos anteriores tanto en cáncer colorrectal¹⁵⁷ como en cáncer de pulmón.¹⁵⁸ Es posible que en estos pacientes, todo el sistema hemostático se vea afectado, reduciéndose el equilibrio hemostático y haciendo que sean más sensibles a cualquier estímulo procoagulante que, en condiciones normales, posiblemente no tuviera consecuencias trombóticas.

3. 2. Trombosis y supervivencia

Aunque la mayoría de los trabajos publicados demostraron que la trombosis tenía un efecto deletéreo en la supervivencia,^{129,159} nuestro estudio no estaba diseñado para observar el efecto de la trombosis en la supervivencia y de hecho no hemos encontrado relación alguna en las neoplasias estudiadas.

3. 3. Elementos del sistema hemostático y trombosis

En el estudio de los elementos del sistema hemostático estudiados el único parámetro que se relacionó con la trombosis fue la presencia de FvW elevado en pacientes con CCR. No observamos asociación de ningún otro parámetro estudiado.

El hecho de no haber encontrado asociación de los niveles de DD con la trombosis es de destacar. Se sabe que el DD tiene un alto valor predictivo negativo de trombosis¹⁶⁰ pero no está claro todavía si los niveles elevados pueden predecir trombosis y tampoco cuál es el punto de corte adecuado en este sentido. En la serie de Viena⁷² con 821 pacientes, se observó que aquellos que tenían niveles de DD dos veces por encima de la normalidad, tenían 1.3 veces más riesgo de sufrir trombosis (HR= 1.3, IC 95%: 1.2–1.6; $p < 0.01$). Además, aumentaba su valor predictivo positivo cuando la elevación de DD se asociaba a niveles elevados de fragmento de protrombina 1+2, siendo un factor de riesgo independiente de trombosis (HR= 3.6, IC 95%: 1.4-9.5). Previamente a este trabajo ya había sido demostrado el valor predictivo del DD en varios estudios, sin embargo los puntos de corte son muy distintos en cada uno y son series muy limitadas en cuanto a número de pacientes incluidos y variables en cuanto a tipo de tumor, por lo tanto son series difícilmente comparables y con resultados no extrapolables a la población general.^{73,161-163} Una de las series con mayor número de pacientes se publicó recientemente por Jianlong y colaboradores. En este estudio se incluyeron 1473 pacientes con diferentes neoplasias y observaron que los niveles altos de DD por encima de 1484 ng/ml se asociaba con mayor número de trombosis venosa en los 3 meses siguientes a la determinación de DD.¹⁶⁴ En nuestra serie no encontramos estas diferencias ni con valores extremos de DD, ni con el análisis de valores x2 el valor normal como en la serie de Viena, quizá sea debido al bajo número de pacientes incluidos. En contra, hay que tener en cuenta que tanto el cáncer como los procesos infecciosos pueden aumentar los niveles de DD en sangre, lo que confiere una baja sensibilidad y hace que no sea una buena herramienta cuando se utiliza de forma aislada para predecir trombosis. Nosotros no encontramos asociación con trombosis en nuestra serie ya sea por este motivo, ya sea por el tamaño muestral que hace que no hayamos encontrado las diferencias.

Otro parámetro que merece la pena comentar es el ADNc en su relación con la trombosis. Aunque se ha descrito que tanto el ADNc como los NETs pueden activar la cascada de la coagulación mediante la activación del FXII e inducir la trombosis, nosotros no encontramos dicha asociación en nuestro

trabajo. Pacientes con niveles muy elevados de ADNc (hasta 2090 ng/ml) no presentaron trombosis. Aunque no de manera significativa, observamos que aquellos pacientes que presentaron activación del FXII, tenían concentraciones de ADNc más elevadas que los que no tenían el FXII activado, pero no desarrollaron más eventos trombóticos. Quizá el hecho de que en estos pacientes no observáramos activación del FXI indique que no se había desencadenado la activación de la cascada de la coagulación por la ruta de contacto. Quizás estudios más detallados que incluyan más pacientes con seguimiento, y que analicen de forma más sensible la ruta de contacto, por ejemplo empleando sustratos cromogénicos específicos del FXIIa y FXIa, puedan aportar nueva información que permita obtener aplicación clínica al ADNc en el contexto del riesgo trombótico en pacientes con cáncer.

4. Cáncer de próstata

En la cohorte de cáncer de próstata metastásico observamos una incidencia del 31,2% de eventos trombóticos, valor que es el más elevado de todas las series publicadas previamente. Solo encontramos un trabajo donde los resultados fueron similares, pero se realizó en una serie de pacientes hospitalizados. Es el trabajo de Stein y colaboradores,¹⁶⁵ que observaron que el cáncer de próstata fue uno de los tumores con mayor incidencia de trombosis junto con páncreas, pulmón, sistema nervioso central, gástrico, endometrio y renal. Creemos que el hecho de que en nuestra serie todos los pacientes incluidos fueran estadio IV justifique este hallazgo, ya que en el resto de series publicadas no se especifica el estadio de los pacientes con cáncer de próstata analizados.

El cáncer de próstata fue el que más alteraciones en el sistema hemostático de forma basal presentó. La elevación del DD, FvW como marcadores de fibrinólisis y daño endotelial y LDH, como marcador de lisis celular. El ADNc también estaba elevado de forma basal y se correlacionaba con niveles de PSA y LDH, de esta forma podríamos decir que en cáncer de próstata avanzado la invasividad y progresión tumoral se ven reflejados en un

aumento de daño endotelial y aumento de lisis celular, lo que provoca una liberación al plasma de sustancias procoagulantes y sustancias que reflejan de manera indirecta fenómenos de progresión y metastatización y se asocian con peor pronóstico. Así es lo que hemos visto con LDH, DD y con ADNc, ya que niveles elevados al diagnóstico se asociaban a peor supervivencia global y peor supervivencia libre de progresión. En nuestro estudio, no encontramos asociación con las alteraciones observadas del sistema hemostático y la trombosis, pero lo que sí observamos es que fue el tumor con mayor tasa de trombosis de nuestro estudio. Quizá el tamaño muestral hace que estadísticamente no se observen diferencias y quizá el análisis estadístico es insuficiente para poder observar la asociación, ya que puede ser que la suma de todas las alteraciones en un paciente, desemboque en el evento trombótico. Aunque intentamos separar cada elemento para poder entenderlo mejor, la realidad es que perdemos mucha información especialmente en el sistema hemostático en el que convergen gran cantidad de factores.

Los niveles elevados de DD previo al inicio de tratamiento (en el momento de la refractariedad hormonal) se asociaban a peor pronóstico tanto de supervivencia libre de progresión como de supervivencia global. En este contexto, hay pocos trabajos publicados. Un trabajo de 2010¹³⁸ estudió 28 pacientes que habían progresado a una o dos líneas hormonales previas comparando la correlación entre las variaciones de DD, PSA y células tumorales circulantes con la progresión tumoral. En este estudio se observó que las variaciones en los niveles de DD era el marcador que mejor se correlacionaba con la progresión. No es un trabajo comparable con el nuestro puesto que lo que se analiza son los cambios en los niveles de DD y no los niveles basales como valor pronóstico. En nuestro trabajo, además, observamos una correlación significativa del DD con el PSA, que es un marcador útil para el seguimiento del tumor puesto que se relaciona con la carga tumoral. Hasta donde sabemos, es el primer trabajo que haya encontrado esta asociación en cáncer de próstata.

La elevación de FvW basal y su relación con supervivencia no había sido previamente descrita en cáncer de próstata metastásico.

5. Valor pronóstico del ADN circulante

Analizamos la concentración total de ADNc en las cohortes estudiadas, comparándolas inicialmente con una cohorte de personas sanas y posteriormente entre sí. Igual que se observa en la mayoría de estudios,¹⁶⁶⁻¹⁷¹ la concentración en pacientes con cáncer fue superior a la que se observó en población sana de referencia. Sin embargo, se desconoce el valor a partir del cual se pueda relacionar con la presencia de neoplasia, los estudios publicados reflejan rangos muy amplios de concentraciones. Por ejemplo, en una reciente revisión en CNMP realizada por Kun Nie y colaboradores,¹¹³ se observó que las concentraciones de ADNc oscilaban entre 8 ng/ml y 270 ng/ml.

Se han empleado distintas técnicas para la identificación y cuantificación de ADNc que precisan volúmenes entre 8 y 200 µl y con mayor coste y complejidad: PCR, DREAMing,¹⁷² Next generation sequencing (NGS), BEAMing, whole exome sequencing (WES), whole genome sequencing (WGS).^{112,113,173} La mayoría de los trabajos identifican el ADNc tumoral mediante la detección de alteraciones concretas como puede ser mutación en KRAS en cáncer colorrectal,¹⁷⁴ las alteraciones de metilación u otros. Nosotros analizamos la concentración global y un método fluorimétrico sencillo, que precisa 20 µl y tiene una duración de 20 minutos y un coste global de 5 €. Habría que validar la técnica en series más amplias.

En nuestra serie pudimos detectar ADNc en todos los pacientes de los que disponíamos muestra plasmática, a diferencia de lo presentado en otros estudios en cáncer de mama y cáncer colorrectal en los que, en pacientes con enfermedad localizada previamente intervenidos, solo se detectaba ADNc en aquellos que posteriormente progresaron.^{175,176} Este hecho llevó al planteamiento de que la detección de ADNc tras la cirugía podría ser empleado como herramienta capaz de seleccionar aquellos pacientes con mayor riesgo de recaída y, por tanto, candidatos a tratamiento adyuvante. Por otro lado, en la serie de Bettgowda y colaboradores¹⁶⁶ en la que se estudiaron 640 pacientes con diferentes tumores, en más del 80% de los pacientes con enfermedad metastásica pudieron detectar ADNc mediante PCR, porcentajes muy superiores a los que presentan los biomarcadores que utilizamos en la práctica

clínica habitual.¹⁷⁷ Estos resultados invitan a considerar el ADNc como un posible biomarcador útil para el seguimiento del tumor.

En nuestro estudio observamos diferencias significativas en la concentración de ADNc según la localización del tumor primario como han observado otros autores.¹⁷⁸ Una de las hipótesis que justifica esta observación es que las diferencias en la vascularización tipo de tumor atendiendo a su localización, podrían influir en la concentración de ADNc. Sin embargo, esta hipótesis no ha sido demostrada y hay trabajos que no encontraron estas diferencias.¹⁷⁹

COHORTE A: Cáncer de próstata

En la cohorte de pacientes con cáncer de próstata, observamos que la concentración de ADNc se correlacionaba con dos marcadores relevantes en este tipo de tumor que se relacionan con la carga tumoral: PSA y LDH. Estos resultados se confirman con los presentados recientemente en ASCO 2016 de un estudio liderado por De Bono.¹⁸⁰ Se analizó la concentración de ADNc pre y post-quimioterapia en plasma de los pacientes incluidos en dos ensayos fase III PROSELICA y FIRSTANA, ambos con quimioterapia en pacientes con cáncer de próstata resistente a castración (1400 muestras). Se observó que la concentración ADNc se correlacionaba con los niveles de LDH y PSA ($p < 0,001$) y por lo tanto, con la carga tumoral. Y, pacientes con niveles elevados tenían peor supervivencia y tiempos más cortos a la progresión.

Hasta ahora, no había otros trabajos publicados de estas características. Los datos que teníamos venían de estudios con pacientes de reciente diagnóstico y por tanto, con enfermedad localizada, que a pesar de no ser comparables con nuestros resultados por las diferencias en la situación de la enfermedad, también apoyaban nuestros resultados. Destacamos dos estudios: el primero, publicado por Delgado y colaboradores,¹⁸¹ en el que se estudiaron 19 pacientes a los que se analizaba el ADNc mediante PCR, a los 3 y a los 6 meses del diagnóstico. Observaron que el ADNc aumentaba a los 3 meses tras la biopsia y se correlacionaba con PSA ($R = 0,57$, $p = 0,011$) y a los 6 meses, se seguía observando esta asociación ($R = 0,54$, $p = 0,017$). Sin embargo, no se observó que hubiera correlación entre los niveles basales de PSA y ADNc. El

segundo estudio, con mayor número de pacientes, publicado por Wroclawski, en 2013,¹⁸² presentó una tendencia a la asociación entre ADNc y PSA, que no llegó a alcanzar la significación estadística. Se analizaron 133 pacientes de reciente diagnóstico y 33 controles sanos (a los que se realizó la biopsia prostática por PSA elevado, que fue negativa), con muestra 3 meses tras la biopsia inicial y antes de iniciar cualquier tratamiento y luego cada 3 meses durante 2 años. En este estudio se observó una tendencia a la asociación de ADN con el nivel total de PSA ($p= 0,08$) y PSA libre ($p= 0,053$). No observaron correlación de ADNc con Gleason, ni con estadio, pero es de destacar que aquellos pacientes con niveles más altos de ADNc tenían intervalos libres de progresión bioquímica más cortos. En nuestro estudio, tampoco se observó asociación de ADNc con la edad ni con Gleason, igual que ocurrió en los dos estudios mencionados.^{181,182}

Nuestros resultados apoyan que sería interesante validar los resultados obtenidos en nuevos estudios con mayor número de pacientes y comparar el valor pronóstico del ADNc frente a otros marcadores pronósticos conocidos como los que se incluyen en el modelo de Armstrong.¹¹⁶ Y sería una herramienta útil especialmente en pacientes pobremente diferenciados, que no elevan PSA.

COHORTE B: Cáncer colorrectal

En esta cohorte la concentración de ADNc no se relacionó con la carga tumoral. Solo encontramos un trabajo que apoya nuestros resultados, el de Lecomte publicado en 2010.¹⁸³ Por el contrario, la mayoría de trabajos en cáncer colorrectal observaron una correlación entre la concentración de ADNc y la carga tumoral.¹⁷⁰ Las series más representativas se realizaron en pacientes operados, en las que se observaba que los niveles de ADNc disminuían tras la cirugía y aumentaban en la recaída.^{175,178,184} Cabe resaltar un trabajo publicado por Hao en 2014,¹⁷⁰ en el que incluyeron pacientes con pólipos, pacientes con cáncer colorrectal de reciente diagnóstico y controles sanos y, analizaron el ADNc en suero y encontraron relación no solo con la carga tumoral, sino también con la edad y con el grado de diferenciación histológica. Curiosamente los tumores de bajo grado tenían concentraciones más elevadas de ADNc.

En el grupo de pacientes con enfermedad metastásica observamos que aquellos con concentraciones elevadas, tenían una tendencia a la asociación con peor supervivencia libre de progresión. Aunque no fueron resultados contundentes, quizá el bajo número de pacientes justifique que no encontráramos una asociación más fuerte como se ha presentado previamente.^{171,185-187} En este contexto, hay varios trabajos que merece la pena resaltar: uno, publicado en 2016 por Messaoudi y colaboradores,¹⁸⁶ que estudiaba 97 pacientes con cáncer colorrectal metastásico y analizaba tanto la concentración total de ADNc como la carga de mutaciones BRAF y KRAS. Observaron que las concentraciones elevadas de ADNc se asociaban a peor supervivencia global (18,07 meses vs 28,5 meses, $p=0,0087$) que se mantenía como factor pronóstico independiente en el análisis multivariante. El otro estudio publicado por Spindler y colaboradores en 2015,¹⁷¹ incluía 229 pacientes metastásicos que habían progresado por lo menos a 3 líneas de tratamiento. Observaron que la supervivencia global disminuía cuanto mayor era la concentración de ADNc, tomando como punto de corte el valor de la mediana, la mediana de supervivencia global fue 10,2 meses (8,3-11,7) frente 5,2 meses (4,6-5,9), HR= 1.78, $p=0,0006$. Por último, Spindler y colaboradores publicaron en 2014,¹⁸⁷ un estudio con 100 pacientes con carcinoma colorrectal estadio IV, en segunda línea de quimioterapia. En este estudio, dividieron los pacientes en alto y bajo riesgo, en función de tener concentración elevada o baja de ADNc (determinada por PCR). De este modo, observaron que los pacientes de alto riesgo tenían intervalo libre de progresión más corto (2,1 meses frente 6,5 meses, HR= 2.53, IC 95%: 1.57-4.06, $p<0,001$) y peor supervivencia global (7,4 meses frente a 13,8 meses; HR= 2.52; IC 95%: 1.54–4.13, $p<0,001$). Además, se mantenía como factor pronóstico independiente en el análisis mediante regresión múltiple de Cox.

COHORTE C: Cáncer de pulmón

En el grupo de CNMP observamos que la concentración de ADNc se correlacionaba con la carga tumoral y era un factor pronóstico independiente de supervivencia global y libre de progresión. Nuestros resultados validan lo presentado en estudios anteriores.

En cuanto al valor de la concentración de ADNc como marcador de carga tumoral, mencionaremos solo aquellos estudios realizados en pacientes con CNMP y no aquellos que recogen tanto CMP como CNMP. Así, varios estudios en CNMP encontraron que los pacientes con cáncer tenían concentraciones más elevadas frente a población sana, aquellos con estadio IV tenían mayor concentración de ADNc frente a pacientes con estadios localizados y las concentraciones elevadas se asociaban a peor supervivencia: el de Gautschi con 185 pacientes en el que se estudió el ADNc en plasma y suero,¹⁶⁹ el del grupo español liderado por Camps en 2005,¹⁸⁸ con 78 pacientes con CNMP y el estudio de Sozzi publicado en 2009,¹⁸⁹ en el que se recogieron muestras de plasma en 1035 personas fumadoras mayores de 50 años, de las cuales, 38 desarrollaron CNMP. Aunque hay que destacar que en este último estudio, en el análisis de la concentración de ADNc diferenciaron entre estadio I frente II-IV y quizá por eso las diferencias observadas no fueron significativas. Sin embargo, observaron que los pacientes con concentraciones más elevadas de ADNc presentaban peor supervivencia.

En cuanto al valor pronóstico de la concentración de ADN hay otro estudio interesante, el de Nygaard,¹⁹⁰ que recoge 53 pacientes con CNMP estadio III-IV previo al inicio de primera línea de tratamiento. En este estudio el objetivo fue comparar la concentración de ADNc con la actividad metabólica y la carga tumoral por PET/TC. En este estudio no se observó asociación entre el ADNc y la actividad metabólica, sin embargo se observó que los pacientes con alta concentración de ADNc tenían peor supervivencia global. La conclusión de sus autores fue que la presencia de ADNc en sangre puede ser reflejo no solo de la carga tumoral, sino de otros mecanismos más complejos de agresividad tumoral haciendo que pueda ser un buen marcador pronóstico independiente. Sin embargo, otro estudio más antiguo, publicado en 2001,¹⁹¹ en el que se recogieron 84 pacientes con diagnóstico de CNMP estadio I-III y 43 personas sanas, tampoco observó asociación de la concentración de ADNc con el estadio, ni con la edad, ni con las diferentes histologías (adenocarcinoma vs carcinoma epidermoide), ni asociación con la supervivencia. Únicamente observaron que la concentración era mayor en los individuos con cáncer frente

a los sanos. Hay que tener en cuenta que en este estudio no fueron incluidos pacientes estadio IV por lo tanto, los resultados no son comparables.

En nuestro estudio el 9,2% de pacientes era estadio II, el 30,8% de pacientes estadio III y un 60% de pacientes estadio IV. Las diferencias que observamos en los niveles de ADNc por estadio son significativas. Además, el hecho de que la presencia de metástasis hepáticas se asociara a mayor concentración de ADNc frente a la no presencia de afectación hepática, apoya este resultado. En relación a los estudios comentados, las diferencias son más llamativas cuando hay enfermedad metastásica que cuando la enfermedad es localizada, quizá es por eso por lo que el estudio de Sozzi de 2001¹⁹¹ no encontrara diferencias por estadio (solo se incluyeron pacientes estadio I-III) y el estudio del mismo grupo, publicado en 2009,¹⁸⁹ observara una tendencia que no fue significativa, al separar pacientes estadio II-IV frente a estadio I. Pensamos que la presencia de enfermedad a distancia puede aumentar de forma clara la concentración de ADNc fruto de la lisis tumoral, la liberación por parte de la célula tumoral e incluso por la lisis de células de tejidos vecinos en el mecanismo de invasión y progresión tumoral.

En cuanto al valor pronóstico de la concentración de ADNc destacamos algunos de los estudios que investigaron el papel de la concentración total de ADNc y su relación con la respuesta y con la supervivencia en cáncer de pulmón.

En 2012 el estudio de Catarino,¹⁹² recogió plasma de 104 pacientes con CNMP y 205 controles sanos. Había 4 pacientes estadio I-II (5,8%) y 100 estadio III-IV (96,2%). No observaron asociación con la carga tumoral (quizá porque la mayoría de pacientes eran estadio III-IV), pero sí que las concentraciones elevadas de ADNc se asociaron con la supervivencia de forma significativa: HR= 3.77; IC 95%: 1.16-12.28; $p= 0.03$.

Pan y colaboradores,¹⁶⁸ estudiaron 88 pacientes con CNMP y observaron que los pacientes que progresaban tenían mayor concentración de ADNc. Tras 3 ciclos, aquellos pacientes que tenían concentraciones más bajas de ADNc vivían más. Sin embargo, estos autores no estudiaron la evolución de los niveles de ADNc en la muestra pre y post-tratamiento, de hecho, no

estudiaron el papel de la concentración de ADNc basal. Otro estudio con similares resultados, es el de Kumar y colaboradores,¹⁶⁷ en el que analizaron 42 pacientes con CNMP estadio III-IV y observaron que los pacientes que progresaban tenían un aumento significativo en la concentración de ADNc. Además en cuanto a supervivencia, observaron que la concentración de ADNc tras el tercer ciclo tenía valor pronóstico ya que concentraciones elevadas se asociaban con peor supervivencia, sin embargo no encontraron esta asociación cuando se analizaron los niveles de ADNc pre-tratamiento.

El trabajo más reciente es el de Li y colaboradores.¹⁹³ Analizaron de forma prospectiva 103 pacientes con CNMP estadio IIIB-IV, a los que se recogió muestra de plasma basal, en la semana 6 y en la semana 12. Su objetivo fue estudiar la asociación entre la tasa de cambio de concentración de ADNc a las 12 semanas de tratamiento y la respuesta radiológica por TAC. El segundo objetivo de ese trabajo fue analizar la asociación entre la concentración basal de ADNc y la supervivencia. Los resultados obtenidos fueron negativos: no observaron relación entre el cambio en la concentración de ADNc y la respuesta radiológica por criterios RECIST, ni tampoco observaron asociación entre la variación en la concentración de ADNc con la supervivencia (global ni libre de progresión); HR= 0.93, IC 95%: 0.82–1.04; $p=$ 0.20, ni los niveles basales de ADNc con supervivencia (libre de progresión: HR= 1.06, IC 95% 0.93–1.20; $p=$ 0.41; ni con supervivencia global: HR= 1.04, IC 95%: 0.93–1.17; $p=$ 0.51), si bien llama la atención que el punto de corte utilizado, que fue la mediana: 7 ng/ml, es extremadamente bajo comparado con las otras series.

El estudio de Gautschi y colaboradores¹⁶⁹ ya mencionado previamente, aporta un dato más de conflictividad. En este trabajo se analizó la concentración de ADNc en dos muestras del mismo paciente, plasma y suero. Los resultados analizados de forma global sugieren un papel pronóstico al ADNc pero existen importantes discordancias en los resultados observados en cada muestra difíciles de explicar. Así la concentración de ADNc aumentaba en el plasma de pacientes que progresaban pero no lo hacía en suero, y disminuía en el suero de pacientes que respondían, pero cambiaba en plasma de los mismos pacientes respondedores. Sin embargo, en este estudio la

concentración basal de ADNc tanto en plasma como en suero se relacionó con la supervivencia, si bien las diferencias fueron mayores en plasma (mayor concentración se asociaba a peor supervivencia). Una de las limitaciones más importantes de este estudio es que incluía pacientes en todos los estadios, algunos habían sido tratados con cirugía y otros con radioterapia y otros solo con quimioterapia y no se hizo distinción entre ellos para el análisis.

Además de estos trabajos, hay otros estudios que analizaban el ADNc de forma cualitativa en relación con su valor pronóstico. Algunos ya han sido comentados, como el de Camps¹⁸⁸ o el de Sozzi¹⁸⁹, pero hay otros como el de Van Der Drift¹¹¹ que recoge 46 pacientes con CNMP pre-tratamiento y 21 controles sanos, observaron que concentraciones elevadas de ADNc se asociaban a peor supervivencia, pero no encontraron asociación con estadio tumoral, probablemente debido a que la muestra estaba muy dispersa y había pocos pacientes en cada estadio (estadio I, 11 pacientes, estadio II 6 pacientes, estadio III, 12 y 15 pacientes estadio IV).

No está claro si existe asociación de la concentración de ADNc con la carga tumoral y la supervivencia, los resultados de los estudios son dispares, probablemente, por las diferencias en las técnicas utilizadas para la cuantificación y las diferencias en los grupos de pacientes. En nuestro estudio, la asociación es clara, a pesar de que el número de pacientes es bajo, pero similar a los presentados en las otras series y la población es bastante homogénea. Además, a diferencia de los demás estudios antes mencionados, en nuestro trabajo, se realizó el estudio mediante regresión múltiple incluyendo edad, ECOG, histología (adenocarcinoma vs carcinoma epidermoide) y el ADNc se mantenía como factor pronóstico independiente. Por estos motivos, nos parece que podría ser interesante utilizar el mismo método para validar nuestros resultados en series más amplias.

Conclusiones

1. El sistema hemostático se encuentra afectado en pacientes con cáncer. Aunque hay elementos alterados comunes en las distintas neoplasias estudiadas, como son la elevación basal de LDH, DD y FvW, hay otros que varían entre ellas. En cáncer de próstata observamos una tendencia a una mayor activación de FXII que no se acompaña de activación de FXI. En cáncer colorrectal, se observó elevación de FvW y DD, sin activación de la ruta de contacto. En pacientes con CNMP, observamos una mayor incidencia de deficiencia de antitrombina que probablemente sea por consumo como lo sugiere la detección de complejos trombina-antitrombina.
2. La presencia de elevación del FvW en pacientes con cáncer de próstata se asocia con el desarrollo de eventos trombóticos en nuestra serie. No se ha encontrado relación entre el desarrollo de fenómenos trombóticos y otras alteraciones del sistema hemostático.
3. La quimioterapia basada en fluoropirimidinas no provoca alteraciones relevantes del sistema hemostático en pacientes con cáncer colorrectal.
4. Determinadas alteraciones del sistema hemostático, como el aumento de FvW, DD y ADN circulante, se asocian con un peor pronóstico en las neoplasias estudiadas. La elevación de FvW se asocia a peor pronóstico en tres de los cuatro tumores estudiados: cáncer de próstata, cáncer colorrectal y CNMP. La elevación de DD se asocia con peor pronóstico en cáncer de próstata. Finalmente, la presencia de concentraciones elevadas de ADN circulante se asocia con peor supervivencia en pacientes con cáncer de próstata y CNMP avanzado.

Bibliografía

BIBLIOGRAFIA

1. Alexa J. Siddon HMRyCAT. Andreoli and Carpenter's Cecil Essentials of Medicine; 2016.
2. Trousseau A. Phlegmasia alba dolens. In. Lectures on clinical medicine, delivered at the Hôtel-Dieu, Paris. 5th ed. Cormack JR, trans. London: New Sydenham Society; 1872:281-95.
3. Blom JW, Doggen CJ, Osanto S, Rosendaal FR. Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. *JAMA* 2005;293:715-22.
4. Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ, 3rd. Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study. *Archives of Internal Medicine* 2000;160:809-15.
5. Baron JA, Gridley G, Weiderpass E, Nyren O, Linet M. Venous thromboembolism and cancer. *Lancet* 1998;351:1077-80.
6. Lee AY, Levine MN. Venous thromboembolism and cancer: risks and outcomes. *Circulation* 2003;107:117-21.
7. Kristine Blix HJ, Sigrid K. Brækkan, John-Bjarne Hansen. Cancer-associated venous thromboembolism in a general population- The Scandinavian thrombosis and cancer (STAC) study. In: EVENT Symposium Etiology of venous thrombosis. Longyearbyen; 2014.
8. Streiff MB. Association between cancer types, cancer treatments, and venous thromboembolism in medical oncology patients. *Clinical Advances in Hematology & Oncology : Hematology and Oncology* 2013;11:349-57.
9. Khorana AA, Francis CW, Culakova E, Kuderer NM, Lyman GH. Frequency, risk factors, and trends for venous thromboembolism among hospitalized cancer patients. *Cancer* 2007;110:2339-46.
10. Cronin-Fenton DP, Sondergaard F, Pedersen LA, et al. Hospitalisation for venous thromboembolism in cancer patients and the general population: a population-based cohort study in Denmark, 1997-2006. *British Journal of Cancer* 2010;103:947-53.
11. Severinsen M OK, Tjønneland A, Kristensen SR on behalf of the STAC investigators. The impact of cancer stages on the risk of VTE in a prospective population based cohort study. Preliminary results from the STAC study. In. Longyearbyen; 2014.
12. Sorensen HT, Mellekjaer L, Olsen JH, Baron JA. Prognosis of cancers associated with venous thromboembolism. *The New England Journal of Medicine* 2000;343:1846-50.
13. White RH, Chew HK, Zhou H, et al. Incidence of venous thromboembolism in the year before the diagnosis of cancer in 528,693 adults. *Archives of Internal Medicine* 2005;165:1782-7.
14. Prandoni P, Lensing AW, Piccioli A, et al. Recurrent venous thromboembolism and bleeding complications during anticoagulant treatment in patients with cancer and venous thrombosis. *Blood* 2002;100:3484-8.
15. Chew HK, Wun T, Harvey D, Zhou H, White RH. Incidence of venous thromboembolism and its effect on survival among patients with common cancers. *Archives of Internal Medicine* 2006;166:458-64.
16. Lyman GH, Bohlke K, Khorana AA, et al. Venous thromboembolism prophylaxis and treatment in patients with cancer: American Society of Clinical Oncology

- clinical practice guideline update 2014. *Journal of Clinical Oncology* 2015;33:654-6.
17. Lyman GH, Khorana AA, Kuderer NM, et al. Venous thromboembolism prophylaxis and treatment in patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *Journal of Clinical Oncology* 2013;31:2189-204.
 18. Munoz Martin AJ, Font Puig C, Navarro Martin LM, Borrega Garcia P, Martin Jimenez M. Clinical guide SEOM on venous thromboembolism in cancer patients. *Clinical and Translational Oncology* 2014;16:1079-90.
 19. Napolitano M, Siragusa S. Reply to e.g. Urrego et Al. *Journal of Clinical Oncology* 2015;33:1713-4.
 20. Napolitano M, Saccullo G, Malato A, et al. Optimal duration of low molecular weight heparin for the treatment of cancer-related deep vein thrombosis: the Cancer-DACUS Study. *Journal of Clinical Oncology* 2014;32:3607-12.
 21. Urrego EG, Carmona-Bayonas A, Gonzalez-Billalabeitia E, Ayala de la Pena F. Should anticoagulation therapy be withheld in patients with active cancer after 6 months of low-molecular weight heparin? *Journal of Clinical Oncology* 2015;33:1713.
 22. Mousa SA, Petersen LJ. Anti-cancer properties of low-molecular-weight heparin: preclinical evidence. *Thrombosis and Haemostasis* 2009;102:258-67.
 23. Mousa SA, Mohamed S. Inhibition of endothelial cell tube formation by the low molecular weight heparin, tinzaparin, is mediated by tissue factor pathway inhibitor. *Thrombosis and Haemostasis* 2004;92:627-33.
 24. Kuderer NM, Ortel TL, Francis CW. Impact of venous thromboembolism and anticoagulation on cancer and cancer survival. *Journal of Clinical Oncology* 2009;27:4902-11.
 25. Mismetti P, Laporte-Simitsidis S, Tardy B, et al. Prevention of venous thromboembolism in internal medicine with unfractionated or low-molecular-weight heparins: a meta-analysis of randomised clinical trials. *Thrombosis and Haemostasis* 2000;83:14-9.
 26. Smorenburg SM, Vink R, Otten HM, Swaneveld F, Buller HR. The effects of vitamin K-antagonists on survival of patients with malignancy: a systematic analysis. *Thrombosis and Haemostasis* 2001;86:1586-7.
 27. Conti S, Guercini F, Iorio A. Low-molecular-weight heparin and cancer survival: review of the literature and pooled analysis of 1,726 patients treated for at least three months. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* 2003;33:197-201.
 28. Akl EA, Kahale LA, Ballout RA, et al. Parenteral anticoagulation in ambulatory patients with cancer. *The Cochrane database of systematic reviews* 2014;12:CD006652.
 29. Lebeau B, Chastang C, Brechot JM, et al. Subcutaneous heparin treatment increases survival in small cell lung cancer. "Petites Cellules" Group. *Cancer* 1994;74:38-45.
 30. Altinbas M, Coskun HS, Er O, et al. A randomized clinical trial of combination chemotherapy with and without low-molecular-weight heparin in small cell lung cancer. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2004;2:1266-71.

31. Lecumberri R, Lopez Vivanco G, Font A, et al. Adjuvant therapy with bemiparin in patients with limited-stage small cell lung cancer: results from the ABEL study. *Thrombosis Research* 2013;132:666-70.
32. Altinbas M, Dikilitas M, Ozkan M, Dogu GG, Er O, Coskun HS. The effect of small-molecular-weight heparin added to chemotherapy on survival in small-cell lung cancer - A retrospective analysis. *Indian Journal of Cancer* 2014;51:324-9.
33. Macbeth F, Noble S, Evans J, et al. Randomized Phase III Trial of Standard Therapy Plus Low Molecular Weight Heparin in Patients With Lung Cancer: FRAGMENT Trial. *Journal of Clinical Oncology* 2016;34:488-94.
34. Zhang J, Zhang YL, Ma KX, Qu JM. Efficacy and safety of adjunctive anticoagulation in patients with lung cancer without indication for anticoagulants: a systematic review and meta-analysis. *Thorax* 2013;68:442-50.
35. Sideras K, Schaefer PL, Okuno SH, et al. Low-molecular-weight heparin in patients with advanced cancer: a phase 3 clinical trial. *Mayo Clinic proceedings* 2006;81:758-67.
36. Agnelli G, Gussoni G, Bianchini C, et al. Nadroparin for the prevention of thromboembolic events in ambulatory patients with metastatic or locally advanced solid cancer receiving chemotherapy: a randomised, placebo-controlled, double-blind study. *The Lancet Oncology* 2009;10:943-9.
37. Kakkar AK, Levine MN, Kadziola Z, et al. Low molecular weight heparin, therapy with dalteparin, and survival in advanced cancer: the fragmin advanced malignancy outcome study (FAMOUS). *Journal of Clinical Oncology* 2004;22:1944-8.
38. Klerk CP, Smorenburg SM, Otten HM, et al. The effect of low molecular weight heparin on survival in patients with advanced malignancy. *Journal of Clinical Oncology* 2005;23:2130-5.
39. Blom JW, Vanderschoot JP, Oostindier MJ, Osanto S, van der Meer FJ, Rosendaal FR. Incidence of venous thrombosis in a large cohort of 66,329 cancer patients: results of a record linkage study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2006;4:529-35.
40. Chew HK, Wun T, Harvey DJ, Zhou H, White RH. Incidence of venous thromboembolism and the impact on survival in breast cancer patients. *Journal of Clinical Oncology* 2007;25:70-6.
41. Scappaticci FA, Skillings JR, Holden SN, et al. Arterial thromboembolic events in patients with metastatic carcinoma treated with chemotherapy and bevacizumab. *Journal of the National Cancer Institute* 2007;99:1232-9.
42. Zangari M, Fink LM, Elice F, Zhan F, Adcock DM, Tricot GJ. Thrombotic events in patients with cancer receiving antiangiogenesis agents. *Journal of Clinical Oncology* 2009;27:4865-73.
43. Ay C, Dunkler D, Marosi C, et al. Prediction of venous thromboembolism in cancer patients. *Blood* 2010;116:5377-82.
44. Khorana AA, Kuderer NM, Culakova E, Lyman GH, Francis CW. Development and validation of a predictive model for chemotherapy-associated thrombosis. *Blood* 2008;111:4902-7.
45. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A. Coagulation and cancer: biological and clinical aspects. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2013;11:223-33.

46. Langer F, Bokemeyer C. Crosstalk between cancer and haemostasis. Implications for cancer biology and cancer-associated thrombosis with focus on tissue factor. *Hamostaseologie* 2012;32:95-104.
47. Pabinger I, Thaler J, Ay C. Biomarkers for prediction of venous thromboembolism in cancer. *Blood* 2013;122:2011-8.
48. Keibel A, Singh V, Sharma MC. Inflammation, microenvironment, and the immune system in cancer progression. *Current Pharmaceutical Design* 2009;15:1949-55.
49. Owens AP, 3rd, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circulation Research* 2011;108:1284-97.
50. Thaler J, Ay C, Weinstabl H, et al. Circulating procoagulant microparticles in cancer patients. *Annals of Hematology* 2011;90:447-53.
51. Tesselaar ME, Romijn FP, Van Der Linden IK, Prins FA, Bertina RM, Osanto S. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2007;5:520-7.
52. Manly DA, Wang J, Glover SL, et al. Increased microparticle tissue factor activity in cancer patients with Venous Thromboembolism. *Thrombosis Research* 2010;125:511-2.
53. Auwerda JJ, Yuana Y, Osanto S, et al. Microparticle-associated tissue factor activity and venous thrombosis in multiple myeloma. *Thrombosis and Haemostasis* 2011;105:14-20.
54. Thaler J, Ay C, Mackman N, et al. Microparticle-associated tissue factor activity, venous thromboembolism and mortality in pancreatic, gastric, colorectal and brain cancer patients. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2012;10:1363-70.
55. Voloshin T, Fremder E, Shaked Y. Small but mighty: microparticles as mediators of tumor progression. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society* 2014;7:11-21.
56. Balaj L, Lessard R, Dai L, et al. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nature Communications* 2011;2:180.
57. Poutsika DD, Schroder EW, Taylor DD, Levy EM, Black PH. Membrane vesicles shed by murine melanoma cells selectively inhibit the expression of Ia antigen by macrophages. *Journal of Immunology* 1985;134:138-44.
58. Al-Nedawi K, Meehan B, Kerbel RS, Allison AC, Rak J. Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106:3794-9.
59. Millimaggi D, Mari M, D'Ascenzo S, et al. Tumor vesicle-associated CD147 modulates the angiogenic capability of endothelial cells. *Neoplasia* 2007;9:349-57.
60. Taverna S, Gherzi G, Ginestra A, et al. Shedding of membrane vesicles mediates fibroblast growth factor-2 release from cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2003;278:51911-9.
61. Yu J, May L, Milsom C, et al. Contribution of host-derived tissue factor to tumor neovascularization. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2008;28:1975-81.

62. Abu Saadeh F, Norris L, O'Toole S, et al. Tumour expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in ovarian cancer- relationship with venous thrombosis risk. *Thrombosis Research* 2013;132:627-34.
63. Schaffner F, Versteeg HH, Schillert A, et al. Cooperation of tissue factor cytoplasmic domain and PAR2 signaling in breast cancer development. *Blood* 2010;116:6106-13.
64. Ruf W. Tissue factor and cancer. *Thrombosis Research* 2012;130 Suppl 1:S84-7.
65. Schaffner F, Yokota N, Ruf W. Tissue factor proangiogenic signaling in cancer progression. *Thrombosis Research* 2012;129 Suppl 1:S127-31.
66. Magnus N, Garnier D, Rak J. Oncogenic epidermal growth factor receptor up-regulates multiple elements of the tissue factor signaling pathway in human glioma cells. *Blood* 2010;116:815-8.
67. Jain S, Harris J, Ware J. Platelets: linking hemostasis and cancer. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2010;30:2362-7.
68. Danckwardt S, Hentze MW, Kulozik AE. Pathologies at the nexus of blood coagulation and inflammation: thrombin in hemostasis, cancer, and beyond. *Journal of Molecular Medicine (Berl)* 2013;91:1257-71.
69. Ay C, Dunkler D, Pirker R, et al. High D-dimer levels are associated with poor prognosis in cancer patients. *Haematologica* 2012;97:1158-64.
70. Cosmi B, Legnani C, Cini M, Guazzaloca G, Palareti G. The role of D-dimer and residual venous obstruction in recurrence of venous thromboembolism after anticoagulation withdrawal in cancer patients. *Haematologica* 2005;90:713-5.
71. Oya M, Akiyama Y, Okuyama T, Ishikawa H. High preoperative plasma D-dimer level is associated with advanced tumor stage and short survival after curative resection in patients with colorectal cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 2001;31:388-94.
72. Ay C, Vormittag R, Dunkler D, et al. D-dimer and prothrombin fragment 1 + 2 predict venous thromboembolism in patients with cancer: results from the Vienna Cancer and Thrombosis Study. *Journal of Clinical Oncology* 2009;27:4124-9.
73. Arpaia G, Carpenedo M, Verga M, et al. D-dimer before chemotherapy might predict venous thromboembolism. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2009;20:170-5.
74. Vicente E. Predictive value for thrombosis of pre-chemotherapy D-Dimer in ambulatory cancer patients. In. *ASCO Annual Meeting Journal of Clinical Oncology* 27, 2009 (suppl; abstr e20601); 2009.
75. Blackwell K, Haroon Z, Broadwater G, et al. Plasma D-dimer levels in operable breast cancer patients correlate with clinical stage and axillary lymph node status. *Journal of Clinical Oncology* 2000;18:600-8.
76. Dirix LY, Salgado R, Weytjens R, et al. Plasma fibrin D-dimer levels correlate with tumour volume, progression rate and survival in patients with metastatic breast cancer. *British Journal of Cancer* 2002;86:389-95.
77. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:15880-5.
78. Demers M, Krause DS, Schatzberg D, et al. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2012;109:13076-81.
79. Fuchs TA, Brill A, Wagner DD. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2012;32:1777-83.
 80. Ishiguro K, Kojima T, Kadomatsu K, et al. Complete antithrombin deficiency in mice results in embryonic lethality. *The Journal of Clinical Investigation* 2000;106:873-8.
 81. Hernandez-Espinosa D, Minano A, Martinez C, et al. L-asparaginase-induced antithrombin type I deficiency: implications for conformational diseases. *The American Journal of Pathology* 2006;169:142-53.
 82. Guerrero JA, Teruel R, Martinez C, et al. Protective role of antithrombin in mouse models of liver injury. *Journal of Hepatology* 2012;57:980-6.
 83. Koh SC, Khalil R, Lim FK, Ilancheran A, Choolani M. The association between fibrinogen, von Willebrand Factor, antithrombin III, and D-dimer levels and survival outcome by 36 months from ovarian cancer. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 2006;12:3-8.
 84. Hong SK, Ko DW, Park J, et al. Alteration of Antithrombin III and D-dimer Levels in Clinically Localized Prostate Cancer. *Korean Journal of Urology* 2010;51:25-9.
 85. Unsal E, Atalay F, Atikcan S, Yilmaz A. Prognostic significance of hemostatic parameters in patients with lung cancer. *Respiratory Medicine* 2004;98:93-8.
 86. Browder T, Folkman J, Pirie-Shepherd S. The hemostatic system as a regulator of angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 2000;275:1521-4.
 87. Azhar A, Singh P, Rashid Q, Naseem A, Khan MS, Jairajpuri MA. Antiangiogenic function of antithrombin is dependent on its conformational variation: implication for other serpins. *Protein and Peptide Letters* 2013;20:403-11.
 88. Muller F, Mutch NJ, Schenk WA, et al. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell* 2009;139:1143-56.
 89. Mackman N, Gruber A. Platelet polyphosphate: an endogenous activator of coagulation factor XII. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2010;8:865-7.
 90. Puy C, Tucker EI, Wong ZC, et al. Factor XII promotes blood coagulation independent of factor XI in the presence of long-chain polyphosphates. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2013;11:1341-52.
 91. Kenne E, Nickel KF, Long AT, et al. Factor XII: a novel target for safe prevention of thrombosis and inflammation. *Journal of Internal Medicine* 2015;278:571-85.
 92. de la Morena-Barrio ME, Sevivas TS, Martinez-Martinez I, et al. Congenital disorder of glycosylation (PMM2-CDG) in a patient with antithrombin deficiency and severe thrombophilia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2012;10:2625-7.
 93. de la Morena-Barrio ME, Anton AI, Martinez-Martinez I, et al. Regulatory regions of SERPINC1 gene: identification of the first mutation associated with antithrombin deficiency. *Thrombosis and Haemostasis* 2012;107:430-7.
 94. de la Morena-Barrio MEM-M, I.; de Cos, C. New thrombophilic mechanism: autosomal-recessive and transient antithrombin deficiency due to hypoglycosylation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2016;en prensa.

95. Holst S, Stavenhagen K, Balog CI, et al. Investigations on aberrant glycosylation of glycosphingolipids in colorectal cancer tissues using liquid chromatography and matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *Molecular & cellular Proteomics* 2013;12:3081-93.
96. Kang JG, Ko JH, Kim YS. Pros and cons of using aberrant glycosylation as companion biomarkers for therapeutics in cancer. *BMB reports* 2011;44:765-71.
97. Pinho SS, Oliveira P, Cabral J, et al. Loss and recovery of Mgat3 and GnT-III Mediated E-cadherin N-glycosylation is a mechanism involved in epithelial-mesenchymal-epithelial transitions. *PloS One* 2012;7:e33191.
98. Xu Q, Isaji T, Lu Y, et al. Roles of N-acetylglucosaminyltransferase III in epithelial-to-mesenchymal transition induced by transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) in epithelial cell lines. *The Journal of Biological Chemistry* 2012;287:16563-74.
99. Patsos G, Andre S, Roeckel N, et al. Compensation of loss of protein function in microsatellite-unstable colon cancer cells (HCT116): a gene-dependent effect on the cell surface glycan profile. *Glycobiology* 2009;19:726-34.
100. Park SY, Yoon SJ, Jeong YT, et al. N-glycosylation status of beta-haptoglobin in sera of patients with colon cancer, chronic inflammatory diseases and normal subjects. *International Journal of Cancer* 2010;126:142-55.
101. Balog CI, Stavenhagen K, Fung WL, et al. N-glycosylation of colorectal cancer tissues: a liquid chromatography and mass spectrometry-based investigation. *Molecular and Cellular Proteomics* 2012;11:571-85.
102. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* 2012;12:252-64.
103. Robert C, Schachter J, Long GV, et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *The New England Journal of Medicine* 2015.
104. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *The New England Journal of Medicine* 2015.
105. Swystun LL, Mukherjee S, Liaw PC. Breast cancer chemotherapy induces the release of cell-free DNA, a novel procoagulant stimulus. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2011;9:2313-21.
106. von Bruhl ML, Stark K, Steinhart A, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* 2012;209:819-35.
107. Diaz LA, Jr., Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *Journal of Clinical Oncology* 2014;32:579-86.
108. Ilie M, Hofman V, Long E, et al. Current challenges for detection of circulating tumor cells and cell-free circulating nucleic acids, and their characterization in non-small cell lung carcinoma patients. What is the best blood substrate for personalized medicine? *Annals of Translational Medicine* 2014;2:107.
109. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *The New England Journal of Medicine* 2013;368:1199-209.
110. Schwarzenbach H, Alix-Panabieres C, Muller I, et al. Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer. *Clinical Cancer Research* 2009;15:1032-8.

111. van der Drift MA, Hol BE, Klaassen CH, et al. Circulating DNA is a non-invasive prognostic factor for survival in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2010;68:283-7.
112. Ignatiadis M, Dawson SJ. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA for precision medicine: dream or reality? *Annals of Oncology* 2014;25:2304-13.
113. Nie K, Jia Y, Zhang X. Cell-free circulating tumor DNA in plasma/serum of non-small cell lung cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2015;36:7-19.
114. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *European Journal of Cancer* 2009;45:228-47.
115. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *American Journal of Clinical Oncology* 1982;5:649-55.
116. Armstrong AJ, Garrett-Mayer ES, Yang YC, de Wit R, Tannock IF, Eisenberger M. A contemporary prognostic nomogram for men with hormone-refractory metastatic prostate cancer: a TAX327 study analysis. *Clinical Cancer Research* 2007;13:6396-403.
117. Tait C, Moore D, Hodgson C, et al. Quantification of skeletal metastases in castrate-resistant prostate cancer predicts progression-free and overall survival. *BJU international* 2014;114:E70-3.
118. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *Journal of Thoracic Oncology* 2013;8:823-59.
119. Corral J, Hernandez-Espinosa D, Soria JM, et al. Antithrombin Cambridge II (A384S): an underestimated genetic risk factor for venous thrombosis. *Blood* 2007;109:4258-63.
120. de la Morena-Barrio ME, Garcia A, Martinez-Martinez I, et al. A new method to quantify beta-antithrombin glycoform in plasma reveals increased levels during the acute stroke event. *Thrombosis Research* 2015;136:634-41.
121. Corral J, Huntington JA, Gonzalez-Conejero R, et al. Mutations in the shutter region of antithrombin result in formation of disulfide-linked dimers and severe venous thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2004;2:931-9.
122. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 2012;9:671-5.
123. Helander A, Husa A, Jeppsson JO. Improved HPLC method for carbohydrate-deficient transferrin in serum. *Clinical Chemistry* 2003;49:1881-90.
124. Lane DA, Bayston T, Olds RJ, et al. Antithrombin mutation database: 2nd (1997) update. For the Plasma Coagulation Inhibitors Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thrombosis and Haemostasis* 1997;77:197-211.
125. Olds RJ, Lane DA, Chowdhury V, De Stefano V, Leone G, Thein SL. Complete nucleotide sequence of the antithrombin gene: evidence for homologous recombination causing thrombophilia. *Biochemistry* 1993;32:4216-24.
126. Jaeken J. Congenital disorders of glycosylation (CDG): it's (nearly) all in it! *Journal of Inherited Metabolic Disease* 2011;34:853-8.

127. Caine GJ, Lip GY, Stonelake PS, Ryan P, Blann AD. Platelet activation, coagulation and angiogenesis in breast and prostate carcinoma. *Thrombosis and Haemostasis* 2004;92:185-90.
128. Kohli M, Fink LM, Spencer HJ, Zent CS. Advanced prostate cancer activates coagulation: a controlled study of activation markers of coagulation in ambulatory patients with localized and advanced prostate cancer. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2002;13:1-5.
129. Amer MH. Cancer-associated thrombosis: clinical presentation and survival. *Cancer Management and Research* 2013;5:165-78.
130. Morganti M, Carpi A, Amo-Takyi B, et al. Von Willebrand's factor mediates the adherence of human tumoral cells to human endothelial cells and ticlopidine interferes with this effect. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2000;54:431-6.
131. Terraube V, Marx I, Denis CV. Role of von Willebrand factor in tumor metastasis. *Thrombosis Research* 2007;120 Suppl 2:S64-70.
132. Liu G, Ren YM. Effect of von Willebrand factor on the biological characteristics of colorectal cancer cells. *Chinese Journal of Gastrointestinal Surgery* 2010;13:616-9.
133. Damin DC, Rosito MA, Gus P, Roisemberg I, Bandinelli E, Schwartzmann G. Von Willebrand factor in colorectal cancer. *International Journal of Colorectal Disease* 2002;17:42-5.
134. Wang WS, Lin JK, Lin TC, et al. Plasma von Willebrand factor level as a prognostic indicator of patients with metastatic colorectal carcinoma. *World Journal of Gastroenterology* 2005;11:2166-70.
135. Schellerer VS, Mueller-Bergh L, Merkel S, et al. The clinical value of von Willebrand factor in colorectal carcinomas. *American Journal of Translational Research* 2011;3:445-53.
136. Gil-Bazo I, Catalan Goni V, Alonso Gutierrez A, et al. Impact of surgery and chemotherapy on von Willebrand factor and vascular endothelial growth factor levels in colorectal cancer. *Clinical and Translational Oncology* 2005;7:150-5.
137. Liu Y, Starr MD, Bulusu A, et al. Correlation of angiogenic biomarker signatures with clinical outcomes in metastatic colorectal cancer patients receiving capecitabine, oxaliplatin, and bevacizumab. *Cancer Medicine* 2013;2:234-42.
138. Houry JD, Adcock DM, Chan F, et al. Increases in quantitative D-dimer levels correlate with progressive disease better than circulating tumor cell counts in patients with refractory prostate cancer. *American Journal of Clinical Pathology* 2010;134:964-9.
139. Blackwell K, Hurwitz H, Lieberman G, et al. Circulating D-dimer levels are better predictors of overall survival and disease progression than carcinoembryonic antigen levels in patients with metastatic colorectal carcinoma. *Cancer* 2004;101:77-82.
140. Wang Y, Wang Z. Predictive value of plasma D-dimer levels in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *OncoTargets and Therapy* 2015;8:805-8.
141. Ma X, Li Y, Zhang J, Huang J, Liu L. Prognostic role of D-dimer in patients with lung cancer: a meta-analysis. *Tumour Biology* 2014;35:2103-9.
142. Li Y, Wei S, Wang J, Hong L, Cui L, Wang C. Analysis of the factors associated with abnormal coagulation and prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Chinese Journal of Lung Cancer* 2014;17:789-96.

143. Ge LP, Li J, Bao QL, Chen P, Jiang Q, Zhu LR. Prognostic and predictive value of plasma D-dimer in advanced non-small cell lung cancer patients undergoing first-line chemotherapy. *Clinical and Translational Oncology* 2015;17:57-64.
144. Inal T, Anar C, Polat G, Unsal I, Halilcolar H. The prognostic value of D-dimer in lung cancer. *The Clinical Respiratory Journal* 2015;9:305-13.
145. Posch F, Riedl J, Reitter EM, et al. Hypercoagulability, venous thromboembolism, and death in patients with cancer. A Multi-State Model. *Thrombosis and Haemostasis* 2016;115:817-26.
146. Diao D, Wang Z, Cheng Y, et al. D-dimer: not just an indicator of venous thrombosis but a predictor of asymptomatic hematogenous metastasis in gastric cancer patients. *PLoS One* 2014;9:e101125.
147. Wang M, Yang L, Pan J, et al. Dynamic changes and significance of antithrombin and fibrinolytic function in advanced lung cancer patients during chemotherapy. *Chinese Journal of Lung Cancer* 2007;10:226-8.
148. Dabrowska M PJ, Kemonna H, Kretowska J, Kulik S, Gluszczyk M. Serum antithrombin III and alpha-2-antiplasmin concentration in patients with lung carcinoma. *Folia Haematologica (Germany)* 1988;115(5):641-6.
149. Gabazza EC, Taguchi O, Yamakami T, Machishi M, Ibata H, Suzuki S. Evaluating prethrombotic state in lung cancer using molecular markers. *Chest* 1993;103:196-200.
150. Geddings JE, Mackman N. New players in haemostasis and thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis* 2014;111:570-4.
151. Matthijs G, Schollen E, Pardon E, et al. Mutations in PMM2, a phosphomannomutase gene on chromosome 16p13, in carbohydrate-deficient glycoprotein type I syndrome (Jaeken syndrome). *Nature Genetics* 1997;16:88-92.
152. Irving JA, Pike RN, Lesk AM, Whisstock JC. Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Research* 2000;10:1845-64.
153. McCoy AJ, Pei XY, Skinner R, Abrahams JP, Carrell RW. Structure of beta-antithrombin and the effect of glycosylation on antithrombin's heparin affinity and activity. *Journal of Molecular Biology* 2003;326:823-33.
154. Numico G, Garrone O, Dongiovanni V, et al. Prospective evaluation of major vascular events in patients with nonsmall cell lung carcinoma treated with cisplatin and gemcitabine. *Cancer* 2005;103:994-9.
155. Khorana AA, Connolly GC. Assessing risk of venous thromboembolism in the patient with cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2009;27:4839-47.
156. Agnelli G, Bolis G, Capussotti L, et al. A clinical outcome-based prospective study on venous thromboembolism after cancer surgery: the @RISTOS project. *Annals of Surgery* 2006;243:89-95.
157. Alcalay A, Wun T, Khatri V, et al. Venous thromboembolism in patients with colorectal cancer: incidence and effect on survival. *Journal of Clinical Oncology* 2006;24:1112-8.
158. Blom JW, Osanto S, Rosendaal FR. The risk of a venous thrombotic event in lung cancer patients: higher risk for adenocarcinoma than squamous cell carcinoma. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2004;2:1760-5.

159. Gary T, Belaj K, Steidl K, et al. Asymptomatic deep vein thrombosis and superficial vein thrombosis in ambulatory cancer patients: impact on short-term survival. *British Journal of Cancer* 2012;107:1244-8.
160. Pulivarthi S, Gurram MK. Effectiveness of d-dimer as a screening test for venous thromboembolism: an update. *North American Journal of Medical Sciences* 2014;6:491-9.
161. Ferroni P, Martini F, Portarena I, et al. Novel high-sensitive D-dimer determination predicts chemotherapy-associated venous thromboembolism in intermediate risk lung cancer patients. *Clinical Lung Cancer* 2012;13:482-7.
162. Kodama J, Seki N, Masahiro S, et al. D-dimer level as a risk factor for postoperative venous thromboembolism in Japanese women with gynecologic cancer. *Annals of Oncology* 2010;21:1651-6.
163. Stender MT, Frokjaer JB, Larsen TB, Lundbye-Christensen S, Thorlacius-Ussing O. Preoperative plasma D-dimer is a predictor of postoperative deep venous thrombosis in colorectal cancer patients: a clinical, prospective cohort study with one-year follow-up. *Diseases of the Colon and Rectum* 2009;52:446-51.
164. Jianlong M, Diansheng Z, Jing R. Estimation of venous thromboembolism risk with thrombotic biomarkers in cancer patients. *Chinese Journal of Oncology* 2015;37:283-9.
165. Stein PD, Beemath A, Meyers FA, Skaf E, Sanchez J, Olson RE. Incidence of venous thromboembolism in patients hospitalized with cancer. *The American Journal of Medicine* 2006;119:60-8.
166. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Science Translational Medicine* 2014;6:224ra24.
167. Kumar S, Guleria R, Singh V, Bharti AC, Mohan A, Das BC. Efficacy of circulating plasma DNA as a diagnostic tool for advanced non-small cell lung cancer and its predictive utility for survival and response to chemotherapy. *Lung Cancer* 2010;70:211-7.
168. Pan S, Xia W, Ding Q, et al. Can plasma DNA monitoring be employed in personalized chemotherapy for patients with advanced lung cancer? *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2012;66:131-7.
169. Gautschi O, Bigosch C, Huegeli B, et al. Circulating deoxyribonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology* 2004;22:4157-64.
170. Hao TB, Shi W, Shen XJ, et al. Circulating cell-free DNA in serum as a biomarker for diagnosis and prognostic prediction of colorectal cancer. *British Journal of Cancer* 2014;111:1482-9.
171. Spindler KL, Pallisgaard N, Andersen RF, Brandslund I, Jakobsen A. Circulating free DNA as biomarker and source for mutation detection in metastatic colorectal cancer. *PloS One* 2015;10:e0108247.
172. Pisanic TR, 2nd, Athamanolap P, Poh W, et al. DREAMing: a simple and ultrasensitive method for assessing intratumor epigenetic heterogeneity directly from liquid biopsies. *Nucleic Acids Research* 2015.
173. Ellinger J, Muller SC, Stadler TC, Jung A, von Ruecker A, Bastian PJ. The role of cell-free circulating DNA in the diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Urologic Oncology* 2011;29:124-9.

174. Holdhoff M, Schmidt K, Donehower R, Diaz LA, Jr. Analysis of circulating tumor DNA to confirm somatic KRAS mutations. *Journal of the National Cancer Institute* 2009;101:1284-5.
175. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature Medicine* 2008;14:985-90.
176. Olsson E, Winter C, George A, et al. Serial monitoring of circulating tumor DNA in patients with primary breast cancer for detection of occult metastatic disease. *EMBO Molecular Medicine* 2015;7:1034-47.
177. Duffy MJ. Clinical uses of tumor markers: a critical review. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 2001;38:225-62.
178. Frattini M, Gallino G, Signoroni S, et al. Quantitative and qualitative characterization of plasma DNA identifies primary and recurrent colorectal cancer. *Cancer Letters* 2008;263:170-81.
179. Perkins G, Yap TA, Pope L, et al. Multi-purpose utility of circulating plasma DNA testing in patients with advanced cancers. *PLoS One* 2012;7:e47020.
180. Niven Mehra RC, Lorna Pope, Suzanne Carreira, Jane Goodall, David Lorente, Nuria Porta, Emma Hall, Penelope Flohr, Gunther Boysen, Diletta Bianchini, Oliver Sartor, Mario A. Eisenberger, Karim Fizazi, Stephane Oudard, Mustapha Chadjaa, Sandrine Macé, Johann S. De Bono. Association of plasma cell-free DNA concentration (cfDNA) with outcome from taxane therapy (TT) for castration resistant prostate cancer (CRPC). *Journal of Clinical Oncology* 2016;34.
181. Delgado PO, Alves BC, Gehrke Fde S, et al. Characterization of cell-free circulating DNA in plasma in patients with prostate cancer. *Tumour Biology* 2013;34:983-6.
182. Wroclawski ML, Serpa-Neto A, Fonseca FL, et al. Cell-free plasma DNA as biochemical biomarker for the diagnosis and follow-up of prostate cancer patients. *Tumour Biology* 2013;34:2921-7.
183. Lecomte T, Ceze N, Dorval E, Laurent-Puig P. Circulating free tumor DNA and colorectal cancer. *Gastroenterologie Clinique et Biologique* 2010;34:662-81.
184. Frattini M, Gallino G, Signoroni S, et al. Quantitative analysis of plasma DNA in colorectal cancer patients: a novel prognostic tool. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006;1075:185-90.
185. Spindler KL, Pallisgaard N, Vogelius I, Jakobsen A. Quantitative cell-free DNA, KRAS, and BRAF mutations in plasma from patients with metastatic colorectal cancer during treatment with cetuximab and irinotecan. *Clinical Cancer Research* 2012;18:1177-85.
186. El Messaoudi S, Mouliere F, Du Manoir S, et al. Circulating DNA as a strong multi-marker prognostic tool for metastatic colorectal cancer patient management care. *Clinical Cancer Research* 2016.
187. Spindler KL, Appelt AL, Pallisgaard N, Andersen RF, Brandslund I, Jakobsen A. Cell-free DNA in healthy individuals, noncancerous disease and strong prognostic value in colorectal cancer. *International Journal of Cancer* 2014;135:2984-91.
188. Camps Herrero C, Bayo Zaera P, Sirera Perez R, Sancho Salvador E, Blasco Cordellat A, Safont Aguilera MJ. Analysis of tumour-derived DNA in serum in advanced non-microcytic lung cancer: might it be a prognostic factor?. *Clinical and Translational Oncology* 2005;7:122-6.

189. Sozzi G, Roz L, Conte D, et al. Plasma DNA quantification in lung cancer computed tomography screening: five-year results of a prospective study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2009;179:69-74.
190. Nygaard AD, Holdgaard PC, Spindler KL, Pallisgaard N, Jakobsen A. The correlation between cell-free DNA and tumour burden was estimated by PET/CT in patients with advanced NSCLC. *British Journal of Cancer* 2014;110:363-8.
191. Sozzi G, Conte D, Mariani L, et al. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Research* 2001;61:4675-8.
192. Catarino R, Coelho A, Araujo A, et al. Circulating DNA: diagnostic tool and predictive marker for overall survival of NSCLC patients. *PloS One* 2012;7:e38559.
193. Li BT, Drilon A, Johnson ML, et al. A prospective study of total plasma cell-free DNA as a predictive biomarker for response to systemic therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancers. *Annals of Oncology* 2016;27:154-9.

Anexo

ANEXO

FORMULAS DE LOS TAMPONES UTILIZADOS

PBS (1litro)

- Cloruro de Sodio (NaCl) 8 gr
- Cloruro de Potasio (KCl)..... 0,2 gr
- Fosfato de disodio (Na_2HPO_4)..... 1,44 gr
- Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)..... 0,24 gr
- Para ajustar el pH a 7,3 se utilizara HCl

PBS 1X + TWEEN 20 (0,1 %)

TBS

- Tris Base 50 mM (MW 121,14)
- NaCl 150 mM (MW 58,44)
- Se ajusta a pH 7,4