

Alberto Rodrigo Cáceres

Biopsia Líquida Térmica (TLB):
Calorimetría diferencial de barrido
aplicada a diagnóstico y
seguimiento de melanoma y
cáncer de pulmón

Director/es

Isla Casado, Dolores
Abian Franco, Olga María

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

BIOPSIA LÍQUIDA TÉRMICA (TLB): CALORIMETRÍA
DIFERENCIAL DE BARRIDO APLICADA A
DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE MELANOMA Y
CÁNCER DE PULMÓN

Autor

Alberto Rodrigo Cáceres

Director/es

Isla Casado, Dolores
Abian Franco, Olga María

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

2021

Tesis Doctoral

BIOPSIA LÍQUIDA TÉRMICA (TLB): CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO APLICADA A DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE MELANOMA Y CÁNCER DE PULMÓN

Autor

ALBERTO RODRIGO CÁCERES

Director/es

Olga Abian Franco
Dolores Isla Casado

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Medicina, psiquiatría y dermatología
Año2021

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA, PSIQUIATRÍA Y
DERMATOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

BIOPSIA LÍQUIDA TÉRMICA (TLB): CALORIMETRÍA
DIFERENCIAL DE BARRIDO APLICADA A
DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE MELANOMA Y
CÁNCER DE PULMÓN

Memoria presentada por:

ALBERTO RODRIGO CÁCERES

Licenciado en Medicina

Para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza



**Universidad
Zaragoza**

D^a. Olga Abian Franco, Doctora en Bioquímica y Biología Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid e Investigadora Senior en el Instituto Aragonés de la Salud (IACS), y D^a. María Dolores Isla Casado, Jefa del Servicio de Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (Zaragoza) y Doctora en Medicina.

Certifican:

Que Don Alberto Rodrigo Cáceres, Licenciado en Medicina, ha realizado bajo su dirección la Tesis Doctoral titulada **“Biopsia Líquida Térmica (TLB): Calorimetría Diferencial de Barrido aplicada a diagnóstico y seguimiento de melanoma y cáncer de pulmón”** y que dicho trabajo reúne a nuestro juicio, originalidad, evidencia científica, calidad y méritos académicos suficientes para ser presentado como Memoria para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

Y para que conste, firman el presente Certificado en Zaragoza a 13 de Enero de 2021

Fdo.: Olga Abian Franco

Fdo.: Dolores Isla Casado

“Nunca consideres el estudio como una obligación,
sino como una oportunidad para penetrar
en el bello y maravilloso mundo del saber”

ALBERT EINSTEIN

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quería agradecerle todo el trabajo y dedicación sin el cual no hubiera sido posible esta tesis doctoral a mi directora OLGA ABIÁN, porque siempre ha estado ahí para animarme a seguir, para todo lo que me iba surgiendo y con la cual ha sido un gusto trabajar, haciendo todo fácil y ameno.

A mi otra directora de la tesis, LOLA ISLA, porque es mi mentora dentro de la oncología, gracias a la cual hoy soy lo que soy en mi profesión y la que tengo siempre como referente de cómo quiero ser. Por su ayuda siempre que la he necesitado, sus siempre tempranas respuestas y sus buenos consejos.

A mis compañeras residentes de oncología durante mis años de residencia ALEXIA, PATRI, ELISA, MARA, cuando comencé este camino de la tesis, sin los cuales muchos de los datos que se recogen no podrían haber sido, porque siempre que les necesité ahí estuvieron para ayudarme. Porque además de compañeras son buenas amigas, e hicieron que esos años sean inolvidables, y que nos sigamos viendo por muchos años más. Igualmente agradecer a mis adjuntos del Hospital Clínico Lozano Blesa de Zaragoza, los cuales me trataron como a un hijo y a un amigo, me enseñaron todo lo que se de la oncología y siempre estuvieron ahí cuando los necesité

En especial, quería agradecer a mi coerre, compañera, amiga, ANA CALLEJO, la cual siempre está ahí, siempre dispuesta a echar una mano o una sonrisa y sin la cual no me imagino mis años de residencia.

A mis compañeros del Servicio de Oncología del Hospital Arnau de Vilanova de Lleida, que me han aguantado estos años trabajando en la tesis y siempre se han interesado, con los cuales es un gusto trabajar y hacen que me sienta como en casa. En especial a Guillermina, por su recuerdo semanal de que debía terminar la tesis ya.

A mis amigos, que siempre están ahí, que son la familia que uno elige y sin los cuales no me imaginaría mi vida como es hoy.

Y por ultimo, y para mi más importantes, a mi familia. A mis padres, sin los cuales no sería quien soy ni estaría donde estoy, que siempre están ahí para todo lo que les necesito y que siempre han hecho todos los sacrificios necesarios sin pensarlo por mi. A mi hermano Fran, con su apoyo constante como hermano mayor, y como amigo, el que nos alegra siempre en la familia.

No podría terminar el agradecimiento sin acordarme de los pacientes, quienes altruistamente aportaron su interés en el estudio en esos momentos tan duro de esta enfermedad que es el cáncer.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	16
1.1. CIFRAS DEL CÁNCER	18
1.2. MEDICINA PERSONALIZADA	23
1.3. MELANOMA	26
1.3.1. Diagnóstico del melanoma	27
1.3.2. Seguimiento del melanoma	28
1.4. CÁNCER DE PULMÓN	29
1.4.1. Diagnóstico del cáncer de pulmón	30
1.4.2. Evaluación de respuesta en cáncer de pulmón	31
1.4.3. Tratamiento	31
1.5. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO	33
1.6. CRIBADO EN CÁNCER DE PULMÓN	40
1.7. BIOPSIA LÍQUIDA	47
1.7.1. Concepto	47
1.7.2. Características	49
1.7.3. Subtipos	51
1.7.4. Ventajas y desventajas de la biopsia líquida	55
1.7.5. Usos de la biopsia líquida en diferentes tumores	57
1.7.6. Biopsia líquida en cáncer de pulmón	58
1.7.7. Futuras aplicaciones de la biopsia líquida	64

2. OBJETIVOS	66
3. MATERIALES Y MÉTODOS	70
3.1. Diseño del estudio	72
3.1.1. Cronograma del estudio	72
3.2. Población del estudio	73
3.2.1. Estudio de melanoma	73
3.2.2. Estudio de cáncer de pulmón	74
3.2.2.1. Criterios de inclusión	74
3.2.2.2. Criterios de exclusión	75
3.3. Recogida de las muestras	76
3.3.1. Estudio de melanoma	76
3.3.2. Estudio de cáncer de pulmón	77
3.4. Procesamiento especial de las muestras de melanoma	78
3.5. Técnica de estudio	79
3.5.1. DSC (Calorimetría Diferencial de Barrido)	79
3.5.2. Estudio de melanoma	80
3.5.3. Estudio de cáncer de pulmón	82
3.6. Obtención de los parámetros del termograma	83
3.6.1. Análisis multiparamétrico	83
3.6.2. Representación gráfica de los parámetros	86
3.7. Análisis estadístico de los parámetros	87
3.7.1. Modelo estadístico	87

4. RESULTADOS	91
4.1. RESULTADOS DE ESTUDIO DE MELANOMA	93
4.1.1. Estudio descriptivo	93
4.1.2. Deconvolución de termogramas de plasma	97
4.1.3. Características de las muestras de control	98
4.1.4. Gráficos tridimensionales: elipsoide de control y distribución de distancia de pacientes con melanoma	100
4.1.5. El d-valor: la distancia de un termograma hasta la región NED	102
4.1.6. Uso de los termogramas mediante DSC para la monitorización de pacientes con melanoma	104
4.1.7. Caso A: no evidencia de enfermedad de acuerdo con la valoración clínica y mediante termogramas de DSC	105
4.1.8. Caso B: pacientes con enfermedad activa de melanoma de acuerdo con valoración clínica y mediante termogramas de DSC	108
4.1.9. Caso C: resultados discordantes entre la evaluación clínica y los termogramas de DSC	111
4.2. RESULTADOS DE CÁNCER DE PULMÓN	113
4.2.1. Descriptivo de la muestra	113
4.2.2. Termogramas de suero de TLB para individuos con HV y LCP	125
4.2.3. Análisis de parámetros derivados de TLB individuales	126
4.2.4. Construyendo un valor predictivo de clasificación para la condición de cáncer de pulmón con GLM	132
4.2.5. Indicador PS en sujetos sanos	140
4.2.6. Indicador PS en pacientes con cáncer de pulmón	141

5. DISCUSIÓN	147
6. CONCLUSIONES	166
7. BIBLIOGRAFÍA	171
8. LISTADO DE ABREVIATURAS	194
9. LISTADO DE TABLAS	201
10. LISTADO DE FIGURAS	205
11. ANEXO 1	211
12. ANEXO 2	214
13. ANEXO 3	218
14. ARTÍCULOS PUBLICADOS	220

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CIFRAS DEL CANCER

El cáncer sigue constituyendo una de las principales causas de morbilidad del mundo, con aproximadamente 18'1 millones de casos nuevos con 9'6 millones de muertes relacionadas al cáncer en el mundo en el año 2018 (1,2). Las estimaciones poblacionales muestran que el número de nuevos casos probablemente aumente en un 70 % en las próximas décadas, alcanzando los 29'5 millones de casos aproximadamente en el año 2040.

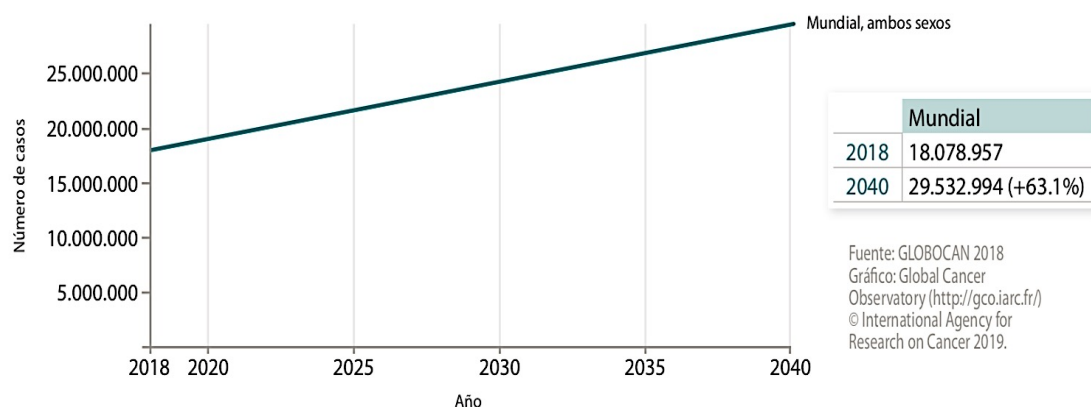


Figura 1.1: Incidencia estimada de tumores en la población mundial para el periodo 2018-2040, ambos sexos. (3)

Hay un 20% de riesgo de padecer cáncer ante de los 75 años, y un 10% de fallecer por esta causa (1).

Se considera al cáncer como la segunda causa de muerte en el mundo (primera en hombres), por detrás de las enfermedades cardiovasculares.

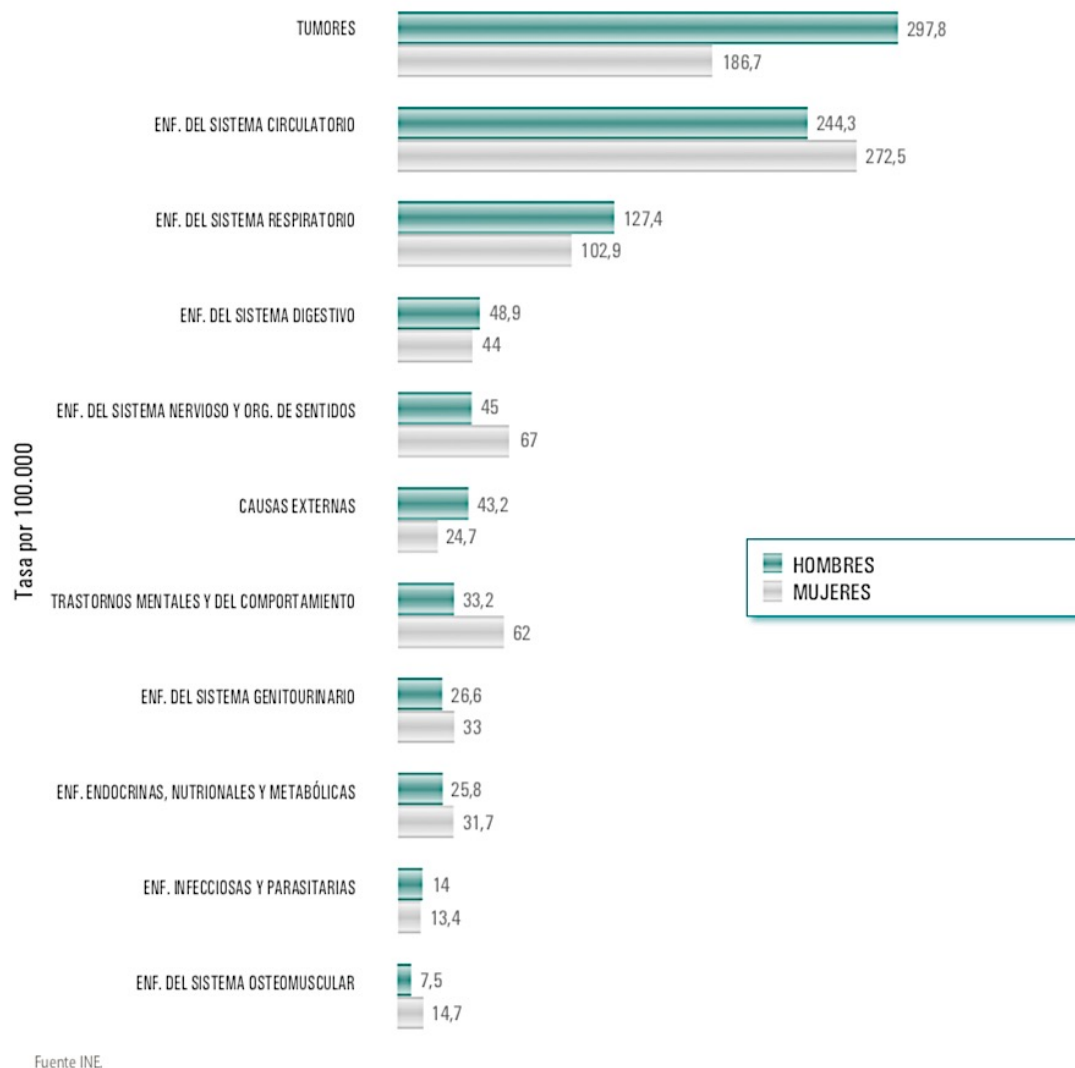


Figura 1.2: Defunciones según causa de muerte por capítulos de la CIE-10 (Clasificación Internacional de Enfermedades) y sexo. Año 2018. (3) .

Los tumores más frecuentemente diagnosticados en el mundo en el año 2018 fueron los de pulmón, mama, colon y recto, próstata y estómago (1). En cuanto a la mortalidad, los tumores causantes del mayor número de fallecimientos a nivel mundial fueron el cáncer de pulmón (18,4% del total de muertes por cáncer), el cáncer colorrectal (9,2%), el cáncer de estómago (8,2%) y el cáncer de hígado (8,2%).

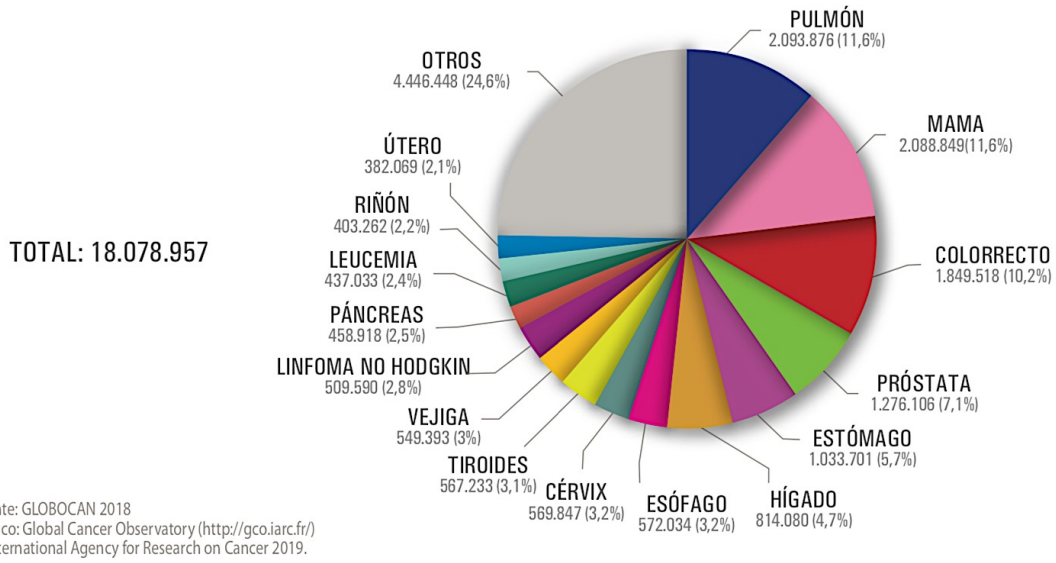


Figura 1.3: Tumores más frecuentemente diagnosticados en el mundo. Estimación para el año 2018, ambos sexos. (3).

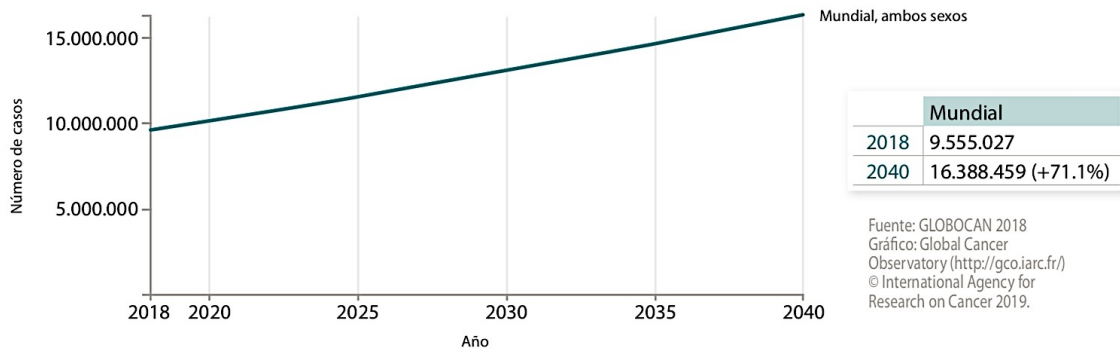


Figura 1.4: Estimación de número de fallecimientos por tumores en la población mundial para el periodo 2018-2040, ambos sexos. (3).

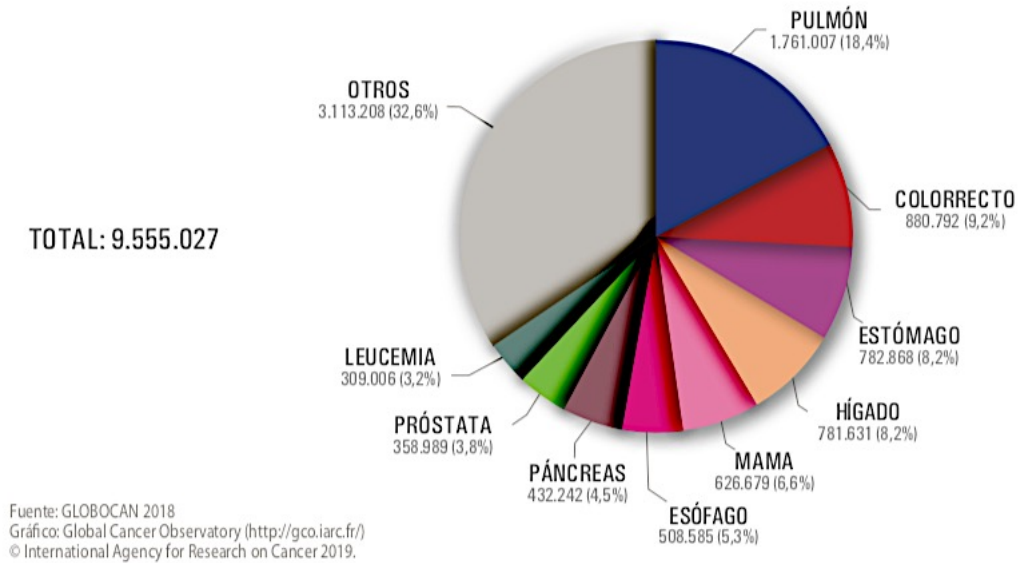


Figura 1.5: Número de fallecimientos por tumores en el mundo en el año 2018, ambos sexos. (3)

A nivel europeo, ocurren al menos un cuarto de los diagnósticos a nivel mundial (4'2 millones) y un quinto de los fallecimientos relacionados (1'9 millones), aunque sea solamente el 9% de la población mundial.

En cuanto a España, también se considera el cáncer como una de las principales causas de morbi-mortalidad. Se estima que en el año 2020 el número de cánceres diagnosticados en España llegará a 277.394 (4), siendo datos muy similares al 2019.

	Hombres	Mujeres	Ambos sexos
< 65 años	53.404	54.642	108.046
>= 65 años	106.794	62.554	169.348
Todas las edades	160.198	117.196	277.394

Fuente: Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN).

Figura 1.6: Estimación del número de nuevos casos de cáncer en España para el año 2020 (excluidos los tumores cutáneos no melanoma).(3)

En España, en el 2020 se estiman que los tumores que más frecuentemente se diagnosticarán son los de colon y recto (44.231 nuevos casos), próstata (35.126), mama (32.953), pulmón (29.638) y vejiga urinaria (22.350).

Si hacemos una apreciación por sexos, en hombres el año 2020 se diagnosticarán más frecuentemente los tumores de próstata, colon y recto, pulmón y vejiga urinaria. Cabe destacar que la incidencia de los tumores relacionados con el tabaco seguirá una tendencia al descenso debido a los cambios en el hábito tabáquico que se ha podido apreciar en las últimas décadas. Siguiendo la distribución por sexos, las mujeres presentarán más frecuentemente en 2020 tumores de mama y colon y recto (1).

En el caso de las mujeres, el hábito tabáquico ha ido en aumento desde los años 70, por lo que el cáncer de pulmón pasó de ser el cuarto tumor más diagnosticado en mujeres en el año 2015, al tercero más incidente en el año 2019. En general, se espera un aumento de la incidencia de los otros tumores relacionados con el tabaco, como los de cavidad oral y faringe o vejiga urinaria.

Si consideramos el número absoluto de cánceres diagnosticados en España, estos han sufrido un continuo aumento en probable relación con el aumento poblacional, el envejecimiento de la población (como un factor de riesgo asociado), la exposición a factores de riesgo (como el tabaco, el alcohol, la contaminación, la obesidad, el sedentarismo entre otros muchos) y la detección precoz (en tumores como el colorrectal, y los de mama, cérvix o próstata, donde se consigue un aumento de casos pero disminución de la mortalidad).

1.2 MEDICINA PERSONALIZADA

Hoy en día, el concepto de medicina de precisión o personalizada, supone un importante avance con gran potencial tanto en el diagnóstico como en el manejo y tratamiento del paciente oncológico (5). El objetivo principal de la medicina de precisión consiste en proveer del tratamiento más adecuado y efectivo para cada paciente, basado en el perfil genético y las características moleculares de cada tumor, para que pueda diseñarse una estrategia de tratamiento individualizada (6).

El concepto de medicina de precisión no es algo nuevo (7), ya se ha ido realizando a lo largo de la historia en diferentes ámbitos. Un ejemplo ampliamente conocido es la tipificación que se realiza previamente a una transfusión. Sin embargo, los últimos avances en el conocimiento de la biología básica del ser humano, como es el descubrimiento de la secuenciación genómica, abren un amplio panel de posibilidades para la aplicación de esta medicina de precisión en otros ámbitos de la medicina, como puede ser la oncología (8).

El campo de la oncología es un claro ejemplo para desarrollar este tipo de medicina personalizada, ya que la incidencia de las enfermedades tumorales es cada día mayor y es una de las principales causas de muerte en nuestra sociedad (5). Por esta razón, el cáncer es objeto de una investigación más intensiva que otras patologías menos relevantes ya que es imprescindible obtener la mayor información posible sobre los mecanismos oncogénicos para poder diseñar nuevos abordajes terapéuticos que nos permitan desarrollar terapias cada vez más efectivas, específicas de cada tipo tumoral y con la menor cantidad posible de efectos secundarios para el paciente.

De esta manera, la investigación arroja información importantísima tanto para el asesoramiento genético de los pacientes, el desarrollo de instrumentos de diagnóstico y el aumento de estrategias terapéuticas.

La medicina de precisión supone un avance en el manejo de pacientes con cáncer, dado que va a aportar al oncólogo importante información, como puede ser la heterogeneidad de los tumores, los diferentes perfiles moleculares, las mutaciones de cada tumor y las variaciones que se puedan producir en el mismo, la resistencia a diferentes fármacos y la valoración de respuesta a diferentes tratamientos y su monitorización (9).

Biomarcador se define como una característica que es objetivamente medible y evaluable como indicador de procesos biológicos y patogénicos, o respuestas farmacológicas a intervenciones terapéuticas.

Uno de los retos más importantes de la medicina de precisión para su futura implementación en oncología es la identificación y detección de los diferentes biomarcadores moleculares que puedan predecir pronóstico, sensibilidad o resistencia a fármacos específicos o su combinación o incluso posibles toxicidades a los mismos (9).

No obstante, además del estudio de la biología del tumor para su tratamiento y monitorización, se están realizando numerosos estudios para poder usar esta información con fines diagnósticos (6). Numerosos datos apoyan la eficacia de los biomarcadores circulantes como técnica diagnóstica mínimamente invasiva (8). Estos estudios utilizan tanto células tumorales, ácidos nucleicos tumorales (cf-RNA y cf-DNA) y proteínas circulantes en sangre como biomarcadores circulantes para la detección de numerosos tumores (5).

Hasta hace poco, todos los biomarcadores clínicamente aprobados para cáncer de pulmón eran proteínas o péptidos y carecían de suficientes datos de especificidad, sensibilidad y reproductibilidad, incluso para diagnóstico en fases avanzadas. En los últimos años, han sido aprobadas diferentes técnicas de secuenciación genómica para la detección de diferentes mutaciones imprescindibles para su tratamiento. Todas estas técnicas están basadas en la técnica NGS (Next Generation Sequency), siendo el producto más frecuente en esta patología el

“Foundation One CDx™”, aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) en Octubre de 2017.

Esta información específica de los diferentes tumores, los biomarcadores, junto a factores epidemiológicos y firmas radiogenómicas se postulan como prometedores modelos de predicción de riesgo para el diagnóstico temprano de diferentes patologías, como es el caso del cáncer de pulmón (donde mayor avance a nivel de estudios podemos encontrar, junto con melanoma) (10).

Estos avances que se han ido produciendo en los últimos años nos permiten una cantidad inmensa de información relevante para el diagnóstico y tratamiento individualizado de los pacientes con cáncer, y donde la biopsia líquida, sin duda, juega un papel principal permitiendo obtener de una manera más sencilla el material tisular necesario.

1. 3 MELANOMA

El melanoma maligno cutáneo presenta diferentes incidencias en Europa, dependiendo de si se trata de un país mediterráneo (con cifras de 3-5 casos por cada 100.000 habitantes) o países nórdicos (con datos de 12-35/100.000 habitantes) donde se puede apreciar una mayor tasa de diagnósticos. Los países que mayor incidencia presentan, 50/100.000 casos, son Australia y Nueva Zelanda, dada su situación geográfica y su exposición al sol (11).

La incidencia de melanoma maligno ha ido en un lento incremento durante los últimos 40 años, con una tendencia a la estabilización de la mortalidad, aunque en los últimos años se ha visto un aumento importante la supervivencia con los últimos tratamientos en desarrollo (12). EL pico de edad al diagnóstico son los 65 años (12).

Se ha demostrado la relación directa que existe entre melanoma y la exposición a la radiación ultravioleta (UV) como principal factor de riesgo de desarrollo de la enfermedad, siendo esta identificada como el mayor culpable de la aparición del tumor (13). Se asocia esta exposición a los rayos UV con un daño en el ADN (Ácido Dexosirribonucleico) y una tasa considerablemente alta de mutaciones por megabase, lo que provocaría el desarrollo de la carcinogénesis en las células melanóticas (13).

Esta asociación entre radiación UV y el desarrollo de melanoma maligno conduce a aunar esfuerzos en la disminución a la exposición solar como factor principal para la prevención (14). En países como Australia, con datos elevados de incidencia, existen ensayos clínicos de prevención con medidas de protección solar (14).

1.3.1 Diagnóstico de melanoma

El principal método diagnóstico del melanoma está basado en la visión directa de la lesión, que se analiza con 2 reglas básicas: el “patito feo” y la regla del ABCDE (Asimetría, Bordes, Color, Diámetro y Evolución) (15).

Una vez identificada una lesión con estos parámetros, el especialista utiliza diferentes técnicas diagnósticas, principalmente ayudado de un dermatoscopio, que permite una mejor visualización de la lesión. Este método, sin embargo, es dependiente del observador, por lo que el diagnóstico definitivo se realiza mediante una biopsia tipo punch de la lesión, o bien su escisión completa (16).

Otros métodos más objetivos están siendo desarrollados, como son la videodermatoscopia, pudiendo mejorar el diagnóstico en los pacientes con múltiples nevos cutáneos, principalmente mejorando la detección temprana de las lesiones malignas mediante la imagen de cuerpo completo con alta resolución (17).

Dado el avance de la tecnología, está en fase de estudio el entrenamiento de una máquina mediante diferentes algoritmos, de forma que pueda mejorar el ratio diagnóstico por un dermatólogo especializado mediante un dermatoscopio (18). Esto se encuentra en fases tempranas, pero podría mejorar el diagnóstico temprano de esta enfermedad.

Sin duda alguna, el mayor reto en esta enfermedad es encontrar la técnica que nos ayude a realizar un diagnóstico más precoz y así mejorar el pronóstico de la enfermedad.

1.3.2 Seguimiento del melanoma

Durante el seguimiento de los pacientes que han sido tratados de un melanoma, se requiere de una monitorización clínica de cara a poder detectar y diagnosticar tempranamente una posible recaída, o incluso segundos melanomas (15). Se estima que el 8% de los pacientes con melanoma desarrollarán un melanoma secundario en los próximos 5 años (19).

Sin embargo, no existe consenso del método más eficaz para realizar esta estrategia de seguimiento, que pueda ayudar a mejorar la supervivencia (19,20). El impacto en supervivencia obtenido en realización de pruebas de imagen seriadas durante el seguimiento no ha sido demostrado (21). El estudio de marcadores tumorales, como el S100, tiene una mayor especificidad para la detección de una posible recidiva, siendo en estos momentos el test sanguíneo más específico y posiblemente el único recomendado (en caso de tener que recomendar uno, puesto que la evidencia no es firme) (22), siendo por tanto una laguna importante en los pacientes con esta patología.

1.4 CÁNCER DE PULMÓN

El cáncer de pulmón se mantiene como la enfermedad tumoral más frecuente después de los tumores de piel no melanoma, pero superando en cifras de mortalidad (23). Según el informe GLOBOCAN 2018, el cáncer de pulmón sigue siendo el tumor más diagnosticado con más de 2 millones de casos en el mundo (11'6% de todos los casos) (24). Igualmente supone el tumor más mortal con en torno a 1.7 millones de muertes al año en el mundo (18'4% del total), siendo así el tumor con mayor mortalidad, por delante de colon, mama y próstata juntos (23,25).

En cuanto a la distribución por sexos, el cáncer de pulmón supone el tumor más frecuente en hombres, y el segundo en mujeres (en crecimiento debido a los cambios en el hábito tabáquico de las últimas décadas), pero se mantiene como el que más mortalidad provoca en ambos sexos en los países más desarrollados, viéndose aumentadas las tasas de mortalidad en mujeres en Europa (23).

En cuanto a los diferentes subtipos del cáncer de pulmón, la mayoría son cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) en torno al 80-90%, mientras que el carcinoma microcítico de pulmón (CPM) se encuentra en descenso en las últimas décadas (más directamente relacionado al tabaco) (25). Dentro de los CPNM, la distribución por subtipos es muy similar entre adenocarcinoma y carcinoma escamoso, con leve crecimiento en los últimos años del adenocarcinoma (23).

Atendiendo a los factores de riesgo, el tabaco sigue siendo la causa principal de desarrollo de cáncer de pulmón. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que un 71% de las muertes por cáncer de pulmón están relacionadas con el tabaco (24). Se ha visto que en países donde se han realizado campañas de prevención antitabaco, así como de inicio de consumo, se han visto reducidas las tasas de cáncer de pulmón, principalmente en hombres, con una estabilización en las mujeres (26). Otros múltiples factores de riesgo han sido descritos en la patogénesis del cáncer de pulmón, como son la exposición a asbesto, arsénico, radón y otros hidrocarburos aromáticos (27).

1.4.1 Diagnóstico

El aumento en la complejidad de los diferentes tratamientos que se han desarrollado en los últimos años, así como la importancia de un diagnóstico temprano, produce un aumento de la importancia de los comités multidisciplinares desde las fases tempranas del diagnóstico, provocando un mejor estadiaje, aplicación de guías clínicas y, por tanto, un aumento en supervivencia (28,29).

Debido a los múltiples avances en los diferentes tratamientos de esta patología, la necesidad de obtener una adecuada y precisa información biológica del tumor supone un reto importante en la obtención de muestras histológicas (30).

Actualmente, la técnica utilizada como *gold standard* para el diagnóstico histológico es la broncoscopia, principalmente para las lesiones más centrales, con una mínima morbilidad. Con la broncoscopia se pueden realizar diferentes formas de obtención celular, como son los lavados bronquiales, el cepillado y la biopsia bronquial y transbronquial, obteniendo tasas de diagnóstico en torno al 65-85% (31,32). Por otro lado, la ecobroncoscopia (EBUS) obtiene tasas del 75-85% de diagnóstico, y permite la valoración de posible afectación de adenopatías regionales mediante fibra óptica, pudiendo así en ocasiones, evitar la mediastinoscopia (33,34). El material obtenido mediante esta técnica permite el análisis molecular necesario para una decisión terapéutica posterior, no solo diagnóstica histológica.

En caso de lesiones periféricas, el método más adecuado de diagnóstico es mediante una biopsia percutánea transtorácica guiada por imagen (principalmente por Tomografía Axial Computerizada (TAC)). En estos casos es preferible una biopsia de aguja gruesa a la de aguja fina, debido a la necesidad de obtención de material suficiente para futuras determinaciones (32,35). No obstante, esta técnica supone un moderado riesgo de complicaciones, principalmente el neumotórax (observado en el 17-50% de los pacientes) (36,37).

1.4.2 Evaluación de respuesta en Cáncer de Pulmón

La evaluación de respuesta en este tipo de tumor está recomendada después de 2-3 ciclos de quimioterapia o inmunoterapia, usando el mismo método radiológico que se usó al diagnóstico. El uso del PET-TAC (Tomografía por Emisión de Positrones) no está recomendado de rutina. Ese mismo esquema de seguimiento se puede seguir en los sucesivos ciclos posteriores (38). Los criterios de respuesta al tratamiento deben ser los RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumours) (39).

En cuanto a la opción de realizar biopsia líquida o rebiopsia a la progresión está indicado en aquellos pacientes en los que se quiera detectar alguna alteración genómica *driver* y no se disponga de muestra tumoral suficiente o algún tipo de resistencia al tratamiento que se ha estado empleando (40). Esto ocurre principalmente en los pacientes con mutación en EGFR (Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico) que se encuentran recibiendo un tratamiento dirigido y a la progresión se desea valorar la mutación de resistencia T790M u otras alteraciones genómicas. En este caso en concreto, está indicado la realización de una biopsia líquida para la obtención de células tumorales circulantes (CTCs) y así realizar la técnica NGS, donde nos ofrece el panel genómico mutacional del tumor en concreto. Esta técnica es la más comúnmente usada con una mayor sensibilidad (40,41).

1.4.3 Tratamiento

Pese a los numerosos avances que se realizan en los tratamientos de esta enfermedad, las tasas de supervivencia a los 5 años en estadios avanzados son tan solo del 4% (25), sin embargo, si la enfermedad se diagnostica en un estadio operable, la tasa de supervivencia a los 5 años puede subir hasta el 50% (42). Por todos estos datos, los tratamientos en el cáncer de pulmón y sus avances suponen un problema de salud pública (43).

En los últimos años se ha visto como el panorama en los tratamientos en el cáncer de pulmón se ha transformado radicalmente tras el uso de las terapias dirigidas y, más recientemente, los inhibidores de los controles del sistema inmune (conocido en la sociedad científica como inmunoterapia) (44,45). La importancia de un correcto diagnóstico molecular en estos pacientes cobra aún más importancia a la hora de seleccionar el tratamiento más adecuado y así ganar en supervivencia para los pacientes (44,45).

Según el último Consenso de la SEOM (Sociedad Española de Oncología Médica) y la SEAP (Sociedad Española de Anatomía Patológica), los biomarcadores que resultan esenciales a determinar en el diagnóstico de un cáncer de pulmón (esencialmente en histologías no microcítico) para seleccionar un tratamiento más adecuado serían mutación de EGFR, translocación de ALK, reordenamiento de ROS1, mutación de BRAF y sobreexpresión de PD-L1 (46).

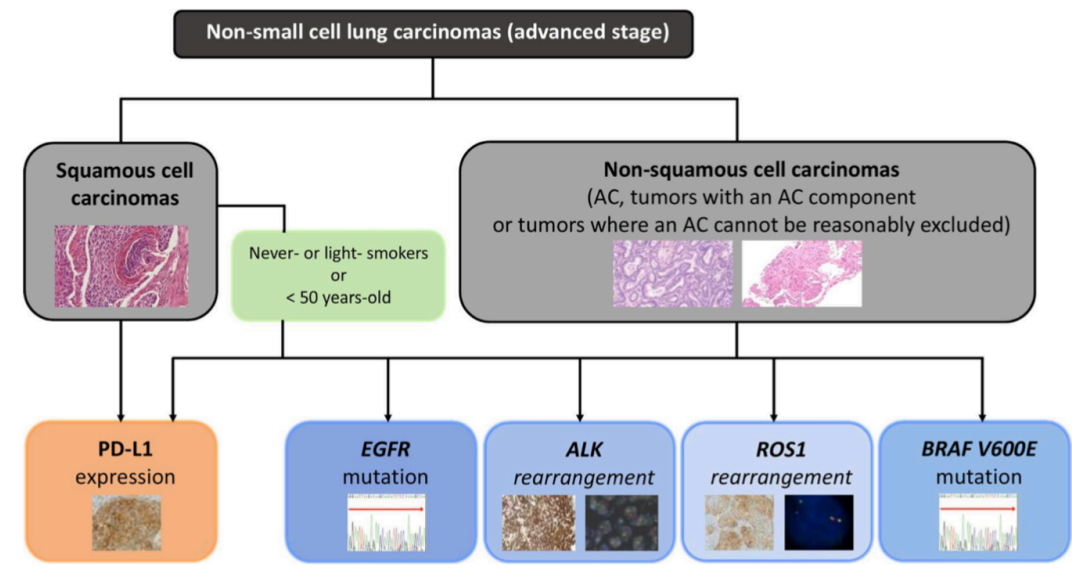


Figura 1.7: Algoritmo de diagnóstico para la prueba de biomarcadores en pacientes con CPNM avanzado. Adenocarcinoma (AC), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), ligando 1 de muerte programada (PD-L1). Figura extraída de Garrido P. Et al. Clin Transl Oncol. 2020 Jul;22(7):989-1003 (46).

1.5 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

La DSC apareció como una herramienta novedosa en biomedicina en 2007, cuando Chaires y su grupo pusieron de manifiesto su potencial para el diagnóstico de enfermedades en el plasma sanguíneo (47). Demostraron que individuos sanos mostraban un perfil calorimétrico DSC (termograma) de plasma sanguíneo típico (figura 1.8) mientras que los sujetos enfermos mostraban un patrón alterado (47).

A:

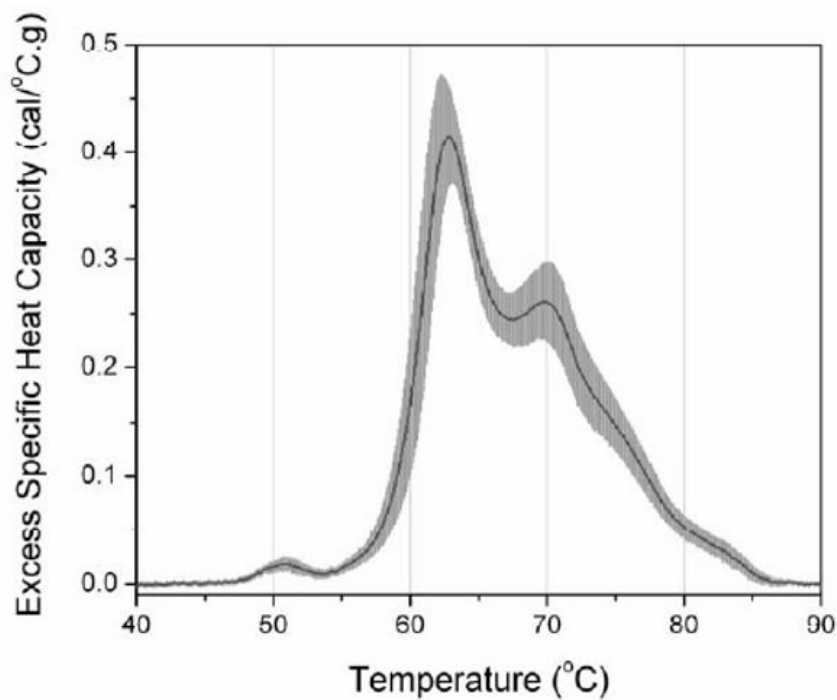


Figura 1.8: Termograma promedio de plasma calculado a partir de muestras obtenidas de 15 individuos normales. El termograma promedio es la línea continua negra, y la desviación estándar a cada temperatura está indicada por el sombreado gris. Figura extraída de Garbett et al. *Semin Nephrol.* 2007 27(6): 621–626. (47)

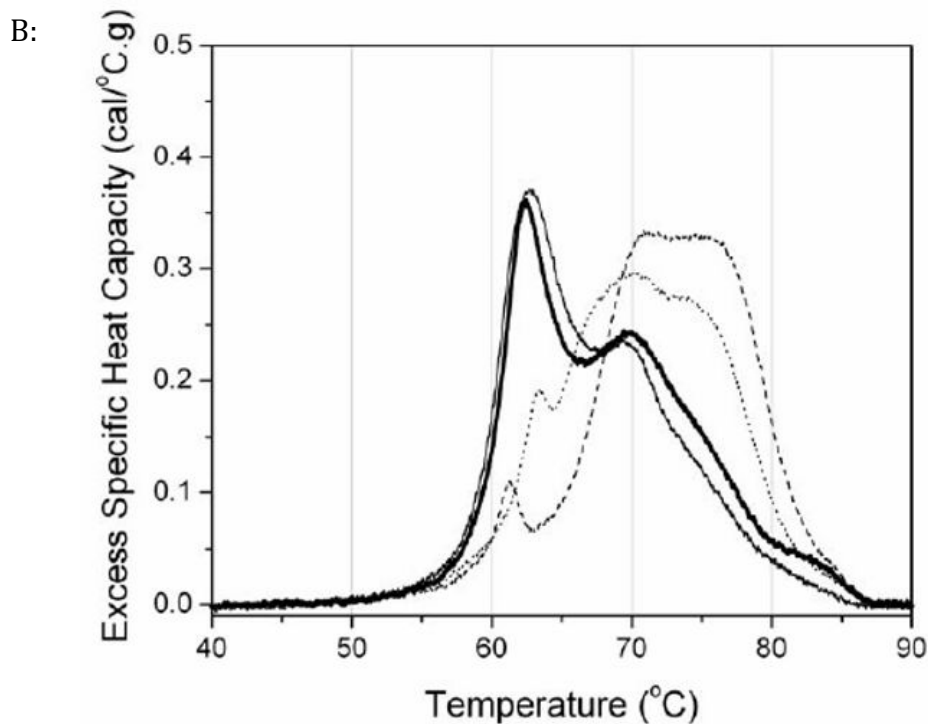


Figura 1.9: Termogramas determinados a partir de muestras de suero obtenidas de pacientes diabéticos con enfermedad coronaria mínima (CAD-) o grave (CAD +). Las líneas negras y negras continuas corresponden a pacientes con CAD - y las líneas discontinuas y punteadas a pacientes con CAD +. Figura extraída de Garbett et al. Semin Nephrol. 2007 27(6): 621–626. (47)

DSC es una técnica altamente sensible que mide con precisión las transiciones conformacionales de biomoléculas inducidas térmicamente y que permite la determinación de los parámetros termodinámicos de desnaturalización de la proteína (plegado / desplegado) (48).

De este modo, mediante DSC una proteína en disolución exhibe un perfil de desnaturalización térmica (termograma) (figura 1.10) relativamente sencillo que refleja su estabilidad conformacional en disolución, en términos de temperatura de desplegamiento (T_m) y entalpía de desplegamiento (ΔH_m). Además, este perfil de desnaturalización se ve alterado si está presente alguna molécula que interacciona con la proteína e induce un efecto estabilizante (aumentan T_m y ΔH_m) o desestabilizante (disminuyen T_m y ΔH_m) (49).

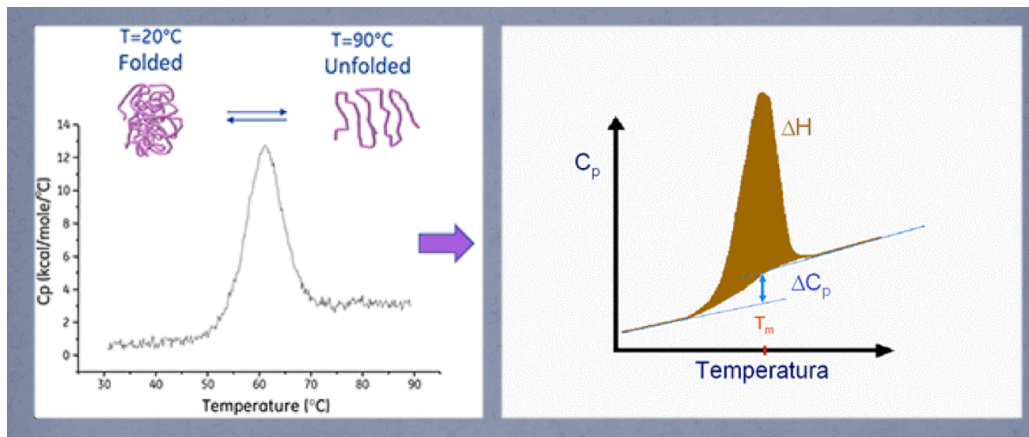


Figura: 1.10 En la gráfica de la izquierda se muestra el termograma típico de desnaturalización de una proteína y en el de derecha se muestra gráficamente los diferentes parámetros que usamos para medir las características del termograma formado. Figura extraída de Garbett et al. Biophysical Journal 94, 2008 1377–1383. (50)

En la desnaturalización térmica de una mezcla de diferentes proteínas (ej. plasma sanguíneo) se obtiene un termograma más complejo que consiste básicamente en la superposición de los termogramas individuales de cada proteína según la concentración relativa de cada proteína en dicha mezcla (Figura 1.10) (50). Las modificaciones del termograma del plasma en un sujeto enfermo respecto de un individuo sano se consideran relacionadas con alteraciones metabólicas inducidas por la enfermedad: 1) modificaciones en el contenido proteico del plasma; y/o 2) modificaciones en la $T_m/\Delta H_m$ de proteínas del plasma al interactuar específicamente con moléculas asociadas con la enfermedad (interactómica) (47,50–52). Por tanto, las diferencias entre el termograma de un individuo sano y un sujeto enfermo reflejan cambios fisiológicos asociados específicamente con la enfermedad: proteínas presentes y su concentración, así como metabolitos de bajo peso molecular relacionados con una fisiología alterada.

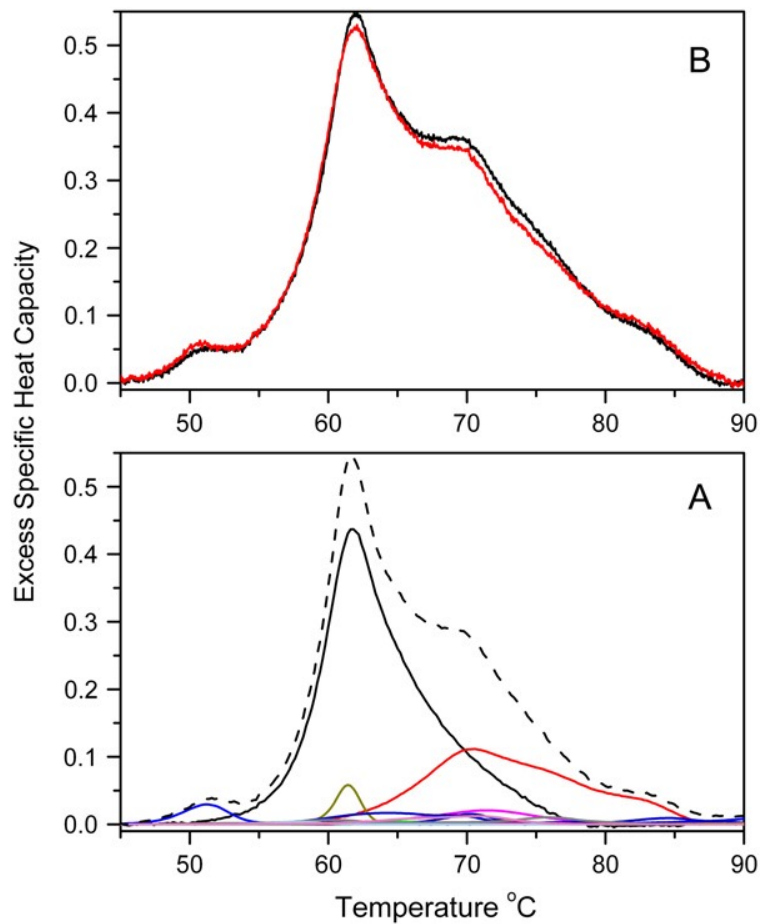


Figura 1.11: A. Termograma calculado (línea discontinua) obtenido de la suma de las contribuciones ponderadas de las 16 proteínas plasmáticas más abundantes. (B) Termogramas obtenidos de mezclas de proteínas plasmáticas puras, mezcladas en concentraciones que imitan sus concentraciones promedio conocidas en plasma normal. La curva roja es una mezcla de HSA, IgG, fibrinógeno y transferrina. La curva negra es una mezcla de las 16 proteínas plasmáticas más abundantes. Figura extraída de Garbett et al. *Biophysical Journal* 94, 2008 1377–1383 (50)

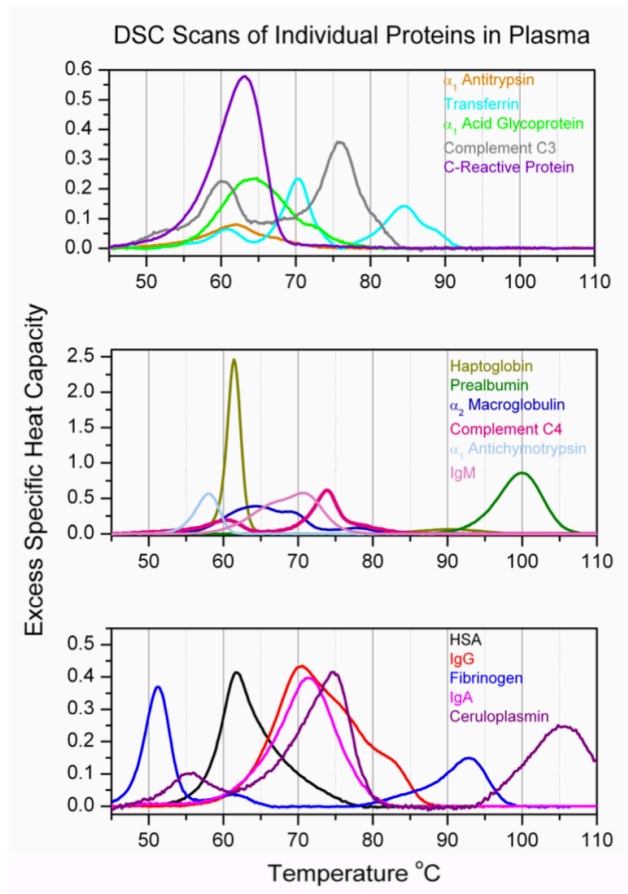


Figura 1.12: Termogramas para proteínas plasmáticas puras individuales. Figura extraída de Garbett et al. *Biophysical Journal* 94, 2008 1377–1383 (50)

DSC permite realizar medidas termodinámicas directamente de las interacciones intra e intermoleculares que establecen los sistemas biológicos (53). Esta capacidad de medición hace que sea posible realizarse en muestras biológicas complejas como son sangre y otros fluidos biológicos (54).

Para facilitar la interpretación de todos estos cambios analizados existen numerosos estudios realizados al respecto (55–64) reportando los cálculos métricos que facilitan su lectura e interpretación.

Un estudio de gran importancia en el desarrollo de los métodos realizados para aportar soporte estadístico a la determinación de muestras ha sido el desarrollado por Fish DJ et al donde determinan que la distancia entre diferentes perfiles de DSC era definida como la media geométrica de la correlación entre los perfiles y una distancia euclídea (65). Estas medidas fueron desarrolladas en un estudio de

pacientes con lupus vs controles sanos, donde se alcanzaban hasta un 88% de clasificaciones correctas para pacientes con la enfermedad (65). Este mismo método fue recogido satisfactoriamente en otro estudio con pacientes con carcinoma colorrectal (63). Otros diferentes métodos han sido igualmente validados por otros grupos en pacientes con cáncer de cérvix uterino o de ovario (63,66).

En 2016, el grupo de los Drs. Adrián Velázquez y Olga Abian, contribuyó de forma relevante al desarrollo de un método de análisis de las curvas de los termogramas (67). En este método se procedía a la deconvolución del perfil de DSC en diferentes componentes curvas, cada uno de ellos definido por su altura, centro y anchura, usando un análisis multiparamétrico para la clasificación de pacientes sanos y pacientes con adenocarcinoma gástrico (67) (figura 1.13).

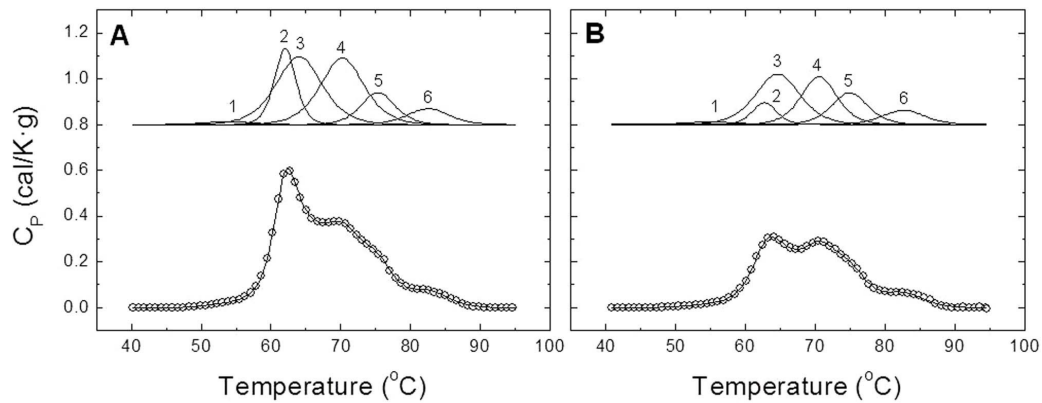


Figura 1.13 gast: Termogramas de suero experimentales de un sujeto sano (A) y un paciente con adenocarcinoma gástrico en estadio I (B). (Gráfico inferior) Termogramas globales que muestran los puntos experimentales (círculos abiertos; uno de cada tres puntos experimentales se muestra para mayor claridad) y la curva de ajuste (línea continua); (Gráfico superior) Deconvolución del termograma global que muestra las transiciones numeradas individuales. Figura extraída de Vega et al. Scientific Reports 2016. (67)

También se presentaron los 18 parámetros obtenidos en forma de polígonos que permitía mediante una representación fácil e intuitiva distinguir visualmente entre los sanos y los enfermos, y además, entre diferentes estadios de enfermedad (51).

En cáncer de pulmón, hay un precedente de estudio de DSC aplicado a diagnóstico del grupo de la Dra. Karolina Kedra (68) en el que estudian 11 pacientes con CPNM Estadio IV después de haber realizado tratamiento de quimioterapia. Como grupo control se tomaron 5 pacientes sanos. Con este pequeño grupo de pacientes apreciaron como las curvas de los pacientes que habían respondido a la quimioterapia se iban aproximando a la de los controles sanos. Estos datos son prometedores para futuras investigaciones con esta técnica en esta patología concreta (68).

Estos estudios han demostrado que la técnica DSC acompañada de diferentes algoritmos de clasificación aporta una aproximación diagnóstica potente en el análisis de muestras biológicas, identificado una relación específica entre termograma-enfermedad (48). Los diferentes termogramas provenientes de estos estudios han resultado diferir del patrón de termograma normal, e incluso se aprecia como difieren entre diferentes patologías, siendo estos resultados prometedores en una futura utilidad clínica (47).

El interés en la aplicación de DSC en plasma de la sangre en el diagnóstico del cáncer es elevado, ya que es una técnica no invasiva para los pacientes y proporciona un rápido seguimiento *in situ* de los cambios fisiológicos de la sangre (plasma / suero) que están directamente relacionados con cambios fisiológicos inducidos por un determinado tumor.

Sin embargo, la validación de DSC como una herramienta útil para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad requiere de mayor esfuerzo en investigaciones futuras, así como de una ampliación de los conocimientos a pequeña escala de lo que ocurre en esos fluidos estudiados para poder proporcionar mayores respuestas.

1.6 CRIBADO EN CÁNCER DE PULMON

Las estrategias de prevención primaria como campañas antitabaco y programas de *screening* o cribado poblacional representan las medidas más importantes para reducir la prevalencia y la mortalidad del cáncer de pulmón. En un inicio se realizaron estudios de *screening* con radiografías de tórax, pero no demostraron ningún beneficio en la reducción de la mortalidad por cáncer de pulmón (69), por lo que se iniciaron los estudios con tomografía computerizada de baja dosis (TCBD), siendo estas una herramienta muy útil para la detección de tumores en una fase temprana de la enfermedad (70).

En 2011 aparecieron los primeros resultados prometedores con una reducción de hasta el 20% en mortalidad específica por cáncer de pulmón tras el estudio NSLT (Unites States National Lung Screening Trial), debido a la alta sensibilidad del TCBD frente a las radiografías de tórax (70–72).

Este estudio aleatorizado contaba con la participación de 53.454 pacientes que podían recibir TCBD o radiografía de tórax como método de *screening*. Los datos de este estudio se publicaron un año antes de lo previsto puesto que tenía como criterio parar cuando se alcanzase un 20% de mortalidad específica y tras un análisis interno se observó que se había alcanzado prematuramente dicha cifra se obtuvo. Este estudio también mostró una reducción en la mortalidad por cualquier causa del 6'7% (1877 muertes en el brazo de TCBD frente a 2000 en el otro brazo) (73,74).

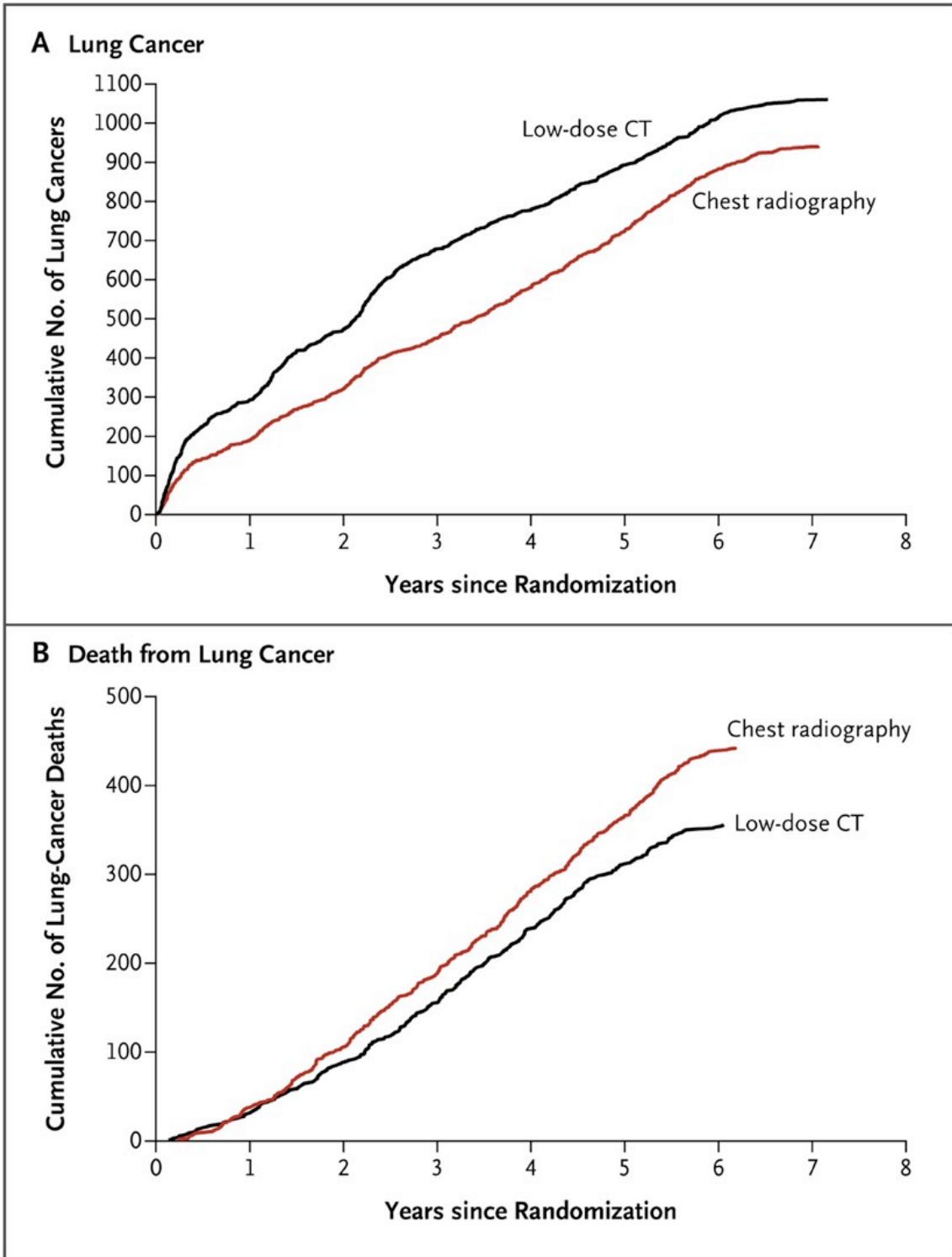
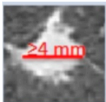



Figura 1.14: Figura con datos del estudio NELSON apreciando las diferencias al usar el LDTC en el cribado de cáncer de pulmón. Figura extraída de N Engl J Med 2011; 365:395-409 (ref N Engl J Med 2011; 365:395-409).

Otro estudio más reciente, presentado en septiembre de 2018 en el 19º Congreso Mundial de Cáncer de Pulmón en Toronto es el estudio NELSON. Este nuevo estudio muestra una reducción de la mortalidad en un 25% en los pacientes sometidos a TCBD frente al brazo control (75).

	NLST	NELSON
Country	USA	BE/NL
Enrollment	2002–2004	2003–NR
Number of Centers	33	4
Number of screens		3
Screening planned at years	1, 2 and 3	1, 2 and 4
Comparison	LDCT vs. Xray	LDCT vs. usual care
Population		
Age	55–74	50–69 (50–75)
Smoking (pack-years)	≥30	>15 *
Sex	both (male 59%)	men ° (male 84%)
Years since quit	≤15	≤10
Patients Screened, <i>n</i>	26,722 vs. 26,732	7907 vs. 7915
Planned follow-up, y	>7	10
Nodule Size warranting Follow-up	2011 	2009  + VDT
		2014 ≥100 mm ³ (≥5 mm) + VDT
LC diagnosed at screening, %	1.02	0.9
5 mm Reduction of LC mortality	20%	26% ^a

^{*}, ≥15 cigarettes/day for 25 years or ≥10 cigarettes/day for 30 years; [°], both in Belgium; VDT, volume doubling time; ^a, in men.

Figura 1.15: tabla comparativa de los estudios NLST y NELSON. Tabla extraída de Benzaquen J. Et al. *Cancers* 2019, 11, 212. (76)

Basándose en los datos del estudio NLST la UPSTF (United States Preventive Services Task Force) presentó una serie de recomendaciones para la realización de *screening* de cáncer de pulmón en pacientes en edades comprendidas entre 55 y 77 años con un índice paquetes-año superior a 30 (77). Con estos resultados, la TCBD se convierte en la prueba de referencia del *screening* de cáncer de pulmón en Estados Unidos (73).

Sin embargo, la implantación de estos métodos de *screening* mediante TCBD no está exento de controversias dado sus altas tasas de falsos positivos, las dudas sobre los intervalos óptimos entre las pruebas y la coste-efectividad del protocolo en población de alto riesgo (se observan también dificultades a la hora de definir la población de alto riesgo) (73,78). Aparte del criterio habitual de selección de los pacientes basado en la edad y la historia previa de tabaquismo, se han estudiado otros modelos donde combinan otros factores de riesgo adicionales como son el género, raza, nivel educativo, índice de masa muscular, enfermedades previas o actuales pulmonares, exposición al polvo o asbestos y una posible historia familiar de cáncer de pulmón (79,80).

A nivel europeo, múltiples de estudios han sido realizados por diferentes países. Entre estos estudios se incluyen DANTE, DLCST, ITALUNG, LUSI, MILD, NELSON y UKLS (71,81–87). Los resultados de estos estudios en conjunto pueden ayudar a estudiar una posible implementación del *screening* en Europa, aunque sin duda el que mayor cantidad de datos de mortalidad y coste-efectividad proporciona es el estudio NELSON.

	Recruitment period	Recruitment criteria	Screening methods
Randomised controlled trials			
NLST ¹	2002–04	Age 55–75 years, ≥30 PY smoker, quit smoking <15 years earlier	Annual low-dose CT vs chest x-ray for 3 years
MILD ²	2005–11	Age >49 years, ≥20 PY smoker, quit smoking <10 years earlier, no cancers within past 5 years	Three groups: no screen, annual screen, and biennial low-dose CT for 5 years
ITALUNG ⁴	2004–06	Age 55–69 years, ≥20 PY smoker	Annual low-dose CT for 4 years vs no screen
DANTE ⁵	2001–06	Age 60–75 years, ≥20 PY smoker, quit smoking <10 years earlier, male	Annual low-dose CT for 4 years vs no screen
DLCST ⁶	2004–06	Age 50–70 years, ≥20 PY smoker, quit smoking <10 years earlier, FEV ₁ ratio >30%, able to climb two flights of stairs without pausing	Annual low-dose CT vs usual care for 5 years
NELSON ⁷	2003–06	Age 50–75 years, smoker or quit smoking ≤10 years earlier, >15 cigarettes per day for >25 years or >ten cigarettes per day for >30 years	Low-dose CT in year 1, year 2, year 4, and year 6-5 vs no screen
LUSI ⁷	2007–11	Age 50–69 years, heavy smoking history	Annual low-dose CT and smoking cessation for 5 years vs smoking cessation alone
UKLS ⁸	2011–14	Age 50–75 years, ≥5% of 5-year lung cancer risk as calculated by LLP _{v2} scores	Wald single low-dose CT screen design vs no screen
Other studies			
I-ELCAP ¹⁴	1993–2006	Age >60 years, ≥10 PY smoker	Annual low-dose CT and chest x-ray for 5 years
Mayo LDCT trial ¹⁸	1999	Age >50 years, 20 PY smoker, quit smoking <10 years earlier	Annual low-dose CT for 5 years
PANCAN ¹⁹	2008–11	Age 50–75 years, ≥2% of 3-year lung cancer risk as calculated by PLCO score	Low-dose CT in year 1, year 2, and year 4
COSMOS ²⁰	2000–01	Age >50 years, ≥20 PY smoker	Annual low-dose CT for 10 years
PY=pack-year. FEV ₁ =forced respiration volume. LLP _{v2} =Liverpool Lung Project risk model, version 2. PLCO=Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian trial risk model.			
Table: European pilot trials for lung cancer low-dose CT screening			

Figura 1.16: resumen de resultados de los diferentes estudios europeos. Tabla extraída de Oudkerk M et al. Lancet Oncol 2017;18: e754-66. (73)

En el año 2017, la Unión Europea tomó una postura en cuanto a las evidencias que mostraban que podría ser interesante realizar una implementación de un cribado poblacional de cáncer de pulmón, mediante la publicación en la revista *The Lancet Oncology* (73). En dicho artículo se describe tanto la situación del *screening* de cáncer de pulmón en Europa, como cuáles serían las necesidades previas que se requieren para poder promover su implementación.

Algo importante para la Unión Europea es que se le de una mayor importancia a la selección de la población diana objeto del cribado poblacional. La selección únicamente en edad (como ocurre en cáncer de mama y de colon) es insuficiente para el pulmón debido a los múltiples factores de riesgo. Teniendo todo esto en cuenta se consideran los posibles factores de riesgo asociados: el hábito tabáquico, la historia de enfermedades respiratorias (EPOC, enfisema, bronquitis, neumonía previa y tuberculosis), padecer una neoplasia previa, historia familiar de cáncer de pulmón (familiar de primer grado diagnosticado a los 60 años o menos) y la exposición a asbesto (88,89).

Teniendo en cuenta estas dificultades en la selección de pacientes susceptibles de beneficiarse de un posible *screening*, se han publicado múltiples modelos multivariantes de predicción de riesgo. Cabe destacar entre ellos el LLP (Liverpool Lung Project) y el PLCO (Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial), los cuales han sido utilizados mayoritariamente en diferentes estudios para seleccionar los pacientes (90,91).

Los daños asociados con un *screening* en cáncer de pulmón como pueden ser el sobrediagnóstico, cirugías innecesarias para lesiones benignas, daño psicológico y la exposición a la radiación deben minimizarse lo máximo posible de cara a maximizar los beneficios clínicos de esta intervención (73). Estos posibles daños podrán ser minimizados tomando una serie de precauciones, como una correcta selección de la población a estudio, una disminución de la dosis de radiación al mínimo y un manejo óptimo de los hallazgos radiológicos (nódulos, sospechas de

cáncer o hallazgos incidentales) por parte de personal cualificado en centros especializados en esta técnica (73).

Se están estudiando múltiples biomarcadores procedentes de muestras de sangre (con pruebas que conllevan con menos riesgos para la población) que pudieran ser útiles para la detección de estadios tempranos de la enfermedad, y que ayuden a mejorar la selección de pacientes candidatos a un *screening* o a clasificar los nódulos pulmonares indeterminados (76). Estos biomarcadores incluyen células circulantes tumorales (CTCs), ADN circulante (ctDNA), ARN circulante (ctRNA), exosomas y plaquetas educadas por tumor (TEP) (92,93).

Un estudio francés publicó la detección de CTCs en pacientes con cáncer de pulmón que presentaban patología previa tipo Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), y por tanto alto riesgo que de otra manera no hubiese sido detectable clínicamente, adelantando incluso hasta 4 años la detección del cáncer por TCBD. Hay que resaltar que no se encontraron CTCs en controles sanos tanto fumadores como no fumadores (94,95). Estos datos preliminares demostraron por primera vez la posibilidad de que la determinación de CTCs pueden detectar de una manera muy temprana un posible cáncer de pulmón. Estos resultados prometedores dieron lugar a un ensayo clínico prospectivo (estudio AIR, que estudia el papel de las CTCs en el *screening* de cáncer de pulmón en población de alto riesgo, definida como pacientes con EPOC, grandes fumadores y mayores de 55 años, pendiente aún de resultados) (96,97).

Se conoce que el ctRNA son las moléculas más abundantes en sangre, mostrando una estabilidad duradera en muestras de plasma y suero, provocando que sea un biomarcador muy útil en la detección temprana de diferentes tumores (98,99). Todos estos hallazgos preliminares hacen que la combinación de todas estas estrategias mínimamente invasivas, a través de imagen y biopsia líquida, basadas en la radiómica y/o biomarcadores circulantes, permitan mejorar el desarrollo de futuros protocolos de *screening* mediante firmas radiogenómicas para diferentes tumores, entre ellos el de cáncer de pulmón (100–102).

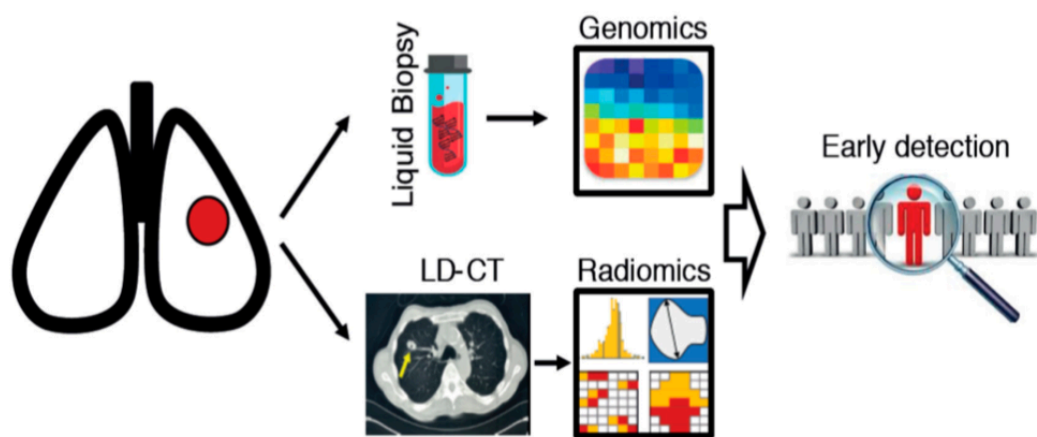


Figura 1.17: representación esquemática de un análisis integrado de biomarcadores circulantes (biopsia líquida) y radiómica, para mejorar el diagnóstico temprano en cáncer de pulmón según riesgo individual. Gráfica extraída de Dama E. Et al. J. Clin Med 2019, 8, 108. (69).

1.7 BIOPSIA LIQUIDA

1.7.1 Concepto

El *US National Cancer Institute (NCI)* define la biopsia líquida como “una prueba que se hace sobre una muestra de sangre para buscar células cancerígenas de un tumor que están circulando en la sangre, o piezas del ADN de un tumor que se encuentran en la sangre” (103). En 2018, el término biopsia líquida fue introducido por primera vez como término MeSH (Medical Subject Heading) por el *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, el cual coordina las bases de datos en biotecnología y biomedicina (104).

Según la Biblioteca Nacional de Medicina de USA, la biopsia líquida puede definirse como el procedimiento que obtiene material para el análisis y examen patológico. Dicho material puede ser obtenido de cualquier fluido corporal recuperando material como ácidos nucleicos libres, micropartículas derivadas de células, exosomas, células tumorales circulantes, y otras células circulantes o estructuras celulares (105,106).

Este nuevo concepto de biopsia ofrece a los pacientes la posibilidad de una opción mucho menos invasiva para *screening*, diagnóstico, monitorización y seguimiento de la enfermedad oncológica, así como la posibilidad de obtención de biomarcadores que marcarán las decisiones terapéuticas (107–111).

La US FDA aprobó por primera vez el test mediante biopsia líquida el día 1 de junio de 2016 para la determinación de la mutación EGFR para pacientes con CPCNP usando la técnica llamada “cobas EGFR mutation test v2”. (112).

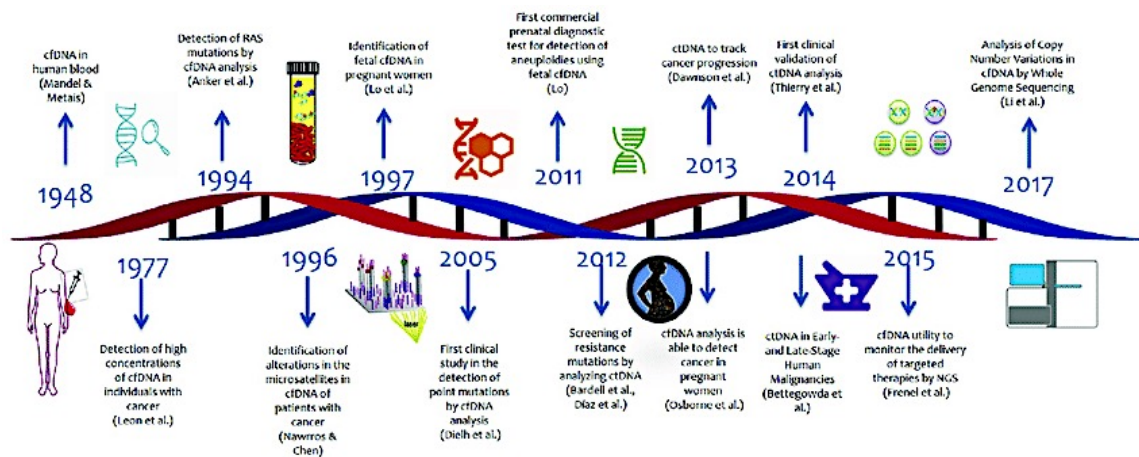


Figura 1.18: evolución del desarrollo de la biopsia líquida . Figura extraída de Dominguez-Vigil I G. Et al. Oncotarget 2018, vol 9, 2912-2922. (113)

Según el estudio de mercado de RNCOS (Business Consulting Service), se espera que para el año 2023 el mercado global de la biopsia líquida supere los 5 billones de dólares, como resultado de un uso prometedor de este tipo de técnicas (114,115).

Con todos estos resultados prometedores que se han ido definiendo en los últimos años, se ha visto incrementado de manera exponencial el número de publicaciones con temas relacionados a la biopsia líquida y sus diferentes características como aplicaciones.

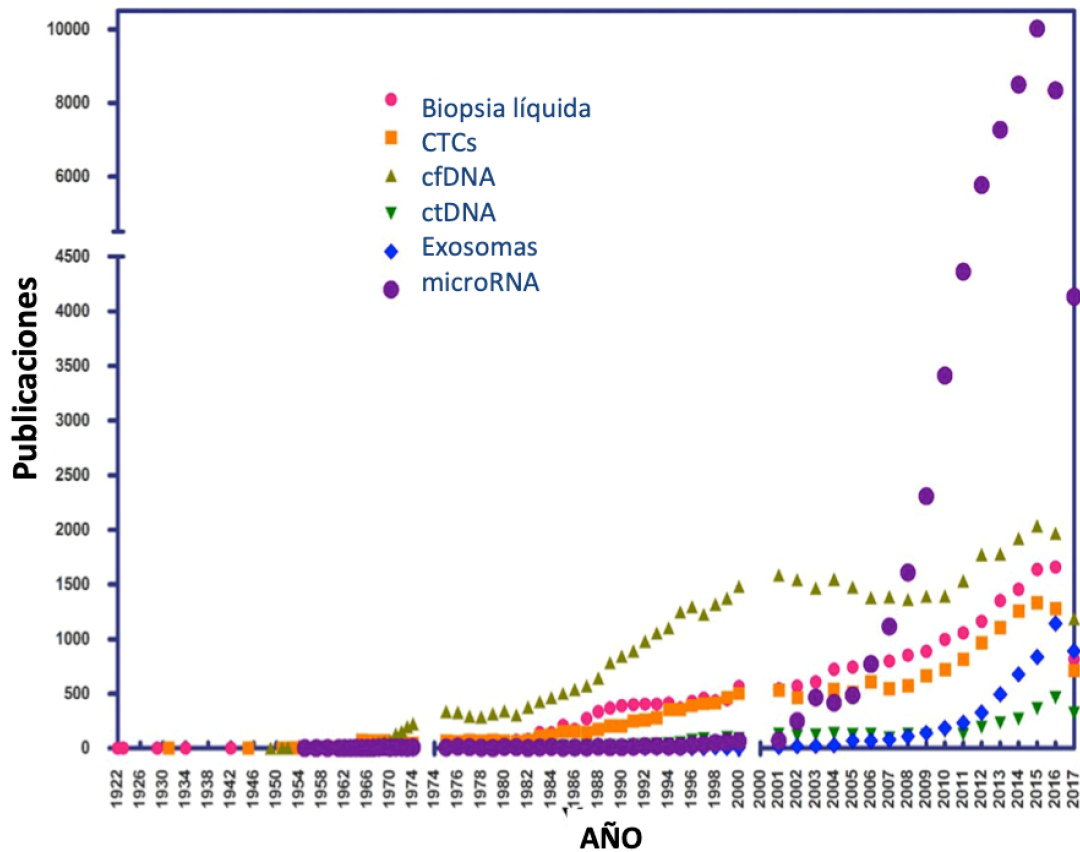


Figura 1.18: número de publicaciones por año en pubmed con los diferentes términos expuestos para el año 2017. Gráfica extraída y adaptada de Figura extraída de Dominguez-Vigil I G. Et al. Oncotarget 2018, vol 9, 2912-2922. (113)

1.7.2 Características

Una de las dificultades más importantes a la hora de determinar una biopsia líquida es el conocimiento de la biología y la dinámica que las células circulantes y su ctDNA tienen en la sangre, siendo así necesario conocer sus mecanismos de apoptosis y su importancia en la carga de material que se desprende de la célula circulando por el medio (116–120).

La existencia de CTC se conoce desde 1869, pero fue a finales de los 90 cuando se reconoció su potencial clínico (108,115,121). Aunque el primer informe sobre el ADN circulante libre de células (cfDNA) fue publicado ya a finales de los años 40,

no fue sino hasta cuatro décadas después que se informó de la presencia de cfDNA en plasma de pacientes con cáncer (115).

Las ctDNA se liberan de células que sufren apoptosis, necrosis y por secreción activa, y normalmente se elimina del torrente sanguíneo en cuestión de horas por la actividad de la nucleasa (115). Diferentes autores han estudiado en los últimos años las implicaciones de esa actividad celular en diferentes tumores.

Con esta información, la biopsia líquida no solo puede centrarse en tratar de determinar ADN circulante, sino que también está en auge la determinación de otras moléculas que resulten de la actividad de esas células tumorales. Entre estos metabolitos que se pueden analizar en la biopsia líquida estarían mRNA (RNA mensajero), miRNA (microRNA), lncRNA, vesículas extracelulares (fagocitosis), proteínas y plaquetas educadas de tumor (108,122-124).

Por otro lado, pese que habitualmente cuando se habla de biopsia líquida la tendencia es a pensar en extracción sanguínea, la utilidad de otros fluidos corporales está siendo estudiada, tales como saliva, orina, líquido pleural, etc.

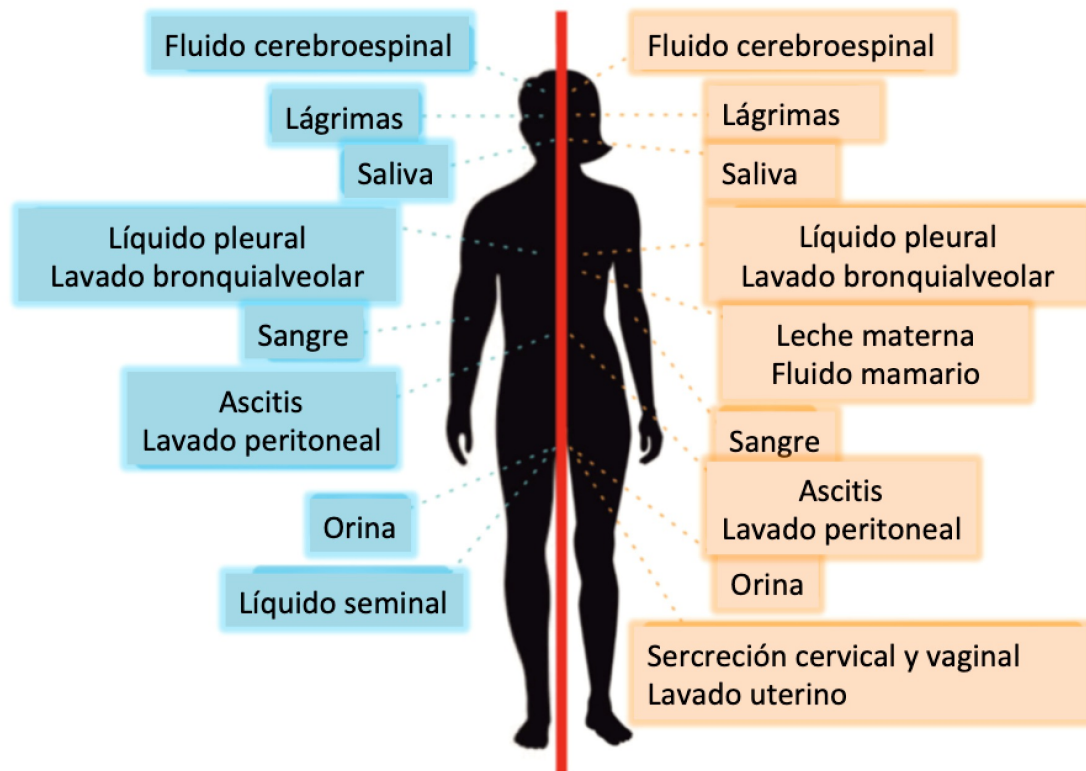


Figura 1.19: Análisis de los tipos de líquidos más habituales utilizados para la realización de biopsias líquidas en hombres (izquierda) y mujeres (derecha). (Imagen extraída y adaptada de Lisova A Et al. J. CLin Med. 2020, 9, 2749. (125)

1.7.3 Subtipos

Existen múltiples tipos de biopsia líquida dependiendo de lo que se analice dentro del líquido en estudio. Existen diferentes divisiones para una mejor comprensión de un tema que cada vez se está haciendo más complejo con un incremento logarítmico de estudios. Una de las posibles divisiones más práctica es dividirlos según el tipo de material analizado (126).

- Análisis de células tumorales circulantes CTC

Esta prueba identifica la presencia de células en la sangre, y usa estas mismas para la caracterización molecular de diferentes tumores (127). Las células tumorales circulantes son células intactas que son liberadas al torrente sanguíneo desde el tumor primario o lesiones metastásicas (128). Estas células se encuentran presentes en la sangre en un número muy pequeño (en torno a 1 célula por cada 10^6 - 10^7 leucocitos por mililitro de sangre, muy inferior en las etapas tempranas), por lo que la detección y aislamiento de dicha célula ha supuesto un avance tecnológico muy importante (128,129).

Las características genóticas y fenotípicas de las CTCs pueden variar a lo largo de la evolución de la enfermedad, representando una alta heterogeneidad a niveles tanto genéticos, transcriptómicos, proteómicos y metabolómicos, de ahí la importante revolución en este campo que supuso su detección y estudio (130-133).

Actualmente existen numerosos sistemas aprobados por la FDA que favorecen la detección de las CTCs basados principalmente en citometría de flujo, inmunofluorescencia y transcriptasa inversa mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) (134,135).

- Análisis de ADN libre circulante

El ADN está constantemente siendo liberado a la sangre en forma de fragmentos procedentes de la apoptosis y necrosis las células (tanto tumorales como no tumorales) (136-138). Cuando las células que liberan el DNA son células tumorales se llaman ctDNA (si son generales sin especificar origen se denominan cfDNA). Gracias a este ctDNA se puede analizar con alta sensibilidad y especificidad mutaciones, número de copias

de variaciones, cambios de metilación y variaciones en los nucleótidos (139).

En pacientes con cáncer, los niveles de cfDNA son muy superiores con una media de tamaño superior que en los pacientes sanos. De la misma manera, ctDNA representa una pequeña proporción dentro del cfDNA en los pacientes con cáncer (en torno a un 0'1%-10%). Esta proporción depende en gran medida del tamaño tumoral, estadio tumoral y respuesta a los tratamientos (140-143). De media, un paciente con una masa tumoral de 100g libera un 3'3% de ctDNA a la circulación (144).

El cfDNA es el material más usado para la detección de diferentes mutaciones tumorales usados en la práctica clínica tales como BRAF, KRAS, Her2, ALK, PI3K (109,145).

- Análisis de ADN exosomal

Los exosomas con unas bicapas lipídicas que están formadas por cuerpos multivesiculares de la fusión celular con proteínas de membrana que se forman durante la exocitosis y tienen un diámetro aproximado de 40-200 nm (146,147). Se cree que los exosomas tiene como función el intercambio de información célula a célula mediante la fusión de los recipientes celulares y liberando su contenido, el cual puede estar compuesto por proteínas, DNA, mRNA, miRNA, provocando una serie de señales moleculares (147-151). Estas señales pueden modificar el ambiente sistémico y al sistema inmune, afectando así a la actividad tumoral, de igual manera se ha visto que ejercen un papel importante en el organotropismo de las metástasis, la invasión tisular y la angiogénesis(152).

El método más utilizado para el aislamiento de exosomas se basa en propiedades biofísicas (tamaño, morfología y densidad) o bien en un sistema de precipitación por inmunofinidad (134).

- Análisis de miRNAs (microRNA)

Se le llama microRNA a las moléculas de RNA no codificado que regula la expresión génica (153). Un único miRNA puede influir en la expresión de numerosos genes del ser humano, y en ocasiones se encuentran en lugares frágiles que son fácilmente eliminados por diferentes tipos de tumores, lo que provoca que esté implicado en la progresión del cáncer (154). Hay numerosos ejemplos de miRNA que están implicados en diferentes tumores (cáncer de piel miR-21, miR-320a o bien colorrectal con miR-106a, miR-29).

Como ejemplo de esta técnica, en el 2019 se presentaron datos en el Congreso Mundial de Cáncer de Pulmón (IASLC, International Association for the Study of Lung Cancer, 2019) en los que combinaban determinaciones de miRNA junto con TCBD en el *screening* de cáncer de pulmón con datos prometedores (155).

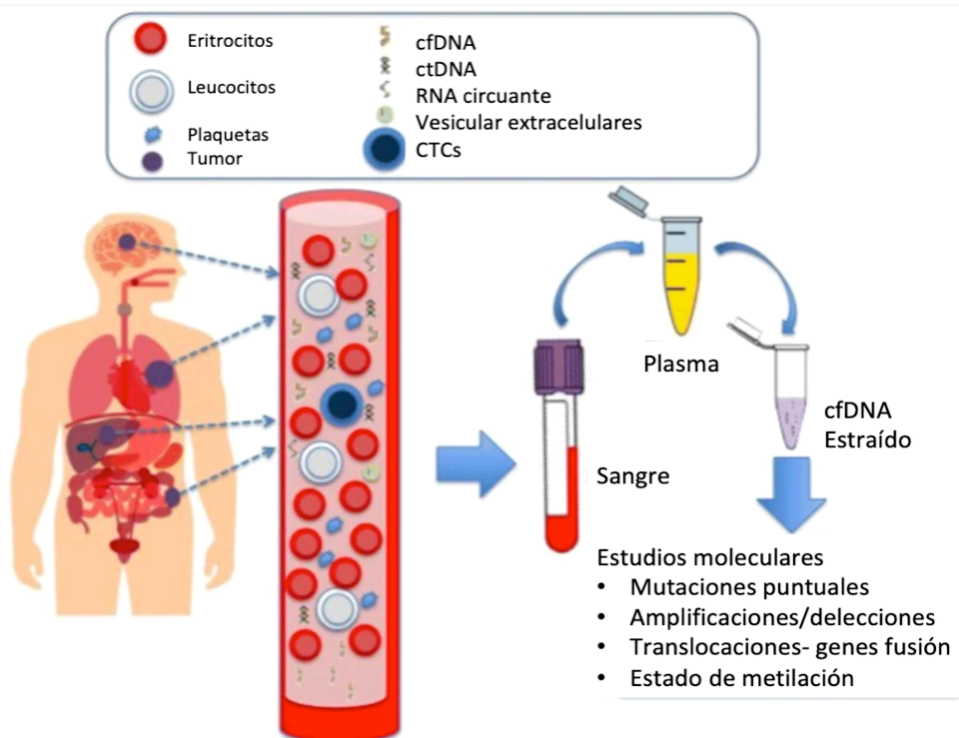


Figura 1.20: descripción gráfica del proceso durante la biopsia líquida. Figura extraía adaptada de Remon J. Et al. Clin and Transl Onc. (43)

1.7.4 Ventajas y desventajas de la biopsia líquida

En la actualidad, las biopsias tisulares siguen siendo consideradas como el *gold standard* o técnica de referencia a la hora de obtener material para el diagnóstico y elección de tratamiento de las enfermedades neoplásicas (156). Sin embargo, esta técnica presenta numerosas deficiencias inherentes a la hora de actuar en diversas situaciones que se pueden presentar a lo largo de la enfermedad, como puede ser en el diagnóstico y la monitorización.

Los principales inconvenientes a la obtención de material tisular mediante biopsia convencional serían:

- La accesibilidad limitada al tejido tumoral durante la biopsia produce un aumento en las probabilidades de obtener un resultado falso negativo (157).
- Ausencia de información sobre la heterogeneidad espacial y temporal del tumor (158).
- La diversidad genética del tumor puede variar dependiendo de la respuesta a los diferentes tratamientos aplicados y sus resistencias debido a subclones tumorales. Esta situación no se puede apreciar con una única biopsia tisular (158,159).
- Problemas debidos a la logística y complicaciones técnicas como puede ser el almacenamiento de tejido, que darían lugar a resultados equívocos (160).
- Riesgo de efectos adversos debido al procedimiento de la biopsia (157).
- Coste alto del procedimiento (161).

Sin embargo, frente a este procedimiento, la biopsia líquida ofrece una serie de ventajas como puede ser la facilidad de obtención de la muestra de una manera rápida y con mayor frecuencia, así como ofrecer una detección rápida de alteraciones genéticas tanto de novo como debido a resistencias a los fármacos administrados (162,163).

Esta facilidad de obtención de la muestra provoca que se puedan tomar determinaciones en diferentes momentos de la enfermedad, detectando así antes las recurrencias y resistencias mutacionales. De igual manera, en diferentes estudios sobre determinaciones mutacionales, principalmente en cáncer de pulmón, se ha objetivado como la biopsia líquida provee de una mayor detección de los diferentes perfiles mutacionales y genéticos del tumor (164,165). Esto se debe a una alta sensibilidad y factor predictivo intrínseco de la técnica (166).

En la siguiente tabla, se comentan las principales ventajas y desventajas que podemos obtener de la realización de una biopsia líquida (126,139,163,167-172).

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Ayuda a comprender la heterogeneidad espacial y temporal del cáncer	Ausencia de estandarización de las técnicas actuales
Requiere únicamente una cantidad muy pequeña de sangre (6-10 ml aprox.)	Validación técnica y clínica suficiente para su correcta implementación
Mínimamente invasiva	En algunos tumores, el diagnóstico requiere de histología
Detección temprana del cáncer	Variaciones en niveles de DNA circulante
Monitorización en tiempo real para respuestas al tratamiento y resistencias	
Se pueden hacer análisis repetidos	
Menor tiempo de respuesta para genotipado de mutaciones	
Oncología de precisión	

Tabla 1.1: principales ventajas y desventajas de la biopsia líquida (173).

De las desventajas comentadas, la estandarización de las diferentes técnicas utilizadas y la variabilidad de las mismas, puede llevar a errores de interpretación por los facultativos, requiriendo de una formación específica, (141,174,175). Por otro lado, la cantidad de ADN circulante varía en diferentes pacientes, así dependiendo también del estadio tumoral, vascularización tumoral, dimensiones tumorales y potencial metastásico (137,141) lo que puede dificultar los diagnósticos en fases más tempranas de la enfermedad (108).

Hoy en día, una limitación de la biopsia líquida (no siendo una desventaja intrínseca de la técnica) es el coste en la implementación de la técnica en un laboratorio, debido a la necesidad de un equipo multidisciplinar de bioquímicos, bioinformáticos y demás especialistas, haciendo que la accesibilidad a la misma sea más dificultosa y por tanto menos aplicada en estos momentos tan iniciales de su beneficio (126).

1.7.5 Usos de la biopsia líquida en diferentes tumores

En los últimos años, la biopsia líquida se ha ido implantando poco a poco en las diferentes unidades oncológicas que tratan diversos tumores como pueden ser pulmón, melanoma, mama, ovario, cérvix o vejiga urinaria (174). De igual manera se usan para las determinaciones de diferentes mutaciones que son de aplicación clínica en estos tumores, como KRAS y BRAF en colon, o EGFR en pulmón (176).

En cuanto al diagnóstico mediante ctDNA, se ha visto que se puede detectar hasta en un 75% de los tumores pancreáticos, ovario, colorrectal, vejiga, mama, cuello, hepatocarcinoma, melanoma y gastroesofágico, y hasta en un 50% en los tumores del Sistema Nervioso Central (SNC), renal, prostático y tiroides (110) .

Hay numerosos estudios de biopsia líquida en cáncer colorrectal, donde se pueden identificar numerosas mutaciones (como KRAS, BRAF o APC) en ctDNA con alta sensibilidad y especificidad (141,177) . También se estudia su uso como estimador de estadiaje y pronóstico midiendo los niveles de CTCs y ctDNA en sangre (a mayores niveles, peor pronóstico o riesgo de recidiva y progresión), con estudios

de validación de la presencia de dichas moléculas en un diagnóstico temprano de cáncer colorrectal (144,178-180).

Otro de los tumores más estudiados con estas técnicas es el cáncer de mama usando el ctDNA para la monitorización del tamaño tumoral, como posible *screening*, respuesta al tratamiento y como detección de enfermedad mínima residual (1,181-184). Otra de las funciones de la biopsia líquida en este tumor sería la determinación de Her2, esencial en la práctica clínica, con estudios donde aseguran que las tasas de detección con esta técnica eran incluso superiores a las obtenidas por inmunohistoquímica (185,186).

1.7.6. Biopsia líquida en Cáncer de Pulmón

El cáncer de pulmón se ha desarrollado durante los últimos años como una complicada patología que depende de muchos factores a la hora de decidir estrategias terapéuticas, aportando mayor importancia a la obtención de material suficiente de cara a poder realizar un diagnóstico completo (46). Las determinaciones más importantes que cuentan (o se encuentran en estudio) con un tratamiento dirigido son EGFR, KRAS, BRAF, translocación de ALK, ROS1, RET, inserción de Her2 o amplificación de MET (187-190).

Existen numerosos estudios donde se comprueba la viabilidad de determinar este tipo de mutaciones mediante el análisis de CTCs y ctDNA, siendo el cáncer de pulmón uno de los tumores más avanzados en este tema (187-190). Además de la determinación de mutaciones, también hay estudios que sirven de guía a la hora de determinación de pronóstico (dependiendo de los niveles de ctDNA o CTCs en sangre), riesgo de recidiva o respuesta al tratamiento (137,139,143,163,191-194).

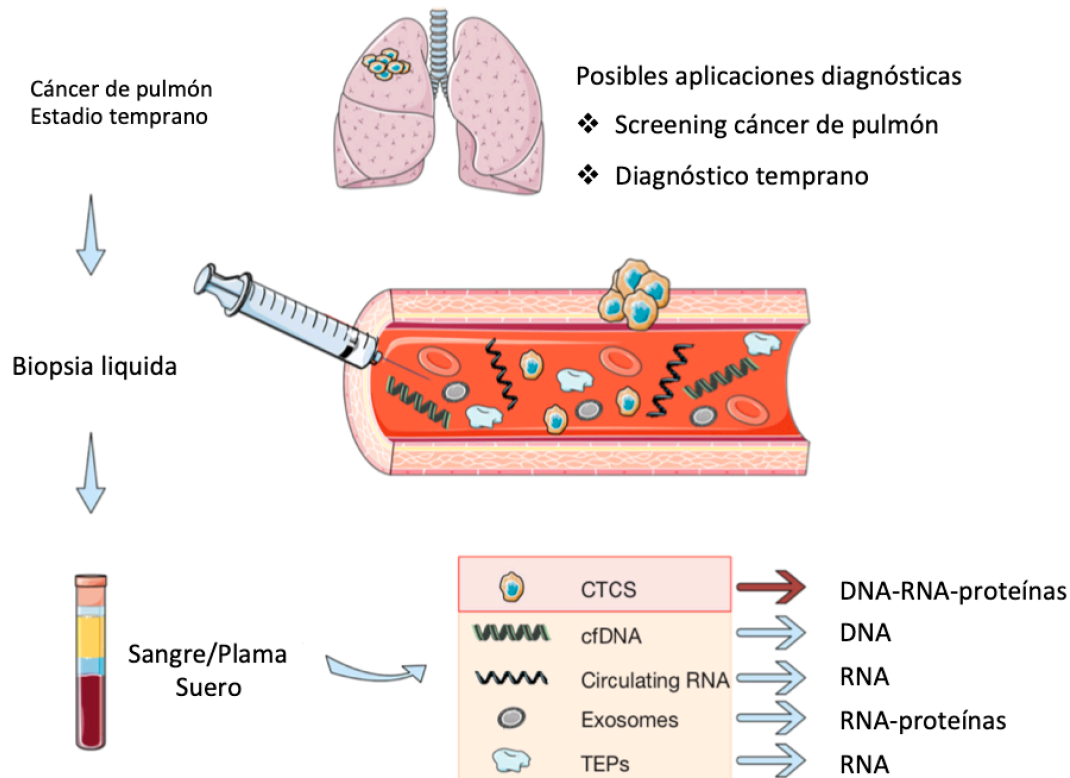


Figura 1.21: Componentes derivados de tumores que se pueden usar como biopsia líquida para pruebas genéticas. (125)

En cuanto a las CTCs, se sabe que estas pueden ser determinadas previo a la aparición de enfermedad por imagen (objetivado en un estudio de pacientes con EPOC sin nódulos detectables por TAC (94), llevando así a un diagnóstico precoz (93,195,196). La técnica más usada para su determinación es la ISET (Isolation by Size of Epitelial Tumor cells), la cual aísla las CTCs en relación a su tamaño y ofrece material para el análisis citomorfológico e inmunocitoquímico para detectar reordenamientos o amplificaciones (165,197–200).

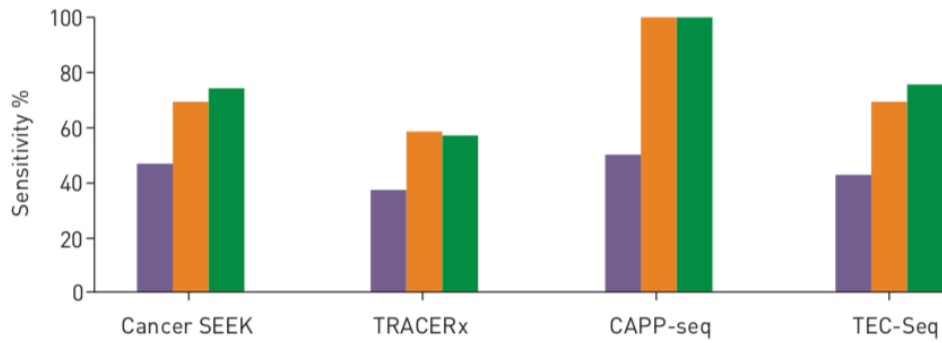
La ratio de detección de CTCs en estadios tempranos de cáncer de pulmón es del 30%, lo que asociado a una técnica más específica como ISET lo convierte en una opción viable de *screening* (94,96,201,202), siendo estudiado principalmente en pacientes de alto riesgo por el grupo francés (94,96,201,202). Si atendemos a la cantidad de CTCs detectadas, hay estudios que lo asocian al pronóstico y también a

la evaluación de respuesta, aunque estos últimos con resultados poco sensibles, por lo que requieren de estudios a mayor escala (131,203–209).

Sin duda, la técnica que más recorrido tiene y resultados más prometedores es mediante el análisis de ctDNA en sangre. Estudios más tempranos demostraron que la presencia de cfDNA está aumentada en pacientes con cáncer de pulmón, pero también se puede ver aumentada por otras enfermedades, por lo que se requieren de técnicas muy sensibles para determinar la pequeña proporción de ctDNA de todo el conjunto (210). Todo ello produce que los requerimientos técnicos sean muy complicados y se produzcan falsos negativos por falta de ADN viable o falsos positivos por errores de secuenciación (211).

Esta técnica se utiliza mayormente para la determinación de las mutaciones ya mencionadas anteriormente, pero en los últimos años se han visto aumentados los estudios en otros usos. Entre otros, se estipula con utilidad para la determinación de respuesta a la inmunoterapia (212–216), detección de enfermedad mínima residual o mecanismos de resistencia adquiridos (217).

En cuanto a lo referente al *screening*, ctDNA se postula como una técnica con alta sensibilidad (llegando al 100% en estadios II y III según la técnica utilizada), la mayoría combinando el análisis genómico a través de ctDNA con biomarcadores proteicos (142,218), aunque en ocasiones se puede determinar la presencia de tumor pero no su localización, ya que el cáncer de pulmón no tiene conocidos biomarcadores proteicos que ayuden en su detección.



	Cancer SEEK [#]	TRACERx [¶]	CAPP-seq ⁺	TEC-Seq [§]
■ Stage I	43	37	50	45
■ Stage II	69	59	100	72
■ Stage III	74	57	100	75

Figura 1.22 current: Resumen de las propiedades técnicas y el rendimiento de las cuatro principales plataformas de genotipado plasmático estudiadas para la detección del cáncer de pulmón de células no pequeñas en estadio temprano. etapas iniciales: captura híbrida, secuenciación de próxima generación de plasma (NGS) (16 genes) y 8 marcadores de proteínas. Enfermedad residual mínima (ERM): NGS plasmática, PCR multiplex específica del paciente (variaciones de 10 a 22 de un solo nucleótido), evolución subclonal. +: ERM en estadio temprano: captura híbrida, plasma NGS (139 genes). ERM en estadio temprano: captura híbrida, plasma NGS (58 genes). Figura extraída de Guibert N. Et al. Eur Respir Rev 2020; 29: 190052.

Aparte de la determinación de células circulantes o material proveniente de las mismas, otros mecanismos de estudio están siendo investigados con buenos resultados. Un caso es el estudio de proteínas circulantes y su metabolismo en el diagnóstico en fase temprana, con resultados prometedores (219). Este campo está cada vez más en auge, con el estudio de la proteómica, la cual se encarga de identificar y cuantificar las proteínas en sangre y posteriormente analizar las modificaciones post-transcripcionales y las variantes en su secuencia(220).

Numerosos estudios se han llevado a cabo para determinar el estado proteómico del cáncer de pulmón (tanto en sangre como en lavado bronquial) mediante espectrometría de masa, en los cuales han identificado un panel de proteínas que podría determinar el diagnóstico de cáncer de pulmón(221). De igual manera, se han encontrado diversas regulaciones proteicas en diferentes paneles que podrían

determinar cuáles de ellas están involucradas en el desarrollo de un tumor en estadio precoz(222).

Por otro lado, además del estudio cuantitativo de las proteínas, también se está desarrollando un campo muy amplio que estudia su metabolismo, las moléculas intermedias y sus productos que estas generan, así como su fisiología. El estudio de estas características es lo que se conoce como metabolómica. Mediante las nuevas técnicas de espectrometría de masa se están realizando estudios focalizados en la detección temprana de tumores que son difíciles de diagnosticar como es el cáncer de pulmón (223,224). Los metabolitos más estudiados como producto de la actividad proteínica son tales como el lactato, valina, lípidos, hexenal, ácido hidroxipirúvico, iosina y demás compuestos metabólicos.

Por tanto, según la última guía española de biomarcadores en cáncer de pulmón, la biopsia líquida ofrece numerosas ventajas (diagnóstico no invasivo, *screening* y monitorización de la evolución de la enfermedad) y permite la determinación de mutaciones susceptibles de tratamiento dirigido (92,225). Sin embargo, ante un resultado negativo de esta biopsia se recomienda realizarla sobre tejido tumoral mediante técnicas convencionales, dado que aún falta mayor validación. De igual manera se postulan como una técnica prometedora para el manejo de esta patología (46).

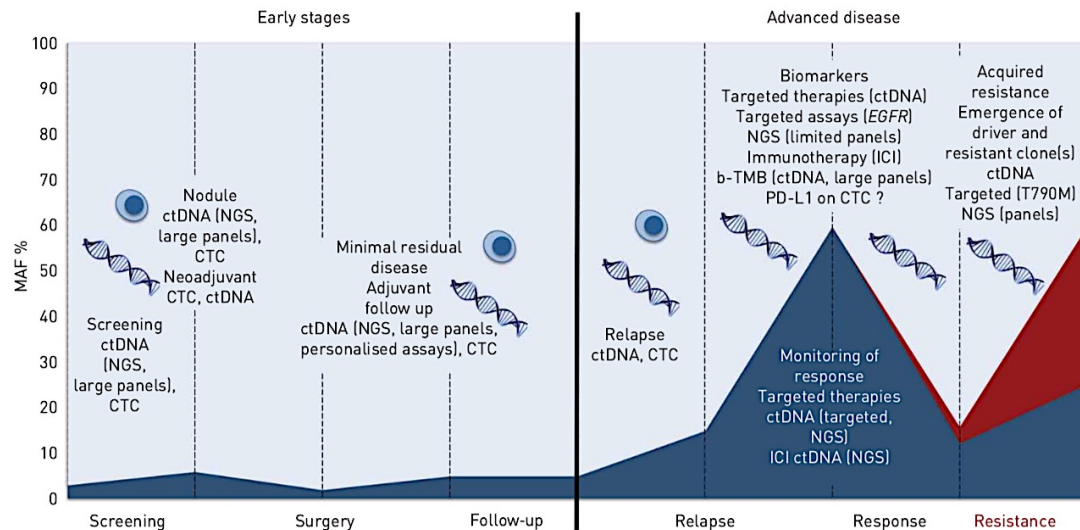


Figura 1.23: Aplicaciones potenciales de la biopsia líquida en el cáncer de pulmón de células no pequeñas durante todo el tratamiento. En las etapas iniciales de la enfermedad, el cribado requiere la secuenciación de plasma de NGS utilizando paneles grandes, con alta sensibilidad (limitada por una baja diseminación tumoral) y una especificidad perfecta, o plataformas de detección de CTCs altamente específicas. Para diferenciar los nódulos benignos de los malignos, la NGS plasmática podría ser útil y evitar biopsias invasivas. La carga de CTC o ADN del tumor circulante antes de la cirugía tiene el potencial de ayudar a guiar la terapia neoadyuvante, mientras que la detección mínima de enfermedad residual después de la cirugía (paneles de NGS grandes o específicos del paciente) puede guiar la terapia adyuvante. En la enfermedad en estadio avanzado, la genotipificación plasmática está bien establecida en el entorno del EGFR) y las plataformas NGS permiten una genotipificación más amplia en ambos diagnósticos (incluida la detección de otros impulsores oncogénicos y la estimación de la carga de mutaciones de tumores sanguíneos (b-TMB)) y resistencia. MAF: frecuencia alélica mutante; ICI: inhibidor de puntos de control inmunológico; PD-L1: ligando 1 de muerte programada. Figura extraída de Guibert N. Et al. Eur Respir Rev 2020; 29: 190052.

1.7.7 Futuras aplicaciones de la biopsia líquida

Sin duda nos encontramos en las fases tempranas de las múltiples posibles utilidades que nos puede ofrecer esta técnica tanto en el diagnóstico como en la monitorización y opciones terapéuticas de los pacientes con enfermedades neoplásicas, pero también se abre un campo de estudio de otras enfermedades como pueden ser las cardiovasculares, metabólicas o neurológicas (114,226,227).

En cuanto a cuestiones técnicas, sin duda que la tecnología en un futuro irá proporcionando mayores opciones técnicas de uso de esta biopsia con un descenso en los costes. Además de las que ya conocemos mediante la detección de CTC, ctDNA, miRNA, otras opciones tecnológicas basadas en espectrometría, microfluidos, secuencia celular, metabolismo proteico y otras muchas se encuentran en estudios preliminares con resultados prometedores (114).

2. OBJETIVOS

Los objetivos principales de esta tesis son:

- Aplicación de calorimetría diferencial de barrido (DSC) en práctica clínica para diagnóstico y seguimiento de pacientes de melanoma.
- Aplicación de calorimetría diferencial de barrido (DSC) en práctica clínica para diagnóstico de pacientes de cáncer de pulmón.
- Correlacionar los datos clínicos de las muestras de los pacientes con patología tumoral del estudio y los datos de los termogramas de DSC, para establecer DSC como test clínico de diagnóstico y seguimiento para medicina personalizada.

Los objetivos secundarios de esta tesis son:

- Diseñar y desarrollar nuevos parámetros que permitan identificar los elementos característicos y diferenciales de los termogramas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de plasma/suero sanguíneo entre controles sanos y pacientes de melanoma.
 - A) Definición de nuevos parámetros secundarios a partir de los parámetros primarios obtenidos directamente obtenidos de los termogramas de DSC.
 - B) Correlacionar la evolución clínica de los pacientes de Melanoma en seguimiento con los cambios observados en los nuevos parámetros que se desarrollen en el estudio a partir de los termogramas de DSC.
- Diseñar y aplicar modelos y herramientas estadísticas que permitan identificar los elementos característicos y diferenciales de los termogramas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de plasma/suero sanguíneo entre controles sanos y pacientes de cáncer de pulmón.
 - A) Desarrollar nuevos modelos estadísticos aplicables a los parámetros primarios que se obtienen tras el análisis de los termogramas de DSC de las muestras de pacientes con cáncer de pulmón.
 - B) Definición de un indicador fácil de interpretar que reúna toda la información de los parámetros obtenidos de los termogramas de DSC de las muestras de pacientes con cáncer de pulmón que permita al especialista clínico discriminar entre enfermedad y no enfermedad.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 Diseño del estudio

3.1.1 Cronograma del estudio

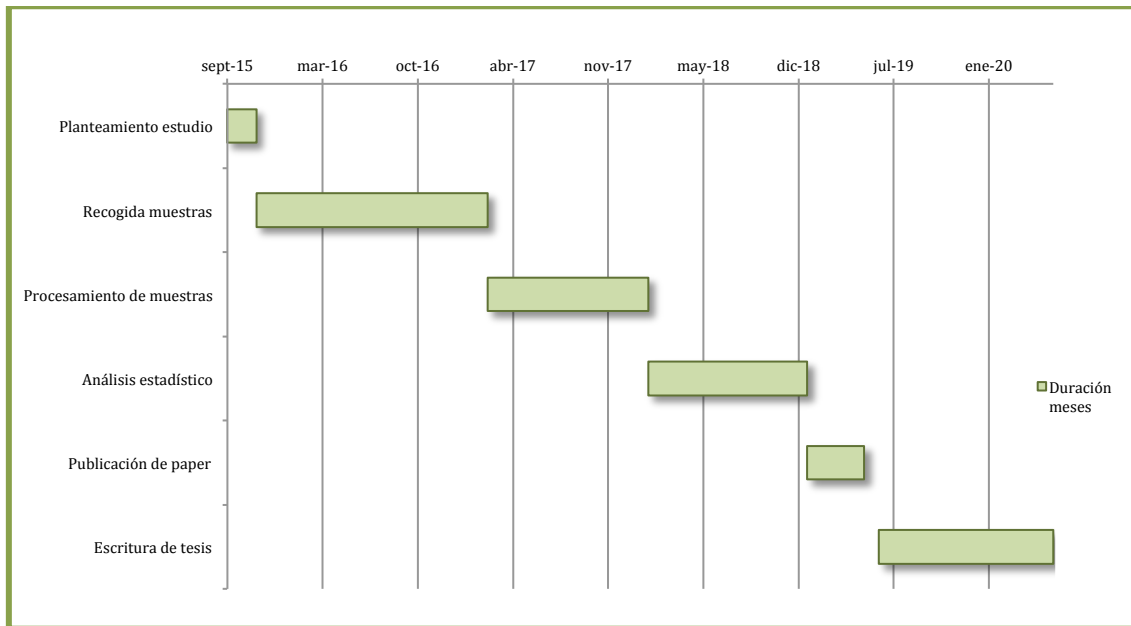


Figura 3.1: cronograma del estudio.

Para este trabajo de tesis doctoral se realizan 2 estudios diferentes con la misma técnica de DSC:

1) El primer estudio consiste en un estudio prospectivo de casos y controles , en los que se recogen 3 grupos diferentes de pacientes: pacientes sanos y pacientes que hayan completado el tratamiento para su melanoma y hayan realizado un seguimiento en el que no se evidencia recidiva de la enfermedad (estos dos grupos conforman el grupo control), y el tercer grupo consiste en pacientes con melanoma que estuvieran recibiendo tratamiento o hubieran completado recientemente el tratamiento y estuvieran realizando controles para valorar una respuesta o posible recidiva (grupo de casos). En el estudio se busca una posible correlación entre la

evaluación clínica (examen físico o pruebas de imagen) con los diferentes termogramas de DSC obtenidos.

2) El segundo es un estudio prospectivo de casos y controles en el que se estudian diferentes modelos predictivos para la clasificación diagnóstica de pacientes con cáncer de pulmón (casos) y sujetos sanos (controles) utilizando los parámetros obtenidos tras el análisis de los termogramas de sus muestras de plasma por calorimetría diferencial de barrido (DSC).

3.2 Población del estudio

3.2.1 Estudio de Melanoma:

Muestras procedentes de pacientes diagnosticados de Melanoma cutáneo en el *James Graham Brown Cancer Center (Louisville, Kentucky)* que tras firma de Consentimiento Informado dieron su consentimiento por escrito para que su plasma sanguíneo se ingrese en el biobanco (IRB # 08.0388) y se utilicen para fines de investigación. El comité de ética aprobó específicamente el uso de muestras de plasma del biobanco para su uso en este estudio sin la necesidad de un consentimiento adicional (IRB # 10.0144, 14.0517).

El estudio de melanoma se planteó como un estudio piloto que incluía a 10 pacientes afectados con melanoma, que se encontraban bajo seguimiento clínico y para los cuales estaban disponibles tanto las pruebas de imagen y su evaluación clínica como los termogramas de DSC.

Se aceptaban melanomas tanto en estadios II y III, en tratamiento adyuvante con seguimiento posterior de posibles recaídas (9 de los 10 pacientes) que habían sido atendidos en consulta en los últimos 1-2 años, como pacientes en Estadio IV (1 de ellos) con cualquier tipo de tratamiento (principalmente inmunoterapia como tratamiento *standard* actual).

Para el grupo de controles en melanoma se analizaron 36 individuos sanos procedentes del biobanco de la Universidad de Louisville y 8 pacientes que habían completado el tratamiento quirúrgico del melanoma y que se hubiera determinado ausencia de evidencia de enfermedad tras una evaluación clínica continua. Todas las muestras de plasma se almacenaron previamente en tubos comerciales y posteriormente se analizaron en un equipo *Nano DSC Autosampler System (TA instruments, New Castle, DE)*.

3.2.2 Estudio de Cáncer de pulmón:

Dos grupos de sujetos, controles sanos (grupo HC) y pacientes con cáncer de pulmón (grupo LCP), se emplearon para construir el modelo predictivo para el cáncer de pulmón proporcionando una forma de clasificación del paciente.

El estudio se realiza en los pacientes con reciente diagnóstico de cáncer de pulmón que acuden por primera vez a la consulta del Servicio de Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (Zaragoza) desde noviembre de 2015 a noviembre de 2016. Se les propone la entrada en el estudio y se les entrega hoja de información al paciente y consentimiento informado (Anexos 1 y 2). Se da tiempo al paciente a leerlo y a resolver dudas, finalmente firma.

3.2.2.1 Criterios de inclusión:

- Pacientes mayores de 18 años.
- Consentimiento Informado por escrito firmado
- Pacientes con diagnóstico reciente de Cáncer de Pulmón de cualquier histología, confirmado por biopsia.
- Cualquier estadio tumoral (según TNM de la *American Joint Committee on Cancer AJCC 7^a Edición*).
- Pacientes que reciban tratamiento o seguimiento en el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (Zaragoza) en el Servicio de Oncología Médica.
- Paciente que no hayan recibido tratamiento para la enfermedad neoplásica a estudio.

- Cualquier Performance Status escala ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*)
- Pacientes dispuestos a realizar extracción de sangre en los tiempos estipulados en el estudio, previamente informado.

3.2.2.2 Criterios de exclusión:

- Pacientes que hayan recibido algún tratamiento previo para la enfermedad tumoral en estudio.
- Pacientes con otras patologías tumorales activas en el momento del diagnóstico.
- Pacientes cuyo estado cognitivo o mental no permita consentir el estudio

Un total de 114 pacientes con cáncer de pulmón se agruparon según su tipo histológico (adenocarcinoma, cáncer de pulmón de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas y otros tipos diferentes de cáncer de pulmón de células no pequeñas). Además, los pacientes se clasificaron en diferentes etapas en el momento del diagnóstico (desde el estadio II al IV). Los pacientes con antecedentes sincrónicos de otras neoplasias malignas, tratamiento previo relacionado con el cáncer, ausencia de muestras de sangre o negativa a participar en el estudio se consideraron no elegibles.

En el momento de la inclusión, se registró información detallada sobre la edad, el género, los hábitos de fumar, el estadio tumoral, tipo de tratamiento y subtipo histológico.

El grupo de controles sanos consistió en 85 muestras de suero de sujetos caucásicos españoles, aparentemente libres de cáncer, sin antecedentes de cáncer de pulmón, de un biobanco de FISABIO (Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Generalitat Valenciana) con una distribución homogénea, incluido el género (53% hombres y 47% mujeres) con una edad promedio de 45.2 ± 14.2 .

3.3 Recogida de las muestras

3.3.1 Estudio de Melanoma

La sangre se extrajo en recipientes de 5 ml (plasma, anticoagulante de heparina sódica). Los tubos se mezclaron suavemente por inversión 8-10 veces inmediatamente después de la recogida de sangre para distribuir uniformemente el aditivo anticoagulante seguido de centrifugación a 3200 rpm durante 10 minutos (centrífuga BD-Clay Adams Compact II). El plasma separado se aspiró cuidadosamente para evitar la hemólisis o la contaminación de las fases sanguíneas separadas y se almacenó en alícuotas inmediatamente a -80 ° C hasta su posterior análisis. Todo el manejo de las muestras y el desecho de las muestras se realizó de acuerdo con los procedimientos de OSHA (*Occupational Safety and Health Administration*) sobre patógenos transmitidos por la sangre.

Todos los especímenes recolectados para el estudio fueron convenientemente anonimizados. La información demográfica y clínica asociada fue recolectada por el personal de la oficina de ensayos clínicos y almacenada de forma segura en el biobanco. La documentación relativa a los consentimientos del paciente fue aprobada por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad de Louisville (IRB # 08.0388) y cumplía totalmente con HIPAA (Ley de Transparencia y Responsabilidad de Seguro Médico). Las muestras proporcionadas para los estudios de DSC fueron codificadas por el número de colección de biobanco quedando protegidos los datos de los pacientes. Tanto los datos demográficos como los relativos a la clínica se proporcionaron posteriormente para el proceso de análisis de muestras.

3.3.2 Estudio de Cáncer de Pulmón

Se recogen las muestras procedentes de extracción sanguínea en diferentes situaciones (previo al inicio del tratamiento de quimioterapia o aprovechando una extracción sanguínea para la realización de un análisis).

Aproximadamente 10 ml de sangre periférica de cada paciente y sujeto de control se recogieron en tubos separadores de suero para el posterior análisis de DSC, los cuales se rotulan con un código alfa-numérico que identifica a cada paciente del estudio, asegurando así la confidencialidad de las muestras obtenidas.

Los tubos se mezclaron suavemente inmediatamente después de la extracción de sangre y se centrifugaron a 3200 rpm durante 10 minutos (Centrifuge 5702, Eppendorf). El plasma separado se aspiró cuidadosamente para evitar la hemólisis y la contaminación de las fases sanguíneas separadas, y se almacenó inmediatamente en alícuotas de 0,2 ml a -80 ° C con su código alfanumérico para la identificación hasta el análisis. Tras el almacenaje, las muestras fueron enviadas al laboratorio del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA) para su posterior análisis mediante la técnica de estudio.

Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito al protocolo del estudio, que fue previamente aprobado y realizado de acuerdo con la Junta de Revisión Ética para la Investigación Clínica del Gobierno Regional (CEIC Aragón). Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el CEIC Aragón (Nº CP18/2015, 18/11/2015). Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices aprobadas. (Anexo 1 y 2: Consentimientos informados).

3.4 Procesamiento especial de las muestras de Melanoma

Esta parte del estudio se realizó completamente en la *Universidad de Louisville (Kentucky, USA)*.

Las muestras de plasma (200 µL) se dializaron contra un tampón de fosfato estándar (KH₂PO₄ 1.7 mM, K₂HPO₄ 8.3 mM, NaCl 150 mM, citrato de sodio 15 mM, pH 7.5) durante 24 horas a 4°C para lograr la normalización de las condiciones del tampón para todas las muestras. Para dializar eficazmente esos pequeños volúmenes de plasma, se utilizaron dispositivos de diálisis Slide-A-Lyzer MINI (MWCO 3,500, 0.1 mL; Pierce, Rockford, IL) con cada muestra de plasma (200 µL) dividida entre dos unidades de diálisis para proporcionar un volumen suficiente para completar el análisis DSC. Las unidades de diálisis se cargaron con 100 µl de tampón de diálisis y se equilibraron durante la noche a 4°C contra 1L de tampón de diálisis. Las muestras de plasma congelado se descongelaron durante la noche a 4°C la noche anterior a la diálisis. En la mañana de la diálisis, las unidades de diálisis se retiraron del vaso de precipitados, se vaciaron del tampón y se cargaron con muestras de plasma. Las muestras se dializaron contra 1L de tampón fosfato con cambios de tampón después de tres horas de diálisis, luego después de dos períodos de cuatro horas con un período final de diálisis durante la noche. Después de la diálisis, las muestras se recuperaron y se filtraron para eliminar las partículas utilizando filtros de tubo de centrífuga Spin-X (acetato de celulosa de 0,45 mm; Corning Incorporated, Corning, NY). El tampón de diálisis final también se filtró (polietersulfona de 0,2 mm; Pall Corporation, Ann Arbor, MI) y se usó para todas las diluciones de muestra y como solución de referencia para estudios de DSC.

3.5 Técnica de estudio:

3.5.1 DSC (Differential Scanning Calorimetry)

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica que nos permite analizar las propiedades termodinámicas que caracterizan los cambios conformacionales en proteínas inducidos por aumento de temperatura.

Esta técnica nos permite medir la capacidad calorífica de una proteína en solución, en función de la temperatura, proporcionando información termodinámica del equilibrio de plegamiento-desplegamiento, así como de su mecanismo y cooperatividad. Para el desplegamiento típico de una proteína globular, el termograma obtenido muestra un pico de calor absorbido, inducido por el incremento de temperatura. El calorímetro, trabajando de manera adiabática, mide la diferencia de capacidad calorífica entre dos celdas idénticas, una con la proteína en solución y otra con el tampón de solución. Una vez finalizado el experimento obtendremos un resultado parecido al mostrado en la figura 1.8.

De un experimento de DSC se pueden obtener directamente parámetros termodinámicos asociados a la transición entre la proteína nativa y desnaturalizada tales como la entalpía, ΔH ; la capacidad calorífica, C_p del estado nativo y desplegado, así como la diferencia entre ambas ΔC_p ; la temperatura de desplegamiento, T_m .

Además, utilizando un análisis basado en un modelo de desplegamiento, es posible obtener la energía libre de Gibbs, ΔG ; y la entropía ΔS , (siempre y cuando el proceso sea reversible y tenga lugar en equilibrio).

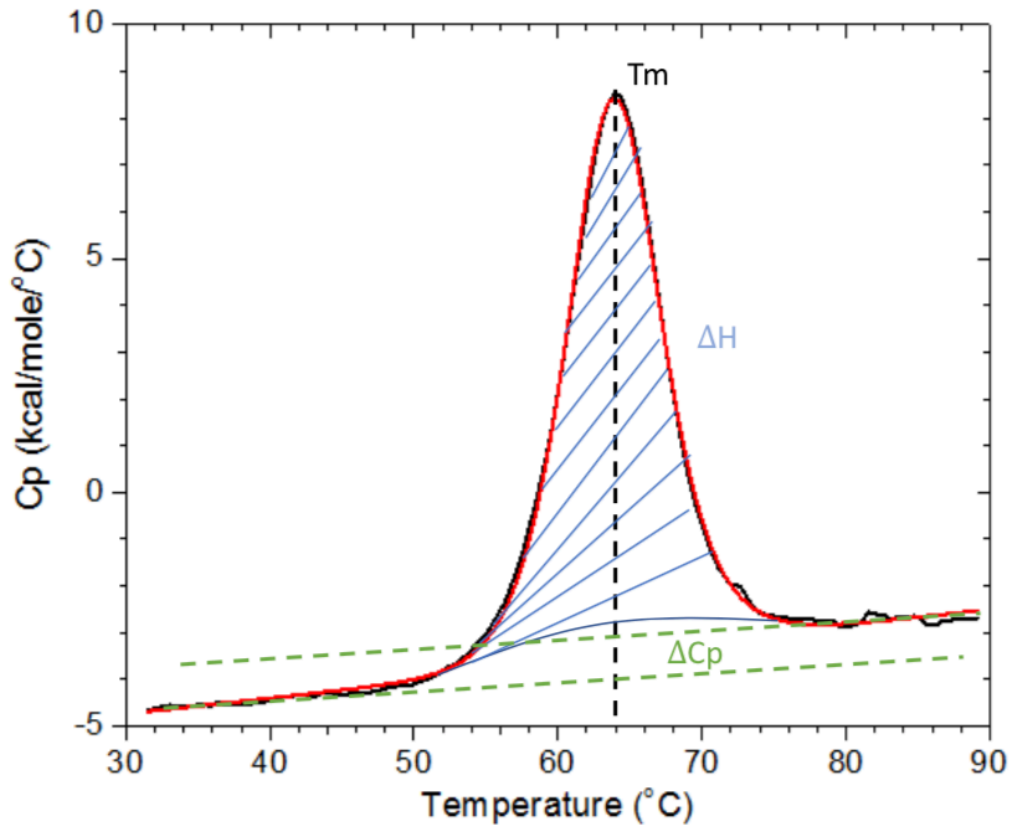


Figura 3.2. Ejemplo del análisis de una transición obtenida por DSC para una proteína y los parámetros que se pueden obtener.

El plasma/suero sanguíneo es una mezcla de proteínas y metabolitos, de modo que el termograma de una muestra de plasma/suero refleja la desnaturalización térmica de las proteínas más abundantes en plasma/suero, sus posibles interacciones entre ellas y con metabolitos, y sus posibles modificaciones estructurales.

3.5.2 Estudio de Melanoma

Los datos de DSC se recopilaron con un sistema *Nano DSC Autosampler System* (TA instruments, New Castle, DE) realizándose los experimentos de acuerdo con los procedimientos del fabricante. Como control interno se utilizó lisozima estándar comprobándose que estaba dentro de las especificaciones del fabricante. Las muestras dializadas se diluyeron 25 veces para obtener una concentración de

proteína adecuada para el análisis DSC. Las muestras y el dializado, se utilizaron para cargar tanto la muestra como las cámaras de referencia del instrumento, respectivamente. Se utilizaron placas de 96 pocillos que se encontraban termostalizadas a 4°C dentro del inyector automático del instrumento hasta su análisis por DSC. Se requirieron volúmenes de muestra de 950 µL para proporcionar un volumen suficiente para asegurar un enjuague y llenado adecuados del área de detección térmica de 300 µL. Los termogramas se registraron de 20°C a 110°C a una velocidad de barrido de 1°C/min con un tiempo de equilibrio previo de 900 segundos, aunque el análisis de datos se realizó solo en el rango de temperatura de 40-95°C. El instrumento se sometió a ciclos durante la noche ejecutando múltiples termogramas de agua-agua (durante el período de diálisis de toda la noche) seguido a la mañana siguiente al menos por tres termogramas de tampón-tampón para acondicionar las cámaras del instrumento antes de ejecutar el conjunto de muestras. Se examinó cuidadosamente cada aspecto del proceso: recolección y manejo de muestras de sangre; preparación de muestras para análisis DSC; ajustes del instrumento y réplicas de análisis; Análisis e interpretación de datos.

Este estudio metodológico fue previamente publicado (54), y se demostró que el almacenamiento a largo plazo de la muestra a -20 o -80°C y/o diálisis no influyó en los resultados de DSC en comparación con el plasma fresco. Es importante destacar que se demostraron que los termogramas de plasma eran robustos para todas las variables analíticas y preanalíticas examinadas. Estos estudios permitieron adoptar un protocolo estándar para el análisis de muestras clínicas. Para cada conjunto de muestras, se examinaron termogramas de búfer recolectados al principio y al final de un conjunto de muestras y después de termogramas de muestras individuales o consecutivas para determinar la reproducibilidad aceptable y la limpieza efectiva de las cámaras del instrumento. También se compararon los termogramas de muestras recolectados después de un tampón o muestra y se encontró que es posible obtener termogramas de muestras consecutivos después de un enjuague extenso de las cámaras del instrumento con poco efecto en el perfil del termograma. Rutinariamente se compararon termogramas de muestras duplicadas obtenidas bajo diferentes secuencias de

ejecución y en diferentes puntos de tiempo para asegurar que el perfil del termograma fuera reproducible.

Para este estudio, los termogramas se realizaron por duplicado y los datos DSC sin procesar se corrigieron según la línea de base instrumental mediante la sustracción de un termograma de referencia de tampón adecuado seguido del análisis multiparamétrico.

3.5.3 Estudio de Cáncer de Pulmón

La capacidad térmica de las muestras de suero se midió en función de la temperatura, C_p (T), utilizando un microcalorímetro VP-DSC capilar diferencial de barrido automático de alta sensibilidad (MicroCal - Malvern Panalytical, Malvern, UK). Las muestras de suero y las soluciones de referencia se desgasificaron adecuadamente y se cargaron cuidadosamente en las células para evitar la formación de burbujas. La línea de base del instrumento se registró de forma rutinaria antes de los experimentos. Los experimentos se realizaron en muestras de suero diluidas [1:25 en salino *fosfato-buffered* (PBS)] a una velocidad de barrido de 1°C/min. No se produjo precipitación/agregación durante la desnaturalización térmica. Los termogramas se corrigieron y analizaron utilizando un software desarrollado en nuestro laboratorio implementado en Origin 7.0 (OriginLab, Northampton, MA, USA). Con el fin de garantizar la reproducibilidad, se realizaron experimentos repetidos, así como experimentos de control con suero humano comercial (H4522, Sigma-Aldrich, Barcelona, España) periódicamente.

3.6 Obtención de los parámetros del termograma

Los termogramas obtenidos en los estudios de melanoma y pulmón fueron analizados en base a la estrategia novedosa definida en un estudio previo del grupo con pacientes de cáncer gástrico (67). En dicho estudio, el termograma de las muestras de suero o plasma se descomponía obteniendo diferentes parámetros. A continuación, se describe la forma en la que se ha aplicado dicha estrategia en cada patología en estudio.

3.6.1 Análisis Multiparamétrico

La medición directa en el calorímetro de barrido proporciona el termograma: capacidad de calor a presión constante de la muestra en función de la temperatura, $C_p(T)$. Hemos empleado un modelo fenomenológico previamente desarrollado en el grupo de investigación donde se ha realizado esta Tesis Doctoral. En él, el termograma se deconvoluciona en varias transiciones individuales (n), modelando cada transición individual por el pico logístico o la función de Hubbert. Como se describió anteriormente, la función Hubbert es capaz de reproducir (incluso mejor que una función gaussiana) el termograma para el desplegamiento de una proteína (67).

$$C_p(T) = C_{p,0} + \sum_{i=1}^{i=x} \frac{4A_i \exp\left(-\frac{T-T_{c,i}}{w_i}\right)}{\left(1 + \exp\left(-\frac{T-T_{c,i}}{w_i}\right)\right)^2} \text{ Ecuación 1}$$

donde A_i es la altura de cada componente (equivalente a la capacidad máxima de calor de despliegue $C_{p,max.}$), $T_{c,i}$ es el centro de cada componente (equivalente a la temperatura de transición media T_m), y w_i es la anchura de cada componente ($C_p(T_c \pm w) \approx 0.8A$, y $C_p(T_c \pm 2w) \approx 0.4A$). El parámetro de compensación $C_{p,0}$ es un parámetro ajustable para contrarrestar los posibles errores de la corrección de la línea de base.

Para cualquier termograma de suero dado, se obtuvieron los parámetros A_i , $T_{c,i}$ y w_i , para cada una de las transiciones individuales después del análisis de los datos. Estos parámetros constituyen el conjunto básico de parámetros a partir de los cuales se construye otro conjunto final de parámetros (como se indica en la siguiente sección) para la metodología cuantitativa comparativa multiparamétrica (67,228) destinada a establecer un criterio de clasificación entre sujetos sanos y pacientes.

El método multiparamétrico se basa en un conjunto de 14 parámetros que se definieron para el termograma TLB de cada sujeto de manera independiente de la concentración de plasma/proteína. Por lo tanto, no hay necesidad de determinar la concentración de proteína y no hay dependencias ocultas de concentración de proteína.

Temperatura media, T_{av}

Este parámetro proporciona la temperatura promedio o el primer momento del termograma cuando se considera como una función de distribución de densidad:

$$T_{av} = \frac{\sum_j C_P(T_j)T_j}{\sum_j C_P(T_j)} \text{ Ecuación 2}$$

donde el subíndice j abarca toda la gama de puntos experimentales en el termograma

Asimetría G_1

Este parámetro proporciona una medida de la asimetría del termograma:

$$m_k = \frac{\sum_j C_P(T_j)(T_j - T_{av})^k}{\sum_j C_P(T_j)} \text{ Ecuación 3 y 4}$$

$$G_1 = \frac{m_3}{m_2^{3/2}}$$

Área normalizada bajo la curva, AUC_{ni} .

Este parámetro proporciona el área debajo del termograma normalizado por cualquiera de las alturas de los picos (con $i = 2-5$):

$$AUC_{ni} = \frac{\sum_j C_P(T_j)}{A_i} \text{ Ecuación 5}$$

Área del polígono normalizado, AP_{ni} .

Este parámetro proporciona el área del diagrama hexagonal irregular construido con las alturas de los seis picos individuales normalizados por cualquiera de las alturas de los picos (con $i = 2-5$):

$$AP_{ni} = \sum_{s=1}^{s=x} \frac{\sqrt{3} A_s A_{s+1}}{4 A_i^2} \text{ Ecuación 6}$$

Valor de distancia normalizado, Dv_i

Este parámetro proporciona la distancia Euclidiana desde el centro del elipsoide del grupo HC (conjunto de sujetos sanos). Teniendo en cuenta los valores de referencia (mediana) para el conjunto de sujetos sanos, $\overline{T_{av}}$, $\overline{AUC_{ni}}$, $\overline{AP_{ni}}$

$$Dv_i = \sqrt{\left(\frac{T_{av} - \overline{T_{av}}}{\overline{T_{av}}}\right)^2 + \left(\frac{AUC_{ni} - \overline{AUC_{ni}}}{\overline{AUC_{ni}}}\right)^2 + \left(\frac{AP_{ni} - \overline{AP_{ni}}}{\overline{AP_{ni}}}\right)^2} \text{ Ecuación 7}$$

3.6.2 Representación gráfica de los parámetros

Los datos del análisis multiparamétrico (AUC_n , AP_n y T_{ave}) se representaron utilizando gráficos X, X/Y o X/Y/Z (es decir, gráficos mono, bi o tridimensionales), donde X, Y y Z pueden ser cualquiera de estos parámetros. Cada sujeto de control y cada punto de tiempo del paciente (p. ej., diagnóstico inicial, postratamiento) se representaron mediante un punto en un gráfico tridimensional con AUC_n , AP_n y T_{ave} como coordenadas cartesianas. Los sujetos sanos considerados como controles delimitan la región correspondiente a la ausencia de enfermedad, que puede representarse por un elipsoide con un centroide ubicado en la media de cada uno de estos parámetros ($\overline{AUC_n}$, $\overline{AP_n}$, $\overline{T_{ave}}$) con la desviación estándar de cada parámetro (σAUC_n , σAP_n y σT_{ave}) que define los límites del elipsoide. La ubicación de cada paciente en un cierto punto de tiempo en relación con el conjunto de controles, dentro o fuera de la región de control o elipsoide de "ausencia de enfermedad", proporciona información sobre el estado de salud de ese paciente en ese momento. Esto puede cuantificarse calculando la distancia euclidiana de cada punto de tiempo del paciente al centro del elipsoide de control, el d-valor, tomando como referencia los valores promedio de los parámetros para el grupo de control sin evidencia de enfermedad (NED):

$$d = \sqrt{\sum_{i=1}^3 \left(\frac{X_i - \bar{X}}{\bar{X}} \right)^2} = \sqrt{\left(\frac{AUC_n - \overline{AUC_n}}{\overline{AUC_n}} \right)^2 + \left(\frac{T_{ave} - \overline{T_{ave}}}{\overline{T_{ave}}} \right)^2 + \left(\frac{AP_n - \overline{AP_n}}{\overline{AP_n}} \right)^2} \quad \text{Ecuación 8}$$

donde X_i son los diferentes valores de los tres parámetros (AUC_n / AP_n / T_{ave}) para un paciente determinado en un momento determinado. Para evitar cualquier sesgo hacia cualquier parámetro dado, el d-valor se calculó normalizando cada uno de los tres parámetros por cada media, respectivamente.

3.7. Análisis estadístico de los parámetros

Tras la obtención de los parámetros del termograma, es preciso analizar su potencial como indicadores diagnósticos y de monitorización de pacientes. En primer lugar, se analiza la capacidad diagnóstica de cada uno de los parámetros y posteriormente, se desarrolla un modelo estadístico en el que se recogen de forma global los parámetros de forma que sea posible: 1/ Agruparlos en un único parámetro que informe del diagnóstico; 2/ Aumentar la potencia diagnóstica de la técnica TLB.

3.7.1 Análisis estadístico

Dada la complejidad del análisis estadístico requerido para el estudio de los datos obtenidos, esta parte de creación de un modelo estadístico que pudiera diferenciar entre pacientes con cáncer de pulmón y controles sanos fue realizada por un especialista estadístico.

El objetivo principal en este trabajo es construir un indicador óptimo derivado de TLB que muestre una fuerte correlación con la condición del cáncer de pulmón que podría emplearse como una herramienta clínica para la evaluación del cáncer de pulmón. Ese indicador se debía construir utilizando el conjunto de datos multiparamétrico introducido anteriormente, y se consideraron tres modelos predictivos diferentes, pero relacionados, cada uno con un conjunto de variables base diferente: el modelo 1 basado en T_{av} , G_1 , AUC_{ni} y AP_{ni} ; modelo 2 basado en Dv_i ; y modelo 3 basado en los 14 parámetros.

Debido a que tenemos que predecir una variable binaria, el GLM binomial se convierte en una herramienta adecuada para estimar una regresión logística con el resultado de la probabilidad de ausencia de cáncer de pulmón (es decir, sujeto sano) de acuerdo con un termograma TLB dado.

Estos tres modelos diferentes se desarrollaron para abordar el problema de la construcción de un indicador de predicción o clasificación para el cáncer de

pulmón basada en los parámetros derivados de TLB. De hecho, ese indicador representará la probabilidad de que un sujeto sea clasificado como sano/enfermo según los parámetros derivados de TLB dados (sano si el termograma TLB no está alterado, enfermo si el termograma TLB está alterado). Esos modelos se elaboraron utilizando modelos lineales generalizados binomiales (GLM) con modelos de enlace *logit*, ya que esta herramienta superó a otras herramientas estadísticas en la discriminación de sujetos sanos y enfermos. Esta probabilidad se puede interpretar de manera directa como la probabilidad de que el individuo con dicho termograma TLB esté libre de cáncer de pulmón y, por lo tanto, esa probabilidad se puede utilizar como criterio de diagnóstico.

La única diferencia entre los tres GLMs consiste en el conjunto de parámetros TLB individuales considerados: 1) el modelo 1 emplea T_{av} , G_1 , AUC_{ni} y AP_{ni} ; 2) el modelo 2 emplea Dv_i y 3) el modelo 3 emplea los 14 parámetros.

Por lo tanto, en cada uno de los tres GLM, se emplea un conjunto dado de parámetros derivados de TLB, $\{p_k\}$, se emplea, y el indicador de probabilidad de sano, PS, de un individuo con un termograma determinado (es decir, con parámetros derivados de TLB dados $\{p_k\}$) está dado por lo siguiente:

$$PS = P(\text{healthy}|\{p_i\}) = \frac{e^{\mu(\{p_k\})}}{1 + e^{\mu(\{p_k\})}}$$

donde μ es una función lineal de los parámetros derivados de TLB:

$$\mu(\{p_k\}) = a_0 + \sum_{k=1} a_k p_k$$

Además, los coeficientes $\{a_k\}$ se estiman de manera óptima mediante un estimador de máxima verosimilitud, que a su vez utiliza un algoritmo iterativo de mínimos cuadrados ponderado o el método de Newton (229). Esta probabilidad puede interpretarse directamente como la probabilidad de que el individuo con un termograma TLB esté libre de cáncer de pulmón y, por lo tanto, esa probabilidad

puede usarse como criterio de diagnóstico. Este indicador de PS basada en parámetros derivados de TLB clasifica a los individuos como sujetos sanos (resultado negativo, $PS > 0.5$) y enfermos (resultado positivo, $PS < 0.5$).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 RESULTADOS MELANOMA

Se realiza primero un estudio descriptivo de la muestra para conocer las características tanto demográficas como clínicas de los sujetos del estudio.

	Controles sanos (n=36)	Controles con melanoma (n=8)	Pacientes con melanoma (n=10)
Edad ± Ds	34 ± 11	51 ± 10	51 ± 15
Sexo			
Hombres	19 (53%)	4 (54%)	4 (40%)
Mujeres	17 (47%)	4 (46%)	8 (60%)
Etnia			
Caucásicos	22 (61%)	7 (87%)	10 (100%)
Negros	13 (36%)	1 (13%)	
Hispánicos	1 (3%)		
Total de muestras	36	13	62
Melanma			
NED*	—	8 (100%)	7 (70%)
Enfermedad activa		—	3 (30%)
Tratamiento durante estudio		—	10 (100%)

Tabla 4.1: características demográficas y situación clínica de los participantes del estudio

(*No Evidencia de Enfermedad).

A continuación, se ofrece una tabla con las características y valores de las muestras obtenidas de cada paciente.

Paciente	Edad	Sexo	Estadio	Nº de muestra	Días del diagnóstico	Estado tratamiento	Estado enfermedad	Determinación estado enfermedad ¹
1	25	F	3a	1	69	Pre-Tto	NED	Quirúrgico (69)
				2	110	En-Tto	NED	Clínico (0)
				3	138	En-Tto	NED	Clínico (0)
				4	192	En-Tto	NED	Radiológico (34)
				5	220	En-Tto	NED	Clínico (0)
				6	282	Post-Tto	NED	Radiológico (8)
2	57	F	2c	1	114	Pre-Tto	NED	
				2	171	Pre-Tto	NED	
				3	199	En-Tto	NED	
				4	233	En-Tto	NED	Radiológico (0)
				5	288	En-Tto	NED	
				6	315	Post-Tto	NED	Radiológico (5)
3	41	F	3a	1	150	Pre-Tto	NED	
				2	198	En-Tto	NED	
				3	228	En-Tto	NED	
				4	255	En-Tto	NED	Radiológico (0)
				5	283	En-Tto	NED	
				6	310	En-Tto	NED	
				7	338	Post-Tto	NED	Radiológico (5)
				8	420	Post-Tto	NED	Radiológico (0)

Paciente	Edad	Sexo	Estadio	Nº de muestra	Días del diagnóstico	Estado tratamiento	Estado enfermedad	Determinación estado enfermedad ¹
4	57	M	2b	1	55	Pre-Tto	NED	
				2	82	Pre-Tto	NED	
				3	110	En-Tto	NED	
				4	137	En-Tto	NED	
				5	164	En-Tto	NED	Radiológico (0)
				6	192	En-Tto	NED	
				7	219	En-Tto	NED	
				8	247	Post-Tto	NED	Radiológico (8)
5	35	F	2b	1	86	Pre-Tto	NED	
				2	107	Pre-Tto	NED	
				3	134	En-Tto	NED	
				4	278	Post-Tto	NED	Radiológico (1)
				5	367	Post-Tto	NED	Radiológico (0)
				6	535	Post-Tto	NED	Radiológico (0)
				7	617	Post-Tto	NED	Radiológico (0)
				8	706	Post-Tto	NED	Radiológico (0)
6	43	M	4	1	83	Pre-Tto	Active	
				2	104	Pre-Tto	Active	
				3	124	En-Tto	Active	
				4	158	En-Tto	Active	Radiológico (6)

Paciente	Edad	Sexo	Estadio	Nº de muestra	Días del diagnóstico	Estado tratamiento	Estado enfermedad	Determinación estado enfermedad ¹
7	55	M	3b	1	35	Pre-Tto	NED	
				2	144	En-Tto	NED	
				3	199	En-Tto	NED	
				4	226	Post-Tto	NED	
				5	240	Post-Tto	Progression (Stage 4)	Quirúrgico (9)
8	71	F	3a	1	54	Pre-Tto	NED	
				2	88	En-Tto	NED	
				3	116	En-Tto	NED	Clínico (0)
				4	143	Post-Tto	Progression (Stage 2)	Radiológico (1)
				5	164	Pre-Tto	Active	
				6	199	En-Tto	Active	Clínico (0)
9	76	F	2c	1	262	Post-Tto	NED	Radiológico (4)
				2	427	Post-Tto	NED	Radiológico (20)
				3	511	Post-Tto	NED	Radiológico (0)
				4	615	Post-Tto	NED	Radiológico (-1)
				5	724	Post-Tto	NED	Radiológico (0)
				6	828	Post-Tto	NED	

Paciente	Edad	Sexo	Estadio	Nº de muestra	Días del diagnóstico	Estado tratamiento	Estado enfermedad	Determinación estado enfermedad ¹
10	52	M	2c	1	99	Pre-Tto	NED	
				2	182	En-Tto	NED	Radiológico (0)
				3	236	En-Tto	NED	Radiológico (0)
				4	431	Post-Tto	NED	Radiológico (0)
				5	513	Post-Tto	NED	Radiológico (0)
				6	595	Post-Tto	NED	Radiológico (0)

Tabla 4.2: Información clínica de los pacientes con melanoma en seguimiento.

NED: No evidencia de enfermedad. Tto: tratamiento

¹: Los valores entre paréntesis indican la cantidad de días relativos a la recolección de muestras. Esto proporciona una referencia para el momento en que se realizó la evaluación clínica con respecto a cuándo se recolectó la muestra en la clínica. Los números positivos indican que la determinación del estado de la enfermedad se realizó antes de la recolección de la muestra y los valores negativos indican que la determinación se realizó después de la recolección de la muestra.

4.1.2- Deconvolución de termogramas de plasma

Según los datos publicados en un trabajo anterior del grupo de investigación, Vega S et al (67), donde se describe un nuevo enfoque de análisis multiparamétrico que aplica el ajuste logístico máximo a los termogramas de suero obtenidos de sujetos sanos y pacientes con cáncer gástrico para la clasificación de pacientes.

En el presente trabajo, el manejo de la muestra fue ligeramente diferente, tal como se describe en el apartado de materiales y métodos (previamente a la dilución de la muestra antes de medirla en el DSC, se realizó una diálisis de la muestra). Los termogramas del presente estudio requieren cuatro curvas componentes para

reproducir el termograma global. La figura (4.1) muestra un ejemplo de las diferencias entre las formas del termograma de un sujeto sano y un paciente con melanoma (que corresponde a la Muestra 1 del paciente 8 de este estudio). Las transiciones individuales que componen la curva global (obtenidas tras su deconvolución), reflejan cambios importantes entre los grupos sanos y los grupos de melanoma donde se observaron cambios en la altura, el centro y el ancho de cada transición.

Esta deconvolución del termograma experimental permite la determinación de todos los parámetros para el análisis multiparamétrico: A_i , $T_{c,i}$, w_i , AUC_n , AP_n y T_{ave}

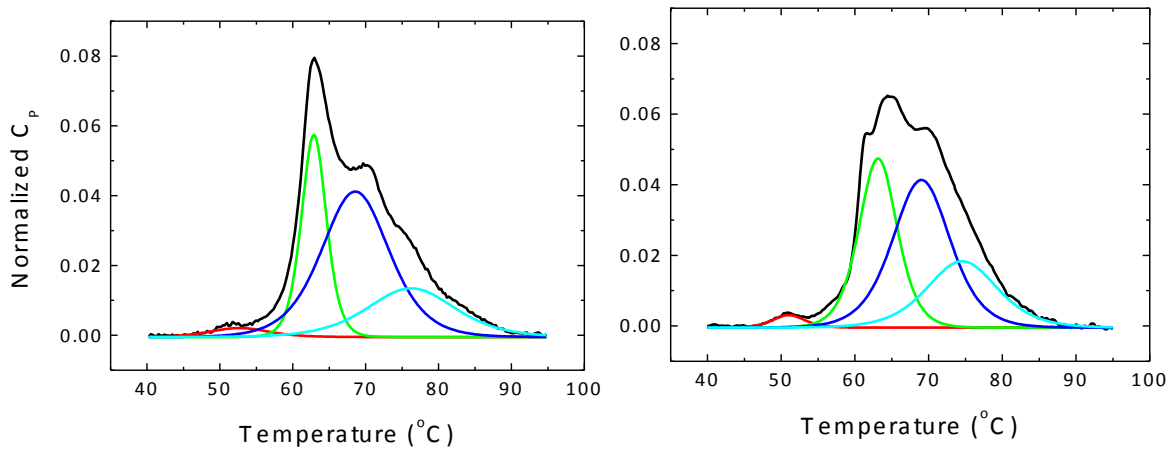


Figura 4.1: termogramas de plasma de un sujeto sano (izquierda) y un paciente con melanoma (derecha). Los termogramas experimentales se muestran mediante las líneas negras en cada panel (CP se ha normalizado, de tal manera que el área total debajo del termograma es 1). La deconvolución del termograma global se muestra mediante los cuatro componentes (líneas roja, verde, azul y cian).

4.1.3 Características de las muestras de control

Se han analizado el plasma de 36 sujetos sanos (controles) y de 8 pacientes que habían completado con éxito el tratamiento quirúrgico para su melanoma y se demostró mediante una evaluación clínica continuada que no existía evidencia de enfermedad (NED) (controles de melanoma, MC) (Figura 4.2) No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los grupos según los

valores de AUC_n , AP_n y T_{ave} (Figura 4.2). Esto muestra que no hay diferencias discernibles entre los termogramas DSC de los controles sanos y los pacientes con melanoma que no tienen evidencia de enfermedad. Esta es una observación clave para validar DSC como un enfoque útil para el seguimiento de pacientes con melanoma.

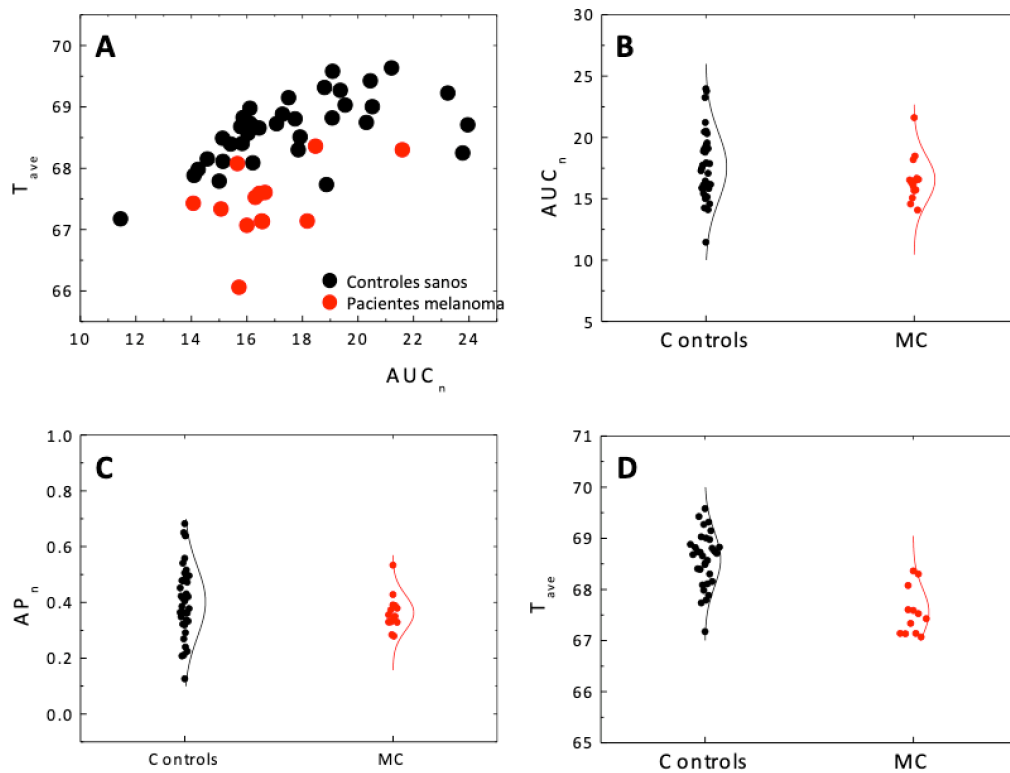


Figura 4.2: Datos multiparamétricos obtenidos de termogramas de plasma para controles sanos y controles de melanoma (MC). (Panel A) Valores para T_{ave} representados como una función de AUC_n para controles sanos (círculos negros) y controles de melanoma (MC) (círculos rojos). Curvas de distribución correspondientes a los valores medios y las desviaciones estándar para AUC_n (Panel B), AP_n (Panel C) y T_{ave} (Panel D).

4.1.4 Gráficos tridimensionales: elipsoide de control y distribución de distancia de pacientes con melanoma

Cuando se representan los valores de AUC_n , T_{ave} y AP_n como coordenadas cartesianas en un gráfico tridimensional (Figura 4.3), se puede observar una región bien definida correspondiente al grupo de controles sanos y pacientes de melanoma.

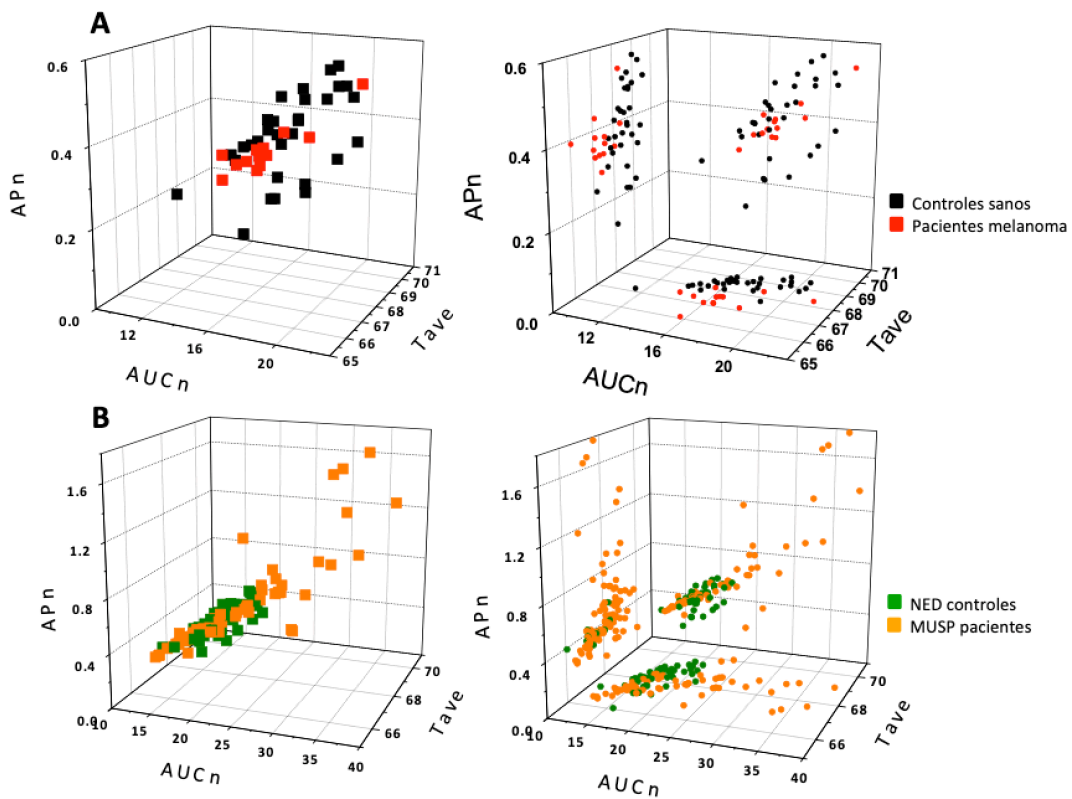


Figura 4.3. (A) Valores de AUC_n , T_{ave} y AP_n a partir de termogramas de plasma de controles sanos (cuadrados negros) y controles de melanoma (cuadrados rojos) en una gráfica tridimensional cartesiana (representación XYZ, izquierda y proyecciones XYZ, derecha). (B) parámetros AUC_n , T_{ave} y AP_n a partir de termogramas de plasma de controles NED (cuadrados verdes) y pacientes con melanoma bajo seguimiento (cuadrados anaranjados) en una gráfica tridimensional cartesiana (representación XYZ, izquierda y proyecciones XYZ, derecha).

Se obtuvieron los datos de los termogramas de 10 pacientes con melanoma en diferentes momentos (Tablas 4.1 y 4.2), con un total de 63 termogramas. Cada cuadrado naranja corresponde al termograma de un paciente dado en un cierto punto de tiempo.

La estrecha coincidencia entre controles sanos y controles de melanoma define una región en el gráfico tridimensional que denominamos "sin evidencia de enfermedad" (NED), que es la región de referencia cuando se comparan los valores obtenidos para pacientes con melanoma en seguimiento. Esta región puede ser representada por un elipsoide centrado en \overline{AUCn} , \overline{APn} , \overline{Tave} , con límites definidos por σ_{AUCn} , σ_{APn} , σ_{Tave} .

Se recogieron muestras de plasma de 10 pacientes con melanoma en sus consultas programadas de seguimiento oncológico. Se analizaron entre cuatro y ocho muestras por paciente. La Figura 4.3B muestra todos los datos de esas mediciones (63 en total).

En comparación con la Figura 4.3A, se puede observar en la Figura 4.3B que algunos termogramas de pacientes con melanoma están ubicados dentro del elipsoide de control (es decir, en la región NED), pero algunos termogramas caen fuera de este elipsoide. El objetivo de este estudio es desarrollar un enfoque simple y útil para monitorizar pacientes y rastrear su estado de enfermedad. Desde un punto de vista práctico y de fácil comprensión, sería conveniente utilizar un solo dato con el que se pudiese evaluar el estado de la enfermedad. Calculamos la distancia de un termograma dado a la región NED y probó la utilidad de este parámetro para evaluar el estado clínico de los pacientes de melanoma en este estudio.

4.1.5 El d-valor: la distancia de un termograma hasta la región NED

Definimos el d-valor como la distancia euclidiana entre la ubicación de un termograma de un paciente (usando AUC_n , AP_n y T_{ave} como coordenadas cartesianas) para el centroide del elipsoide de control o la región NED (esta parte se ha explicado en material y métodos). Debido a que los valores de los tres parámetros son de diferente magnitud, el d-valor se calculó mediante la normalización de los valores de cada parámetro. (ver Ecuación 7 en materiales y métodos)

La Figura 4.4 muestra una comparación entre los d-valor de diferentes grupos de sujetos. El grupo control saludable (controles) y el grupo control de melanoma (MC) se han agrupado en los controles "sin evidencia de enfermedad" (controles NED), que es un grupo muy homogéneo.

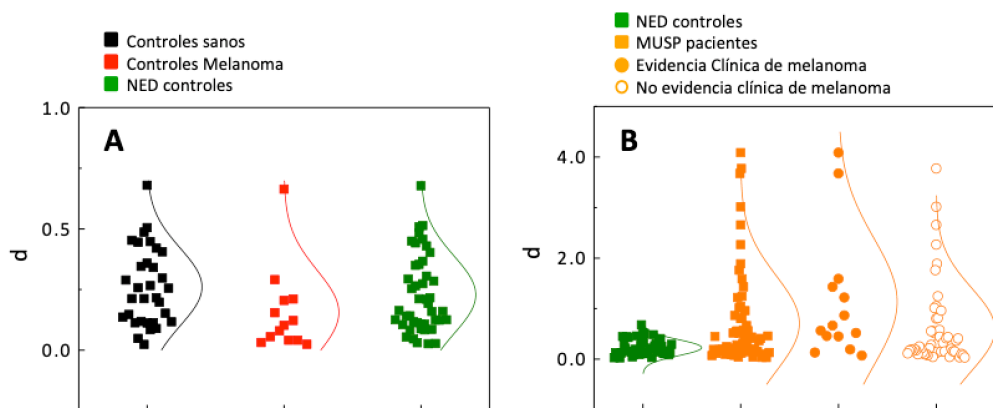


Figura 4.4. d-valor de todos los termogramas de plasma en este estudio. (Panel izquierdo) Vista ampliada para los d-valor para controles sanos (cuadrados negros), controles de melanoma (MC, cuadrados rojos) y controles sanos y de melanoma agrupados como controles NED (cuadrados verdes). No hay diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre ambos grupos (controles sanos y MC). (Panel derecho) d-valores para controles NED (cuadrados verdes), pacientes de melanoma bajo seguimiento (MUSP) (cuadrados anaranjados) y los subgrupos MUSP, pacientes con enfermedad activa confirmados por diagnóstico clínico o radiológico (círculos rellenos de color

naranja) y pacientes determinados clínicamente o radiológicamente para no tener evidencia de enfermedad (círculos anaranjados abiertos). En el panel izquierdo, los d-valor se han calculado considerando el valor promedio de los parámetros dentro del grupo correspondiente. En el panel derecho, los d-valor para el grupo MUSP (cuadrados naranjas) se han calculado considerando el valor promedio de los parámetros para el grupo de control NED.

No hay diferencias estadísticamente significativas entre los sujetos sanos (controles) y los pacientes con melanoma ($p > 0.05$) que se determinó clínicamente que no tenían evidencia de enfermedad (controles de melanoma, MC). Los sujetos sanos y los controles de melanoma se agruparon en el grupo sin evidencia de enfermedad (control NED) (Figura 4.4, panel izquierdo).

Los d-valor para los termogramas de pacientes con melanoma en seguimiento durante su tratamiento se compararon con el grupo de control NED. Los termogramas de pacientes con enfermedad activa en el momento de la toma de muestra de plasma se caracterizan por presentar un d-valor que son más altos que los del grupo de control NED. Se puede definir una región NED o un umbral de d-valor a partir del valor d medio para el grupo de control NED y su desviación estándar (Figuras 4.5, 4.7 y 4.9). Los d-valor para los termogramas de pacientes con designaciones de estado NED son similares a los del grupo de control NED. De acuerdo con las Figuras 4.5, 4.7 y 4.9, los d-valor no exceden 5; hay 11 muestras con d-valor significativamente superiores a la región del grupo de control (definido como el valor de control promedio más el doble de su desviación estándar); 12 muestras con valores d alrededor del umbral del grupo de control; y el resto (40 muestras) tienen d-valor dentro de la región del grupo de control, y típicamente alrededor del umbral.

Al examinar los datos clínicos de los 11 termogramas en el grupo MUSP con un alto d-valor, 4 de estos 11 termogramas correspondieron a muestras de plasma recogidas al comienzo del seguimiento del paciente donde los pacientes se habían sometido recientemente a cirugía o acababan de iniciar el tratamiento adyuvante. Esto podría explicar por qué estas muestras aún exhiben d-valor en desacuerdo con el estado clínico de NED: el estado metabólico del plasma sanguíneo puede que no se hubiese restablecido del estado previo al cáncer. Otras cuatro muestras de

los 11 termogramas con d-valor altos correspondieron a la recidiva de la enfermedad; algunas de estas muestras mostraron una indicación temprana de recidiva de la enfermedad (Paciente 7, muestras 4-5, y Paciente 8, muestras 3-4). Solo para una muestra de pacientes, la muestra 4 del Paciente 9, el d-valor está por encima de 1 y no concuerda con la evaluación clínica, pero en visitas posteriores el d-valor vuelve a entrar en la región NED.

En general, esto sugiere potencialmente que el termograma DSC fue capaz de detectar alteraciones metabólicas en el plasma sanguíneo asociadas con la recurrencia antes de que el tumor adquiriera un tamaño detectable para la determinación clínica.

4.1.6 Uso de los termogramas mediante DSC para la monitorización de pacientes con melanoma (10 pacientes)

La utilidad de DSC para la monitorización del paciente radicaría en la capacidad de DSC para rastrear el estado clínico de un paciente de forma personalizada. El análisis del termograma y los resultados clínicos obtenidos para cada caso brindan información relevante sobre la capacidad del DSC para detectar enfermedades, la comparación entre el umbral para detectar enfermedades usando técnicas de diagnóstico por imagen y termogramas DSC, y el acuerdo entre ambas pruebas de seguimiento.

Los diez pacientes MUSP se dividieron en tres categorías diferentes según el estado de la enfermedad, el tratamiento y el d-valor correspondiente. Los cinco pacientes del caso A tuvieron resección quirúrgica de sus melanomas, recibieron terapia adyuvante y tuvieron valores de termograma que correspondían a la determinación clínica del estado de la enfermedad. Se recogieron muestras de plasma de pacientes en visitas clínicas durante un período de uno a dos años y se analizaron para este estudio.

Los pacientes del caso B se colocaron dentro del grupo de enfermedad activa. El paciente 6 tenía una enfermedad activa desde su diagnóstico inicial y durante el tratamiento. Los pacientes 7 y 8 fueron colocados inicialmente en terapia adyuvante después de la resección quirúrgica de sus melanomas, pero tuvieron recurrencia de la enfermedad. El paciente 8 se cambió a un régimen de tratamiento alternativo.

El último grupo de pacientes, el Caso C, tuvo resultados discordantes con su estado clínico: clínicamente los pacientes son como el Caso A, pero los resultados del termograma fueron discordantes con la evaluación clínica.

4.1.7- Caso A: no evidencia de enfermedad (NED) de acuerdo con la valoración clínica y mediante termogramas de DSC

Este grupo comprendía pacientes con melanoma en etapa 2 o 3 considerados clínicamente como que no tenían evidencia de enfermedad después de la resección quirúrgica de sus melanomas seguida de quimioterapia adyuvante. Para cada paciente, entre 6 y 8 muestras de plasma fueron analizadas por DSC en diferentes puntos de tiempo que abarcan antes, durante y después de la quimioterapia en un período de uno a dos años (Figura 4.5). Comparando los termogramas durante y después de la quimioterapia, se observa que los termogramas no se vieron afectados por la terapia. Cabe señalar que se determinó un estado inicial de NED después de la resección clínica de los melanomas y se mantuvo como el estado clínico durante las rondas iniciales de quimioterapia. Esto no fue confirmado por la evaluación por imágenes hasta la segunda o tercera ronda de quimioterapia o en el post-tratamiento (como se indica en la Tabla 4.2). En el momento de la última muestra, ninguno de los cuatro pacientes exhibió ninguna recurrencia de melanoma.

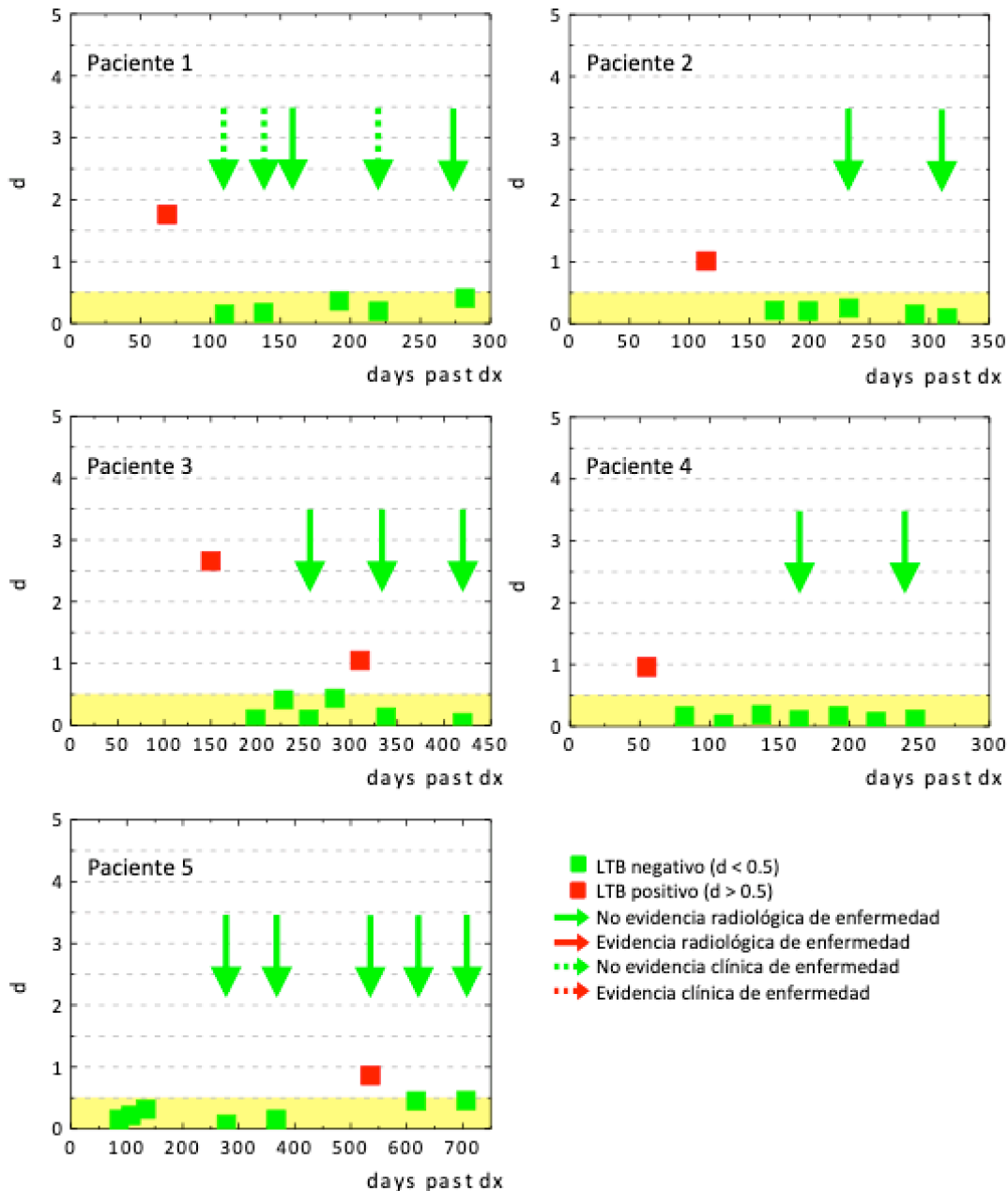


Figura 4.5: Comparación longitudinal de los resultados del termograma y las evaluaciones clínicas de muestras de plasma MUSP. Los cuadrados corresponden a los d-valor de cada termograma DSC de la muestra recogida en un momento determinado después del diagnóstico. Los cuadrados verdes indican un resultado negativo de TLB, es decir, dentro de la región de d-valor NED (valor medio del grupo de control NED más dos veces la desviación estándar, sombreado amarillo) y los cuadrados rojos indican un resultado TLB positivo, es decir, fuera de esta área. Las flechas corresponden a la evaluación clínica realizada en un momento determinado después del diagnóstico. Las flechas sólidas representan una evaluación radiológica y las flechas discontinuas representan una evaluación clínica. Las flechas verdes o rojas representan NED o enfermedad activa, respectivamente.

No todas las muestras de termograma de DSC se han comparado con la evaluación clínica. Las evaluaciones clínicas y termogramas proporcionaron resultados idénticos en todas las muestras, excepto una discrepancia menor en el paciente 5 (muestra 6, pero el d-valor es inferior a 1) (Figura 4.5).

Se realizaron unas tablas de contingencia para la evaluación clínica y los resultados DSC se muestran en la (Figura 4.7). Además, los pocos d-valor encontrados fuera de la región de control NED corresponden principalmente al primer termograma inicial en un paciente, es decir, muestra inicial después de la resección quirúrgica. La interpretación de estos resultados es que podría haber un estado alterado residual como resultado de la enfermedad después de una resección quirúrgica que podría no ser clínicamente detectable, pero que podría reflejarse en un estado metabólico alterado del plasma sanguíneo. Esto podría ser una consecuencia de la alta sensibilidad del termograma de DSC para detectar alteraciones en la composición e interacciones en el plasma sanguíneo. Debido a que es una prueba mínimamente invasiva, el termograma DSC se puede prescribir tantas veces como lo requiera el médico durante el seguimiento del paciente para evaluar cuándo el estado metabólico del plasma sanguíneo vuelve a un perfil normal / saludable después del tratamiento clínico. Por lo tanto, cada vez que un resultado de termograma DSC proporciona un resultado positivo para la recurrencia del melanoma, los termogramas posteriores realizados en un tiempo cercano a esta muestra se pueden utilizar para confirmar una recurrencia.

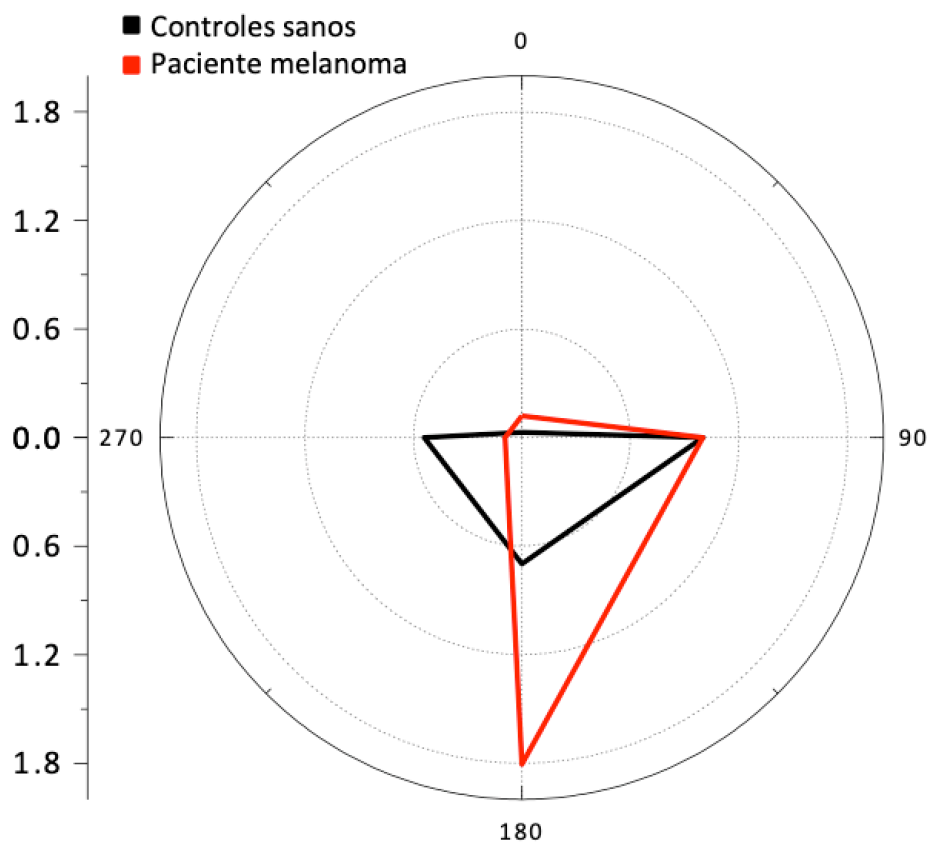


Figura 4.6. Polígono para los valores normalizados de $A_{i, n}$ (altura de los cuatro componentes diferentes en los que se desconvoluciona el termograma de acuerdo con la ecuación 1 descrita en material y métodos). Se muestran los valores de los parámetros de dos sujetos: sujeto sano (negro) y un paciente con melanoma (rojo), correspondientes a los que se muestran en la Figura 4.1. El área de la región delimitada por el polígono se llama AP_n (Ecuación 4 descrita en material y métodos).

4.1.8 Caso B: pacientes con enfermedad activa de Melanoma de acuerdo con valoración clínicas y mediante termogramas de DSC.

Estos pacientes tenían enfermedad activa durante el período de seguimiento (Figura 4.7). Es importante señalar que el paciente 6 tenía un estado de enfermedad activo al comienzo del tratamiento, mientras que los pacientes 7 y 8

tenían un estado inicial de enfermedad NED. Además, el paciente 8 se colocó inicialmente en quimioterapia adyuvante, pero se cambió a terapias alternativas debido a la metástasis más adelante en el tratamiento.

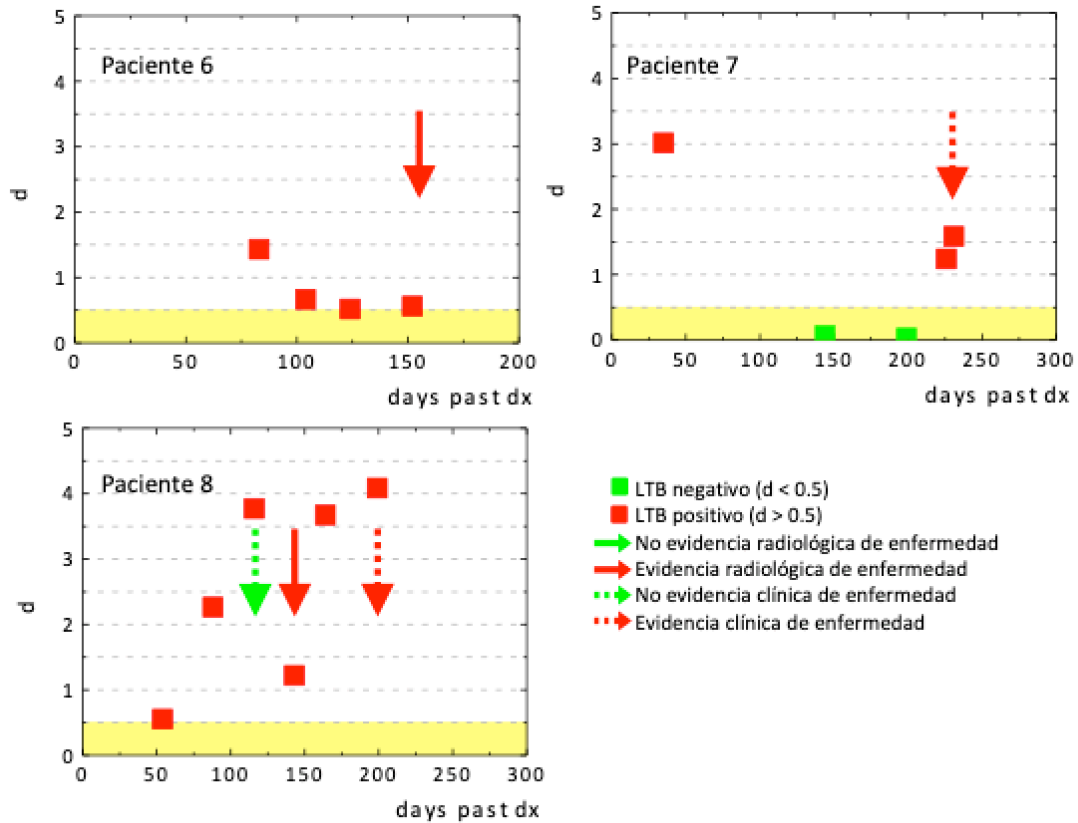


Figura 4.7: Comparación longitudinal de los resultados del termograma y las evaluaciones clínicas de muestras de plasma MUSP. Los cuadrados corresponden a los d-valor de cada termograma DSC de la muestra recogida en un momento determinado después del diagnóstico. Los cuadrados verdes indican el resultado de TLB negativo, es decir, dentro de la región de d-valor NED (valor medio del grupo de control NED más el doble de la desviación estándar, sombreado amarillo) y los cuadrados rojos indican resultado de TLB positivo, es decir, fuera de esta área. Las flechas corresponden a la evaluación clínica realizada en un momento determinado después del diagnóstico. Las flechas sólidas representan una evaluación radiológica y las flechas discontinuas representan una evaluación clínica. Las flechas verdes o rojas representan NED o enfermedad activa, respectivamente.

Los resultados muestran que el análisis de DSC detecta la enfermedad del melanoma con alta sensibilidad (Figura 4.7). La única muestra donde la evaluación clínica y los resultados del termograma DSC no coinciden corresponde a la evaluación clínica no radiológica. Curiosamente, los termogramas de plasma parecen detectar la recurrencia del melanoma antes de la evaluación clínica (Figura 4.7). Para los pacientes 6 y 7 hay poca evidencia clínica a lo largo de su historial de tratamiento. Los termogramas para los pacientes 6 y 7 pudieron detectar un cambio en el estado de la enfermedad antes de la determinación clínica. Esto sugeriría que el DSC puede usarse para llenar los vacíos para evaluaciones radiológicas infrecuentes y / o exámenes clínicos en consulta que no incluyan diagnóstico por imagen. Curiosamente, para el paciente 8, la primera evaluación clínica (muestra 3) no indica enfermedad, mientras que el termograma de DSC proporciona un indicador previo de recurrencia, confirmado por una evaluación radiológica posterior.

		Evaluación clínica					Evaluación clínica				
		Caso A	+	-	Total			Caso B	+	-	Total
LTB	+		0	1	1	LTB	+	4	1	5	
	-		0	16	16		-	0	0	0	
	Total		0	17	17		Total	4	1	5	

		Evaluación clínica					Evaluación clínica				
		Caso C	+	-	Total			Global	+	-	Total
LTB	+		0	5	5	LTB	+	4	7	11	
	-		0	5	5		-	0	21	21	
	Total		0	10	10		Total	4	28	32	

Figura 4.8: Tablas de contingencia para la comparación de evaluaciones clínicas y biopsia térmica líquida (TLB) para cada caso de paciente (casos A, B y C, y datos globales). Los resultados positivos significan recurrencia del melanoma (evaluación clínica: evaluación radiológica o clínica; TLB: d-valor > 0.5, de acuerdo con el umbral del grupo de control NED), y los resultados negativos significan ausencia de recurrencia (evaluación clínica: evaluación radiológica o clínica; TLB: d-valor <0.5).

4.1.9 Caso C: resultados discordantes entre la evaluación clínicas y los termogramas de DSC

Se determinó que estos pacientes eran NED a lo largo de su seguimiento clínico y se los sometió a tratamiento de quimioterapia adyuvante. Sorprendentemente, los resultados del termograma sobreestimaron la recurrencia en estos pacientes (Figura 4.9). Para el paciente 10, los d-valor están cerca del umbral NED. Debemos tener en cuenta que, si este método se usa para la monitorización del paciente, el umbral se puede establecer de forma individual para cada paciente. Para el paciente 10, si el umbral NED se estableció un poco más alto, los resultados del termograma coincidirían con la evaluación clínica. Para el paciente 9, se encuentra un escenario similar, aunque hay una muestra con mayor discrepancia (muestra 4). Al final del período de seguimiento no se observó recurrencia del melanoma en ambos pacientes. Estos dos pacientes (9 y 10) proporcionan los resultados más discrepantes entre la evaluación clínica y el termograma DSC. Puede haber una sobreestimación de la recurrencia tumoral en DSC (en algún momento debido a la sensibilidad de la técnica, o debido a una remisión incompleta del estado metabólico alterado en el plasma), pero la prueba DSC se puede repetir sin riesgo y a bajo costo. Puede ser mejor tener falsos positivos que falsos negativos, y de acuerdo con las tablas de contingencia (Figura 4.6), no hay falsos negativos proporcionados por las pruebas DSC.

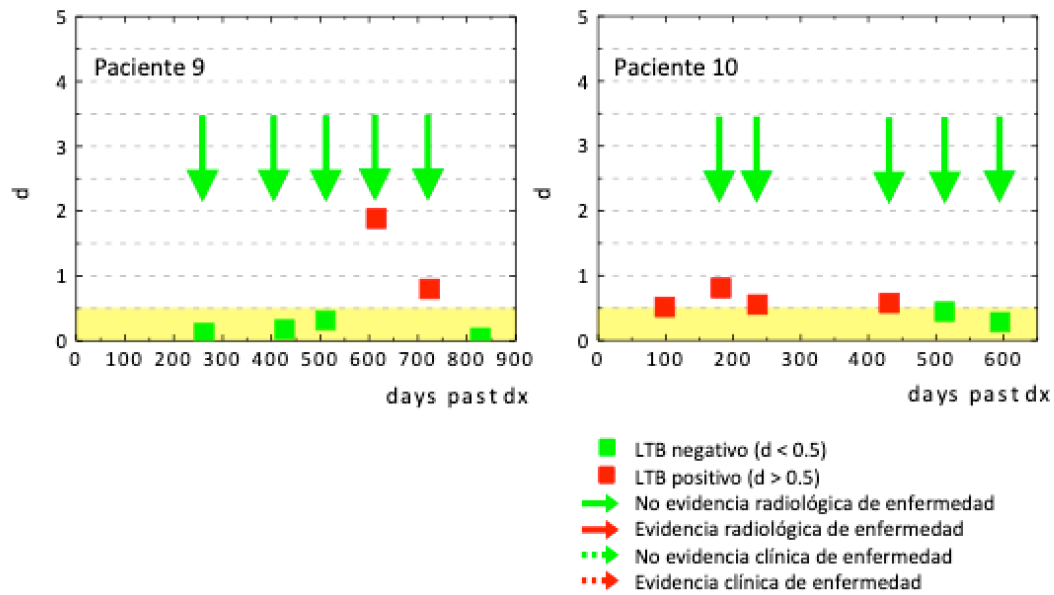


Figura 4.9: Comparación longitudinal de los resultados del termograma y las evaluaciones clínicas de muestras de plasma MUSP. Los cuadrados corresponden a los d-valor de cada termograma DSC de la muestra recogida en un momento determinado después del diagnóstico. Los cuadrados verdes indican un resultado negativo de Biopsia Térmica Líquida (TLB), es decir, dentro de la región de d-valor NED (valor medio del grupo de control NED más dos veces la desviación estándar, sombreado amarillo) y los cuadrados rojos indican un resultado TLB positivo, es decir, fuera de esta área. Las flechas corresponden a la evaluación clínica realizada en un momento determinado después del diagnóstico. Las flechas sólidas representan una evaluación radiológica y las flechas discontinuas representan una evaluación clínica. Las flechas verdes o rojas representan NED o enfermedad activa, respectivamente.

4.2 RESULTADOS EN CÁNCER DE PULMÓN

4.2.1 Descriptivo de la muestra

En primer lugar, se realizó estudio descriptivo de la muestra para conocer las características de los pacientes reclutados durante el periodo en estudio, y así poder realizar posteriormente el análisis por subgrupos.

Se obtuvieron muestras de un total de 114 pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón a lo largo del periodo estudiado.

Tal como se detalla en la Tabla 4.3, observamos que la edad media de nuestros pacientes se sitúa en los 64'6 años con una desviación media en torno a 8'3 años. En cuanto a la distribución por sexos, se aprecia que un 83% (95 sujetos) de los pacientes son hombres frente al 17% (19 sujetos) de mujeres.

Tabla 4.3: estudio descriptivo de la muestra obtenida (*QT= quimioterapia, QT/RT= quimio-radioterapia)

	Pacientes con cáncer de pulmón
Edad	64'6 ± 8'3
Sexo	
Hombres	95 (83%)
Mujeres	19 (17%)
Hábito tabáquico	
Fumador	73 (64%)
Ex fumador	33 (29%)
No fumador	8 (7%)
Histología	
Adenocarcinoma	43 (37%)
Células pequeñas	35 (30%)
Escamoso	32 (29%)
Otros	4 (4%)
Estadio	
II	6 (5%)
III	30 (27%)
IV	78 (68%)
Tratamiento	
QT paliativa	77 (68%)
QT/RT	26 (22%)
QT adyuvante	8 (7%)
QT neoadyuvante	3 (3%)
Respuesta	
Respuesta parcial	46 (40%)
Respuesta completa	11 (10%)
Enfermedad estable	19 (17%)
Progresión	15 (13%)
Exitus	23 (20%)

En cuanto a factores de riesgo asociados, se estudió la exposición al tabaco (Figura 4.10), apreciando que en nuestra muestra el 64% de los pacientes eran fumadores habituales en el momento del diagnóstico, frente a un 29% de sujetos que cumplían criterios de exfumadores en el momento del diagnóstico y un 7% del grupo que no había fumado en ningún momento. Entre el grupo de fumadores y no fumadores, la exposición al tabaco se ha calculado con un IPA (Índice Paquetes/Año) medio de 47.

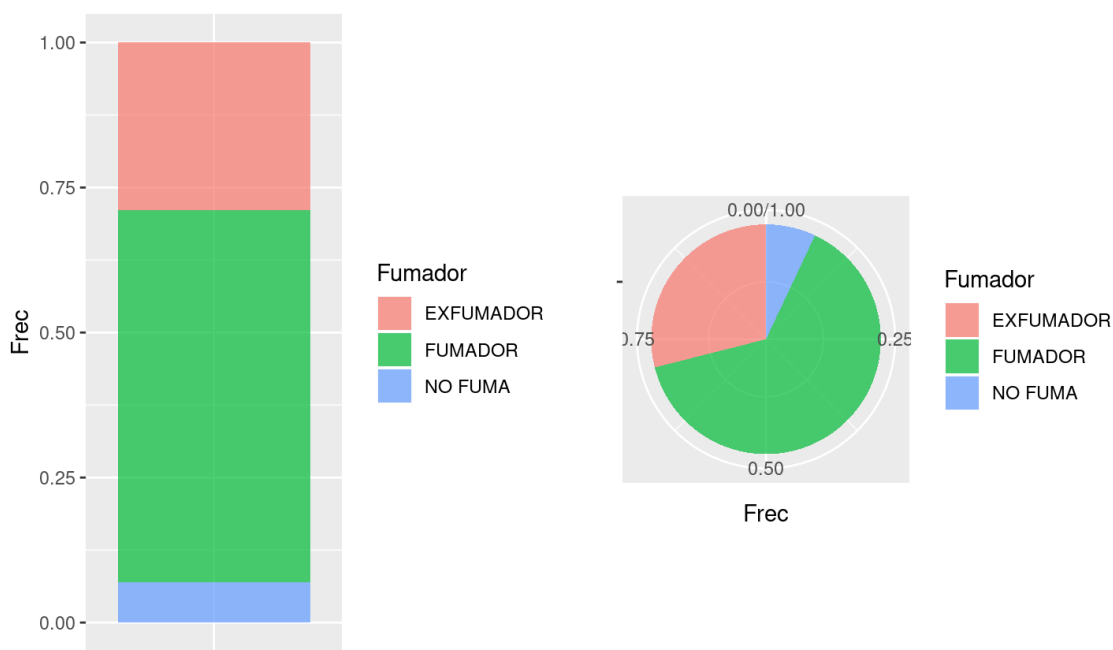


Figura 4.10: gráfica descriptiva de distribución de hábito tabáquico.

En cuanto a la distribución por sexos en pacientes fumadores (Figura 4.11, Tabla 4.4), se aprecia que en los hombres, el 63'13% eran fumadores, frente a un 34'63 de hombres que habían cesado en el hábito tabáquico y tan solo un 2'11% que no habían fumado nunca. En el caso de las mujeres, el 68'42% no eran fumadores en el momento diagnóstico, frente al 31'58% de las mismas que no habían fumado nunca (no hay caso de exfumadoras en nuestra muestra). En cuanto al porcentaje de pacientes que fuman por sexos, se aprecia que un 82'19% de los fumadores eran hombres.

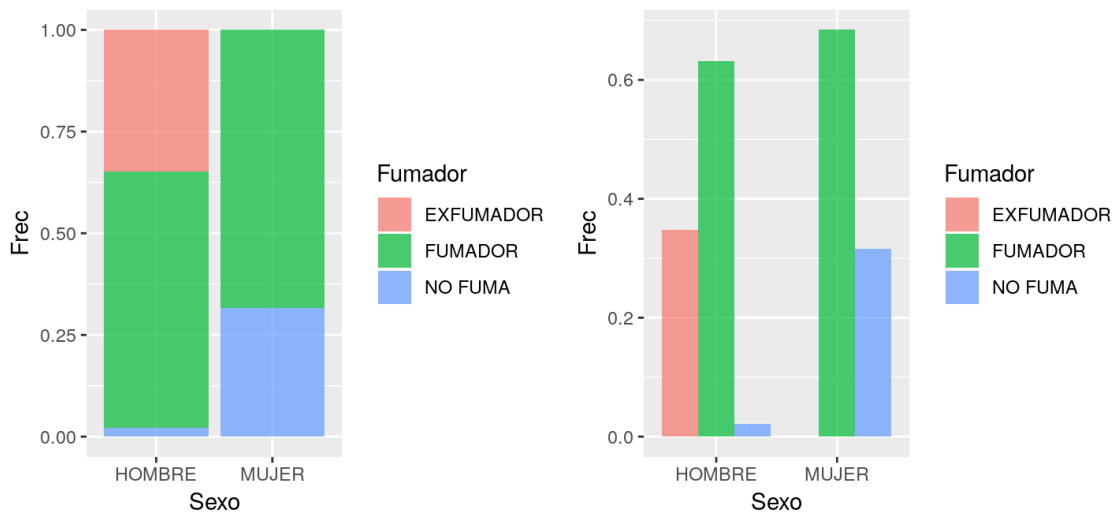


Figura 4.11: gráfica descriptiva de distribución por sexos según el hábito tabáquico.

Sexo	Ex fumador	Fumador	No fumador
Hombres	33 (34'7%)	60 (63'2%)	2 (2'1%)
Mujeres	0 (0'0%)	13 (68'4%)	6 (31'6%)

Tabla 4.4: datos de distribución por sexos según el hábito tabáquico

En cuanto a la histología (Figura 4.12), se aprecia que el tumor más frecuentemente diagnosticado fue el adenocarcinoma con un total de 43 pacientes (37% de la muestra), seguido del carcinoma de células pequeñas que se observó en 35 pacientes (30%) y del carcinoma escamoso, con 32 pacientes (29% de la muestra). Finalmente 4 pacientes obtuvieron diferentes histologías como son el pleomorfo o endocrino de células grandes, lo que constituye un 4% de la muestra total.

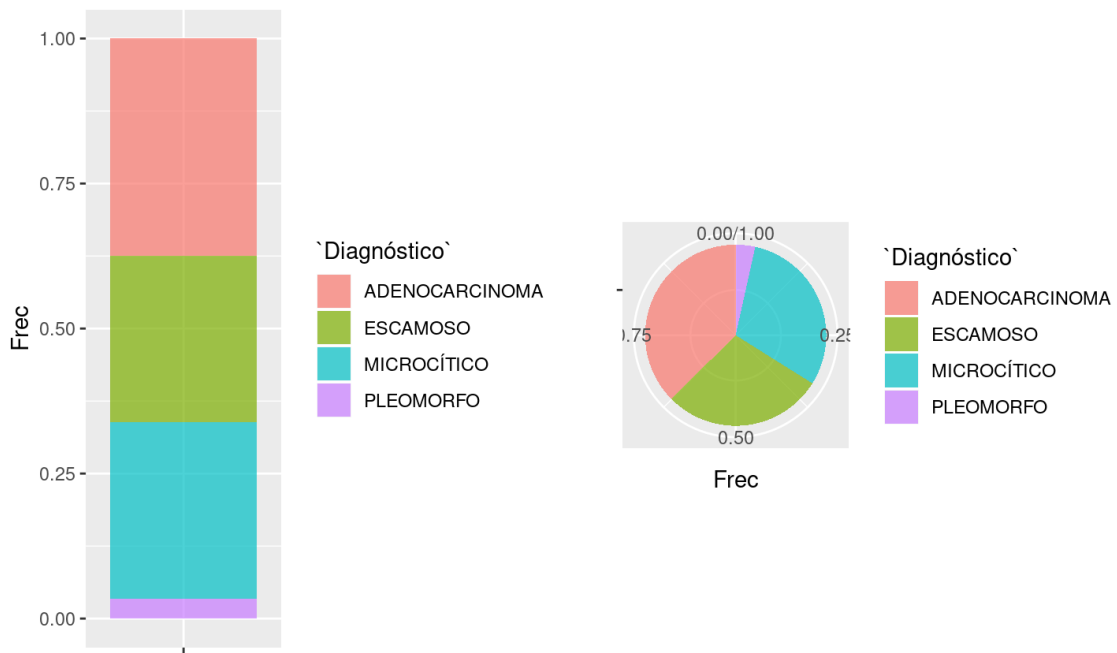


Figura 4.12: gráfica descriptiva de la distribución de pacientes según la histología tumoral.

Sexo	Adenocarcinoma	Células pequeñas	Escamoso	Otros
Hombres	34 (35'4%)	31 (33'3%)	27 (28'1%)	3 (3'1%)
Mujeres	9 (47'4%)	1 (5'3%)	8 (42'1%)	1 (5'3%)

Tabla 4.5: datos de distribución por sexos según histología.

Si atendemos a la distribución por sexos según la histología, podemos ver como tanto en hombres como mujeres el tumor mayormente diagnosticado es el adenocarcinoma (34 pacientes en los hombres y 9 en las mujeres, 35'42% y 47'37% de sus respectivos grupos) seguido del carcinoma de células pequeñas en los hombres con un 33'33% (31 pacientes) frente a las mujeres donde el segundo tumor más frecuente fue el carcinoma escamoso (8 paciente, suponiendo un 42'11%). En el caso de las mujeres solo se diagnosticó un caso de carcinoma de células pequeñas, frente a los 31 casos que se obtuvieron en el grupo de hombres.

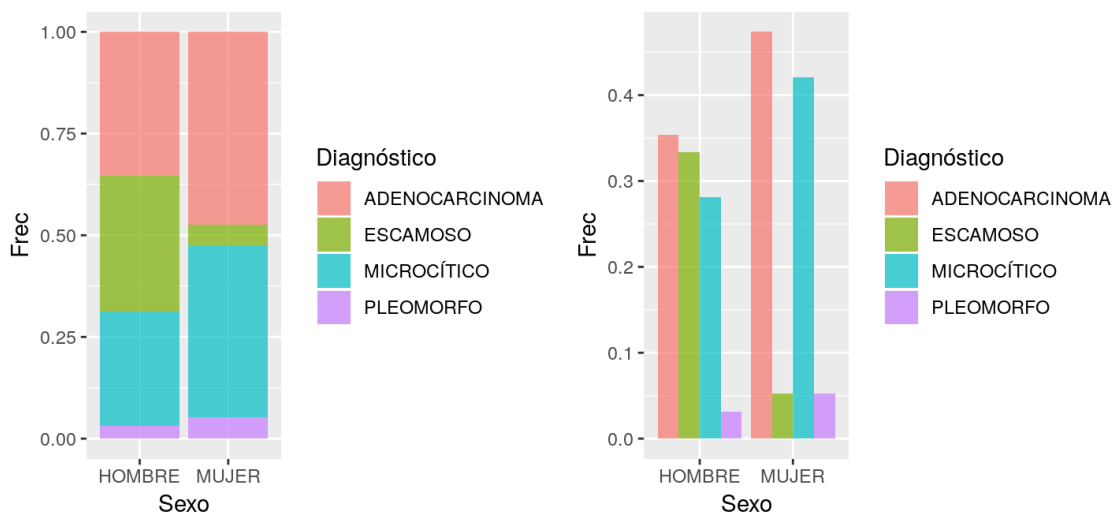


Figura 4.13: gráfica descriptiva de distribución por sexos según las diferentes histologías.

Otra variable estudiada en el grupo de pacientes recogido fue el estadio al diagnóstico de los pacientes. En nuestro estudio, dado que se trataba de pacientes visitados en la consulta de Oncología Médica, la mayoría de pacientes se diagnosticaban en estadio IV, siendo un 68% del total de la muestra (78 pacientes en total), seguido del estadio III con 30 pacientes (un 27%) y del estadio II con 6 sujetos (un 5% del total de la muestra).

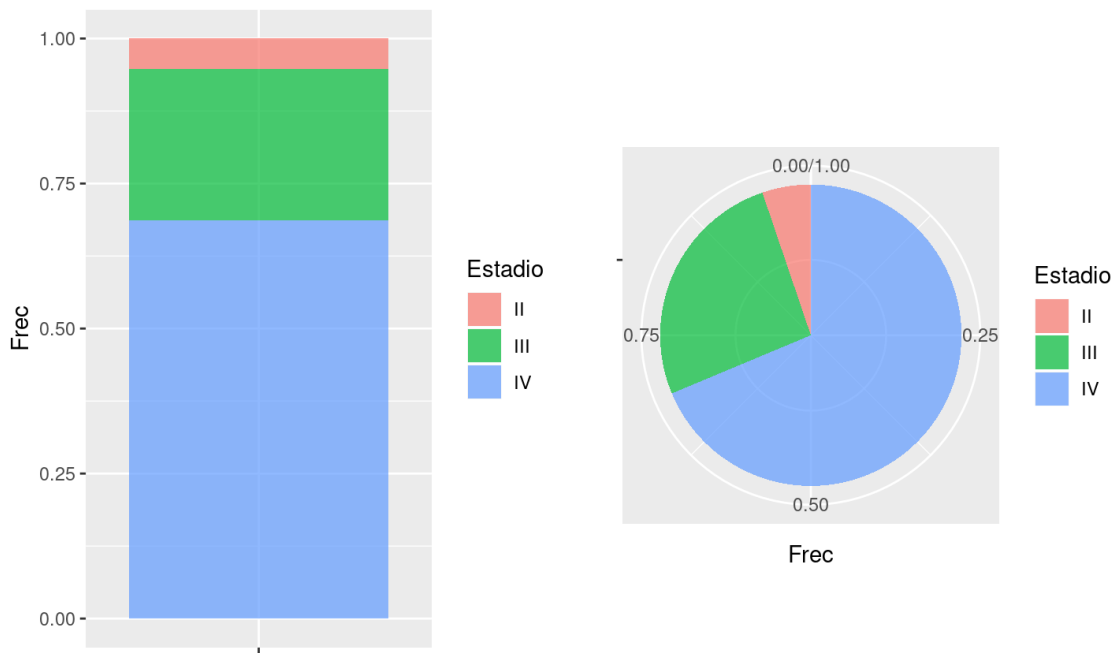


Figura 4.14: gráfica descriptiva de la distribución de pacientes según el estadio al diagnóstico.

Sexo	II	III	IV
Hombres	5 (5'2%)	28 (29'2%)	63 (65'6%)
Mujeres	1 (5'3%)	2 (10'5%)	16 (84'2%)

Tabla 4.6: datos de distribución por sexos según estadio al diagnóstico.

En cuanto a la distribución del estadio por sexos, se mantiene acorde con la distribución global, apreciando que en ambos sexos la mayoría de pacientes se diagnosticaron en estadio IV (65'62% en hombres y 84'21% en mujeres).

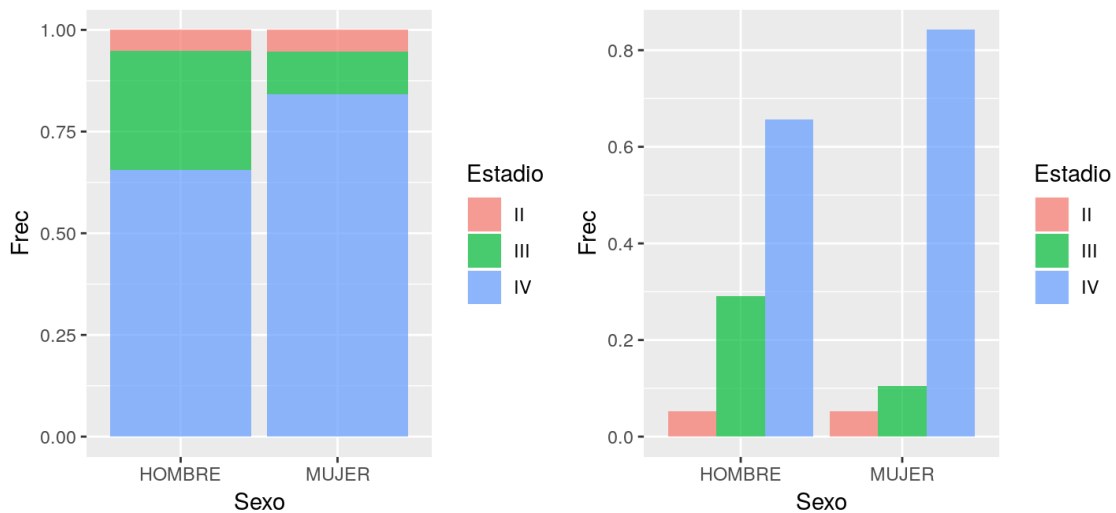


Figura 4.15: gráfica descriptiva de distribución por sexos según los diferentes estadios al diagnóstico.

Si atendemos a la distribución de pacientes según su histología y el estadio al diagnóstico, apreciamos que en el estadio IV se obtiene una distribución acorde a lo observado a nivel general, siendo más frecuente el adenocarcinoma (en el 44'30% de los pacientes en este estadio, seguido de carcinoma de células pequeñas y escamoso con un 30'38% y 22'78% respectivamente. Si bien en el estadio III apreciamos que en primer lugar se encuentran pacientes con carcinoma escamoso y células pequeñas con 11 pacientes en ambos grupos (siendo ambos un 36'67% de los pacientes en estadio III) seguido de adenocarcinoma con 8 pacientes (26'67% de los pacientes en ese estadio).

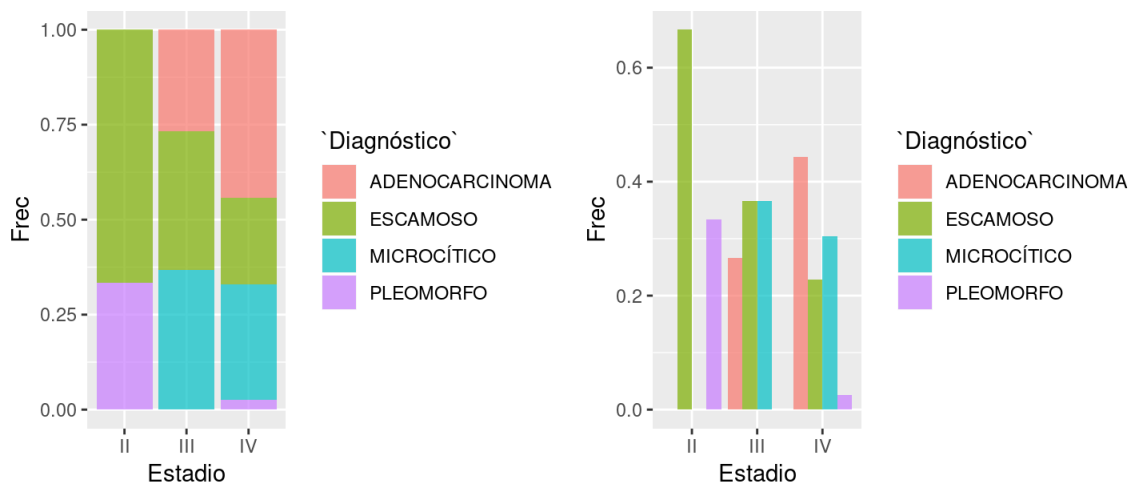


Figura 4.16: gráfica descriptiva de la distribución de histologías en los diferentes estadios tumorales.

En cuanto al tratamiento recibido por el grupo de pacientes de la muestra, se encuentra acorde con el estadio al diagnóstico, observando como todos los pacientes que fueron diagnosticados en un estadio avanzado se realizó tratamiento con quimioterapia paliativa (78 pacientes, un total del 68% de la muestra y el 100% de los pacientes en estadio IV). Por otro lado, los pacientes diagnosticados en estadios localizados (II y III) se trataron de diferentes formas según las guías clínicas de ese momento, por lo que podemos apreciar que en nuestra muestra 3 pacientes (3% de la muestra) recibieron tratamiento neoadyuvante y 8 (un 7% de la muestra) fueron a tratamiento adyuvante posterior a la cirugía. El resto de pacientes diagnosticados en estadio III que no fueron resecables fueron tratados con quimio-radioterapia (un total de 26 pacientes, el 22% de la muestra).

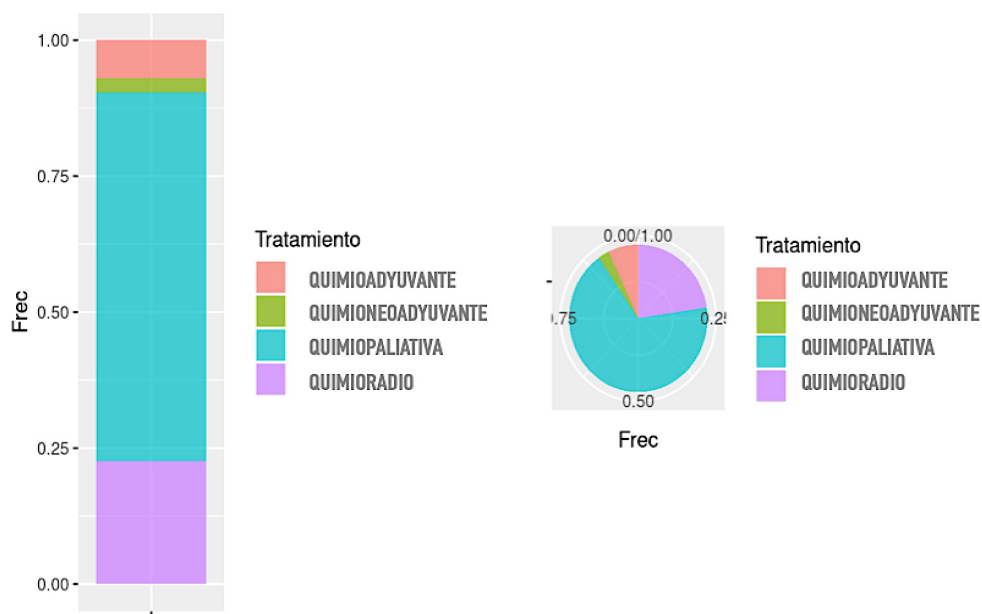


Figura 4.17: gráfica descriptiva de la distribución de pacientes según el tratamiento recibido.

En cuanto a la distribución de sexos por tratamiento realizado, se mantiene acorde con el estadio al diagnóstico sin variaciones dependientes del tratamiento.

Con la muestra objeto de nuestro estudio, se realizó un seguimiento a los 3-4 meses con evaluación de respuesta mediante técnica de imagen y con una nueva extracción de sangre. Aunque en este trabajo no se estudian los cambios obtenidos en las segundas muestras, se presenta un estudio descriptivo de las diferentes respuestas obtenidos en nuestros pacientes a lo largo del periodo estudiado.

Analizamos la respuesta obtenida en el total de la muestra, observando que la mayoría de pacientes obtienen una respuesta parcial de la enfermedad (un total de 46 pacientes, lo que supone un 40% de la muestra global). Seguidamente observamos que 19 de los pacientes consiguen una estabilización de la enfermedad (un 17%), y un 10% acaban alcanzando una respuesta completa de la enfermedad (11 pacientes). Con todos estos datos vemos que se consigue un control de la enfermedad en un 67% de todos los pacientes de la muestra.

Por otro lado se aprecia una progresión de la enfermedad en 15 pacientes, lo que supone un 13% de la muestra, y se aprecia que 23 pacientes fallecieron antes de los 3-4 meses que se pudiera realizar una evaluación de respuesta, siendo un 20% de todos los pacientes estudiados.

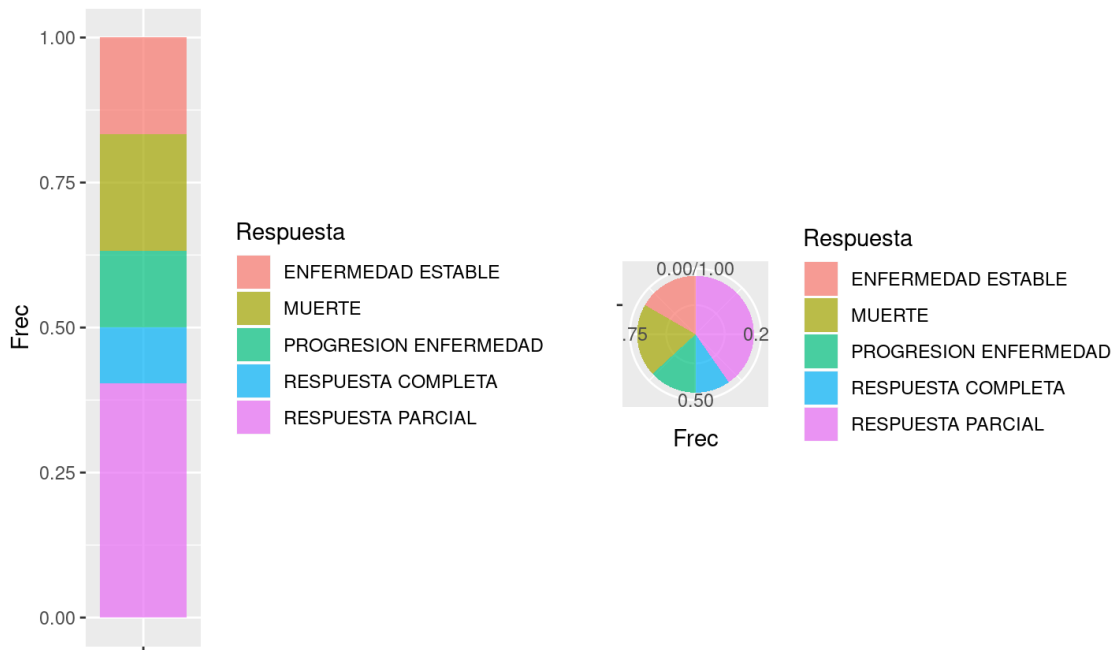


Figura 4.18: gráfica descriptiva de la distribución de pacientes según la respuesta obtenida.

Si atendemos a la distribución por sexos, apreciamos que la distribución se observa muy similar en ambos grupos, observando en ambos que la mayoría presentan una respuesta parcial (40% en hombres y 42'11% en las mujeres), seguido de enfermedad estable, con un 31'58% de mujeres que obtuvieron una estabilización de la enfermedad y un 13'68% en el grupo de los hombres. Como principal diferencia entre ambos grupos se observó en los pacientes que fallecieron, observando como solo un 5'26% del grupo de mujeres falleció antes de la evaluación de respuesta frente al 23'16% en el grupo de hombres. De igual manera sucedió en los pacientes que obtuvieron una respuesta completa de la enfermedad, dado que se observa que un 5'26% de las mujeres obtuvieron esta respuesta, frente a un 10'53% de hombres que la alcanzaron.

	RP	RC	EE	PD	Exitus
Hombres	38 (40'0%)	10 (10'5%)	13 (13'7%)	12 (12'6%)	22 (23'2%)
Mujeres	8 (42'1%)	1 (5'3%)	6 (31'6%)	3 (10'8%)	1 (5'3%)

Tabla 4.7: Datos de distribución por sexos según la respuesta al tratamiento. (RP= Respuesta Parcial, RC= Respuesta Completa, EE= Enfermedad Estable, PD: progresión)

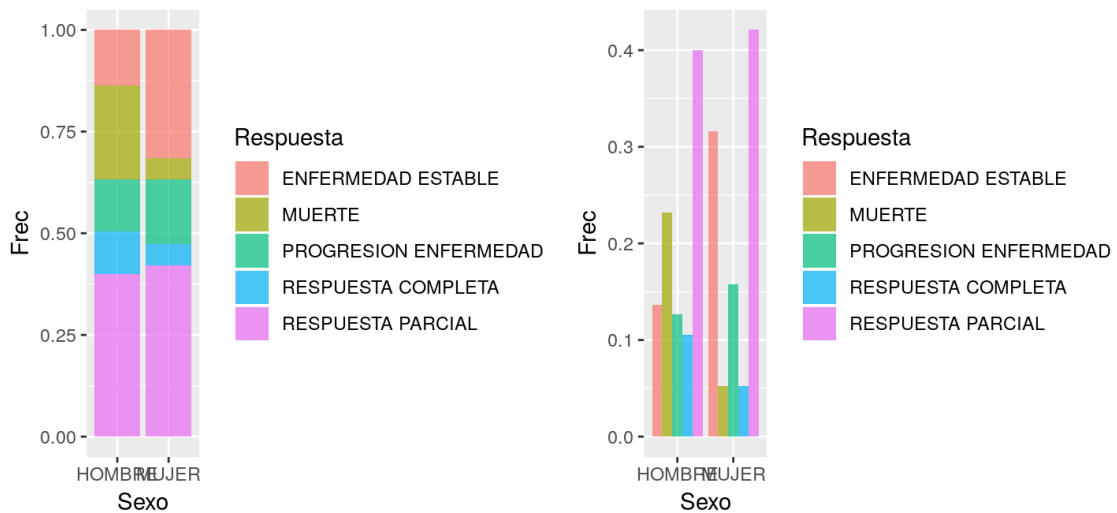


Figura 4.19: gráfica descriptiva de distribución por sexos según las diferentes respuestas al tratamiento.

4.2.2 Termogramas de suero de TLB para individuos con HC y LCP

Se obtuvieron los termogramas de DSC de las muestras de suero de los individuos pertenecientes a los grupos HC (controles sanos) y LCP (pacientes de cáncer de pulmón). La Figura 4.20 muestra termogramas representativos para sujetos sanos y enfermos. La homogeneidad dentro del grupo HC, así como la heterogeneidad dentro del grupo LCP son notables. Además, son evidentes diferencias significativas en los termogramas de TLB de sujetos sanos y enfermos. La aplicación del procedimiento de deconvolución (ya explicado en la sección de Materiales y Métodos) proporcionan un conjunto de parámetros que representan la base de la metodología estadística para clasificar y discriminar entre los individuos de HC y LCP

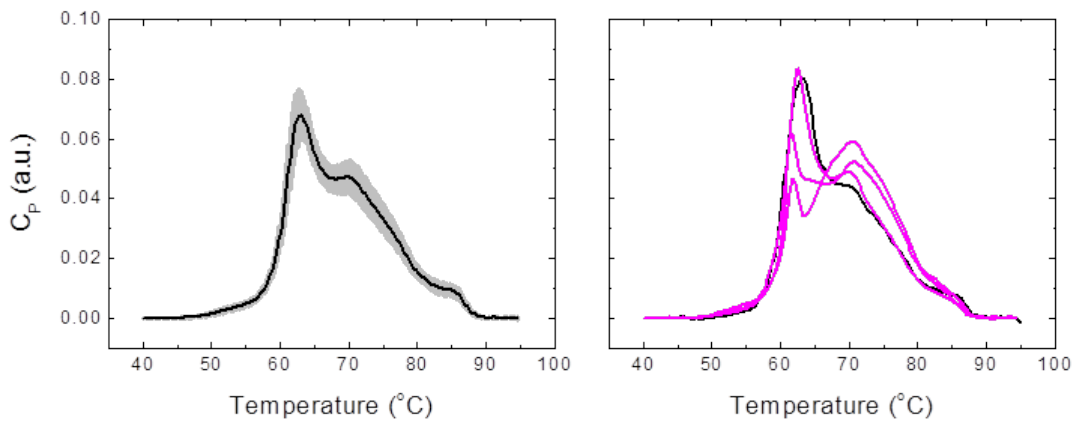


Figura 4.20: Termogramas de suero TLB para individuos con HC y LCP. (Izquierda) El termograma de TLB promedio calculado con todos los sujetos que pertenecen al grupo HC (línea continua) se muestra junto con la desviación estándar de los termogramas a cada temperatura (región sombreada). (Derecha) Se compara un termograma de TLB para un sujeto sano (línea negra) con los de tres ejemplos de pacientes con cáncer de pulmón (líneas magenta).

4.2.3 Análisis de parámetros derivados de TLB individuales

En primer lugar, se realiza un análisis completo de cada uno de los 14 parámetros, obteniendo los diferentes valores (máximo, mínimo, media) de los 14 parámetros en cada uno de los 2 grupos, tanto HC como LCP

Grupo HC	Mínimo	Media	Máximo
T_{av}	65.93	67.98	69.08
G₁	-0.3757	0.2330	0.7714
AUC_{n2}	7.011	36.92	201.7
AP_{n2}	0.2438	3.598	81.29
AUC_{n3}	14.98	24.02	76.84
AP_{n3}	0.2934	0.9215	4.343
AUC_{n4}	2.882	43.90	148.2
AP_{n4}	0.07751	3.232	16.24
AUC_{n5}	22.06	49.67	143.8
AP_{n5}	0.2949	4.203	33.44
Dv₂	0.9857	3.244	71.43
Dv₃	0.9855	1.175	5.101
Dv₄	0.9861	1.443	6.069
Dv₅	0.9825	1.377	10.93

Tabla 4.8: Descriptivo completo de los 14 diferentes parámetros analizados procedentes de la TLB en el grupo HC.

Grupo LCP	Mínimo	Media	Máximo
T_{av}	65.04	68.23	70.63
G₁	-0.1058	0.4518	3.622
AUC_{n2}	7.011	29.82	98.32
AP_{n2}	0.0952	1.924	20.61
AUC_{n3}	8.830	34.63	263.71
AP_{n3}	0.2049	2.145	29.33
AUC_{n4}	4.842	122.7	8098.0
AP_{n4}	0.2855	261.2	28790
AUC_{n5}	18.95	101.8	1858
AP_{n5}	0.1778	152.3	8070
Dv₂	0.9857	1.909	17.32
Dv₃	0.9855	2.562	35.50
Dv₄	0.9861	3.872	149.7
Dv₅	0.9825	3.644	85.04

Tabla 4.9: Descriptivo completo de los 14 diferentes parámetros analizados procedentes de la TLB en el grupo LCP.

Como una evaluación primaria de la capacidad de diferentes parámetros para clasificar a los individuos en grupos de HC y LCP, se utilizaron los cuartiles principales Q1, Q2 y Q3 (es decir, la mediana y el primer y tercer cuartiles) para la distribución de cada parámetro TLB derivado del parámetro dentro de esos dos grupos. La tabla 4.10 muestra esos índices estadísticos para los grupos de HC y LCP.

	Grupo HC			Grupo LCP		
Parámetro	Q ₁	Q ₂	Q ₃	Q ₁	Q ₂	Q ₃
T _{av}	67.59	68.09	68.52	67.78	68.16	68.71
G ₁	0.197	0.3449	0.4921	0.2899	0.4436	0.5662
AUC _{n2}	19.32	25.13	38.39	18.72	24.20	36.15
AP _{n2}	0.5404	0.9874	2.170	0.4884	0.9303	1.902
AUC _{n3}	20.88	24.43	28.54	21.59	25.76	33.09
AP _{n3}	0.6773	0.9018	1.207	0.7416	0.9723	1.551
AUC _{n4}	26.75	36.53	50.72	25.74	33.30	46.76
AP _{n4}	1.095	1.990	3.838	0.9898	1.619	3.508
AUC _{n5}	37.79	44.96	58.08	36.73	47.69	63.12
AP _{n5}	2.206	2.952	5.216	2.150	3.120	6.294
Dv ₂	1.078	1.193	1.451	1.094	1.204	1.393
Dv ₃	1.010	1.056	1.224	1.014	1.072	1.509
Dv ₄	1.057	1.179	1.359	1.081	1.184	1.3333
Dv ₅	1.014	1.079	1.413	1.025	1.197	1.480

Tabla 4.10: Cuartiles de parámetros derivados de TLB individuales en grupos de HC y LCP.

Se realiza una comparativa visual entre ambos grupos para apreciar las diferencias que podemos encontrar entre ambos grupos con los diferentes valores netos de los 14 parámetros resultantes del análisis directo de la TLB (Figura 4.21).

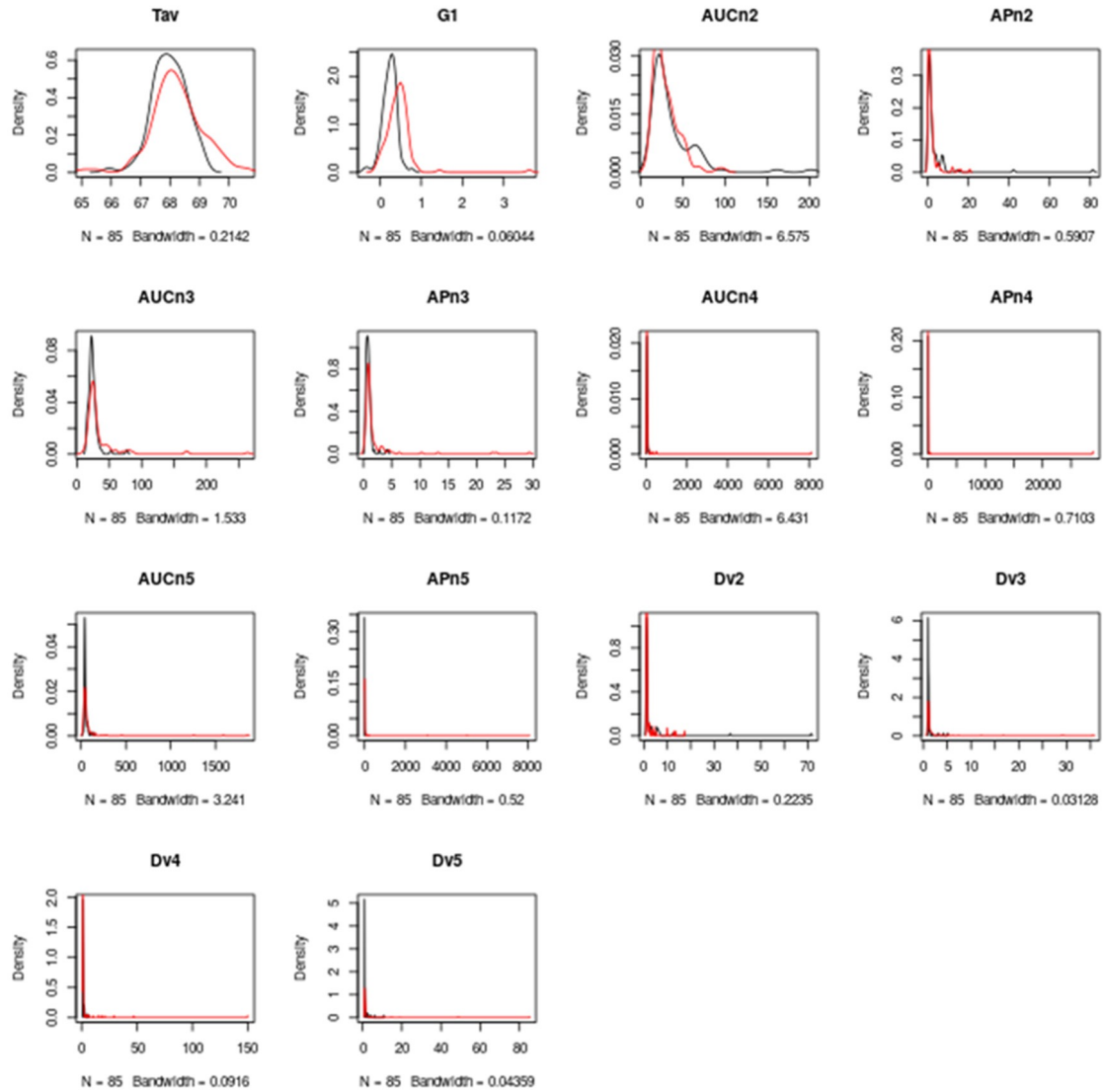


Figura 4.21: Estimadores de densidad no paramétricos para los 14 parámetros individuales derivados de TLB. Grupo HC (negro) / grupo LCP (rojo).

Para inspeccionar visualmente y explorar las diferencias de un solo parámetro entre los grupos HC y LCP, se calcularon las diferencias entre la mediana (Q2) normalizada por el rango intercuartílico (Q3-Q1). De esta manera, no solo se evalúa la diferencia en la mediana de cada parámetro, sino también el tamaño de esta diferencia en comparación con la dispersión de parámetros. La Figura 4.21 muestra la mediana normalizada para cada parámetro, y siete parámetros (G1, AUCn3, APn3, AUCn5, Dv2, Dv3 y Dv4) emergen individualmente como los parámetros estadísticamente más importantes para distinguir ambos grupos.

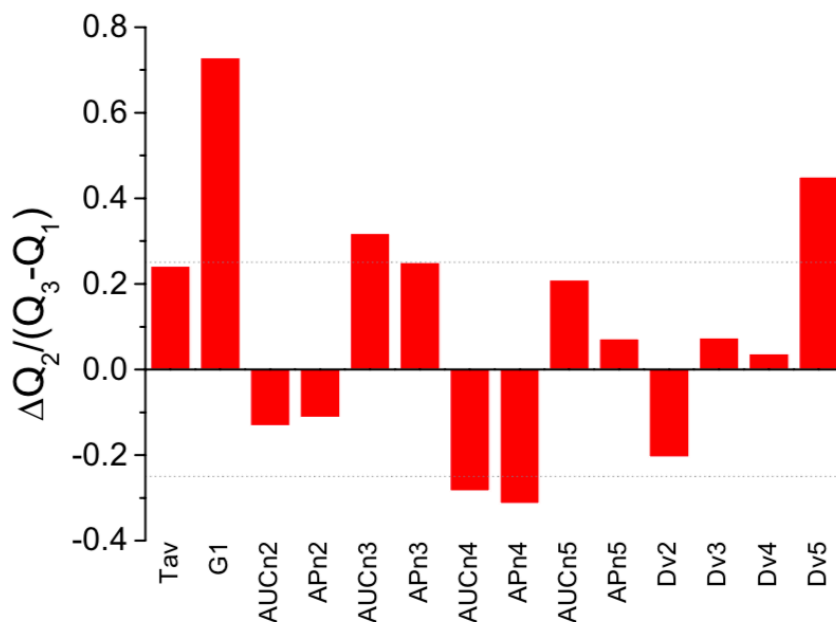


Figura 4.22. Diferencias en la mediana normalizada de rango intercuartílico para los parámetros individuales derivados de los termogramas de suero TLB entre los grupos de HC y LCP. Algunos de los parámetros muestran diferencias notables entre esos dos grupos: G1, AUCn3, APn3, AUCn5, Dv2, Dv3 y Dv4. El código de color se ha establecido de acuerdo con la magnitud de las diferencias con un valor de umbral de ± 0.3 .

Para evaluar las capacidades predictivas de cada uno de los parámetros derivados de la TLB, realizamos un análisis de curva de Característica Operativa del Receptor (ROC). La idea principal detrás del análisis de ROC es la identificación de un valor de corte óptimo para cada uno de los parámetros que podrían emplearse para clasificar a los sujetos como sanos o enfermos, de modo que se maximice la sensibilidad y especificidad estadísticas. Para establecer el corte óptimo, hemos considerado el método de Youden, uno de los métodos más comunes para la optimización de ROC.

La Tabla 4.11 muestra el resultado de aplicar el método de Youden a los grupos de HC y LCP. La tasa de éxito es la probabilidad de asignar correctamente a los sujetos como sanos (termograma TLB inalterado, perteneciente al grupo HC) o enfermos (termograma TLB alterado, perteneciente al grupo LCP), mientras que la sensibilidad y la especificidad son el porcentaje de positivos verdaderos (positivo según a TLB y pertenecientes al grupo LCP) y negativos verdaderos (negativos según TLB y pertenecientes al grupo HC) tomando como referencia sus respectivos grupos LCP y HC.

Parámetros	Success rate	Sensiti- vidad	Especifi- cidad	Thresh old	Tend encia
T_{av}	57.8	61.4	52.9	68.0	↓
G_1	71.4	63.2	82.3	0.37	↓
AUC_{n2}	53.8	48.2	61.2	23.9	↑
AP_{n2}	56.8	62.3	49.4	1.23	↑
AUC_{n3}	63.8	59.7	69.4	24.9	↓
AP_{n3}	61.8	64.0	58.8	0.88	↓
AUC_{n4}	58.8	53.5	65.9	34.0	↑
AP_{n4}	59.3	54.4	65.9	1.82	↑
AUC_{n5}	61.3	57.9	65.9	45.4	↓
AP_{n5}	58.3	43.9	77.6	4.26	↓
Dv_2	53.3	58.8	45.9	1.17	↓
Dv_3	58.8	41.2	82.4	1.14	↓
Dv_4	56.3	65.8	44.5	1.11	↓
Dv_5	63.3	59.7	68.2	1.08	↓

Tabla 4.11. Análisis de ROC para parámetros derivados de TLB individuales.

Nota: El análisis de ROC utilizando el método de Youden permitió calcular el umbral para cualquier parámetro individual para clasificar a los sujetos en

termograma TLB sano (negativo, inalterado) y enfermo (termograma TLB alterado positivo). El símbolo de tendencia indica la dirección para la clasificación como sujeto sano: \uparrow \downarrow significa que, en general, los sujetos clasificados como saludables (resultado negativo según TLB) mostraron valores mayores / menores que el umbral indicado.

De la Tabla 4.11, es evidente que G1, AUCn3, APn3, AUCn5 y Dv5 son los parámetros individuales más exitosos (alta tasa de éxito, valores de sensibilidad y especificidad) para clasificar correctamente a los sujetos como sanos o enfermos.

4.2.4 Construyendo un valor predictivo/de clasificación para la condición de cáncer de pulmón con GLM

Si bien algunos de los parámetros derivados de TLB individuales muestran un buen desempeño con respecto a la clasificación de sujetos, el uso combinado de varios parámetros (como se sugiere por el hecho de que los dos enfoques preliminares han proporcionado subconjuntos ligeramente diferentes de parámetros relevantes) podría mejorar significativamente el desempeño de la clasificación de los pacientes si el objetivo es aplicar TLB en la práctica clínica.

Realizamos un análisis comparativo de cuatro herramientas de creación de modelos: GLM (modelos lineales binomiales generalizados con regresión logística), LDA (análisis de discriminación lineal), SVM (máquina de vectores de soporte para clasificación) y NBC (clasificador Naive Bayes). El rendimiento de estas cuatro herramientas fue el siguiente: GLM > SVM > LDA > NBC, aunque SVM y GLM siempre están muy cerca. Como se muestra en Tabla 4.12 GLM y SVM funcionan de manera similar con el modelo 3, que aparentemente es el mejor modelo. Además, la interpretación del modelo predictivo con SVM no es tan sencilla como con GLM. Por estas razones, de ahora en adelante solo consideraremos el marco GLM.

	Parámetro	Success Rate	Sensibilidad	Especificidad
Modelo 1	GLM	88	89	87
	LDA	84	88	79
	SVM	90	87	95
	NBC	55	24	98

	Parámetro	Success Rate	Sensibilidad	Especificidad
Modelo 2	GLM	69	73	65
	LDA	58	96	6
	SVM	61	97	13
	NBC	55	25	96

	Parámetro	Success Rate	Sensibilidad	Especificidad
Modelo 3	GLM	91	90	92
	LDA	85	88	81
	SVM	90	88	96
	NBC	56	25	96

Tabla 4.12: Estudio comparativo del rendimiento de GLM, LDA, SVM y NBC en los tres modelos.

Se realizó una comparación de los tres modelos (1-3) utilizando GLM. Debido a que los parámetros Dvi son funciones no lineales de otros parámetros derivados de TLB individuales, establecer un modelo 3 (los 14 parámetros individuales) representa una mejora significativa para predecir la condición de salud / enfermedad fue un paso requerido.

Cuando se aplica GLM al modelo 1, solo los parámetros individuales T_{av} , G_1 y $AUCn_3$ tienen significación estadística (valores de $p < 0,05$). Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 4.13. El valor z es el coeficiente de regresión dividido por su error estándar. El valor z es el coeficiente de regresión dividido por el error

estándar obtenido por GLM. Como regla general, un valor de corte de 2 (que corresponde aproximadamente a una prueba de hipótesis de dos lados con un nivel de significación de $\alpha = 0.05$) indica si los parámetros correspondientes son importantes o no (es decir, si el valor $z > 2$, entonces su coeficiente GLM correspondiente no es despreciable (no es nulo) y el parámetro es importante y significativo para predecir la presencia / ausencia de cáncer de pulmón). Por otro lado, cuando se aplica GLM al modelo 2, solo los parámetros individuales Dv_3 y Dv_5 tienen una significación estadística (valores de $p < 0,05$). Finalmente, cuando se aplica GLM al modelo 3, los parámetros que muestran significación estadística son principalmente los que fueron significativos en los modelos anteriores: T_{av} , G_1 , $AUCn_3$, $AUCn_4$, APn_4 , $AUCn_5$ y Dv_4 . Curiosamente, algunos de estos parámetros coinciden con los ya identificados a través del análisis estadístico simple que se muestra en la Tabla 4.2.

Modelo	Parámetros	z-value	Pr(> z)
MODELO 1	T _{av}	-5.14	0.00000
	G ₁	-6.38	0.00000
	AUC _{n2}	-1.18	0.23689
	AP _{n2}	0.931	0.35192
	AUC _{n3}	-2.59	0.00949
	AP _{n3}	0.975	0.32937
	AUC _{n4}	1.38	0.16735
	AP _{n4}	-1.28	0.20197
	AUC _{n5}	1.36	0.17247
	AP _{n5}	1.46	0.14450
MODELO 2	Dv ₂	1.29	0.19585
	Dv ₃	-2.14	0.03265
	Dv ₄	-1.22	0.22283
	Dv ₅	-1.96	0.04993
MODELO 3	T _{av}	-4.63007	0.00000
	G ₁	-6.30023	0.00000
	AUC _{n2}	-1.45263	0.14633
	AP _{n2}	1.68493	0.09200
	AUC _{n3}	-2.84924	0.00438
	AP _{n3}	1.05694	0.29054
	AUC _{n4}	2.80208	0.00508
	AP _{n4}	-2.36746	0.01791
	AUC _{n5}	2.15199	0.03140
	AP _{n5}	-1.31683	0.18789
	Dv ₂	-1.65683	0.09755
	Dv ₃	-0.70715	0.47947
	Dv ₄	-2.26054	0.02379
	Dv ₅	0.04718	0.96237

Tabla 4.13: Resumen de la aplicación de GLM (Binomial Generalized Model with Logistic Regression) a los 3 diferentes modelos.

Debido a que los tres modelos (1-3) tienen un rendimiento aparentemente diferente, debemos establecer cuál de ellos se debe emplear finalmente. Las pruebas de equivalencia del modelo basadas en la relación de probabilidad (Tabla 4.14 y 4.15) muestran que el modelo 1 es estadísticamente equivalente al modelo completo. Además, los criterios de información de Bayesian y Akaike confirman que el modelo 1 y el modelo 3 son bastante similares en términos estadísticos.

	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3
Degrees of Freedom	-4	-10	NA
Residual Degrees of Freedom	188	194	184
Residual Deviance	128	240	118
Deviance	-8.9	-123	NA
Pr(>χ^2)	0.06269	0.00000	NA

Tabla 4.14. Comparación de modelos basada en la relación de probabilidad.

	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3
AIC	149	251	148
BIC	185	267	198

Tabla 4.15. Comparación de modelos basada en los criterios de información de Akaike y Bayesianos.

Si comparamos el desempeño de los tres modelos para predecir el cáncer de pulmón para los individuos dentro de los grupos de HC y LCP, como se muestra en la Tabla 4.16, el modelo 3 se desempeña mejor que cualquiera de los otros dos modelos en tasa de éxito, sensibilidad y especificidad (Tabla 4.16). Los falsos negativos son pacientes con cáncer de pulmón con puntuaciones de PS

pronosticadas superiores a 0,5, mientras que los falsos positivos son individuos sanos con puntuaciones de PS (Probabilidad de Sano) pronosticadas menores de 0,5. La sensibilidad y la especificidad se definen como las tasas positivas verdaderas y negativas verdaderas considerando como referencia el grupo LCP y el grupo HC, respectivamente. El valor de la proporción de probabilidades de los modelos 1, 2 y 3 es 54, 5 y 104, respectivamente.

Las predicciones para construir la tabla anterior se hicieron para los mismos individuos que se utilizaron para ajustar el modelo. Con el fin de reducir cualquier posible sesgo, se realizó un estudio de no recurrir (LOO) para obtener una idea más realista del rendimiento de los modelos propuestos (Tabla 4.16). En esta prueba, con el fin de predecir la probabilidad de salud / enfermedad para un individuo, ajustamos el modelo con todos los datos, pero solo ese caso específico; luego, esta prueba produce tantos conjuntos de parámetros ajustados como el tamaño del conjunto de datos (número de individuos de HC y LCP).

MODELOS	Success rate	Sensibilidad	Especificidad
Modelo 1	88	87	89
Modelo 2	69	65	73
Modelo 3	91	92	90
TEST DE LOO	Success rate	Sensibilidad	Especificidad
Modelo 1	86	86	87
Modelo 2	65	60	68
Modelo 3	87	86	87

Tabla 4.16: Comparación de modelos basada en la capacidad de clasificar sujetos (por los modelos de estudio y por el test de LOO de corrección).

Como se requiere un conjunto fijo de parámetros para definir el modelo completo, a partir de ahora consideraremos el modelo 3 basado en el conjunto completo de parámetros derivados de TLB para calcular un valor que indique la probabilidad de sano (PS), es decir, de que una persona esté sana o sufra de cáncer de pulmón dado el termograma TLB. Se debe enfatizar que esta probabilidad, como herramienta de diagnóstico, debe entenderse como un índice de evaluación: cuanto más bajo sea el indicador de PS (más cercana a 0) para un individuo, mayor será la probabilidad de que él / ella sufra de cáncer de pulmón; cuanto mayor sea el indicador de PS (más cercana a 1) para un individuo, mayor será la probabilidad de que el individuo esté sano. Es importante enfatizar que el indicador PS no es la probabilidad de estar sano o de padecer cáncer de pulmón, sino la probabilidad asociada a un termograma TLB de suero de proteína alterada / alterada; un cáncer de pulmón podría inducir o causar un termograma de TLB alterado. Esa correlación entre la condición del cáncer de pulmón y el termograma de TLB alterado constituye la base sobre que soporta el buen desempeño de nuestro modelo al clasificar y discriminar los grupos de HC y LCP.

Está claro que el modelo completo (modelo 3) es el mejor, logrando casi el 92% de los éxitos en la clasificación correcta de los individuos, el 10% de falsos positivos (es decir, clasificar como enfermo como un sujeto sano) y el 8% de falsos negativos (es decir, , clasificando como sano un sujeto enfermo). A pesar de que no todos los parámetros derivados de TLB parecen ser estadísticamente significativos con respecto a la capacidad de clasificar a los individuos, decidimos mantener todos los parámetros en el modelo.

La Figura 4.23 muestra la distribución del valor indicador de PS calculada con el modelo 3 utilizando GLM. Hay una marcada diferencia en la distribución de la puntuación de PS para los grupos de HC y LCP: en HC, PS media es $Q2 = 0.88$ ($Q1 = 0.7$, $Q3 = 0.94$), mientras que en LCP PS mediana es $Q2 = 0.05$ ($Q1 = 0.01$, $Q3 = 0.18$). Esto proporciona una evaluación visual de la calidad y el rendimiento del poder discriminante de PS y la fuerte correlación entre el indicador PS (capacidad para identificar el termograma de TLB sérico no alterado / alterado) y la ausencia / presencia de cáncer de pulmón.

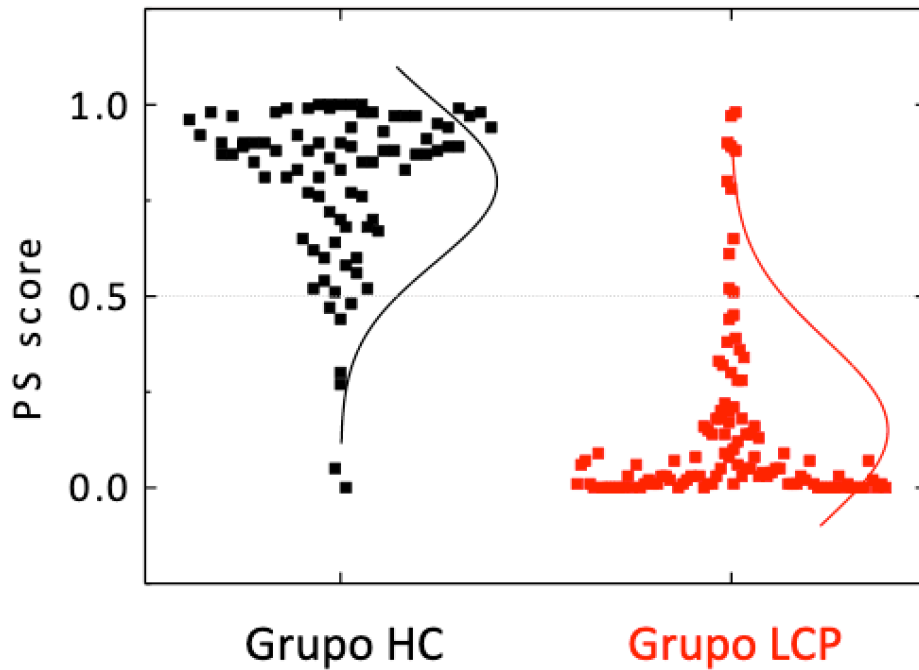


Figura 4.23. Distribución del indicador PS en individuos sanos (grupo HC) y pacientes con cáncer de pulmón (grupo LCP). La línea de puntos gris indica el umbral (PS = 0.5) para clasificar a un sujeto como que tiene un termograma de TLB de proteoma sérico inalterado (PS > 0.5) o alterado (PS < 0.5).

El objetivo de las siguientes secciones es explorar las propiedades del indicador PS (probabilidad de tener un termograma TLB inalterado / alterado, que se relaciona con estar sano o padecer cáncer de pulmón) a través de un análisis detallado del indicador PS aplicada a HC y Grupos de LCP. Estudiamos los valores del indicador PS según la información disponible para los individuos, ya sea en su historia clínica o condición, tanto en los grupos de individuos de HC como de LCP. Por lo tanto, buscamos averiguar si hay alguna correlación entre el indicador PS y cualquiera de los parámetros de la historia clínica y personal (sexo, edad, diagnóstico, etapa, tratamiento, respuesta, supervivencia, fumador y la cantidad de paquetes de cigarrillos por año) .

4.2.5 Indicador PS en sujetos sanos (grupo HC)

Para estudiar el comportamiento del indicador PS propuesto, y teniendo en cuenta su asimetría para los grupos de HC y LCP, hemos desarrollado un pequeño análisis descriptivo utilizando cuartiles y la prueba de Kruskal-Wallis basada en rangos para abordar si la distribución por grupos es o no lo mismo o no. Puede verse (tablas 4.17 y 4.18) no hay diferencias significativas en la distribución del indicador PS en el grupo de HC según el género y la edad de los individuos (valor de $p > 0.05$; tabla 4.17). Por lo tanto, en individuos sanos, la probabilidad de tener un termograma TLB normal / alterado no depende del sexo ni de la edad. Al observar el comportamiento de la clasificación establecida por el indicador PS (es decir, si el valor $PS > \text{umbral} = 0.5$ o no), algunos sujetos (5) se clasifican como que tienen un termograma TLB alterado (falsos positivos), pero son más antiguos que 40, y de hecho cuatro de ellos tienen más de 50 años (Tabla 4.18).

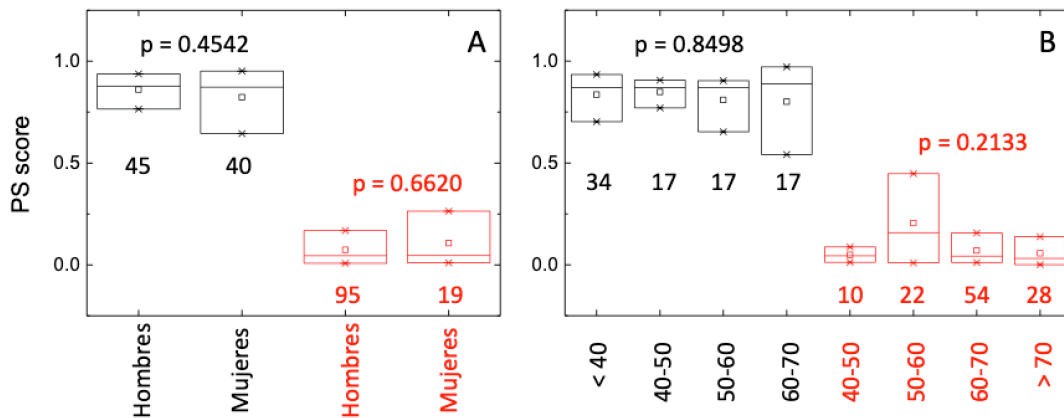


Figura 4.24. Distribución del indicador de probabilidad (PS) de sano (grupo HC, negro) y pacientes con cáncer de pulmón (grupo LCP, rojo) según el sexo (A) y la edad (B). Los diagramas de diagrama de caja indican Q1, Q2 y Q3, junto con el valor promedio (cuadrado). El número debajo de cada cuadro es el número de sujetos dentro de cada subgrupo. El valor p (prueba de Kruskal-Wallis) indica que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre las subcategorías (género y edad) dentro de los grupos HC y LCP ($p > 0.05$).

4.2.6 Indicador PS en pacientes con cáncer de pulmón (LCP)

Está claro que el indicador PS para aquellos individuos con cáncer de pulmón (grupo LCP) es dramáticamente más pequeña que PS para sujetos sanos (grupo HC), lo que indica un termograma TLB alterado (Tabla 4.17). Como ocurrió en el grupo de HC, no hay diferencias significativas en PS según el sexo o la edad (valor de $p > 0.05$; tabla 4.17). Sin embargo, al observar el comportamiento de la clasificación establecida por el indicador PS (es decir, si $PS > \text{umbral} = 0.5$ o no), algunos sujetos (11) se clasificaron como que tenían un termograma TLB sin alterar (falsos negativos), y la mayoría son mayores de 50 años (tabla 4.18).

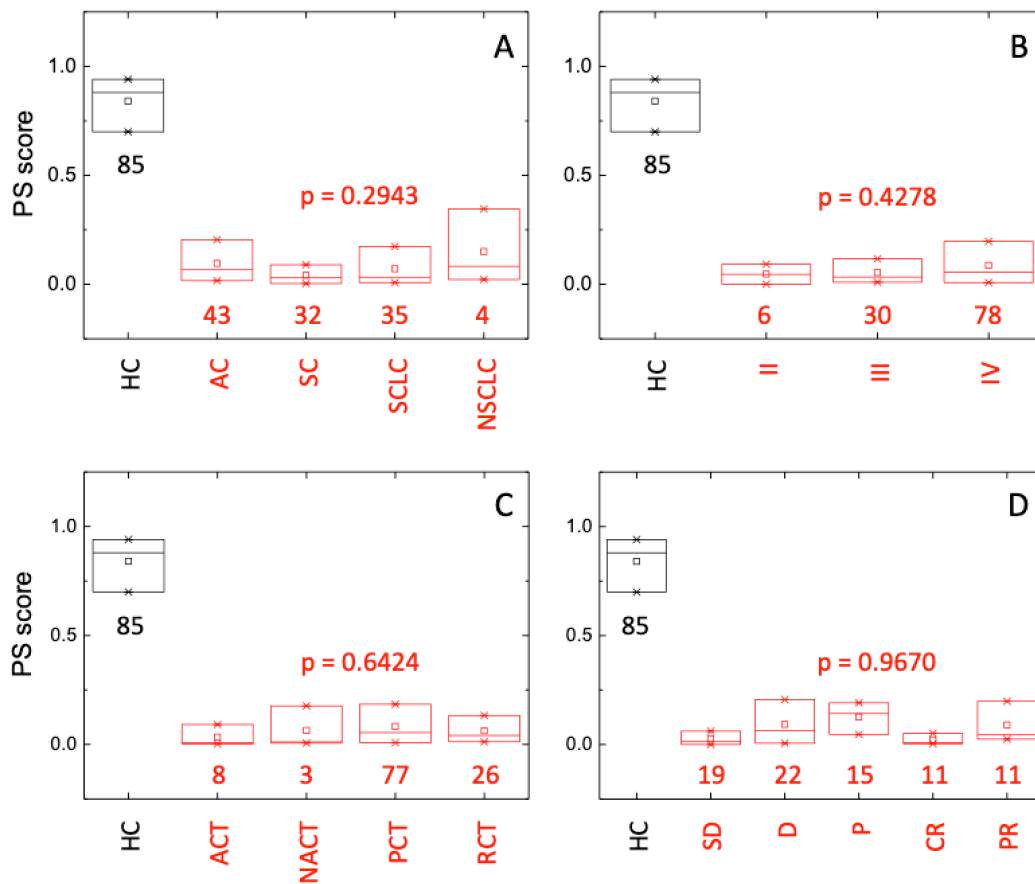


Figura 4.25: Distribución del indicador de probabilidad (PS) en individuos sanos (grupo HC, negro) y pacientes con cáncer de pulmón (grupo LCP, rojo) según el diagnóstico (A) (AC: adenocarcinoma,

SC: cáncer de pulmón de células escamosas, SCLC: pulmón de células pequeñas cáncer, NSCLC: otro cáncer de pulmón de células no pequeñas), (B) etapa, (C) tratamiento (ACT: quimioterapia adyuvante, NACT: quimioterapia neoadyuvante, PCT: quimioterapia paliativa, RCT: radioquimioterapia) y (D) respuesta (DE: enfermedad estable, D: muerte, P: progresión, CR: respuesta completa, PR: respuesta parcial). Los diagramas de diagrama de caja indican Q1, Q2 y Q3, junto con el valor promedio (cuadrado). El número debajo de cada cuadro es el número de sujetos dentro de cada subgrupo. El valor p (prueba de Kruskal-Wallis) indica que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre las subcategorías (diagnóstico, estadio, tratamiento y respuesta) dentro de los grupos HC y LCP ($p > 0.05$).

Género	Controles Sanos					Pacientes Cáncer de Pulmón				
	N	Q ₁	Q ₂	Q ₃	p-value	N	Q ₁	Q ₂	Q ₃	p-value
Hombre	45	0.7649	0.8776	0.9380	0.4542S	95	0.0075	0.0450	0.1681	0.6620
Mujer	40	0.6448	0.8722	0.9515		19	0.0101	0.0457	0.2632	

Edad	Controles Sanos					Pacientes Cáncer de Pulmón				
	N	Q ₁	Q ₂	Q ₃	p-value	N	Q ₁	Q ₂	Q ₃	p-value
< 40	34	0.7022	0.8699	0.9343	0.8498	0				0.2133
40 - 50	17	0.7706	0.8692	0.9062		10	0.0120	0.0443	0.0879	
50 - 60	17	0.6528	0.8707	0.9035		22	0.0090	0.1574	0.4478	
60 - 70	17	0.5411	0.8883	0.9713		54	0.0114	0.0423	0.1564	
> 70	0					28	0.0003	0.0309	0.1375	

Tabla 4.17. Indicador PS vs género y edad

		Género	PS > 0.5	PS < 0.5	<i>p-Value</i>
			Verdaderos Negativos	Falsos Positivos	
Controles Sanos	Hombre		43 (96%)	2 (4%)	0.2460
	Mujer		35 (88%)	5 (12%)	
		Género	PS > 0.5	PS < 0.5	<i>p-Value</i>
			Falsos Negativos	Verdaderos Positivos	
Pacientes cancer de pulmón	Hombre		8 (8%)	87 (92%)	0.2394
	Mujer		3 (16%)	16 (84%)	

		Edad	PS > 0.5	PS < 0.5	<i>p-Values</i>
			Verdaderos Negativos	Falsos Positivos	
Controles Sanos	< 40		32 (94%)	2 (6%)	0.3894
	40 - 50		17 (100%)	0 (0%)	
	50 - 60		14 (82%)	3 (18%)	
	60 - 70		15 (88%)	2 (2%)	
		Edad	PS > 0.5	PS < 0.5	<i>p-Value</i>
			Falsos Negativos	Verdaderos Positivos	
Pacientes cáncer de pulmón	40 - 50		1 (10%)	9 (90%)	0.04748
	50 - 60		5 (23%)	17 (77%)	
	60 - 70		5 (9%)	49 (91%)	
	>70		0	28 (100%)	

Tabla 4.18. Tablas de contingencia por género y edad (umbral del indicador PS = 0,5)

Una vez que se ha establecido que el indicador PS no se ve afectado significativamente por el género y la edad (a pesar de una influencia leve y por lo demás razonable y esperada de la edad del sujeto), el siguiente paso es explorar si el indicador PS proporciona información sobre la etapa y condiciones particulares del cáncer que sufre un individuo del grupo LCP (es decir, si muestra alguna correlación con la información de la historia clínica).

PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN					
DIAGNÓSTICO	N	Q ₁	Q ₂	Q ₃	<i>p-value</i>
Adenocarcinoma	43	0.0166	0.0672	0.2046	0.2943
Escamoso	32	0.0040	0.0301	0.0899	
SCLC	35	0.0078	0.0324	0.1739	
Otros NSCLC	4	0.0223	0.0823	0.3456	
ESTADIO	N	Q ₁	Q ₂	Q ₃	<i>p-value</i>
II	6	0.0008	0.0456	0.0923	0.4278
III	30	0.0096	0.0334	0.1169	
IV	78	0.0079	0.0566	0.1964	
TRATAMIENTO	N	Q ₁	Q ₂	Q ₃	<i>p-value</i>
QT adyuvante	8	0.0018	0.0072	0.0917	0.6424
QT neoadyuvante	3	0.0061	0.0113	0.1764	
QT paliativa	77	0.0078	0.0546	0.1845	
QT-RT	26	0.0127	0.0412	0.1327	
RESPUESTA	N	Q ₁	Q ₂	Q ₃	<i>p-value</i>
E.Estable	19	0.0004	0.0133	0.0618	0.0967
Fallecimiento	22	0.0065	0.0648	0.2063	
Progresión	15	0.0468	0.1419	0.1915	
R. Completa	11	0.0038	0.0091	0.0518	
R. Parcial	46	0.0246	0.0469	0.1981	

Tabla 4.19. Indicador PS vs información de historia clínica. Notas: QT= Quimioterapia, QT-RT= Quimio-Radioterapia, E= Enfermedad, R= Respuesta.

No existe una relación estadísticamente significativa entre el indicador PS de la EP y el diagnóstico, el estadio del tumor, el tratamiento y la respuesta clínica ($p > 0,05$) (Tabla 4.19). Sin embargo, los tumores diagnosticados como microcíticos escamosos o SCLC muestran puntuaciones de PS muy pequeñas en comparación con el adenocarcinoma u otros tumores de CPNM pleomórficos (Tabla 4.19). Solo unos pocos sujetos (11) se clasificaron como que tenían un termograma TLB sin alterar (falsos negativos), y corresponden principalmente a adenocarcinoma (8) y estadios III (3) y IV (IV).

		Diagnóstico	PS > 0.5 Falsos Negativos	PS < 0.5 Verdaderos Positivos
Pacientes de Cáncer de Pulmón	Adenocarcinoma		7 (16%)	36 (84%)
	Escamoso		2 (6%)	30 (93%)
	SCLC		1 (3%)	34 (97%)
	Otros NSCLC		1 (25%)	3 (75%)

		Estadio	PS > 0.5 Falsos Negativos	PS < 0.5 Verdaderos Positivos
Pacientes de Cáncer de Pulmón	II		0 (0%)	6 (100%)
	III		2 (7%)	28 (93%)
	IV		9 (12%)	69 (88%)

Tabla 4.20. Tabla de contingencia para la información de la historia clínica (umbral del indicador PS = 0.5)

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

El melanoma maligno presenta diferentes incidencias dependiendo de la zona en la que se estudie, pero en general la incidencia de melanoma ha aumentado en los últimos años, principalmente en países con alta exposición solar, aunque su mortalidad ha disminuido gracias a un auge reciente del desarrollo de nuevos tratamientos, principalmente con el nacimiento de la inmunoterapia y las terapias dirigidas (23).

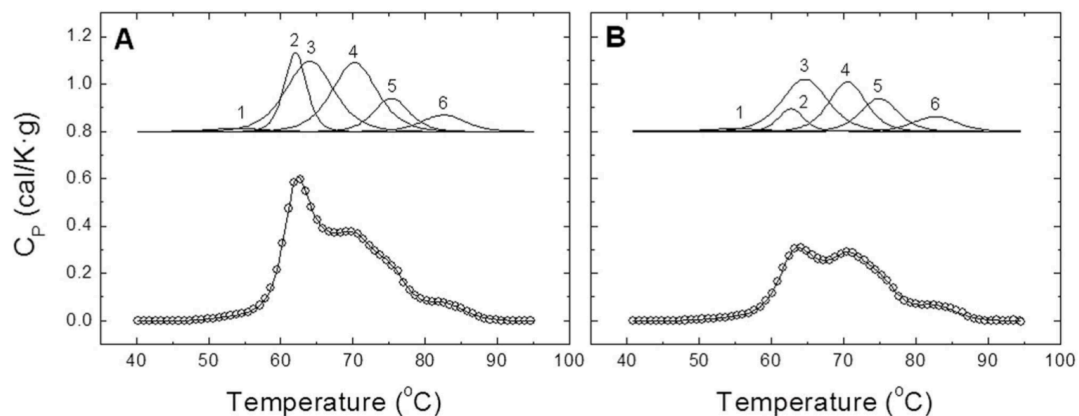
Por otro lado, el cáncer de pulmón permanece, según los datos del 2018 del *Global Cancer observatory*, como el tumor con mayor incidencia y mortalidad en hombres, y segundo en mujeres, en todo el mundo (23). Esto supone un total de 2 millones de nuevos casos y 1,7 millones de fallecimientos en ese año.

Este tipo de tumor se ha convertido en un problema de salud pública mundial para el que se deben aunar mayores esfuerzos que permitan su correcto diagnóstico y desarrollo de tratamientos específicos de forma que puedan mejorar esas cifras.

Para mejorar el pronóstico de ambos tipos de cáncer, es importante un diagnóstico temprano y correcto de la enfermedad, así como una monitorización más precisa y menos invasiva. En este aspecto, en los últimos años se están realizando grandes esfuerzos para desarrollar la tecnología basada en la biopsia líquida, dado que ocasiona pocas molestias para el paciente y permite realizar el seguimiento de la patología tumoral en intervalos de tiempo más cortos.

Esta técnica no está exenta de limitaciones a día de hoy, por lo que es necesario continuar con su desarrollo para poder asegurar una fiabilidad y seguridad adecuada de forma que su aplicación en la práctica clínica pueda realizarse de manera eficiente y a coste bajo.

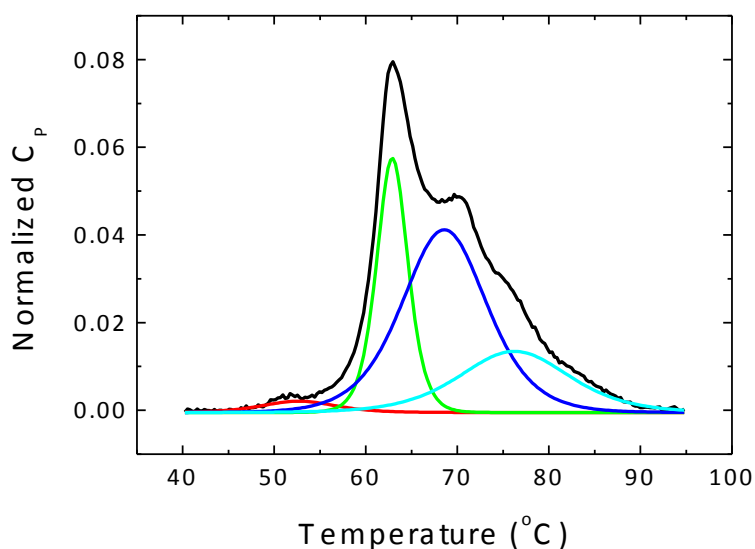
En nuestro estudio, tratamos de desarrollar un nuevo tipo de biopsia líquida que se ha perfeccionado en los últimos años y que se basa en una técnica novedosa en medicina, la calorimetría diferencial de barrido (DSC). Esta técnica consiste en un análisis de una muestra de suero o plasma y se obtiene un termograma específico muy conservado en el caso de individuos sanos y que se encuentra alterado en los pacientes con enfermedad tumoral (54).



La utilidad de los termogramas obtenidos de muestras de suero plasmático de pacientes con carcinoma gástrico ha sido demostrada por nuestro grupo con anterioridad (67). Las curvas analizadas resultaron ser características y permitieron no sólo diferenciar entre controles sanos y enfermos, sino que además fue posible diferenciar entre estadios tumorales. Sin embargo, se trata de un estudio con una muestra pequeña, por lo que se valoró continuar dentro de esta misma línea pero con mayor potencia estadística.

En esta tesis doctoral, se han estudiado dos tipos de patologías tumorales continuando con este trabajo previo y los resultados obtenidos aplicados a cáncer de pulmón y a melanoma, que han permitido a nuestro grupo acuñar el término de biopsia líquida térmica (TLB) cuyo nombre aparece por primera vez publicado en el artículo fruto de este trabajo y por tanto ha sido acuñado por el grupo de investigación de esta tesis.

La metodología utilizada para ambos trabajos se basa en la deconvolución del termograma de suero en transiciones individuales inducidas por temperatura. A partir de esa deconvolución se definió un conjunto de parámetros primarios derivados de termogramas (T_{av} , G_1 , A_i , T_i y w_i) que se emplearon para calcular un segundo conjunto de parámetros secundarios o finales (AUC_{ni} y AP_{ni}).



En el caso del melanoma, fruto de una colaboración con el grupo de la Dra. Nichola C. Garbett del James Graham Brown Cancer Center, en la Universidad de Louisville, los parámetros primarios y secundarios obtenidos a través de este análisis multiparamétrico, se han combinado de forma que es posible cuantificar las diferencias entre los termogramas de controles y pacientes con melanoma, durante el seguimiento de su tratamiento. Este trabajo muestra que la utilización de la DSC es de aplicación, no sólo en diagnóstico, sino también en la monitorización de pacientes oncológicos

Debido al aumento del coste de la atención médica y la efectividad limitada debido a las características intrínsecas de los métodos de seguimiento para los pacientes con melanoma en estadio temprano, existe la necesidad de nuevos métodos de seguimiento para estos pacientes que sean más baratos, rápidos y de bajo riesgo

para llenar el vacío que las evaluaciones clínicas y las imágenes de diagnóstico no pueden lograr.

El propósito de este estudio fue doble: aplicar nuestro sólido análisis multiparamétrico a un subconjunto de pacientes con melanoma y comparar los valores de termogramas posteriores con los datos clínicos a lo largo del tiempo para evaluar la utilidad de la metodología aplicada en el seguimiento de pacientes. A diferencia de lo publicado hasta ahora, donde la mayoría son estudios de determinación de termogramas en diferentes tumores, pero no se ha estudiado hasta ahora las posibles utilidades que se pueden ofrecer en el seguimiento de estos pacientes.

Para probar la correlación del análisis de DSC en cada tiempo en el que se han realizado controles con los datos clínicos en ese momento, se compararon los d valor (valores promedio de la distancia entre el valor control y el valor de un sujeto enfermo) obtenidos para cada paciente durante su tratamiento de melanoma. Cada muestra tenía una designación clínica asociada al radiodiagnóstico como: No evidencia de enfermedad (NED), enfermedad activa y recurrencia. Estas muestras se utilizaron para validar el estado de la enfermedad. Al comparar estos estados de la enfermedad con los d-valor, encontramos que los resultados de nuestro termograma tenían una buena correlación con la evaluación clínica, e incluso en algunos pacientes la recidiva se detectó de forma más temprana, antes incluso de que la enfermedad fuese detectada mediante evaluación clínica (pacientes 6 y 7). Para ambos pacientes, sólo se realizaron visitas médicas (es decir, no se realizaron pruebas radiológicas o biopsias) o no se realizaron evaluaciones antes de encontrar una recurrencia mediante termogramas. Esto sugeriría que la DSC tiene una gran utilidad para la detección temprana de la recurrencia y podría ser más fiable que la evaluación clínica como prueba de diagnóstico. Si bien se encontraron algunos falsos positivos, éstos se asociaron principalmente con muestras iniciales después de la resección quirúrgica, donde el estado metabólico del plasma aún puede reflejar la presencia de enfermedad residual.

Es importante señalar que en todos los casos estudiados en este trabajo, no se obtuvieron falsos negativos mediante termogramas DSC, tomando como referencia la valoración clínica (radiológica o no radiológica). Por lo tanto, una mayor sensibilidad y un umbral más bajo en DSC podrían permitir detectar antes la metástasis y la recurrencia en los pacientes. Para la mayoría de los casos, existe una correlación entre la evaluación clínica y el análisis DSC multiparamétrico.

Aunque este es un estudio pequeño y limitado (n = 10, con un total de 63 muestras analizadas), los resultados son prometedores y respaldan el trabajo futuro que involucra un conjunto de muestras más grande para determinar la sensibilidad y especificidad de los termogramas DSC para la detección de recurrencias en el contexto del melanoma.

Por otro lado, observamos que hay algunos pacientes con d-valor altos en las visitas tempranas al de seguimiento. En algunos casos, el d-valor alto puede deberse a una determinación temprana de DSC después de la cirugía en la que el estado metabólico plasmático alterado no ha regresado a un estado saludable. Pero, aún así, esto podría ser una indicación del estado inicial del paciente después de la cirugía, y esto puede tomarse como una referencia personalizada para el seguimiento posterior. Por lo tanto, queda trabajo futuro para aplicar nuestro procedimiento a un grupo más grande de pacientes con melanoma e investigar el estado del plasma en las primeras visitas después de la resección quirúrgica.

Este estudio sirve como demostración inicial de que la calorimetría presenta una gran ventaja como enfoque de monitorización o seguimiento de pacientes. El termograma de un paciente en un momento determinado se puede comparar con algunos índices o parámetros de un grupo de control, para detectar diferencias significativas. Además, al realizar termogramas cercanos en el tiempo es posible elaborar un procedimiento de seguimiento personalizado en base a la historia del paciente, tomando sus propios valores de control de referencia, sin necesidad de incluir controles externos, con el fin de detectar alteraciones en el suero del paciente.

De las tablas de contingencia obtenidas de nuestros pacientes se puede observar que no existen casos en los que los termogramas DSC den un falso negativo, es decir, un resultado negativo cuando la valoración clínica radiológica indica la existencia de un tumor. Por lo tanto, los termogramas DSC detectan todos los tumores que se han detectado mediante el diagnóstico por imagen. Además, existe una concordancia de aproximadamente un 80% entre ambos tipos de pruebas: evaluaciones clínicas y termogramas DSC. Las únicas discrepancias corresponden a las recurrencias del melanoma observadas por termogramas DSC, que pueden reafirmarse o rechazarse en análisis posteriores.

El trabajo realizado con pacientes con melanoma representa una prueba de principio para implementar la biopsia líquida térmica (análisis de termograma DSC de muestras de suero) como un enfoque valioso para una evaluación diagnóstica personalizada de pacientes con melanoma. Esta metodología permitiría a los médicos un protocolo de seguimiento más cercano y personalizado para ayudar a evaluar el estado de salud del paciente y facilitar el proceso de toma de decisiones.

Con estos datos obtenidos en nuestro estudio, nos permiten idear una nueva opción de control y seguimiento en estos pacientes ya que la combinación de los datos obtenidos con el análisis multiparamétrico permite obtener un único d-valor que pueden compararse directamente con los d-valor de la referencia que se usa como control. Esta técnica combinada se puede ejecutar de manera combinada con los métodos de diagnóstico por imagen actuales, de forma que se realicen de forma rutinaria según lo prescrito actualmente (p. Ej., 2 a 4 veces al año) mientras se realizan los termogramas DSC de forma más frecuentes (mensual o bimensual). Las ventajas principales de la biopsia líquida térmica son: reducir el intervalo de tiempo de monitorización sin un aumento significativo en el coste económico o el riesgo para el paciente y proporcionar al mismo tiempo un valor diagnóstico informando del estado de enfermedad actual del paciente.

Por otro lado, en nuestro trabajo con pacientes con cáncer de pulmón nos hemos basado en los datos ya estudiados y publicados por el grupo pero desarrollando un modelo de predicción con herramientas estadísticas que permita clasificar a los

sujetos de acuerdo con un índice predictivo, siendo la medida de probabilidad de tener un termograma de suero sano/alterado, que se espera se relacione con la presencia de cáncer.

A diferencia de otros estudios donde se centran en la descripción de la determinación del DSC en esos tumores, como son en cáncer de ovario, cérvix o glioblastoma (56,66,230) nuestro estudio tiene un tamaño muestral mayor y además se ha centrado no solo en caracterizar los termogramas resultantes de nuestra muestra, sino que también se ha realizado la comparación con termogramas de sujetos sanos y además hemos desarrollado unos modelos estadísticos diagnósticos para poder llevarlo a la práctica clínica.

Nos basamos en el antecedente del estudio desarrollado en cáncer gástrico, donde se muestra la DSC como una técnica adecuada para detectar diferencias de proteoma/interactoma (proteínas presentes en plasma y sus interacciones) en el plasma sanguíneo de pacientes sanos frente a pacientes con cáncer gástrico, ofreciendo así una posible técnica rápida, no invasiva y de bajo coste para el diagnóstico y estadificación de pacientes con esta patología

En este estudio se aprecia claramente como los termogramas de los pacientes sanos eran diferentes de aquellos correspondientes a los pacientes con cáncer gástrico, relacionando así las diferentes interacciones entre las proteínas y sus metabolitos que se pueden producir en un paciente con ciertas patologías. Observado esto se intentó ofrecer un modelo fenomenológico para descomponer el termograma (una curva) en transiciones individuales (varias curvas dentro de ella), cada una de ellas caracterizadas por tres parámetros (altura, centro y anchura).

Con estos datos se podía observar como la relación entre diferentes parámetros estudiados podrían establecer unas diferencias sobre los termogramas y por tanto, definir grupos de pacientes pertenecientes a diferentes categorías (pacientes sanos y los diferentes estadios tumorales cada uno agrupado entre sí). La deconvolución de estos termogramas en componentes individuales permitía así una inspección rápida a los diferentes componentes dados en 2 termogramas diferentes.

Sin embargo, este estudio con cáncer de estómago se basa en la medición de las diferencias observadas y la agrupación en diferentes categorías dependiendo de los resultados obtenidos en el termograma. Con nuestro estudio de cáncer de pulmón queremos ir más allá, creando un modelo predictivo multiparamétrico que nos permita distinguir entre pacientes sanos y pacientes enfermos a través de un único parámetro que englobe toda la información para que ayude al facultativo en la toma de decisiones.

Otro antecedente importante en nuestro trabajo es el desarrollado por el grupo de la Dra. Karolina Kedra (68) en el que estudiaron pacientes con cáncer de pulmón (11 pacientes con 5 de grupo control) que habían recibido tratamiento quimioterápico y estudiaban las diferencias entre los diferentes grupos, así como la evolución de los termogramas según la respuesta al tratamiento, apreciando como las curvas se iban acercando a la normalidad en caso de respuesta, pero con la limitación de que cuenta con un número muy pequeño de pacientes.

Así pues, se construyó un modelo utilizando individuos sanos y pacientes con cáncer de pulmón, con el objetivo final de aplicar el indicador predictivo en la práctica clínica para estimar la probabilidad de padecer cáncer de pulmón, siempre que haya una fuerte correlación entre el termograma de TLB sérico alterado y la presencia de cáncer de pulmón. Por lo tanto, se emplearon dos grupos de sujetos como grupo control (85 individuos sanos, HC) y grupo enfermo (114 pacientes con cáncer de pulmón, LCP).

Un análisis preliminar inicial de la distribución estadística de los 14 parámetros individuales derivados de TLB (T_{av} , G_1 , AUC_{ni} , AP_{ni} , D_{vi}) basado en los tres cuartiles Q1-3 sugirió que G_1 , AUC_{n3} , AP_{n3} , AUC_{n5} , DV_2 , DV_3 y DV_4 fueron notoriamente diferentes entre los grupos de HC y LCP. Un paso adelante consistió en realizar un análisis ROC a partir del cual G_1 , AUC_{n3} , AP_{n3} , AUC_{n5} y DV_5 emergieron como parámetros estadísticamente relevantes. El hecho de que estos dos subgrupos sólo compartan algunos elementos indica que los enfoques analíticos simples sólo proporcionarán una descripción limitada de las diferencias entre los termogramas

de TLB, y es una indicación de los posibles detalles ocultos y sutiles dentro de los termogramas.

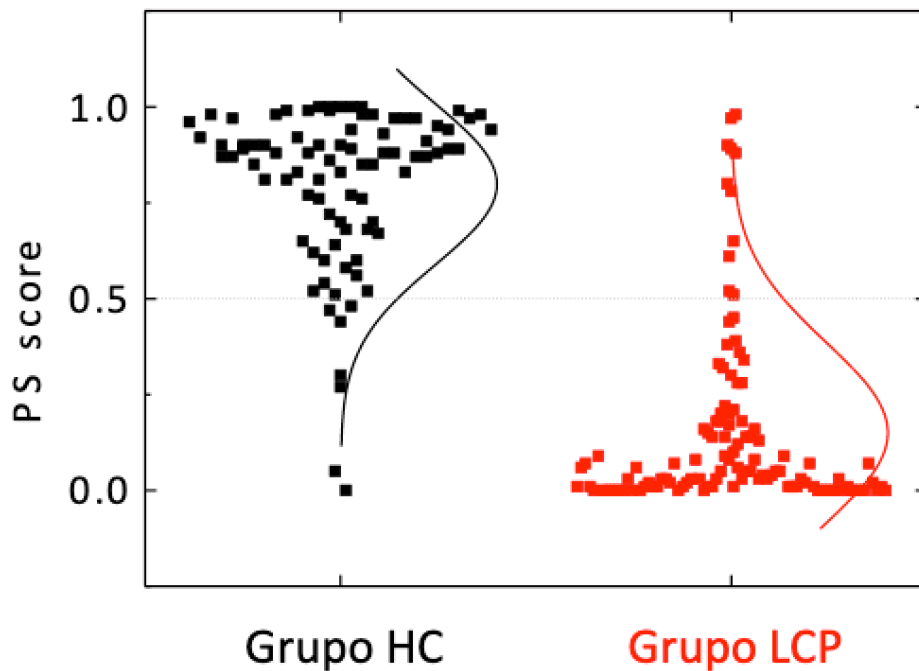
Desde el punto de vista estadístico, existe una variedad de técnicas diferentes que se pueden usar para predecir el resultado de una variable aleatoria binaria. De hecho, la mayoría de ellos no solo son útiles para hacer predicciones, sino que también ofrecen una forma de obtener una probabilidad o un tipo de índice para discriminar entre las dos opciones. Una buena descripción general de estas técnicas y su uso se puede encontrar en bibliografía. Si bien las características principales y la motivación de estas técnicas son bastante diferentes, en principio todas son válidas para nuestro objetivo: obtener un índice predictivo para clasificar a los individuos según sus termogramas de TLB que se correlacionan con la ausencia/presencia de cáncer de pulmón.

Se comparó el rendimiento de cuatro herramientas de construcción de modelos (GLM, LDA, SVM y NBC) considerando tres conjuntos de parámetros: modelo 1 basado en T_{av} , G_1 , AUC_{ni} , AP_{ni} ; modelo 2 basado en Dv_i ; y modelo 3 basado en el conjunto completo de 14 parámetros. GLM superó a las otras tres herramientas al usar estos tres conjuntos de parámetros. Por lo tanto, se seleccionó GLM para construir un índice de probabilidad (PS) a partir de parámetros derivados de TLB porque permite construir y comparar el ajuste de diferentes modelos en función de sus parámetros y podría ser posible medir la importancia relativa de los parámetros derivados de TLB para clasificar personas enfermas/sanas. Este PS tiene unos valores que van de 0 a 1, según sea perfil de enfermo o sano, respectivamente. Es importante tener en cuenta que el objetivo final es doble: 1) realizar una clasificación adecuada de individuos sanos y enfermos con TLB; y 2) proporcionar un índice cuantitativo que puede interpretarse como la probabilidad de que una persona se encuentre en una condición de cáncer de pulmón o de buena salud según TLB. Por lo tanto, las técnicas ROC no serán de interés y la comparación de modelos no será la más adecuada para este objetivo más allá del rendimiento en términos de clasificación.

La aplicación de GLM reveló diferentes subconjuntos de parámetros derivados de TLB estadísticamente relevantes ($p < 0.05$) para discriminar entre los grupos de HC y LCP según los modelos multiparamétricos: T_{av} , G_1 y AUC_{n3} para el modelo 1, Dv_3 y Dv_5 para el modelo 2 y T_{av} , G_1 , AUC_{n3} , AUC_{n4} , AP_{n4} , AUC_{n5} y Dv_4 para el modelo 3. Curiosamente, este subconjunto de parámetros relevantes de TLB coincide parcialmente con aquellos subconjuntos identificados con el análisis preliminar inicial.

Aunque con escasa diferencia en comparación con el modelo 1, el modelo 3 ofrece el mejor rendimiento al usar GLM. El puntaje de PS obtenido con GLM y el modelo 3 da como resultado una tasa de éxito del 91% en la clasificación adecuada de los sujetos en personas sanas y enfermas con cáncer de pulmón, sensibilidad del 90% (tasa del 10% de falsos positivos) y especificidad del 92% (tasa del 8% de falsos negativos), lo que llevaría a una *odds ratio* de diagnóstico de a una de 104., lo que supone una fuerte relación de los resultados obtenidos con la concordancia de estado sano/enfermo del sujeto.

Estos índices apoyan una fuerte correlación entre el indicador PS y la ausencia/presencia de cáncer de pulmón. De hecho, existe una diferencia intergrupar pronunciada en la distribución del indicador PS para los grupos de HC y LCP: en HC, el índice PS medio es de 0,88, mientras que en la de LCP el índice PS medio es de 0,05.



Un buen indicador predictivo para la práctica clínica no debe tener ningún sesgo con respecto a ningún factor que no esté directamente relacionado con la enfermedad a la que se dirige. Por lo tanto, en nuestro caso, el índice PS no debe mostrar diferencias en su distribución según el sexo y la edad dentro del grupo HC. Sin embargo, en el grupo LCP, podría haber cierta influencia del género o la edad en la distribución del índice PS si el cáncer de pulmón exhibiera características diferenciales específicas según el género y la edad. De acuerdo con los resultados, no hay influencia del género ni de la edad en el índice PS en los grupos de HC y LCP.

Con respecto a los pacientes con cáncer de pulmón, sería razonable suponer que el género no debería tener ninguna influencia en la enfermedad, pero podría existir una correlación entre el PS y la edad, ya que es bien sabido que la edad es un factor de riesgo importante para la enfermedad en estudio (cáncer). Sin embargo, el grupo de LCP está formado por sujetos que ya padecen cáncer de pulmón y, por lo tanto, todos los individuos de LCP ya muestran valores de PS pequeños. Con el fin de observar una cierta correlación entre el indicador de PS y la edad, debemos considerar un conjunto más general de sujetos (es decir, con una clasificación a

priori desconocida con respecto a la presencia de cáncer de pulmón); luego, el puntaje de PS debe mostrar una leve tendencia decreciente a medida que aumenta la edad, ya que la reducción depende de la incidencia de cáncer en los diferentes rangos de edad.

Por otro lado, podría ser razonable esperar que los datos clínicos de los pacientes (diagnóstico, estadio del tumor, tratamiento y respuesta) puedan tener cierta influencia en la distribución del índice de la PS. De acuerdo con los resultados, la distribución del indicador PS no muestra dependencia en el tipo de tumor (diagnóstico) ni en el estadio del tumor. Muy interesante, aunque el tipo de tumor (diagnóstico) no influye en la distribución del valor PS, es que PS muestra valores significativamente diferentes para el adenocarcinoma y otros tumores de CPNM pleomórficos (valores medianos de 0.0672 y 0.0823), en comparación con los tumores escamosos y SCLC (valores medianos de 0.0310 y 0.0324). Sería interesante averiguar si el primer tipo de tumores indujo alteraciones mayores en las proteínas o metabolitos del suero (por ejemplo, aumento de la secreción de metabolitos o exosomas), en comparación con el último tipo de tumores. Además, además de otros cánceres de pulmón NSCLC, para los cuales solo hay 4 casos en este estudio, el cáncer de pulmón adenocarcinoma presenta la tasa más alta de falsos negativos (16%), y este es el tipo de cáncer de pulmón con mejor pronóstico. Escamoso y SCLC, siendo éste un tipo de cáncer de pulmón muy agresivo, muestran tasas falsas negativas muy bajas (6% y 3%, respectivamente) lo que resulta interesante, para así no perder diagnósticos en tumores tan agresivos.

Aunque inicialmente otro de los objetivos del estudio fue analizar la influencia del tratamiento aplicado al paciente, la respuesta al mismo finalmente no se analizó por varias razones: 1) al contrario del diagnóstico (tipo de tumor y estadio) que depende de la fisiología y la historia natural del tumor, el tratamiento aplicado depende de la decisión del oncólogo basada en múltiples factores; 2) la respuesta depende del tipo y el estadio del tumor, junto con el tratamiento seleccionado, y, por lo tanto, están involucrados muchos factores de interacción; y 3) la respuesta del paciente al tratamiento se evaluó solo 2-3 meses después de la primera intervención terapéutica, y podría ser posible que un intervalo de dos meses no

sea suficiente para evaluar de manera confiable e inferir conclusiones valiosas y precisas sobre la evolución del paciente.

Con estos datos obtenidos, nuestro estudio ofrece un paso más allá en el desarrollo de esta técnica, aportándola como un nuevo tipo de biopsia líquida que no había sido planteada previamente en otros estudios de otros grupos, aún sabiendo que es un trabajo con limitaciones, ya que se trata de un trabajo exploratorio inicial.

En lo que se refiere a las limitaciones de este estudio podemos observar que en el caso del estudio de pacientes con melanoma, el pequeño tamaño muestral no permite sacar conclusiones con alta potencia estadística, si no que ofrece una idea prometedora de los beneficios de esta técnica, requiriendo de un tamaño muestral superior para una posible validación.

En el estudio de cáncer de pulmón, observamos como limitación la distribución por estadios de la muestra recogida, ya que, aunque la muestra es mayor y estadísticamente potente, se aprecia como el mayor porcentaje de ellos se trata de estadios avanzados (principalmente estadio IV), lo que hace que los cambios fisiológicos en estos pacientes sean mayores y por tanto se presupone menos difícil de detectar. Además, de cara a una futura aplicación en el diagnóstico de estadios tempranos, que es donde se ofrece mayor beneficio clínico ante el potencial curativo de la enfermedad, se necesitarían estudios donde predomine este tipo de estadios localizados para comprobar que la TLB ofrece los mismos valores de sensibilidad y especificidad que los observados en este estudio.

Los controles sanos que han sido utilizados en este estudio corresponden a una muestra de población general, si bien no están pareados con las características de la población de estudio, ya que al tratarse de muestras obtenidas de un banco de sangre solo conocemos la distribución por edad y sexo (aunque si podemos asegurar la ausencia de enfermedad neoplásica puesto que es un requisito para la donación de sangre).

Dado que esta técnica que hemos estudiado mide las alteraciones fisiológicas que se producen en la sangre en el contexto de una enfermedad neoplásica, un posible factor de confusión, como ya se ha mencionado antes, es la existencia concomitante de una enfermedad inflamatoria, lo que podría alterar el ambiente fisiológico de la muestra. En este estudio no hemos tenido en cuenta la posible existencia de estas enfermedades o situaciones concomitantes, dado que en el momento del diseño del estudio no estaba clara esta asociación, si bien si se aseguró que la toma de la muestra se realizara separada de cualquier prueba diagnóstica invasiva o siempre previa al inicio del tratamiento quimioterápico para no verse influido por posibles factores externos o derivados del tratamiento oncoespecífico.

Pese a que en un inicio se recogieron muestras de sangre en los pacientes a los 2-3 meses del diagnóstico para valorar los cambios obtenidos tras el inicio de tratamiento y la posible predicción de respuesta mediante esta técnica en relación con la observada en las pruebas de imagen, finalmente no hemos realizado el análisis dada la dificultad de las múltiples variables de las que depende esta observación. No obstante, este apartado merece especial atención, puesto que como hemos comprobado en el estudio de melanoma la TLB puede tener resultados muy prometedores en la monitorización de los pacientes, por lo que se podría valorar el diseño de un estudio con mayor control sobre las diferentes variables que pueden jugar un papel importante en esta situación y así conocer los beneficios de esta técnica tan prometedora en ese escenario.

Este estudio se realizó previo al desarrollo e implementación de la inmunoterapia como tratamiento *standard* en el cáncer de pulmón, por lo que no valora las posibles alteraciones que el sistema inmune pueda producir en el ambiente fisiológico.

No es una biopsia para obtención de biomarcadores o material genético tumoral circulante, lo que no puede ayudar en diagnóstico específico, pero si que ofrece resultados de alta probabilidad de padecer cáncer de pulmón.

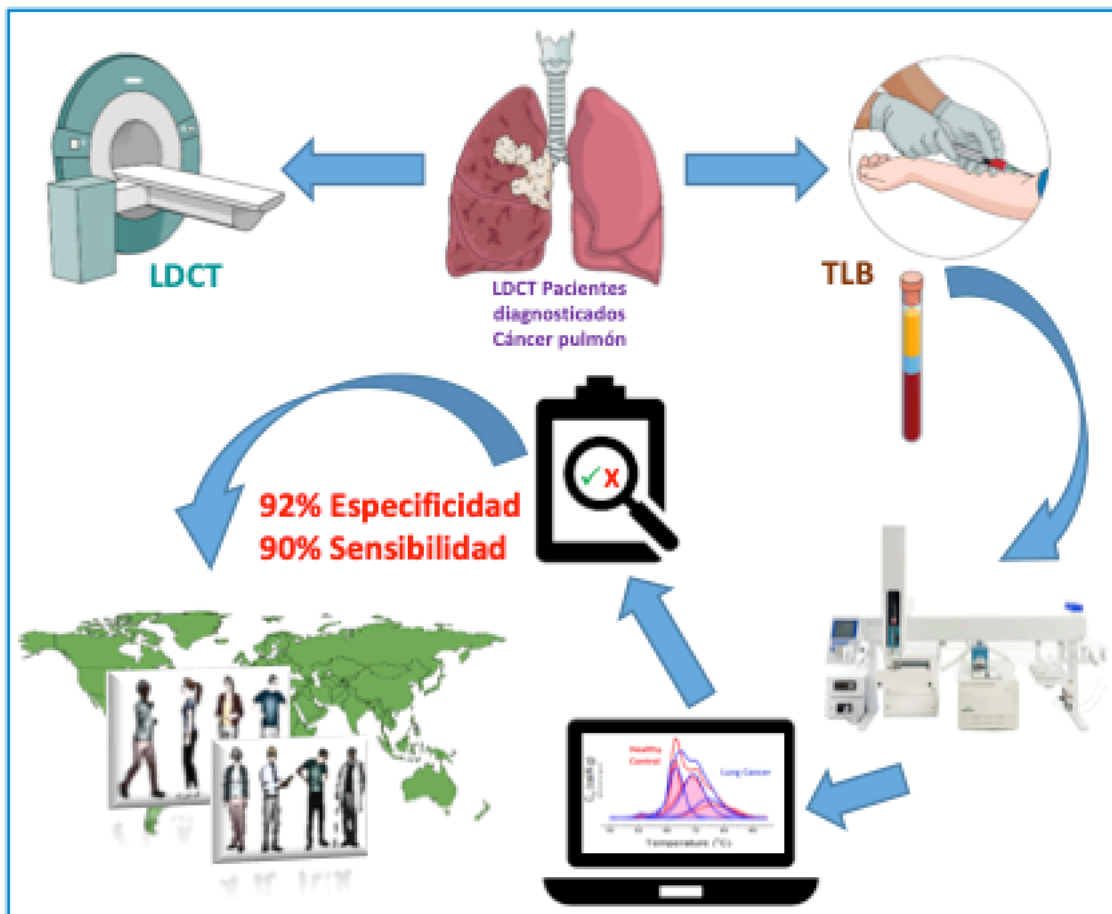
En comparación con los procedimientos tecnológicos actuales donde se requiere de procedimientos invasivos o como en la biopsia líquida basada en células tumorales circulantes y ADN que requieren de técnicas complejas y caras para inferir información sobre las características fisiológicas de los tumores, las ventajas de TLB son claras, tales como un manejo simple y rápido de la muestra: una vez que se obtiene el suero de la muestra de sangre, se puede almacenar, congelar y medir el TLB mediante una simple dilución en una solución salina tamponada con fosfato después de descongelarlo (cuando se almacena a 80 C, quedan muestras después de varios ciclos de congelación / descongelación).

Otra de las ventajas que ofrece esta técnica es la medición de alta sensibilidad: TLB es capaz de detectar cambios en la composición del suero (regulación ascendente o descendente de las principales proteínas séricas, presencia de metabolitos relacionados con el tumor que interactúan, modificación postraduccional relacionada con el tumor de las principales proteínas séricas) en las primeras etapas de la enfermedad, incluso cuando las lesiones no son visibles mediante técnicas de imagen. Esto puede suponer un alcance clínico amplio, ya que la TLB se puede aplicar a diferentes tipos de cánceres, puesto que el método de detección analítica se basa en la observación en tiempo real del estado metabólico alterado inducido por el tumor del suero de un sujeto dado en comparación con el de sujetos sanos (es decir, TLB no detecta ningún componente específico relacionado con el tumor).

Otra función que puede ofrecer este tipo de biopsia es el monitoreo cuasi en tiempo real ya que la TLB evalúa el estado de salud actual del suero del proteoma, en lugar de evaluación del riesgo de sufrir cáncer basado en biomarcadores genéticos.

Con todos los datos obtenidos en nuestro estudio y aquí presentados, podríamos considerar la idea de que TLB puede ser utilizado como herramienta de apoyo a la hora de implementar un sistema de cribado en cáncer de pulmón mediante la selección de grupos de riesgo, optimizando así las pruebas a realizar, y, por tanto, el coste-efectividad del sistema de cribado. Asociando esta técnica de TLB a la

realización de TCBD puede ofrecer una potente herramienta diagnóstica mínimamente invasiva, de bajo riesgo y de bajo coste.



La asociación de esta TLB en los escenarios anteriormente mencionados (programas de cribado, refuerzo del diagnóstico o monitorización de pacientes) requiere de estudios con mayor número de sujetos y mayor potencia estadística, pero sin duda esta nueva técnica que estamos desarrollando en este estudio puede suponer un avance en el diagnóstico temprano, y por tanto una mejora en la supervivencia de los pacientes. De ser así, podría suponer un importante avance en el estudio y manejo del cáncer de pulmón con una técnica de bajo coste y fácilmente accesible.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- Se acuña el término Biopsia Líquida Térmica (TLB) para definir a la calorimetría diferencial de barrido aplicada al análisis de suero o plasma.
- Los parámetros TLB se encuentran alterados en pacientes con melanoma comparados con los parámetros de individuos sanos, en los que no se aprecian alteraciones en los termogramas.
- Las alteraciones de parámetros TLB para pacientes de melanoma se han cuantificado mediante un único parámetro (d-valor) que permite interpretar rápidamente posibles alteraciones.
- Las alteraciones observadas en los termogramas TLB obtenidos en pacientes en seguimiento con melanoma presentan buena correlación con la evaluación clínica. Además, es posible detectar recidiva de forma mucho más temprana que mediante evaluación clínica y/o radiológica.
- Los parámetros TLB representan una descripción personalizada de cada paciente o individuo sano, basada en valores característicos de cada sujeto y su evolución temporal.
- Existen diferencias significativas entre los valores de los parámetros TLB obtenidos en pacientes con cáncer de pulmón e individuos sanos.
- Generalizando el d-valor definido en TLB para melanoma, se ha construido un indicador de probabilidad de sano/enfermo (PS) mediante un modelo multiparamétrico para clasificar a los individuos entre sanos y enfermos en cáncer de pulmón.
- Utilizando el indicador PS para cáncer de pulmón, se obtiene una tasa de éxito del 91% en clasificación (sano/enfermo), con una sensibilidad del

90% y una especificidad del 92%, y una *odds ratio* de 104, indicando una fuerte asociación de estos resultados.

7. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Global Cancer Data: GLOBOCAN 2018 | UICC [Internet]. [citado 10 de enero de 2021]. Disponible en: <https://www.uicc.org/news/global-cancer-data-globocan-2018>
2. EUCAN Connect [Internet]. [citado 8 de enero de 2021]. Disponible en: <https://eucanconnect.com/>
3. Las cifras del Cáncer en España 2020. Sociedad Española de Oncología Médica. Acceso online.
4. REDECAN - Red Española de Registros de Cáncer. [citado 8 de enero de 2021]. Disponible en: <https://redecn.org/redecn.org/es/index.html>
5. Collins FS, Varmus H. A New Initiative on Precision Medicine. *N Engl J Med*. 26 de febrero de 2015;372(9):793-5.
6. Kuntz TM, Gilbert JA. Introducing the Microbiome into Precision Medicine. *Trends Pharmacol Sci*. 1 de enero de 2017;38(1):81-91.
7. Prasad V. Perspective: The precision-oncology illusion. *Nature*. septiembre de 2016;537(7619):S63-S63.
8. Shin SH, Bode AM, Dong Z. Precision medicine: the foundation of future cancer therapeutics. *Npj Precis Oncol*. 24 de abril de 2017;1(1):1-3.
9. Bailey AM, Mao Y, Zeng J, Holla V, Johnson A, Brusco L, et al. Implementation of Biomarker-Driven Cancer Therapy: Existing Tools and Remaining Gaps. *Discov Med*. febrero de 2014;17(92):101-14.
10. Talluri R, Shete S. Using the weighted area under the net benefit curve for decision curve analysis. *BMC Med Inform Decis Mak* [Internet]. 18 de julio de 2016
11. Trends of cutaneous melanoma in The Netherlands: increasing incidence rates among all Breslow thickness categories and rising mortality rates since 1989. *Ann Oncol*. 1 de febrero de 2012;23(2):524-30.
12. National Cancer Registration and Analysis Service (NCRAS) [Internet]. GOV.UK. [citado 12 de enero de 2021]. Disponible en: <https://www.gov.uk/guidance/national-cancer-registration-and-analysis-service-ncras>
13. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SAJR, Behjati S, Biankin AV, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 22 de agosto de 2013;500(7463):415-21.
14. Green AC, Williams GM, Logan V, Stratton GM. Reduced Melanoma After Regular Sunscreen Use: Randomized Trial Follow-Up. *J Clin Oncol*. 6 de diciembre de 2010;29(3):257-63.

15. Dummer R, Siano M, Hunger RE, Lindenblatt N, Braun R, Michielin O, et al. The updated Swiss guidelines 2016 for the treatment and follow-up of cutaneous melanoma. *Swiss Med Wkly* [Internet]. 15 de febrero de 2016;146(0708).
16. Kittler H, Pehamberger H, Wolff K, Binder M. Diagnostic accuracy of dermoscopy. *Lancet Oncol*. 1 de marzo de 2002;3(3):159-65.
17. Salerni G, Carrera C, Lovatto L, Puig-Butille JA, Badenas C, Plana E, et al. Benefits of total body photography and digital dermoscopy (“two-step method of digital follow-up”) in the early diagnosis of melanoma in high-risk patients. *J Am Acad Dermatol*. julio de 2012;67(1):e17-27.
18. Esteva A, Kuprel B, Novoa RA, Ko J, Swetter SM, Blau HM, et al. Dermatologist-level classification of skin cancer with deep neural networks. *Nature*. febrero de 2017;542(7639):115-8.
19. Titus-Ernstoff L, Perry AE, Spencer SK, Gibson J, Ding J, Cole B, et al. Multiple Primary Melanoma: Two-Year Results From a Population-Based Study. *Arch Dermatol* [Internet]. 1 de abril de 2006;142(4).
20. Turner RM, Bell KJL, Morton RL, Hayen A, Francken AB, Howard K, et al. Optimizing the Frequency of Follow-Up Visits for Patients Treated for Localized Primary Cutaneous Melanoma. *J Clin Oncol*. 7 de noviembre de 2011;29(35):4641-6.
21. Nieweg OE, Kroon BBR. The Conundrum of Follow-Up: Should it be Abandoned? *Surg Oncol Clin*. 1 de abril de 2006;15(2):319-30.
22. Beyeler M, Waldispühl S, Strobel K, Joller-Jemelka HI, Burg G, Dummer R. Detection of Melanoma Relapse: First Comparative Analysis on Imaging Techniques versus S100 Protein. *Dermatology*. 2006;213(3):187-91.
23. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries - Bray - 2018 - CA: A Cancer Journal for Clinicians
24. Carioli G, Bertuccio P, Boffetta P, Levi F, Vecchia CL, Negri E, et al. European cancer mortality predictions for the year 2020 with a focus on prostate cancer. *Ann Oncol*. 1 de mayo de 2020;31(5):650-8.
25. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020;70(1):7-30.
26. Ordóñez-Mena JM, Schöttker B, Mons U, Jenab M, Freisling H, Bueno-de-Mesquita B, et al. Quantification of the smoking-associated cancer risk with rate advancement periods: meta-analysis of individual participant data from cohorts of the CHANCES consortium. *BMC Med*. 5 de abril de 2016;14(1):62.
27. Malhotra J, Malvezzi M, Negri E, Vecchia CL, Boffetta P. Risk factors for lung cancer worldwide. *Eur Respir J*. 1 de septiembre de 2016;48(3):889-902.

28. Freeman RK, Woerkom V, M J, Vyverberg A, Ascioti AJ. The effect of a multidisciplinary thoracic malignancy conference on the treatment of patients with lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1 de julio de 2010;38(1):1-5.
29. Forrest LM, McMillan DC, McArdle CS, Dunlop DJ. An evaluation of the impact of a multidisciplinary team, in a single centre, on treatment and survival in patients with inoperable non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer.* 31 de octubre de 2005;93(9):977-8.
30. Schmidt HM, Roberts JM, Bodnar AM, Kunz S, Kirtland SH, Koehler RP, et al. Thoracic Multidisciplinary Tumor Board Routinely Impacts Therapeutic Plans in Patients With Lung and Esophageal Cancer: A Prospective Cohort Study. *Ann Thorac Surg.* 1 de mayo de 2015;99(5):1719-24.
31. Ost DE, Ernst A, Lei X, Kovitz KL, Benzaquen S, Diaz-Mendoza J, et al. Diagnostic Yield and Complications of Bronchoscopy for Peripheral Lung Lesions. Results of the AQUIRE Registry. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 de enero de 2016;193(1):68-77.
32. Rivera MP, Mehta AC, Wahidi MM. Establishing the Diagnosis of Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *CHEST.* 1 de mayo de 2013;143(5):e142S-e165S.
33. Drift MA van der, Wilt G-J van der, Thunnissen FBJM, Janssen JP. A Prospective Study of the Timing and Cost-Effectiveness of Bronchial Washing During Bronchoscopy for Pulmonary Malignant Tumors. *CHEST.* 1 de julio de 2005;128(1):394-400.
34. Herth F, Becker HD, Ernst A. Conventional vs Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration: A Randomized Trial. *CHEST.* 1 de enero de 2004;125(1):322-5.
35. Chan EY, Gaur P, Ge Y, Kopas L, Santacruz JF, Gupta N, et al. Management of the Solitary Pulmonary Nodule. *Arch Pathol Lab Med.* 1 de julio de 2017;141(7):927-31.
36. Lee SM, Park CM, Lee KH, Bahn YE, Kim JI, Goo JM. C-Arm Cone-Beam CT-guided Percutaneous Transthoracic Needle Biopsy of Lung Nodules: Clinical Experience in 1108 Patients. *Radiology.* 27 de noviembre de 2013;271(1):291-300.
37. Takeshita J, Masago K, Kato R, Hata A, Kaji R, Fujita S, et al. CT-Guided Fine-Needle Aspiration and Core Needle Biopsies of Pulmonary Lesions: A Single-Center Experience With 750 Biopsies in Japan. *Am J Roentgenol.* 24 de diciembre de 2014;204(1):29-34.
38. Lim W, Ridge CA, Nicholson AG, Mirsadraee S. The 8th lung cancer TNM classification and clinical staging system: review of the changes and clinical implications. *Quant Imaging Med Surg.* agosto de 2018;8(7):709-18.

39. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 1 de enero de 2009;45(2):228-47.
40. Novello S, Barlesi F, Califano R, Cufer T, Ekman S, Levra MG, et al. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 1 de septiembre de 2016;27(suppl_5):v1-27.
41. C R, Pc M, Gv S, P B, F B, Tg B, et al. Liquid Biopsy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Statement Paper from the IASLC [Internet]. *Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2018.
42. Gadgeel SM. Personalized Therapy of Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC). En: *Lung Cancer and Personalized Medicine: Novel Therapies and Clinical Management* [Internet]. Springer, Cham; 2016. p. 203-22. (Advances in Experimental Medicine and Biology).
43. Remon J, Chaput N, Planchard D. Predictive biomarkers for programmed death-1/programmed death ligand immune checkpoint inhibitors in nonsmall cell lung cancer. *Curr Opin Oncol*. marzo de 2016;28(2):122-9.
44. Malapelle U, Bellevicine C, Luca CD, Salatiello M, Stefano AD, Rocco D, et al. EGFR mutations detected on cytology samples by a centralized laboratory reliably predict response to gefitinib in non-small cell lung carcinoma patients. *Cancer Cytopathol*. 2013;121(10):552-60.
45. Folch E, Yamaguchi N, VanderLaan PA, Kocher ON, Boucher DH, Goldstein MA, et al. Adequacy of lymph node transbronchial needle aspirates using convex probe endobronchial ultrasound for multiple tumor genotyping techniques in non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. noviembre de 2013;8(11):1438-44.
46. Garrido P, Conde E, de Castro J, Gómez-Román JJ, Felip E, Pijuan L, et al. Updated guidelines for predictive biomarker testing in advanced non-small-cell lung cancer: a National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin Transl Oncol*. 2020;22(7):989-1003.
47. Garbett NC, Miller JJ, Jenson AB, Chaires JB. Calorimetric analysis of the plasma proteome. *Semin Nephrol*. noviembre de 2007;27(6):621-6.
48. Garbett NC, Brock GN, Chaires JB, Mekmaysy CS, DeLeeuw L, Sivils KL, et al. Characterization and classification of lupus patients based on plasma thermograms. *PLoS ONE* [Internet]. 17 de noviembre de 2017 [citado 12 de mayo de 2018];12(11).

49. Cimmperman P, Baranauskienė L, Jachimovičiūtė S, Jachno J, Torresan J, Michailovienė V, et al. A Quantitative Model of Thermal Stabilization and Destabilization of Proteins by Ligands. *Biophys J*. 1 de octubre de 2008;95(7):3222-31.
50. Garbett NC, Miller JJ, Jenson AB, Chaires JB. Calorimetry Outside the Box: A New Window into the Plasma Proteome. *Biophys J*. 15 de febrero de 2008;94(4):1377-83.
51. Garbett NC, Miller JJ, Jenson AB, Miller DM, Chaires JB. Interrogation of the Plasma Proteome with Differential Scanning Calorimetry. *Clin Chem*. 1 de noviembre de 2007;53(11):2012-4.
52. Differential scanning calorimetry of blood plasma for clinical diagnosis and monitoring. *Exp Mol Pathol*. 1 de junio de 2009;86(3):186-91.
53. Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability. *Arch Biochem Biophys*. 1 de marzo de 2013;531(1-2):100-9.
54. Garbett NC, Mekmaysy CS, DeLeeuw L, Chaires JB. Clinical application of plasma thermograms. Utility, practical approaches and considerations. *Methods San Diego Calif*. abril de 2015;76:41-50.
55. Garbett NC, Merchant ML, Chaires JB, Klein JB. Calorimetric Analysis of the Plasma Proteome: Identification of Type 1 Diabetes Patients With Early Renal Function Decline. *Biochim Biophys Acta*. octubre de 2013;1830(10):4675-80.
56. Garbett NC, Merchant ML, Helm CW, Jenson AB, Klein JB, Chaires JB. Detection of cervical cancer biomarker patterns in blood plasma and urine by differential scanning calorimetry and mass spectrometry. *PLoS One*. 2014;9(1):e84710.
57. Aa C, C Q, N D, Ld H, Am C, Rl J. Differential scanning calorimetry of gliomas: a new tool in brain cancer diagnostics? *Neurosurgery*. 1 de agosto de 2013;73(2):289-95; discussion 295.
58. Fekecs T, Zapf I, Ferencz A, Lőrinczy D. Differential scanning calorimetry (DSC) analysis of human plasma in melanoma patients with or without regional lymph node metastases. *J Therm Anal Calorim*. 1 de abril de 2012;108(1):149-52.
59. Krumova S, Rukova B, Todinova S, Gartcheva L, Milanova V, Toncheva D, et al. Calorimetric monitoring of the serum proteome in schizophrenia patients. *Thermochim Acta*. 20 de noviembre de 2013;572:59-64.
60. Mehdi M, Fekecs T, Zapf I, Ferencz A, Lőrinczy D. Differential scanning calorimetry (DSC) analysis of human plasma in different psoriasis stages. *J Therm Anal Calorim*. 1 de marzo de 2013;111(3):1801-4.

61. Michnik A, Drzazga Z, Michalik K, Barczyk A, Santura I, Sozańska E, et al. Differential scanning calorimetry study of blood serum in chronic obstructive pulmonary disease. *J Therm Anal Calorim.* 1 de octubre de 2010;102(1):57-60.
62. Todinova S, Krumova S, Gartcheva L, Roberst C, Taneva SG. Microcalorimetry of Blood Serum Proteome: A Modified Interaction Network in the Multiple Myeloma Case. *Anal Chem.* 15 de octubre de 2011;83(20):7992-8.
63. S T, S K, P K, V D, L D, Z D, et al. Calorimetry-based profiling of blood plasma from colorectal cancer patients. *Biochimica et biophysica acta.* 2012.
64. DSC analysis of human plasma in breast cancer patients. *Thermochim Acta.* 20 de septiembre de 2011;524(1-2):88-91.
65. Statistical analysis of plasma thermograms measured by differential scanning calorimetry. *Biophys Chem.* 1 de noviembre de 2010;152(1-3):184-90.
66. Kim NA, Jin JH, Kim K-H, Lim DG, Cheong H, Kim YH, et al. Investigation of early and advanced stages in ovarian cancer using human plasma by differential scanning calorimetry and mass spectrometry. *Arch Pharm Res.* mayo de 2016;39(5):668-76.
67. Vega S, Garcia-Gonzalez MA, Lanas A, Velazquez-Campoy A, Abian O. Deconvolution analysis for classifying gastric adenocarcinoma patients based on differential scanning calorimetry serum thermograms. *Sci Rep.* 23 de enero de 2015;5:7988.
68. Kędra-Królik K, Chmielewska I, Michnik A, Zarzycki P. Blood Serum Calorimetry Indicates the Chemotherapeutic Efficacy in Lung Cancer Treatment. *Sci Rep* [citado 13 de mayo de 2018];7.
69. Dama E, Melocchi V, Colangelo T, Cuttano R, Bianchi F. Deciphering the Molecular Profile of Lung Cancer: New Strategies for the Early Detection and Prognostic Stratification. *J Clin Med.* enero de 2019;8(1):108.
70. Patz EF, Pinsky P, Gatsonis C, Sicks JD, Kramer BS, Tammemägi MC, et al. Overdiagnosis in Low-Dose Computed Tomography Screening for Lung Cancer. *JAMA Intern Med.* 1 de febrero de 2014;174(2):269-74.
71. Reduced Lung-Cancer Mortality with Low-Dose Computed Tomographic Screening. *N Engl J Med.* 4 de agosto de 2011;365(5):395-409.
72. Iersel CA van, Koning HJ de, Draisma G, Mali WPTM, Scholten ET, Nackaerts K, et al. Risk-based selection from the general population in a screening trial: Selection criteria, recruitment and power for the Dutch-Belgian randomised lung cancer multi-slice CT screening trial (NELSON). *Int J Cancer.* 2007;120(4):868-74.

73. Oudkerk M, Devaraj A, Vliegenthart R, Henzler T, Prosch H, Heussel CP, et al. European position statement on lung cancer screening. *Lancet Oncol*. 1 de diciembre de 2017;18(12):e754-66.
74. Fu M, Travier N, Martín-Sánchez JC, Martínez-Sánchez JM, Vidal C, Garcia M. Identifying high-risk individuals for lung cancer screening: Going beyond NLST criteria. *PLoS ONE* [Internet]. 5 de abril de 2018;13(4).
75. Koning HD, Aalst CVD, Haaf KT, Oudkerk M. PL02.05 Effects of Volume CT Lung Cancer Screening: Mortality Results of the NELSON Randomised-Controlled Population Based Trial. *J Thorac Oncol*. 1 de octubre de 2018;13(10):S185.
76. Benzaquen J, Boutros J, Marquette C, Delingette H, Hofman P. Lung Cancer Screening, towards a Multidimensional Approach: Why and How? *Cancers*;11(2).
77. Moyer VA. Screening for Lung Cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *Ann Intern Med*. 4 de marzo de 2014;160(5):330-8.
78. Katki HA, Kovalchik SA, Petito LC, Cheung LC, Jacobs E, Jemal A, et al. Implications of 9 risk prediction models for selecting ever-smokers for CT lung-cancer screening. *Ann Intern Med*. 3 de julio de 2018;169(1):10-9.
79. ten Haaf K, Jeon J, Tammemägi MC, Han SS, Kong CY, Plevritis SK, et al. Risk prediction models for selection of lung cancer screening candidates: A retrospective validation study. *PLoS Med* [Internet]. 4 de abril de 2017
80. Kaaks R, Hüsing A, Fortner RT. Selecting high-risk individuals for lung cancer screening; the use of risk prediction models vs. simplified eligibility criteria. *Ann Transl Med*;5(20).
81. van Klaveren RJ, Oudkerk M, Prokop M, Scholten ET, Nackaerts K, Vernhout R, et al. Management of Lung Nodules Detected by Volume CT Scanning. *N Engl J Med*. 3 de diciembre de 2009;361(23):2221-9.
82. Sverzellati N, Silva M, Calareso G, Galeone C, Marchianò A, Sestini S, et al. Low-dose computed tomography for lung cancer screening: comparison of performance between annual and biennial screen. *Eur Radiol*. 1 de noviembre de 2016;26(11):3821-9.
83. Paci E, Puliti D, Pegna AL, Carrozzi L, Picozzi G, Falaschi F, et al. Mortality, survival and incidence rates in the ITALUNG randomised lung cancer screening trial. *Thorax*. 1 de septiembre de 2017;72(9):825-31.
84. Infante M, Cavuto S, Lutman FR, Passera E, Chiarenza M, Chiesa G, et al. Long-Term Follow-up Results of the DANTE Trial, a Randomized Study of Lung Cancer Screening with Spiral Computed Tomography. *Am J Respir Crit Care Med*. 11 de marzo de 2015;191(10):1166-75.

85. Wille MMW, Dirksen A, Ashraf H, Saghir Z, Bach KS, Brodersen J, et al. Results of the Randomized Danish Lung Cancer Screening Trial with Focus on High-Risk Profiling. *Am J Respir Crit Care Med*. 20 de octubre de 2015;193(5):542-51.
86. Becker N, Motsch E, Gross M-L, Eigentopf A, Heussel CP, Dienemann H, et al. Randomized Study on Early Detection of Lung Cancer with MSCT in Germany: Results of the First 3 Years of Follow-up After Randomization. *J Thorac Oncol*. 1 de junio de 2015;10(6):890-6.
87. Jk F, Sw D, Dr B, Ke B, A D, T E, et al. The UK Lung Cancer Screening Trial: a pilot randomised controlled trial of low-dose computed tomography screening for the early detection of lung cancer. *Health Technol Assess [Internet]*. 24 de mayo de 2016
88. Bach PB, Kattan MW, Thornquist MD, Kris MG, Tate RC, Barnett MJ, et al. Variations in Lung Cancer Risk Among Smokers. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 19 de marzo de 2003;95(6):470-8.
89. Spitz MR, Hong WK, Amos CI, Wu X, Schabath MB, Dong Q, et al. A Risk Model for Prediction of Lung Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2 de mayo de 2007;99(9):715-26.
90. Cassidy A, Myles JP, van Tongeren M, Page RD, Liloglou T, Duffy SW, et al. The LLP risk model: an individual risk prediction model for lung cancer. *Br J Cancer*. 29 de enero de 2008;98(2):270-6.
91. Tammemägi MC, Katki HA, Hocking WG, Church TR, Caporaso N, Kvale PA, et al. Selection Criteria for Lung-Cancer Screening. *N Engl J Med*. 21 de febrero de 2013;368(8):728-36.
92. M S, A L, A D, N K, M G-C, Mg D, et al. Liquid biopsy for lung cancer early detection [Internet]. *Journal of thoracic disease*. 2018
93. Hofman P. Liquid biopsy for early detection of lung cancer. *Curr Opin Oncol*. enero de 2017;29(1):73-8.
94. Ilie M, Hofman V, Long-Mira E, Selva E, Vignaud J-M, Padovani B, et al. "Sentinel" Circulating Tumor Cells Allow Early Diagnosis of Lung Cancer in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PLoS ONE [Internet]*. 31 de octubre de 2014;9(10).
95. Hofman VJ, Ilie M, Hofman PM. Detection and characterization of circulating tumor cells in lung cancer: Why and how? *Cancer Cytopathol*. 2016;124(6):380-7.
96. Leroy S, Benzaquen J, Mazzetta A, Marchand-Adam S, Padovani B, Israel-Biet D, et al. Circulating tumour cells as a potential screening tool for lung cancer (the AIR study): protocol of a prospective multicentre cohort study in France. *BMJ Open*. 1 de diciembre de 2017;7(12):e018884.

97. Wozniak MB, Scelo G, Muller DC, Mukeria A, Zaridze D, Brennan P. Circulating MicroRNAs as Non-Invasive Biomarkers for Early Detection of Non-Small-Cell Lung Cancer. *PLOS ONE*. 12 de mayo de 2015;10(5):e0125026.
98. Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in Cancer: Small Molecules With a Huge Impact. *J Clin Oncol*. 1 de diciembre de 2009;27(34):5848-56.
99. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci*. 29 de julio de 2008;105(30):10513-8.
100. Lambin P, Leijenaar RTH, Deist TM, Peerlings J, Jong EEC de, Timmeren J van, et al. Radiomics: the bridge between medical imaging and personalized medicine. *Nat Rev Clin Oncol*. diciembre de 2017;14(12):749-62.
101. Grossmann P, Stringfield O, El-Hachem N, Bui MM, Rios Velazquez E, Parmar C, et al. Defining the biological basis of radiomic phenotypes in lung cancer.
102. Zhou M, Leung A, Echegaray S, Gentles A, Shrager JB, Jensen KC, et al. Non-Small Cell Lung Cancer Radiogenomics Map Identifies Relationships between Molecular and Imaging Phenotypes with Prognostic Implications. *Radiology*. 20 de julio de 2017;286(1):307-15.
103. NCIN Homepage [Internet]. [citado 8 de enero de 2021]. Disponible en: <http://www.ncin.org.uk/home>
104. Finotti A, Allegretti M, Gasparello J, Giacomini P, Spandidos DA, Spoto G, et al. Liquid biopsy and PCR-free ultrasensitive detection systems in oncology (Review). *Int J Oncol*. 6 de agosto de 2018;53(4):1395-434.
105. Hofman P. Liquid Biopsy and Therapeutic Targets: Present and Future Issues in Thoracic Oncology. *Cancers* [Internet]. 10 de noviembre de 2017;9(11).
106. Stanciu J, Tariman JD. Liquid Biopsy: A Tool for the Diagnostic and Prognostic Evaluation of Cancers. *Clin J Oncol Nurs*. 1 de febrero de 2020;24(1):19-21.
107. Rubis GD, Krishnan SR, Bebawy M. Liquid Biopsies in Cancer Diagnosis, Monitoring, and Prognosis. *Trends Pharmacol Sci*. 1 de marzo de 2019;40(3):172-86.
108. Keller L, Pantel K. Unravelling tumour heterogeneity by single-cell profiling of circulating tumour cells. *Nat Rev Cancer*. octubre de 2019;19(10):553-67.
109. Liquid biopsy for cancer patients: Principles and practice. *Pathogenesis*. 1 de enero de 2015;2(1-2):1-4.
110. E H, P U, Jb G. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer [Internet]. *Clinical chemistry*. 2015 [citado 5 de enero de 2021].

111. Lewis AR, Valle JW, McNamara MG. Pancreatic cancer: Are «liquid biopsies» ready for prime-time? *World J Gastroenterol.* 28 de agosto de 2016;22(32):7175-85.
112. Kwapisz D. The first liquid biopsy test approved. Is it a new era of mutation testing for non-small cell lung cancer? *Ann Transl Med* [Internet]. febrero de 2017;5(3).
113. Domínguez-Vigil IG, Moreno-Martínez AK, Wang JY, Roehrl MHA, Barrera-Saldaña HA. The dawn of the liquid biopsy in the fight against cancer. *Oncotarget.* 8 de diciembre de 2017;9(2):2912-22.
114. Chen D, Xu T, Wang S, Chang H, Yu T, Zhu Y, et al. Liquid Biopsy Applications in the Clinic. *Mol Diagn Ther.* 1 de abril de 2020;24(2):125-32.
115. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* septiembre de 2017;14(9):531-48.
116. Jf M, S J-N, J P, Jc M, Jl C. Induction of apoptosis increases sensitivity to detect cancer mutations in plasma [Internet]. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990).* 2020
117. D M, M W, K B, M Z, J N, S S, et al. Plasma DNA integrity as a biomarker for primary and metastatic breast cancer and potential marker for early diagnosis [Internet]. *Breast cancer research and treatment.* 2014
118. M F, G G, S S, D B, L L, L B, et al. Quantitative and qualitative characterization of plasma DNA identifies primary and recurrent colorectal cancer [Internet]. *Cancer letters.* 2008
119. G S, D C, L M, S LV, L R, C L, et al. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients [Internet]. *Cancer research.* 2001
120. A E, C C, M L, M M, G C. Liquid biopsies for solid tumors: Understanding tumor heterogeneity and real time monitoring of early resistance to targeted therapies [Internet]. *Pharmacology & therapeutics.* 2016 [
121. Liquid biopsy analysis in cancer diagnostics. *Mol Aspects Med.* 1 de abril de 2020;72:100839.
122. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Sci Transl Med.* 19 de febrero de 2014;6(224):224ra24.
123. Braig F, März M, Schieferdecker A, Schulte A, Voigt M, Stein A, et al. Epidermal growth factor receptor mutation mediates cross-resistance to panitumumab and cetuximab in gastrointestinal cancer. *Oncotarget.* 14 de marzo de 2015;6(14):12035-47.

124. Carvalho J, Oliveira C. Extracellular Vesicles – Powerful Markers of Cancer EVolution. *Front Immunol* [Internet]. 1
125. Liskova A, Samec M, Koklesova L, Giordano FA, Kubatka P, Golubnitschaja O. Liquid Biopsy is Instrumental for 3PM Dimensional Solutions in Cancer Management. *J Clin Med*
126. Arneth B. Update on the types and usage of liquid biopsies in the clinical setting: a systematic review. *BMC Cancer* [Internet]. 4 de mayo de 2018;18.
127. Brevet M, Johnson ML, Azzoli CG, Ladanyi M. Detection of EGFR mutations in plasma DNA from lung cancer patients by mass spectrometry genotyping is predictive of tumor EGFR status and response to EGFR inhibitors. *Lung Cancer Amst Neth*. julio de 2011;73(1):96-102.
128. Circulating tumor DNA—From bench to bedside. *Curr Probl Cancer*. 1 de mayo de 2017;41(3):212-21.
129. Zhao X, Han R-B, Zhao J, Wang J, Yang F, Zhong W, et al. Comparison of Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Statuses in Tissue and Plasma in Stage I–IV Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Respiration*. 2013;85(2):119-25.
130. Manicone M, Poggiana C, Facchinetti A, Zamarchi R. Critical issues in the clinical application of liquid biopsy in non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis*. octubre de 2017;9(Suppl 13):S1346-58.
131. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med*. 19 de agosto de 2004;351(8):781-91.
132. Krebs MG, Sloane R, Priest L, Lancashire L, Hou J-M, Greystoke A, et al. Evaluation and Prognostic Significance of Circulating Tumor Cells in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 21 de marzo de 2011;29(12):1556-63.
133. Sefrioui D, Blanchard F, Toure E, Basile P, Beaussire L, Dolfus C, et al. Diagnostic value of CA19.9, circulating tumour DNA and circulating tumour cells in patients with solid pancreatic tumours. *Br J Cancer*. 26 de septiembre de 2017;117(7):1017-25.
134. van der Toom EE, Verdone JE, Gorin MA, Pienta KJ. Technical challenges in the isolation and analysis of circulating tumor cells. *Oncotarget*. 10 de agosto de 2016;7(38):62754-66.
135. Micalizzi DS, Maheswaran S, Haber DA. A conduit to metastasis: circulating tumor cell biology. *Genes Dev*. 15 de septiembre de 2017;31(18):1827-40.
136. Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Lefort F, et al. The Origin and Mechanism of Circulating DNA. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;906(1):161-8.

137. Diaz LA, Bardelli A. Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA. *J Clin Oncol.* 20 de febrero de 2014;32(6):579-86.
138. Ulz P, Auer M, Heitzer E. Detection of Circulating Tumor DNA in the Blood of Cancer Patients: An Important Tool in Cancer Chemoprevention. En: *Cancer Chemoprevention [Internet]*. Humana Press, New York, NY; 2016. p. 45-68. (Methods in Molecular Biology).
139. Crowley E, Nicolantonio FD, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol.* agosto de 2013;10(8):472-84.
140. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer.* junio de 2011;11(6):426-37.
141. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med.* septiembre de 2008;14(9):985-90.
142. Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclov NCW, Modlin LA, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med.* mayo de 2014;20(5):548-54.
143. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer.* abril de 2017;17(4):223-38.
144. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 8 de noviembre de 2005;102(45):16368-73.
145. Circulating Tumor DNA as Biomarkers for Cancer Detection. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 1 de abril de 2017;15(2):59-72.
146. Heijnen HFG, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated Platelets Release Two Types of Membrane Vesicles: Microvesicles by Surface Shedding and Exosomes Derived From Exocytosis of Multivesicular Bodies and α -Granules. *Blood.* 1 de diciembre de 1999;94(11):3791-9.
147. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics.* 10 de septiembre de 2010;73(10):1907-20.
148. Luo W, Rao M, Qu J, Luo D. Applications of liquid biopsy in lung cancer-diagnosis, prognosis prediction, and disease monitoring. *Am J Transl Res.* 15 de diciembre de 2018;10(12):3911-23.
149. Pol E van der, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles. *Pharmacol Rev.* 1 de julio de 2012;64(3):676-705.

150. Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in Tumor Microenvironment Influence Cancer Progression and Metastasis. *J Mol Med Berl Ger.* abril de 2013;91(4):431-7.
151. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen T-L, Rodrigues G, Hashimoto A, Mark MT, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature.* noviembre de 2015;527(7578):329-35.
152. Salma K, M.s JJ, R AJ, A VMM, S PJ, David T, et al. The Application of Membrane Vesicles for Cancer Therapy. *Adv Cancer Ther [Internet].* 21 de noviembre de 2011
153. Mayo-de-las-Casas C, Jordana-Ariza N, Garzón-Ibañez M, Balada-Bel A, Bertrán-Alamillo J, Viteri-Ramírez S, et al. Large scale, prospective screening of EGFR mutations in the blood of advanced NSCLC patients to guide treatment decisions. *Ann Oncol.* 1 de septiembre de 2017;28(9):2248-55.
154. Izzotti A, Carozzo S, Pulliero A, Zhabayeva D, Ravetti JL, Bersimbaev R. Extracellular MicroRNA in liquid biopsy: applicability in cancer diagnosis and prevention. *Am J Cancer Res.* 1 de julio de 2016;6(7):1461-93.
155. Pastorino U, Boeri M, Sestini S, Sabia F, Silva M, Suatoni P, et al. PL02.04 Blood MicroRNA and LDCT Reduce Unnecessary LDCT Repeats in Lung Cancer Screening: Results of Prospective BioMILD Trial. *J Thorac Oncol.* 1 de octubre de 2019;14(10):S5-6.
156. Palmirotta R, Lovero D, Cafforio P, Felici C, Mannavola F, Pellè E, et al. Liquid biopsy of cancer: a multimodal diagnostic tool in clinical oncology. *Ther Adv Med Oncol*;10.
157. Sholl LM, Aisner DL, Allen TC, Beasley MB, Cagle PT, Capelozzi VL, et al. Liquid Biopsy in Lung Cancer: A Perspective From Members of the Pulmonary Pathology Society. *Arch Pathol Lab Med.* 19 de mayo de 2016;140(8):825-9.
158. Bedard PL, Hansen AR, Ratain MJ, Siu LL. Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature.* septiembre de 2013;501(7467):355-64.
159. Kerick M, Isau M, Timmermann B, Sülthmann H, Herwig R, Krobitch S, et al. Targeted high throughput sequencing in clinical cancer Settings: formaldehyde fixed-paraffin embedded (FFPE) tumor tissues, input amount and tumor heterogeneity. *BMC Med Genomics.* 29 de septiembre de 2011;4:68.
160. Wong SQ, Li J, Tan AY-C, Vedururu R, Pang J-MB, Do H, et al. Sequence artefacts in a prospective series of formalin-fixed tumours tested for mutations in hotspot regions by massively parallel sequencing. *BMC Med Genomics.* 13 de mayo de 2014;7:23.
161. Ilié M, Hofman P. Pros: Can tissue biopsy be replaced by liquid biopsy? *Transl Lung Cancer Res.* agosto de 2016;5(4):420-3.

162. Jung A, Kirchner T. Liquid Biopsy in Tumor Genetic Diagnosis. *Dtsch Ärztebl Int.* marzo de 2018;115(10):169-74.
163. Liquid biopsies in lung cancer: The new ambrosia of researchers. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer.* 1 de diciembre de 2014;1846(2):539-46.
164. Wang J, Bettgowda C. Applications of DNA-Based Liquid Biopsy for Central Nervous System Neoplasms. *J Mol Diagn.* 1 de enero de 2017;19(1):24-34.
165. Ilie M, Hofman V, Long E, Bordone O, Selva E, Washetine K, 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? *Ann Transl Med [Internet].* noviembre de 2014;2(11).
166. Mok T, Wu Y-L, Lee JS, Yu C-J, Sriuranpong V, Sandoval-Tan J, et al. Detection and Dynamic Changes of EGFR Mutations from Circulating Tumor DNA as a Predictor of Survival Outcomes in NSCLC Patients Treated with First-line Intercalated Erlotinib and Chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 15 de julio de 2015;21(14):3196-203.
167. Oxnard GR, Paweletz CP, Kuang Y, Mach SL, O'Connell A, Messineo MM, et al. Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 de marzo de 2014;20(6):1698-705.
168. Johann DJ, Steliga M, Shin IJ, Yoon D, Arnaoutakis K, Hutchins L, et al. Liquid biopsy and its role in an advanced clinical trial for lung cancer. *Exp Biol Med.* febrero de 2018;243(3):262-71.
169. Bardelli A, Pantel K. Liquid Biopsies, What We Do Not Know (Yet). *Cancer Cell.* 13 de febrero de 2017;31(2):172-9.
170. Schmiegel W, Scott RJ, Dooley S, Lewis W, Meldrum CJ, Pockney P, et al. Blood-based detection of RAS mutations to guide anti-EGFR therapy in colorectal cancer patients: concordance of results from circulating tumor DNA and tissue-based RAS testing. *Mol Oncol.* febrero de 2017;11(2):208-19.
171. Castro-Giner F, Gkountela S, Donato C, Alborelli I, Quagliata L, Ng CKY, et al. Cancer Diagnosis Using a Liquid Biopsy: Challenges and Expectations. *Diagnostics [Internet].* 9 de mayo de 2018;8(2).
172. Mino-Kenudson M. Cons: Can liquid biopsy replace tissue biopsy?—the US experience. *Transl Lung Cancer Res.* agosto de 2016;5(4):424-7.
173. Ra M, Rvs V, Bs R, L T, K U, J K, et al. Potential Utility of Liquid Biopsy as a Diagnostic and Prognostic Tool for the Assessment of Solid Tumors: Implications in the Precision Oncology [Internet]. *Journal of clinical medicine.* 2019

174. Molina-Vila MA, Mayo-de-las-Casas C, Giménez-Capitán A, Jordana-Ariza N, Garzón M, Balada A, et al. Liquid Biopsy in Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Med [Internet]*. 23 de diciembre de 2016;3.
175. Kidess E, Jeffrey SS. Circulating tumor cells versus tumor-derived cell-free DNA: rivals or partners in cancer care in the era of single-cell analysis? *Genome Med*. 13 de agosto de 2013;5(8):70.
176. Medina Diaz I, Nocon A, Mehnert DH, Fredebohm J, Diehl F, Holtrup F. Performance of Streck cfDNA Blood Collection Tubes for Liquid Biopsy Testing. *PLoS ONE [Internet]*. 10 de noviembre de 2016;11(11).
177. Thierry AR, Mouliere F, Messaoudi SE, Mollevi C, Lopez-Crapez E, Rolet F, et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med*. abril de 2014;20(4):430-5.
178. Lefebure B, Charbonnier F, Fiore FD, Tuech JJ, Pessot FL, Michot F, et al. Prognostic Value of Circulating Mutant DNA in Unresectable Metastatic Colorectal Cancer. *Ann Surg*. febrero de 2010;251(2):275-80.
179. Hardingham JE, Kotasek D, Sage RE, Eaton MC, Pascoe VH, Dobrovic A. Detection of circulating tumor cells in colorectal cancer by immunobead-PCR is a sensitive prognostic marker for relapse of disease. *Mol Med*. noviembre de 1995;1(7):789-94.
180. Alix-Panabières C, Bartkowiak K, Pantel K. Functional studies on circulating and disseminated tumor cells in carcinoma patients. *Mol Oncol*. marzo de 2016;10(3):443-9.
181. Chan KA, Jiang P, Zheng YW, Liao GJ, Sun H, Wong J, et al. Cancer Genome Scanning in Plasma: Detection of Tumor-Associated Copy Number Aberrations, Single-Nucleotide Variants, and Tumoral Heterogeneity by Massively Parallel Sequencing. *Clin Chem*. 1 de enero de 2013;59(1):211-24.
182. Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. Relationship of Circulating Tumor Cells to Tumor Response, Progression-Free Survival, and Overall Survival in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 1 de julio de 2008;26(19):3213-21.
183. Iqbal S, Vishnubhatla S, Raina V, Sharma S, Gogia A, Deo SSV, et al. Circulating cell-free DNA and its integrity as a prognostic marker for breast cancer. *SpringerPlus [Internet]*. 17 de junio de 2015;4.
184. Dawson S-J, Tsui DWY, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin S-F, et al. Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med*. 28 de marzo de 2013;368(13):1199-209.
185. Wallwiener M, Hartkopf AD, Riethdorf S, Nees J, Sprick MR, Schönfisch B, et al. The impact of HER2 phenotype of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: a retrospective study in 107 patients. *BMC Cancer*. 14 de mayo de 2015;15(1):403.

186. Tzeng Y-DT, Chang S-E, Mei R, Javey M. Liquid Biopsy Prevents Inaccurate Her2 Status Determination by in situ Hybridization in a Patient with Invasive Ductal Adenocarcinoma of the Breast: Case Report. *Case Rep Oncol*. 21 de septiembre de 2017;10(3):857-62.
187. Couraud S, Vaca-Paniagua F, Villar S, Oliver J, Schuster T, Blanché H, et al. Noninvasive Diagnosis of Actionable Mutations by Deep Sequencing of Circulating Free DNA in Lung Cancer from Never-Smokers: A Proof-of-Concept Study from BioCAST/IFCT-1002. *Clin Cancer Res*. 1 de septiembre de 2014;20(17):4613-24.
188. Xu S, Lou F, Wu Y, Sun D-Q, Zhang J-B, Chen W, et al. Circulating tumor DNA identified by targeted sequencing in advanced-stage non-small cell lung cancer patients. *Cancer Lett*. 28 de enero de 2016;370(2):324-31.
189. Del Re M, Tiseo M, Bordi P, D'Incecco A, Camerini A, Petrini I, et al. Contribution of KRAS mutations and c.2369C > T (p.T790M) EGFR to acquired resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant NSCLC: a study on circulating tumor DNA. *Oncotarget*. 20 de enero de 2016;8(8):13611-9.
190. Paweletz CP, Sacher AG, Raymond CK, Alden RS, O'Connell A, Mach SL, et al. Bias-corrected targeted next-generation sequencing for rapid, multiplexed detection of actionable alterations in cell-free DNA from advanced lung cancer patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 de febrero de 2016;22(4):915-22.
191. Dai L-J, Wang C, Ding Z-Y. A Case-control Study Supporting the Use of Liquid Biopsy in the Targeted Therapy for Lung Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2018;19(7):1761-6.
192. Abbosh C, Birkbak NJ, Wilson GA, Jamal-Hanjani M, Constantin T, Salari R, et al. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. *Nature*. mayo de 2017;545(7655):446-51.
193. Sozzi G, Roz L, Conte D, Mariani L, Andriani F, Lo Vullo S, et al. Plasma DNA Quantification in Lung Cancer Computed Tomography Screening. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 de enero de 2009;179(1):69-74.
194. Tognela A, Spring KJ, Becker T, Caixeiro NJ, Bray VJ, Yip PY, et al. Predictive and prognostic value of circulating tumor cell detection in lung cancer: A clinician's perspective. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1 de febrero de 2015;93(2):90-102.
195. Bracht JWP, Mayo-de-las-Casas C, Berenguer J, Karachaliou N, Rosell R. The Present and Future of Liquid Biopsies in Non-Small Cell Lung Cancer: Combining Four Biosources for Diagnosis, Prognosis, Prediction, and Disease Monitoring. *Curr Oncol Rep*. 20 de julio de 2018;20(9):70.
196. Reclusa P, Taverna S, Pucci M, Durendez E, Calabuig S, Manca P, et al. Exosomes as diagnostic and predictive biomarkers in lung cancer. *J Thorac Dis*. octubre de 2017;9(Suppl 13):S1373-82.

197. Hofman V, Long E, Ilie M, Bonnetaud C, Vignaud JM, Fléjou JF, et al. Morphological analysis of circulating tumour cells in patients undergoing surgery for non-small cell lung carcinoma using the isolation by size of epithelial tumour cell (ISET) method. *Cytopathology*. 2012;23(1):30-8.
198. Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schütze K, et al. Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells. *Am J Pathol*. enero de 2000;156(1):57-63.
199. Ilie M, Long E, Butori C, Hofman V, Coelle C, Mauro V, et al. ALK-gene rearrangement: a comparative analysis on circulating tumour cells and tumour tissue from patients with lung adenocarcinoma. *Ann Oncol*. 1 de noviembre de 2012;23(11):2907-13.
200. Ilié M, Szafer-Glusman E, Hofman V, Chamorey E, Lalvée S, Selva E, et al. Detection of PD-L1 in circulating tumor cells and white blood cells from patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 1 de enero de 2018;29(1):193-9.
201. Pierga J-Y, Bidard F-C, Mathiot C, Brain E, Delaloge S, Giachetti S, et al. Circulating Tumor Cell Detection Predicts Early Metastatic Relapse After Neoadjuvant Chemotherapy in Large Operable and Locally Advanced Breast Cancer in a Phase II Randomized Trial. *Clin Cancer Res*. 1 de noviembre de 2008;14(21):7004-10.
202. van Dalum G, Stam G-J, Scholten LFA, Mastboom WJB, Vermes I, Tibbe AGJ, et al. Importance of circulating tumor cells in newly diagnosed colorectal cancer. *Int J Oncol*. 1 de marzo de 2015;46(3):1361-8.
203. Bidard F-C, Peeters DJ, Fehm T, Nolé F, Gisbert-Criado R, Mavroudis D, et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 1 de abril de 2014;15(4):406-14.
204. Huang X, Gao P, Song Y, Sun J, Chen X, Zhao J, et al. Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells detected with the CellSearch System in colorectal cancer. *BMC Cancer*. 30 de marzo de 2015;15(1):202.
205. Lindsay CR, Faugeroux V, Michiels S, Pailler E, Facchinetti F, Ou D, et al. A prospective examination of circulating tumor cell profiles in non-small-cell lung cancer molecular subgroups. *Ann Oncol*. 1 de julio de 2017;28(7):1523-31.
206. Hofman V, Bonnetaud C, Ilie MI, Vielh P, Vignaud JM, Fléjou JF, et al. Preoperative Circulating Tumor Cell Detection Using the Isolation by Size of Epithelial Tumor Cell Method for Patients with Lung Cancer Is a New Prognostic Biomarker. *Clin Cancer Res*. 15 de febrero de 2011;17(4):827-35.
207. Hou J-M, Krebs MG, Lancashire L, Sloane R, Backen A, Swain RK, et al. Clinical Significance and Molecular Characteristics of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor Microemboli in Patients With Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 17 de enero de 2012;30(5):525-32.

208. Sher Y-P, Shih J-Y, Yang P-C, Roffler SR, Chu Y-W, Wu C-W, et al. Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer Patients by Detecting Circulating Cancer Cells in the Peripheral Blood with Multiple Marker Genes. *Clin Cancer Res.* 1 de enero de 2005;11(1):173-9.
209. Wu C, Hao H, Li L, Zhou X, Guo Z, Zhang L, et al. Preliminary Investigation of the Clinical Significance of Detecting Circulating Tumor Cells Enriched from Lung Cancer Patients. *J Thorac Oncol.* 1 de enero de 2009;4(1):30-6.
210. Mouliere F, Chandrananda D, Piskorz AM, Moore EK, Morris J, Ahlborn LB, et al. Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis. *Sci Transl Med [Internet].* 7 de noviembre de 2018;10(466).
211. Rainer TH, Lam NYL. Circulating Nucleic Acids and Critical Illness. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1075(1):271-7.
212. Fabrizio D, Lieber D, Malboeuf C, Silterra J, White E, Coyne M, et al. Abstract 5706: A blood-based next-generation sequencing assay to determine tumor mutational burden (bTMB) is associated with benefit to an anti-PD-L1 inhibitor, atezolizumab. *Cancer Res.* 1 de julio de 2018;78(13 Supplement):5706-5706.
213. Koepfel F, Blanchard S, Jovelet C, Genin B, Marcaillou C, Martin E, et al. Whole exome sequencing for determination of tumor mutation load in liquid biopsy from advanced cancer patients. *PLoS ONE [Internet].* 21 de noviembre de 2017;12(11).
214. Davis AA, Chae YK, Agte S, Pan A, Simon NI, Taxter TJ, et al. Comparison of tumor mutational burden (TMB) across tumor tissue and circulating tumor DNA (ctDNA). *J Clin Oncol.* 20 de mayo de 2017;35(15_suppl):e23028-e23028.
215. Khagi Y, Goodman AM, Daniels GA, Patel SP, Sacco AG, Randall JM, et al. Hyper-Mutated Circulating Tumor DNA: Correlation with Response to Checkpoint Inhibitor-Based Immunotherapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 de octubre de 2017;23(19):5729-36.
216. Gandara DR, Kowanetz M, Mok TSK, Rittmeyer A, Fehrenbacher L, Fabrizio D, et al. Blood-based biomarkers for cancer immunotherapy: Tumor mutational burden in blood (bTMB) is associated with improved atezolizumab (atezo) efficacy in 2L+ NSCLC (POPLAR and OAK). *Ann Oncol.* septiembre de 2017;28:v460.
217. Cabel L, Proudhon C, Romano E, Girard N, Lantz O, Stern M-H, et al. Clinical potential of circulating tumour DNA in patients receiving anticancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol.* octubre de 2018;15(10):639-50.
218. Cohen JD, Li L, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, Danilova L, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science.* 23 de febrero de 2018;359(6378):926-30.

219. Louis E, Adriaensens P, Guedens W, Bigirumurame T, Baeten K, Vanhove K, et al. Detection of Lung Cancer through Metabolic Changes Measured in Blood Plasma. *J Thorac Oncol*. 1 de abril de 2016;11(4):516-23.
220. Uribarri M, Hormaeche I, Zalacain R, Lopez-Vivanco G, Martinez A, Nagore D, et al. A New Biomarker Panel in Bronchoalveolar Lavage for an Improved Lung Cancer Diagnosis. *J Thorac Oncol*. 1 de octubre de 2014;9(10):1504-12.
221. Foster MW, Morrison LD, Todd JL, Snyder LD, Thompson JW, Soderblom EJ, et al. Quantitative Proteomics of Bronchoalveolar Lavage Fluid in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J Proteome Res*. 6 de febrero de 2015;14(2):1238-49.
222. Kato Y, Nakamura H, Tojo H, Nomura M, Nagao T, Kawamura T, et al. A proteomic profiling of laser-microdissected lung adenocarcinoma cells of early lepidic-types. *Clin Transl Med [Internet]*. 3 de julio de 2015;4.
223. Li T, He J, Mao X, Bi Y, Luo Z, Guo C, et al. In situ biomarker discovery and label-free molecular histopathological diagnosis of lung cancer by ambient mass spectrometry imaging. *Sci Rep*. 25 de septiembre de 2015;5(1):1-12.
224. Wikoff WR, Grapov D, Fahrman JF, DeFelice B, Rom W, Pass H, et al. Metabolomic Markers of Altered Nucleotide Metabolism in Early Stage Adenocarcinoma. *Cancer Prev Res Phila Pa*. mayo de 2015;8(5):410-8.
225. Taus Á, Camacho L, Rocha P, Hardy-Werbin M, Pijuan L, Piquer G, et al. Dynamics of EGFR Mutation Load in Plasma for Prediction of Treatment Response and Disease Progression in Patients With EGFR-Mutant Lung Adenocarcinoma. *Clin Lung Cancer*. 1 de septiembre de 2018;19(5):387-394.e2.
226. Benincasa G, Mansueto G, Napoli C. Fluid-based assays and precision medicine of cardiovascular diseases: the 'hope' for Pandora's box? *J Clin Pathol*. 1 de diciembre de 2019;72(12):785-99.
227. Zhang X, Karunathilaka N, Senanayake S, Subramaniam VN, Chan W, Kostner K, et al. The potential prognostic utility of salivary galectin-3 concentrations in heart failure. *Clin Res Cardiol*. 1 de junio de 2020;109(6):685-92.
228. Velazquez-Campoy A, Vega S, Sanchez-Gracia O, Lanás A, Rodrigo A, Kaliappan A, et al. Thermal liquid biopsy for monitoring melanoma patients under surveillance during treatment: A pilot study. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj*. agosto de 2018;1862(8):1701-10.
229. Rodrigo A, Ojeda JL, Vega S, Sanchez-Gracia O, Lanás A, Isla D, et al. Thermal Liquid Biopsy (TLB): A Predictive Score Derived from Serum Thermograms as a Clinical Tool for Screening Lung Cancer Patients. *Cancers [Internet]*. 19 de julio de 2019;11(7).

230. Aa C, Rl J, L R, M G, Am C. Preliminary use of differential scanning calorimetry of cerebrospinal fluid for the diagnosis of glioblastoma multiforme [Internet]. Journal of neuro-oncology. 2011

8. LISTADO DE ABREVIATURAS

LISTADO DE ABREVIATURAS

AC: Adenocarcinoma

ACT: quimioterapia adyuvante

ADN: Ácido Dexosirribonucleico

AJCC: American Joint Committee on Cancer

AUC: Area Under the Curve (Área bajo la curva)

CAD: Diabetes con Enfermedad Coronaria

CEIC: Comisión Ética para la Investigación Clínica

cfDNA: cell free DNA (DNA circulante celular)

cfRNA: cell free RNA (RNA circulante celular)

ctDNA: circulating tumor DNA (DNA tumoral circular)

ctRNA: circulating tumor RNA (RNA tumoral circulante)

CIBA: Centro de Investigación Biomédica de Aragón

CPNM: Cáncer de Pulmón No Microcítico

CPM: Cáncer de Pulmón Microcítico

CTCs: Células Tumorales Circulantes

DSC: Differential Scanning Calorimetry (Calorimetría Diferencial de Barrido)

EBUS: Ecobroscopia

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group (Escala)

EE: Enfermedad Estable

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor (Receptor del factor de crecimiento epidérmico)

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

ERM: Enfermedad Residual Mínima

ESMO: European Society of Medical Oncology (Sociedad Europea de Oncología Médica)

FDA: Food and Drug Administration

FISABIO: Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Generalitat Valenciana

GLM: modelos lineales binomiales generalizados con regresión logística

HC: Healthy Controls (controles sanos)

HIPPA: Ley de Transparencia y Responsabilidad de Seguro Médico

ISLET: Isolation by Size of Epitelial Tumor cells (Aislamiento por tamaño de las células tumorales epiteliales)

IASLC: International Association for the Study of Lung Cancer (Asociación Internacional para el estudio de Cáncer de Pulmón)

LCP: Lung Cancer Patients (pacientes con cáncer de pulmón)

LDA: análisis de discriminación lineal

LLP: Liverpool Lung Project

MeSH: Medical Subject Heading

MC: Controles de Melanoma

MUSP: pacientes de melanoma bajo seguimiento

mRNA: RNA mensajero

mi RNA: micro RNA

NACT: quimioterapia neoadyuvante

NBC: clasificador Naive Bayes

NCI: National Cancer Institute

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NED: No Evidencia de Enfermedad

NGS: Next Generation Sequency

NSCLC: Non Small Cell Lung Cancer (Cáncer de pulmón de células no pequeñas)

NSLT: National Lung Screening Trial

OMS: Organización Mundial de la Salud

OSHA: Occupational Safety and Health Administration

PBS: Phosphate Buffer Salin (Buffer de fosfato sódico)

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PCT: quimioterapia paliativa

PD: Progresión

PET-TAC: Tomografía por Emisión de Positrones-Tomografía Axial Computarizada

PLCO: Prostate Lung Colorectal Ovarian Screening Trial

PS: Probabilidad de Sano

RC: Respuesta Completa

RCT: Radioquimioterapia

RECIST: Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (Criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos)

RNCOS: Business Consulting Service (compañía)

ROC: curva de Característica Operativa del Receptor

RP: Respuesta Parcial

SC: Cáncer de células escamosas

SCLC: Small Cell Lung Cancer (Cáncer de pulmón de células pequeñas)

SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica

SEAP: Sociedad Española de Anatomía Patológica

SNC: Sistema Nervioso Central

SVM: Máquina de vectores de soporte para clasificación

TAC: Tomografía Axial Computarizada

TCBD: Tomografía Computarizada de Baja Dosis

TEP: Tumor Educated Platelets (Plaquetas Educadas por Tumor)

TLB: Thermal Liquid Biopsy (Biopsia Líquida Térmica)

USPSTF: United States Preventive Service Task Force

UV: UltraVioleta

9. LISTADO DE TABLAS

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1: Principales ventajas y desventajas de la biopsia líquida.

Tabla 4.1: Características demográficas y situación clínica de los participantes del estudio.

Tabla 4.2: Información clínica de los pacientes con melanoma en seguimiento.

Tabla 4.3: Estudio descriptivo de la muestra del estudio de cáncer de pulmón.

Tabla 4.4: Datos de distribución por sexos según el hábito tabáquico.

Tabla 4.5: Datos de distribución por sexos según histología.

Tabla 4.6: Datos de distribución por sexos según estadio al diagnóstico.

Tabla 4.7: Datos de distribución por sexos según la respuesta al tratamiento.

Tabla 4.8: Descriptivo completo de los 14 diferentes parámetros analizados procedentes de la TLB en el grupo HC.

Tabla 4.9: Descriptivo completo de los 14 diferentes parámetros analizados procedentes de la TLB en el grupo LCP.

Tabla 4.10: Cuartiles de parámetros derivados de TLB individuales en grupos de HC y LCP.

Tabla 4.11: Análisis de ROC para parámetros derivados de TLB individuales.

Tabla 4.12: Estudio comparativo del rendimiento de GLM, LDA, SVM y NBC en los tres modelos.

Tabla 4.13: Resumen de la aplicación de GLM a los 3 diferentes modelos.

Tabla 4.14: Comparación de modelos basada en la relación de probabilidad.

Tabla 4.15: Comparación de modelos basada en los criterios de información de Akaike y Bayesianos.

Tabla 4.16: Comparación de modelos basada en la capacidad de clasificar sujetos (por los modelos de estudio y por el test de LOO de corrección).

Tabla 4.17: Indicador PS vs género y edad

Tabla 4.18: Tablas de contingencia por género y edad

Tabla 4.19: Indicador PS vs información de historia clínica.

Tabla 4.20: Tabla de contingencia para la información de la historia clínica

10. LISTADO DE FIGURAS

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1: Incidencia estimada de tumores en la población mundial 2018-2040, ambos sexos.

Figura 1.2: Defunciones según causa de muerte por capítulos de la CIE-10 y sexo.

Figura 1.3: Tumores más frecuentemente diagnosticados en el mundo. 2018, ambos sexos.

Figura 1.4: Estimación de número de fallecimientos por tumores en la población mundial 2018-2040, ambos sexos.

Figura 1.5: Número de fallecimientos por tumores en el mundo en el año 2018, ambos sexos.

Tabla 1.6: Estimación del número de nuevos casos de cáncer en España para el año 2020

Figura 1.7: Algoritmo de diagnóstico para la prueba de biomarcadores en pacientes con CPNM avanzado.

Figura 1.8: Termograma promedio de plasma calculado a partir de muestras obtenidas de 15 individuos normales.

Figura 1.9: Termogramas determinados a partir de muestras de suero obtenidas de pacientes diabéticos con enfermedad coronaria

Figura 1.10: Termograma típico de desnaturalización de una proteína y características del termograma formado.

Figura 1.11: A. Termograma calculado obtenido de la suma de las contribuciones ponderadas de las 16 proteínas plasmáticas más abundantes. (B) Termogramas obtenidos de mezclas de proteínas plasmáticas puras.

Figura 1.12: Termogramas para proteínas plasmáticas puras individuales.

Figura 1.13: Termogramas de suero experimentales de un sujeto sano y un paciente con adenocarcinoma gástrico en estadio I.

Figura 1.14: Figura con datos del estudio NELSON apreciando las diferencias al usar el TCBD en el cribado de cáncer de pulmón.

Tabla 1.15: tabla comparativa de los estudios NLST y NELSON.

Tabla 1.16: resumen de resultados de los diferentes estudios europeos.

Figura 1.17: representación esquemática de un análisis integrado de biomarcadores circulantes (biopsia líquida) y radiómica, para mejorar el diagnóstico temprano en cáncer de pulmón según riesgo individual.

Figura 1.18: evolución del desarrollo de la biopsia líquida

Figura 1.18: número de publicaciones por año en pubmed con los diferentes términos expuestos para el año 2017.

Figura 1.19: Análisis de los tipos de líquidos más habituales utilizados para la realización de biopsias líquidas.

Figura 1.20: descripción gráfica del proceso durante la biopsia líquida.

Figura 1.21: Componentes derivados de tumores que se pueden usar como biopsia líquida para pruebas genéticas.

Figura 1.22: Resumen de las propiedades técnicas y el rendimiento de las cuatro principales plataformas de genotipado plasmático estudiadas para la detección del cáncer de pulmón de células no pequeñas en estadio temprano.

Figura 1.23: Aplicaciones potenciales de la biopsia líquida en el cáncer de pulmón de células no pequeñas durante todo el tratamiento.

Figura 3.1: cronograma del estudio.

Figura 3.2: Ejemplo del análisis de una transición obtenida por DSC para una proteína y los parámetros que se pueden obtener.

Figura 4.1: termogramas de plasma de un sujeto sano y un paciente con melanoma.

Figura 4.2: Datos multiparamétricos obtenidos de termogramas de plasma para controles sanos y controles de melanoma

Figura 4.3: Valores de AUC_n , T_{ave} y AP_n a partir de termogramas de plasma de controles sanos y controles de melanoma en una gráfica tridimensional cartesiana.

Figura 4.4: d-valor de todos los termogramas de plasma en este estudio.

Figura 4.5: Comparación longitudinal de los resultados del termograma y las evaluaciones clínicas de muestras de plasma MUSP.

Figura 4.6: Polígono para los valores normalizados de A_i y n .

Figura 4.7: Comparación longitudinal de los resultados del termograma y las evaluaciones clínicas de muestras de plasma MUSP.

Figura 4.8: Tablas de contingencia para la comparación de evaluaciones clínicas y biopsia térmica líquida (TLB) para cada caso de paciente.

Figura 4.9: Comparación longitudinal de los resultados del termograma y las evaluaciones clínicas de muestras de plasma MUSP.

Figura 4.10: gráfica descriptiva de distribución de hábito tabáquico.

Figura 4.11: gráfica descriptiva de distribución por sexos según el hábito tabáquico.

Figura 4.12: gráfica descriptiva de la distribución de pacientes según la histología tumoral.

Figura 4.13: gráfica descriptiva de distribución por sexos según las diferentes histologías.

Figura 4.14: gráfica descriptiva de la distribución de pacientes según el estadio al diagnóstico.

Figura 4.15: gráfica descriptiva de distribución por sexos según los diferentes estadios al diagnóstico.

Figura 4.16: gráfica descriptiva de la distribución de histologías en los diferentes estadios tumorales.

Figura 4.17: gráfica descriptiva de la distribución de pacientes según el tratamiento recibido.

Figura 4.18: gráfica descriptiva de la distribución de pacientes según la respuesta obtenida.

Figura 4.19: gráfica descriptiva de distribución por sexos según las diferentes respuestas al tratamiento.

Figura 4.20: Termogramas de suero TLB para individuos con HC y LCP.

Figura 4.21: Estimadores de densidad no paramétricos para los 14 parámetros individuales derivados de TLB.

Figura 4.22: Diferencias en la mediana normalizada de rango intercuartil para los parámetros individuales derivados de los termogramas de suero TLB entre los grupos de HC y LCP.

Figura 4.23: Distribución de la puntuación PS en HC y LCP.

Figura 4.24. Distribución de PS entre HC y LCP según el sexo y la edad.

Figura 4.25: Distribución de PS entre HC y LCP.

11. ANEXO 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE

Yo,, con DNI

- He leído las hojas de información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio y sobre la colección y he recibido suficiente información sobre los mismos.

He hablado con el Dr. _____

- Comprendo que mi participación es voluntaria.
- Comprendo que puedo retirarme del estudio:
 - 1) cuando quiera
 - 2) sin tener que dar explicaciones
 - 3) sin que esto repercuta en mis cuidados médicos
- Presto libremente mi conformidad para:
 - 1) Participar en el proyecto "Identificación de termogramas de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) para el diagnóstico y monitorización clínica de patologías digestivas y pulmonares" Sí No
 - 2) Que mis muestras biológicas y mis datos clínicos se incorporen a la colección de muestras con fines de investigación biomédica Patologías Pulmonares DSC y se utilicen en proyectos de investigación autorizados llevados a cabo por el grupo de investigación indicado en la hoja de información al paciente. Sí No

Quiero incluir las siguientes restricciones en el uso de mis muestras (si es el caso):

- Autorizo que se me comunique la información relevante para la mi salud derivada de la investigación con mis muestras. Sí No
- Autorizo ser contactado en el caso de que la Investigación con las muestras necesite más información Sí No

He recibido una copia firmada de este Consentimiento Informado

Firma del participante:

Fecha:

He explicado la naturaleza y el propósito del estudio al paciente mencionado

Firma del Investigador:

Fecha:

Este documento se firmará por triplicado, quedándose una copia el paciente, otra el investigador y la tercera el centro

12. ANEXO 2

**DOCUMENTO DE INFORMACIÓN AL PACIENTE
UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO PARA INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UNA COLECCIÓN**

- **Línea de investigación:** Aplicación de calorimetría a patologías.
- **Nombre de la colección:** Patologías Pulmonares DSC
- **Responsable de la colección:** Olga Abian Franco (976 555417; email: oabifra@unizar.es
Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA), Zaragoza, España

Es importante que lea detenidamente esta hoja de consentimiento informado, que comprenda su contenido y el objeto de la misma y que, en su caso, haga todas las preguntas que crea preciso acerca de la misma.

Como en cualquier estudio con fines de investigación, le recordamos que su participación, y por consiguiente la autorización que le solicitamos, es libre y voluntaria. Su aceptación implica la aceptación de las condiciones que a continuación se exponen y su denegación no ocasionará perjuicio alguno para usted.

Línea de investigación y participantes

La Dra. Olga Abian Franco forma parte del grupo Patología Digestiva (DGA B01) cuyo investigador responsable es el Dr. Ángel Lanás ~~Arbeola~~. Actualmente está desarrollando un proyecto cuyos resultados preliminares podrían ser extrapolables al ámbito de las patologías pulmonares. En dicho proyecto financiado por el Instituto de Salud Carlos III, participa como colaboradora la Dra. Dolores Isla, oncóloga especialista en pulmón, del Hospital Clínico Universitario Lozano ~~Blesa~~ de Zaragoza. En este proyecto se exploran nuevas formas de diagnóstico y monitorización de las patologías tumorales más relevantes, la respuesta a tratamiento de pacientes, evolución de la enfermedad, identificación de nuevas dianas terapéuticas de interés en el tratamiento de dichas patologías tumorales.

Utilización de las muestras

Solicitamos su autorización para, aprovechando que le tenemos que hacer una analítica general, extraerle entre 8 a 15 ml de sangre adicionales, con el objeto de incorporar sus muestras de suero y plasma a una **colección con fines de investigación biomédica**.

Esta colección se conservará en el Servicio de Digestivo del Hospital Clínico Universitario bajo la responsabilidad de la investigadora Olga Abian Franco, y será registrada por el responsable de la colección en el Registro Nacional de Biobancos, sección colecciones, que depende del Instituto de Salud Carlos III.

Las muestras de la colección podrán utilizarse únicamente en el grupo de investigación antes referido y en la línea de investigación en patologías digestivas. Todos los proyectos deberán ser previamente aprobados por un Comité Científico y un Comité Ético acreditados. En ningún caso se llevarán a cabo estudios genéticos sobre las muestras.

Requerimos también su autorización para recoger la información contenida en su historia clínica, incorporarla a la colección y utilizarla en nuestras investigaciones.

En el caso de que se suspendiese la actividad investigadora de este grupo, sus muestras podrán ser destruidas o cedidas a un biobanco oficial y autorizado según la normativa vigente, en cuyo caso volveremos a contactarle para recabar su consentimiento.

Todos los procedimientos del estudio se llevarán a cabo según lo estipulado en la Ley de Investigación Biomédica 14/2007 y el Real Decreto 1716/2011.

Beneficios e Inconvenientes

Usted no obtendrá ningún beneficio directo de los estudios que llevemos a cabo. El beneficio esperado de nuestra investigación es el avance en el diagnóstico de enfermedades.

El único inconveniente para usted es la extracción de la muestra de sangre, que siempre se hará aprovechando una analítica general necesaria para los controles rutinarios de la evolución de su enfermedad.

Si no tiene inconveniente, y así lo indica al final del documento, es posible que en el futuro tengamos que ponernos en contacto con Ud. para recabar datos o muestras adicionales, en dependencia del progreso de los resultados que se vayan obteniendo

Confidencialidad y protección de datos

Sus datos clínicos, sus muestras y la información derivada del análisis de las mismas se incluirán en una base de datos codificada, asignándoles un código numérico de forma que sólo el investigador principal y sus colaboradores puedan relacionar dichos datos con usted y su historia clínica.

Como garantía de confidencialidad, dichos datos serán tratados con las medidas de seguridad establecidas en la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de carácter personal. Usted podrá ejercer el derecho de acceso, rectificación y cancelación de los mismos en cualquier momento. Para ejercer este derecho debe ponerse en contacto con el investigador principal.

Los resultados de las investigaciones derivadas de la utilización de las muestras podrán ser publicadas en revistas científicas, pero siempre de forma que sea imposible identificar la identidad del donante.

Derecho de Revocación

Usted puede ejercer el derecho de revocación de este consentimiento cuando considere oportuno, sin que esto repercuta en sus cuidados médicos, solicitándolo al responsable de la colección. Desde ese momento ningún dato nuevo será añadido a la investigación y, además, puede exigir la destrucción de todas sus muestras extraídas previamente para evitar la realización de nuevas determinaciones.

Derecho de Información

Si está interesado en recibir información sobre los resultados generales obtenidos en relación a esta investigación podrá solicitársela al responsable de la colección.

Es posible que, durante el desarrollo de alguno de los proyectos de investigación se obtenga información relativa a su salud. El Comité de Ética que autorizó el proyecto decidirá cuándo se le debería enviar la información a usted personalmente. Al final del documento puede decidir si desea ser informado de estos resultados en el caso que se produzcan.

Asimismo, en caso de dudas respecto a sus derechos, puede dirigirse al Servicio de Atención al Paciente del hospital del centro donde firmó el consentimiento.

Le agradecemos sinceramente su colaboración, que servirá para que adquiramos mayor experiencia y podamos prestar una mejor atención a nuestros pacientes.

13. ANEXO 3

Dña. María González Hinjos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

CERTIFICA

1º. Que el CEIC Aragón (CEICA) en su reunión del día 18/11/2015, Acta Nº CP18/2015 ha evaluado la **modificación relevante** referida al estudio:

Título: Identificación de termogramas de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) para el diagnóstico y monitorización clínica de patologías digestiva.

Investigador Principal: Olga Abián Franco.

Dicha modificación propone la incorporación del HU Miguel Servet y las siguientes versiones:

Inclusión de muestras de patologías pulmonares y creación de la colección de Patologías Pulmonares DSC

Versión protocolo: octubre 2015

Versión Hoja de Información y consentimiento informado proyecto: octubre 2015

2º. Considera que

- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

3º. Por lo que este CEIC emite un **DICTAMEN FAVORABLE.**

Lo que firmo en Zaragoza, a 18 de noviembre de 2015

Fdo:


Dña. María González Hinjos
Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

14. ARTÍCULOS PUBLICADOS



Contents lists available at ScienceDirect

BBA - General Subjects

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbagen

Thermal liquid biopsy for monitoring melanoma patients under surveillance during treatment: A pilot study



Adrian Velazquez-Campoy^{a,b,c,d,e,f,g}, Sonia Vega^a, Oscar Sanchez-Gracia^f, Angel Lanas^{c,d,g,h}, Alberto Rodrigo^b, Alagammai Kaliappanⁱ, Melissa Barousse Hall^j, Taylor Q. Nguyen^k, Guy N. Brock^l, Jason A. Chesney^l, Nichola C. Garbett^{l,m,n}, Olga Abian^{a,b,c,d,k,m,n}

^a Institute of Biocomputation and Physics of Complex Systems (BIFI), Joint Units IQFR-CISC-BIF, and GBIC-CISC-BIF, Universidad de Zaragoza, Zaragoza 50018, Spain

^b Department of Biochemistry and Molecular and Cell Biology, Universidad de Zaragoza, Zaragoza 50009, Spain

^c Aragon Institute for Health Research (IS Aragon), Zaragoza, 50009, Spain

^d Centro de Investigación Biomédica en Red en el Área Temática de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Madrid, Spain

^e Fundación ARAID, Government of Aragon, Zaragoza 50018, Spain

^f Barjaque Vía, Zaragoza 50011, Spain

^g Servicio de Aparato Digestivo, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, 50009, Spain

^h Department of Medicine, University of Zaragoza, Spain

ⁱ James Graham Brown Cancer Center, Department of Medicine, University of Louisville, Louisville, KY 40202, USA

^j Department of Biomedical Informatics, College of Medicine, The Ohio State University, Columbus, OH 43210, USA

^k Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS), Zaragoza 50009, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Melanoma
Differential scanning calorimetry (DSC)
Non-invasive test
Early diagnostic and prognostic
Patient surveillance

ABSTRACT

Background: Differential Scanning Calorimetry (DSC) is a technique traditionally used to study thermally induced macromolecular transitions, and it has recently been proposed as a novel approach for diagnosis and monitoring of several diseases. We report a pilot study applying Thermal Liquid Biopsy (TLB, DSC thermograms of plasma samples) as a new clinical approach for diagnostic assessment of melanoma patients.

Methods: Multiparametric analysis of DSC thermograms of patient plasma samples collected during treatment and surveillance (63 samples from 10 patients) were compared with clinical and diagnostic imaging assessment to determine the utility of thermograms for diagnostic assessment in melanoma. Nine of the ten patients were stage 2 or 3 melanoma subjects receiving adjuvant therapy after surgical resection of their melanomas. The other patient had unresectable stage 4 melanoma and was treated with immunotherapy. Two reference groups were used: (A) 36 healthy subjects and (B) 13 samples from 8 melanoma patients who had completed successful surgical management of their disease and were determined by continued clinical assessment to have no evidence of disease.

Results: Plasma thermogram analysis applied to melanoma patients generally agrees with clinical evaluation determined by physical assessment or diagnostic imaging (~80% agreement). No false negatives were obtained from DSC thermograms. Importantly, this methodology was able to detect changes in disease status before it was identified clinically.

Conclusion: Thermal Liquid Biopsy could be used in combination with current clinical assessment for the earlier detection of melanoma recurrence and metastasis.

General significance: TLB offers advantages over current diagnostic techniques (PET/CT imaging), limited in frequency by radiation burden and expense, in providing a minimally-invasive, low-risk, low-cost clinical test for more frequent personalized patient monitoring to assess recurrence and facilitate clinical decision-making.

Abbreviations: DSC, Differential Scanning Calorimetry; CT, Computed Tomography; GAC, Gastric Adenocarcinoma; IRB, Institutional Review Board; M USP, Melanoma Under Surveillance Patients; MC, Melanoma Controls; NED, No Evidence of Disease; C_p , Heat Capacity; T, Temperature; A, Height of the peak; T_p , Center of the peak; w, Width of the peak; AUC, Area Under the Curve; AP_n, Area of the normalized heights polygon

* Correspondence to: A. Velazquez-Campoy, Fundación ARAID, Government of Aragon, Zaragoza 50018, Spain.

** Corresponding author.

*** Correspondence to: O. Abian, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS), Zaragoza 50009, Spain.

E-mail addresses: adrianve@unizar.es (A. Velazquez-Campoy), nichola.garbett@oslniv.ohio.edu (N.C. Garbett), olabira@unizar.es (O. Abian).



<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.04.020>

Received 6 February 2018; Received in revised form 13 April 2018; Accepted 24 April 2018
Available online 26 April 2018

0304-4165/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Article

Thermal Liquid Biopsy (TLB): A Predictive Score Derived from Serum Thermograms as a Clinical Tool for Screening Lung Cancer Patients

Alberto Rodrigo ¹, Jorge L. Ojeda ², Sonia Vega ³, Oscar Sanchez-Gracia ⁴, Angel Lanas ^{5,6,7,8}, Dolores Isla ^{6,9}, Adrian Velazquez-Campoy ^{3,6,8,10,11,*}  and Olga Abian ^{3,6,8,10,12,*} 

¹ Medical Oncology Department, Hospital Arnau de Vilanova, 25198 Lleida, Spain

² Department of Statistical Methods, Universidad de Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain

³ Institute of Biocomputation and Physics of Complex Systems (BIFI), Joint Units IQFR-CSIC-BIFI, and GBsC-CSIC-BIFI, Universidad de Zaragoza, 50018 Zaragoza, Spain

⁴ Enrique Val, 50011 Zaragoza, Spain

⁵ Department of Medicine, University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain

⁶ Aragon Institute for Health Research (IIS-Aragon), 50009 Zaragoza, Spain

⁷ Servicio de Aparato Digestivo, Hospital Clinico Universitario Lozano Blesa, 50009 Zaragoza, Spain

⁸ Biomedical Research Networking Center in Digestive and Hepatic Diseases (CIBERehd), 28029 Madrid, Spain

⁹ Medical Oncology Department, Hospital Clinico Universitario Lozano Blesa, 50009 Zaragoza, Spain

¹⁰ Department of Biochemistry and Molecular and Cell Biology, Universidad de Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain

¹¹ Fundacion ARAID, Government of Aragon, 50018 Zaragoza, Spain

¹² Aragon Health Sciences Institute (IACS), 50009 Zaragoza, Spain

* Correspondence: adrianvc@unizar.es (A.V.-C.); oabifra@unizar.es (O.A.);
Tel.: +34-976762996 (A.V.-C.); +34-976555417 (O.A.)

Received: 27 May 2019; Accepted: 17 July 2019; Published: 19 July 2019



Abstract: Risk population screening programs are instrumental for advancing cancer management and reducing economic costs of therapeutic interventions and the burden of the disease, as well as increasing the survival rate and improving the quality of life for cancer patients. Lung cancer, with high incidence and mortality rates, is not excluded from this situation. The success of screening programs relies on many factors, with some of them being the appropriate definition of the risk population and the implementation of detection techniques with an optimal discrimination power and strong patient adherence. Liquid biopsy based on serum or plasma detection of circulating tumor cells or DNA/RNA is increasingly employed nowadays, but certain limitations constrain its wide application. In this work, we present a new implementation of thermal liquid biopsy (TLB) for lung cancer patients. TLB provides a prediction score based on the ability to detect plasma/serum proteome alterations through calorimetric thermograms that strongly correlates with the presence of lung cancer disease (91% accuracy rate, 90% sensitivity, 92% specificity, diagnostic odds ratio 104). TLB is a quick, minimally-invasive, low-risk technique that can be applied in clinical practice for evidencing lung cancer, and it can be used in screening and monitoring actions.

Keywords: liquid biopsy; lung cancer; serum sample; differential scanning calorimetry; generalized linear models; cancer screening program