

Sonia Hermoso Durán

Biopsia Líquida Térmica en
muestras de sangre periférica:
modelos de clasificación basados
en aprendizaje automatizado para
el diagnóstico y pronóstico de
patología oncológica pancreática y
colorrectal

Director/es

Abián Franco, Olga María
Velázquez Campoy, Adrián

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



Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Tesis Doctoral

**BIOPSIA LÍQUIDA TÉRMICA EN MUESTRAS DE
SANGRE PERIFÉRICA: MODELOS DE
CLASIFICACIÓN BASADOS EN APRENDIZAJE
AUTOMATIZADO PARA EL DIAGNÓSTICO Y
PRONÓSTICO DE PATOLOGÍA ONCOLÓGICA
PANCREÁTICA Y COLORRECTAL**

Autor

Sonia Hermoso Durán

Director/es

Abián Franco, Olga María
Velázquez Campoy, Adrián

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

2024

TESIS DOCTORAL

Biopsia Líquida Térmica en muestras de sangre periférica:
modelos de clasificación basados en aprendizaje
automatizado para el diagnóstico y pronóstico de
patología oncológica pancreática y colorrectal

Memoria presentada por:

Sonia Hermoso Durán

Directores:

Olga Abián Franco

Adrián Velázquez Campoy

Universidad de Zaragoza

Programa de Doctorado de Bioquímica y Biología Molecular

2024

Memoria de Tesis Doctoral presentada por **Sonia Hermoso Durán** para optar al título de Doctora con Mención Internacional por la Universidad de Zaragoza.

Dra. **Olga Abián Franco**, Profesora titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Zaragoza e Investigadora del Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón (IIS-Aragón),

Dr. **Adrián Velázquez Campoy**, profesor titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Zaragoza e Investigador de la Fundación Agencia Aragonesa para la Investigación y el Desarrollo (ARAID),

Certifican:

Que la Tesis Doctoral *Biopsia "Líquida Térmica en muestras de sangre periférica: modelos de clasificación basados en aprendizaje automatizado para el diagnóstico y pronóstico de patología oncológica pancreática y colorrectal"* ha sido realizada por **Sonia Hermoso Durán** bajo su dirección, dentro del Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular, en el Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI) y el Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón (IIS-Aragón), y en colaboración con el Servicio de Digestivo del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza. Además, que ha realizado dos estancias fuera de España, cada una de tres meses, siendo una de ellas en el Grupo de Cáncer Pancreático del *Cancer Research Center of Marseille* (CRCM), en Marsella (Francia), y la otra en el *Kolling Institute* de la Universidad de Sídney, en Sídney (Australia), y que reúne las condiciones requeridas para optar al Grado de Doctora con Mención Internacional por la Universidad de Zaragoza.

Zaragoza, Marzo de 2024

Olga Abián Franco
Directora y tutora

Adrián Velázquez Campoy
Codirector

Sonia Hermoso Durán
Doctoranda

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la siguiente financiación:

- Plataforma PRECIPITA-2017-000201 por la Universidad de Zaragoza: “Detección rápida y sencilla de cáncer de colon”. Plataforma especializada en promover la financiación colectiva de la ciencia, *crowdfunding*.
- Proyecto FIS PI18/00349 del Instituto de Salud Carlos III (ISC-III): “Biopsia Líquida Térmica (BLT): Aplicación clínica del análisis de curvas calorimétricas de suero como nuevo método de diagnóstico y seguimiento de patología digestiva tumoral”.
- Contrato Predoctoral P-FIS (FI19/00146) del Instituto de Salud Carlos III (ISC-III): “Aplicación en el cribado de cáncer de colon de la Biopsia Líquida Térmica mediante el test multiparamétrico Foregnosis”.
- Proyecto FIS PI21/00394 del Instituto de Salud Carlos III (ISC-III): “Diagnóstico y seguimiento personalizado de pacientes con riesgo de patología digestiva tumoral mediante Biopsia Líquida Térmica (TLB) aplicando herramientas de inteligencia artificial y nanotecnología”.
- Ayuda a Investigador Predoctoral de la Fundación Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS-Aragón).
- Ayuda de Movilidad M-AES (MV2/0089) del Instituto de Salud Carlos III (ISC-III).
- Centro de Investigación Biomédica en Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERshd).
- Fundación Agencia Aragonesa para la Investigación y el Desarrollo (ARAID).
- Fundación Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón (IIS-Aragón).
- Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS).

AGRADECIMIENTOS

Fue en mi etapa en Pamplona, compartiendo piso con el actual Doctor Emilio y la Doctora Letrado, donde empecé a conocer un poco más qué era eso de hacer la tesis doctoral, el depósito, la defensa, los agradecimientos... "¿Agradecimientos?". Me preguntaba mientras pensaba que era todo un mero trámite más. Ahora que llega el momento de terminar esta etapa, entiendo perfectamente la necesidad de dar las gracias a mucha gente. Primero porque esta tesis no ha sido por el trabajo de una única persona, sino que por el trabajo en equipo y el apoyo de las personas que te rodean. En mi caso me siento muy afortunada de toda esta gente que me ha ido acompañando. Dicho esto, empezamos:

Si me remonto a los inicios, nunca hubiera pensado que un *bla-bla-car* me hubiera cambiado tanto la vida. Se comenta que hay parejas que se conocieron en un viaje compartiendo coche. Sabía que eso no me iba a pasar a mí, pero nunca imaginé que acabaría cambiando de trabajo y empezando mi periodo predoctoral tras intercambiar contactos con una chica camino a Pamplona en San Fermín, y que mi CV acabara en manos de Olga, mi actual directora. Y así fue como tras una entrevista conocí a mis directores de tesis, Olga y Adrián, a los cuales agradezco la confianza que depositaron en mí para poder exprimir al máximo este proyecto. Gracias a Olga por romper esa línea que separa lo profesional de lo personal, permitiendo que una esté más cómoda y que las reuniones sean a veces menos intensas al ir acompañadas de lecciones de numerología, de proyección positiva y otras pseudociencias que nunca fallan. Gracias a Adrián por concederme un gran poder y una gran responsabilidad. Espero haber estado a la altura. Lo que empezó como un proyecto para mejorar mi CV, se ha convertido en plantearme seguir con la carrera investigadora.

Como dije, me pasé a la investigación dejando un trabajo, el cual me dio muchísima pena por las chicas, mis "chicas Grasa", las cuales, muchas de ellas han estado ahí durante todos estos años, contándonos penas y alegrías mientras tomábamos más cafés que vinos, he de decir. Gracias a Lorena, Andrea y Susana, donde cada mensaje de ánimo se recibía como un chute de energía, además de haber compartido de las mejores meriendas cuando trabajábamos juntas. Gracias a Lorena por los consejos de limpieza de pelo. Gracias a Andrea por compartir todos sus viajes y aventuras nocturnas. Gracias a Susana por sacar a bailar a Eva. Gracias a Paula, que siempre buscábamos un hueco para ponernos al día, aunque fuese "¿quedamos en 30 minutos cuando salga de la peluquería?". Y, por supuesto a mi amiga Eva. Ella fue una de las personas que más me costó despedirme cuando dejé Zaragoza, y la principal razón es que ha sido tan importante, planteando las preguntas adecuadas en los momentos adecuados, aprender a reírnos y a sacarnos unas carcajadas. Así que muchas gracias por los mensajes enviados, conversaciones, es decir, gracias por estar y seguir ahí.

Cuando empecé con el trabajo de tesis, estuve primero como un mes en el BIFI, donde fui prácticamente la sombra de Sonia V., para aprender todo lo que pudiera del DSC. Sin ella, no habría sido capaz de utilizar sola el equipo del hospital. Además, de tener la paciencia conmigo de pedirle preparar PBS y Decon al 14% juntas. Gracias por los consejos dados y por compartir algunas experiencias bajo el mar.

Del BIFI, fui al hospital, lo que iba a ser mi segunda casa. En él tuve la suerte de conocer a la compañera de despacho más terremoto, la persona que conozco que habla más rápido sobre estadística y sin dudar en lo que está diciendo. A Patricia le tengo que agradecer la confianza y el vínculo que se ha creado entre las dos. Ella fue la "culpable" de que me pusiera a estudiar estadística y que usara R. Haber seguido ese consejo cambió totalmente mi carrera profesional, abriéndome un camino donde el aprendizaje ha sido exponencial. Igual de importantes han sido las conversaciones más personales que hemos tenido. Gracias por buscar un hueco en tu apretada agenda para poder quedar y vernos, sobre todo en el periodo postpandemia. Me hubiera gustado muchísimo que hubieras sido miembro del tribunal, ya que creo que te lo merecías, aunque ya sabes que entiendo tus justificaciones. Siempre me queda la esperanza de que vayas de oyente y me hagas una pregunta.

De los trabajadores del hospital, tengo que agradecer al Servicio de Endoscopias de Digestivo que me abrieran las puertas (literalmente) a su servicio. Era la primera vez que trabajaba con médicos, enfermeras, auxiliares, celadores y pacientes. Ha sido una experiencia de la que he aprendido mucho. Empezando por los médicos endoscopistas, gracias por dejarme interrumpir vuestra rutina de las colonoscopias para que yo pudiera reclutar a los pacientes para el estudio. Muy importante, gracias por dejarme estar en las salas de las colonoscopias mientras que vosotros trabajabais, ya que pude aprender tanto de los médicos como de las enfermeras sobre cómo tiene que ser el trato con los pacientes, cómo hablarles y explicarles sus dudas, además de saber cómo es el colon por dentro. Gracias a las enfermeras y auxiliares por ayudarme en todo lo relacionado con las tomas de muestras. Habéis tenido un papel muy importante en este proyecto. Aunque a todos les agradezco su aportación, me gustaría nombrar a esas personas con las que el acercamiento es un poco más personal. De las enfermeras, quisiera dar las gracias a María, la alegría de la huerta que se la oye desde antes de entrar a endoscopias, y con la que he compartido alguna excursión por la nieve. Si María es el *yin*, Victoria es el *yang*, y juntas son una apuesta segura de que ese día trabajando te vas contenta a casa. Del equipo médico, me gustaría primero agradecer a Domper la paciencia que ha tenido conmigo, sobre todo en mis inicios, cuando era novata y cometía mil errores. Gracias a Nuria y Cris, con las que he compartido llamadas de teléfono. Gracias a Vivi por compartir las experiencias de viajes vividas, gracias a los resis (que ahora son adjuntos) Sandra y Gonzalo, donde prácticamente nos hemos visto crecer juntos. Al grupo de páncreas liderado por Guille y Judith, donde me parecía increíble lo que aprendía de ellos cuando salía de nuestras reuniones. Gracias a vuestro enfoque clínico ha sido mucho más fácil trabajar. También me quedo con los encuentros inesperados por la montaña.

Al igual que en Grasa, donde el turno de tarde era el mejor, en el hospital no podía ser menos. Comer rápido en cinco minutos para llegar al turno de tarde merecía la pena, y sobre todo por la presencia de nuestro celador favorito, Pepe. Lo que empezó con muchas bromas, canciones de Camela, y conversaciones que parecían que no iban a ningún lado, finalmente acabó en una amistad a la que aprecio muchísimo. Esos desayunos y *brunchs* que nos hemos tomado juntos han sido imprescindibles. Las conversaciones más profundas, palabras de apoyo y ánimo acompañados de un café de especialidad y unas tostadas con aguacate, queso feta, tomate confitado y frutos secos, se degustaban al máximo. Los mensajes de voz que nos enviábamos que duraban minutos me hacían mucha compañía. En general, me siento muy afortunada de tener un amigo como él.

Seguimos en el hospital, pero nos pasamos al "confesionario", primer cuarto a la izquierda, donde están las personas que realmente me recibieron cuando empecé allí. Una de ellas es Marta, la persona que conozco cuya agenda laboral está más llena. Me asombra de ella en cuantos proyectos está metida a la vez, y lo bien que se sabe los criterios de inclusión y exclusión en cada uno de ellos. Con ella empecé a aprender a reclutar pacientes, de la cual he aprendido muchas cosas sobre cómo hablarles, tratarles, preocuparte por ellos, etc. Junto a ella está Pilar, y ambas forman un dúo donde, a nivel de compañeras de trabajo se han portado de diez. Me han ayudado en todos los problemillas que iban surgiendo. Pero además, si les contabas tus días malos y tus preocupaciones te iban a decir las palabras acertadas, y si tenías un día bueno, lo iban a celebrar contigo. Con Pilar empezamos a tener más vínculo cuando íbamos al cuarto de extracciones, donde citábamos a los pacientes. Tuve el privilegio de que ella me diera unas horitas al día para que ella realizara las extracciones de sangre. Allí, además se iniciaron conversaciones más cercanas que hacían que el trabajo fuera mucho más agradable. He aprendido mucho de ella tanto a nivel laboral, como personal, y de cómo es posible una relación en la distancia. Gracias a ambas y al equipo de enfermería de investigación donde también están las Beas.

Para terminar la parte del hospital me gustaría dar las gracias a todos los pacientes que de manera voluntaria han participado en los estudios. Sin ellos, no existiría ningún trabajo y no se avanzaría en medicina. Especialmente, me gustaría

dar las gracias a los más de 800 pacientes a los que he puesto cara. Gracias a los que me concedieron unos minutos antes de la colonoscopia, un momento que no es el más agradable, y gracias a los que me cogieron el teléfono y se fiaron de mí para participar en el estudio. La experiencia de tratar con pacientes no la había vivido antes. Pido disculpas si en algún momento no tuve la suficiente profesionalidad, sobre todo con los del principio. Algunos de ellos me han contado historias personales de las que siempre sacas una moraleja. Así que gracias por humanizar todos estos proyectos.

En paralelo junto al hospital, y en la otra punta del Zaragoza, está el BIFI. Mi presencia allí ha sido muy puntual, pero el recibimiento y el compañerismo le ha acompañado siempre. Creo que sobre todo al final de este periodo, ha sido cuando he notado mayor apoyo. Por ello, no puede faltar los agradecimientos a los ya doctores David y Ana. Con Ana he tenido momentos de quedar para hablar por cosas de trabajo, y terminar desahogándonos y apoyándonos la una a la otra terminando en un abrazo muy necesario. Gracias por sacarme a bailar. Espero que nos veamos pronto compartiendo escapadas por la naturaleza. David, mi profesor para hacer ELISAS, le agradezco las clases impartidas, el abrir una puerta que diga "si necesitas algo, dime sin problema" que hace que todo no se atragante tanto. También gracias por darnos a conocer y apreciar una fruta como es el limón. Ahora cuando como melón, no es lo mismo sin el chorrito de limón. Estoy muy afortunada de haberlos tenido como compañeros de grupo y les deseo lo mejor en la siguiente etapa.

Del resto de la gente del BIFI, aún no tengo claro si esto es correcto o no, pero gracias a los doctores BIFI-saurios, es decir, a Andrés (y Marta) por compartir su afición a la lectura; a Anita y Víctor por los juegos de mesa y cervezas artesanas; a Polanco por su calma hasta en los momentos más estresantes; a María por llegar corriendo tan lejos; a Juan por enseñarnos el monte de Huesca (su segunda casa) y a Mati por sus juegos de palabras de la que soy fan absoluta; a Pablo por enseñarnos que es posible hoy en día ser una persona que piensa en los demás, que con muy poco ya eres feliz, y por invitarnos a tu casa (Adobes, Murillo, etc.). Con la gran mayoría nos hemos visto más fuera de los laboratorios que dentro, cosa que les agradezco mucho. Así que gracias por acogerme y vivir experiencias, escapadas al monte, salidas nocturnas, juegos de mesa (incluso los creados por vosotros mismos), etc., que han hecho que todo sea más fácil y me llevo muchos recuerdos y momentos con vosotros. No pueden faltar las proto-BIFI-saurias Marta, Paula, Hajar y Javier, que son las sucesoras de los proyectos. Gracias por llegar con todas las ilusiones y proporcionar un poco de positivismo.

De la gente que he conocido en el BIFI, quisiera nombrar además a las que formamos "tres patas para un banco", es decir, a las también doctoras Martha y Patricia. Ellas aparecieron de repente y poco a poco fuimos congeniando más y pasándolo cada vez mejor, porque ese era el principal objetivo cuando quedábamos. Me he reído muchísimo con ellas, hemos compartido buenas cenas, rompecabezas, lecturas de cartas, copas de vino y hasta una mudanza. Nos hemos desahogado también juntas, intentar superar miedos, darnos consejos que posiblemente no sigamos, etc. Quedar con ellas ha sido otro respiro y recarga de energía para seguir adelante. Gracias por todo patitas.

Antes de terminar con la gente del BIFI, no puede faltar una persona que, aunque estaba como estancia en Zaragoza por un tiempo, siendo egoísta, me alegro de que el COVID no le dejara montar en el tren de vuelta a Galicia. Para muchos la pandemia nos marcó significativamente en los proyectos y en la vida en general. Pero creo que puedo decir que mi periodo predoctoral se diferencia en un antes y un después del COVID, y parte se debe a él. Le tengo que agradecer el mostrarme la vida en dos ruedas, desde un objetivo y mirando hacia el cielo, el ser consciente de cuantos pajaritos nos rodean, de disfrutar y compartir juntos paisajes naturales, tanto montañosos como marinos. Además, he tenido la suerte de aprender a ser mejor persona contigo. Eres una de las personas a las que también tengo que pedir perdón porque ha sido quien me ha aguantado en los peores momentos. Gracias por haber estado siempre al otro lado de la pantalla, gracias por los paseos en bici en horario

permitido, gracias por las escapadas y viajes, gracias por transmitir tu ilusión por la academia, gracias por haber empezado esta aventura que ha pasado por muchas ciudades (Zaragoza, Marsella, Bilbao, Sidney) y que ahora continua en Oslo. Estas palabras van dirigidas a Pablo, mi persona estadísticamente significativa.

Hablando del COVID, aproveché los meses de confinamiento para hacer un curso de estadística, cuyo docente fue el Doctor Jacobo Díaz Portillo. Él (mejor dicho, los videos de él) fue mi compañía durante todo ese periodo que estaba sola en casa. Hizo que todo fuera más llevadero y consiguió transmitir su ilusión y conocimiento que posteriormente pude plasmar en este trabajo. Gracias por el esfuerzo de hacer un curso online, por responder a todas las dudas que tenía y a tu disponibilidad siempre que se ha requerido.

Si seguimos por docentes, el segundo profesor importante en mi formación ha sido Juan Ramón González Ruiz. Fue él quien me dio mi primer curso de R. Dijo que el objetivo era que nos quitásemos el miedo a usar R. Debo decirte que objetivo conseguido, así que gracias por ese y otros cursos a los que he asistido tuyos, los cuales han sido muy productivos y siempre me quedaba con ganas de más.

Para terminar con la gente de Zaragoza, hay dos personas que nos unió el deporte en el tiempo libre y luego cambiamos la vida *fit* por una *beer*. Uno de ellos es mi amigo Dani, con el que salía a correr cuando llegué a Zaragoza. Gracias por ver todo desde otro enfoque, a plantearme las cosas como son y a afrontarlas y superarlas. Me hubiera encantado verte tocar en directo alguna vez. La otra amiga es Bea, que nos conocimos en el gimnasio. Después mantuvimos un contacto y, cuando las agendas nos lo permitían, quedábamos. Agradezco muchísimo su visita a Marsella, me hizo mucha ilusión. Gracias por escucharme hablar de temas que son totalmente opuestos a tu trabajo, gracias por darme una casa cuando lo necesitaba, gracias por la máquina cortapastas, y gracias por todas las historias que nos hemos compartido.

Como me dijo una bruja una vez "tu vas a viajar mucho, vas a atravesar el océano". Y menos mal que tuvo razón, porque dos hechos importantes en esta tesis han sido las dos estancias que he podido disfrutar. Primero, he de decir que sin el empujón de Olga para solicitar las ayudas, no hubieran sido posibles. La primera estancia fue en Marsella, donde doy las gracias al Doctor Iovanna por recibirme a su laboratorio y por presentarme a su grupo, donde quisiera destacar a Patricia, una persona que me acogió desde el día uno y que siempre intenta ayudar. Pero no solo a mí me acogió, sino que al mes vino Carla y junto con Scarlett hicimos un cuarteto muy majo donde disfrutamos desde cada comida juntas hasta la fiesta de los 70`s del CRCM, el *afterwork* de Halloween, etc. A Carla también le quiero agradecer las palabras de ánimo recibidas desde Argentina. Es una persona que cuando estaba con ella o ahora cuando escucho sus audios, me transmite mucha tranquilidad. Gracias por todos los momentos compartidos.

También en el CRCM conocí a Nico, con el que comentaba los programas de *Masterchef* cada lunes. Pero gracias a su implicación, él fue quien me enseñó a dar los primeros pasos en los modelos de aprendizaje automatizado y que mi nivel de usuaria de R diese un salto enorme. Gracias por el intercambio de emails y de la ayuda recibida en la distancia. Además, por todas las conversaciones compartidas junto a Carla en ese despacho donde había que estar con chaqueta por el frío que hacía.

El otro punto y destino importante ha sido Sidney, donde realicé una estancia en el laboratorio del Profesor Molloy. Se lo he comentado a ellos muchas veces lo afortunada que me he sentido estando con ellos, con Matt, Zoe, Miguel, Benita, Jun y Anh. Muchas gracias a Matt por todo lo que me ha enseñado, por esos días trabajando juntos en el laboratorio, y por la ayuda que aún recibo cuando les escribo por dudas que me surgen ahora. Gracias a Zoe por las conversaciones de 5-10 minutos que teníamos cuando llegaba a la oficina y por los mensajes que aún nos enviamos. Creo que ya podemos decir que lo hemos conseguido. Gracias a Benita y Miguel por los consejos y palabras de ánimo, que he intentado seguir cada uno de ellos. Gracias por incorporar a Taylor Swift en las conversaciones de las comidas, y gracias a Miguel por abrir sus historias más personales. Llegué allí muy cansada, con las

pilas muy descargadas, pero os aseguro que volví con la fuerza para afrontar la escritura de la tesis, y así ha sido.

Ambas estancias han supuesto una experiencia laboral (formación) y una experiencia vital que creo que me han ayudado a llegar hasta la final más entera.

Terminamos en Madrid, donde se encuentra la gente que ya estaba cuando empecé la tesis y que aún siguen al terminar. Mis amigas de la universidad, Eva y Noe, muchas gracias por el apoyo que me habéis dado. También sobre ellas he descargado mis frustraciones y siempre han confiado en mí. Gracias por las visitas que me habéis hecho y las que quedan por hacer. Gracias a mi amiga María, mi amiga desde que teníamos uso de consciencia. Nuestros caminos parece que se han ido por otros lados, pero siempre hemos intentado buscar esos puentes que los ponían en contacto. Gracias por transmitir tu entusiasmo trabajando como técnico de laboratorio, de lo que también he aprendido mucho. Hubiéramos hecho un buen tándem trabajando juntas. A mis antiguas compañeras de piso: a Silvia gracias por dar consejos como una madre y a la vez ser tan disfrutona. Gracias por el contacto que hemos ido manteniendo; la otra compañera de piso fue Patri (la doctora Letrado), a la que agradezco compartir sus experiencias predoctorales que todas acababan concluyendo "los resultados siempre aparecen el último año". ¡Y qué razón tenías!

Y cuando parecía que nadie más ibas a conocer en esta etapa, aparece Ricardo, mi actual compañero de biblioteca que ha sido muy importante en esta recta final. Gracias por haberte acercado a encenderme la luz del flexo, lo que nos llevó a tomar un café y así nuestra rutina hasta ahora. Gracias por hacer que vaya con ganas a la biblioteca, aunque llueva, nieve o no haya luz. Gracias por todas las frases, refranes y dichos populares que has compartido. Gracias por ayudarme a llevar el peso de la mochila.

Para terminar, me dejo a las "supernenas", que en los dibujos son tres, pero nosotras somos cuatro. Gracias a mis hermanas Mónica y Ana y a mi madre, por las comidas y sobremesas que tanto nos gusta hacer cuando nos juntamos, por las visitas a Zaragoza y Marsella, donde tan bien nos lo pasamos. También han aguantado mis días malos y mis dudas y frustraciones, donde ellas siempre no han tenido dudas sobre mí. Especialmente, a mi madre le doy las gracias por el gran esfuerzo que ha hecho al nunca ponerme pegas cuando tuve que irme fuera de Madrid a trabajar, cuando me he ido de estancia, incluso a países que no sabía ni poner ella en el mapa. Es decir, gracias por no cortarme las alas y dejarme volar siempre. Gracias por la educación dada por las tres para poder trabajar en lo que una quiere. Por último, gracias al pequeño de la casa, a mi sobrino Víctor, por sacarme de la rutina, por aprender a esquiar juntos, por los bailes que nos hemos echado, por preguntarme qué ha sido lo mejor, lo medio-medio y lo peor del día.

A todos y cada uno de vosotros que habéis aportado una mano amiga, un abrazo, un mensaje, una quedada, un viaje, unas palabras, etc., GRACIAS A TODOS.

ÍNDICE

ÍNDICE	10
RESUMEN	12
ABSTRACT	14
ABREVIATURAS.....	16
PRÓLOGO	19
INTRODUCCIÓN	21
Calorimetría diferencial de barrido, herramientas de aprendizaje automatizado y metodologías propuestas para analizar los termogramas	22
Cáncer de páncreas.....	29
Cáncer colorrectal	35
BIOPSIA LÍQUIDA TÉRMICA: HACIA LA PRÁCTICA CLÍNICA	41
Interferencia de la bilirrubina en la TLB	42
Desarrollo de un modelo de aprendizaje automatizado para el diagnóstico y pronóstico del cáncer de páncreas mediante muestras de suero analizadas por TLB.....	48
Transformación del diagnóstico de PDAC: análisis comparativo integral de biomarcadores clínicos, TLB y enfoques integrados	69
Aportación de la TLB en el diagnóstico temprano del CCR y en la búsqueda de nuevos biomarcadores junto con la espectrometría de masas.....	103
TLB en cribado de cáncer colorrectal	144
Efecto de la preparación previa a la colonoscopia	145
Efecto del diluyente y del tipo de muestra y primera aproximación del modelo iTLB	147
CONCLUSIONES.....	166
CONCLUSIONS.....	168
BIBLIOGRAFÍA	170
ANEXOS.....	181
Listado de tablas	182
Listado de figuras	185
PUBLICACIONES	192

RESUMEN

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica biofísica que se ha utilizado tradicionalmente para el estudio de la estabilidad térmica de proteínas en solución. En ella se determina el exceso de capacidad calorífica en función de la temperatura, lo que se conoce como termograma. El uso del DSC con muestras biológicas es lo que se conoce como biopsia líquida térmica (TLB). Estudios previos han demostrado que existe un patrón muy homogéneo y característico de los termogramas obtenidos de pacientes sanos, al igual que se ha demostrado que el termograma cambia ante situaciones de patologías inflamatorias, autoinmunes, cancerosas, etc.

A pesar de los cada vez más estudios publicados y en diferentes patologías, todavía no existe una metodología estándar para analizar las curvas de termogramas y poder diferenciar diferentes grupos (sanos vs enfermos). Gracias al avance en la bioinformática se han propuesto algunas metodologías más sofisticadas para obtener modelos de clasificación a partir de la información de los termogramas.

En esta Tesis Doctoral se propone una nueva metodología de análisis de curvas de termogramas procedentes de muestras biológicas (sobre todo de suero sanguíneo), caracterizado por el uso de parejas de temperaturas como variables predictivas, con la aplicación de algoritmos ya validados en otro tipo de datos (*ómicas*), para ajustar un modelo de clasificación mediante aprendizaje automatizado, el cual incluye un sistema de penalización tipo Lasso, para evitar problemas de sobreajuste, mediante la aplicación de validación cruzada. Todo este procedimiento se ajusta en un 70% de los datos (entrenamiento) y se valida en el 30% restante, aleatorizando la selección de estos dos grupos 100 veces. La respuesta obtenida del modelo de clasificación (modelo iTLB), es un número que, si es menor de cero (umbral estándar) significa que el modelo iTLB clasifica ese termograma como no patológico, mientras que si la respuesta es un número superior a cero significa que clasifica ese termograma como patológico.

Existen muchas patologías donde sería muy interesante la incorporación de nuevas herramientas como la TLB para mejorar el diagnóstico o seguimiento de los pacientes. Esta Tesis Doctoral se ha centrado en dos principales patologías oncológicas: el adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC) y el cáncer colorrectal (CCR). La primera de ellas porque es una de las enfermedades oncológicas con peor pronóstico, debido principalmente a su diagnóstico en estadios avanzados. Por lo que son necesarias nuevas herramientas que mejoren la detección del PDAC en estadios tempranos. En el caso del CCR, es uno de los cánceres más frecuentes, sobre todo en los países desarrollados. Hacen falta nuevas técnicas no invasivas que mejoren la sensibilidad y especificidad obtenida de los principales biomarcadores tumorales de uso clínico, para mejorar el diagnóstico en estadios tempranos, y para ayudar en el pronóstico de estos pacientes. De igual manera, en el caso del CCR, se dispone de un programa de cribado de pacientes asintomáticos, basado en la realización de la prueba de sangre oculta en heces, seguido de una colonoscopia en el caso de ser positivo. A pesar de que el programa de cribado a supuesto una disminución en la mortalidad del CCR, hacen falta más esfuerzos para mejorarlo, sobre todo para evitar el colapso de las listas de espera para la realización de la colonoscopia.

Se ha comprobado que la metodología propuesta de análisis de termogramas se ha podido aplicar en estudios relacionados con el diagnóstico y/o pronóstico de pacientes con PDAC, CCR y en el programa de cribado de CCR (en este último caso como segunda prueba después del positivo en sangre oculta en heces y realizando la extracción de las muestras antes de empezar con la preparación de la colonoscopia). Al mismo tiempo, se ha puesto de manifiesto la versatilidad de la metodología propuesta para incorporar variables clínicas al modelo (edad, sexo, concentración de biomarcadores en sangre periférica), e incluso el ajuste de un modelo de clasificación utilizando únicamente dichas variables clínicas. También se ha combinado el estudio de la TLB con técnicas de espectrometría de masas para la búsqueda de nuevos biomarcadores para el diagnóstico y/o pronóstico de las enfermedades.

Además, se ha estudiado algunas condiciones preanalíticas relacionadas con la TLB, como son el tipo de muestra (suero o plasma-EDTA) y el diluyente usado (PBS, NaCl 0.9% o agua Milli-Q), donde se ha comprobado que los termogramas obtenidos según el tipo de muestra no son intercambiables. Además, se ha observado que según el diluyente usado se obtienen diferentes perfiles de termogramas. En el caso de los termogramas obtenidos con PBS y con NaCl 0.9% son muy parecidos, pero tampoco son intercambiables.

Como conclusiones de esta Tesis Doctoral, es la primera vez que se aplica la misma metodología de análisis de termogramas de muestras biológicas en diferentes patologías, e incluyendo variables clínicas. Son necesarios más estudios para pulir aspectos metodológicos e incluso probar otros algoritmos de clasificación como los no supervisados. Además, es la primera vez que se realiza estudio preanalítico de la TLB, abriendo las puertas a valorar diferentes condiciones (muestra/diluyente) para buscar las óptimas del estudio.

ABSTRACT

Differential scanning calorimetry (DSC) is a biophysical technique that has traditionally been used to study the thermal stability of proteins in solution. It determines the excess heat capacity as a function of temperature, which is known as a thermogram. The use of DSC with biological samples is known as thermal liquid biopsy (TLB). Previous studies have shown that there is a very homogeneous and characteristic pattern of thermograms obtained from healthy patients, just as it has been shown that the thermogram changes in situations of inflammatory, autoimmune, cancerous pathologies, etc.

Despite the increasing number of studies published and in different pathologies, there is still no standard methodology to analyze thermogram curves and be able to differentiate different groups (healthy vs sick). Thanks to advances in bioinformatics, some more sophisticated methodologies have been proposed to obtain classification models from thermogram information.

In this Doctoral Thesis, a new methodology for analyzing thermogram curves from biological samples (especially blood serum) is proposed, characterized by the use of temperature pairs as predictive variables, by applying algorithms already validated in other types of data (*omics*), to adjust a classification model through machine learning, which includes a Lasso-type penalty system, to avoid overfitting problems, through the application of cross-validation. This entire procedure is adjusted to 70% of the data (training) and will be validated in the remaining 30%, randomizing the selection of these two groups 100 times. The response obtained from the classification model (iTLB model) is a number that, if it is less than zero (standard threshold) means that the iTLB model classifies that thermogram as non-pathological, while if the response is a number greater than zero it means which classifies this thermogram as pathological.

There are many pathologies where the incorporation of new tools such as TLB would be very interesting to improve the diagnosis or monitoring of patients. This Doctoral Thesis has focused on two main oncological pathologies: pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and colorectal cancer (CCR). The first of them because it is one of the oncological diseases with the worst prognosis, mainly due to its diagnosis in advanced stages. Therefore, new tools are necessary to improve the detection of PDAC in early stages. In the case of CCR, it is one of the most common cancers, especially in developed countries. New non-invasive techniques are needed to improve the sensitivity and specificity obtained from the main tumor biomarkers in clinical use, to improve diagnosis in early stages, and to help in the prognosis of these patients. Similarly, in the case of CRC, there is a screening program for asymptomatic patients, based on performing the fecal occult blood test, followed by a colonoscopy if positive. Although the screening program has led to a decrease in CRC mortality, more efforts are needed to improve it, especially to avoid the collapse of waiting lists for colonoscopy.

It has been proven that the proposed methodology of thermogram analysis has been able to be applied in studies related to the diagnosis and/or prognosis of patients with PDAC, CCR and in the CCR screening program (in the latter case as a second test after the positive in fecal occult blood and extracting the samples before starting the colonoscopy preparation). At the same time, the versatility of the proposed methodology has been revealed to incorporate clinical variables into the model (age, sex, concentration of biomarkers in peripheral blood), and even the adjustment of a classification model using only these clinical variables. The study of TLB has also been combined with mass spectrometry techniques to search for new biomarkers for the diagnosis and/or prognosis of diseases.

In addition, some preanalytical conditions related to TLB have been studied, such as the type of sample (serum or plasma-EDTA) and the diluent used (PBS, NaCl 0.9% or Milli-Q water), where it has been proven that the thermograms obtained according to the type of sample are not interchangeable. Furthermore, it has been observed that different thermogram profiles are obtained depending on the diluent used. In the case of the thermograms obtained with PBS and with 0.9% NaCl, they are very similar, but they are not interchangeable either.

As conclusions of this Doctoral Thesis, it is the first time that the same methodology for analyzing thermograms of biological samples is applied in different pathologies and including clinical variables. More studies are necessary to refine methodological aspects and even test other classification algorithms such as unsupervised ones. Furthermore, it is the first time that a pre-analytical study of TLB has been carried out, opening the doors to evaluating different conditions (sample/diluent) to find the optimal ones for the study.

ABREVIATURAS

ΔT	diferencia de temperatura
ACN	acetonitrilo
AJCC	<i>american joint comitee on cancer</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ASA	<i>american society of anesthesiologists</i>
AUC	<i>area under curve</i>
Bili	bilirrubina
C_p	capacidad calorífica
CA19.9	antígeno carbohidrato 19-9
CACI	<i>Charlon-age comorbidity index</i>
CART	<i>classification and regression tree</i>
CCI	<i>Charlson comorbidity index</i>
CCR	cancer colorectal
CEA	antígeno carcinoembrionario
CEICA	comité de ética de la investigación de la comunidad de Aragón
DNA	deoxyribonucleic acid
DSC	<i>differential scanning calorimetry</i>
DTW	<i>dynamic time warping</i>
ECOG	<i>eastern cooperative oncology group</i>
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EE	enfermedad estable
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Espec	especificidad
Exact	exactitud
FC	fold change
FDA	<i>food and drugs administration</i>
FERMT3	<i>fermitin family homolog 3</i>
FGL1	proteína similar a fibrinógeno-1
G	grado de diferenciación histológica
GLM	<i>generalized linear model</i>
GLOBOCAN	global cancer observatory
HCULB	hospital clínico universitario Lozano Blesa
HUMS	hospital Universitario Miguel Servet
IC _{95%}	intervalo de confianza del 95%
IL-6	interleucina-6
IMC	índice de masa corporal
iTLB	<i>intelligent thermal liquid biopsy</i>
KNN	<i>k-nearest neighbors</i>
KTSP	<i>K-top scoring pair</i>
L1	regularización tipo Lasso
L2	regularización tipo Ridge
LDA	<i>linear discriminant analysis</i>
LDH	lactate deshidrogenasa
Le ^a	genotipo Lewis a
Le ^b	genotipo Lewis b
MCN	<i>mucinous cystic neoplasm</i>
MLDA	<i>maximum linear discriminant analysis</i>
MS	<i>mass spectrometry</i>
N	propagación o no a nódulos o ganglios linfáticos adyacentes
na	<i>not available</i>
NaCl	cloruro sódico
NaOH	hidróxido de sodio
OMS	organización mundial de la salud
OS	<i>overall survival</i>
P.	pólipo
PanIN	<i>pancreatic intraepithelial neoplasia</i>

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	proteína C reactiva
PDAC	adenocarcinoma ductal de páncreas
PE	progresión enfermedad
PFS	<i>progression free survival</i>
POC	<i>point of care</i>
R0	resección completa
R1	resección incompleta con resto tumoral microscópico
R2	resección incompleta con resto tumoral macroscópico
RC	respuesta completa
RECIST	<i>response evaluation criteria in solid tumors</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROC	<i>receiver operating characteristic</i>
RP	respuesta parcial
rpm	revoluciones por minuto
RR	rango de referencia
Sens	sensibilidad
SDC	<i>sodio desoxicolato</i>
SOH	sangre oculta en heces
SPE	<i>solid phase extraction</i>
T	tamaño tumoral
TAC	tomografía axial computarizada
TAG-72	<i>tumor-associated glycoprotein 72</i>
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i>
TLB	<i>thermal liquid biopsy</i>
TPMI	tumor papilar mucinoso intraductal
u.a.	unidades arbitrarias
USE	ultrasonografía endoscópica
VAMS	<i>volumetric absorptive microsampling</i>
VPP	valor predictivo positivo
VPN	valor predictivo negativo
VR	valor de referencia
WASP	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
YKL-40	proteína 1 similar a quitinasa-3

PRÓLOGO

El tema principal de esta Tesis Doctoral es el uso de la técnica conocida como calorimetría diferencial de barrido (DSC de sus siglas en inglés) con muestras biológicas, lo que nuestro grupo ha acuñado con el término de biopsia líquida térmica (TLB de sus siglas en inglés). La muestra biológica más frecuentemente estudiada ha sido la muestra de suero de sangre periférica.

Concretamente, el hilo conductor de la Tesis Doctoral ha sido el desarrollo de una nueva metodología para analizar las curvas de termogramas. Por ello, primero se explica la metodología propuesta, y se utilizan como ejemplo los termogramas de suero de dos cohortes independientes: un grupo de sanos de banco de sangre, y un grupo de pacientes con diagnóstico de cáncer de páncreas. Posteriormente, se aplica la metodología propuesta en otros estudios relacionados con el cáncer de páncreas y el cáncer colorrectal.

Para mejorar la lectura del manuscrito, se ha dividido en dos bloques. Un primer bloque que corresponde a la introducción, la cual se divide en tres partes: una primera parte relacionada con el DSC, una segunda parte de introducción al cáncer de páncreas y una tercera de introducción al cáncer colorrectal. El segundo bloque corresponde a los diferentes estudios realizados con la TLB, que consta del estudio de la interferencia de la bilirrubina en el TLB, presentación de la metodología de análisis de curvas de termogramas, estudio realizado en pacientes con cáncer de páncreas, estudio en pacientes con cáncer colorrectal y termina con el estudio de pacientes del programa de cribado de cáncer colorrectal. Este último, se divide en dos partes. Una primera parte donde se estudió el efecto de la preparación en la TLB, donde se muestra un resumen del estudio. Los detalles de material y métodos, resultados y discusión se pueden ver en el artículo del apartado de **PUBLICACIONES**. Y una segunda parte donde se estudió otras condiciones preanalíticas (tipo de muestra y de diluyente) y se realiza una primera aproximación a un modelo iTLB para el programa de cribado.

En cada uno de los apartados del segundo bloque se muestra una breve introducción, un apartado de materiales y métodos, resultados y discusión de los mismos. A continuación de los estudios, se muestra unas conclusiones generales de la Tesis Doctoral.

Para mantener la coherencia en todo el texto, y dado que los resultados obtenidos por los diferentes métodos de análisis suelen llevar la forma anglosajona, se utilizará esta misma a lo largo del texto, por lo que los valores decimales se indicarán con un punto en lugar de una coma, que sería la forma correcta en castellano.

INTRODUCCIÓN

Calorimetría diferencial de barrido, herramientas de aprendizaje automatizado y metodologías propuestas para analizar los termogramas

Las muestras de sangre periférica son una poderosa herramienta de evaluación clínica para diagnosticar y monitorizar enfermedades. Tanto es así que se considera que las pruebas solicitadas al laboratorio clínico influyen en un 60-70% de las decisiones médicas, (1) siendo la sangre periférica el tipo de muestra más comúnmente estudiada debido, en parte, a que es una muestra fácil de extraer, segura y mínimamente invasiva, y también porque en el torrente sanguíneo suele haber un reflejo de prácticamente casi todo lo que ocurre en el organismo.

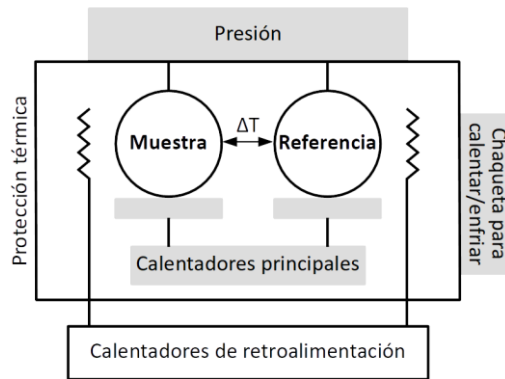
En sangre periférica se puede encontrar más de 3000 proteínas y péptidos cuya concentración varía desde picogramos hasta decenas de miligramos por mililitro. Sin embargo, al hablar de proporción, muy pocas proteínas representan casi el 99% del proteoma: 10 proteínas constituyen el 90%, y otras 12 representan un 9% adicional. (2) Por lo tanto, existe un 1% restante de información que no hay que menospreciar. En los últimos años se han realizado muchos esfuerzos dirigidos al estudio de estos componentes de baja abundancia, llamado peptidoma, mediante técnicas como la espectrometría de masas y la electroforesis, donde se ha demostrado que los cambios en la composición de proteínas y péptidos poco abundantes parecen correlacionarse con enfermedades, aumentando su interés clínico.

Sin embargo, la teoría del *interactoma* complica el estudio del peptidoma y del proteoma en general. Los defensores del *interactoma* creen que el peptidoma, donde se incluyen posibles biomarcadores potenciales, no están libres en el torrente sanguíneo, sino que se encuentran formando interacciones con las proteínas mayoritarias. Así, en estados patológicos, las proteínas o péptidos de bajo peso molecular exclusivos de esa enfermedad, aumentan su concentración en sangre periférica, formando complejos con las proteínas más abundantes, particularmente con la albúmina y las inmunoglobulinas. (3-5) Esta es una de las razones por las que cada vez cueste más la búsqueda de un único biomarcador que justifique toda una patología, cobrando más peso la defensa de que los cambios producidos ante una enfermedad involucran a numerosas proteínas. Por ello, se habla de patrones de proteínas o péptidos característicos de un estado patológico.

El artículo que introdujo el concepto del *interactoma*, concluyó diciendo que “el descubrimiento de nuevos biomarcadores en suero o plasma requiere de nuevos enfoques bioquímicos y analíticos y, lo más importante, está claro que ninguna preparación de muestra única o método de detección será suficiente para que las investigaciones de biomarcadores sean ampliamente exitosas utilizando las tecnologías actuales”.

A la luz de las dificultades que plantea el descubrimiento de biomarcadores con el avance en la investigación del proteoma, un enfoque experimental completamente nuevo basado en una base biofísica diferente podría resultar interesante. Es aquí donde la calorimetría, específicamente la calorimetría diferencial de barrido (DSC de sus siglas en inglés), podría ofrecer una nueva base física para observar el proteoma y el peptidoma, basada en la estabilidad térmica de las muestras.

El DSC es una técnica biofísica que se ha utilizado tradicionalmente para estudiar la estabilidad térmica de proteínas. En esta técnica se dispone de una celda con una proteína en solución, y una segunda celda de referencia idéntica con únicamente el disolvente. Durante un experimento, se va a calentar ambas celdas a una velocidad constante y controlada. A medida que va aumentando la temperatura, la proteína pasará de estado plegado a desplegado. Al mismo tiempo, se va a ir manteniendo el equilibrio térmico entre ambas celdas mediante unos calentadores de retroalimentación accionados eléctricamente y conectados a las celdas. Cualquier proceso químico en la celda de muestra que absorba o libere calor resulta en un desequilibrio térmico. La potencia aplicada por los calentadores de retroalimentación es directamente proporcional a los cambios en la capacidad calorífica que acompaña a las reacciones de desnaturalización y disociación inducidas térmicamente (Figura 1). La representación del exceso de capacidad calorífica específica (C_p) frente a la temperatura se conoce como termograma. Cada proteína tiene, bajo unas condiciones determinadas, un termograma de desnaturalización característico, reflejando sus propiedades físicas fundamentales.



Notas: ΔT : diferencia de temperatura.

Figura 1: Esquema del instrumento DSC (calorimetría diferencial de barrido). Figura adaptada de (36).

Las muestras biológicas como suero y plasma se pueden considerar una mezcla de proteínas y macromoléculas. Si se usa este tipo de muestras biológicas en el DSC, se puede obtener un termograma, el cual proporciona una firma específica para cada muestra, que refleja su composición proteica y, por tanto, ofrece una ventana y una base física única para ver el proteoma.

Al igual que el termograma de una única proteína es directamente proporcional a la masa de ésta en disolución (si se duplica la concentración en peso de la proteína, la respuesta calorimétrica se duplicará), el termograma de una muestra biológica es directamente proporcional a la masa de cada componente en disolución. El termograma global observado en una muestra biológica será, en ausencia de interacciones, la suma ponderada de todos los termogramas de sus componentes individuales, ponderados según la masa de cada uno de ellos. (6)

Si la hipótesis del interactoma es correcta, el DSC proporciona una ventaja adicional, ya que sería muy sensible tanto a los cambios en composición como a las interacciones de unión, siendo particularmente susceptible al estudio de las interacciones proteína-proteína y proteína-péptido del *interactoma*. Estas interacciones de unión podrían tener un efecto considerable en la desnaturalización térmica de las proteínas mayoritarias analizadas por el DSC cuando se utiliza una muestra biológica. Por ejemplo, si un ligando se une a un sitio en una proteína nativa y la estabiliza, resultará en un aumento en la temperatura media de desnaturalización. Por el contrario, si un ligando tiene mayor afinidad por la forma desnaturalizada de la proteína, se observará una disminución en la temperatura media de desnaturalización. (7)

Ante una patología, se producen cambios en la composición y en las interacciones en una muestra biológica, que alteraría los termogramas, produciendo cambios respecto al patrón normal. Los cambios de décimas de grados en la temperatura de fusión podrían ser mucho más significativos que los pequeños cambios de tamaño, forma o carga resultante de la unión de una proteína a un receptor observado mediante electroforesis o métodos de espectrometría de masas. (2)

Aunque en el ensayo calorimétrico no se observa específicamente la desnaturalización de biomarcadores de baja abundancia y bajo peso molecular, ni identifica directamente biomarcadores de enfermedad, sí informa de las consecuencias debido a los cambios en las interacciones con las principales proteínas plasmáticas a través de la modificación de las propiedades observadas durante su proceso de desnaturalización.

Se ha demostrado que el DSC proporciona un termograma bien definido, homogéneo y reproducible para individuos sanos (clínicamente asintomáticos). (6) Además, los estudios en varias enfermedades revelaron cambios significativos en el termograma del suero/plasma en comparación con controles sanos. Incluso en algunos casos se han observado diferentes cambios según el estadio o durante el seguimiento de los pacientes. (2,6–27) Aunque la muestra biológica más comúnmente estudiada haya sido el suero o plasma, también hay estudio donde se han analizado mediante DSC otras muestras biológicas (líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, líquido intraquístico pancreático, saliva, etc.). (28–32)

Con todos los estudios publicados hasta ahora, aunque no hay evidencia de los mecanismos biológicos responsables de los cambios en los perfiles de DSC, se ha demostrado que los termogramas de muestras biológicas pueden proporcionar información complementaria importante a las técnicas existentes, mostrando así su potencial como posible nueva herramienta de diagnóstico y seguimiento de enfermedades. Serían necesarios estudios con mayores tamaños muestrales, diferentes patologías y seguimientos de los pacientes, así como el desarrollo de métodos de estandarización de análisis de los datos de termograma, con tratamientos estadísticos rigurosos, pero que a la vez sea fácilmente de aplicar

para generar métricas sencillas de entender por los clínicos, con el fin último de alcanzar el potencial diagnóstico prometedor de esta metodología.

A la hora de analizar de forma comparativa las curvas de termogramas entre individuos sanos y enfermos, las referencias bibliográficas muestran unos análisis para obtener parámetros termodinámicos de características localizadas y específicas de los perfiles de DSC (temperaturas máximas, entalpía calculada mediante el área, exceso de capacidad calorífica a determinadas temperaturas, etc.). (6,8,9,11,12,14–21,24,25,33,34) Con el avance en el análisis de datos y el desarrollo de técnicas cada vez más sofisticadas relacionadas con la inteligencia artificial, en los últimos años se han incorporado conceptos como el aprendizaje automatizado y el aprendizaje profundo.

De manera simplista se puede decir que dentro del ámbito de la inteligencia artificial se incluye el aprendizaje automatizado, y dentro de éste el aprendizaje profundo. La principal diferencia entre estas áreas radica en el objetivo a estudio. Así, la inteligencia artificial representa un sistema no biológico que se basa en reglas, el aprendizaje automatizado se basa en algoritmos que entrenan modelos usando datos existentes, y el aprendizaje profundo se basa en algoritmos que parametrizan redes neuronales de múltiples capas que representan los datos mediante diferentes niveles de abstracción.

El aprendizaje automatizado crea sistemas que aprenden automáticamente, es decir, un algoritmo aprende a partir de datos existentes y, posteriormente es capaz de predecir comportamientos futuros. Además, estos sistemas se mejoran de forma autónoma con el tiempo, sin intervención humana. Dentro del aprendizaje automatizado se distinguen dos variantes, el aprendizaje supervisado y el no supervisado. Ambos se diferencian en que el supervisado tiene la información de la variable respuesta de antemano, mientras que en el no supervisado se le proporciona todos los datos y el algoritmo hará agrupaciones según las variables dadas. Dentro del aprendizaje supervisado se incluye la clasificación (cuando la variable respuesta es categórica) y la regresión (cuando la variable respuesta es continua) (Figura 2).

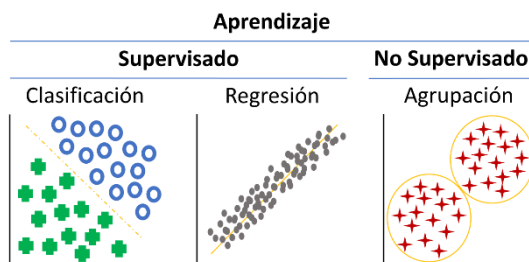


Figura 2: Tipos de aprendizaje automatizado.

El aprendizaje automatizado en estadística se ha considerado como una ciencia independiente, donde se dispone de un conjunto de herramientas basada en diferentes métodos y algoritmos que permite clasificar a los individuos según una serie de variables. Algunas de las metodologías son:

- **Regresión lineal:** método de regresión paramétrica cuando la variable respuesta es continua. No es una de las técnicas más sofisticadas, pero, su uso correcto lleva a alcanzar una precisión predictiva comparable a algoritmos más avanzados. Además, se puede obtener información descriptiva gracias a los coeficientes asociados a cada variable predictora.
- **Regresión logística:** se considera uno de los métodos más sencillos para crear modelos predictivos cuando la variable respuesta es dicotómica. Es decir, es un método de clasificación supervisada. El objetivo del modelo de regresión logística es la de predecir lo mejor posible la variable resultado usando la combinación más eficiente de las variables predictoras incluidas en el estudio. La ecuación inicial del modelo no es una función lineal, sino exponencial, si bien una sencilla transformación logarítmica (logit) la convierte finalmente en una función lineal, que sigue la ecuación de la recta, cuya pendiente son los distintos coeficientes de regresión (Figura 3). Es una de las mejores aproximaciones a la realidad biológica, ya que la influencia de una variable predictiva sobre la

probabilidad de que aparezca una categoría (una enfermedad, por ejemplo) suele asemejarse más a una curva sigmoidea (función exponencial) que a una recta.

$$P = \frac{e^{(\beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_p X_p)}}{1 + e^{(\beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_p X_p)}} \rightarrow \text{Log} \frac{P}{1+P} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_p X_p$$

Figura 3: Fórmula del modelo de regresión logística múltiple.

- **Regresión Lasso:** este tipo de modelos incorpora una regularización, lo que se conoce como penalización, que es una manera de evitar el sobreajuste (cuando un modelo se ajusta demasiado a los datos de entrenamiento, obteniendo un rendimiento deficiente en los datos no vistos), generalizar el modelo, y seleccionar automáticamente las variables predictoras. De manera general se puede hablar de regresión Lasso (regularización L1) y regresión Ridge (regularización L2). Ambos se basan en el vector de coeficientes del modelo, pero la gran diferencia entre ellos es que el tipo L1 puede reducir el valor del coeficiente hasta llegar a cero, lo que conlleva la eliminación de esas variables del modelo. Mientras que el tipo L2 puede estimar coeficientes con valores muy bajos, pero sin llegar a ser cero y, por lo tanto, no se eliminan. Existen otras funciones de penalización como la red elástica, que combina las dos anteriores, donde se suelen descartar variables correlacionadas. El grado de penalización se puede controlar, pasando por distintos niveles desde muy estricto a sin restricciones.
- **Análisis lineal discriminante (LDA por sus siglas en inglés):** es un sistema de aprendizaje automático supervisado de clasificación y un método de reducción de dimensiones. Busca la mejor combinación lineal de variables que diferencie las diferentes categorías de la variable respuesta. Parece que el LDA tiene cierta ventaja respecto la regresión logística cuando hay correlaciones importantes, pero ambos no serían muy útiles cuando existe una muy alta multicolinealidad.
- **Árboles de decisión:** también conocidos como modelos de árbol de clasificación y regresión (CART), son un tipo de aprendizaje automatizado supervisado. Estos modelos segmentan el espacio predictor en K nodos no superpuestos. Cada nodo se describe mediante un conjunto de reglas que se pueden utilizar para predecir nuevas respuestas (Figura 4). Son fáciles de usar e interpretar, pero no son competitivos con los mejores métodos de aprendizaje automatizado. Sin embargo, son la base para un grupo de modelos (*bagged trees*, *random forest*, *boosted trees*) más precisos, pero menos interpretables. Una de las ventajas es que considera las interacciones entre las variables.

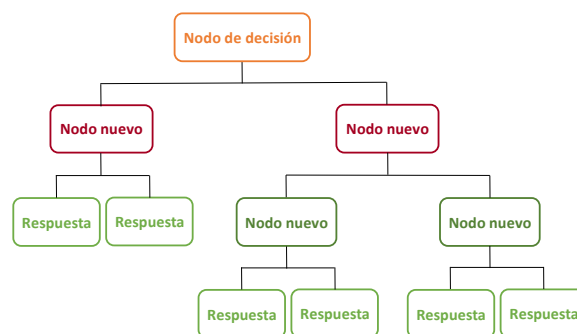


Figura 4: Diagrama de árbol de decisión.

- **Regresión de K vecinos más próximos (KNN de sus siglas en inglés):** método no paramétrico donde aproxima la asociación entre las variables independientes y la variable resultado promediando las observaciones en la misma vecindad (Figura 5). Este método se vuelve menos práctico cuando se aumenta las variables predictoras. Es una

manera diferente de construir un modelo de clasificación, pero con algunas limitaciones como la mayor carga computacional y la falta de interpretabilidad, en comparación con la regresión logística.

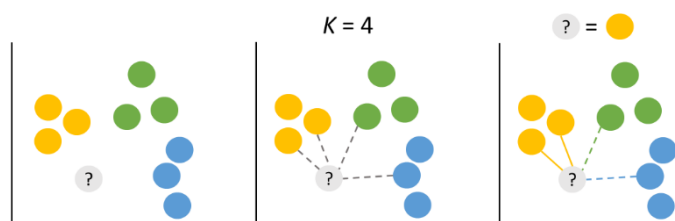


Figura 5: Algoritmo de K vecinos más próximos.

Desde que se comenzó a estudiar el potencial de la técnica DSC aplicada al diagnóstico, se han reportado diversos métodos de análisis, ya que los esfuerzos de los grupos de investigación se han centrado en el desarrollo de una metodología sistemática y robusta para el análisis computacional de las curvas de los termogramas de DSC. Estas son algunas de las metodologías de análisis desarrolladas en diversos estudios orientados a patologías tumorales e inflamatorias:

En 2010, Fish D. et al, (35) desarrollaron un método no paramétrico para analizar y clasificar los termogramas. Consiste en la combinación de dos parámetros, una métrica de distancia y un coeficiente de correlación, para resumirlos en un único parámetro de “similitud” respecto a un grupo empírico de referencia. Además, analizaron la variabilidad en cada temperatura y concluyen que el rango entre 60°C y 80°C es el de mayor variabilidad. Por esta razón, decidieron no usar todo el rango de temperatura (considerando todo el rango entre 40°C hasta 95°C), sino que seleccionaron desde 55°C hasta 85°C para aplicar su metodología. Con todo esto, fue posible clasificar los termogramas de pacientes diagnosticados de lupus en categorías estratificadas por diferentes grados de la patología. Posteriormente, esta metodología fue aplicada por otros grupos de investigación, y otras patologías como cáncer colorrectal, gammapatías monoclonales y pacientes con esquizofrenia, poniendo de manifiesto la reproducibilidad del método. (10,13,23,27)

En 2013, Rai S. et al, (36) puso de manifiesto la complejidad del análisis y la clasificación de estos datos, considerados de alta dimensión, es decir, son datos en los que el número de variables es mucho mayor que el número de pacientes. En este trabajo, se hizo referencia al método de clasificación I-RELIEF, (37) utilizado sobre todo en conjuntos de datos de alta dimensión como son los datos de expresión genética o los de proteómica. En estos casos sólo un grupo pequeño de variables fueron significativos, por lo que se necesitaban de herramientas de selección o reducción de variables. Por ello, este grupo desarrolló y validó un nuevo método de reducción y modelado de datos de alta dimensión, demostrando que el rendimiento era mayor que el método I-RELIEF. Como en el caso anterior, seleccionaron un rango de temperaturas, pero en este caso entre 50°C y 75°C. Además, en cada muestra, se promedió los valores de C_p dentro de cada incremento de 1°C, es decir, de 50°C a 50.9°C, de 51°C a 51.9°C, etc. obteniendo 26 observaciones por muestra. Esta metodología se aplicó para diferenciar controles sanos de pacientes con cáncer de cuello de útero.

En 2016, Garbett N. et al, (38) propusieron un análisis utilizando tres enfoques: un ajuste con un primer modelo de regresión logística con cinco de los parámetros localizados clásicos, un ajuste de un segundo modelo con los seis primeros componentes principales, y, finalmente, un ajuste con seis modelos de clasificación con algoritmos penalizados. Además, para este estudio se seleccionó de nuevo un rango de temperaturas, ente 60°C y 80.9°C (cada 0.1°C), contando con 210 variables. Se dividió la población a estudio en 2/3 como entrenamiento y 1/3 como prueba, aleatorizando 100 veces cada grupo. Aplicando estas metodologías para diferenciar los termogramas de pacientes sanos respecto a pacientes con lupus, concluyeron que el rendimiento de la clasificación fue significativamente mayor cuando se aplicó cualquiera de los algoritmos de penalización.

En 2017, Kendrik S. et al, (39) consideró en su estudio las curvas de termogramas como datos funcionales. Por ello, primero utilizaron puntuaciones de componentes principales funcionales para reducir la dimensionalidad, para, posteriormente, ajustar un modelo de regresión logística funcional. Se dividió los datos en 2/3 de entrenamiento y 1/3 de prueba, aleatorizándolo hasta 1000 veces. Se aplicó de nuevo en pacientes con lupus, destacando de su modelo la fácil interpretación de los resultados y la posibilidad de introducir además covariables como edad, sexo, etc.

Ese mismo año y usando la misma patología (lupus), Garbett N. et al, (40) utilizaron una versión modificada del análisis discriminante lineal de Fisher (MLDA), el cual también fue diseñado para datos de alta dimensión. Dividiendo 2/3 de la muestra en entrenamiento y 1/3 en prueba, aleatorizando 1000 veces, se comparó tres modelos: un primero modelo

basado únicamente en las curvas de DSC, un segundo modelo basado en los resultados de autoanticuerpos, y un tercer modelo usando las curvas de DSC y los autoanticuerpos. En este trabajo se demostró que la combinación de los termogramas y las pruebas diagnósticas disponibles, se mejora el diagnóstico de los pacientes.

En 2019, Rai S. et al, (41) propusieron un análisis de componentes principales para la reducción de los datos, aplicándolo a un método paramétrico, y comparándolo con un método no paramétrico de *K*-vecinos (KNN) y con un método semiparamétrico de KNN con distorsión dinámica del tiempo (DTW). Para realizar los ajustes de los modelos emplearon el 70% como entrenamiento y el 30% restante como prueba. Además, seleccionaron el rango entre 48°C y 80°C, tomando la media para cada grado, contando finalmente con 33 variables. Todo ello se ajustó a modelos de dos grupos (controles vs cáncer de pulmón; controles vs cáncer de cuello de útero; controles vs cáncer de pulmón y de cuello de útero; cáncer de pulmón vs cáncer de cuello de útero) y de tres grupos de clasificación (controles vs cáncer de pulmón vs cáncer de cuello de útero), siendo mayor el rendimiento en los modelos de dos grupos. Concluyeron que el modelo paramétrico tenía mejor rendimiento, sobre todo cuando se introducían covariables demográficas, debido a que este método utiliza menos parámetros y es menos sensible al sobreajuste.

Nuestro grupo de investigación comenzó sus estudios sobre la utilización del DSC con muestras biológicas en el 2015. (42) El primer trabajo publicado, presentaba un enfoque fenomenológico y multiparamétrico de análisis. Para ello, primero se realizaba una deconvolución del termograma en seis curvas individuales. De cada curva se obtenían diferentes parámetros (parámetros primarios): altura del pico (equivalente a la capacidad calorífica máxima), temperatura del máximo del pico (equivalente a la temperatura de transición media) y el ancho del pico. Luego, mediante su combinación, obtener unos parámetros secundarios (área normalizada bajo la curva en las transiciones 2 al 5, área normalizada del polígono en las transiciones 2 al 5), los cuales, junto con la temperatura media (primer momento del termograma) y la asimetría del termograma, se podían comparar entre individuos sanos y pacientes con adenocarcinoma gástrico.

En un trabajo posterior en 2018, (43) realizado en colaboración con el grupo de la Dra. Garbett (pioneros en el uso de DSC aplicado a diagnóstico) se acuñó el término de biopsia líquida térmica (TLB de sus siglas en inglés) para definir el uso del DSC con muestras biológicas. Se aplicó el análisis multiparamétrico de los termogramas en muestras recogidas durante el tratamiento y la vigilancia de los pacientes con melanoma, y se comparó con la evaluación clínica y con las pruebas de imagen. Se observó una buena concordancia entre la evolución clínica y los cambios en el termograma. Incluso, en algunos casos se observaron cambios en el termograma antes de que fuera diagnosticado clínicamente, poniendo en manifiesto el potencial del TLB como herramienta para el seguimiento de los pacientes.

En el trabajo publicado en 2019, (44) los parámetros descritos previamente se introdujeron en un modelo de regresión logística múltiple de forma que fue posible obtener un modelo que proporcionaba una puntuación de predicción (TLB score) basada en la capacidad de detectar termogramas alterados de pacientes con cáncer de pulmón.

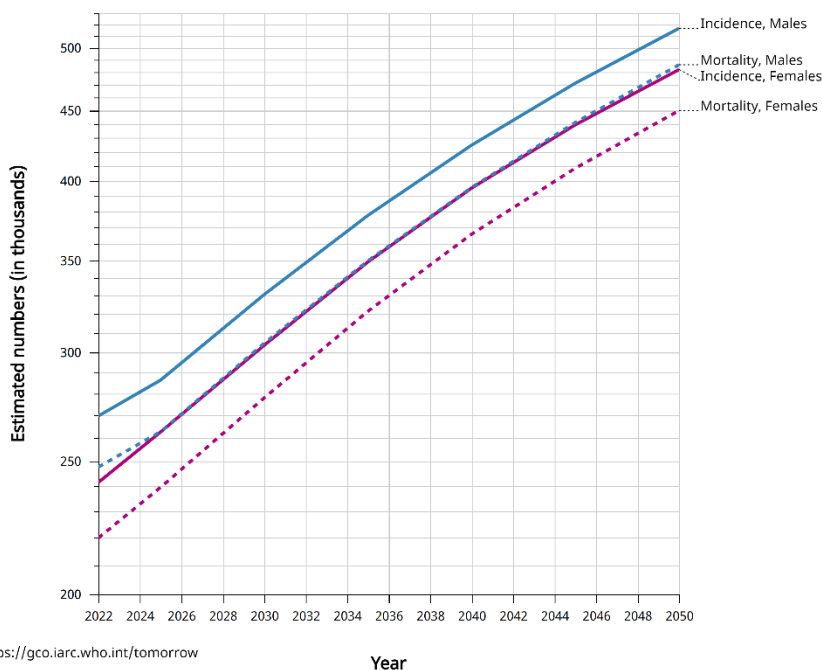
En 2021, (45) se aplicó el TLB score en pacientes con esclerosis múltiple, concluyendo que el modelo mejoraba su predicción en estadios tempranos, cuando era más difícil el diagnóstico con las técnicas disponibles. Estos resultados abrieron las puertas al uso del TLB como herramienta de cribado. Este estudio fue publicado durante la Tesis Doctoral, por lo que se puede ver en el apartado de **PUBLICACIONES**.

Cáncer de páncreas

El adenocarcinoma ductal (PDAC) es el tipo más frecuente de cáncer de páncreas. Es un tumor del páncreas exocrino, que se origina a partir del epitelio ductal. Existen tres lesiones precursoras reconocidas que son, por orden de frecuencia, la neoplasia microscópica intraepitelial pancreática (PanIN), la neoplasia mucinosa papilar intraductal (TPMI) y la neoplasia quística mucinosa (MCN). (46) Es un problema de salud grave y de incidencia creciente a nivel mundial, debido sobre todo al diagnóstico tardío (estadios localmente avanzados o metastásicos) por ausencia de síntomas específicos, por la no disponibilidad de biomarcadores sensibles, así como por la resistencia a las terapias disponibles.

En España, la incidencia estimada en el año 2023 es de 9.280 nuevos casos (51.40% en el sexo masculino), siendo el octavo cáncer más frecuente. A pesar de no ser uno de los tumores más incidentes, si es uno de los más mortales, siendo la tercera causa de muerte por cáncer, con un cociente muerte/incidencia casi de 0.98. (47) Tiene una tasa de supervivencia menor al 10% a 5 años, y sólo entre un 10-20% de los pacientes son candidatos a tratamiento quirúrgico, siendo ésta la única opción potencialmente curativa. Aunque en España la mortalidad por cáncer ha experimentado un importante descenso en las últimas décadas gracias a los programas de prevención, de cribado y a los avances terapéuticos, el cáncer de páncreas es el único en el que la mortalidad se ha visto incrementada, siendo además esta tendencia similar a la estimada en la mayoría de los países europeos. Según datos proporcionados por GLOBOCAN (*Global Cancer Observatory*), se prevé que la mortalidad y la incidencia por cáncer de páncreas en los próximos veinte años se mantendrá en ascenso (Figura 6).

Estimated numbers from 2022 to 2050, Males and Females, age [0-85+]
Pancreas



Cancer Tomorrow | IARC - <https://gco.iarc.who.int/tomorrow>
Data version : 2022
© All Rights Reserved 2024



Notas: Imagen recogida de GLOBOCAN (*Global Cancer Observatory*) a fecha 12 de marzo del 2024.

Figura 6: Estimación de la incidencia y la mortalidad del cáncer de páncreas a nivel mundial, desde el 2020 hasta el 2040, según el sexo.

Uno de los mayores problemas en el cáncer de páncreas es la ausencia de los síntomas específicos, siendo prácticamente indetectable en las primeras etapas de la enfermedad. Esta es una de las razones por las que el diagnóstico suele producirse en estadios avanzados. Las manifestaciones van a depender de la situación, tamaño y diseminación del tumor. Así, las principales zonas de diseminación metastásica son hígado, peritoneo, pulmones y hueso (Figura 7). (46)

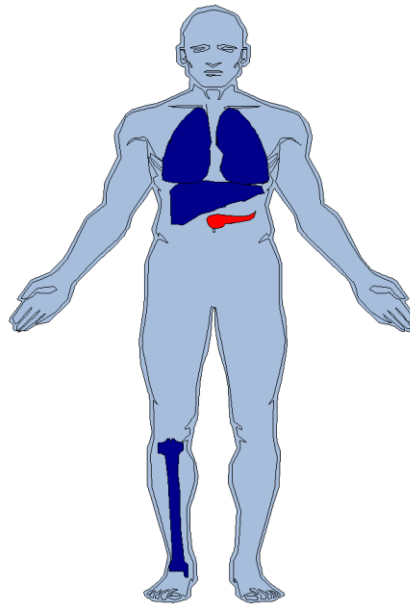


Figura 7: Localización del **páncreas** y sus principales **metástasis**. Imagen creada mediante la librería gganatogram. (171,172)

Actualmente no existe ningún programa de cribado poblacional para el cáncer de páncreas debido sobre todo a su baja incidencia y a la ausencia de biomarcadores con alta sensibilidad. Sin embargo, la mayoría de las sociedades científicas sí que aconsejan la realización de programas de cribado en determinados grupos poblacionales de riesgo con susceptibilidad genética, que pueden suponer hasta el 10% de los casos.

Una de las herramientas de las que se dispone cuando se está estudiando a un paciente con cáncer de páncreas son la realización de una analítica sanguínea general con bioquímica, hemograma y coagulación. Dentro de todos estos parámetros, se va a destacar:

- **Albúmina:** proteína sintetizada en el hígado que representa alrededor del 60% de las proteínas en sangre periférica. La albúmina actúa en la homeostasis, nutre a los tejidos y es uno de los principales transportadores del torrente sanguíneo. Su concentración puede disminuir en estados patológicos como el cáncer, pero además cuando hay signos o síntomas de malnutrición y pérdida de peso. Es considerado un reactante de fase aguda negativo.
- **Lactato deshidrogenasa (LDH):** enzima que interviene en reacciones metabólicas que conducen a la obtención de energía, y se encuentra en casi todas las células del organismo, predominando en el corazón, hígado, músculo, riñones y pulmones. Puede emplearse para establecer el estadio de ciertos tipos de cáncer, determinar su pronóstico y/o monitorizar su tratamiento. Un aumento en la concentración de LDH suele indicar algún daño tisular, siendo una señal de peor evolución, menor supervivencia y que el paciente no está respondiendo bien al tratamiento (quimioterapia). Es considerado un reactante de fase aguda positivo.
- **Marcador tumoral antígeno carbohidrato 19-9 (CA19.9):** proteína que se encuentra en la superficie de ciertas células cancerosas, siendo liberado por las mismas al torrente sanguíneo, lo que permite su aplicación para su diagnóstico, con una sensibilidad entorno al 70%-92% y una especificidad del 68%-92%, es decir, no es específico del cáncer de páncreas. Pero sobre todo está más aceptado su uso como medida de carga tumoral, aplicándose por su valor pronóstico en el seguimiento de los pacientes y en la toma de decisiones quirúrgicas. (48,49) No se ha demostrado su utilidad como herramienta de cribado en individuos asintomáticos por su escaso valor predictivo negativo (58%). (50) Además, por un lado, existe un grupo poblacional que no son capaces de producir CA19.9. Este grupo tiene un genotipo Lewis (Le^a y Le^b) negativo, caracterizándose por no poder sintetizar la enzima fucosiltransferasa necesaria para el CA19.9, y representa

entre el 10%-15% de los pacientes caucásicos, llegando a un 22% en población africana. (46,51,52) Por otro lado, existen patologías benignas que provocan elevaciones de CA19.9 como son la pancreatitis aguda, cirrosis hepática o colestasis. Incluso puede estar aumentado en menor concentración en personas sanas. Esto limita su uso como única prueba para el diagnóstico de cáncer de páncreas.

- **Proteína C reactiva (PCR):** proteína que se produce en el hígado, aumentando su concentración en sangre periférica cuando existe una inflamación, de manera que puede ayudar al diagnóstico de situaciones agudas o al seguimiento de enfermedades inflamatorias crónicas. Se considera un reactante de fase aguda. Puede estar aumentada en traumatismos, infarto agudo de miocardio, enfermedades autoinmunes, infecciones, etc. Parece que la inflamación juega un papel importante en el desarrollo y progresión del cáncer. (53) En el caso del cáncer de páncreas, parece estar relacionado con la supervivencia de los pacientes, de manera aislada o combinada con otros biomarcadores. (54–64)
- **Interleucina 6 (IL-6):** proteína de la familia de las citoquinas, con un gran número de funciones, sobre todo relacionadas con el sistema inmunitario, participando en la llamada “cascada inflamatoria”. Es producida por diferentes tipos de células, ejerciendo su función sobre varias células o tejidos. Favorece la diferenciación de linfocitos B y la producción de reactantes de fase aguda. Es principalmente proinflamatorio, aunque tiene algunos efectos antiinflamatorios también. En pacientes con cáncer de páncreas, se ha asociado niveles elevados de IL-6 con menor supervivencia, tanto solo como combinado con otros biomarcadores. (64)
- **Proteína 1 similar a quitinasa-3 (YKL-40):** lectina fijadora de carbohidratos con preferencia por la quitina, sin actividad quitinasa. Desempeña un papel en la respuesta inflamatoria de células T, y en la inflamación inducida por la interleucina 13. En pacientes con cáncer de páncreas, un nivel alto de YKL-40 se ha asociado con una menor supervivencia, pero no es tan pronóstico como la PCR y la IL-6. (64)

Las pruebas de imagen son otra herramienta importante para el diagnóstico, permitiendo el estudio de la extensión y la planificación del tratamiento. Las más habituales son: pruebas radiológicas como la ecografía abdominal, la tomografía axial computarizada (TAC), y la resonancia magnética; y pruebas endoscópicas como la ultrasonografía endoscópica (USE). (65–68) Estas técnicas de imagen permiten la clasificación del adenocarcinoma de páncreas en estadios según el sistema TNM del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). De esta manera, según la *American Cancer Society*, se pueden clasificar en base a tres parámetros: tamaño del tumor (T), propagación o no a los nódulos o ganglios linfáticos adyacentes (N), y metástasis a sitios distantes (M). El tamaño y si hay metástasis o no (es decir, T y M), se puede saber mediante pruebas de imagen, mientras que la información de la propagación a los nódulos (N) solamente si se dispone en la pieza quirúrgica, es decir, en los pacientes operados. Este proceso facilita la toma de decisiones ya que, cada estadio tumoral se asocia a un pronóstico diferente y con unas opciones terapéuticas concretas. En la 8ª edición de la AJCC del 2017 se establecen los estadios IA, IB, IIA, IIB, III y IV según el TNM, (69) de forma que, posteriormente, se puede resumir en unas etapas que va de 0 hasta IV, como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1: Etapas del cáncer de páncreas según la clasificación de la AJCC y su agrupación según las características del tumor descrita en los parámetros TNM (tamaño, metástasis y propagación a nódulos).

Estadio	Etapas AJCC	Agrupación por etapas
0	0	TisN0M0 (carcinoma <i>in situ</i>)
I	IA	T1N0M0
	IB	T2N0M0
II	IIA	T3N0M0
	IIIB	T1N1M0
	IIIB	T3N1M0
	IIIB	T3N1M0
III	III	T2N2M0
	III	T3N2M0
	III	T4NcualquieraM0
IV	IV	TcualquieraNcualquieraM1

Notas: Estadios según la octava edición de la AJCC (*American Joint Committee on Cancer*).

Independientemente del estadio, existe una clasificación más práctica, especialmente desde el punto de vista quirúrgico: (46,69)

- **Resecables:** si el cáncer está sólo en el páncreas o se ha propagado cerca de éste, pudiéndose extraer por completo el tumor. Aquí se incluyen los pacientes T1, T2 y T3 sin metástasis (M0).
- **No resecables:** cuando mediante cirugía no se pueden extraer completamente. Aquí se puede subclassificar en:
 - o **Localmente avanzado:** si el cáncer aún no se ha propagado a órganos distantes pero el cirujano considera que no se puede extraer completamente. La principal razón es porque ha crecido hacia o alrededor de los vasos sanguíneos principales adyacentes. El objetivo de esta cirugía no sería tratar de curar el cáncer, sino que prevenir y aliviar síntomas o problemas tales como una obstrucción del conducto biliar o del tracto intestinal. Aquí se incluyen los pacientes T4 sin metástasis (M0).
 - o **Metastásico:** cuando el cáncer se propaga a órganos distantes y no se pueden extraer por completo. Aquí se incluyen los pacientes con metástasis.

Además, se cuenta con otras escalas para poder clasificar a los pacientes en función de diferentes categorías:

- La escala ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*) del estado funcional, que fue creada por Zubrod y cols., (70) la cual incluye la funcionalidad como uno de los parámetros para tener en cuenta la evaluación del efecto de las quimioterapias en pacientes oncológicos. Consta de 6 niveles, desde funcionalidad normal (ECOG = 0) a muerte (ECOG = 5) (Tabla 2). Es una valoración clínica muy útil y sencilla de utilizar para valorar del estado general de los pacientes, debido a los pocos niveles que tiene, de manera que los pacientes con ECOG = 0-1-2 son pacientes candidatos para tratar con quimioterapia, mientras que los pacientes clasificados como ECOG=3-4 normalmente reciben cuidados paliativos.

Tabla 2: Escala *Eastern Cooperative Oncology Group* (Escala ECOG).

Puntuación	Descripción
0	Completamente activo, capaz de realizar todas las actividades previas a la enfermedad, sin restricción.
1	Restringido en actividad física extrema, capaz de caminar y realizar trabajos livianos, como en casa o en el trabajo.
2	Capacidad de caminar y de autocuidados, pero incapaz de realizar cualquier tipo de trabajo. Deambula más del 50% de las horas que está despierto.
3	Capacidad de autocuidados limitado, se mantiene postrado o en sillas más del 50% de las horas que está despierto.
4	Completamente incapacitado. No puede realizar autocuidados. Totalmente confinado en cama o silla.
5	Muerte

- El grado de diferenciación histológica indica la rapidez con la que probablemente crecerá ese tumor. La importancia de esta variable es que puede ser uno de los factores que determine el pronóstico y el tratamiento. Esta información se recoge del estudio anatomopatológico de la muestra quirúrgica. De manera general se habla de tumores bien diferenciados, cuando las células del tumor y la organización del tejido se asemeja a las células y tejidos normales, y su crecimiento es lento por ser de baja malignidad; y de tumores indiferenciados o pobremente diferenciados, cuando las células son anormales y le falta la estructura de los tejidos normales. De manera más específica, según la semejanza a las células normales, los tumores se clasifican en grados que van del 1 al 4. A medida que aumenta el grado, menor semejanza hay con las células normales, mayor tendencia a crecer y a diseminarse más rápidamente y, por lo tanto, peor pronóstico. Así, se puede distinguir los siguientes grados: desconocido o cuando no puede determinarse (Gx), bien diferenciados (G1), moderadamente diferenciado (G2), pobremente diferenciado (G3), o indiferenciado (G4).

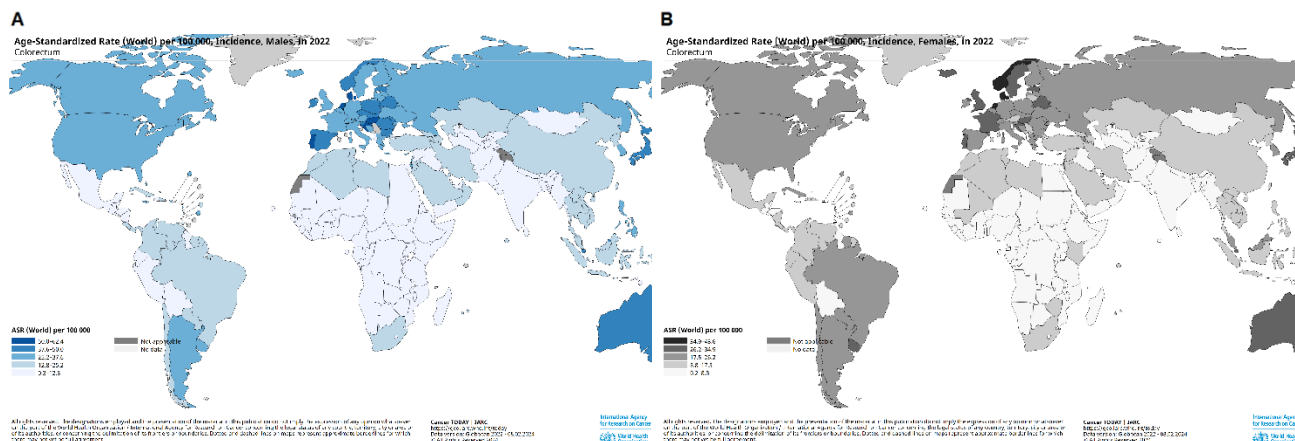
- El sistema de medición conocido como *The Response Evaluation Criteria in Solid Tumors* (RECIST), en su versión 1.1., (71) el cual también se suele llamar criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos, es un método estándar que se usa para medir el modo en que un paciente con cáncer responde al tratamiento. Permite determinar si los tumores se reducen, permanecen igual o se agrandan. Los tipos de respuesta serían:
 - Respuesta Completa (RC): Desaparición de todas las lesiones diana. Cualquier ganglio linfático patológico (ya sea diana o no) debe tener una reducción en el eje corto de < 10 mm.
 - Respuesta Parcial (RP): Al menos una disminución del 30% en la suma de los diámetros de las lesiones diana, tomando como referencia la suma basal de los diámetros.
 - Progresión de Enfermedad (PE): Al menos un aumento del 20% en la suma de los diámetros de las lesiones diana, tomando como referencia la suma más pequeña en el estudio (esto incluye la suma basal si es la más pequeña en el estudio). Además, la suma también debe demostrar un aumento absoluto de al menos 5 mm. La aparición de una o más lesiones nuevas también se considera progresión.
 - Enfermedad Estable (EE): Ni la disminución suficiente para calificar como RP ni el aumento suficiente para calificar como PE, tomando como referencia los diámetros de la suma más pequeña durante el estudio.

- Índice de comorbilidad de Charlson corregido por la edad (CACI): (72) sistema de evaluación de la esperanza de vida a los diez años, según la edad y 19 situaciones más. En general se considera valores entre 0-1 como ausencia de comorbilidad, valores de 2 como comorbilidad baja, y valores ≥ 3 como comorbilidad alta.

Por lo tanto, en la actualidad para el cáncer de páncreas, considerado uno de los tipos de cáncer con evolución infausta, no contamos con biomarcadores que permitan sospechar de la afectación o diagnosticarlo en estadios precoces, ni con herramientas más sensibles para realizar un seguimiento más preciso. Estos serían algunos de los puntos de mayor interés para poder mejorar el manejo de los pacientes con esta patología. Aunque es todo un reto, uno de los escenarios ideales sería disponer de una técnica de alta sensibilidad para mejorar el diagnóstico, la estratificación y el seguimiento de los pacientes con cáncer de páncreas, a partir de una muestra poco invasiva, como es la muestra de sangre periférica.

Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) es el tercer cáncer más frecuente en cuanto a incidencia a nivel mundial, manteniendo esta posición en ambos sexos. En el 2022 causó 903,853 muertes, siendo el segundo cáncer con mayor mortalidad después del de pulmón. Estas tasas dependen de la geografía, observándose una mayor incidencia y mortalidad en los países más desarrollados (Europa, Oceanía y América del Norte) (Figura 8). Se estima que tanto la incidencia como la mortalidad van a ir aumentando en los próximos años, manteniéndose una frecuencia mayor en el sexo masculino. En Europa, todos estos porcentajes y tendencias se mantienen, excepto en la incidencia, donde pasa a ser el segundo tipo de cáncer más frecuente. Y en España destaca por ser el cáncer más frecuentemente diagnosticado.

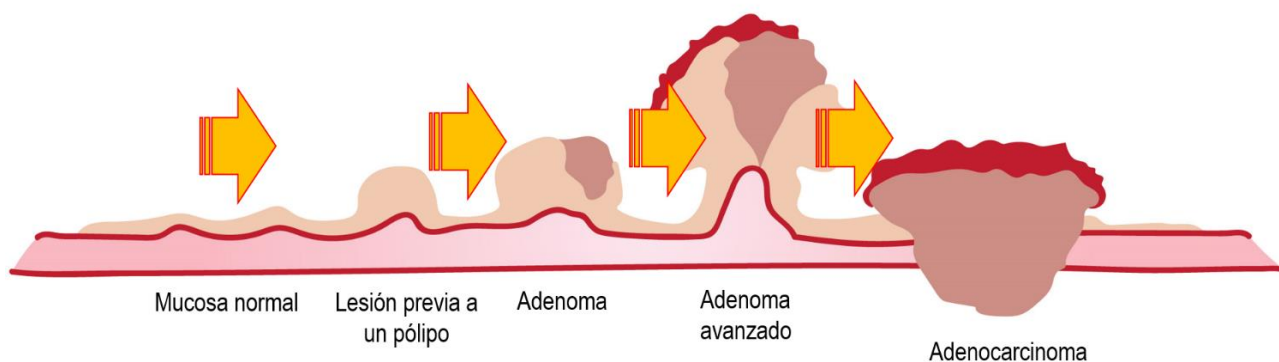


Notas: Imagen recogida de GLOBOCAN (*Global Cancer Observatory*) a fecha 22 de febrero del 2024.

Figura 8: Mapa de incidencia del cáncer colorrectal en el mundo según rangos de edad. **A/** En el sexo masculino; **B/** En el sexo femenino.

El CCR es generalmente considerado como una sola entidad, pero en realidad, se compone del cáncer de colon y cáncer del recto, que difieren no sólo por su localización anatómica, sino también por sus diferentes orígenes, patrones metastásicos y tratamientos. (73) La clasificación patológica de la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica el CCR en los siguientes subtipos histológicos: cánceres glandulares (adenocarcinomas clásicos, el más frecuente), adenocarcinomas mucinosos, carcinomas de células en anillo de sello y variantes que incluyen carcinomas adenoescamosos, carcinomas de células escamosas, carcinomas medulares, neuroendocrinos, indiferenciados y otros. El CCR es un cáncer de origen epitelial, que suele desarrollarse a partir de adenomas convencionales. (74)

En las primeras etapas del CCR, periodo que puede durar años, generalmente el proceso se origina a partir del crecimiento de células del colon, y comúnmente comienza como un pequeño crecimiento no canceroso, llamado pólipo, en la pared del colon. Con el tiempo, estas células se multiplican sin control, haciendo que el pólipo crezca y se vuelva canceroso (Figura 9). Como resultado, los tejidos circundantes se dañan, alterando las funciones normales del colon. (75) Además, a medida que los pólipos crecen, pueden sangrar y/u obstruir el intestino. La transformación del epitelio colónico normal en una lesión precancerosa, que conduce a un carcinoma invasivo, requiere una acumulación de mutaciones genéticas ya sea en la línea somática (adquirida) y/o en la línea germinal (heredada), lo cual suele tardar aproximadamente de 10 a 15 años. Toda esta progresión desde una lesión benigna (pólipo adenomatoso) hasta el cáncer, es una secuencia bien establecida y conocida en el 70-80% de los pacientes con CCR. (76) Aunque no todos los adenomas evolucionan a carcinoma.



Nota: Imagen tomada de <https://serviciodigestivotomelloso.es/cribado-de-cancer-colorrectal/>

Figura 9: Evolución de la mucosa normal a cancerosa en el intestino grueso.

Para los pacientes diagnosticados con CCR en una etapa temprana de la enfermedad, la cirugía es la principal opción terapéutica, llegando a ser curativa. Sin embargo, un gran número de pacientes son diagnosticados en una etapa avanzada, es decir, con metástasis, donde la tasa de supervivencia a 5 años es de aproximadamente el 14%. Para estos pacientes, la principal opción terapéutica es la quimioterapia. (77)

Los síntomas y signos del CCR pueden pasar desapercibidos en etapas tempranas de la enfermedad, mientras que su aparición suele ser indicativa de estadios avanzados. Estos síntomas y signos pueden depender de la localización del tumor, (74) pero de manera general destaca el sangrado rectal, cambios en los hábitos intestinales alternando periodos de diarrea con periodos de estreñimiento, pérdida de peso involuntaria y dolor abdominal. Entre los signos, se pueden detectar masas palpables rectales y abdominales, anemia ferropénica (como consecuencia de las pérdidas de sangre), síntomas agudos y enfermedades metastásicas. (78)

El riesgo de CCR está influenciado por factores modificables y no modificables. Dentro de los modificables destacan la obesidad, el tabaquismo, el abuso del alcohol, el consumo de carnes procesadas y rojas, y las infecciones bacterianas. Por otro lado, la actividad física, los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos, la terapia hormonal posmenopáusica y la ingesta de frutas y verduras se asocian con un menor riesgo de CCR. Así, se estima que cambios en los hábitos nutricionales y dietéticos pueden reducir hasta un 70% el riesgo de padecer CCR. (74) Entre los factores no modificables, la edad, los antecedentes familiares de CCR, la enfermedad inflamatoria intestinal, un diagnóstico previo de diabetes tipo II y un diagnóstico de enfermedades hereditarias como el síndrome de Lynch o la poliposis adenomatosa familiar, son los más relevantes. Además, se debe tener en cuenta que la carcinogénesis es el resultado de la interacción entre mutaciones genéticas y cambios epigenéticos. Por lo que sus interacciones con factores ambientales, así como la microbiota humana que influye en el metabolismo celular y la tasa de proliferación, la alteración de la información genética, la regulación epigenética, los defectos genéticos en los remodeladores de la cromatina, así como las limitaciones en el conocimiento sobre el papel de las regiones no codificantes del genoma en el desarrollo del cáncer, deben tomarse en conjunto como factores clave para comprender la carcinogénesis. (74)

Para estratificar a los pacientes con CCR se utilizan escalas aplicadas en otros tipos de cánceres, tales como la escala ECOG, los estadios según la octava edición de la AJCC, y escalas relacionadas con la comorbilidad como la escala CACI. Todas ellas ya han sido descritas en la **INTRODUCCIÓN: Cáncer de páncreas**. Por ello, ahora únicamente se va a añadir el sistema de clasificación del estado físico de la Sociedad Estadounidense de Anestesiólogos (ASA). Es un sistema uniforme de clasificación de los pacientes antes de un procedimiento quirúrgico que requiere anestesia, con el objetivo de predecir los riesgos y complicaciones quirúrgicas, las cuales van a depender del tipo de cirugía, la edad del paciente, la extensión del procedimiento, etc. Para ello, utiliza un sistema de clasificación que va desde el estado I al estado V, existiendo un sexto estado que identifica a los donantes de órganos fallecidos (Tabla 3).

Tabla 3: Sistema de clasificación del estado físico de la Sociedad Estadounidense de Anestesiólogos.

ASA	Definición	Ejemplo en adultos	Ejemplo en pediatría
I	Persona con buena salud	Persona que no fuma y consume mínimamente alcohol	Niño/a con un IMC saludable para su edad
II	Con afección leve pero bien manejada o tratada	Embarazada, persona con afección pulmonar, fuma o consume alcohol socialmente o tiene sobrepeso	Niño/a con asma leve, con arritmias bien controladas o apnea obstructiva del sueño leve
III	Con una condición grava que tiene un impacto en su salud general	Persona con IMC superior a 40, trastorno por el abuso del alcohol o con un marcapasos implantado	Niño/a con asma grave, anomalía cardíaca, epilepsia o apnea obstructiva del sueño grave
IV	Con una condición grave que pone en peligro su vida	Persona con sepsis, que recibe diálisis con regularidad o tiene una enfermedad cardíaca grave	Niño/a con insuficiencia cardíaca congestiva, que depende de un ventilador o está en shock
V	Con una afección potencialmente mortal que necesita cirugía inmediata para aumentar las probabilidades de supervivencia	Persona con aneurisma roto, sangrado cerebral o disfunción multiorgánica	Niño/a con hemorragia intracraneal, insuficiencia respiratoria o enfermedad hepática grave
VI	Fallecida donante de órganos	Fallecido	Fallecido

Nota: ASA: Sociedad Estadounidense de Anestesiólogos, de sus siglas en inglés; IMC: índice de masa corporal.

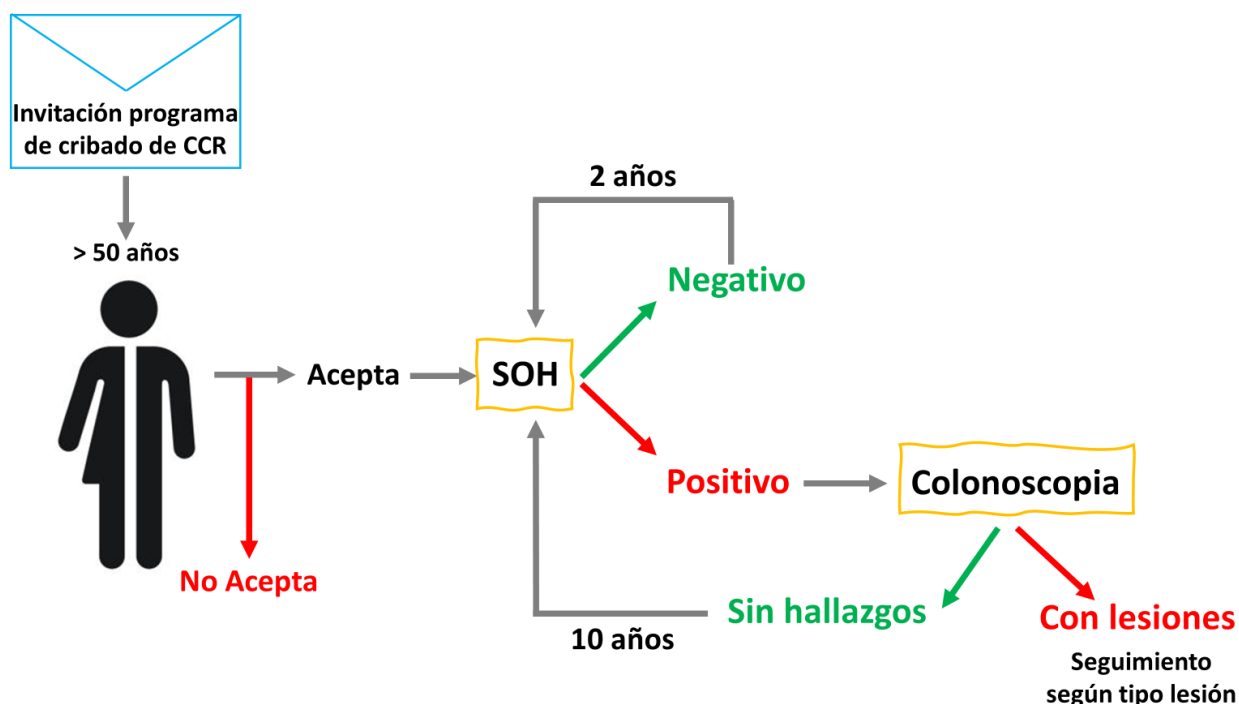
A la hora de realizar un diagnóstico de un paciente con CCR, primero hay que diferenciar dos escenarios. El primero de ellos es el de un paciente sintomático y se tenga la sospecha de que el origen de esos síntomas es posiblemente un CCR. En esta situación lo más habitual es realizar una batería de pruebas de laboratorio, donde se incluyen pruebas de sangre periférica como hemograma y parámetros relacionados con el metabolismo del hierro, si el paciente tiene síntomas relacionados con una posible anemia, para así confirmarla y clasificarla (normo/macro/microcítica, con/sin ferritina baja, con déficit de vitamina B12 o ácido fólico, etc.).

Además, la prueba más utilizada ante una sospecha de CCR es la determinación de sangre oculta en heces (SOH), que consiste en una prueba inmunoquímica para la cuantificación de hemoglobina en heces. Es una prueba no invasiva y barata con una sensibilidad elevada, en torno al 79%. (74) Cuando un paciente obtiene un resultado positivo en la prueba de SOH, se realiza una segunda prueba para confirmar el CCR, que es la colonoscopia, la cual es una técnica de detección muy conocida y popular que tiene la ventaja de detectar y, al mismo tiempo, eliminar lesiones sospechosas precancerosas. Su sensibilidad es muy alta, entre el 92% y 99%, (79) aplicable tanto al cáncer como a los adenomas no cancerosos. Pero se considera una prueba invasiva, ya que conlleva ciertos riesgos y complicaciones como la perforación intestinal, además de que se realiza con sedación. Es muy importante mencionar que una correcta preparación del paciente es necesaria para asegurar la correcta visualización del intestino grueso por parte de los endoscopistas.

Una cuestión muy interesante es qué se considera positivo en la prueba de SOH, ya que es un umbral que se puede modificar, como en todas las pruebas de laboratorio. En este caso, es muy habitual utilizar un punto de corte más alto ante pacientes sintomáticos (50 µg hemoglobina/g heces), mientras que se suele reducir dicho punto de corte ante pacientes asintomáticos (20 µg hemoglobina/g heces). (80) Es aquí donde aparece el segundo escenario, es decir, el correspondiente al cribado poblacional del cáncer colorrectal. En este caso, el punto de corte en SOH varía según la incidencia y presentación del CCR, de forma que, si esta cambia, se podría cambiar el punto de corte utilizado. Un ejemplo es la interrupción del programa de cribado de CCR durante el periodo de pandemia COVID-19 desde el 13 de marzo hasta el 01 de septiembre del 2020. (81) Como consecuencia de esta interrupción, se redujo el número de colonoscopias disponibles a realizar, por lo que se redujo el número de casos diagnosticados de CCR, aumentando la proporción de estadios avanzados. Para mitigar estas consecuencias, y debido a que no se podía aumentar la disponibilidad de las colonoscopias en los servicios de salud, se estudiaron estrategias como aumentar el punto del corte de la prueba de SOH o el uso de factores de riesgo específicos como el sexo o la edad avanzada, con el fin último de priorizar el acceso a las colonoscopias y reducir el infra diagnóstico de pacientes con CCR y con lesiones avanzadas. (82)

El programa de cribado de asintomáticos se realiza en pacientes con una edad superior a los 50 años. Este sería el único criterio para poder ser invitado al programa de cribado. Aunque se está valorando reducir a los 45 años, debido a un aumento de casos de CCR en pacientes menores de 50 años. (83,84) Una vez que se acepta su participación, se debe realizar la prueba de SOH, que si es negativa (< 20 µg hemoglobina/g heces), se debe repetir la prueba de SOH a los dos años. Pero si es positiva (> 20 µg hemoglobina/g heces), se debe confirmar con la colonoscopia. En función del resultado

de la colonoscopia, el paciente tendrá un seguimiento diferente. Así, si en la colonoscopia no se observa ninguna lesión, el paciente es excluido temporalmente del programa de cribado durante 10 años. Pasado este tiempo, tendría que volver a hacer la prueba de SOH y, en función del resultado, hacer otra colonoscopia o no. En cambio, si en la colonoscopia se observa una lesión, el paciente es excluido definitivamente del programa de cribado y es trasladado al servicio de digestivo donde se le realizará un seguimiento (Figura 10). Este seguimiento será más exhaustivo o menos en función del tipo de lesión. Las lesiones de bajo riesgo tienen un seguimiento más distanciado en el tiempo que las lesiones de mayor riesgo, cuyo seguimiento es más cercano. La definición de la lesión es posible gracias a que el procedimiento de la colonoscopia permite extirpar las lesiones para realizar su análisis anatomopatológico, el cual permite clasificar la lesión. Además, la definición del grado de riesgo también depende del número y tamaño de las lesiones. (85,86) Existen varias guías con los criterios para realizar el seguimiento, (85,86) pero todas ellas se basan en el número y tamaños de pólipos encontrados en la colonoscopia, además de la displasia y vellosidad analizadas en el laboratorio de anatomía patológica.



Notas: CCR: cáncer colorrectal; SOH: sangre oculta en heces.

Figura 10: Esquema del programa de cribado población del cáncer colorrectal.

Una vez que se hace un diagnóstico de CCR, ya sea porque el paciente es sintomático o asintomático, existen marcadores tumorales cuyo uso es más eficiente en el seguimiento que en el propio diagnóstico. No existe ningún marcador tumoral específico para CCR, pero destaca el antígeno carcinoembrionario (CEA) por ser uno de los más utilizados. El CEA es una proteína que se encuentra en algunos tejidos del feto cuando se está desarrollando. En el momento del nacimiento su concentración en sangre es muy baja, y en los adultos se encuentra en concentraciones pequeñas, las cuales pueden aumentar en algunos tipos de cáncer (valor de referencia: < 5 µg/L). Al principio se pensó que era un marcador específico de CCR, pero posteriormente se ha demostrado que su aumento también está relacionado con cáncer de páncreas, ovario, mama, tiroides, pulmón, hígado, estómago, etc. Incluso puede estar aumentado en patologías no cancerosas, tales como inflamación, cirrosis, úlcera péptica, colitis ulcerosa, pólipo rectal, enfisema, trastornos mamarios benignos, así como en fumadores. Por esta razón, el CEA tiene limitada su aplicación en el cribado poblacional. Sin embargo, juega un papel muy importante en la evaluación de la respuesta al tratamiento y en el seguimiento de recidivas, ya que su concentración está relacionada con la masa tumoral. Junto al biomarcador CEA, se suele utilizar también el CA19.9, el cual tampoco es específico de CCR, pero ambos son muy utilizados en el seguimiento de estos pacientes.

Debido a que todavía no existe una prueba no invasiva con la suficiente especificidad y sensibilidad para diagnosticar el CCR, con el objetivo final del reducir el número de colonoscopias realizadas se siguen haciendo esfuerzos en su búsqueda. Por ejemplo, la proteína septina-9 en suero se ha relacionado con el CCR. Es una proteína implicada en la carcinogénesis

del CCR cuando su región promotora está hipermetilada. Una vez hipermetilada dentro de las células de CCR, la proteína se libera al torrente sanguíneo donde puede detectarse. Se han obtenido sensibilidades y especificidades entre 52%-73% y 84%-91% respectivamente, aumentando estos porcentajes en etapas avanzadas. (74) Incluso se ha adaptado un dispositivo POC (*point of care*). (87)

Otros biomarcadores estudiados son: 1) el antígeno polipeptídico específico tisular, la proteína formada en las fases S y G2 del ciclo celular y liberada después de la mitosis. Parece que juega un papel en el diagnóstico (aumenta su concentración en el 60%-80% de los pacientes con CCR) y seguimiento de los pacientes tras el tratamiento quimioterapéutico en cáncer pancreático y colorrectal, sobre todo; (88) y 2) la glucoproteína asociada a tumores (TAG-72) es una glicoproteína producida por células de la pelvis renal, el epitelio gástrico y los conductos biliares. Se estima una sensibilidad del 28%-67% para diagnosticar el CCR. (88)

De igual manera, se están buscando nuevos biomarcadores no invasivos para el cribado poblacional del CCR, que sean capaces de mejorar los resultados de la prueba de SOH o como herramienta complementaria, con el objetivo final de reducir el número de colonoscopias innecesarias realizadas a pacientes sin lesiones en el colon. En este contexto, la FDA (*Food and Drug Administration*) ha aprobado una combinación de SOH y marcadores de DNA (*deoxyribonucleic acid*) anormal para la detección del CCR, demostrando una mayor sensibilidad que la SOH para adenomas avanzados (42% frente al 23%) y cáncer (92% frente al 72%). (89)

BIOPSIA LÍQUIDA TÉRMICA: HACIA LA PRÁCTICA CLÍNICA

Interferencia de la bilirrubina en la TLB

INTRODUCCIÓN

Más de la mitad de los pacientes con diagnóstico de cáncer de páncreas experimentan un aumento de la concentración de bilirrubina en sangre periférica, lo que se conoce como hiperbilirrubinemia o ictericia, y se define como una coloración amarillenta de los tejidos corporales por la acumulación de un exceso de bilirrubina. La ictericia producida en los pacientes con cáncer de páncreas es causada principalmente por la ubicación del tumor, es decir, generalmente los tumores ubicados en la cabeza del páncreas suprimen los conductos biliares provocando una obstrucción que desencadena en un aumento de la bilirrubina, sobre todo la bilirrubina directa. Así, la mayoría de los pacientes con cáncer de cabeza de páncreas presentan signos y síntomas de ictericia obstructiva. (90) Una ictericia temprana suele ocurrir por un tumor en la cabeza del páncreas, mientras que una ictericia observada en estadios más avanzados se suele deber a metástasis en los ganglios linfáticos y los conductos biliares. (91)

Debido a que la bilirrubina es poco hidrosoluble, cuando se encuentra en el torrente sanguíneo, se une fuertemente a la albúmina para ser transportada al hígado para su metabolización, donde se transforma en su conjugado que sí es soluble en agua. (92,93) Un exceso en la concentración de bilirrubina satura la capacidad de unión a albúmina, aumentando la concentración de bilirrubina no conjugada libre, que es la responsable de los efectos tóxicos, destacando su neurotoxicidad.

La unión entre la bilirrubina y la albúmina es estequiométricamente 1:1, habiendo un sitio en la albúmina con mayor afinidad, además de otros sitios secundarios. (94) Por lo tanto, la concentración de bilirrubina libre (no unida a albúmina) depende, además de la concentración de bilirrubina total, de la concentración de albúmina y de su capacidad de unión. (95)

La ictericia, junto con la hemólisis y la lipemia, es considerado uno de los interferentes preanalíticos endógenos que pueden impedir una correcta interpretación de los resultados de las pruebas de laboratorio. (96,97) Por ello, ante una nueva técnica analítica, las sociedades científicas recomiendan realizar, al menos, el estudio de aquellas interferencias más relevantes que podrían afectar a los resultados. Sin embargo, no existe ningún estudio publicado sobre las posibles interferencias que pueden producir la hemólisis, la lipemia y la ictericia en el TLB.

Debido a que se estudiaron mediante TLB muestras de suero de pacientes con diagnóstico de cáncer de páncreas, siendo uno de los principales agentes etiológicos de la ictericia, (98) se analizó la posible interferencia de la bilirrubina en suero, ya que tanto el aumento de la concentración de bilirrubina como sus interacciones con albúmina, podrían detectarse mediante TLB.

Por lo tanto, el **objetivo** de este estudio fue estudiar si puede haber una interferencia por la bilirrubina o a partir de qué concentración no se puede diferenciar pacientes con PDAC de pacientes sin cáncer.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se preparó una solución madre de bilirrubina con una concentración de 100 mg/dL. Para ello, primero se disolvió 10 mg de bilirrubina pura (Sigma Referencia B4126, lote SLCK9189) en 1 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 M. Posteriormente se añadió 9 mL de PBS (*phosphate buffered saline*), obteniendo 10 mL de solución madre (a una concentración de 1 mg/mL o 100 mg/dL).

Por otro lado, se preparó 10 mL de solución blanco (sin bilirrubina) mezclando 1 mL de NaOH 0.1 M con 9 mL de PBS. Se utilizó una mezcla de sueros de voluntarios sanos, sin patología pancreática.

La solución madre se añadió a diez diferentes alícuotas de la mezcla de sueros de los voluntarios sanos, obteniéndose muestras con concentraciones crecientes de bilirrubina, desde cero hasta 40 mg/dL (Tabla 4). En cada alícuota se realizó una dilución 1:25 con PSB, utilizando 400 μ L para el ensayo en el DSC.

Tabla 4: Alícuotas de concentraciones crecientes de bilirrubina, indicando los volúmenes usados de la solución madre, la solución blanco y de la mezcla de suero en cada una de ellas.

Bilirrubina (mg/dL)	Solución madre (μ L)	Solución blanco (μ L)	Mezcla de sueros (μ L)
0	0	40	60
1	1	39	60
5	5	35	60
10	10	30	60
15	15	25	60
20	20	20	60
25	25	15	60
30	30	10	60
35	35	5	60
40	40	0	60

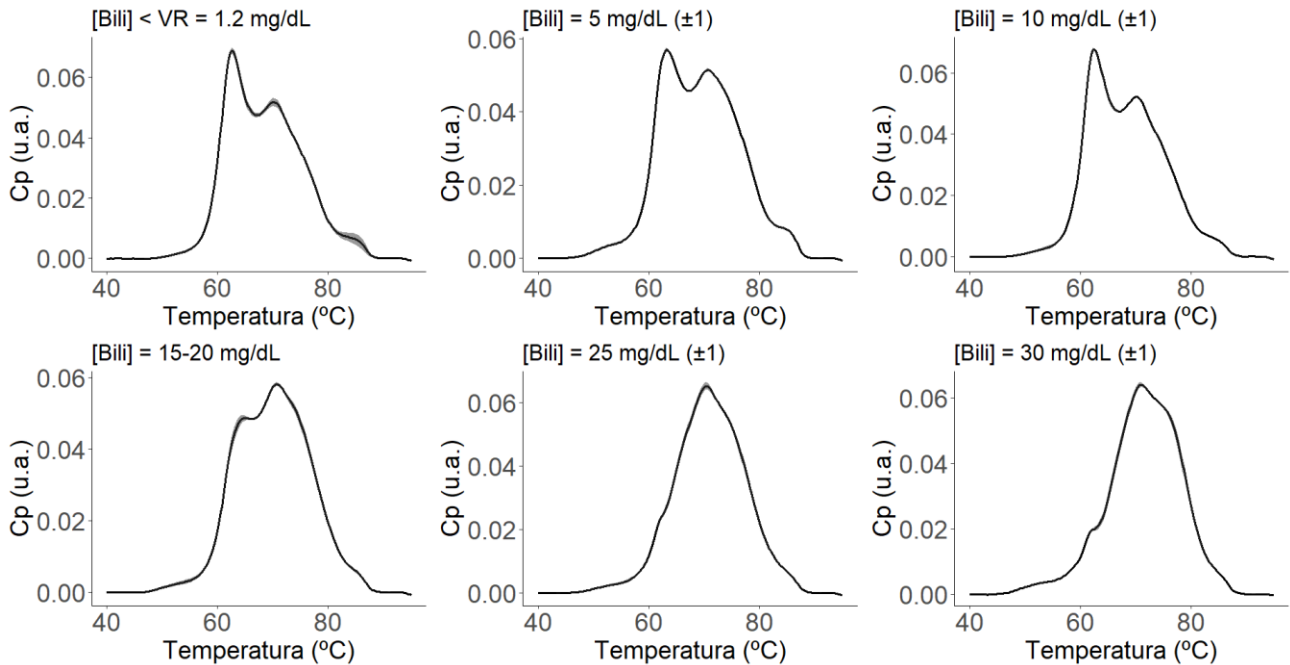
Se utilizaron muestras de suero de pacientes diagnosticados de adenocarcinoma pancreático, donde se recogió la concentración de la bilirrubina en suero.

Todas las muestras se analizaron en un microcalorímetro VP-DSC de escaneo diferencial automatizado de alta sensibilidad (MicroCal, Malvern Panalytical, Malvern, Reino Unido). Los experimentos se realizaron a una velocidad de escaneo de 1°C/min, realizando un barrido desde los 10°C hasta los 95°C. Los termogramas obtenidos fueron corregidos en función su línea base. En el caso de las muestras de los pacientes con adenocarcinoma pancreático, se obtuvo un único termograma por pacientes, mientras que las alícuotas de los sueros de voluntarios sanos con concentraciones crecientes de bilirrubina se realizó por duplicado.

Se compararon los termogramas obtenidos en cada alícuota para observar si existía un cambio en los termogramas al aumentar la concentración de bilirrubina. Además, se comparó con los termogramas de los pacientes con adenocarcinoma de páncreas cuya concentración de bilirrubina era parecida a la concentración de bilirrubina en la alícuota.

RESULTADOS

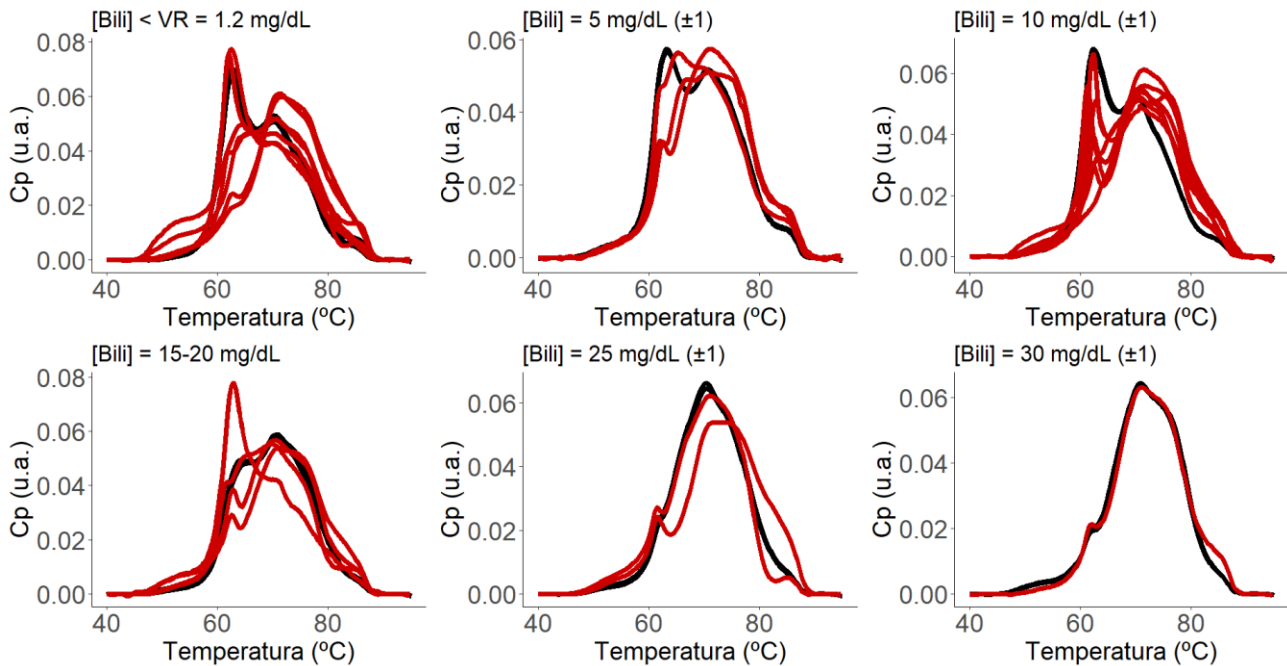
Las curvas de termogramas de las alícuotas con concentraciones crecientes de bilirrubina experimentaron cambios a medida que aumentaba dicha concentración, obteniendo una muy buena reproducibilidad en los duplicados (Figura 11).



Notas: u.a.: unidades arbitrarias; Bili: bilirrubina; VR: valor de referencia de la bilirrubina.

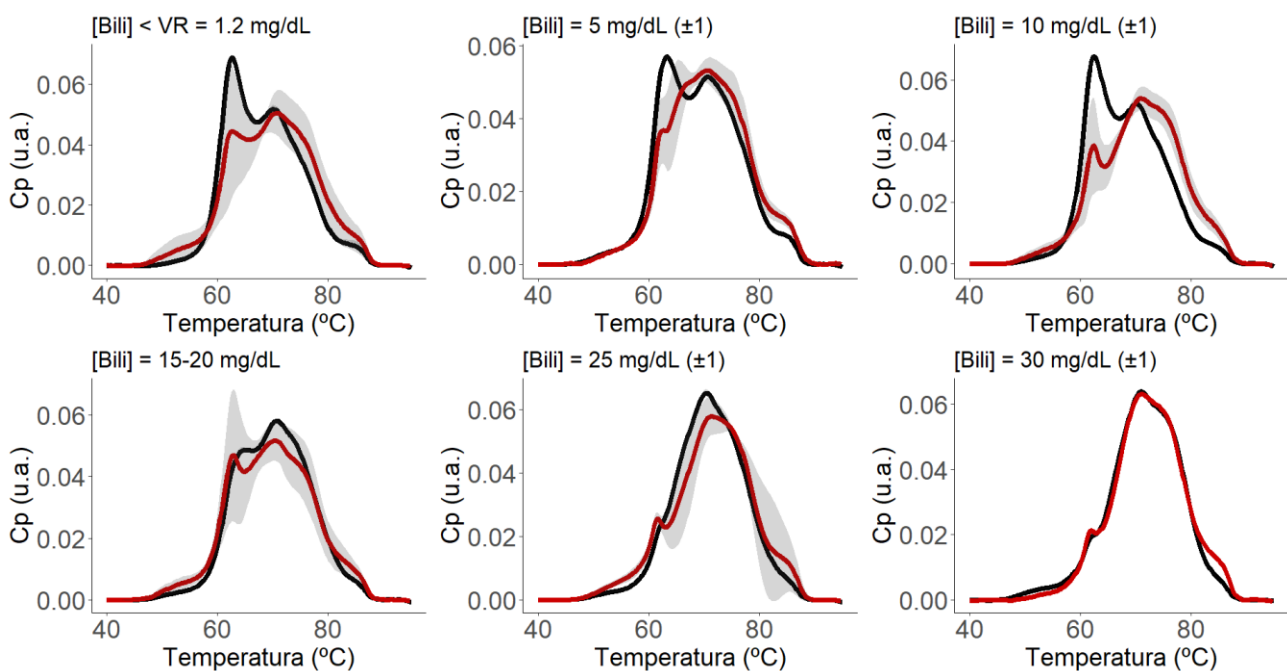
Figura 11: Media y desviación estándar (sombreado en gris) de los duplicados de los termogramas procedentes de las alícuotas con concentraciones crecientes de bilirrubina.

Se comparó los termogramas obtenidos en cada alícuota, con los termogramas de los pacientes con adenocarcinoma de páncreas, ambos grupos con concentraciones parecidas de bilirrubina, de manera que hasta 10 mg/dL claramente se observó diferencias entre los termogramas de las alícuotas y los termogramas de los pacientes con adenocarcinoma. A partir de la concentración de 15 mg/dL empezaron a disminuir las diferencias, siendo prácticamente iguales a partir de los 25 mg/dL (Figura 12 y Figura 13).



Notas: u.a.: unidades arbitrarias; Bili: bilirrubina; VR: valor de referencia de la bilirrubina.

Figura 12: Termogramas de las **alícuotas** con concentraciones crecientes de bilirrubina, junto a los termogramas de los pacientes con **adenocarcinoma** con concentraciones de bilirrubina parecida al de la alícuota.



Notas: u.a.: unidades arbitrarias; Bili: bilirrubina; VR: valor de referencia de la bilirrubina.

Figura 13: Termogramas de la media de las **alícuotas** a cada concentración crecientes de bilirrubina, junto a la media de los termogramas de los pacientes con **adenocarcinoma** con concentraciones de bilirrubina parecida al de la alícuota, junto con su desviación estándar representada como sombreado en gris.

DISCUSIÓN

Se ha observado un cambio en los termogramas de la mezcla de sueros de pacientes sanos al aumentar la concentración de bilirrubina. Los mayores cambios se observaron al pasar de una concentración de bilirrubina de 10 mg/dL a 15-20 mg/dL, donde se observó una disminución del primer máximo, siendo el segundo máximo mayor a este. El primer máximo corresponde principalmente a la aportación de la desnaturalización de la albúmina, (6) lo que indicaría un reflejo del cambio en la interacción producida entre la albúmina y la bilirrubina. Además, se observó un segundo cambio importante en los perfiles de los termogramas a partir de los 25 mg/dL de bilirrubina, donde prácticamente no se observó un cambio en ellos.

A pesar de los cambios observados al aumentar la concentración de bilirrubina, esto no impidió que se observasen diferencias entre los perfiles sanos y los perfiles de pacientes con cáncer de páncreas a concentraciones bajas de bilirrubina. Mientras que a partir de los 15 mg/dL de bilirrubina, estas diferencias fueron menores, siendo prácticamente superponibles a partir de los 25 mg/dL. Es aquí donde el perfil no cambia y, por lo tanto, se deduce que lo que se observa es el perfil de desnaturalización de la bilirrubina principalmente. Es decir, a partir de una concentración de 25 mg/dL, independientemente del resto de analitos, es tan alta esta concentración que enmascara el perfil de desnaturalización del resto.

Por lo tanto, al comparar los termogramas de pacientes sanos con pacientes con cáncer de páncreas, se pueden seguir observando diferencias entre ambos grupos y, si se analiza una muestra de un paciente con una concentración de bilirrubina superior a 25 mg/dL, habría que tener en cuenta que únicamente se estaría viendo la aportación de la bilirrubina al termograma.

Otras patologías con aumentos de bilirrubina podrían confundirse con cáncer de páncreas al usar el TLB, ya que éste mostraría el perfil de desnaturalización de la bilirrubina, lo que indicaría un aumento considerable de ella en suero, pero sin indicar la causa. Es aquí donde haría falta utilizar otras pruebas o el contexto clínico para diferenciarlo.

Desarrollo de un modelo de aprendizaje automatizado para el diagnóstico y pronóstico del cáncer de páncreas mediante muestras de suero analizadas por TLB

INTRODUCCIÓN

El cáncer de páncreas es uno de los cánceres más mortales y con peor evolución. Estos pacientes suelen ser diagnosticados en estadios avanzados debido principalmente a la falta de síntomas en los inicios de la enfermedad, a la falta de herramientas diagnósticas con la suficiente sensibilidad y especificidad que permitan sospechar de la afectación o diagnosticarlo en estadios precoces, y a la falta de respuesta de los pacientes con tratamientos quimioterápicos. Uno de los principales biomarcadores más utilizado en los pacientes con PDAC es el marcador tumoral CA19.9, destacando más por uso en el seguimiento de la enfermedad, como indicador de carga tumoral, que, como herramienta diagnóstica, debido a su valor predictivo negativo tan bajo. Por todas estas razones, el cáncer de páncreas es uno de los escenarios donde sería interesante buscar nuevas herramientas complementarias.

Se propone la TLB como una nueva herramienta para estudiar a los pacientes con cáncer de páncreas. Pero antes sería necesario establecer qué metodología se va a utilizar para analizar las curvas de termogramas de las muestras de suero de los pacientes con cáncer de páncreas.

En este estudio se va a mostrar los resultados de una nueva metodología desarrollada y validada, para el análisis de las curvas de termogramas de DSC cuando se utilizan muestras biológicas. Teniendo en cuenta la bibliografía previamente comentada en la introducción general, se considera que es interesante el uso de herramientas de clasificación tradicionalmente validadas para su uso en datos de alta dimensión como las que se utilizan para los resultados de *ómicas*, además del uso de algoritmos de penalización para seleccionar las variables y evitar el sobreajuste. Además de dividir la muestra de estudio en grupo de entrenamiento y en grupo de validación, aleatorizando varias veces la selección de ambos grupos.

Por ello, el **objetivo** de este estudio fue: proponer una nueva metodología de análisis de curvas de termogramas de muestras biológicas, en este caso muestras de suero de sangre periférica, debido a que es un tipo de muestra fácil de conseguir y mínimamente invasiva, usando la información directa de las curvas gracias al uso de herramientas de aprendizaje automatizado, para:

- 1/ Obtener un modelo de clasificación, modelo iTLB (*intelligent Thermal Liquid Biopsy*), robusto que nos diferencie entre pacientes controles sanos y pacientes con cáncer de páncreas, ya que es una de las patologías donde es necesario nuevos enfoques diagnósticos.

- 2/ Aplicar externamente el modelo con otra cohorte de pacientes diagnosticados de cáncer de páncreas, donde se dispone de dos muestras por paciente, antes y después del tratamiento, para relacionar el cambio del resultado del modelo iTLB entre ambas muestras con la respuesta o no al tratamiento, y compararlo con los cambios producidos en variables bioquímicas de uso en clínica como es el marcador CA19.9.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos

A) Cohortes de entrenamiento y validación del modelo iTLB de clasificación para el diagnóstico

Para el desarrollo de una nueva metodología de análisis de los termogramas y obtención de un modelo de clasificación de pacientes se utilizaron a modo de ejemplo las muestras de suero retrospectivas de dos colecciones del Banco de Sangre y Tejidos de Aragón, y proporcionadas por el Biobanco del Sistema de Salud de Aragón, integrado en la Red Nacional de Biobancos de España: un grupo de controles sanos, procedentes del banco de sangre de Zaragoza, y un grupo de pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC) del Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS) de Zaragoza. En el grupo de pacientes con PDAC, se dispone de la siguiente información clínica:

- Estadio según la octava edición de la AJCC: Define el grado de extensión tumoral, en función del tamaño, metástasis y propagación a nódulos. Toma valores de 0 a IV.
- Clasificación de Resecable o No resecable: Información sobre el pronóstico del tratamiento, basándose en si se puede o no extraer la masa tumoral mediante cirugía. Por ello se pueden dividir en: resecables o no resecables. Y dentro de este último en localmente avanzado o metastásico.

Posteriormente el modelo iTLB ajustado se validó externamente en una cohorte de pacientes diagnosticados de PDAC procedentes tanto del HUMS como del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (HCULB), ambos de Zaragoza.

B) Cohorte de pacientes con PDAC para la aplicación del modelo iTLB en la respuesta al tratamiento y su relación con la supervivencia de los pacientes

El modelo iTLB se aplicó en una cohorte independiente de un tamaño muestral pequeño, formado por pacientes con PDAC, procedentes también del HCULB de Zaragoza, muy bien clasificados y con datos clínicos asociados, tanto bioquímicos como histológicos:

- Escala ECOG del estado funcional: Valoración del estado general de los pacientes. Muy utilizado para decidir qué pacientes son los candidatos para recibir tratamiento quimioterapéutico (ECOG = 0-2) y cuáles cuidados paliativos (ECOG = 3-4).
- Grado de diferenciación histológica: Relacionado con la rapidez que probablemente crecerá el tumor, por lo que está relacionado con el pronóstico. Se clasifica en: desconocido o cuando no puede determinarse (Gx), bien diferenciados (G1), moderadamente diferenciado (G2), pobremente diferenciado (G3), o indiferenciado (G4).
- Sistema de medición RECIST1.1: Evaluación de la respuesta al tratamiento. Los tipos de respuesta son: respuesta completa (RC), respuesta parcial (RP), enfermedad estable (EE) y progresión de enfermedad (PE).
- Concentración en sangre periférica de albúmina (Rango de Referencia (RR): 3.40 - 5.40 d/dL), hemoglobina (RR en el sexo masculino: 13.20 - 16.60 g/dL, RR en el sexo femenino: 11.60 - 15.00 g/dL), LDH (RR: 105 - 333 UI/L) y CA19.9 (RR: 0 - 37 U/mL).

De cada paciente se extrajo dos muestras de sangre periférica, una primera muestra basal extraída antes de empezar con el mismo tratamiento y la una segunda muestra al mes, después del tratamiento (nad-paclitaxel en combinación con gemcitabina). Las muestras de suero se utilizaron para obtener las concentraciones de albúmina, hemoglobina, LDH y CA19.9 en estado basal y al mes. En el caso del marcador tumoral CA19.9, se analizó también en una tercera muestra extraída a los dos meses de la muestra basal (segundo punto de control). Además, las muestras de suero basales y al mes se analizaron para obtener sus termogramas.

Todos los pacientes de esta cohorte tuvieron un seguimiento exhaustivo, donde se registró la supervivencia libre de progresión (PFS de sus siglas en inglés, *Progresión Free Survival*), que es la estimación del tiempo desde la muestra basal previa al tratamiento y la progresión clínica/radiológica del tumor; y la supervivencia global (OS de sus siglas en inglés,

Overall Survival), que es la estimación del tiempo desde la muestra basal y la fecha de fallecimiento del paciente por cualquier causa.

Procesamiento de las muestras de suero

De cada paciente se obtuvieron cinco mililitros de sangre periférica, recogidos en tubos con gel separador (BD Vacutainer®). Tras esperar a que la muestra se coagule, se centrifugó a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos. El suero se separó en alícuotas y se congeló a -80°C hasta su análisis posterior.

Todas las muestras fueron identificadas con un código interno para garantizar el anonimato de los pacientes, siguiendo las indicaciones descritas en el protocolo aprobado por el Comité Ético.

Obtención de los termogramas

Los termogramas se obtuvieron tras analizar las muestras de suero en el equipo automático de alta sensibilidad de calorimetría diferencial de barrido (MicroCal, Malvern-Panalytical). El termograma consiste en la determinación del exceso de capacidad calorífica (C_p) de una muestra de suero, respecto a una disolución de referencia, en función de la temperatura, $C_p(T)$, a lo largo del proceso de desnaturalización térmica.

Cada muestra de suero fue diluida (1:25) en solución salina filtrada y tamponada de fosfato (PBS), para luego utilizar 400 μL para el ensayo. Los experimentos fueron realizados a una velocidad de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, desde los 10°C hasta los 95°C .

Análisis de los datos

Preparación de curvas de termogramas

Los termogramas se procesaron utilizando un software desarrollado por el grupo e implementado en Origin 7 (OriginLab), que implicó la resta y corrección de las líneas base, la interpolación para obtener puntos de datos distribuidos uniformemente en el rango de temperatura ($\Delta T = 0.25^{\circ}\text{C}$), y restringir el análisis al intervalo entre 40°C y 95°C . Cada curva de termograma se normalizó por su área. Las temperaturas y su valor de C_p fueron las variables predictoras del modelo de clasificación, por lo que se disponía de 221 temperaturas/variables predictoras. Con el objetivo de reducir el número de variables predictoras/temperaturas y evitar el sobreajuste, se seleccionó la información de cada grado de temperatura, truncando desde los 60°C hasta los 80°C , ya que la experiencia en estudios previos ha indicado que los mayores cambios se producen entre estas temperaturas. Esto quiere decir que, con este rango, el número de variables predictoras/temperaturas fue de 21 (60°C , 61°C , 62°C , ... hasta 80°C).

Metodología paso a paso para obtener un modelo de clasificación (modelo iTLB) a partir de curvas de termogramas

La metodología de análisis propuesta se basó en la obtención de un modelo de clasificación a partir de la forma de las curvas de los termogramas. La información de la forma de los termogramas se obtuvo al usar como variables predictoras las temperaturas (y su valor de C_p), más concretamente se utilizó parejas de temperaturas mediante la función *K-Top-Scoring-Pair* (KTSP) (librería *switchBox* de R). (99) KTSP se define como un método robusto de clasificación a partir de datos de alta dimensión basado en un pequeño subconjunto de características, lo que lo hace menos sensible al sobreajuste y potencialmente fácil de interpretar en términos biológicos. Tradicionalmente se ha planteado este tipo de herramientas para analizar datos basados en *ómicas*. Debido a las características de alta dimensión de los datos de termogramas, se propone una nueva aplicación del paquete *switchBox*.

Al aplicar el paquete *switchBox* a los datos de termogramas, se convirtió la variable predictora cuantitativa continua (valor de C_p) en una variable dicotómica. El algoritmo selecciona un par de temperaturas (T_1 , T_2) cuando existe una fuerte correlación entre el signo de la diferencia de C_p entre esa pareja de temperaturas en un grupo, $C_p(T_1) > C_p(T_2)$ o $C_p(T_1) < C_p(T_2)$, y una correlación de signo contrario en el otro grupo (Figura 14). Por esta razón, cada termograma de cada paciente podría alcanzar o no la condición de los pares de temperaturas (No/Sí o 0/1).

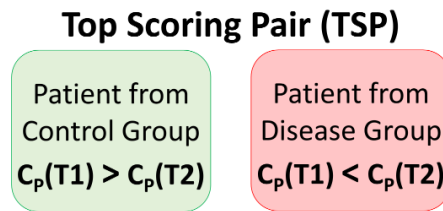


Figura 14: Top Scoring Pair de la librería switchBox de R aplicado a los datos de las curvas de termogramas de muestras biológicas.

El modelo de clasificación se ajustó mediante una regresión logística regularizada aplicando el paquete *ncvreg* de R-Studio, el cual utiliza penalizaciones de Lasso o no convexas, y validación cruzada para el ajuste del modelo. Con el objetivo de obtener un modelo robusto, todo este procedimiento se entrenó en el 70% de los datos y se validó en el 30% restante, aleatorizando 100 veces.

El esquema de los pasos de la metodología fue:

1. Generación de matriz de remuestreo para dividir 100 veces los datos en 70% de entrenamiento y 30% de validación. Debido a que la variable de respuesta es PDAC o no PDAC, es importante que el muestreo sea estratificado, es decir, manteniendo el porcentaje observado en la cohorte inicial.
2. Establecimiento del rango óptimo del número de parejas de temperaturas necesarias para el modelo.
3. Selección de las parejas de temperaturas más frecuentemente incluidas en los 100 ajustes.
4. Entrenamiento del modelo a partir de las parejas de temperaturas más frecuentes seleccionadas anteriormente.
5. Selección, de los 100 modelos entrenados, el que tenga una mayor área bajo la curva en el grupo de validación (grupo que constituye el 30% de la cohorte inicial).

El resultado del modelo de clasificación ofreció como resultado único número por paciente $(-\infty, +\infty)$. De manera estándar, el punto de corte establecido por el modelo era de cero. Esto quiere decir que cuando el modelo de clasificación proporcionaba un número menor a cero significaba que clasificaba ese paciente con ese termograma como control sano, mientras que, si el número era mayor a cero, el modelo clasificaba a ese paciente con ese termograma como paciente con patología (PDAC en este caso). El punto de corte se podía cambiar según el objetivo del estudio. Se comparó los resultados obtenidos según el punto de corte estándar y el punto de corte calculado de Youden. (100)

El rendimiento del modelo de clasificación como prueba diagnóstica se evaluó mediante el cálculo de índices de rendimiento comunes (sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo), así como la curva de característica operativa del receptor (ROC) y su área bajo la curva (AUC) con su intervalo de confianza del 95% (IC_{95%}).

Relación del modelo iTLB con variables clínicas

Primero se obtuvo un modelo iTLB para diferenciar a la población de controles sanos de los pacientes con diagnóstico de PDAC. Se relacionó el modelo iTLB con las variables clínicas recogidas en los pacientes con PDAC. Esta relación se realizó considerando al modelo iTLB como una variable cuantitativa y como una variable dicotómica según diferentes puntos de corte. Estos resultados se realizaron con todos los datos (el 70% de entrenamiento y el 30% de validación de la cohorte inicial), para evitar tener grupos con tamaños pequeños y para que la estadística tuviera mayor potencia.

Posteriormente se aplicó el modelo iTLB a la cohorte externa de pacientes con PDAC. Debido a que se disponía de dos muestras por paciente (una basal antes de tratamiento, y una al mes después del tratamiento), se obtuvieron dos resultados del modelo iTLB por paciente. Se relacionó la respuesta al tratamiento evaluada mediante la escala RECIST1.1, con los cambios en las concentraciones en sangre periférica de los biomarcadores albúmina, hemoglobina, LDH y CA19.9, además de los cambios en la respuesta del modelo iTLB, entre las muestras basales y las muestras extraídas al mes. Además, se relacionó estos cambios entre ambas muestras con el pronóstico de los pacientes al compararlos según la supervivencia (PFS y OS).

La prueba de Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors o la prueba de Shapiro-Wilk (según el tamaño muestral) se realizó para evaluar la normalidad de las variables. Las medias entre dos grupos independientes/dependientes se compararon mediante la prueba T de Student de muestras no pareadas/pareadas para variables con comportamiento normal (verificando previamente la homocedasticidad con la prueba de Bartlett), mientras que las medianas entre dos grupos independientes/pareados se compararon mediante la prueba de Wilcoxon de muestras no pareadas/pareadas para variables con comportamiento no normal. Las medias entre tres o más grupos pareados de distribución paramétrica se compararon mediante la prueba de análisis de las varianzas (ANOVA) para muestras pareadas, con la comprobación de la esfericidad mediante la prueba de Mauchly. En caso de no cumplirse la hipótesis de esfericidad, se realizó la corrección del p-valor mediante Greenhouse-Geisser. El posterior análisis múltiple bivariante se realizó ajustando los p-valores según el método de Bonferroni. La asociación entre grupos para variables cualitativas dicotómicas se evaluó mediante la prueba de χ^2 de Pearson con la corrección de Yates, excepto cuando el tamaño muestral era pequeño (≤ 20) donde se utilizó la prueba de Fisher. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de dos grupos se compararon mediante la prueba de Log Rank o la de Gehan-Breslow en el caso de entrecruzamientos.

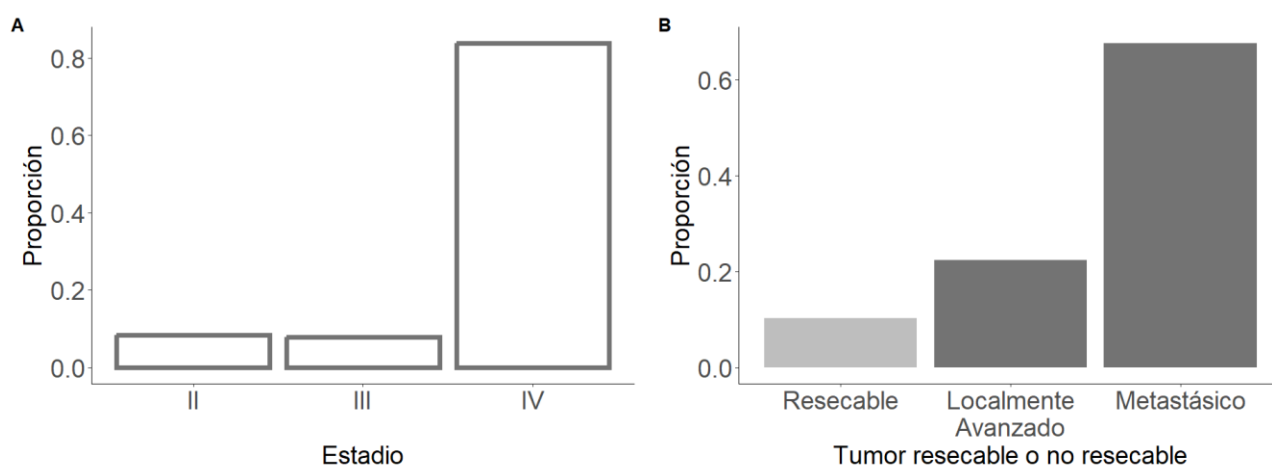
Para todas las pruebas, un p-valor bilateral inferior a 0.05 se consideró estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el lenguaje y entorno para la informática estadística del equipo central de R, en su versión 4.3.2 (31 de octubre de 2023).

RESULTADOS

A) Entrenamiento y validación del modelo iTLB de clasificación entre controles sanos y pacientes con cáncer de páncreas, y su posterior relación con variables clínicas.

Para obtener el modelo iTLB se analizaron las muestras de suero de 396 pacientes formado por dos cohortes independientes: un primero grupo control constituido por 184 (46.46%) sanos donantes de banco de sangre de Zaragoza, y un segundo grupo formado por 212 (53.54%) pacientes con un diagnóstico de PDAC en el HUMS de Zaragoza. Dentro de este grupo, se disponía de la siguiente información clínica:

- Según el estadio de la octava edición del AJCC (*not available*, na = 46): el 8.43% (14/166) eran estadio II, el 7.83% (13/166) eran estadio III y la mayoría, un 83.73% (139/166) eran estadio IV (Figura 15.A).
- Según si el tumor era resecable o no (na = 6): el 10.19% (21/206) fueron resecables, el 22.33% (46/206) fueron localmente avanzados, y más de la mitad, un 67.48% (139/206) fueron metastásicos (Figura 15.B).

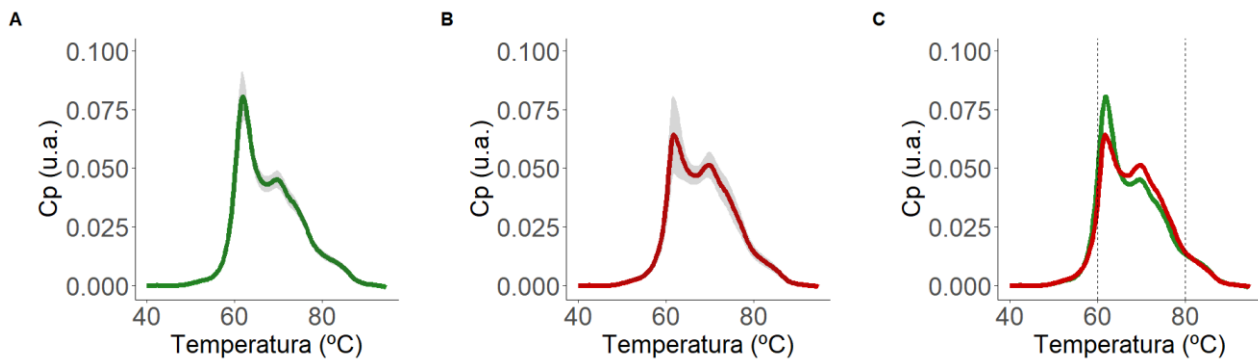


Notas: Estadio según la octava edición de la AJCC (*American Joint Committee on Cancer*).

Figura 15: Diagrama de frecuencias de las variables clínicas del grupo de pacientes con PDAC. **A/** Proporción de pacientes en cada etapa según el estadio de la octava edición del AJCC; **B/** Proporción de pacientes según si el tumor es **resecable** o **no resecable**.

Modelo iTLB paso a paso

Para la obtención del modelo iTLB de clasificación a partir de los termogramas normalizados de las muestras de suero obtenidos en cada paciente, se disponía de 396 muestras de suero, de los cuales 184 correspondían al grupo control sano, y 212 a pacientes con el diagnóstico de PDAC. En las Figura 16.A y Figura 16.B se observan las medias y las desviaciones estándar de las curvas de termogramas (normalizados por su área) correspondientes a cada grupo respectivamente. En la Figura 16.C, donde se superponen ambas medias, se aprecia dónde y en qué sentido se producen los cambios entre ambos grupos. Además, marcado con líneas discontinuas verticales a 60°C y 80°C, se encuentra la parte del termograma con la información utilizada para entrenar el modelo de clasificación.



Nota: Cp: capacidad calorífica; u.a.: unidades arbitrarias.

Figura 16: Representación de las medias de los termogramas normalizados por el área en cada uno de los grupos (**control sano** y **PDAC**). El sombreado en gris hace referencia a la media \pm desviación estándar en cada grupo. Además, en la figura C están marcadas con líneas verticales discontinuas las temperaturas de 60°C y 80°C, ya que este rango de temperaturas fue el utilizado para entrenar el modelo de clasificación.

A continuación, se muestra la metodología paso a paso propuesta para el análisis de curvas de termogramas con el fin obtener un modelo de clasificación usando herramientas de aprendizaje automatizado. Para ello, se empleó como ejemplo los termogramas obtenidos de los 184 controles sanos y 212 pacientes con PDAC:

1. Se generó una matriz de remuestreo para aleatorizar 100 veces la selección de muestras que correspondían al grupo de entrenamiento y al del grupo de validación. Debido a que los grupos estaban balanceados (46.46% controles y 53.54% pacientes con PDAC), se aleatorizó la selección de un 70% en el grupo control y un 70% en el grupo de pacientes con PDAC para entrenar el modelo, dejando el 30% restante de cada grupo para la validación. La proporción de pacientes en cada grupo, al igual que la de entrenamiento y validación, se pueden ver en el Figura 17.1.

2. A partir de las 21 temperaturas/variables predictoras (de 60°C a 80°C: 60°C, 61°C, 62°C, ...), se formaron parejas de temperaturas usando el algoritmo KTSP (librería *switchBox*). De esta forma se convirtió las variables predictoras continuas en variables categóricas. A este algoritmo era necesario indicarle el rango de parejas que se quería generar. Para saber el número óptimo, se realizaron los siguientes pasos previamente:

- En cada grupo de entrenamiento se buscó primero entre 2 y 5 parejas de temperaturas.
- Se introdujo las parejas buscadas en un modelo lineal generalizado (*generalized linear model* o GLM) para ajustar un modelo en cada grupo de entrenamiento.
- Se aplicó el modelo generado a cada grupo de validación (30% de los datos), obteniendo el área bajo la curva ROC.
- Se repitió el proceso (desde "a" hasta "c"), pero buscando entre 5 y 10 parejas.
- Se repitió el proceso (desde "a" hasta "c"), pero buscando entre 10 y 15 parejas.

Al representar la mediana de AUC en cada rango de parejas buscadas, se pudo determinar el rango óptimo, seleccionando el que tuviera una mayor mediana de AUC. A igualdad, se seleccionó el de menor rango de parejas de temperaturas (lo que se conoce como el método del codo). (101) Como se puede ver en la Figura 17.2, el número óptimo de parejas de temperaturas fueron entre 5 y 10.

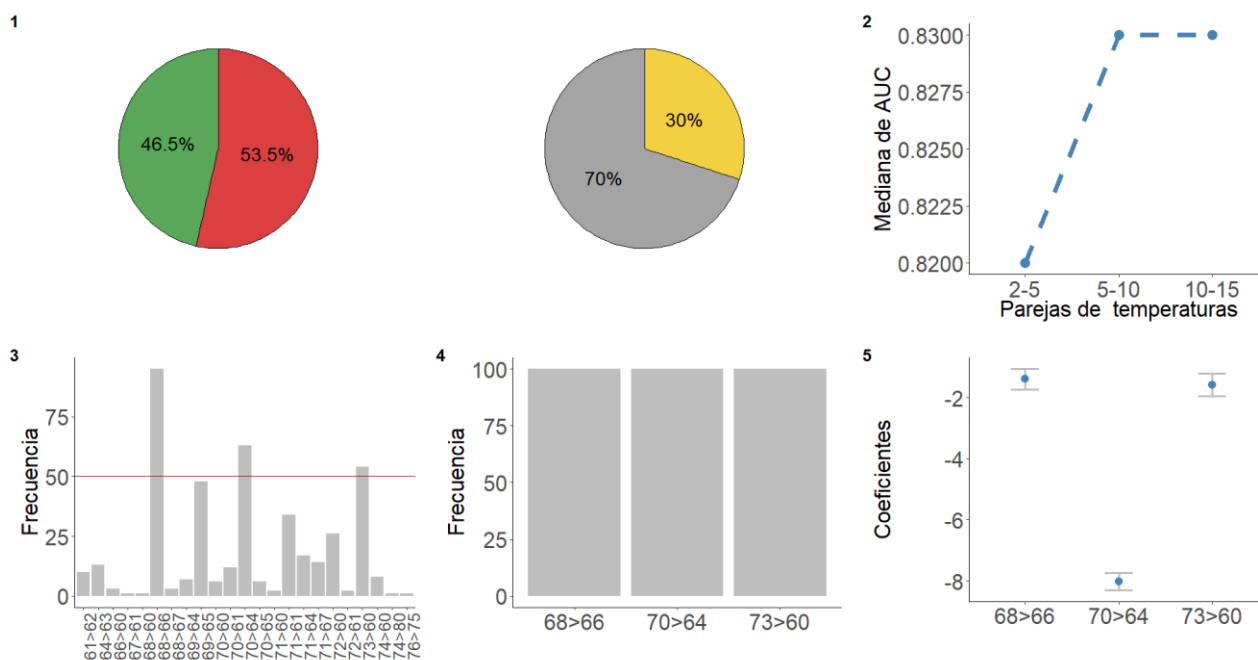
3. Una vez que se disponía del rango de parejas óptimo (5-10), en cada grupo de entrenamiento se realizó:

- Se buscó entre 5 y 10 parejas de temperaturas con el algoritmo KTSP de la librería *switchBox*.
- Se introdujeron las parejas de temperaturas buscadas como variables predictoras en un modelo de clasificación usando la función *ncvreg* de R. Con ellas se ajustó un modelo de clasificación, es decir, se obtuvo unos coeficientes para cada variable predictora (pareja de temperatura). Este coeficiente podía ser un número positivo, negativo o cero. Si era cero, quería decir que consideraba esa variable no significativa para el modelo, quedando eliminada. Además, cada ajuste se realizó mediante validación cruzada, donde se aplicó *k-folds* = "nº pacientes en el grupo de entrenamiento". Finalmente, el modelo de predicción ajustado en el grupo de entrenamiento se aplicó a su correspondiente grupo de validación (30% de los datos).

Se guardó la información de las variables predictoras (parejas de temperaturas) y sus coeficientes en los 100 modelos ajustados (uno por cada grupo de entrenamiento), al igual que las AUC tanto en los 100 grupos de entrenamiento como en los de validación. Al representar la frecuencia que cada pareja de temperaturas tuvo un coeficiente diferente a cero en los 100 modelos entrenados, se pudo considerar un punto de corte a partir del cual se seleccionaron las más frecuentes en los 100 remuestros. Este punto es dependiente del observador y puede variar en cada estudio. Como se puede ver en la Figura 17.3, se eligieron las parejas que fueron seleccionadas al menos 50 veces (frecuencia > 50). De esta forma, 3 fueron las parejas de temperaturas más frecuentemente seleccionadas en los 100 remuestros de entrenamiento.

4. Se repitió el paso anterior de entrenamiento del modelo usando la función *ncvreg* pero esta vez sólo se introdujeron las 3 parejas de temperaturas más frecuentes. Se validó cada modelo entrenado en sus 30% restantes, y se guardó la información de los coeficientes asignados a cada pareja de temperaturas, en cada uno de los 100 entrenamientos, al igual que las AUC tanto en los 100 grupos de entrenamiento como en los de validación. Como se puede ver en la Figura 17.4, las tres parejas de temperaturas frecuentes fueron seleccionadas siempre en los 100 grupos de entrenamientos.

5. Llegado a este punto, se contaba con 100 modelos entrenados, asignando en cada uno de ellos un coeficiente a cada pareja de temperaturas. Se puede visualizar la variabilidad de los coeficientes al representar la media \pm 2 veces su desviación estándar para cada una de las parejas de temperaturas de los modelos ajustados (Figura 17.5). De los 100 modelos entrenados y validados, se obtuvo una media de valores de AUC de 0.83 (\pm 0.01) en los grupos de entrenamiento, y de 0.83 (\pm 0.03) en los grupos de validación.



Notas: AUC: área bajo la curva.

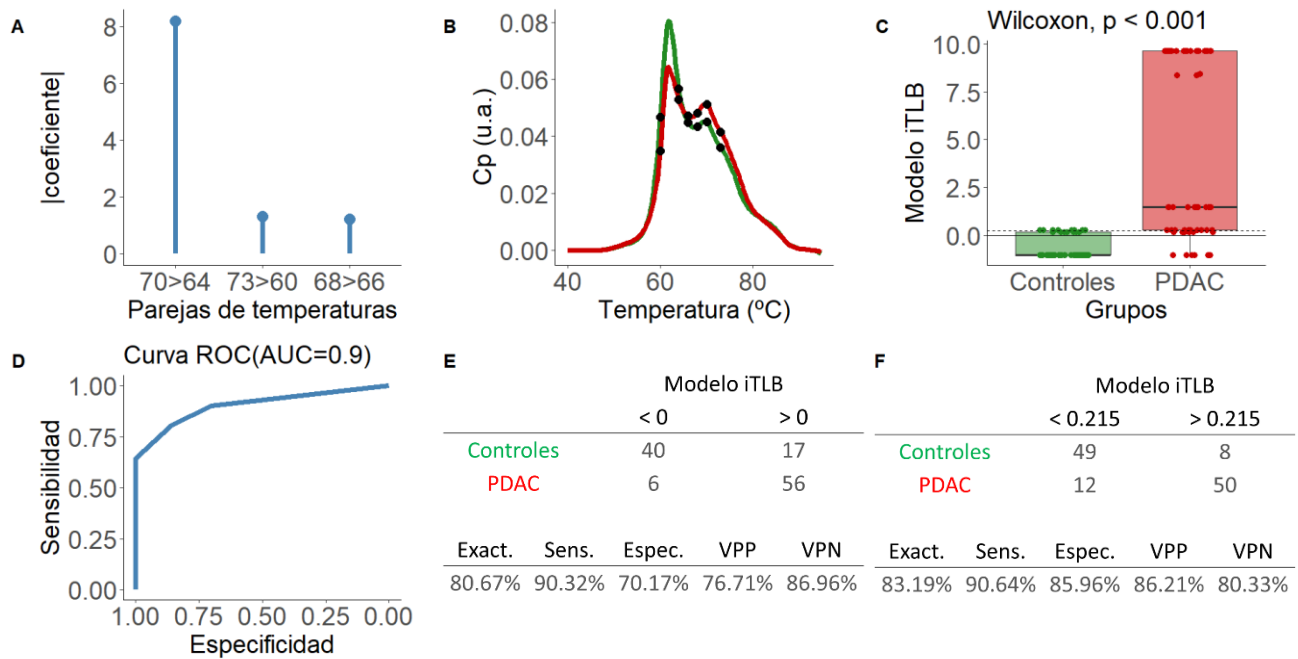
Figura 17: Representación paso a paso (1-5) de la metodología propuesta para analizar las curvas de termogramas normalizadas por el área y obtener un modelo de clasificación (modelo iTLB), según el ejemplo expuesto. **1/** En el gráfico de la izquierda se representa la proporción de pacientes en cada uno de los grupos (**controles** y **PDAC**); En el gráfico de la derecha se representa la proporción utilizada para **entrenar** y **validar** el modelo; **2/** Mediana de las AUC de los 100 grupos de validación, en cada rango de parejas de temperaturas. El objetivo de este gráfico es buscar el número de parejas de temperaturas óptimo (método del codo); **3/** Frecuencia de la selección de cada pareja de temperaturas en los 100 entrenamientos, cuando se aplicó la función *ncvreg*. La línea roja horizontal representa que las parejas de temperaturas que tienen una frecuencia mayor a 50 en los 100 remuestros es óptimo para introducirlos en el siguiente paso; **4/** Frecuencia de la selección de cada pareja de temperaturas que pasaron el punto de corte de 50 en el paso anterior, en los 100 nuevos entrenamientos; **5/** Media \pm 2 veces la desviación estándar de los coeficientes para los 100 últimos entrenamientos, en cada una de las parejas de temperaturas que constituyen el modelo iTLB.

Modelo iTLB

Se obtuvo un modelo iTLB formado por únicamente tres variables (parejas de temperaturas), donde claramente la pareja formada por las temperaturas 64°C y 70°C era la que tenía mayor peso para diferenciar a los controles sanos de los pacientes con PDAC (Figura 18.A). En la Figura 18.B, se puede ver dónde se sitúan cada una de las temperaturas del modelo iTLB en las medias de los termogramas de cada grupo.

El modelo iTLB obtenido proporcionó un resultado para cada paciente. En el grupo de validación se observaron diferencias estadísticamente significativas en la mediana del resultado del modelo iTLB entre el grupo control sano (-1.03 [-1.03;0.17]) y el grupo con PDAC (1.46 [0.26;9.66]) (prueba de Wilcoxon: p-valor < 0.001) (Figura 18.C), con un AUC de 0.90 (IC_{95%} = 0.85-0.96) (Figura 18.D).

Para simplificar la interpretación del modelo iTLB, se podía utilizar un punto de corte que, de manera estándar, tiene el valor de cero. Además, se calculó el punto de corte según Youden usando todos los datos, donde se obtuvo un valor de 0.215, y se comparó con el punto de corte estándar de cero. Se observó en el grupo de validación que al cambiar al punto de corte de Youden, se aumentó drásticamente la especificidad y el VPP (de 70.17% y 76.71% a 85.96% y 86.21%, respectivamente), sacrificando la sensibilidad y el VPN (de 90.32% y 86.96% a 80.64% y 80.33%, respectivamente) (Figura 18.E y Figura 18.F).

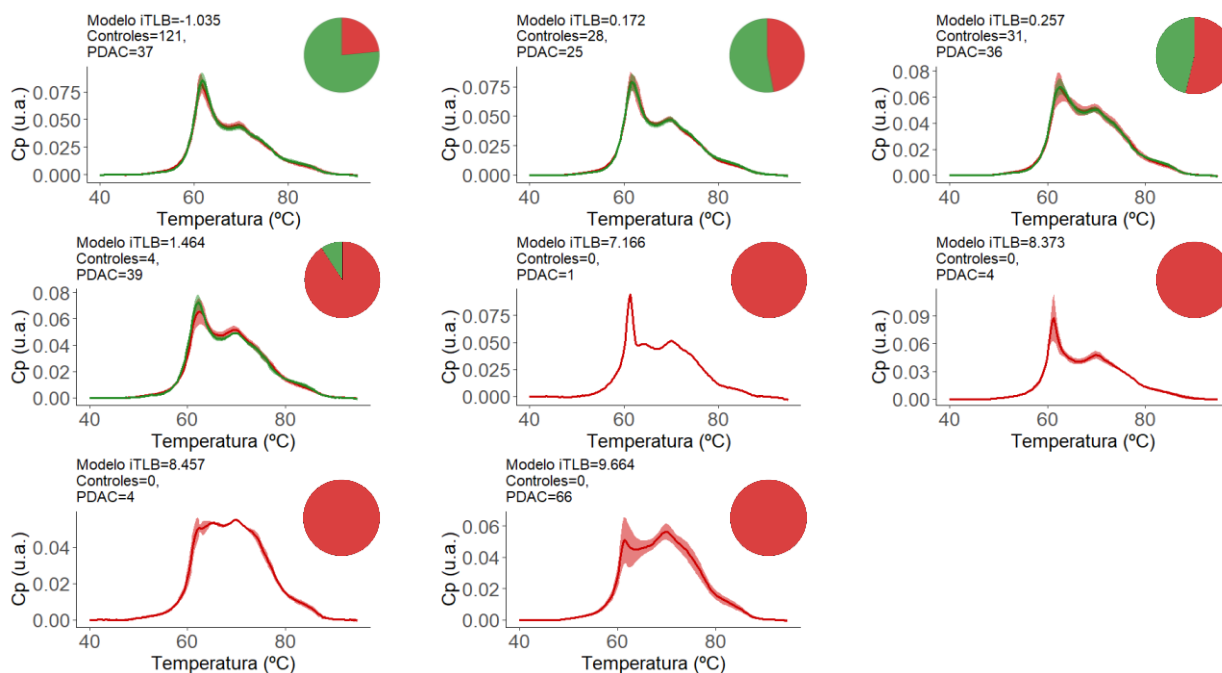


Notas: Cp: capacidad calorífica; u.a.: unidades arbitrarias; iTLB: *intelligence Thermal Liquid Biopsy*; AUC: área bajo la curva ROC; Exact: exactitud; Sens: sensibilidad; Espec: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo.

Figura 18: Resultados del modelo iTLB obtenido para diferenciar los termogramas de un grupo control sano y un grupo de pacientes con PDAC. **A/** Valor absoluto de los coeficientes del modelo iTLB en cada una de las variables predictoras (parejas de temperaturas); **B/** Medias de los termogramas normalizados en cada grupo (controles y PDAC) y marcado con puntos negros se representa las temperaturas utilizadas en el modelo iTLB; **C/** Diferencia de la mediana de la respuesta del modelo iTLB en el grupo de validación; **D/** Área bajo la curva ROC del modelo iTLB en el grupo de validación; **E/** En la parte superior aparece la tabla de contingencia de la predicción en el grupo de validación, usando como punto de corte el valor estándar de cero. En la parte inferior viene indicado los resultados del rendimiento del modelo iTLB; **F/** En la parte superior aparece la tabla de contingencia de la predicción en el grupo de validación, usando como punto de corte el calculado según Youden (0.215). En la parte inferior viene indicado los resultados del rendimiento del modelo iTLB.

Patrones obtenidos del modelo iTLB

Debido a que se usaron variables predictivas dicotómicas, el resultado numérico del modelo de predicción se pudo considerar como una variable cuantitativa discreta con 2^n número de opciones de resultado (siendo “n” el número de variables predictoras). Por ello, se obtuvieron un máximo de 8 resultados. Al agrupar los termogramas de los pacientes con mismo valor en el resultado del modelo iTLB y representar la media de los termogramas en cada grupo (controles y PDAC), se pudo apreciar diferentes patrones y los cambios producidos en ellos a medida que variaba el resultado de modelo iTLB (Figura 19). Se observó que todos los controles tenían un resultado del modelo iTLB ≤ 1.464 , es decir, con este punto de corte el VPP era del 100%.



Notas: Cp: capacidad calorífica; u.a: unidades arbitrarias; PDAC: adenocarcinoma ductal de páncreas; iTLB: *intelligence Thermal Liquid Biopsy*.

Figura 19: Patrones obtenidos como resultado del modelo iTLB en todas las muestras. Se representa la media y en sombreado la desviación estándar de los termogramas en cada uno de los grupos (**controles** y **PDAC**). En cada patrón viene indicado el valor del modelo iTLB, el número de pacientes controles y con PDAC con ese patrón, y, mediante un gráfico circular, la proporción de **controles** y pacientes con **PDAC** en cada patrón.

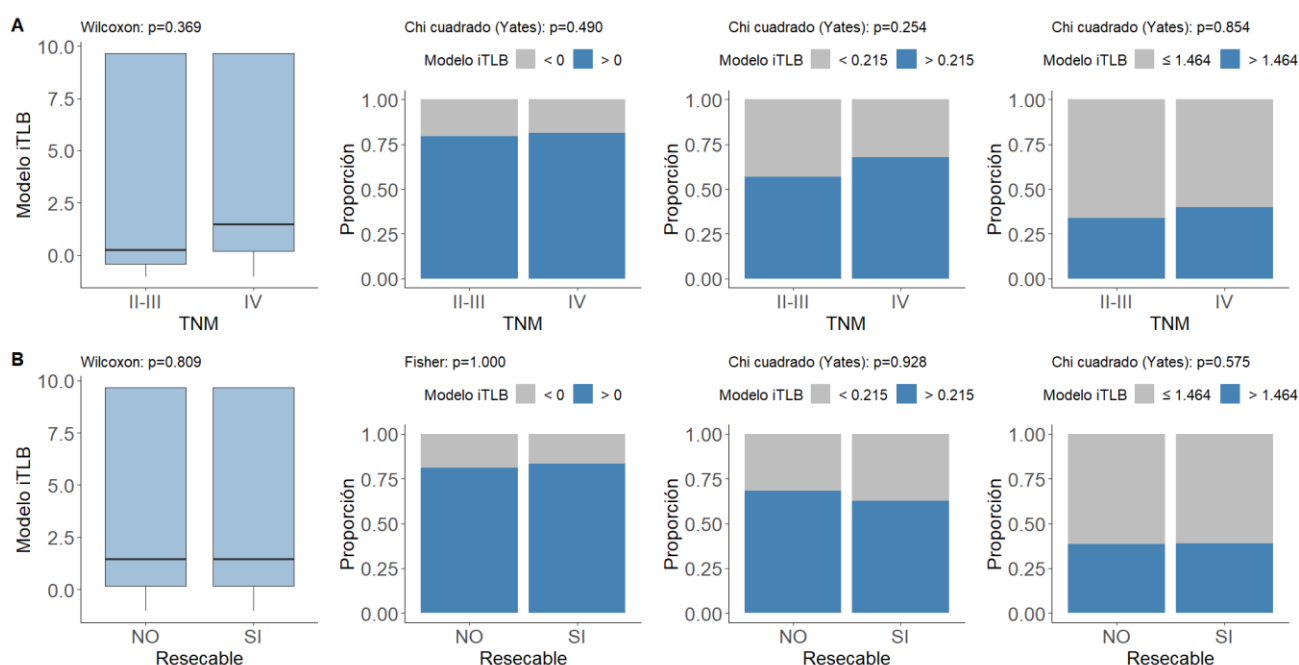
Relación del modelo iTLB con variables clínicas de pacientes con cáncer de páncreas

Se relacionó las variables clínicas (estadio y si el tumor era resecable o no) con el modelo iTLB como variable continua y como variable categórica. En este último caso se utilizó el punto de corte estándar de cero, el de Youden de 0.215 y el observado en los patrones de 1.464. En ninguno de los casos se observó ninguna relación (Tabla 5 y Figura 20).

Tabla 5: Relación de variables clínicas de los pacientes con PDAC según el resultado del modelo iTLB.

	Estadio		p-valor	Resecable		p-valor
	II-III (n = 27)	IV (n = 139)		Sí (n = 21)	No (n = 185)	
Modelo iTLB:	0.26 [-0.43;9.66]	1.46 [0.17;9.66]	0.359	1.46 [0.17;9.66]	1.46 [0.17;9.66]	0.809
< 0	7 (25.93%)	25 (17.99%)	0.490	4 (19.05%)	33 (17.84%)	1.000*
> 0	20 (74.07%)	114 (82.01%)		17 (80.95%)	152 (82.16%)	
< 0.215	12 (44.44%)	43 (30.94%)	0.254	7 (33.33%)	55 (29.73%)	0.928
> 0.215	15 (55.56%)	96 (69.06%)		14 (66.67%)	130 (70.27%)	
≤ 1.464	18 (66.67%)	87 (62.59%)	0.854	12 (57.14%)	122 (65.95%)	0.575
> 1.464	9 (33.33%)	52 (37.41%)		9 (42.86%)	63 (34.05%)	

Notas: Se representa la variable continua con el Q2 [Q1; Q3] debido a la distribución no paramétrica de la misma. Mientras que las variables categóricas con el número (%) de pacientes en cada categoría; los p-valores se obtienen de la prueba de Wilcoxon al comparar una variable continua entre dos grupos, mientras que se obtienen de la prueba de χ^2 con la corrección de Yates al asociar dos variables categóricas; *: p-valor obtenido de la prueba de Fisher; Estadio de la octava edición del AJCC; PDAC: adenocarcinoma ductal de páncreas; iTLB: *intelligence Thermal Liquid Biopsy*.



Notas: PDAC: adenocarcinoma ductal de páncreas; Estadio de la octava edición del AJCC; iTLB: *intelligence Thermal Liquid Biopsy*.

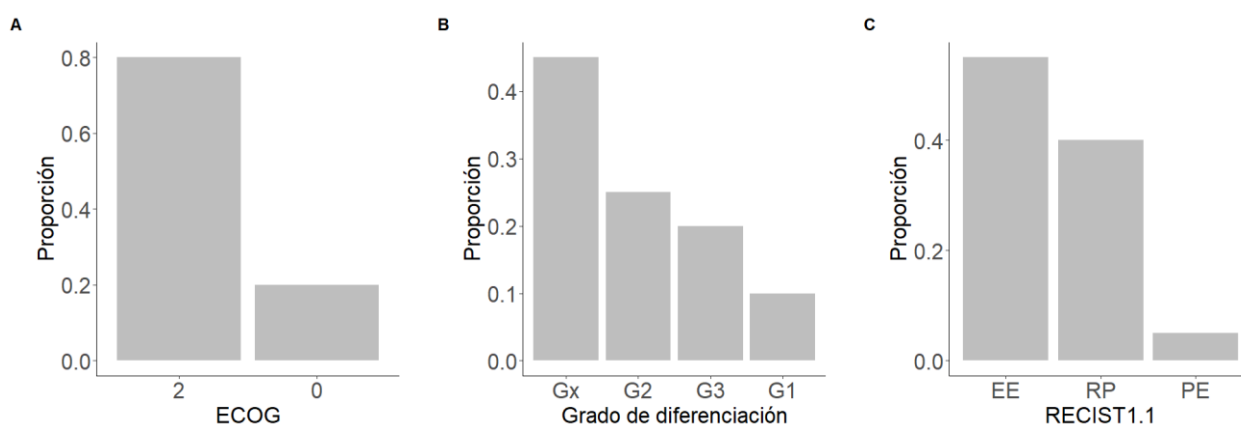
Figura 20: Relación del modelo iTLB con variables clínicas en los pacientes con PDAC. De izquierda a derecha: Modelo iTLB como variable continua, modelo iTLB dicotomizado por el punto de corte estándar, modelo iTLB dicotomizado por el punto de Youden y modelo iTLB dicotomizado por el punto de 1.464 obtenido de los patrones. **A/** Relación del modelo iTLB con el estadio; **B/** Asociación del modelo iTLB con la clasificación del tumor según si fue resecable o no.

Aplicación del Modelo iTLB aplicado a una cohorte externa de pacientes con PDAC: validación externa del modelo iTLB

Se utilizó una cohorte adicional independiente de 113 pacientes diagnosticados con PDAC procedentes del HUMS y del HCLUB de Zaragoza, para evaluar el iTLB desarrollado como grupo de validación externa. Se obtuvieron los termogramas de estos 113 pacientes con PDAC y se aplicó el modelo iTLB para obtener un valor TLB en cada paciente. Según el punto de corte estándar de cero y de Youden (0.215), si el valor TLB era mayor que el umbral, el resultado se consideraba verdadero positivo, pero si el valor TLB era menor que el umbral, el resultado se consideraba falso negativo. De 113 pacientes con PDAC, 110 fueron verdaderos positivos (TLB > 0) y 3 fueron falsos negativos (TLB < 0). Es decir, se obtuvo una sensibilidad del 97.35% y un 2.65% de falsos negativos. En cambio, al utilizar el punto de corte de 1.464, la sensibilidad se redujo al 68.14% (77/113) con un 31.86% (36/113) de falsos negativos.

B) Aplicación del modelo iTLB en una cohorte externa de pacientes con PDAC, y su posterior relación con la respuesta al tratamiento y con la supervivencia de los pacientes.

Se utilizó una cohorte independiente de 20 pacientes diagnosticados de PDAC en el HCULB de Zaragoza, para evaluar si la respuesta al tratamiento podía detectarse mediante el TLB, y para evaluar el pronóstico de los pacientes. Todos eran pacientes con estadio = IV, es decir, todos tenían al menos una metástasis diagnosticada, la cual podía ser hepática (65.00%, 13/20), carcinomatosis peritoneal (10.00%, 2/20), ganglionar (25.00%, 5/20), pulmonar (35.00%, 7/20) u otras (5.00%, 1/20). Según la escala del estado funcional ECOG, la mayoría de estos pacientes eran ECOG = 2 (80.00%, 16/20), mientras que el resto fueron ECOG = 0 (20.00%, 4/20) (Figura 21.A). Según el grado de diferenciación histológica, el 45.00% (9/20) eran Gx, el 10.00% (2/20) eran G1, el 25.00% (5/20) eran G2 y el 20.00% (4/20) eran G3 (Figura 21.B). Se extrajeron dos muestras de suero por paciente, antes y después del tratamiento quimioterapéutico, con un intervalo de tiempo de 38.55 ± 12.66 días. Ambas muestras fueron analizadas para obtener las concentraciones de albúmina, hemoglobina, LDH y CA19.9 en sangre periférica. En el caso del biomarcador CA19.9, se analizó una tercera muestra de suero a los dos meses de la muestra basal. Las muestras de los pacientes también fueron analizadas mediante la TLB, es decir, se obtuvieron sus termogramas y se aplicó el modelo iTLB previamente obtenido. Para evaluar si los pacientes respondían al tratamiento, se utilizó la escala RECIST1.1, de manera que el 55.00% (11/20) de los pacientes se clasificaron como EE, el 40.00% (8/20) de los pacientes como RP y el 5.00% restante (1/20) como PE (Figura 21.C).



Notas: ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; Gx: desconocido o cuando no puede determinarse; G1: bien diferenciado; G2: moderadamente diferenciado; G3: pobremente diferenciado; RECIST1.1: *The Response Evaluation Criteria in Solid Tumors* en su versión 1.1; EE: enfermedad estable; RP: respuesta parcial; PE: progresión de enfermedad.

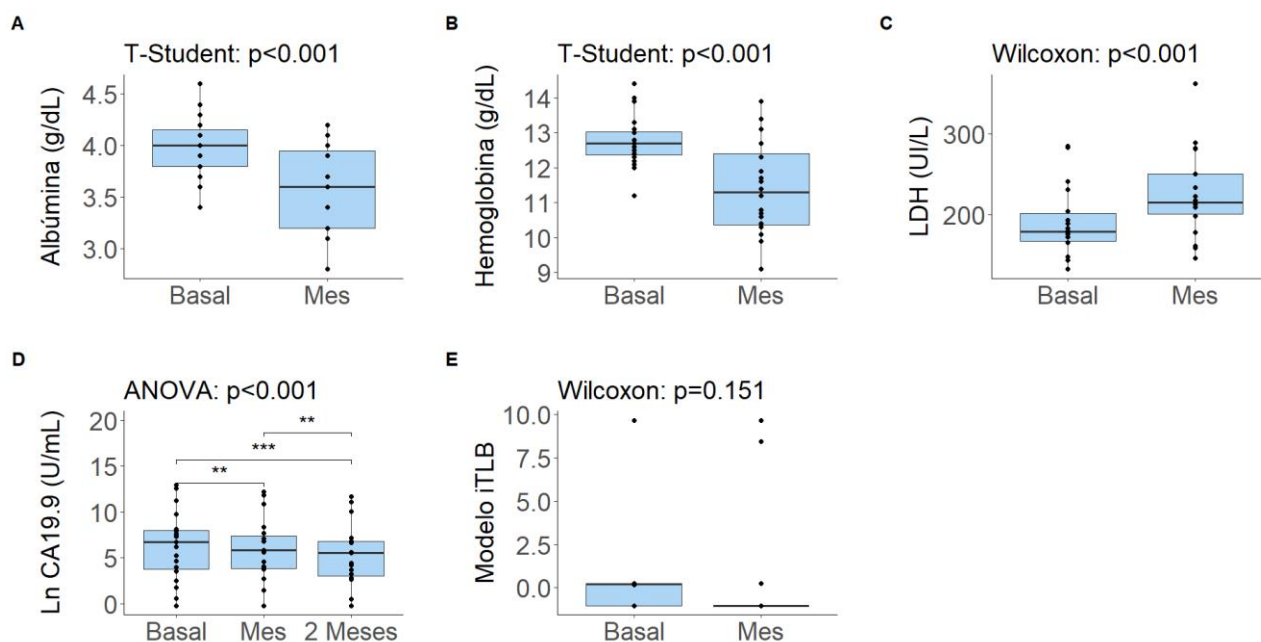
Figura 21: Descriptiva de variables clínica recogidas en la cohorte de 20 pacientes con PDAC. **A/** Proporción de pacientes según la escala del estado funcional ECOG; **B/** Proporción de pacientes según el grado de diferenciación histológica; **C/** Proporción de pacientes según la respuesta al tratamiento por la escala RECIST1.1.

Se consideró que el 95% de los pacientes respondieron al tratamiento quimioterapéutico ya que no se produjo en ellos un empeoramiento de la enfermedad (no fueron clasificados como PE). Se observaron diferencias estadísticamente significativas en las medias/medianas de las concentraciones en sangre periférica de albúmina, hemoglobina, LDH y CA19.9 (Figura 22.A-D) entre la primera y la segunda muestra. A pesar de estas diferencias, el sentido en el que se produjeron esos cambios no indicaba que la mayoría de los pacientes estaban respondiendo al tratamiento. Es decir, en el caso de la albúmina y la hemoglobina, se esperaba que sus concentraciones aumentasen en la segunda muestra, mientras que la concentración de LHD disminuyera. En cambio, se observó todo lo contrario si comparamos las medias/medianas en la muestra basas y al mes (Tabla 6). Sin embargo, en el caso del biomarcador CA19.9, se observaron diferencias estadísticamente significativas y, además, la media fue disminuyendo en el seguimiento de los pacientes (Tabla 6 y Figura 22.D). En el caso del TLB, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras antes y después del tratamiento (Figura 22.E), en cambio, la mediana en la segunda muestra era menor que la mediana en la primera muestra (Tabla 6).

Tabla 6: Diferencia de media/mediana de la concentración de biomarcadores en sangre periférica y del modelo iTLB, entre las muestras extraídas antes (basal) y después del tratamiento (mes y 2 meses).

	Basal	Mes	2 Meses	p-valor
Albúmina (g/dL)	4.02 (0.30)	3.58 (0.42)		< 0.001
Hemoglobina (g/dL)	12.78 (0.74)	11.39 (1.31)		< 0.001
LDH (UI/L)	178.50 [166.75; 201.25]	215.00 [200.75; 250.00]		< 0.001
Ln CA19.9 (U/mL)	6.31 (3.77)	5.68 (3.57)	5.21 (3.45)	< 0.001*
Modelo iTLB	0.21 [-1.03; 0.26]	-1.03 [-1.03; -1.03]		0.151

Notas: p-valores obtenidos de prueba de T de Student o de Wilcoxon de muestras pareadas, según su carácter paramétrico o no; *: p-valor obtenido de la prueba de ANOVA de muestras pareadas con la corrección de Greenhouse-Geisser. Los p-valores de las pruebas de T de Student de muestras pareadas con el ajuste de Bonferroni son: Basal vs Mes: p-valor = **0.006**; Basal vs 2 Meses: p-valor = **0.002**; Mes vs 2Meses: p-valor = **0.016**; LDH: lactato deshidrogenasa; CA19.9: marcador tumoral antígeno carbohidrato 19-9; TLB: biopsia líquida térmica de sus siglas en inglés.

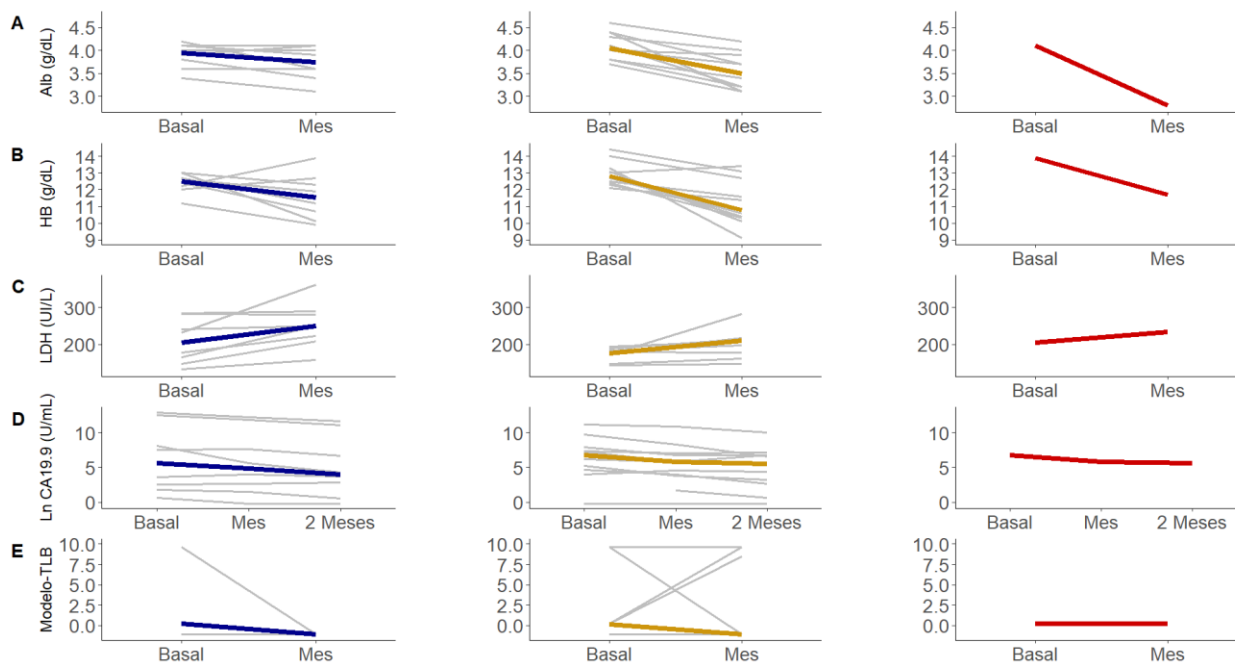


Notas: los p-valores corresponden a pruebas T de Student de muestras pareadas en el caso de la concentración de albúmina y hemoglobina, y a la prueba de Wilcoxon de muestras pareadas en el caso de la LDH y del modelo iTLB. Mientras que en el caso de la concentración de CA19.9 (en su forma de logaritmo natural), el p-valor corresponde a la prueba de ANOVA de muestras pareadas con la corrección de Greenhouse-Geisser. Los asteriscos (**) corresponden a las pruebas de T de Student de muestras pareadas con el ajuste de Bonferroni (Basal vs Mes: p-valor = **0.006**; Basal vs 2 Meses: p-valor = **0.002**; Mes vs 2Meses: p-valor = **0.016**); LDH: lactato deshidrogenasa; CA19.9: marcador tumoral antígeno carbohidrato 19-9; iTLB: *intelligence Thermal Liquid Biopsy*.

Figura 22: Diferencia de medias/medianas de la concentración de biomarcadores en sangre periférica y del modelo iTLB, entre las muestras extraídas antes y después del tratamiento. **A/** Diferencia de medias de albúmina; **B/** Diferencia de medias de hemoglobina; **C/** Diferencia de medias de LDH; **D/** Diferencia de medias del logaritmo natural de CA19.9; **E/** Diferencia de medianas del modelo iTLB.

Al agrupar a los pacientes según la respuesta RECIST1.1, se observó que las variables bioquímicas y el TLB de los pacientes con EE y con RP seguían los mismos cambios que las observadas anteriormente en todos los pacientes (Figura 23). Es decir, las medianas de las concentraciones de albúmina, hemoglobina, CA19.9 y de los valores del TLB eran menores en las muestras obtenidas tras el tratamiento respecto a la muestra basal, mientras que la mediana de la concentración de LDH en la segunda muestra es mayor que en la primera.

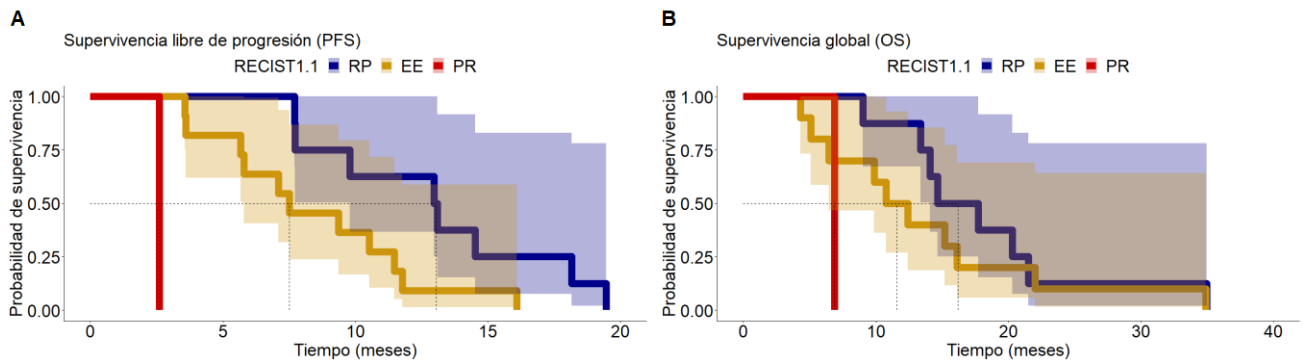
Al centrarnos en el paciente que no respondió al tratamiento (RECIST1.1 = PE), su concentración de albúmina, hemoglobina y LDH seguían las mismas tendencias que en los pacientes con RP y EE (Figura 23.A-C). En el caso del CA19.9, se observó también una reducción en su concentración durante su seguimiento (Figura 23.D), mientras que el resultado del modelo iTLB no se redujo, sino que se mantuvo con el mismo valor al mes (Figura 23.E).



Notas: Se representa en líneas grises el cambio de valor de cada parámetro desde la muestra basal a la/s muestra/s recogida/s después del tratamiento. Se representa en líneas con color azul (RP), amarillo (EE) y rojo (PE), las medianas de la concentración basal y después del tratamiento de cada parámetro; RECIST1.1: *The Response Evaluation Criteria in Solid Tumors* en su versión 1.1; EE: enfermedad estable; RP: respuesta parcial; PE: progresión de enfermedad; Alb.: albúmina; HB: hemoglobina; LDH: lactato deshidrogenasa; CA19.9: marcador tumoral antígeno carbohidrato 19-9; iTLB: *intelligence Thermal Liquid Biopsy*.

Figura 23: Cambios en cada paciente de los valores medidos en las muestras de suero (antes y después del tratamiento), según la respuesta RESCIST1.1. (RP, EE, PE). **A/** Cambios en la concentración de albúmina; **B/** Cambios en la concentración de hemoglobina; **C/** Cambios en la concentración de LDH; **D/** Cambios en la concentración del logaritmo natural de CA19.9; **E/** Cambios en la respuesta del modelo iTLB.

Además, se realizó un seguimiento de los pacientes, recogiendo el tiempo en meses hasta la progresión clínica o radiológica (PFS) y el tiempo hasta el fallecimiento (OS). Primero se comparó la PFS y OS según el tipo de respuesta RECIST1.1. Se observó que la mediana del tiempo de supervivencia en ambos casos (PFS y OS) era menor en el paciente con PE que en los pacientes con EE y RP (Figura 24). Además, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la mediana del tiempo de PFS entre los pacientes con EE y con RP (prueba de Log Rank: p-valor= 0.031). Estas diferencias no se encontraron en el tiempo de OS (Tabla 7).



Notas: RECIST1.1: *The Response Evaluation Criteria in Solid Tumors* en su versión 1.1; EE: enfermedad estable; RP: respuesta parcial; PE: progresión de enfermedad.

Figura 24: Relación de la respuesta RESCIST1.1 (RP, EE, PE) con la supervivencia de los pacientes con PDAC. **A/** Relación con la PFS; **B/** Relación con la OS.

Tabla 7: Relación de la respuesta RECIST1.1 con los tiempos de PFS y OS.

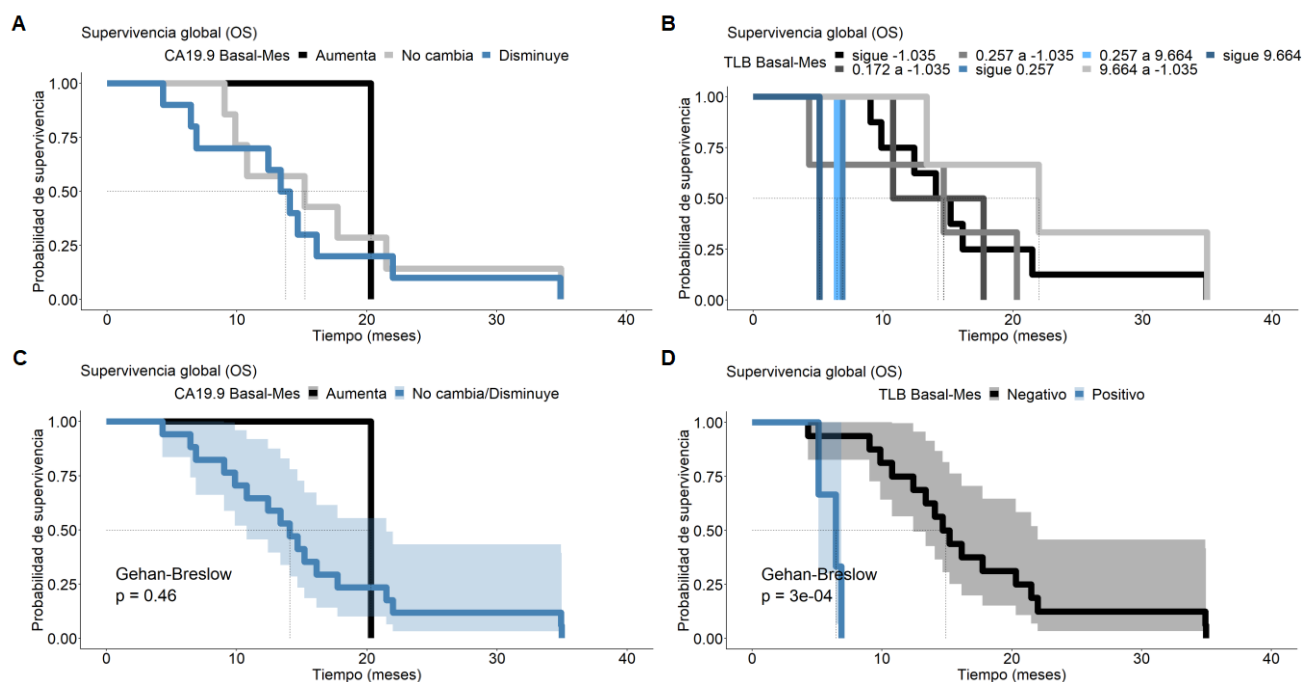
	PFS	p-valor	OS	p-valor
RP	13.03 [8.76; 16.35]	0.031*	16.20 [13.72; 20.90]	0.190**
EE	7.50 [5.67; 11.47]		11.58 [6.43; 16.13]	
PE	2.60 [2.60; 2.60]		6.87 [6.87; 6.87]	

Notas: p-valores obtenidos al comparar los tiempos de supervivencia entre el grupo con RP y con EE; *: p-valor obtenido de la prueba de Log Rank; **: p-valor obtenido de la prueba de Gehan-Breslow; PFS: supervivencia libre de progresión; OS: supervivencia global; RECIST1.1: *The Response Evaluation Criteria in Solid Tumors* en su versión 1.1; EE: enfermedad estable; RP: respuesta parcial; PE: progresión de enfermedad.

Debido a que no se encontró una relación entre la respuesta RECIST1.1 y la OS, se relacionó las variables recogidas en las muestras de suero con la OS. Concretamente, se relacionó el CA19.9 y el TLB, ya que son las que parecían que estaban relacionadas con la evolución de los pacientes. Para comparar los resultados, en ambos casos se relacionó el cambio producido entre la muestra basal y la muestra al mes.

En el caso del marcador tumoral CA19.9, se consideró que variaciones menores a 100 U/mL no eran significativas, por lo que se consideró que no aumentaba ni disminuía. De esta manera, se categorizó a los pacientes como “CA19.9: aumenta”, si la concentración de CA19.9 en la muestra al mes era más de 100 unidades mayor que la basal; “CA19.9: disminuye”, si la concentración de CA19.9 en la muestra basal era más de 100 unidades mayor que la muestra al mes; “CA19.9: no cambia”, si la variación de la concentración de CA19.9 era menor de 100 unidades entre ambas muestras.

De esta manera se observó que los pacientes “no cambia” y “disminuye” tenían tiempos de OS parecidos (Figura 25.A). Al agrupar a los pacientes “no cambia” con los pacientes “disminuye”, y comparar su tiempo de OS con el paciente “aumenta”, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las medianas de los tiempos de OS (Figura 25.C y Tabla 9).



Notas: Las categorías de la figura **B** están explicadas en la Tabla 9; TLB negativo: respuesta del modelo iTLB por debajo del punto de corte de cero; TLB positivo: respuesta del modelo iTLB mayor al punto de corte de cero; TLB: *Thermal Liquid Biopsy*.

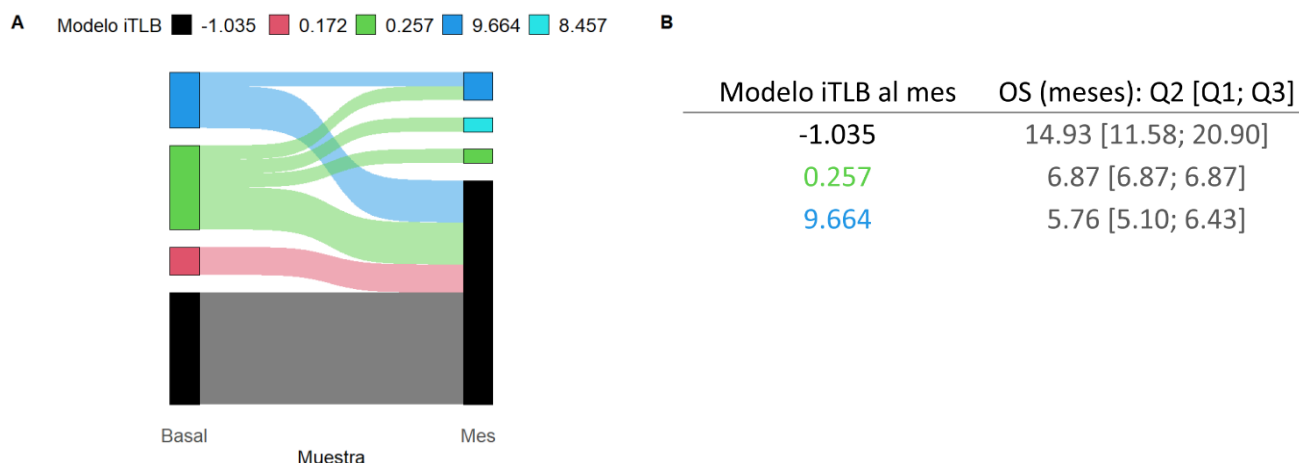
Figura 25: Relación del cambio producido en la concentración de CA19.9 y del TLB entre la muestra basal y la muestra extraída al mes, tras el tratamiento, con la supervivencia global (OS) de los pacientes. **A/** Relación con el cambio de concentración de CA19.9 (“aumenta” vs “no cambia” vs “disminuye”); **B/** Relación con todos los cambios de la respuesta del modelo iTLB; **C/** Relación con el cambio de concentración de CA19.9 (“aumenta” vs “no cambia/disminuye”); **D/** Relación con la respuesta del modelo iTLB en la muestra extraída al mes, categorizado por el punto de corte de cero.

En el caso del TLB, debido a que no está establecido un punto de corte, primero se consideró todos los cambios producidos en la respuesta del modelo iTLB entre las dos muestras de suero (Figura 26.A), de manera que los pacientes fueron clasificados como se indica en la Tabla 8.

Tabla 8: Categorización de los pacientes según la respuesta del modelo iTLB en cada muestra, antes y después del tratamiento.

Respuesta Modelo iTLB		Categoría
Muestra Basal	Muestra al Mes	
-1.035	-1.035	“sigue -1.035”
0.172	-1.035	“0.172 a -1.035”
0.257	-1.035	“0.257 a -1.035”
0.257	0.257	“sigue 0.257”
0.257	8.457	“0.257 a 8.457”
0.257	9.664	“0.257 a 9.664”
9.664	-1.035	“9.664 a -1.035”
9.664	9.664	“sigue 9.664”

Al comparar las medianas de los tiempos de OS de cada categoría, se observó que los pacientes “sigue 9.664” eran los que tenían menor tiempo de supervivencia, y los pacientes “9.664 a -1.035” los que tenían mayor tiempo de supervivencia (Figura 25.B). Al entrar en detalle, los pacientes con menos de 10 meses de OS eran los que tenían un valor negativo (< cero) en la respuesta del modelo iTLB de la muestra recogida al mes. Mientras que los pacientes con más de 10 meses de OS eran los que tenían un valor positivo (> cero) en la respuesta del modelo iTLB de la segunda muestra. Por esta razón, se relacionó la respuesta del modelo iTLB de la segunda muestra, categorizada por el punto de corte estándar de cero, con la OS. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en las medianas de los tiempos de OS entre los pacientes con una respuesta del modelo iTLB en la segunda muestra de suero tras el tratamiento, categorizada por el punto de corte estándar (Figura 25.D, Figura 26.B y Tabla 9).



Notas: iTLB: *intelligence Thermal Liquid Biopsy*.

Figura 26: **A/** Resultados del modelo iTLB en la muestra basal y los cambios producidos en la segunda muestra tras el tratamiento. El ancho de las barras está directamente relacionado con el número de pacientes con ese resultado; **B/** Mediana del tiempo de supervivencia global de los pacientes según su valor en el resultado del modelo iTLB en la muestra al mes.

Tabla 9: Relación del cambio de la concentración de CA19.9 entre la muestra basal y la muestra al mes, y del resultado del modelo iTLB en la muestra al mes categorizado por el punto de corte estándar de cero, según el tiempo de OS.

	OS (meses)	p-valor
ΔCA19.9 basal-mes:		0.460
“aumenta”	20.30 [20.30; 20.30]	
“no cambia/disminuye”	14.07 [9.87; 17.73]	
TLB en la muestra al mes:		<0.001
Negativo	14.93 [11.58; 20.90]	
Positivo	6.43 [5.10; 6.87]	

Notas: p-valores obtenidos de la prueba de Gehan-Breslow; TLB negativo: respuesta del modelo iTLB por debajo del punto de corte de cero; TLB positivo: respuesta del modelo iTLB mayor al punto de corte de cero; iTLB: *intelligence Thermal Liquid Biopsy*.

DISCUSIÓN

El cáncer de páncreas es uno de los cánceres más mortales y con peor evolución. Estos pacientes suelen ser diagnosticados en estadios avanzados debido principalmente a la falta de síntomas en los inicios de la enfermedad, a la falta de herramientas diagnósticas con la suficiente sensibilidad y especificidad que permitan sospechar de la afectación o diagnosticarlo en estadios precoces, y a la falta de respuesta de los pacientes con tratamientos quimioterápicos. Uno de los principales biomarcadores más utilizado en los pacientes con PDAC es el marcador tumoral CA19.9, destacando más por uso en el seguimiento de la enfermedad, como indicador de carga tumoral que, como herramienta diagnóstica, debido a su valor predictivo negativo tan bajo.

Por todas estas razones, el cáncer de páncreas es uno de los escenarios donde sería interesante buscar nuevas herramientas complementarias para el manejo de estos pacientes. La búsqueda de biomarcadores en muestras de sangre periférica es uno de los principales objetivos por ser un tipo de muestra fácil de obtener, rápida y mínimamente invasiva. Pero la experiencia nos dice que el descubrimiento de nuevos biomarcadores es cada vez más difícil. Con el avance en la investigación del proteoma y la teoría del *interactoma*, cobra mayor peso la teoría de que un conjunto de proteínas, y no sólo un único biomarcador, pueden explicar la respuesta del organismo ante una patología. Por esta razón, se deberían plantear nuevos enfoques experimentales con una base biofísica diferente. Es aquí donde aparece el DSC como una opción para observar el proteoma, el peptidoma y las interacciones entre ambos.

El uso del DSC con muestra biológicas, es decir, la TLB, ha demostrado su aplicación como posible nueva herramienta complementaria para el diagnóstico, seguimiento o pronóstico de pacientes. Pero uno de los mayores retos que nos plantea la TLB hoy en día es la obtención de una metodología estándar para analizar las curvas de termogramas y poder diferenciar los diferentes estados. Varios grupos han aportado sus propuestas con metodologías cada vez más sofisticadas gracias al avance e incorporación de la bioinformática, además de facilitar su aplicación e interpretación.

En este trabajo se propone una nueva metodología para el análisis de la TLB que, además, es fácil de interpretar y reproducir. Para ello, se usa la información directa de las curvas de termogramas gracias al uso de herramientas de aprendizaje automatizado, aplicando algoritmos que ya están validados en otro tipo de datos como son las *ómicas*. El uso de herramientas validadas en otro tipo de datos ya se ha reportado previamente. (36) El objetivo de esta metodología es obtener un modelo de clasificación que nos diferencie, en el caso expuesto, entre los termogramas de controles sanos y los termogramas de pacientes con diagnóstico de PDAC. La información utilizada de los termogramas está comprendida entre los 60°C y los 80°C, donde se considera que es donde producen los mayores cambios. Otros grupos han utilizado esta estrategia, pero utilizando otros rangos, aunque muy parecidos entre ellos. (35,36,38,41) Se utilizó el valor de C_p correspondiente a cada grado (60°C, 61°C, 62°C, ... hasta 80°C), parecido a lo que otros grupos han hecho. (36) Por lo que se contaba con 21 variables predictoras, dentro de las cuales se buscaron parejas de temperaturas mediante la función *KTSP*. La búsqueda de parejas de temperaturas es lo más novedoso de esta metodología para los datos de termogramas. El modelo se ajustó mediante la función *ncvreg*, la cual selecciona a las parejas de temperaturas significativas aplicando validación cruzada y gracias a que lleva incorporado un algoritmo de clasificación con penalización. El uso de herramientas de clasificación con penalización ya se ha utilizado previamente con datos procedentes de termogramas, y cada vez está más defendido su uso para evitar el sobreajuste de los modelos. (38) Con el objetivo de buscar un modelo robusto, todo este proceso se entrenó en el 70% de los datos y se validó en el 30% restante, aleatorizando ambos grupos 100 veces. Aunque la práctica de dividir los datos en un grupo de entrenamiento y aleatorizar su selección es cada vez más común, hay que valorarlo en positivo. Así, otros grupos que han propuesto otras metodologías para el análisis de termogramas también lo han puesto en práctica. (38–40)

Aunque la metodología consta de cinco sencillos pasos, en uno de ellos existe cierta subjetividad. Es el paso de seleccionar las parejas más frecuentes (paso número 3). No se descarta probar con el ajuste de varias opciones de modelos para llegar a uno óptimo y real, es decir, sin sobreajustes ni condicionado por el remuestreo.

A modo de ejemplo de la metodología propuesta, se ha utilizado una población balanceada de 396 pacientes, divididos en 184 sanos y 212 pacientes con PDAC, con el objetivo de obtener un modelo de clasificación que nos diferencie ambos grupos según la forma de los termogramas. La mayoría de los pacientes con PDAC estaban en estadios avanzados de la enfermedad. Aunque esto es un reflejo de lo que ocurre en las consultas de diagnóstico de cáncer de páncreas, sería muy recomendable ampliar el tamaño muestral y tener más pacientes en estadios tempranos.

El modelo iTLB obtenido en este caso está formado por tres parejas de temperaturas (tres variables predictoras). De lo publicado hasta ahora, es el modelo que tiene menos número de variables predictoras. Se obtuvo una media de AUC de 0.83 (IC_{95%} = 0.83-0.83) en los grupos de entrenamiento, y de 0.83 (IC_{95%} = 0.83-0.84) en los grupos de validación y se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la respuesta del modelo iTLB en el grupo control y en el grupo de pacientes con PDAC.

Al entrenar un modelo, se recomiendan tener grupos balanceados (como en el ejemplo expuesto), pero si no es posible, el entrenamiento balanceado es fundamental. Un modelo de clasificación entrenado desbalanceado se produce cuando uno de los grupos está más representado que la otra categoría. Esto conduce a un entrenamiento de modelos sesgado en perjuicio del grupo minoritario, que suele contener los casos de mayor interés. Por este motivo, un entrenamiento balanceado es importante para evitar estos problemas de sesgos.

La respuesta del modelo iTLB es muy fácil de interpretar ya que consiste en un único número que puede ir desde menos infinito hasta infinito, donde se puede aplicar un punto de corte. De manera estándar, el punto de corte utilizado es el de cero. Esto quiere decir que, si el modelo da como respuesta un número por encima de cero, clasifica ese paciente como enfermo (en este caso con PDAC), mientras que si el número está por debajo de cero clasifica ese paciente como control sano. El punto de corte, como en cualquier otra prueba diagnóstica, se puede definir según el objetivo de estudio. En este estudio se ha comparado el punto de corte estándar con el punto de corte calculado según Youden, que, en nuestro ejemplo, tiene el valor de 0.215, para alcanzar la mayor sensibilidad y especificidad del modelo iTLB. Si el objetivo es clasificar correctamente al mayor número de pacientes con PDAC (mayor sensibilidad), parece que el punto estándar de cero sería el más recomendable. Para buscar la máxima robustez del modelo, sería ideal establecer un único punto de corte. Pero para ello hacen falta más estudios y un tamaño muestral más grande para establecerlo con mayor seguridad. Independientemente del punto de corte usado, el modelo iTLB es capaz de diferenciar entre sanos y pacientes con PDAC con una sensibilidad y especificidad parecidas a las obtenidas con el marcador tumoral CA19.9. Pero, con la ventaja de tener unos valores predictivos negativos más altos, en torno al 80% respecto al 58% del CA19.9.

Debido a que el modelo iTLB de clasificación está formado por variables predictivas dicotómicas, las respuestas pueden considerarse cuantitativas discretas. En el ejemplo expuesto del modelo iTLB para diferenciar entre controles sanos y pacientes con PDAC, se han obtenido hasta ocho respuestas diferentes. Al comparar los termogramas de los pacientes con el mismo resultado en el modelo iTLB, se observan diferentes patrones y muy homogéneos entre ellos. De esta manera se puede visualizar los cambios que se producen en los termogramas cuando cambia la respuesta en el modelo iTLB. Así, a medida que aumentaba el valor del modelo iTLB, se iba reduciendo el primer máximo hasta llegar a igualarse con el segundo máximo. Hay perfiles que se corresponden con valores de TLB concretos que son exclusivos de pacientes con PDAC y no aparecen en individuos sanos. Este tipo de “agrupación supervisada” es la primera vez que se reporta en relación con los resultados de termogramas usando muestras biológicas. De esta manera, con este estudio, se quiere abrir el camino para el análisis de la TLB mediante la aplicación de herramientas de agrupación no supervisada con los datos de los termogramas que permita la generación de patrones para, posteriormente, comparar los grupos generados con las variables clínicas de los pacientes.

En este caso, el estudio de las relaciones del modelo iTLB con las variables clínicas (escala TNM y reseccabilidad o no del tumor) de los pacientes con PDAC, no reveló relación ninguna. Este resultado puede explicarse por la baja variabilidad clínica de los pacientes con PDAC (estadios tumorales avanzados). Dado el diagnóstico tardío que normalmente se produce en pacientes con PDAC, la ampliación del tamaño muestral del estudio no asegura el reclutamiento de más pacientes en estadios tempranos de esta enfermedad, aunque sí se podría aumentar el tamaño del grupo de pacientes en estadios tempranos, y se estaría en mejores condiciones para estudiar las diferencias en los termogramas debidas a los estadios tumorales, de forma que podría mostrarse la sensibilidad de la técnica en la detección de estadios tempranos de pacientes con PDAC.

El modelo iTLB se validó externamente con una cohorte de 113 pacientes con PDAC, donde se obtuvo una sensibilidad parecida a la cohorte de descubrimiento al usar tanto el punto de corte estándar de cero como el de Youden. Este resultado confirma la solidez del modelo iTLB en pacientes con PDAC. Es necesario un grupo sano externo para validar completamente el modelo iTLB.

En este estudio, también se ha aplicado esta metodología de análisis con el modelo iTLB a una cohorte externa de 20 pacientes diagnosticados de PDAC durante su tratamiento partiendo de un estadio = IV (con metástasis). En este caso se disponía de una muestra antes de empezar el tratamiento, y de una segunda muestra al mes, después del tratamiento, con lo que, en este caso, se pretendía determinar si el seguimiento de los pacientes mediante TLB, podría aportar información que ayudase al manejo clínico de los pacientes durante su tratamiento. De estas muestras de suero, además del TLB, se contaba con la información de concentraciones de biomarcadores (albúmina, hemoglobina, LDH y CA19.9) utilizados en el control del tratamiento en estos pacientes. Se valoró la respuesta al tratamiento mediante la escala RECIST1.1, donde se consideró que la mayoría de los pacientes habían respondido al tratamiento al producirse progresión de enfermedad en únicamente un paciente. Se quiso buscar un reflejo de esta respuesta al tratamiento en los cambios

que las variables bioquímicas y en el TLB, al comparar los cambios que experimentaban entre ambas muestras. Parece que el CA19.9 y el TLB son los que mejor reflejan en suero la respuesta al tratamiento. Se obtuvo algún resultado discordante como que el paciente con progresión de enfermedad experimentaba una reducción en la concentración de CA19.9, y que no se observaban diferencias estadísticamente significativas en el cambio del resultado del modelo iTLB en el total de los pacientes. En este caso, se pudo observar que los cambios en el TLB fueron un reflejo de los cambios en CA19.9, pudiendo tener una herramienta extra para el seguimiento de los pacientes, aunque sería deseable aumentar el tamaño muestral de estos 20 pacientes del estudio piloto para la validación de estos resultados preliminares.

Además, se quiso relacionar con la supervivencia de los pacientes (OS), donde se encontró diferencias estadísticamente significativas en las medianas de los tiempos de OS según la respuesta del modelo iTLB en la muestra al mes. Hacen falta más estudios para comprobar si existe un sesgo en la supervivencia obtenida según el tipo de metástasis del paciente, ya que existe múltiples revisiones institucionales que han observado que la enfermedad metastásica pulmonar aislada tiene un pronóstico significativamente mejor que los pacientes con metástasis hepáticas. (102–104) Debido al pequeño tamaño muestral, no se han podido realizar estas comprobaciones.

Todos estos resultados muestran el potencial de la metodología utilizada para el análisis de las muestras de suero analizadas por calorimetría, ya que los resultados encontrados se alinean con los datos clínicos de las muestras analizadas. Tras este estudio piloto, el siguiente paso es la aplicación del método en una muestra de mayor tamaño, para confirmar la aplicación de la TLB en el seguimiento y pronóstico de los pacientes con PDAC tras el tratamiento.

Transformación del diagnóstico
de PDAC: análisis comparativo
integral de biomarcadores
clínicos, TLB y enfoques
integrados

INTRODUCCIÓN

En la búsqueda de mejores herramientas para diagnosticar el cáncer de páncreas, frecuentemente se estudia pacientes en estadios avanzados de la enfermedad, reflejando la realidad clínica donde los diagnósticos tempranos son raros. La comparación de pacientes con cáncer de páncreas con un grupo control asintomático, como sanos donantes de sangre, encuentran diferencias significativas que sugieren nuevos biomarcadores o herramientas para el diagnóstico. Sin embargo, estos hallazgos a menudo no son aplicables en la práctica clínica. Esto se debe, en parte, a la naturaleza del grupo control utilizado. Los pacientes asintomáticos raramente visitan al médico, salvo en programas de cribado, inexistentes para el cáncer de páncreas. En cambio, los pacientes con síntomas, que sí acuden a las consultas, requieren un diagnóstico diferencial, incluyendo el cáncer de páncreas. Comúnmente, los estudios utilizan como grupo control a individuos sanos y a pacientes con patologías pancreáticas no cancerosas, como la pancreatitis crónica. Al analizar detalladamente, las diferencias entre pacientes con síntomas pancreáticos y aquellos con cáncer de páncreas se minimizan notablemente.

Una mejor aproximación a la práctica clínica sería utilizar pacientes sintomáticos sin diagnóstico de cáncer, como es el caso del estudio MICA de Dinamarca. El estudio MICA es una cohorte abierta de pacientes que se inició en julio de 2016 con el objetivo de buscar biomarcadores de diagnóstico temprano de cáncer. Está formado por pacientes con síntomas no específicos, pero con sospecha de cáncer. Por ello, son remitidos al Hospital Universitario de Copenhague (Herlev and Gentofte) para realizar un diagnóstico diferencial. Una vez que estos pacientes entran en el estudio, se les extrae una muestra de sangre periférica para analizar una batería de biomarcadores (algunos de uso clínico habitual y otros aún en proceso de investigación). Además, estos pacientes reciben un seguimiento a lo largo del tiempo para saber si al final desarrollan un cáncer, de qué tipo y en qué momento. Al excluir a los pacientes que desarrollaron cáncer durante el seguimiento, se puede utilizar a los pacientes sintomáticos del estudio MICA como grupo control, como ya se ha utilizado en otra ocasión, (105) y compararlo con un grupo de pacientes con diagnóstico de PDAC. De esta manera nos acercarnos un poco más a la situación con la que se encuentran los clínicos en su consulta.

Para el cáncer de páncreas, actualmente no se cuenta con un biomarcador *gold standard* para hacer un diagnóstico diferencial en pacientes sintomáticos. Este hecho cada vez es menos evidente si además se tiene en cuenta la teoría de que una enfermedad puede que no esté justificada por un cambio de una única proteína, sino que se debe a cambios producidos en varias proteínas. Por ello, una de las opciones es analizar cambios en los perfiles proteicos. Gracias a las tecnologías cada vez más sofisticadas, se puede encontrar estudios donde analizan perfiles de múltiples proteínas y buscan diferencias entre pacientes con cáncer de páncreas y controles. (51,52,106,107) Al analizar en detalle, se puede observar que lo habitual es utilizar como grupo control a pacientes sanos. En algunas ocasiones se incluyen pacientes con pancreatitis crónica o patologías pancreáticas no cancerosas, reduciéndose la capacidad predictiva con este grupo sintomático. Puede que este sea uno de los motivos por lo que estos biomarcadores no se estén aplicando en clínica todavía.

En el apartado **Desarrollo de un modelo de aprendizaje automatizado para el diagnóstico y pronóstico del cáncer de páncreas mediante muestras de suero analizadas por TLB** se ha mostrado una nueva metodología desarrollada por el grupo para clasificar a los pacientes según la forma de los termogramas obtenidos de muestras biológicas, específicamente de muestras de suero, usando como ejemplo un grupo sano (asintomático) y un grupo con PDAC (mayoritariamente en estadios avanzados). Los prometedores resultados abren el camino a probar la metodología propuesta en otros estudios con mayor tamaño muestral y que se aproximen más a la situación clínica, para estar cada vez más cerca de su aplicación. Pero una de las cualidades que no se demostró fue la posibilidad de incluir covariables como la edad, el sexo o la concentración de biomarcadores en sangre periférica. O incluso utilizar directamente la metodología con este tipo de variables clínicas. Algunos autores consideran esta cualidad una gran ventaja en la metodología, (40,41) ya que se pueden incorporar biomarcadores muy usados y estudiados en el ámbito clínico, como es el CA19.9, pero que de manera aislada no tienen toda la potencia para el diagnóstico o seguimiento de los pacientes. Mientras que su incorporación con otros biomarcadores o con la información de los termogramas en nuestro caso, se podría llegar a conseguir un efecto sinérgico.

Un biomarcador muy estudiado en el cáncer de páncreas es el CA19.9, (108,109) el cual, de manera aislada, no tiene la suficiente especificidad para diagnosticar a pacientes con cáncer de páncreas, pero su uso en el seguimiento de los pacientes está mucho más aceptado. (108,109) La incorporación de la concentración del CA19.9 en combinación con otras proteínas o biomarcadores, es muy habitual. Uno de los estudios que ha analizado el uso del CA19.9 en combinación con otros biomarcadores de inflamación, paneles de proteínas, microRNA, DNA libre de células, etc., es el estudio multicéntrico BIOPAC (*BIOMarkers in patients with PANcreatic Cancer*), siendo también una cohorte abierta de pacientes

de Dinamarca, que comenzó en julio del 2008 a reclutar pacientes con diagnóstico de cáncer de páncreas, comprobado mediante prueba histológica. El objetivo de este estudio era la búsqueda de nuevos biomarcadores para el diagnóstico y el pronóstico de los pacientes con cáncer de páncreas. Por esta razón, cuando los pacientes son incluidos en el estudio, se les realiza una batería de biomarcadores en sangre periférica, además de tener información detallada del diagnóstico del paciente, y se le realiza un seguimiento exhausto durante la enfermedad hasta su fallecimiento. No son pocos los resultados publicados del estudio BIOPAC, tanto los relacionados con el pronóstico, (64,110–113) como los relacionados con el diagnóstico. (51,52,110,111,113–115) En este último caso, se suele utilizar como grupo control a pacientes sanos y/o pacientes con pancreatitis crónica.

Por todo esto, el **objetivo general** de este estudio fue:

Determinar la capacidad diagnóstica y pronóstica de la metodología propuesta por nuestro grupo, basada en algoritmos de aprendizaje automatizado, para el análisis de muestras de suero por TLB en una cohorte de pacientes del estudio BIOPAC y un grupo control sintomático del estudio MICA, tanto de forma independiente como incluyendo variables clínicas de los pacientes en el análisis.

Como **objetivos específicos** se propuso:

1/ Obtener modelos de clasificación, usando la metodología propuesta de análisis de datos basada en *ncvreg* para:

- 1.A/ Obtener un modelo iTLB utilizando parámetros obtenidos de las curvas de los termogramas de suero.
- 1.B/ Obtener un modelo iClin utilizando parámetros bioquímicos y clínicos de los pacientes a estudio.
- 1.C/ Obtener un modelo iTLB+iClin combinando los parámetros anteriores.

2/ Analizar el poder diagnóstico y pronóstico de los tres modelos de clasificación obtenido, prestando especial atención tanto a los estadios precoces como a la evolución de los pacientes.

3/ Proponer una aplicación clínica concreta en base a los resultados obtenidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos

Se han analizado las muestras de pacientes procedentes de dos estudios daneses del Hospital Universitario de Copenhague (*Helev and Gentofte*). El primero de ellos fue el estudio de cohorte abierto MICA (¿“*New biomarkers in patients referred because of suspected serious illness - are they giving new diagnostic information?*”), (116) el cual comenzó en julio del 2016. Está formado por pacientes remitidos al hospital por presentar síntomas y signos sospechosos de cáncer. Estos pacientes fueron seguidos desde el momento de la primera visita hasta su muerte, emigración o hasta la fecha de mayo del 2023. Durante su seguimiento, a algunos de estos pacientes se les diagnosticó algún tipo de cáncer. Los pacientes del estudio MICA sin diagnóstico de cáncer durante todo el seguimiento fueron los que se consideraron como grupo control sintomático.

El segundo grupo estaba formado por pacientes procedentes de la cohorte abierta del estudio multicéntrico prospectivo BIOPAC (“*BIOmarkers in patients with PAncreatic Cancer (BIOPAC) - can they provide new information of the disease and improve diagnosis and prognosis of the patients?*”) (ID NCT03311776), (72) el cual comenzó en julio del 2008, y donde se incluyen a los pacientes con un diagnóstico de PDAC confirmado mediante prueba histológica. Muestras de suero utilizadas en este estudio se obtuvieron antes de empezar con el tratamiento. Estos pacientes recibieron un seguimiento de su enfermedad hasta la fecha de mayo del 2023 o hasta su fallecimiento.

Los estudios se realizaron según la declaración de Helsinki. El protocolo del estudio MICA fue aprobado por el Comité de Ética Regional Danés (H-7-2014-011) y la Agencia Danesa de Protección de Datos (HEH-2014-105; I-Suite 03330; PACTIUS P-2020-578). El protocolo del estudio BIOPAC está aprobado por el Comité de Ética Danés (VEK, j.nr. KA-20030113) y la Agencia Danesa de Protección de Datos (j.nr. 2012-58-0004; HGH-2015-027; I-Suite j. nº 03960 y PACTICUS P-2020-834). Todos los pacientes recibieron información oral y escrita sobre el estudio y dieron su consentimiento por escrito antes de su inclusión de acuerdo con las directrices del Comité de Ética Danés. Todas las muestras fueron identificadas con un código interno para garantizar el anonimato de los pacientes, siguiendo las indicaciones descritas en el protocolo aprobado por el comité ético.

Variables recogidas en cada grupo

Para este estudio en particular se han utilizado algunas variables recogidas en las bases de datos MICA y BIOPAC. Algunas de estas variables están en común en ambos grupos:

- Edad en años.
- Sexo: masculino o femenino.
- Índice de masa corporal (IMC) en kg/m², categorizado según la OMS como: peso insuficiente si el IMC <18.5 kg/m², normopeso si el IMC = 18.5-24.9 kg/m², sobrepeso si el IMC = 25-29.9 kg/m², y obesidad si el IMC ≥30 kg/m².
- Hábito tabáquico: no fumador, fumador o exfumador.
- Consumo de alcohol: no abuso, abuso o exabuso. Definiendo abuso como >7 unidades por semana para el sexo femenino, y >14 unidades por semana para el sexo masculino. Se considera 1 unidad ≈ 12 g alcohol.
- Escala del estado funcional ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*): con valores desde 0 hasta 5.
- Concentraciones de biomarcadores en sangre periférica del antígeno carbohidrato 19-9 (CA19.9), la proteína C reactiva (PCR), la interleucina 6 (IL-6) y la proteína 1 similar a quitinasa-3 (YKL-40).

Además, en el grupo de pacientes del estudio BIOPAC se utilizaron las siguientes variables:

- Etnia: caucásicos o no caucásicos.
- Diagnóstico previo de diabetes, tanto tipo I como tipo II.
- Caquexia en el momento del diagnóstico, definido como una pérdida de peso >5%.
- Índice de comorbilidad de Charlson corregido por la edad (CACI). (72)
- Estadio según la octava edición del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC): desde I hasta IV.
- Durante el seguimiento de la enfermedad de estos pacientes, se recogió:
 - Si cumplían o no los requisitos para ser operados. Dentro de los que sí cumplían los requisitos, si finalmente se operó o al final no se pudo realizar.
 - Dentro de los pacientes operados se recogió:
 - Si la resección fue completa o no (R0/R1 respectivamente).
 - Si hubo recaída de la enfermedad y el tiempo hasta dicha recaída.

- Dentro de los pacientes que no fueron operados, se recogió el tiempo de la supervivencia libre de progresión (PFS).
- De todos los pacientes con PDAC se recogió el tiempo de la supervivencia global (OS).

Procesamiento de las muestras de suero

De cada paciente se obtuvieron 1.5 mililitros de sangre periférica, cuya extracción, en el caso de los pacientes del estudio BIOPAC, fue en el momento del diagnóstico y/o antes de la cirugía o del inicio del tratamiento quimioterapéutico, con una mediana de 8.00 días [-1.00; 19.00] entre el diagnóstico y la extracción de sangre. Las muestras de sangre de los pacientes del estudio MICA se obtuvieron en el momento de inclusión al estudio. Las muestras fueron procesadas según los protocolos MICA y BIOPAC. Todas las muestras de sangre se centrifugaron a un mínimo de 2000 g a 4°C durante 10 minutos dentro de las 3 horas posteriores a la toma de sangre, y el suero se distribuyó en alícuotas en tubos y posteriormente se almacenó a -80°C.

Los análisis de CA19.9 y PCR se determinaron en muestras frescas (no congeladas), ya que formaban parte de las pruebas de rutina realizadas a los pacientes. Mientras que los valores de IL-6, YKL-40 y los termogramas se determinaron en muestras congeladas. La concentración de CA19.9 se analizó utilizando un ensayo de inmunoquimioluminiscencia, en Immulite 2000 GI-MA (número de catálogo L2KG12, Siemens, Ballerup, Dinamarca). Los niveles de PCR se midieron mediante turbidimetría (Dako, Glostrup, Dinamarca) utilizando un ensayo de laboratorio estándar, sujeto a programas de control de calidad internos (diario) y externos (mensuales). Los valores de referencia son 37 kU/L para CA19.9 y 10 mg/L para PCR. Las concentraciones de IL6 e YKL-40 se determinaron en muestras de suero por duplicado mediante ensayos de enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) comerciales de dos sitios, tipo sándwich (IL6: número de catálogo HS600, R&D Systems, Abingdon, Oxon, Reino Unido; YKL-40: Quidel Corporation, San Diego, CA, EE. UU.). Debido a su menor uso en clínica, no hay establecido un valor de referencia para estos dos parámetros.

La obtención de los termogramas a partir de muestras de suero se realizó como se ha comentado en el apartado **Desarrollo de un modelo de aprendizaje automatizado para el diagnóstico y pronóstico del cáncer de páncreas mediante muestras de suero analizadas por TLB.**

Análisis de los datos

Metodología para obtener los modelos de clasificación a comparar

La metodología para obtener los diferentes modelos de clasificación mediante el paquete *ncvreg* de R con penalizaciones tipo Lasso y validación cruzada, está descrita previamente en el apartado **Desarrollo de un modelo de aprendizaje automatizado para el diagnóstico y pronóstico del cáncer de páncreas mediante muestras de suero analizadas por TLB.** En todos los casos, se entrenó en el 70% de los datos y se validó en el 30% restante, aleatorizando 100 veces. Lo que cambia en cada modelo son las variables predictoras utilizadas.

1. **Modelo-iClin (sin TLB):** Para obtener el modelo iClin se utilizaron las siguientes variables predictoras:
 - La edad dicotomizada en pacientes \leq / $>$ de 50 años.
 - La escala del estado funcional ECOG dicotomizada en ECOG = 0 y ECOG = 1-3.
 - La concentración de biomarcadores en sangre periférica de CA19.9, IL-6, PCR e YKL-40, todas ellas en su forma de logaritmo natural. En estas variables se realizó un preprocesado (mediante la librería *caret* de R) para eliminar las variables con varianza igual a cero, con correlación elevada (correlación de Pearson $>$ 0.9) y para centrar y normalizar a partir de la concentración del logaritmo natural.
2. **Modelo iTLB:** El modelo iTLB se basa en la forma de las curvas de termogramas de muestras de suero. Para ello, se utilizan las parejas de temperaturas como variables predictoras, como está descrito previamente en el apartado **Desarrollo de un modelo de aprendizaje automatizado para el diagnóstico y pronóstico del cáncer de páncreas mediante muestras de suero analizadas por TLB.**

3. Modelo iTLB+iClin: A partir de las variables clínicas frecuentes del modelo iClin, y de las parejas de temperaturas frecuentes obtenidas en el modelo iTLB, se combinaron para ajustar un tercer modelo mixto, llamado modelo iTLB+iClin.

Comparación de los tres modelos

El resultado de los modelos de clasificación es un único número por paciente que puede ir desde menos infinito hasta infinito. De manera estándar, el punto de corte establecido por el modelo es de cero. Esto quiere decir que cuando el modelo de clasificación proporciona un número menor a cero significa que clasifica ese paciente como control (paciente sin cáncer), mientras que, si el número es mayor a cero, el modelo clasifica a ese paciente con PDAC en este caso. Se comparó los resultados obtenidos usando el punto de corte estándar con el punto de corte calculado según Youden. (100) El rendimiento de las pruebas diagnósticas se evaluó mediante el cálculo de índices de rendimiento comunes (sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo), así como la curva de característica operativa del receptor (ROC) y su área bajo la curva (AUC) junto con su intervalo de confianza al 95% (IC_{95%}).

Para comparar los modelos, por un lado, se evaluó su capacidad diagnóstica para diferenciar entre el grupo control (pacientes sin diagnóstico de cáncer) y el grupo de pacientes con PDAC. Por otro lado, se relacionó cada modelo con las variables clínicas, haciendo hincapié en las variables recogidas en el grupo de pacientes con PDAC durante el seguimiento de su enfermedad (recaída, PFS y OS), con el objetivo de encontrar posibles nuevas herramientas que informen del pronóstico de los pacientes con PDAC. Para mostrar estos resultados, se usó el 100% de los datos (el 70% de entrenamiento y el 30% de validación), para evitar tener grupos con pequeños tamaños y que la estadística tenga mayor potencia.

Además, se aplicó los modelos obtenidos en los pacientes de la cohorte MICA con diagnóstico de cáncer durante su seguimiento para valorar si alguno de los modelos podía ayudar como herramienta de diagnóstico precoz.

Análisis estadístico aplicado

La prueba de Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors o la prueba de Shapiro-Wilk (según el tamaño muestral) se realizó para evaluar la normalidad de las variables. Las medias entre dos grupos independientes se compararon mediante la prueba T de Student de muestras no pareadas para variables con comportamiento normal (verificando previamente la homocedasticidad con la prueba de Bartlett), mientras que las medianas entre dos grupos independientes se compararon mediante la prueba de Wilcoxon de muestras no pareadas para variables con comportamiento no normal. Las medias entre tres o más grupos de distribución no paramétrica se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis. El posterior análisis múltiple bivalente se realizó ajustando los p-valores según el método de Bonferroni. La asociación entre grupos para variables cualitativas se evaluó mediante la prueba de χ^2 de Pearson con la corrección de Yates. Cuando el tamaño muestral era pequeño (≤ 20) se utilizó la prueba de Fisher. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de dos grupos se compararon mediante la prueba de Log-Rank o de Gehan-Breslow en el caso de entrecruzamientos. La comparación de AUC de las curvas ROC se realizó mediante la prueba de DeLong.

Para todas las pruebas, un p-valor bilateral inferior a 0.05 se consideró estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el lenguaje y entorno para la informática estadística del equipo central de R, en su versión 4.3.2 (31 de octubre de 2023).

RESULTADOS

Se analizaron 706 muestras de suero procedentes de pacientes, de los cuales el 46.74% eran de sexo masculino, con una mediana de edad de 67.00 años [57.00; 73.00]. La mediana del IMC fue de 24.02 kg/m² [21.30; 27.16] (n = 12), el cual se categorizó en: peso insuficiente (6.20%, 43/694), normopeso (53.17%, 369/694), sobrepeso (26.80%, 186/694) y obesidad (13.83%, 96/694). Se contaba con dos grupos:

1/ Grupo control constituido por 325 pacientes (46.03%; edad de 63.00 años [51.00; 72.00]) sin diagnóstico de cáncer ni en el momento de la inclusión ni durante todo el seguimiento del estudio. Dentro del grupo control, el 38.15% (124/325) fueron de sexo masculino. Según el IMC (n = 5), la mediana en este grupo fue de 24.29 kg/m² [21.45; 27.74], clasificándose en: 4.69% con peso insuficiente (15/320), 50.31% con normopeso (161/320), 26.56% con sobrepeso (85/320) y 18.44% con obesidad (59/320). Al dicotomizar el IMC en < 25 (incluyendo los pacientes con peso insuficiente y con normopeso) y ≥ 25 (incluyendo los pacientes con sobrepeso y obesidad), no se observó ninguna asociación entre la edad, el sexo y el IMC en el grupo control (Tabla 10).

2/ Grupo formado por 381 pacientes (53.57%; mediana de edad de 69.00 [63.00; 74.00]) con un diagnóstico de PDAC. Dentro de este grupo, el 54.07% (206/381) fueron de sexo masculino. La mediana de peso en el momento de la inclusión en el estudio fue de 72.00 kg [61.00; 82.00] (n = 9). Según el IMC, la mediana en este grupo fue de 23.64 kg/m² [21.20; 26.60] (n = 7), clasificándose en: 7.49% con peso insuficiente (28/374), 55.61% con normopeso (208/374), 27.01% con sobrepeso (101/374), y 9.89% con obesidad (37/374). Según la etnia, la mayoría eran caucásicos (95.98%, 310/323), mientras que un 4.02% (13/323) eran de otras etnias (n = 58). Al dicotomizar el IMC (</≥ 25 kg/m²), tampoco se encontró ninguna asociación entre la edad, el sexo, el IMC y la etnia en el grupo con PDAC (Tabla 10).

Tabla 10: Relación entre edad, sexo, IMC y etnia en cada grupo (controles y PDAC).

Controles				PDAC		
	Edad (años)		p-valor	Edad (años)		p-valor
Sexo:			0.451			0.904
Masculino	63.00 [51.75;71.00]			69.00 [64.00;74.00]		
Femenino	64.00 [51.00;73.00]			69.00 [62.00;73.00]		
IMC (kg/m²):			0.069			0.231
< 25	65.00 [52.00;73.00]			70.00 [64.00;74.25]		
≥ 25	61.00 [51.00;71.00]			68.00 [63.00;73.00]		
Etnia:						0.261
Caucásica				69.00 [64.00;74.00]		
No caucásica				67.00 [64.00;71.00]		
Sexo	Masculino	Femenino	p-valor	Masculino	Femenino	p-valor
IMC:			0.091			0.173
< 25	60 (33.90%)	117 (66.10%)		120 (50.85%)	116 (49.15%)	
≥ 25	63 (43.75%)	81 (56.25%)		81 (58.70%)	57 (41.30%)	
Etnia:						1.000
Caucásica				166 (53.55%)	144 (46.45%)	
No caucásica				7 (53.85%)	6 (46.15%)	
IMC (kg/m²)				< 25	≥ 25	p-valor
Etnia:						0.619
Caucásica				199 (64.61%)	109 (35.39%)	
No caucásica				7 (53.85%)	6 (46.15%)	

Notas: las variables continuas están representadas por el Q2 [Q1; Q3] debido a su distribución no paramétrica. Mientras que las variables categóricas están representadas por en número (%) de pacientes en cada categoría; los p-valores se obtienen de la prueba de Wilcoxon al comparar una variable continua entre dos grupos, y de la prueba de χ^2 (con la corrección de Yates) al comparar dos variables categóricas; PDAC: adenocarcinoma ductal de páncreas; IMC: índice de masa corporal.

En el total, se observó una relación entre la edad, el sexo y el IMC según los grupos (controles y PDAC), de manera que los pacientes con PDAC tenían una mayor mediana de edad, una mayor proporción de pacientes de sexo masculino y mayor proporción de pacientes con IMC < 25 kg/m² (Tabla 11 y Figura 27A-C).

Respecto a las variables recogidas relacionadas con los hábitos de vida de los pacientes, se disponía de la información del consumo de tabaco (fumador, no fumador o exfumador), y del abuso del alcohol (no abuso, abuso o exabuso). Del total de los pacientes, se contaba con la información sobre el consumo de tabaco en 683 pacientes (96.74%, na = 23), de manera que el 37.34% (255/683) nunca habían fumado, el 26.35% (180/683) fumaban en ese momento, y el 36.31% (248/683) eran exfumadores. Respecto al abuso del alcohol, se tenía información en 659 pacientes (93.34%, na = 47), de manera que el 76.48% (504/659) no abusaban del alcohol, el 16.69% (110/659) hacían un abuso del consumo del alcohol, y el 6.83% restante (45/659) hacían un abuso del alcohol, pero en ese momento no (exabuso). Al dicotomizar el hábito tabáquico como “No fumador” y “Fumador+Exfumador”, y el abuso de alcohol como “No abuso” y “Abuso+Exabuso”, y al relacionarlo con los grupos (controles y pacientes con PDAC), no se observó ninguna asociación (Tabla 11).

Para estratificar a los pacientes se contaba con diferentes escalas. Una de ellas era la escala del estado funcional ECOG, donde se tenía información en ambos grupos en 666 de los pacientes (94.33%, na = 40), de manera que el 61.71% (411/666) se definieron como ECOG = 0, el 32.73% (218/666) como ECOG = 1, y el 5.56% (37/666) como ECOG = 2-3. Al dicotomizar la escala ECOG como ECOG = 0 y ECOG = 1-3, se observó una asociación con los grupos (controles y PDAC), de manera que había una mayor proporción de pacientes con PDAC con ECOG = 1-3 (Tabla 11 y Figura 27.D).

Mientras que de las escalas CACI y el estadio únicamente se tenía información de ellas en los pacientes con PDAC. Respecto a la escala CACI, el 14.24% tenían ausencia de comorbilidad (46/323, CACI = 0-1), el 20.43% tenían comorbilidad baja (66/323, CACI = 2) y el 65.33% restante tenían comorbilidad alta (211/323, CACI ≥ 3) (na = 58) (Figura 28.A). Respecto al estadio, el 3.43% fueron estadio = I (13/379), el 16.09% fueron estadio = II (61/379), el 27.44% fueron estadio = III (104/379) y el 53.03% restante fueron estadio = IV (201/379) (na = 2) (Figura 28.B).

En cuanto a las concentraciones de biomarcadores en sangre periférica recogidas en estos pacientes, CA19.9, IL-6, PCR, YKL-40, se disponía de la información de las cuatro variables en 597 de los pacientes (84.56%, na = 109). Se observó diferencias estadísticamente significativas en las medianas de las concentraciones (en su forma de logaritmo natural) de todos los biomarcadores entre el grupo control y el grupo de pacientes con PDAC (Tabla 11 y Figura 27.E).

Para terminar por comentar los resultados de las variables clínicas basales recogidas, en el grupo de pacientes con PDAC se disponía de un par variables relacionadas con enfermedades o síntomas en el momento del diagnóstico. Una de ellas es si los pacientes presentaban además un diagnóstico de diabetes. De los 381 pacientes con PDAC, el 73.49% (280/381) sí tenían diabetes (Figura 28.C). La otra variable recogida hacía referencia a si los pacientes habían experimentado una pérdida de peso mayor al 5% de su peso corporal en el momento del diagnóstico, lo que se define como caquexia. Se disponía de esta información en 316 pacientes (82.94%, na = 65), de manera que el 68.35% (216/316) sí tenían caquexia (Figura 28.D).

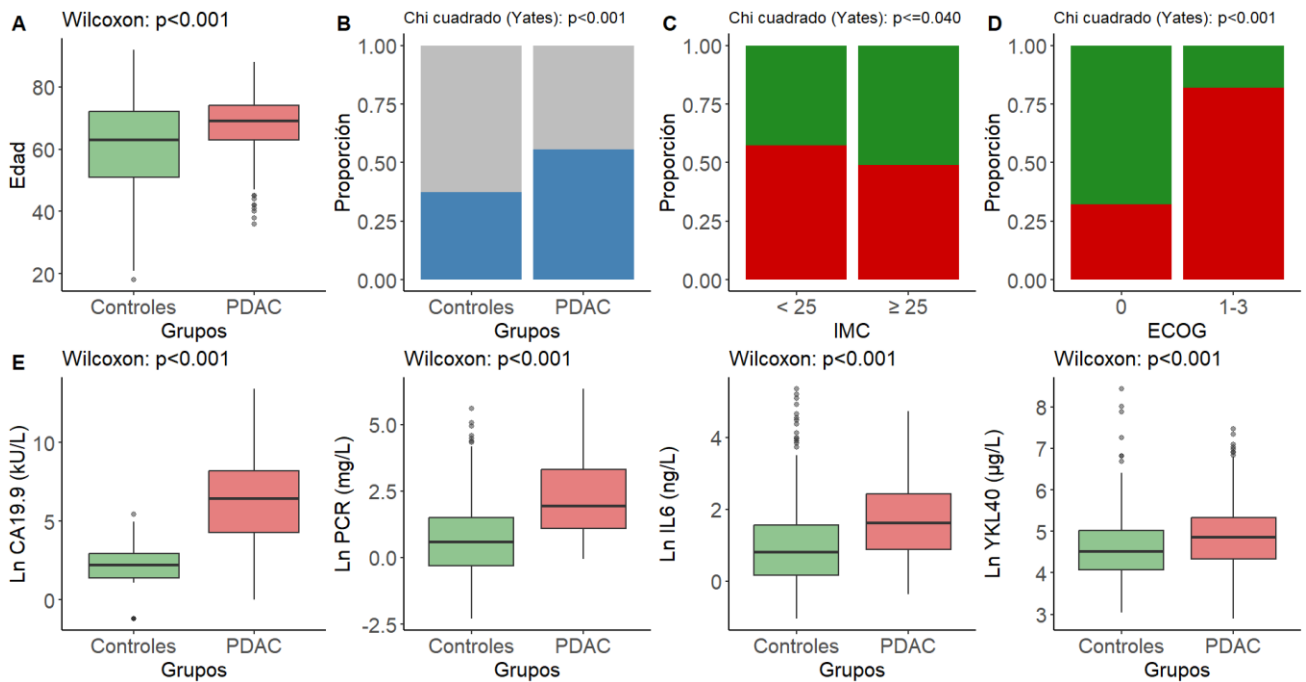
Dentro de los pacientes con PDAC se realizó un seguimiento exhaustivo en el tiempo, recogándose diferentes variables. De esta manera, se pudo clasificar a los pacientes con PDAC en función de si cumplían los requisitos para ser operados o no (na = 1): el 53.16% (202/380) no fueron operados, mientras que el 35.26% (134/380) sí. Además, en un pequeño grupo, el 11.58% (44/380), sí cumplían los requisitos para operarse, pero al final no fue posible (Figura 28.E).

Dentro de los 134 pacientes operados, además se realizó un seguimiento de ellos, categorizándolos según si la resección fue completa o no (R0/R1 respectivamente, na = 4): la mayoría, el 81.54% (106/130) eran R1 (Figura 28.F). La mediana de tiempo de recaída en los pacientes que fueron a cirugía fue de 10.50 meses [6.00; 19.75] (na = 4), y la mediana de OS fue de 20.00 [10.00; 36.75] meses. Además, de los pacientes que no fueron operados, la mediana de tiempo de PFS y OS fueron 5.00 [2.25; 9.75] meses y 8.00 [3.00; 14.00] meses respectivamente

Tabla 11: Relación de edad, sexo, IMC, tabaco, alcohol, escala del estado funcional ECOG y variables bioquímicas entre los grupos (controles y PDAC).

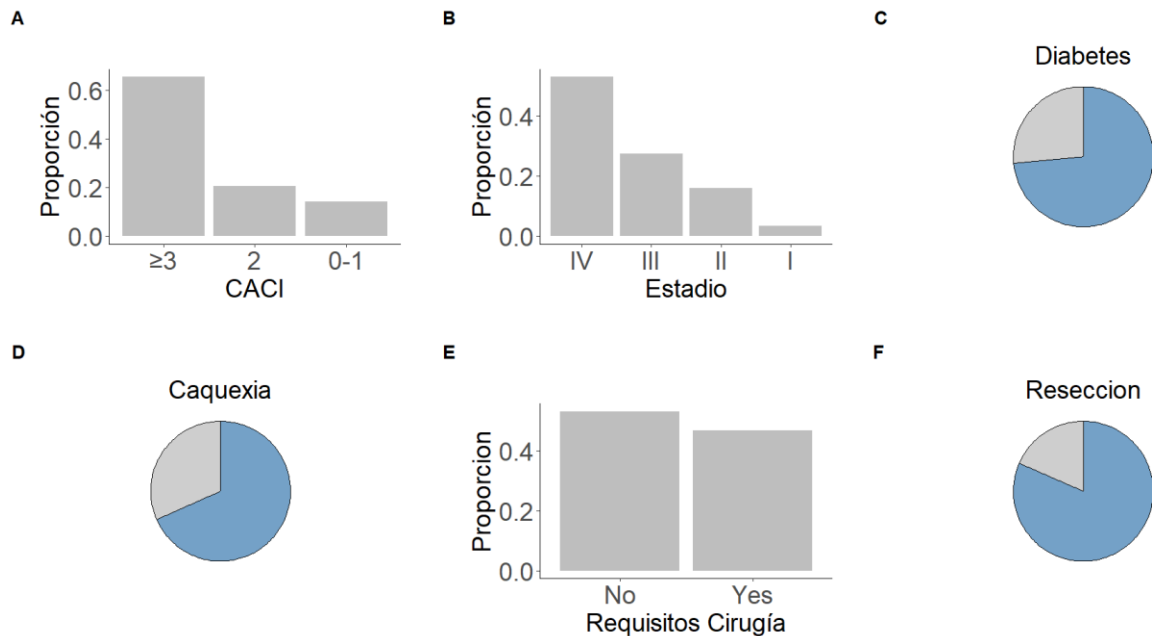
	Controles	PDAC	p-valor
Edad (años)	63.00 [51.00;72.00]	69.00 [63.00;74.00]	< 0.001
Sexo:			< 0.001
Masculino	124 (37.58%)	206 (62.42%)	
Femenino	201 (53.46%)	175 (46.54%)	
IMC (kg/m²):			0.040
< 25	177 (42.86%)	236 (57.14%)	
≥ 25	144 (51.06%)	138 (48.94%)	
Tabaco:			0.164
No fumador	125 (49.02%)	130 (50.98%)	
Fumador+Exfumador	185 (43.22%)	243 (56.78%)	
Alcohol:			0.640
No abuso	218 (43.25%)	286 (56.75%)	
Abuso+Exabuso	71 (45.81%)	84 (54.19%)	
Estado funcional ECOG:			< 0.001
0	279 (67.88%)	132 (32.12%)	
1-3	46 (18.04%)	209 (81.96%)	
Ln CA19.9 (kU/L)	2.20 [1.39;2.94]	6.44 [4.29;8.20]	< 0.001
Ln PCR (mg/L)	0.57 [-0.32;1.50]	1.95 [1.10;3.30]	< 0.001
Ln IL-6 (ng/L)	0.81 [0.16;1.57]	1.61 [0.88;2.42]	< 0.001
Ln YKL-40 (µg/L)	4.51 [4.07;5.03]	4.85 [4.33;5.33]	< 0.001

Notas: las variables continuas están representadas por el Q2 [Q1; Q3] debido a su distribución no paramétrica. Mientras que el resto de las variables están representadas por en número (%) de pacientes en cada categoría; los p-valores se obtienen de la prueba de Wilcoxon al comparar una variable continua entre dos grupos, y de la prueba de χ^2 (con la corrección de Yates) al comparar dos variables categóricas; PDAC: adenocarcinoma ductal de páncreas; IMC: índice de masa corporal; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; CA19.9: marcador tumoral antígeno carbohidrato 19-9; PCR: proteína C reactiva; IL-6: interleuquina 6; YKL-40: proteína 1 similar a quitinasa-3.



Notas: PDAC: adenocarcinoma ductal de páncreas; IMC: índice de masa corporal; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; CA19.9: marcador tumoral antígeno carbohidrato 19-9; PCR: proteína C reactiva; IL-6: interleucina 6; YKL-40: proteína 1 similar a quitinasa-3.

Figura 27: Relación estadísticamente significativa de diferentes variables entre los grupos (controles y PDAC). **A/** Diferencia de la mediana de la edad (años); **B/** Asociación del sexo (masculino y femenino); **C/** Asociación del IMC (kg/m^2); **D/** Asociación de la escala ECOG del estado funcional; **E/** Diferencia de la mediana del logaritmo natural de la concentración de biomarcadores: CA19.9, PCR, IL-6 e YKL-40.



Notas: PDAC: adenocarcinoma ductal de páncreas; CACI: índice de comorbilidad de Charlson ajustado por la edad; CACI = 0-1: ausencia de comorbilidad, CACI = 2: comorbilidad baja, CACI ≥ 3 : comorbilidad alta; Estadio de la enfermedad según la octava edición del AJCC.

Figura 28: Proporción de pacientes con PDAC según: **A/** la escala CACI; **B/** el estadio; **C/** el diagnóstico previo de diabetes (NO/SÍ); **D/** la sintomatología de caquexia (NO/SÍ); **E/** si cumplen o no los requisitos para operarse; **F/** dentro de los pacientes operados, si la resección fue completa o no (SÍ/NO o R0/R1).

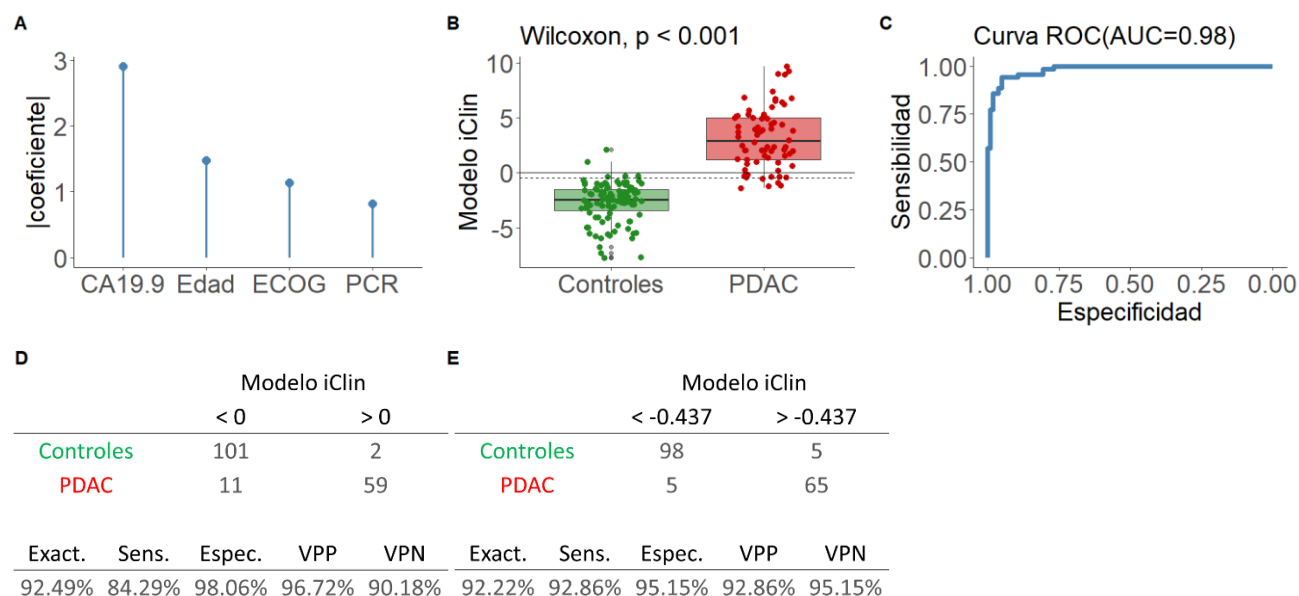
1. Modelo iClin

A partir de variables clínicas, y aplicando la metodología propuesta por el grupo para obtener un modelo de clasificación de termogramas, se obtuvo un primer modelo (modelo iClin) para distinguir entre la población control (pacientes sintomáticos sin diagnóstico de cáncer) y pacientes con un diagnóstico de PDAC. El modelo iClin se entrenó y validó en 574 pacientes (56.62% corresponden al grupo control), los cuales constituyen los pacientes que tienen la información de las seis variables predictoras clínicas introducidas: la edad dicotomizada (\leq/\gt de 50 años), la escala ECOG del estado funcional dicotomizada (0/1-3) y el logaritmo natural de las concentraciones en sangre periférica de CA19.9, IL-6, PCR e YKL-40, éstas últimas preprocesadas.

El modelo iClin obtenido estaba formado por cuatro variables (edad, escala ECOG del estado funcional y las concentraciones de CA19.9 y PCR), es decir, se eliminaron dos de las variables (concentración de IL-6 e YKL-40). Se observó que la concentración de CA19.9 era la que tenía mayor peso para distinguir entre controles y pacientes con PDAC, mientras que la concentración de PCR estaba en la cola (Figura 29.A). La media de AUC en los grupos de entrenamiento fue de 0.96 (± 0.01), y en los grupos de validación fue de 0.95 (± 0.01).

Al considerar la respuesta del modelo iClin como una variable continua, se observó diferencias estadísticamente significativas en la mediana del resultado del modelo iClin entre el grupo control (-2.41 [-3.41; -1.51]) y el grupo con PDAC (2.90 [1.23; 5.02]) (prueba de Wilcoxon: p-valor < 0.001) (Figura 29.B), con un AUC en el grupo de validación de 0.98 (IC_{95%} = 0.97-1.00) (Figura 29.C).

Al considerar la respuesta del modelo iClin como dicotómica, se comparó los resultados obtenidos al usar el punto de corte estándar de cero y el calculado de Youden de -0.437. Se observó que, aunque los cambios eran mínimos, los valores de exactitud, sensibilidad, especificidad, VPP y VPN superaban todos el 90% al usar el punto de Youden (Figura 29.D y E)



Notas: Las variables que aparecen en la figura A son el logaritmo natural de CA19.9 y de PCR. Mientras que la edad está dicotomizada en \leq/\gt a 50 años, y la escala ECOG en 0/1-3; CA19.9: marcador tumoral antígeno carbohidrato 19-9; PCR: proteína C reactiva; PDAC: adenocarcinoma ductal de páncreas; AUC: área bajo la curva ROC; Exact: exactitud; Sens: sensibilidad; Espec: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo.

Figura 29: Resultados del modelo iClin obtenido para diferenciar a los pacientes controles (sintomáticos) de los pacientes con PDAC. **A/** Valor absoluto de los coeficientes del modelo iClin en cada una de las variables predictoras; **B/** Diferencia de medianas de la respuesta del modelo iClin en el grupo de validación (controles y PDAC), representando con una línea horizontal continua el punto de corte estándar, y discontinua el de Youden; **C/** Área bajo la curva ROC del modelo iClin en el grupo de validación; **D/** En la parte superior aparece la tabla de contingencia de la predicción del modelo iClin dicotomizado por el punto de corte estándar, en el grupo de validación. En la parte inferior viene indicado los resultados del rendimiento del modelo iClin; **E/** En la parte superior aparece la tabla de contingencia de la predicción del modelo iClin dicotomizado por el punto de corte de Youden, en el grupo de validación. En la parte inferior viene indicado los resultados del rendimiento del modelo iClin.

Relación de los resultados del modelo iClin con variables clínicas

Una vez que se vio la buena capacidad del modelo iClin para diferenciar entre el grupo control (pacientes sintomáticos sin diagnóstico de cáncer) y pacientes con PDAC, se buscó alguna relación entre el modelo iClin y cada una de las variables recogidas en ambos grupos.

Al relacionar la respuesta del modelo iClin (tanto la continua como la dicotómica) con las variables clínicas recogidas en los pacientes, se encontraron diferencias en las medianas del valor del modelo iClin entre el hábito tabáquico de los controles (no fumador vs fumador/exfumador), entre los pacientes categorizados según el estadio (I-III vs IV) (Figura 30.A), y entre los pacientes que cumplían o no los requisitos para operarse (Figura 30.B). Respecto a la relación encontrada con el hábito tabáquico en el grupo control, se debía porque había una asociación con los pacientes mayores de 50 años (prueba de χ^2 con la corrección de Yates: p-valor = 0.018), y con los pacientes con una escala ECOG = 1-3 (prueba de χ^2 con la corrección de Yates: p-valor = 0.043).

Al dicotomizar el modelo iClin, tanto por el punto de corte estándar como el de Youden, se observó que la mediana de la concentración de IL-6 e YKL-40 era mayor en el grupo de pacientes con una respuesta en el modelo iClin por encima del punto de corte. Esta diferencia se observó en ambos grupos en el caso de la IL-6, mientras que solamente en el grupo de pacientes con PDAC en el caso de la YKL-40. Estos hallazgos se debían a que la concentración de IL-6 y de YKL-40 en el grupo control eran mayores en los pacientes con edad > 50 años y con escala ECOG = 1-3 (prueba de Wilcoxon, p-valor <0.001, para ambos). En el grupo de pacientes con PDAC, solo se encontró estas diferencias en la concentración de IL-6 con los pacientes ECOG = 1-3 (prueba de Wilcoxon, p-valor = 0.002).

Además, se observó una asociación entre el modelo iClin, dicotomizado por el punto de corte estándar, y el diagnóstico de diabetes, encontrando mayor proporción de pacientes con diabetes clasificados por encima del punto de corte. Esta asociación se podía justificar porque había una mayor proporción de pacientes con diabetes y con una edad > 50 años (prueba de χ^2 con la corrección de Yates: p-valor = 0.040).

Respecto a las variables recogidas durante el seguimiento de los pacientes con PDAC (tiempo hasta la recaída, PFS, y OS), no se observó una relación con el modelo iClin con dichas variables.

Los resultados de las relaciones entre el modelo iClin y la clínica están en las Tabla 12, Tabla 13, Tabla 14 y Tabla 15.

Tabla 12: Relación de variables clínicas con la respuesta del modelo iClin dicotomizada según el punto de corte estándar, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con PDAC.

Modelo iClin	Controles		p-valor	PDAC		p-valor
	< 0	> 0		< 0	> 0	
Sexo:			1.000			0.571
Masculino	118 (94.40%)	7 (5.60%)		16 (12.8%)	109 (87.2%)	
Femenino	189 (94.5%)	11 (5.55%)		20 (16.13%)	104 (83.87%)	
IMC (kg/m²):			1.000			1.000
< 25	167 (94.89%)	9 (5.11%)		24 (14.55%)	141 (85.45%)	
≥ 25	136 (94.44%)	8 (5.56%)		12 (14.29%)	72 (85.71%)	
Etnia:						0.126*
Caucásica				33 (13.75%)	207 (86.25%)	
No caucásica				3 (33.33%)	6 (66.67%)	
Tabaco:			0.508			0.384
No fumador	119 (95.97%)	5 (4.03%)		10 (11.63%)	76 (88.37%)	
Fumador+Exfumador	174 (93.55%)	12 (6.45%)		26 (15.95%)	137 (84.05%)	
Alcohol:			0.772*			0.184
No abuso	205 (94.47%)	12 (5.53%)		24 (12.57%)	167 (87.43%)	
Abuso+Exabuso	67 (93.06%)	5 (6.94%)		12 (20.69%)	46 (79.31%)	
Ln IL-6 (ng/L)	0.75 [0.14;1.45]	1.96 [1.34;3.09]	<0.001 [#]	1.05 [0.68;1.46]	1.70 [0.96;2.48]	0.003 [#]
Ln YKL-40 (µg/L)	4.48 [4.04;4.94]	5.52 [4.92;6.05]	<0.001 [#]	4.72 [4.22;5.19]	4.89 [4.32;5.45]	0.247 [#]
Diabetes:						0.035
No				32 (17.58%)	150 (82.42%)	
Sí				4 (5.97%)	63 (94.03%)	
Caquexia:						0.356
No				14 (17.95%)	64 (82.05%)	
Sí				21 (12.57%)	146 (87.43%)	
CACI:						0.356
0-2				14 (18.18%)	63 (81.82%)	
≥ 3				22 (12.79%)	150 (87.21%)	
Estadio:						0.252
I-III				20 (17.70%)	93 (82.30%)	
IV				16 (11.76%)	120 (88.24%)	
Requisitos Cirugía:						0.486
No				19 (12.03%)	139 (87.97%)	
Sí				17 (16.83%)	84 (83.17%)	
Resección:						0.117*
Completa (R0)				3 (37.5%)	5 (62.5%)	
Incompleta (R1)				8 (13.56%)	51 (86.44%)	

Notas: En variables categóricas, se representa el número (%) de pacientes en cada categoría, mientras que en variables continuas se representa el Q2 [Q1; Q3]; p-valores obtenidos mediante la prueba de χ^2 con la corrección de Yates; *: p-valor obtenido mediante la prueba de Fisher; #: p-valor obtenido mediante la prueba de Wilcoxon, debido a su distribución no paramétrica; PDAC: adenocarcinoma ductal de páncreas; IMC: índice de masa corporal; CACI: índice de comorbilidad de Charlson ajustado por la edad; CACI = 0-1: ausencia de comorbilidad, CACI = 2: comorbilidad baja, CACI ≥ 3: comorbilidad alta; Estadio de la octava edición de la AJCC; Los pacientes clasificados según la "Resección", corresponde a pacientes operados.

Tabla 13: Relación de variables clínicas con la respuesta del modelo iClin dicotomizada según el punto de corte calculado de Youden, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con PDAC.

Modelo iClin	Controles		p-valor	PDAC		p-valor
	< -0.437	> -0.437		< -0.437	> -0.437	
Sexo:			0.767			0.834
Masculino	113 (90.40%)	12 (9.60%)		15 (12.00%)	110 (88.00%)	
Femenino	184 (92.00%)	16 (8.00%)		13 (10.48%)	111 (89.52%)	
IMC (kg/m²):			0.723			1.000
< 25	160 (90.91%)	16 (9.09%)		19 (11.52%)	146 (88.48%)	
≥ 25	133 (92.36%)	11 (7.64%)		9 (10.71%)	75 (89.29%)	
Etnia:						0.067*
Caucásica				25 (10.42%)	215 (89.58%)	
No caucásica				3 (33.33%)	6 (66.67%)	
Tabaco:			0.225			0.621
No fumador	117 (94.35%)	7 (5.65%)		8 (9.30%)	78 (90.70%)	
Fumador+Exfumador	167 (89.78%)	19 (10.22%)		20 (12.27%)	143 (87.73%)	
Alcohol:			0.627			0.348
No abuso	199 (91.71%)	18 (8.29%)		19 (9.95%)	172 (90.05%)	
Abuso+Exabuso	64 (88.89%)	8 (11.11%)		9 (15.52%)	49 (84.48%)	
Ln IL-6 (ng/L)	0.70 [0.12;1.36]	1.94 [1.22;3.18]	<0.001 [#]	0.95 [0.67;1.44]	1.70 [0.92;2.48]	0.003 [#]
Ln YKL-40 (µg/L)	4.46 [4.04;4.89]	5.63 [4.99;6.08]	<0.001 [#]	4.71 [4.23;5.19]	4.88 [4.30;5.45]	0.264 [#]
Diabetes:						0.068
No				25 (13.74%)	157 (86.26%)	
Sí				3 (4.48%)	64 (95.52%)	
Caquexia:						0.203
No				12 (15.38%)	66 (84.62%)	
Sí				15 (8.98%)	152(91.02%)	
CACI:						0.424
0-2				11 (14.29%)	66 (85.71%)	
≥ 3				17 (9.88%)	155 (90.12%)	
Estadio:						0.255
I-III				19 (16.81%)	94 (83.19%)	
IV				15 (11.03%)	121 (88.97%)	
Requisitos Cirugía:						0.954
No				16 (10.81%)	132 (89.19%)	
Sí				12 (11.88%)	89 (88.12%)	
Resección:						0.549*
Completa (R0)				1 (16.67%)	5 (83.33%)	
Incompleta (R1)				7 (11.48%)	54 (88.52%)	

Notas: En variables categóricas, se representa el número (%) de pacientes en cada categoría, mientras que en variables continuas se representa el Q2 [Q1; Q3]; p-valores obtenidos mediante la prueba de χ^2 con la corrección de Yates; *: p-valor obtenido mediante la prueba de Fisher; #: p-valor obtenido mediante la prueba de Wilcoxon, debido a su distribución no paramétrica; PDAC: adenocarcinoma ductal de páncreas; IMC: índice de masa corporal; CACI: índice de comorbilidad de Charlson ajustado por la edad; CACI = 0-1: ausencia de comorbilidad, CACI = 2: comorbilidad baja, CACI ≥ 3: comorbilidad alta; Estadio de la octava edición de la AJCC; Los pacientes clasificados según la "Resección", corresponde a pacientes operados.

Tabla 14: Relación de variables clínicas con la respuesta del modelo iClin como variable continua, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con PDAC.

	Controles	p-valor	PDAC	p-valor
Sexo:		0.584		0.056
Masculino	-2.49 [-4.08; -1.52]		3.51 (3.19)	
Femenino	-2.39 [-3.59; -1.36]		2.78 (2.73)	
IMC (kg/m²):		0.555		0.455
< 25	-2.36 [-3.67; -1.34]		3.04 (2.93)	
≥ 25	-2.48 [-3.91; -1.56]		3.35 (3.11)	
Etnia:				0.886
Caucásica			3.15 (2.93)	
No caucásica			2.94 (4.39)	
Tabaco:		0.036		0.759
No fumador	-2.66 [-4.12; -1.66]		3.22 (2.90)	
Fumador+Exfumador	-2.30 [-3.44; -1.17]		3.10 (3.04)	
Alcohol:		0.800		0.726
No abuso	-2.45 [-3.75; -1.33]		3.11 (2.90)	
Abuso+Exabuso	-2.39 [-3.62; -1.68]		3.27 (3.27)	
Diabetes:				0.321
No			3.04 (3.13)	
Sí			3.43 (2.56)	
Caquexia:				0.920
No			3.18 (3.13)	
Sí			3.13 (2.88)	
CACI:				0.509
0-2			2.96 (3.07)	
≥ 3			3.23 (2.95)	
Estadio:				< 0.001
I-III			1.99 (2.42)	
IV			4.11 (3.08)	
Requisitos Cirugía:				<0.001
No			3.93 (3.15)	
Sí			2.00 (2.29)	
Resección:				0.315
Completa (R0)			1.29 (2.06)	
Incompleta (R1)			2.13 (2.28)	

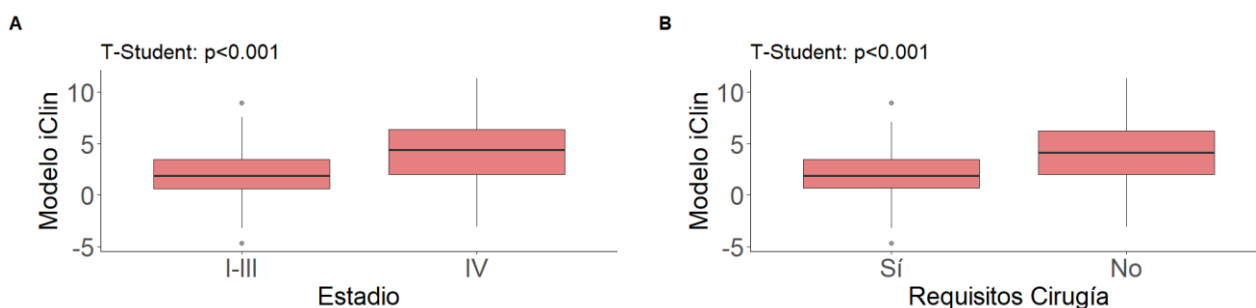
Notas: Los resultados del modelo iClin están representados como la media (desviación estándar) o como el Q2 [Q1; Q3] según el carácter paramétrico o no de las variables; p-valores obtenidos de las pruebas de T de Student o de Wilcoxon, según el carácter paramétrico o no; PDAC: adenocarcinoma ductal de páncreas; IMC: índice de masa corporal; CACI: índice de comorbilidad de Charlson ajustado por la edad; CACI = 0-1: ausencia de comorbilidad, CACI = 2: comorbilidad baja, CACI ≥ 3: comorbilidad alta; escala TNM de la octava edición de la AJCC; los pacientes clasificados según la “resección” corresponde a pacientes operados.

Tabla 15: Relación de las variables recogidas durante el seguimiento de los pacientes con PDAC según el resultado del modelo iClin, para estudiar su posible aplicación en el pronóstico de la enfermedad.

PDAC Operados						
	< 0	> 0	p-valor	< -0.437	> -0.437	p-valor
Recurrencia (meses)	30.00 [8.00; 32.00]	10.00 [6.00; 22.00]	0.074 ⁺	30.00 [8.00; 32.00]	11.00 [6.00; 23.00]	0.170 ⁺
OS (meses)	39.00 [20.00; 65.00]	23.00 [11.00; 41.00]	0.250 [*]	65.00 [13.00; 95.00]	23.00 [11.00; 41.00]	0.260 ⁺

PDAC No operados						
	< 0	> 0	p-valor	< -0.437	> -0.437	p-valor
PFS (meses)	9.00 [6.00; 14.00]	8.00 [5.00; 14.00]	0.340 ⁺	8.50 [5.50; 14.00]	8.00 [5.00; 14.00]	0.510 ⁺
OS (meses)	13.00 [9.00; 19.00]	8.00 [3.00; 15.00]	0.071 [*]	13.00 [8.00; 18.00]	8.00 [3.00; 15.00]	0.065 ⁺

Notas: se representa el Q2 [Q1; Q3] del tiempo en cada grupo; *: p-valor obtenido de la prueba de Log-Rank; +: p-valor obtenido de la prueba de Gehan-Breslow; PDAC: adenocarcinoma ductal de páncreas; PFS: supervivencia libre de progresión; OS: supervivencia global.



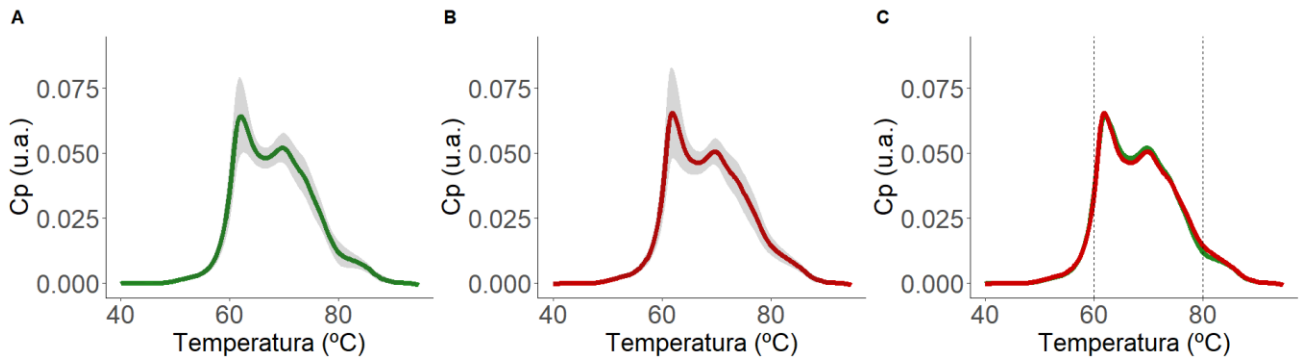
Nota: Estadio de la octava edición de la AJCC.

Figura 30: Relación entre el modelo iClin y variables clínicas recogidas en el grupo de pacientes con PDAC. **A/** Diferencia de la media del modelo iClin según el estadio; **B/** Diferencia de la media del modelo iClin según si los pacientes cumplían los requisitos para operarse o no.

2. Modelo iTLB

El modelo iClin obtenido previamente tuvo una elevada capacidad para diferenciar entre el grupo de controles (pacientes sintomáticos sin diagnóstico de cáncer) y el grupo de pacientes con PDAC. Pero no se observó una relación con el pronóstico de los pacientes. Por ello, se ajustó un segundo modelo (modelo iTLB) a partir de las curvas de termogramas, para ver si, por un lado, tenían también una buena capacidad para diferenciar ambos grupos (controles y PDAC) y, por otro lado, si se mejoraba la relación con el pronóstico de los pacientes con PDAC.

El modelo iTLB de clasificación se obtuvo a partir de los termogramas normalizados de las muestras de suero obtenidas en cada paciente. Se contaba con 706 muestras, de los cuales 325 (46.03%) correspondían al grupo control (pacientes sintomáticos sin diagnóstico de cáncer), y 381 (53.97%) a pacientes con diagnóstico de PDAC. En la Figura 31.A y B se observan las medias y las desviaciones estándar de las curvas de termogramas normalizadas por el área en cada grupo respectivamente. En la Figura 31.C, donde se superponen ambas medias, se marca con líneas discontinuas verticales a 60°C y 80°C, correspondiente a la información que utilizada para entrenar el modelo de clasificación.

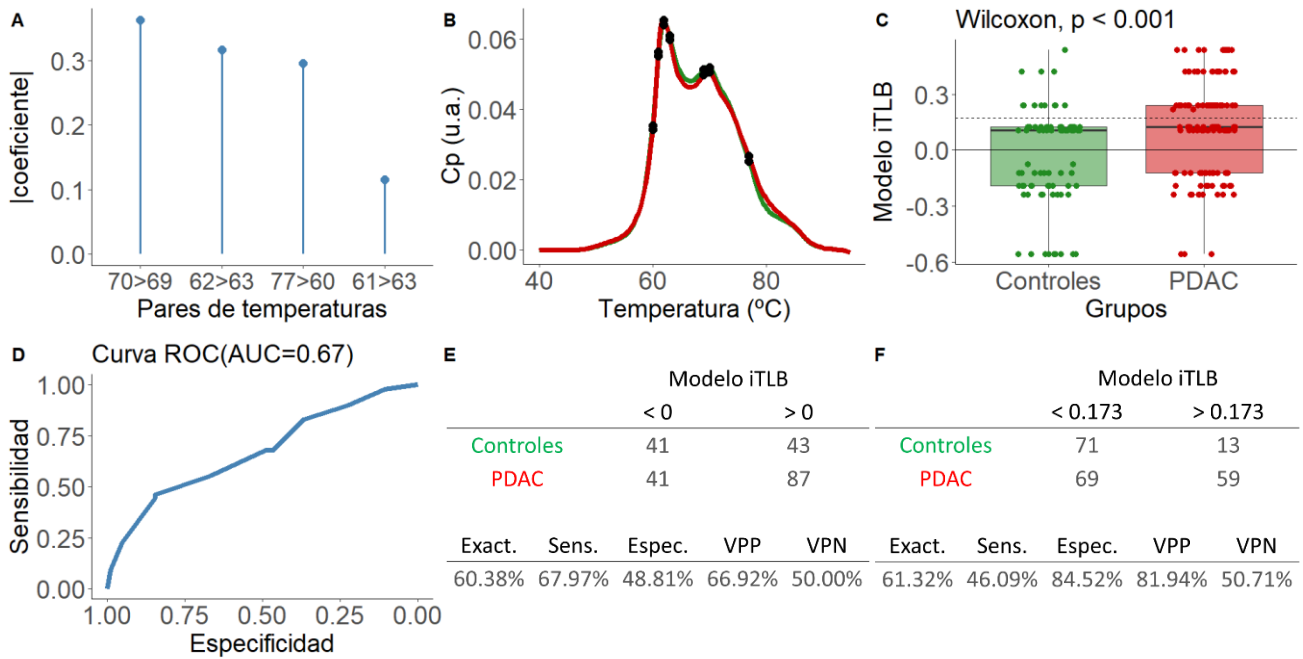


Nota: Cp: capacidad calorífica; u.a.: unidades arbitrarias; PDAC: adenocarcinoma ductal de páncreas.

Figura 31: Representación de las medias de los termogramas normalizados por el área en cada uno de los grupos (**controles** y **PDAC**). El sombreado en gris hace referencia a la media \pm desviación estándar en cada grupo. Además, en la figura **C** se marca con líneas verticales discontinuas las temperaturas de 60°C y 80°C, ya que este rango de temperaturas fue el utilizado para entrenar el modelo de clasificación.

Se obtuvo un modelo iTLB formado por cuatro parejas de temperaturas, las cuales se pueden observar en la Figura 32.A, junto a los coeficientes en valor absoluto asignados a cada uno de ellos. Estas parejas de temperaturas también se pueden ver situadas en las medias de los termogramas de cada grupo en la Figura 32.B. La media de AUC en los grupos de entrenamientos fue de 0.62 (\pm 0.01), y en los grupos de validación fue de 0.59 (\pm 0.03).

Al considerar la respuesta del modelo iTLB como una variable continua, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la mediana del resultado del modelo iTLB entre el grupo control (0.10 [-0.19;0.13]) y el grupo con PDAC (0.13 [-0.12;0.24]) (prueba de Wilcoxon: p-valor < 0.001) (Figura 32.C), con un AUC en el grupo de validación de 0.67 (IC_{95%} = 0.60-0.74) (Figura 32.D). Al comparar los resultados obtenidos utilizando el punto de corte estándar y el punto de corte calculado de Youden de 0.173, en este último caso se observó que la especificidad y el VPP aumentaron considerablemente, aunque disminuyendo la sensibilidad, pero manteniendo prácticamente igual la exactitud y el VPN (Figura 32.E y F).



Notas: Cp: capacidad calorífica; u.a.: unidades arbitrarias; PDAC: adenocarcinoma ductal de páncreas; AUC: área bajo la curva ROC; iTLB: *intelligent Thermal Liquid Biopsy*; Exact: exactitud; Sens: sensibilidad; Espec: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo.

Figura 32: Resultados del modelo iTLB obtenido para diferenciar los termogramas de cada grupo. **A/** Valor absoluto de los coeficientes del modelo iTLB en cada una de las variables predictoras; **B/** Representación de las medias de los termogramas normalizados en cada grupo (**controles** y **PDAC**) y marcado con puntos negros se representa las temperaturas utilizadas en el modelo iTLB; **C/** Diferencia de medianas del modelo iTLB en cada grupo (**controles** y **PDAC**), representando en líneas horizontales el punto de corte estándar (línea continua) y el de Youden (línea discontinua); **D/** Área bajo la curva ROC del modelo iTLB en el grupo de validación; **E/** Arriba: Tabla de contingencia de la predicción en el grupo de validación, usando el punto de corte estándar. Abajo: rendimiento del modelo iTLB; **F/** Arriba: tabla de contingencia de la predicción en el grupo de validación, usando como punto de corte el de Youden. Abajo: resultados del rendimiento del modelo iTLB.

Relación de los resultados del modelo iTLB con variables clínicas

En el modelo iTLB no se observó una capacidad tan elevada para diferenciar a los pacientes controles (enfermos sin diagnóstico de cáncer) de los pacientes con PDAC, a partir de la información de los termogramas, como la obtenida en el modelo iClin. Por ello, se relacionó el modelo iTLB con las variables clínicas recogidas para ver si, sobre todo, el TLB aportaba información sobre el pronóstico de los pacientes con PDAC.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las medianas del modelo iTLB según el IMC en los controles, según la concentración de PCR y según la escala ECOG del estado funcional.

Al considerar la respuesta del modelo iTLB como dicotómica según el punto de corte estándar, se observaron diferencias en la mediana de edad en el grupo de controles, además de una asociación del modelo iTLB con el IMC y con la concentración de PCR, IL-6 e YKL-40.

Al considerar la respuesta del modelo iTLB dicotómica según el punto de corte de Youden, se encontraron de nuevo las diferencias en las medianas de la edad en el grupo control, además de una asociación con las cuatro variables bioquímicas. A diferencia del modelo iClin, en el modelo iTLB se observaron diferencias en las medianas del tiempo en aparecer una recaída en los pacientes operados, y del tiempo hasta el fallecimiento de los pacientes operados y no operados.

Los resultados de las relaciones entre el modelo iTLB y la clínica están en las Tabla 16, Tabla 17, Tabla 18 y Tabla 19. En las Figura 33 y Figura 34 viene representado donde hay significancia estadística.

Tabla 16: Relación de variables clínicas con la respuesta del modelo iTLB como variable continua, en cada grupo (controles y PDAC).

	Controles	p-valor	PDAC	p-valor
Sexo:		0.806		0.960
Masculino	0.01 [-0.19;0.13]		0.13 [-0.12;0.24]	
Femenino	0.10 [-0.19;0.13]		0.13 [-0.12;0.24]	
IMC (kg/m²):		0.003		0.357
< 25	-0.08 [-0.19;0.13]		0.13 [-0.12;0.24]	
≥ 25	0.10 [-0.12;0.22]		0.13 [-0.12;0.24]	
Etnia:				0.572
Caucásica			0.13 [-0.12;0.24]	
No caucásica			0.13 [0.10;0.24]	
Tabaco:		0.059		0.411
No fumador	0.10 [-0.19;0.13]		0.13 [-0.12;0.24]	
Fumador+Exfumador	0.10 [-0.19;0.13]		0.13 [-0.12;0.24]	
Alcohol:		0.343		0.345
No abuso	0.10 [-0.19;0.13]		0.13 [-0.12;0.24]	
Abuso+Exabuso	0.10 [-0.19;0.13]		0.13 [-0.12;0.24]	
CA19.9:		0.204		0.476
≤ 37 kU/L	0.10 [-0.19;0.13]		0.13 [-0.14;0.24]	
> 37 kU/L	0.10 [-0.19;0.24]		0.13 [-0.12;0.24]	
PCR:		<0.001		<0.001
≤ 10 mg/L	0.10 [-0.19;0.13]		0.10 [-0.19;0.24]	
> 10 mg/L	0.24 [-0.12;0.24]		0.24 [0.10;0.24]	
Diabetes:				0.193
No			0.13 [-0.12;0.24]	
Sí			0.13 [-0.12;0.42]	
Caquexia:				0.160
No			0.13 [-0.14;0.24]	
Sí			0.13 [-0.12;0.24]	
ECOG:		0.021		0.035
0	0.10 [-0.19;0.13]		0.13 [-0.19;0.24]	
I-III	0.10 [-0.12;0.24]		0.13 [-0.12;0.24]	
CACI:				0.192
0-2			0.10 [-0.12;0.24]	
≥ 3			0.13 [-0.12;0.24]	
Estadio:				0.829
I-III			0.13 [-0.12;0.24]	
IV			0.13 [-0.12;0.24]	
Requisitos Cirugía:				0.133
No			0.13 [-0.12;0.24]	
Sí			0.13 [-0.12;0.24]	
Resección:				0.213
Completa (R0)			0.13 [0.06;0.24]	
Incompleta (R1)			0.10 [-0.12;0.24]	

Nota: Se representa el Q2 [Q1; Q3] del modelo iTLB; p-valores obtenidos de la prueba de Wilcoxon; PDAC: adenocarcinoma ductal de páncreas; IMC: índice de masa corporal; CA19.9: antígeno carbohidrato 19-9; PCR: proteína C reactiva; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; CACI: índice de comorbilidad de Charlson ajustado por la edad; CACI = 0-1: ausencia de comorbilidad, CACI = 2: comorbilidad baja, CACI ≥ 3: comorbilidad alta; Estadio de la octava edición de la AJCC; Los pacientes clasificados según la "Resección" corresponde a pacientes operados.

Tabla 17: Relación de variables clínicas con la respuesta del modelo iTLB dicotomizada según el punto de corte estándar de cero, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con PDAC.

Modelo iTLB	Controles		p-valor	PDAC		p-valor
	< 0	> 0		< 0	> 0	
Sexo:			0.214			1.000
Masculino	62 (50.00%)	62 (50.00%)		68 (33.01%)	138 (66.99%)	
Femenino	85 (42.29%)	116 (57.71%)		57 (32.57%)	118 (67.43%)	
Edad (años)	59.00 [50.00;69.00]	66.00 [54.25;72.75]	0.002#	69.00 [63.00;73.00]	70.00 [63.00;74.00]	0.288#
IMC (kg/m²):			0.021			0.116
< 25	91 (51.70%)	85 (48.30%)		85 (36.02%)	151 (63.98%)	
≥ 25	55 (38.19%)	89 (61.81%)		38 (27.54%)	100 (72.46%)	
Etnia:						0.556*
Caucásica				104 (33.55%)	206 (66.45%)	
No caucásica				3 (%)	10 (%)	
Tabaco:			0.397			1.000
No fumador	61 (48.80%)	64 (51.20%)		43 (33.08%)	87 (66.92%)	
Fumador+Exfumador	80 (43.24%)	105 (56.76%)		81 (33.33%)	162 (66.67%)	
Alcohol:			1.000			0.399
No abuso	97 (44.50%)	121 (55.50%)		98 (34.27%)	188 (65.73%)	
Abuso+Exabuso	32 (45.07%)	39 (54.93%)		24 (28.57%)	60 (71.43%)	
Ln CA19.9 (kU/L)	2.08 [1.39;2.71]	2.25 [1.61;3.00]	0.115#	6.03 (2.89)	6.15 (2.73)	0.718#
CA19.9:			0.774			0.594
≤ 37 kU/L	136 (45.64%)	162 (54.36%)		22 (36.67%)	38 (63.33%)	
> 37 kU/L	11 (40.74%)	16 (59.26%)		84 (32.06%)	178 (67.94%)	
Ln PCR (mg/L)	0.15 [-0.55;1.11]	0.83 [-0.08;1.71]	<0.001#	1.39 [1.10;2.48]	2.44 [1.17;3.64]	<0.001#
PCR:			0.058			<0.001
≤ 10 mg/L	135 (47.37%)	150 (52.63%)		67 (42.95%)	89 (57.05%)	
> 10 mg/L	12 (30.00%)	28 (70.00%)		26 (21.85%)	93 (78.15%)	
Ln IL-6 (ng/L)	0.52 [-0.08;1.25]	1.00 [0.39;1.89]	<0.001#	1.25 [0.67;2.09]	1.84 [1.16;2.62]	<0.001#
Ln YKL-40 (µg/L)	4.35 [4.00;4.83]	4.65 [4.13;5.22]	<0.001#	4.60 [3.98;5.04]	4.99 [4.49;5.54]	<0.001#
Diabetes:						0.686
No				94 (33.57%)	186 (66.43%)	
Sí				31 (30.69%)	70 (69.31%)	
Caquexia:						0.356
No				37 (37.00%)	63 (63.00%)	
Sí				67 (31.02%)	149 (68.98%)	
ECOG:			0.090			0.261
0	132 (47.31%)	147 (52.69%)		49 (37.12%)	83 (62.88%)	
I-III	15 (32.61%)	31 (67.39%)		64 (30.62%)	145 (69.38%)	
CACI:						0.112
0-2				44 (39.29%)	68 (60.71%)	
≥ 3				63 (29.86%)	148 (70.14%)	
Estadio:						0.483
I-III				55 (30.90%)	123 (69.10%)	
IV				70 (34.83%)	131 (65.17%)	
Requisitos Cirugía:						0.670
No				64 (31.68%)	138 (68.32%)	
Sí				61 (34.27%)	117 (65.73%)	
Resección:						0.665
Completa (R0)				6 (25.00%)	18 (75.00%)	
Incompleta (R1)				34 (32.08%)	72 (67.92%)	

Notas: se representa el número (%) de pacientes en variables categóricas, mientras que se representa la media (desviación estándar) o el Q2 [Q1; Q3], según la distribución paramétrica o no; p-valores obtenidos mediante la prueba de χ^2 con la corrección de Yates; *: p-valor obtenido mediante la prueba de Fisher; #: p-valor obtenido mediante la prueba de T de Student o de Wilcoxon, según su distribución paramétrica o no; iTLB: *intelligence Thermal Liquid Biopsy*; PDAC: adenocarcinoma ductal de páncreas; IMC: índice de masa corporal; CA19.9: marcador tumoral antígeno carbohidrato 19-9; IL-6: interleucina 6; PCR: proteína C reactiva; YKL-40: proteína 1 similar a quitinasa-3; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; CACI: índice de comorbilidad de Charlson ajustado por la edad; CACI = 0-1: ausencia de comorbilidad, CACI = 2: comorbilidad baja, CACI ≥ 3: comorbilidad alta; Estadio de la octava edición de la AJCC; los pacientes clasificados según la "Resección" corresponde a pacientes operados.

Tabla 18: Relación de variables clínicas con la respuesta del modelo iTLB dicotomizada según el punto de corte calculado de Youden, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con PDAC.

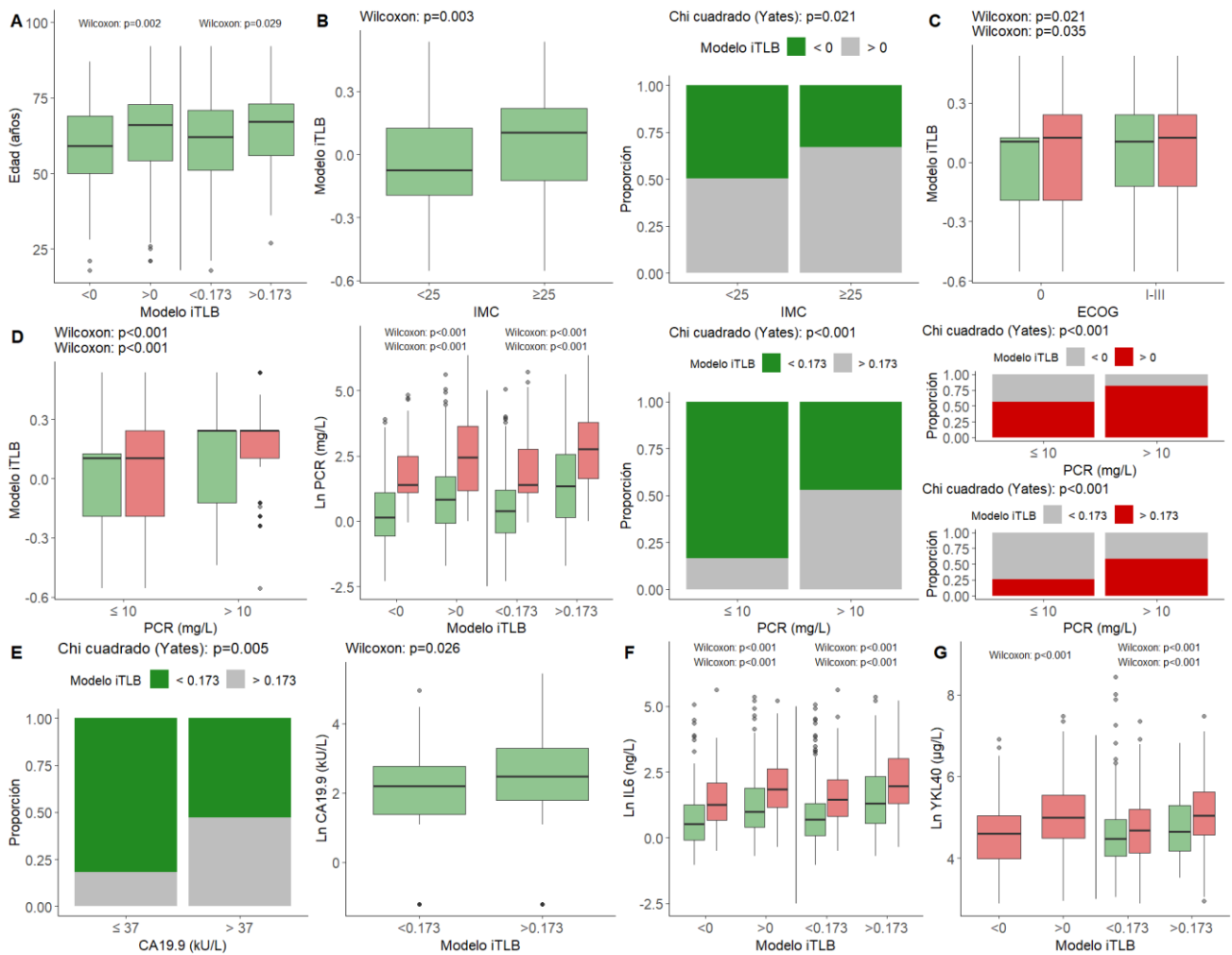
Modelo iTLB	Controles		p-valor	PDAC		p-valor
	< 0.173	> 0.173		< 0.173	> 0.173	
Sexo:			1.000			1.000
Masculino	98 (38.28%)	158 (61.72%)		122 (59.22%)	84 (40.78%)	
Femenino	26 (37.68%)	43 (62.32%)		104 (59.43%)	71 (40.57%)	
Edad (años)	62.00 [51.00;71.00]	67.00 [56.00;73.00]	0.029#	69.00 [63.25;73.75]	69.00 [62.50;74.00]	0.935#
IMC (kg/m²):			0.079			1.000
< 25	146 (82.95%)	30 (17.05%)		140 (59.32%)	96 (40.68%)	
≥ 25	107 (74.30%)	37 (25.69%)		82 (59.42%)	56 (40.58%)	
Etnia:						0.571*
Caucásica				192 (61.94%)	118 (38.06%)	
No caucásica				7 (53.85%)	6 (46.15%)	
Tabaco:			0.104			0.350
No fumador	105 (84.00%)	20 (16.00%)		73 (56.15%)	57 (43.85%)	
Fumador+Exfumador	140 (75.68%)	45 (24.32%)		150 (51.19%)	93 (38.27%)	
Alcohol:			0.564			0.178
No abuso	169 (77.52%)	49 (22.48%)		165 (57.69%)	121 (42.31%)	
Abuso+Exabuso	58 (81.69%)	13 (18.31%)		56 (66.67%)	28 (33.33%)	
Ln CA19.9 (kU/L)	2.20 [1.39;2.77]	2.48 [1.79;3.30]	0.026#	6.01 (2.80)	6.26 (2.76)	0.428#
CA19.9:			0.005			0.599
≤ 37 kU/L	241 (80.87%)	57 (19.13%)		39 (65.00%)	21 (35.00%)	
> 37 kU/L	15 (55.56%)	12 (44.44%)		158 (60.31%)	104 (39.69%)	
Ln PCR (mg/L)	0.40 [-0.43;1.21]	1.34 [0.15;2.56]	<0.001#	1.39 [1.10;2.77]	2.77 [1.63;3.78]	<0.001#
PCR:			<0.001			<0.001
≤ 10 mg/L	239 (83.86%)	46 (16.14%)		114 (73.08%)	42 (26.92%)	
> 10 mg/L	17 (42.50%)	23 (57.5%)		55 (46.22%)	64 (53.78%)	
Ln IL-6 (ng/L)	0.69 [0.09;1.30]	1.31 [0.56;2.33]	<0.001#	1.46 [0.81;2.22]	1.97 [1.29;3.01]	<0.001#
Ln YKL-40 (µg/L)	4.47 [4.04;4.95]	4.64 [4.18;5.28]	0.080#	4.68 [4.13;5.20]	5.04 [4.57;5.62]	<0.001#
Diabetes:						0.201
No				172 (61.43%)	108 (38.57%)	
Sí				54 (53.47%)	47 (46.53%)	
Caquexia:						0.440
No				65 (65.00%)	35 (35.00%)	
Sí				129 (59.72%)	87 (40.28%)	
ECOG:			0.065			0.170
0	225 (80.64%)	54 (19.35%)		84 (63.64%)	48 (36.36%)	
I-III	31 (67.39%)	15 (32.61%)		116 (55.50%)	93 (44.50%)	
CACI:						0.401
0-2				73 (65.18%)	39 (34.82%)	
≥ 3				126 (59.72%)	85 (40.28%)	
Estadio:						0.368
I-III				110 (61.80%)	68 (38.20%)	
IV				114 (56.72%)	87 (43.28%)	
Requisitos Cirugía:						0.137
No				112 (55.45%)	90 (44.55%)	
Sí				113 (63.48%)	65 (36.52%)	
Resección:						0.391
Completa (R0)				13 (54.17%)	11 (45.83%)	
Incompleta (R1)				70 (66.04%)	36 (33.96%)	

Notas: se representa el número (%) de pacientes en variables categóricas, mientras que se representa la media (desviación estándar) o el Q2 [Q1; Q3], según la distribución paramétrica o no; p-valores obtenidos mediante la prueba de χ^2 con la corrección de Yates; *: p-valor obtenido mediante la prueba de Fisher; #: p-valor obtenido mediante la prueba de T de Student o de Wilcoxon, según su distribución paramétrica o no; iTLB: *intelligence Thermal Liquid Biopsy*; PDAC: adenocarcinoma ductal de páncreas; IMC: índice de masa corporal; CA19.9: marcador tumoral antígeno carbohidrato 19-9; IL-6: interleucina 6; PCR: proteína C reactiva; YKL-40: proteína 1 similar a quitinasa-3; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; CACI: índice de comorbilidad de Charlson ajustado por la edad; CACI = 0-1: ausencia de comorbilidad, CACI = 2: comorbilidad baja, CACI ≥ 3: comorbilidad alta; Estadio según la octava edición de la AJCC; Los pacientes clasificados según la "Resección" corresponde a pacientes operados.

Tabla 19: Relación de las variables recogidas durante el seguimiento de los pacientes con PDAC según el resultado del modelo iTLB, para ver su posible aplicación en el pronóstico de la enfermedad.

PDAC Operados						
	< 0	> 0	p-valor	< 0.173	> 0.173	p-valor
Recurrencia (meses)	15.00 [7.00; 32.00]	12.00 [6.00; 28.00]	0.200 ⁺	15.00 [7.00; 32.00]	8.00 [5.00; 17.00]	0.006*
OS (meses)	28.00 [16.00; 49.00]	16.00 [10.00; 33.00]	0.015*	23.00 [12.00; 42.00]	13.50 [10.00; 31.00]	0.041*
PDAC No operados						
	< 0	> 0	p-valor	< 0.173	> 0.173	p-valor
PFS (meses)	8.00 [5.00; 14.00]	8.00 [3.00; 12.00]	0.370 ⁺	8.00 [5.00; 13.00]	7.00 [3.00; 12.00]	0.140 ⁺
OS (meses)	10.00 [5.00; 16.00]	6.00 [3.00; 13.00]	0.007*	9.00 [4.00; 14.00]	6.00 [3.00; 13.00]	0.032*

Notas: Se representa el tiempo como el Q2 [Q1; Q3]; *: p-valor obtenido de la prueba de Log-Rank; †: p-valor obtenido de la prueba de Gehan-Breslow; iTLB: *intelligence Thermal Liquid Biopsy*; PDAC: adenocarcinoma ductal de páncreas; PFS: supervivencia libre de progresión; OS: supervivencia global.



Nota: PDAC: adenocarcinoma ductal de páncreas; iTLB: *intelligence Thermal Liquid Biopsy*; IMC: índice de masa corporal; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; CA19.9: antígeno carbohidrato 19-9; PCR: proteína C reactiva; Estadio de la octava edición de la AJCC.

Figura 33: Relación estadísticamente significativa entre el modelo iTLB y variables clínicas recogidas en el grupo **control** y en el grupo de pacientes con **PDAC**. **A/** Diferencia de mediana de la edad según el modelo iTLB dicotomizado por el punto de corte estándar (izquierda) y el de Youden (derecha); **B/** A la izquierda, diferencia de la mediana del modelo iTLB según el IMC (kg/m²). A la derecha, asociación entre el modelo iTLB y el IMC (kg/m²); **C/** Diferencia de mediana del modelo iTLB según la escala ECOG; **D/** De izquierda a derecha: diferencia de la mediana del modelo iTLB según la concentración de PCR. Diferencia de la media del logaritmo natural de la concentración de PCR según el modelo iTLB dicotomizado por el punto de corte estándar (izquierda) y el de Youden (derecha); Asociación entre la concentración de PCR y el modelo iTLB dicotomizado por el punto de Youden, en el grupo control. Asociación entre la concentración de PCR y el modelo iTLB dicotomizado por el punto estándar (arriba) y el de Youden (abajo), en el grupo PDAC; **E/** A la izquierda, asociación entre el modelo iTLB dicotomizado según el punto de corte de Youden y la concentración de CA19.9; A la derecha, diferencia de la media del logaritmo natural de la concentración de CA19.9 según el modelo iTLB dicotomizado por el punto de corte de Youden; **F/** Diferencia de la mediana del logaritmo natural de IL-6 según el modelo iTLB por el punto de corte estándar (derecha) y el de Youden (izquierda); **G/** Diferencia de la mediana del logaritmo natural de YKL-40 según el modelo iTLB según el punto de corte estándar (derecha) y el de Youden (izquierda).

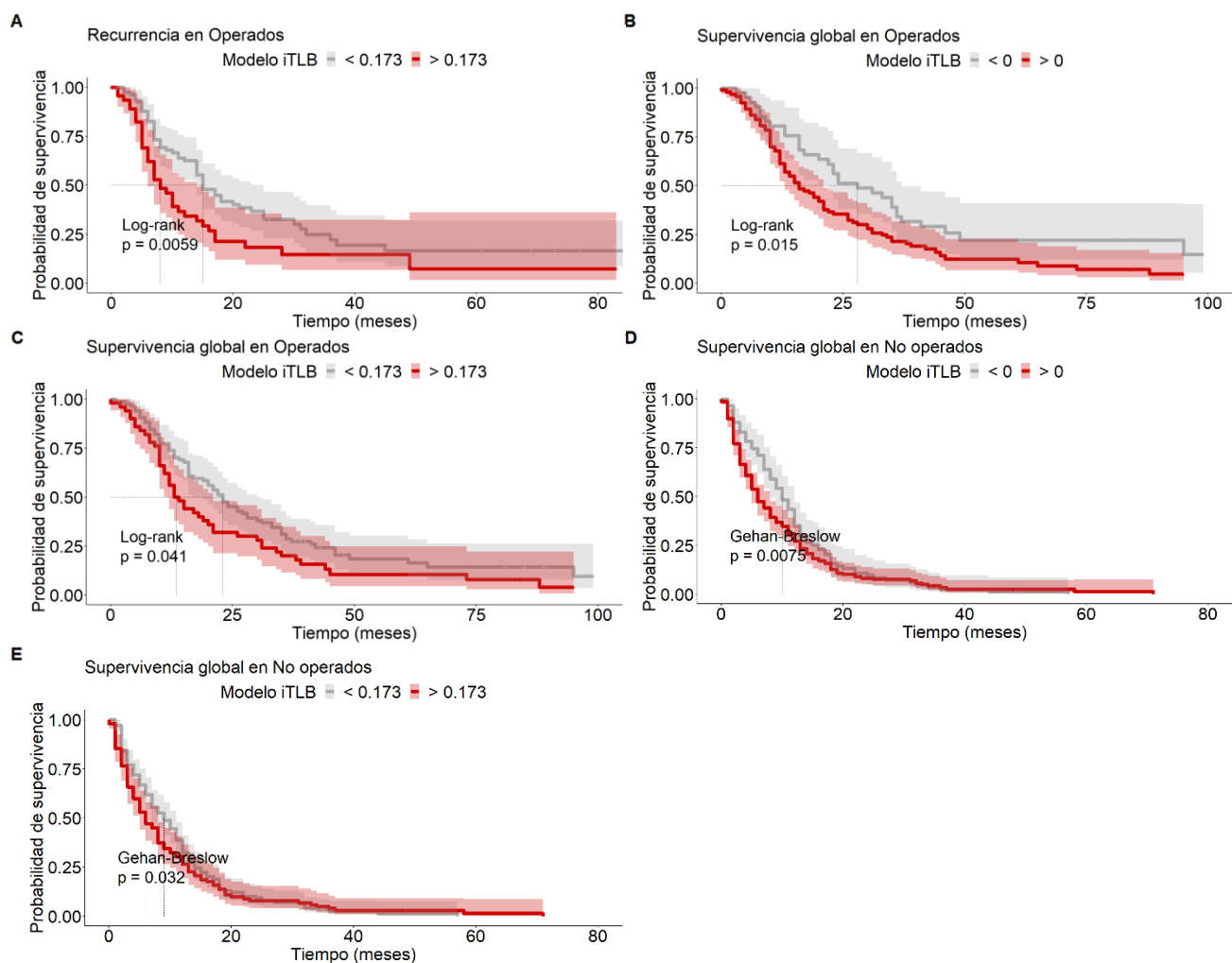


Figura 34: Asociación del modelo iTLB con las variables relacionadas con el pronóstico de los pacientes con PDAC. **A/** Diferencia en la mediana del tiempo hasta la recaída en los pacientes operados, según el modelo iTLB dicotomizado por el punto de corte de Youden; **B/** Diferencia de la mediana del tiempo de OS de los pacientes operados, según el modelo iTLB dicotomizado por el punto de corte estándar; **C/** Diferencia de la mediana del tiempo de OS de los pacientes operados, según el modelo iTLB dicotomizado por el punto de Youden; **D/** Diferencia de la mediana del tiempo de OS de los pacientes no operados, según el modelo iTLB dicotomizado por el punto de corte estándar; **E/** Diferencia de la mediana del tiempo de OS de los pacientes no operados, según el modelo iTLB dicotomizado por el punto de Youden.

La relación entre el modelo iTLB y el tiempo de recurrencia y de supervivencia global daba una idea de su posible aplicación en el pronóstico de los pacientes con PDAC. Al relacionar las variables bioquímicas de uso clínico recogidas en los pacientes con PDAC (CA19.9, PCR), también se observó una asociación entre la recaída y la OS con la concentración de CA19.9 en los pacientes operados, y entre la PFS y la OS con la concentración de PCR en los pacientes no operados (**TablaX**).

Tabla 20: Relación de las variables recogidas durante el seguimiento de los pacientes con PDAC según la concentración de las variables bioquímicas de uso clínico, para ver su posible aplicación en el pronóstico de la enfermedad.

PDAC Operados						
	CA19.9 (kU/L)		p-valor	PCR (mg/L)		p-valor
	≤ 37	> 37		≤ 10	> 10	
Recurrencia (meses)	18.00 [11.00; 32.00]	10.00 [6.00; 23.00]	0.005*	14.00 [7.00; 31.00]	8.00 [5.00; 22.00]	0.210*
OS (meses)	31.00 [20.00; 65.00]	16.00 [10.00; 33.00]	0.003*	23.00 [12.00; 46.00]	15.00 [10.00; 31.00]	0.130*

PDAC No operados						
	CA19.9 (kU/L)		p-valor	PCR (mg/L)		p-valor
	≤ 37	> 37		≤ 10	> 10	
PFS (meses)	8.00 [5.00; 14.00]	8.00 [5.00; 14.00]	0.570[†]	8.00 [5.00; 13.00]	7.00 [3.00; 12.00]	<0.001*
OS (meses)	11.00 [3.00; 17.00]	8.00 [3.00; 15.00]	0.450[†]	14.00 [8.00; 20.00]	4.00 [2.00; 8.00]	<0.001*

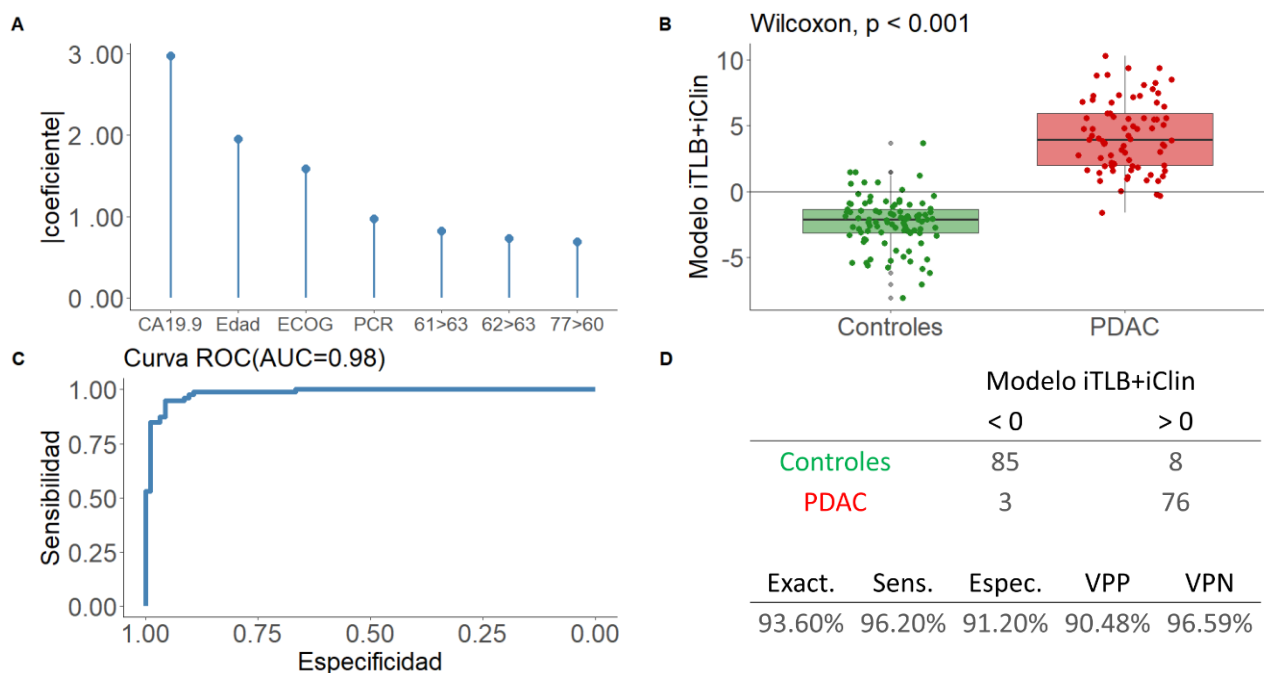
Notas: Se representa el tiempo como el Q2 [Q1; Q3]; *: p-valor obtenido de la prueba de Log-Rank; †: p-valor obtenido de la prueba de Gehan-Breslow; CA19.9: marcador tumoral antígeno carbohidrato 19-9; PCR: proteína C reactiva; PFS: supervivencia libre de progresión; OS: supervivencia global.

3. Modelo iTLB+iClin

Con el objetivo de obtener un modelo que, por un lado, nos diferencie tan bien como el modelo iClin a los pacientes controles (asintomáticos sin diagnóstico de cáncer) y a los pacientes con PDAC, y que por otro lado, se relacione con el pronóstico de los pacientes como el modelo iTLB, se ajustó un tercer modelo mixto (modelo iTLB+iClin), a partir de 573 pacientes (56.54% controles, 324/573), que eran los que tenían información de las variables predictoras: las variables clínicas del primer modelo (edad, escala del estado funcional ECOG, concentraciones en sangre periférica de CA19.9 y PCR) y las cuatro parejas de temperaturas frecuentes (61>63, 62>63, 70>69, 77>60) del segundo modelo.

Se obtuvo un modelo iTLB+iClin formado por siete variables predictoras, cuatro variables clínicas y tres parejas de temperaturas (la pareja 70>69 fue eliminada), donde CA19.9 tuvo el mayor coeficiente en valor absoluto (Figura 35.A). La media del AUC en los grupos de entrenamiento fue de 0.96 (\pm 0.01), y en los grupos de validación de 0.95 (\pm 0.02).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la mediana del resultado del modelo iTLB+iClin entre el grupo control y el grupo de pacientes con PDAC (-2.14 [-3.15; -1.34] y 3.95 [1.97;5.92] respectivamente. Prueba de Wilcoxon: p-valor <0.001) (Figura 35.B), con un AUC de 0.98 (IC_{95%} = 0.97-1.00) en el grupo de validación (Figura 35.C). Al comparar los resultados obtenidos usando el punto de corte estándar de cero y el calculado de Youden de -0.032, se observaron los mismos resultados en la clasificación de los pacientes, obteniendo unos porcentajes de exactitud, sensibilidad, especificidad, VPP y VPN superior al 90% en todos los casos (Figura 35.D).



Notas: Las variables que aparecen en la figura **A** son el logaritmo natural de CA19.9 y de PCR. Mientras que la edad está dicotomizada en $\leq / >$ a 50 años, y la escala del estado funcional ECOG en 0/1-3; iTLB: *intelligence Thermal Liquid Biopsy*; CA19.9: marcador tumoral antígeno carbohidrato 19-9; PCR: proteína C reactiva; PDAC: adenocarcinoma ductal de páncreas; AUC: área bajo la curva ROC; Exact: exactitud; Sens: sensibilidad; Espec: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo.

Figura 35: Resultados del modelo iTLB+iClin obtenido para diferenciar a los pacientes controles (sin diagnóstico de cáncer) de los pacientes con PDAC. **A/** Valor absoluto de los coeficientes del modelo iTLB+iClin en cada una de las variables predictoras; **B/** Diferencia de medianas de la respuesta del modelo iTLB+iClin en el grupo de validación (**controles** y **PDAC**), representando con una línea horizontal continua el punto de corte estándar, y discontinua el de Youden; **C/** Área bajo la curva ROC del modelo iTLB+iClin en el grupo de validación; **D/** En la parte superior aparece la tabla de contingencia de la predicción en el grupo de validación. En la parte inferior viene indicado los resultados del rendimiento del modelo iTLB+iClin.

Relación de los resultados del modelo iTLB+iClin con variables clínicas

Se obtuvo un modelo iTLB+iClin con una alta capacidad para diferenciar entre el grupo control (pacientes sin diagnóstico de cáncer) y el grupo de pacientes con PDAC. Para comprobar si se puede utilizar para saber el pronóstico de los pacientes con PDAC, se relacionó con las variables clínicas, al igual que se realizó anteriormente.

Se observó diferencias en las medias del modelo iTLB+iClin en función del estadio y en función de si los pacientes fueron candidatos para operarse o no (Figura 36.A y B).

Además, se observó de nuevo una diferencia según el hábito tabáquico en el grupo control. Al considerar el modelo iTLB+iClin como una variable dicotómica, existen diferencias en las concentraciones de IL-6 e YKL-40. Las relaciones con el tabaco y con las concentraciones de estos biomarcadores son como las encontradas en el modelo iClin.

Parecido a lo obtenido en el modelo iTLB, en el modelo iTLB+iClin se encontraron diferencias en las medianas del tiempo hasta el fallecimiento de los pacientes (OS), siendo estadísticamente significativo en los pacientes no operados (Figura 36.C y D).

Los resultados de las relaciones entre el modelo iTLB+iClin y la clínica están en las Tabla 21, Tabla 22 y Tabla 23.

Tabla 21: Relación de variables clínicas con el modelo iTLB+iClin como variable continua, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con PDAC.

	Controles	p-valor	PDAC	p-valor
Sexo:		0.903		0.050
Masculino	-2.62 [-4.34; -1.12]		3.95 (3.35)	
Femenino	-2.44 [-3.80; -1.48]		3.16 (2.93)	
IMC (kg/m²):		0.596		0.433
< 25	-2.45 [-3.99; -1.25]		3.44 (3.10)	
≥ 25	-2.61 [-3.94; -1.47]		3.79 (3.31)	
Etnia:				0.900
Caucásica			3.57 (3.12)	
No caucásica			3.38 (4.38)	
Tabaco:		0.036		0.800
No fumador	-2.83 [-4.51; -1.68]		3.63 (3.07)	
Fumador+Exfumador	-2.32 [-3.66; -1.21]		3.52 (3.23)	
Alcohol:		0.628		0.592
No abuso	-2.76 (2.22)		3.49 (3.06)	
Abuso+Exabuso	-2.63 (1.86)		3.77 (3.51)	
Diabetes:				0.352
No			3.45 (3.30)	
Sí			3.85 (2.79)	
Caquexia:				0.830
No			3.62 (3.23)	
Sí			3.52 (3.08)	
CACI:				0.257
0-2			3.21 (3.23)	
≥ 3			3.71 (3.14)	
Estadio:				<0.001
I-III			2.34 (2.58)	
IV			4.57 (3.26)	
Requisitos Cirugía:				<0.001
No			4.37 (3.35)	
Sí			2.36 (2.45)	
Resección:				0.419
Completa (R0)			1.83 (2.05)	
Incompleta (R1)			2.50 (2.52)	

Nota: se representa la media (desviación estándar) o el Q2 [Q1; Q3] de la respuesta del modelo iTLB+iClin según al carácter paramétrico o no del mismo; p-valores obtenidos de la prueba de T de Student o de Wilcoxon, según el carácter paramétrico o no; iTLB: *intelligence Thermal Liquid Biopsy*; PDAC: adenocarcinoma ductal de páncreas; IMC: índice de masa corporal; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; CACI: índice de comorbilidad de Charlson ajustado por la edad; CACI = 0-1: ausencia de comorbilidad, CACI = 2: comorbilidad baja, CACI ≥ 3: comorbilidad alta; estadio de la octava edición de la AJCC; Los pacientes clasificados según la "Resección" corresponde a pacientes operados.

Tabla 22: Relación de variables clínicas con el modelo iTLB+iClin dicotomizada según el punto de corte estándar, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con PDAC.

Modelo iTLB+iClin	Controles		p-valor	PDAC		p-valor
	< 0	> 0		< 0	> 0	
Sexo:			1.000			0.981
Masculino	117 (94.35%)	7 (5.65%)		15 (12.00%)	110 (88.00%)	
Femenino	188 (94.00%)	12 (6.00%)		16 (12.90%)	108 (87.10%)	
IMC (kg/m²):			1.000			1.000
< 25	165 (94.29%)	10 (5.71%)		21 (12.73%)	144 (87.27%)	
≥ 25	135 (93.75%)	9 (6.25%)		10 (11.90%)	74 (88.10%)	
Etnia:						0.311*
Caucásica				29 (12.08%)	211 (87.92%)	
No caucásica				2 (22.22%)	7 (77.78%)	
Tabaco:			0.393			0.626
No fumador	119 (95.97%)	5 (4.03%)		9 (10.47%)	77 (89.53%)	
Fumador+Exfumador	172 (92.97%)	13 (7.03%)		22 (13.50%)	141 (86.50%)	
Alcohol:			0.576*			0.899
No abuso	202 (93.09%)	15 (6.91%)		23 (12.04%)	168 (87.96%)	
Abuso+Exabuso	68 (95.77%)	3 (4.23%)		8 (13.79%)	50 (86.21%)	
Ln IL-6 (ng/L)	0.75 [0.14;1.47]	1.74 [1.08;3.02]	<0.001#	0.99 [0.66;1.44]	1.70 [0.93;2.49]	0.002#
Ln YKL-40 (µg/L)	4.48 [4.04;4.93]	5.39 [4.96;5.98]	<0.001#	4.79 [4.41;5.24]	4.87 [4.28;5.44]	0.758#
Diabetes:						0.096
No				27 (14.84%)	155 (85.16%)	
Sí				4 (5.97%)	63 (94.03%)	
Caquexia:						0.217
No				13 (16.67%)	65 (83.33%)	
Sí				17 (10.18%)	150 (89.82%)	
CACI:						0.427
0-2				12 (15.58%)	65 (84.41%)	
≥ 3				19 (11.05%)	153 (88.95%)	
Estadio:						0.186
I-III				18 (15.93%)	95 (84.07%)	
IV				13 (9.56%)	123 (90.44%)	
Requisitos Cirugía:						0.452
No				16 (10.81%)	132 (89.19%)	
Sí				15 (14.85%)	86 (85.15%)	
Resección:						0.341*
Completa (R0)				2 (25.00%)	6 (75.00%)	
Incompleta (R1)				8 (13.56%)	51 (86.44%)	

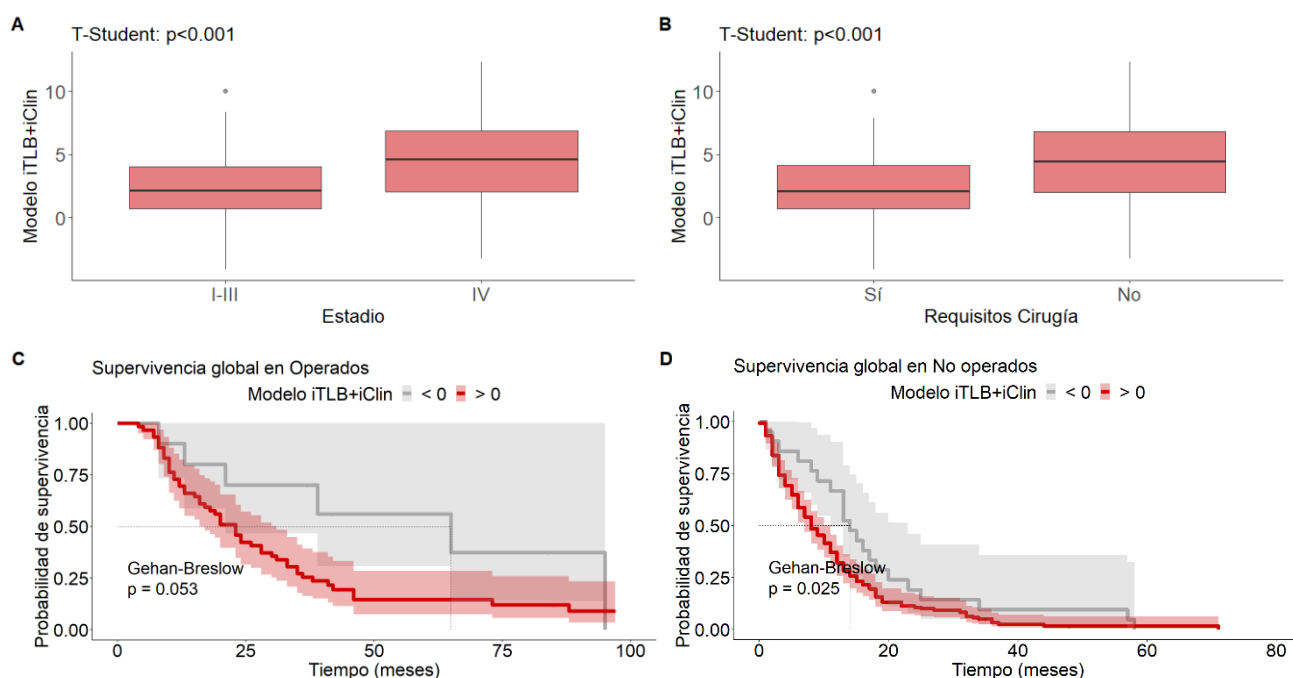
Notas: En variable categóricas se representa el número (%) de pacientes en cada categoría, mientras que en variables continuas se representa el Q2 [Q1; Q3] debido a su distribución no paramétrica; p-valores obtenidos mediante la prueba de χ^2 con la corrección de Yates; *: p-valor obtenido mediante la prueba de Fisher; #: p-valor obtenido mediante la prueba de Wilcoxon, debido a su distribución no paramétrica; iTLB: *intelligence Thermal Liquid Biopsy*; IMC: índice de masa corporal; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; CACI: índice de comorbilidad de Charlson ajustado por la edad; CACI = 0-1: ausencia de comorbilidad, CACI = 2: comorbilidad baja, CACI ≥ 3: comorbilidad alta; estadio de la octava edición de la AJCC; Los pacientes clasificados según la "Resección" corresponde a pacientes operados.

Tabla 23: Relación de las variables recogidas durante el seguimiento de los pacientes con PDAC según el resultado del modelo iTLB+iClin, para ver su posible aplicación en el pronóstico de la enfermedad.

PDAC Operados			
	< 0	> 0	p-valor
Recurrencia (meses)	30.00 [10.00; 32.00]	10.00 [6.00; 22.00]	0.064
OS (meses)	65.00 [21.00; 95.00]	23.00 [11.00; 38.00]	0.053

PDAC No operados			
	< 0	> 0	p-valor
PFS (meses)	10.00 [6.00; 15.00]	8.00 [5.00; 14.00]	0.240
OS (meses)	14.00 [9.00; 10.00]	8.00 [3.00; 15.00]	0.025

Notas: Se representa el tiempo como el Q2 [Q1; Q3]; *: p-valor obtenido de la prueba de Log-Rank; †: p-valor obtenido de la prueba de Gehan-Breslow; iTLB: *intelligence Thermal Liquid Biopsy*; PDAC: adenocarcinoma ductal de páncreas; PFS: supervivencia libre de progresión; OS: supervivencia global.



Notas: Estadio de la octava edición de la AJCC; iTLB: *intelligence Thermal Liquid Biopsy*.

Figura 36: Relación entre el modelo iTLB+iClin y variables clínicas recogidas en el grupo de pacientes con PDAC. A/ Diferencias de medias del modelo iTLB+iClin según el estadio; B/ Diferencia de medias del modelo iTLB+iClin según si cumple los criterios para operarse o no; C/ Diferencia de la mediana del tiempo de supervivencia global de los pacientes operados, según el modelo iTLB+iClin dicotomizado por el punto de corte estándar; D/ Diferencia de la mediana del tiempo de supervivencia global de los pacientes no operados, según el modelo iTLB+iClin dicotomizado por el punto de corte estándar.

Capacidad del modelo iTLB+iClin de diagnosticar estadios tempranos de PDAC

Se obtuvo un modelo iTLB+iClin con una muy buena capacidad para diagnosticar a pacientes con PDAC y diferenciarlos de un grupo control sintomático, además de dar información del pronóstico de los pacientes con PDAC respecto a su OS. En este punto se intentó ir un paso más y analizar la capacidad de diagnosticar estadios tempranos de PDAC (estadios = I-II). Esto sería muy interesante porque uno de los mayores retos en cáncer de páncreas es buscar herramientas de diagnóstico de estadios tempranos, evitando de esta manera que los pacientes lleguen a estadios avanzados sin un tratamiento. Por lo tanto, sería idóneo tener una herramienta de diagnóstico de pacientes con PDAC, donde no se pierda demasiada sensibilidad en estadios tempranos respecto a estadios avanzados.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la mediana del modelo iTLB+iClin entre el grupo control, con los pacientes con estadio=I-II y con los pacientes con estadio = III-IV (pruebas de Wilcoxon con la corrección de Bonferroni: p-valor < 0.001) (Tabla 24 y Figura 37.A). El modelo iTLB+iClin consiguió alcanzar una sensibilidad casi del 90% y un AUC de 0.96 (IC_{95%} = 0.95-0.98), para el diagnóstico de pacientes en estadios avanzados (estadios = III-IV). Esta sensibilidad se redujo al casi 80%, al igual que se redujo el AUC a 0.93 (IC_{95%} = 0.89-0.98), para el diagnóstico de pacientes con estadios tempranos (estadios = I-II) (Tabla 25). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas AUC (prueba de DeLong: p-valor = 0.218) (Figura 37.B).

Tabla 24: Resultado del modelo iTLB+iClin según los estadios (I-II, III-IV).

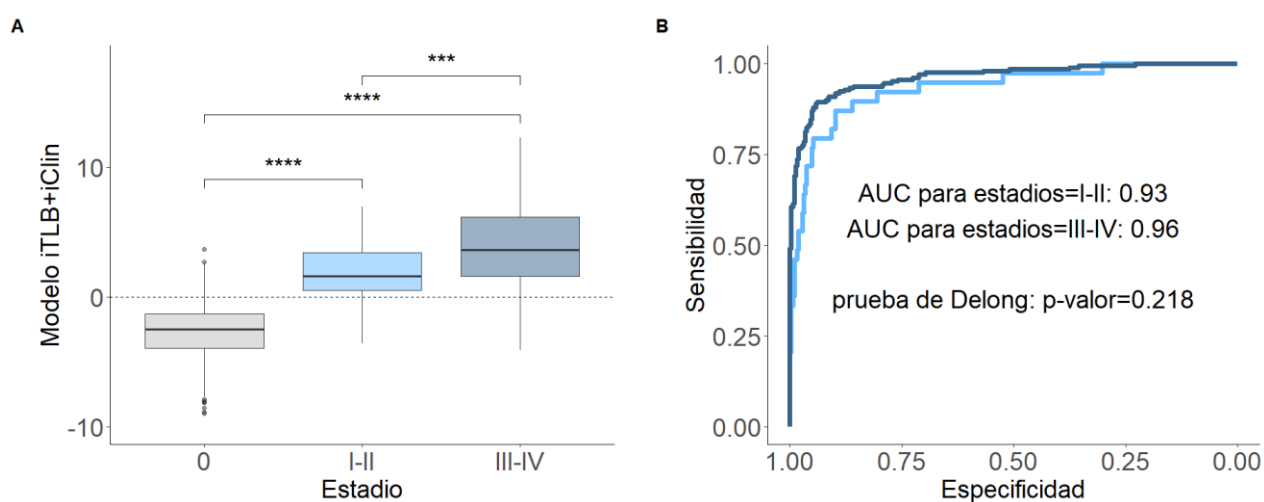
	Modelo iTLB+iClin	p-valor
Controles	-2.47 [-3.94; -1.31]	<0.001
PDAC:		
Estadios = I-II	1.61 [0.53;3.43]	
Estadios = III-IV	3.64 [1.62;6.18]	

Notas: Estadios de la octava edición de la AJCC; p-valor obtenido de la prueba de Kruskal-Wallis. Los p-valores de la prueba de Wilcoxon con la corrección de Bonferroni son: Controles vs estadios= I-II, p-valor < **0.001**; Controles vs estadios= III-IV, p-valor < **0.001**; estadios = I-II vs estadios = III-IV, p-valor < **0.001**; iTLB: *intelligence Thermal Liquid Biopsy*.

Tabla 25: Resultados del modelo iTLB+iClin dicotomizado, relacionados con los estadios (I-II, III-IV).

	Modelo iTLB+iClin	
	< 0	> 0
Controles	305	19
PDAC:		
Estadios = I-II	8	31
Estadios = III-IV	23	187
	Sensibilidad	Especificidad
Estadios = I-II	79.49%	94.13%
Estadios = III-IV	89.05%	94.13%

Notas: Estadios de la octava edición de la AJCC; iTLB: *intelligence Thermal Liquid Biopsy*.



Notas: ****: p-valor < **0.0001**; ***: p-valor < **0.001**; los p-valores de la figura A se obtienen mediante las pruebas de Wilcoxon con la corrección de Bonferroni; Estadios de la octava edición de la AJCC; iTLB: *intelligence Thermal Liquid Biopsy*.

Figura 37: **A/** Diferencia de medianas del modelo iTLB+iClin según los estadios (I-II vs III-IV); **B/** Área bajo la curva ROC del modelo iTLB+iClin para diferenciar a los pacientes con **estadios = I-II**, y **estadios = III-IV**.

Aplicación de los tres modelos en los pacientes de la cohorte MICA con diagnóstico de cáncer

La cohorte de pacientes MICA, formada por pacientes sintomáticos, fueron seguidos durante todo el periodo del estudio y se registró si habían recibido u diagnóstico de cáncer. Los pacientes con diagnóstico de cáncer durante el seguimiento fueron excluidos para constituir el grupo control y ajustar los modelos iClin, iTLB y iTLB+iClin.

Una vez obtenidos los tres modelos, se quiso dar un paso más allá y aplicar dichos modelos sobre los pacientes de la cohorte MICA con diagnóstico de cáncer (n = 58) para estudiar si alguno de ellos podría ayudar en el diagnóstico precoz del cáncer en general. Para tener los mismos criterios, se utilizó el punto de corte estándar de cero en los tres casos para considerar si el modelo clasificaba como paciente con cáncer (> 0) o no (< 0).

El modelo iClin y el modelo iTLB+iClin clasificaron por encima del punto de corte estándar al 15.52% y al 18.52% de los pacientes de la cohorte MICA respectivamente. Mientras que el modelo iTLB clasificó como pacientes con cáncer al 55.56% de los pacientes (Figura 38).

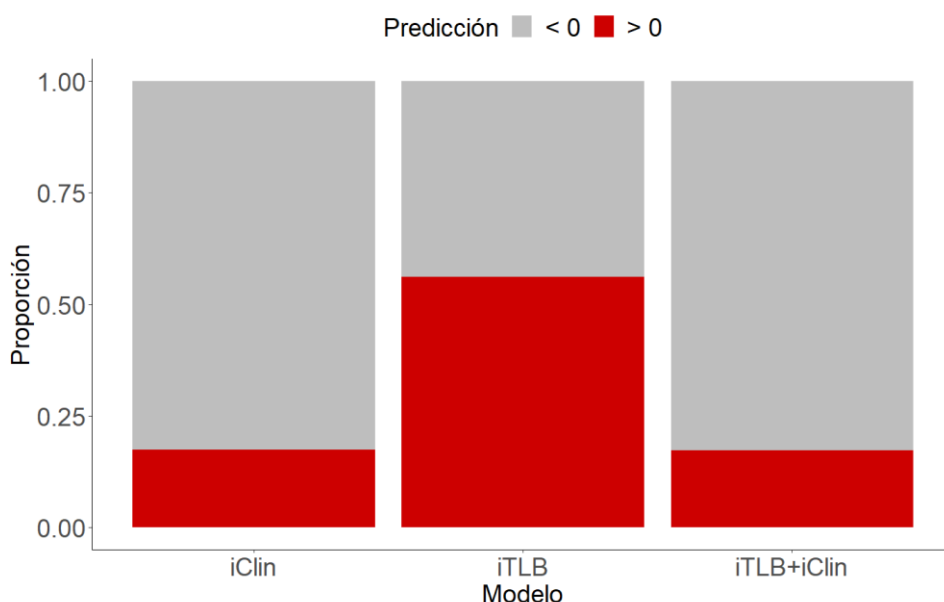


Figura 38: Clasificación, según cada uno de los tres modelos obtenidos, de los pacientes de la cohorte MICA con diagnóstica de cáncer durante su seguimiento.

DISCUSIÓN

El cáncer de páncreas es uno de los cánceres más mortales y con peor evolución. Estos pacientes suelen ser diagnosticados en estadios avanzados. Uno de los principales biomarcadores más utilizado en los pacientes con PDAC es el marcador tumoral CA19.9, destacando más por uso en el seguimiento de la enfermedad, que, como herramienta diagnóstica, debido a su valor predictivo negativo tan bajo. Por ello, el cáncer de páncreas es uno de los escenarios donde sería interesante buscar nuevas herramientas para el manejo de estos pacientes. La experiencia nos dice que el descubrimiento de nuevos biomarcadores en sangre periférica es cada vez más difícil. Por esta razón, se deberían plantear nuevos enfoques experimentales con una base física diferente. Es aquí donde aparece el TLB como posible nueva herramienta para el manejo de los pacientes con PDAC. El TLB es el término acuñado por nuestro grupo como el uso del DSC con muestras biológicas. La diferencia en el exceso de capacidad calorífica específica medida en nuestra muestra, respecto a una solución de referencia, en función de la temperatura, se conoce como termograma.

Pero uno de los mayores retos que nos plantea el TLB hoy en día es la obtención de una metodología estándar para analizar las curvas de termogramas y poder diferenciar los diferentes estados (normalmente controles y pacientes enfermos). Varios grupos han aportado sus propuestas con metodologías cada vez más sofisticadas gracias al avance e incorporación de la bioinformática, además de facilitar su aplicación e interpretación. Previamente en el apartado **Desarrollo de un modelo de aprendizaje automatizado para el diagnóstico y pronóstico del cáncer de páncreas mediante muestras de suero analizadas por TLB** se ha mostrado una nueva metodología desarrollada por el grupo para clasificar a los pacientes según la forma de los termogramas obtenidos de muestras de suero, usando como ejemplo un grupo sano (asintomático) y un grupo con adenocarcinoma ductal de páncreas (mayoritariamente en estadios avanzados). Los prometedores resultados abrieron el camino a probar la metodología propuesta en otros estudios con mayor tamaño muestral y que se aproximen más a la situación clínica, para estar cada vez más cerca de su aplicación. Por esta razón, en este estudio se ha comprobado la aplicación de la metodología de análisis del TLB en una población más grande, en torno a 700 pacientes, divididos en un grupo de pacientes diagnosticados con PDAC, y un segundo grupo de pacientes controles sintomáticos. El motivo del uso de este grupo control es para acercarse más a la situación que tienen los clínicos en sus consultas cuando realizan un diagnóstico diferencial de cáncer de páncreas en pacientes sintomáticos. Además, gracias a que se ha utilizado muestras de pacientes de dos estudios muy bien caracterizados (MICA como controles sintomáticos y BIOPAC como pacientes con cáncer de páncreas, ambos de Dinamarca), se ha demostrado que la metodología de análisis de termogramas propuesta por el grupo también puede estar formado únicamente por variables clínicas, o incluso ajustar un modelo mixto formado por datos clínicos y variables relacionadas con el termograma.

Para realizar estos análisis se ha contado con 706 pacientes divididos en dos grupos balanceados. El primer grupo estaba formado por 325 pacientes del estudio MICA, considerados controles sintomáticos, pero sin cáncer. El segundo grupo estaba formado por 381 pacientes del estudio BIOPAC, diagnosticados de PDAC. Dentro de cada grupo, había mucha homogeneidad entre la edad, el sexo y el IMC. Pero se observó que el grupo con PDAC tenían una mediana de edad mayor al grupo control, una mayor proporción de pacientes de sexo masculino, y una mayor proporción de pacientes con IMC < 25 kg/m². Estas diferencias se pueden justificar ya que la edad se considera un factor de riesgo no modificable del PDAC (117) y que la incidencia reportada por GLOBOCAN indica que es mayor en el sexo masculino. Respecto al IMC, por un lado, la obesidad es un factor de riesgo para padecer PDAC, pero también se considera la pérdida de peso como uno de los síntomas característicos de los pacientes con PDAC. (117) Este último caso es el que se encontró en estos pacientes con PDAC. Respecto a las variables relacionadas con hábitos de vida como el tabaco o el abuso de alcohol, aunque también se considere factores de riesgo, (118) en esta población de estudio no se ha encontrado diferencias entre el grupo control y el grupo de pacientes con PDAC. Podría estar relacionado con el hecho de que los controles son individuos sintomáticos, no exentos de enfermedad para los cuales estos factores de riesgo pueden estar presentes del mismo modo que en los pacientes con PDAC, ya que no son factores de riesgo exclusivos para el cáncer de páncreas. Una de las escalas utilizadas para la categorización de los pacientes en ambos grupos (controles y PDAC) ha sido la escala del estado funcional ECOG, donde se ha encontrado una mayor proporción de pacientes con ECOG = 1-3 en el grupo con PDAC. También se han encontrado diferencias estadísticamente significativas de la concentración de las variables bioquímicas entre ambos grupos. Estas diferencias justifican que, aunque el grupo control sea sintomático, existen variables clínicas y bioquímicas donde hay diferencias estadísticamente significativas entre los controles y los pacientes con PDAC.

Dentro del grupo con PDAC, la mayoría tenían una comorbilidad aumentada (CACI ≥ 3), un estadio = IV, diagnóstico de diabetes, y caquexia, no cumplían los requisitos para operarse y, si se operaron, la resección fue sobre todo incompleta (R1). La mayoría de estas características están relacionadas entre sí y se debe al diagnóstico de estos pacientes en estadios avanzados, sobre todo con metástasis. Esta descripción de pacientes es razonable con lo que se ha comentado anteriormente sobre el diagnóstico tardío de PDAC que normalmente se produce.

Con esta base de datos, se han ajustado tres modelos usando la misma metodología, pero cambiando las variables predictoras. Esta metodología fue propuesta anteriormente para analizar las curvas de termogramas. Pero en este estudio se ha demostrado la versatilidad que tiene para poder incluir además variables clínicas. Los tres modelos estaban entrenados con grupos balanceados. Y en los tres casos se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la mediana del resultado de cada modelo en el grupo control y en el grupo con PDAC (prueba de Wilcoxon: p-valores <0.001), aunque luego se encontraron diferencias en las AUC de las curvas ROC.

El primer modelo obtenido, llamado modelo iClin, estaba formado por únicamente cuatro variables predictoras: edad, escala ECOG del estado funcional y las concentraciones en sangre periférica de CA19.9 y PCR. En un primer momento se introdujeron estas cuatro variables más la concentración de IL-6 y de YKL-40, bajo un primer filtro de decisión clínica y, posteriormente se comprobó que existían diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Posteriormente, las dos últimas variables fueron eliminadas del modelo final, al realizar el ajuste del modelo con penalizaciones tipo Lasso. El CA19.9 es el principal marcador tumoral del cáncer de páncreas, aunque de manera aislada no parece tener la suficiente sensibilidad para usarlo en el diagnóstico. El resto de los biomarcadores están relacionados con la respuesta inflamatoria e inmunitaria. La PCR es muy utilizada en clínica, mientras que la IL-6 algo menos, y la proteína YKL-40 sólo está en fase de investigación. En estas variables bioquímicas, se realizó un preprocesado antes de introducirlo en el modelo, con el objetivo de evitar variables muy correlacionadas, además de centrar y escalar. El modelo iClin ajustado en el 70% de los 574 pacientes (56.62% del grupo control), posteriormente es validado en el 30% restante, obteniendo un AUC de 0.98 (IC_{95%} = 0.97-1.00), indicando la alta capacidad del modelo para diferenciar entre ambos grupos con una exactitud, sensibilidad, especificidad, VPP y VPN en torno al 90%. Al relacionar el modelo iClin con las variables recogidas en ambos grupos, se observó que la media del valor del modelo iClin era mayor en estadios avanzados según el estadio de la enfermedad, y en los pacientes no candidatos a operación. Estos resultados están mutuamente relacionados, ya que los pacientes no candidatos a operación son los que tiene estadios más avanzados.

A pesar de que el modelo iClin tenía una muy buena capacidad para diferenciar entre ambos grupos, no se observó una asociación con el pronóstico de los pacientes. Si se tiene en cuenta las variables bioquímicas de manera individual, sí existe una relación entre CA19.9 y PCR con el pronóstico de los pacientes con PDAC. La relación de la combinación de biomarcadores de inflamación con la progresión, ya se ha publicado previamente en pacientes procedentes del estudio BIOPAC. (64) Debido a que el pronóstico de los pacientes depende del estadio, de la concentración de biomarcadores como CA19.9 y PCR, (64) cabía esperar que este modelo, que tan bien diferenciaba a pacientes con PDAC de pacientes sintomáticos, también pudiera dar información del pronóstico de los pacientes con PDAC en cuanto a recaída, PFS y OS. Pero esto último no debe menospreciar los buenos resultados obtenidos para hacer un diagnóstico diferencial con los pacientes con PDAC utilizando una única herramienta, la cual se podría considerar como una calculadora, ya que únicamente haría falta introducir los valores de edad, ECOG y concentraciones de CA19.9 y PCR.

El segundo modelo obtenido, el modelo iTLB, formado únicamente por variables relacionadas con la forma de los termogramas de muestras de suero, está formado también por cuatro variables predictoras (parejas de temperaturas). El modelo se ajustó en el 70% de los 706 pacientes (46.03% de controles), y se validó con el 30% restante, obteniendo un AUC de 0.67 (IC_{95%} = 0.60-0.74). Esta disminución en el AUC, comparada con la obtenida previamente (al comparar sanos asintomáticos con pacientes con PDAC en el apartado **Desarrollo de un modelo de aprendizaje automatizado para el diagnóstico y pronóstico del cáncer de páncreas mediante muestras de suero analizadas por TLB**), era esperada porque ahora se ha utilizado como grupo control a pacientes sintomáticos. Esto refuerza la idea de que los cambios detectados en suero por TLB son menores al comparar con pacientes sintomáticos, que con pacientes asintomáticos. A nivel diagnóstico se estaría clasificando a la mayoría de los pacientes con un perfil de termograma compatible con enfermedad. Esto se comprueba cuando se compara las medias de las curvas de termogramas de ambos grupos, ya que tal como se puede observar, existen diferencias muy pequeñas entre estos pacientes PDAC y los pacientes sintomáticos. Hay que recordar que el termograma informa de cambios fenomenológicos durante una enfermedad sin identificar qué tipos de macromoléculas o metabolitos son los responsables de esta. La cohorte de pacientes estudiada podría ser la que se encontrase durante la asistencia clínica, y, por lo tanto, supone un mayor reto el hecho de obtener un modelo que pueda diferenciar ambos grupos de pacientes. Este tipo de resultados donde las diferencias en los termogramas son pequeñas en ambos grupos, ya se ha reportado en otros estudios. (36) Al relacionar el modelo iTLB con las variables clínicas, se observa una relación con la edad y el IMC, pero sólo en el grupo control. Estos resultados llevan a pensar que hoy en día no existe ningún estudio sobre los cambios en los termogramas según la edad y el IMC, por lo que sería muy recomendable realizarlas. Pero es de esperar que a medida que avanza la edad, se produzcan cambios en el organismo (algunos patológicos y otros fisiológicos) con un reflejo en el torrente sanguíneo, posiblemente detectados con el TLB. En cuanto a las relaciones encontradas con los biomarcadores en sangre periférica (CA19.9, PCR, IL-6 e YKL-40) indican que los falsos positivos tienden a tener mayores concentraciones de estos biomarcadores, mientras que los falsos negativos tienen menores concentraciones. Esto da una idea de que el TLB está reflejando lo que ocurre a nivel del

torrente sanguíneo y es por ello que detecta como positivos aquellos en los que hay más concentración de biomarcadores y como negativos, aquellas muestras en las que la concentración es menor.

A diferencia de lo encontrado en el modelo iClin, en el modelo iTLB existe una relación con el pronóstico de los pacientes con PDAC, de manera que los pacientes con un valor en el modelo iTLB por debajo del punto de corte tenían mejor pronóstico. Por lo tanto, el modelo iTLB, aunque no sería el mejor para diferenciar entre los dos grupos de pacientes, las relaciones observadas con variables clínicas dan una idea de que podría resultar interesante introducir dichas variables clínicas en el modelo. Esto se refuerza con el hecho de que se encontraran relaciones con variables que informan del pronóstico, relaciones que no se observan a través del modelo en el que sólo se tienen en cuenta las variables clínicas (modelo iClin).

Así pues, con el objetivo de obtener un modelo con la capacidad diagnóstica del modelo iClin junto con capacidad para predecir el pronóstico de los pacientes con cáncer de páncreas como ocurre en el modelo iTLB, se obtuvo un tercer modelo mixto, llamado modelo iTLB+iClin, entrenado en el 70% de los 573 pacientes (56.74% controles). En este modelo se introdujeron las variables más frecuentemente seleccionadas en los modelos anteriores, es decir, se introdujeron ocho variables, que posteriormente se seleccionaron siete de ellas, quedando eliminada una pareja de temperaturas. El modelo ajustado con únicamente siete variables predictoras se validó en el 30% restante, obteniendo un AUC de 0.98 (IC_{95%} = 0.97-1.00), es decir, con una capacidad diagnóstica tan buena como el modelo iClin. Pero además se observó una relación con el estadio de la enfermedad y con los pacientes que cumplen los requisitos para ser operados, trasladándose esa relación con el pronóstico de los pacientes con PDAC. Es decir, el modelo iTLB+iClin, el cual tiene una elevada capacidad diagnóstica, también se podría utilizar como herramienta de pronóstico, ya que se observa una menor supervivencia global en los pacientes con un resultado por debajo del punto de corte.

Después, debido a que el cáncer de páncreas necesita de nuevas herramientas de diagnóstico en estadios tempranos de la enfermedad, se ha diferenciado la capacidad diagnóstica del modelo iTLB+iClin según el estadio (estadios = I-II como estadio temprano, y estadios = III-IV como estadio avanzado). Como cabía esperar, dado que los estadios precoces son más difíciles de diagnosticar por su menor diferencia con los grupos controles, se ha obtenido un AUC menor para los estadios tempranos (AUC = 0.93, IC_{95%} = 0.89-0.98), pero no existiendo diferencias estadísticamente significativas con el AUC obtenido en estadios avanzados (AUC = 0.96, IC_{95%} = 0.95-0.98, prueba de DeLong: p-valor = 0.218).

Al comparar estos resultados con los reportados del estudio BIOPAC donde en cada uno de ellos utilizaban varios biomarcadores como miRNA, paneles de proteínas, DNA libre de células, a veces en combinación con CA19.9, y comparan las AUC obtenidas en pacientes con estadio temprano respecto a estadio avanzado, como se ha realizado en este estudio, las AUC obtenidas para diagnosticar pacientes en estadios tempranos varían desde 0.84 a 0.96. (51,52,114,115) En el mejor de los casos se utilizó un panel de 29 proteínas y se comparó con un grupo control sano asintomático. El estudio que obtuvo un AUC de 0.84 utilizó como control a pacientes con pancreatitis crónica. Con todo esto, se quiere decir que se ha obtenido resultados parecidos a los publicados en cuanto a AUC para diagnosticar pacientes con PDAC, utilizando como grupo control a pacientes sintomáticos y aplicando un modelo con solamente siete variables predictoras. Aun así, sería recomendable futuros estudios usando como grupo control a pacientes con patologías pancreáticas no neoplásicas, para mejorar el valor diagnóstico del modelo iTLB+iClin al estudiar población de riesgo de patología pancreática, pero sin observarse todavía patología tumoral. De esta forma, este modelo se podría implementar en clínica dentro de la consulta de patología pancreática.

Por último, se aplicó los tres modelos ajustados sobre la cohorte de pacientes MICA que tuvieron un diagnóstico de cáncer durante el seguimiento (n = 58). Estos pacientes fueron excluidos del análisis de los modelos. Se observó que los modelos iClin y iTLB+iClin obtuvieron resultados parecidos, clasificando como patológico menos de un 20% de los pacientes. Esto se puede justificar porque las variables predictoras con mayor peso del modelo mixto iTLB+iClin son las variables del modelo iClin. En cambio, el modelo iTLB clasificó como patológico a más del 55% de los pacientes. Esto por un lado da una idea de la elevada sensibilidad de la TLB y su menor especificidad (ya que estos pacientes tuvieron diagnóstico de cualquier tipo de cáncer, no solo de PDAC). Por otro lado, este resultado indica que la TLB es un reflejo de todo lo que hay en sangre periférica, incluido los biomarcadores del modelo iClin, pero además aporta información de otras biomoléculas. Para saber qué proteínas son las responsables de estos cambios en la TLB, hacen falta de otras técnicas proteómicas, ya que la TLB no proporciona este tipo de información.

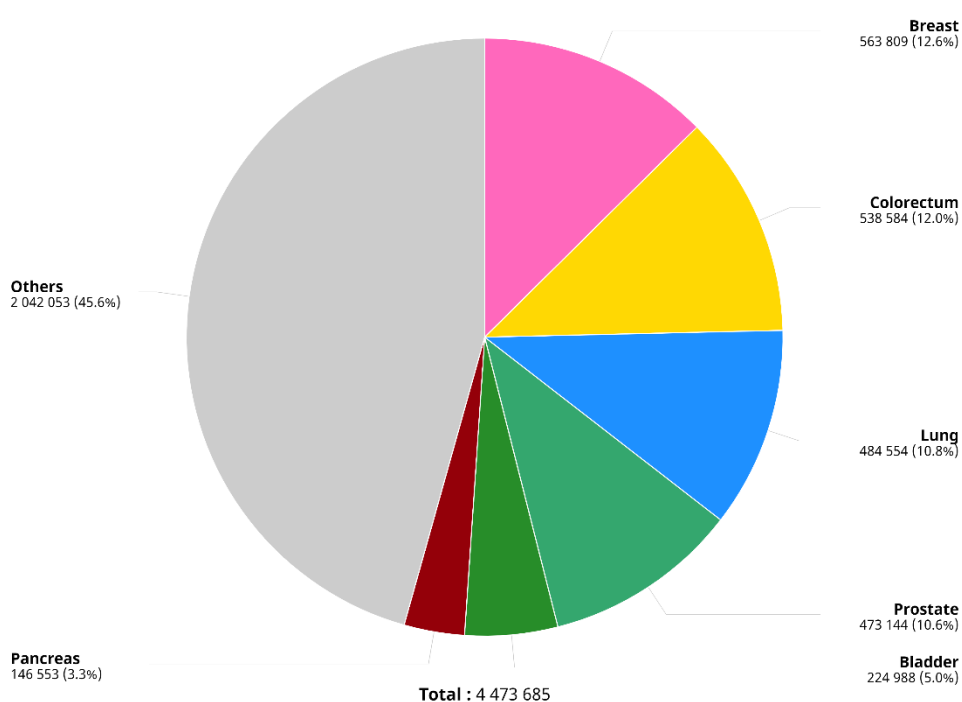
Por lo tanto, la TLB es una técnica muy sensible que nos proporciona una imagen del proteoma y sus interacciones, aunque no informa de forma concreta sobre la identidad de las proteínas responsables de los cambios producidos en los termogramas. Por ello, sería muy interesante la combinación de la espectrometría de masas junto con la TLB para saber las proteínas responsables de los cambios en los perfiles de los termogramas.

Aportación de la TLB en el diagnóstico temprano del CCR y en la búsqueda de nuevos biomarcadores junto con la espectrometría de masas

INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) es uno de los cánceres más frecuentes (Figura 39), cuya incidencia aumenta con la edad. (119) Además, el envejecimiento suele ir acompañado de una inflamación crónica. (120,121) Dicha inflamación es una de las características primarias asociadas con cáncer, (122–124) de manera que se ha descrito una relación entre la inflamación crónica, medida por biomarcadores circulantes inflamatorios, y una mayor incidencia de cáncer, incluido el CCR. (125) El biomarcador de inflamación más utilizado es la proteína C-reactiva (PCR). Esta proteína es producida principalmente por los hepatocitos, (126) mientras que otros biomarcadores circulantes de inflamación, como interleucina-6 (IL-6) y proteína 1 similar a quitinasa-3 (CHI3L1, también llamada YKL-40), son secretados por células inflamatorias, estromales y cancerosas. (127,128) La IL-6 y la YKL40 plasmáticas elevadas se asocian con una menor supervivencia global en pacientes con CCR metastásico. (58,129–131)

Absolute numbers, Incidence, Both sexes, in 2022 Europe



Cancer TODAY | IARC - <https://gco.iarc.who.int/today>
Data version : Globocan 2022
© All Rights Reserved 2024



Notas: Imagen recogida de GLOBOCAN (*Global Cancer Observatory*) a fecha 22 de febrero del 2024.

Figura 39: Gráfico de incidencias de los cánceres más frecuentes en Europa, en ambos sexos.

La mortalidad y morbilidad del CCR han descendido gracias a la aplicación de los programas de cribado poblacional. (74) Esto ha demostrado que el diagnóstico temprano mejora el pronóstico de estos pacientes, debido a que el tratamiento mediante cirugía en pacientes en estadios iniciales suele llegar a ser curativo. La clave para un diagnóstico temprano exitoso de CCR es realizar un examen físico completo. Además, la dieta, la medicación y los antecedentes médicos, quirúrgicos y psicológicos del paciente pueden aportar información valiosa durante el examen médico, y algunos están estrechamente relacionados con el CCR (como la anemia, la hematoquecia, la pérdida de peso involuntaria, los antecedentes familiares de CCR o la enfermedad inflamatoria intestinal). En un diagnóstico diferencial se deben incluir la diverticulosis, las hemorroides, las infecciones intestinales, la enfermedad inflamatoria intestinal y otros tumores intestinales (linfoma, carcinoide). (132)

Debido a la complejidad del diagnóstico de CCR, se están haciendo grandes esfuerzos para desarrollar o identificar nuevos biomarcadores no invasivos (o mínimamente invasivos, como los procedentes de una muestra de suero) para mejorar su diagnóstico, centrándose en diferenciar los estadios tempranos, donde los síntomas son menores y menos específicos y donde la respuesta al tratamiento quirúrgico tiene mejor pronóstico.

En el ámbito clínico se dispone del antígeno carcinoembrionario (CEA), un marcador tumoral que suele encontrarse en elevada concentración en suero en los pacientes con CCR, pero también en otras patologías y otros tipos de cánceres. A pesar de su baja especificidad, es muy utilizado en el seguimiento de los pacientes con CCR, ya que su concentración está relacionada con la masa tumoral y la variación de CEA en el tiempo ofrece información valiosa sobre la respuesta de los pacientes al tratamiento. Uno de los inconvenientes de este biomarcador es su elevación en los pacientes fumadores. Otra de las pruebas que se realiza ante la sospecha de un paciente con CCR es la cuantificación de sangre oculta en heces (SOH). A pesar de ser también la prueba inicial en el cribado poblacional, tiene limitaciones, ya que la única confirmación de un positivo en esta prueba es la realización de una colonoscopia, la cual es más invasiva y que supone mayores riesgos. La determinación de SOH también puede dar positivo en pacientes con hemorroides, divertículos, ante la toma de medicamentos, (133) etc., es decir, cualquier otra causa que provoque sangrado y cuyo origen no sea necesariamente un pólipo o un CCR.

Por lo tanto, se dispone de varias pruebas donde el porcentaje de falsos positivos para el diagnóstico de CCR suele ser elevado, lo que dificulta el manejo de estos pacientes. La búsqueda de nuevas herramientas que ayuden al diagnóstico y al manejo de estos pacientes es necesaria. Es aquí donde la biopsia líquida térmica (TLB) podría ayudar a mejorar el diagnóstico como herramienta complementaria. Además, como el termograma de una muestra de suero es el resultado de todas las proteínas y macromoléculas que están presentes en sangre periférica, además de sus interacciones entre ellas, se podría buscar una nueva aplicación de la TLB. Es decir, se podrían generar grupos de pacientes según el patrón del termograma y realizar estudios de proteómica y comparar las proteínas obtenidas en cada grupo. Aunque no es habitual, no sería la primera vez que se utiliza la técnica del DSC junto a la espectrometría de masas. (33)

La proteómica basada en espectrometría de masas (MS, *mass spectrometry*) se ha convertido en una tecnología fundamental para dilucidar las funciones biológicas de las proteínas a gran escala. (134) Al preparar las muestras para el análisis proteómico a nivel de péptidos (proteómica ascendente), a menudo es necesario concentrar péptidos y eliminar contaminantes. (135) Uno de los métodos más comúnmente utilizados en la preparación de muestras de proteómica basada en MS es la extracción en fase sólida reversa (SPE, *solid-phase extraction*), (136,137) en la que los péptidos se unen a una fase estacionaria, generalmente C18 o una resina de tipo mixto, permitiendo la eliminación de sales y contaminantes y, al mismo tiempo, la concentración de la muestra. Los *StageTips* de un solo uso son una implementación ampliamente utilizada para SPE, ya que sus pequeños volúmenes muertos permiten el procesamiento de cantidades de microgramos de proteínas. (136,138) Los *StageTips* también pueden acomodar una variedad de fases estacionarias, ampliando su aplicación al fraccionamiento de péptidos o para aumentar la flexibilidad en los pasos de lavado. Por ejemplo, se puede utilizar un intercambio catiónico fuerte en modo mixto y un material de fase reversa, lo que permite la eliminación de contaminantes como lípidos de muestras derivadas de plasma o el fraccionamiento de péptidos. (137–140) Además, el formato del *StageTip* a menudo se incorpora a otros flujos de trabajo de proteómica, como en el protocolo *in-StageTip* en el que las muestras se lisan y digieren directamente dentro de los *StageTips*, (138) o, en el caso de los flujos de trabajo de fosfoproteómica, para capturar y retener utilizando cuentas para el enriquecimiento de péptidos. (141–144) También se ha descrito un dispositivo (*Spin96*) que se puede fabricar rápidamente utilizando impresoras 3D ampliamente disponibles y diseñadas para acomodar hasta 96 *StageTips* simultáneamente, (145) donde han aplicado el dispositivo *Spin96* al análisis de plasma/suero humano. Los archivos del diseño completo del *Spin96* están a disposición de la comunidad científica de forma gratuita, lo que permite la producción local del dispositivo.

En el apartado **Transformación del diagnóstico de PDAC: análisis comparativo integral de biomarcadores clínicos, TLB y enfoques integrados** se ha mostrado la importancia de utilizar una correcta cohorte como grupo control. Al utilizar un grupo sintomático sin enfermedad se reducen las diferencias con los pacientes con cáncer, sobre todo con aquellos en estadio temprano. El uso de estos controles sintomáticos supone un mayor reto a la hora de buscar nuevas herramientas que ayuden en el diagnóstico, pero es obvio que esta aproximación se acerca mucho más a las situaciones en que se encuentran los clínicos en sus consultas, lo que facilitaría una mejor aplicación en un futuro.

También, en el mismo estudio, se ha puesto de manifiesto la versatilidad de la metodología propuesta basada en algoritmos de aprendizaje automatizado, para incluir variables clínicas, además de su aplicación en el pronóstico de los pacientes.

Por estas razones, en este estudio se propuso utilizar de nuevo la cohorte de controles sintomáticos MICA, pero frente a una cohorte de pacientes diagnosticados de CCR, como es el caso del estudio REBECCA de Dinamarca, cohorte abierta cuyo objetivo es la búsqueda de nuevos biomarcadores en CCR para su diagnóstico y pronóstico. Aplicando una estrategia parecida a la del apartado **Transformación del diagnóstico de PDAC: análisis comparativo integral de biomarcadores clínicos, TLB y enfoques integrados**, se propusieron como **objetivos**:

1. Obtener un modelo iClin, basado en variables clínicas, y un modelo iTLB+iClin, para valorar si la introducción de la TLB podía mejorar el diagnóstico de los pacientes con CCR, sobre todo en los estadios tempranos.
2. Asociar los modelos obtenidos con las variables clínicas para la búsqueda de las causas de los falsos negativos y positivos, además de las variables relacionadas con el pronóstico de los pacientes con CCR.
3. A partir de grupos de pacientes generados mediante el modelo iTLB, realizar estudios de proteómica para la búsqueda de nuevos biomarcadores para el diagnóstico o pronóstico de los pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos

Se han analizado las muestras de pacientes procedentes de dos estudios realizados en el Hospital Universitario de Copenhague (*Helev and Gentofte*). El primero de ellos es el estudio de cohorte abierta MICA, (116) formado por pacientes remitidos al hospital por presentar síntomas y signos sospechosos de cáncer (cohorte descrita en el apartado **Transformación del diagnóstico de PDAC: análisis comparativo integral de biomarcadores clínicos, TLB y enfoques integrados**). El segundo grupo está formado por pacientes procedentes de la cohorte abierta del estudio REBECCA, (146) el cual comenzó en julio del 2014, y donde se incluyen pacientes con un diagnóstico de CCR confirmado mediante prueba histológica. Estos pacientes recibieron un seguimiento de su enfermedad hasta la fecha de mayo del 2023 o hasta su fallecimiento.

Los estudios se realizaron según la declaración de Helsinki. El protocolo del estudio MICA fue aprobado por el Comité de Ética Regional Danés (H-7-2014-011) y la Agencia Danesa de Protección de Datos (HEH-2014-105; I-Suite 03330; PACTIUS P-2020-578). El protocolo del estudio REBECCA está aprobado por el Comité de Ética Danés (VEK, j.nr. H-2-2013-078) y la Agencia Danesa de Protección de Datos (j.nr. HEH-2014-044, I-suite nº. 02771 y PACTIUS P-2019-614). Todos los pacientes recibieron información oral y escrita sobre el estudio, y dieron su consentimiento por escrito antes de su inclusión de acuerdo con las directrices del Comité de Ética Danés. Todas las muestras fueron identificadas con un código interno para garantizar el anonimato de los pacientes, siguiendo las indicaciones descritas en el protocolo aprobado por el comité ético.

Variables recogidas en cada grupo

Para este estudio en particular se han utilizado algunas variables en común en las bases de datos MICA y REBECCA:

- Edad en años.
- Sexo: masculino o femenino.
- Índice de masa corporal (IMC) en kg/m^2 , categorizado según la OMS como: peso insuficiente si $\text{IMC} < 18.5 \text{ kg}/\text{m}^2$, normopeso si $\text{IMC} = 18.5\text{-}24.9 \text{ kg}/\text{m}^2$, sobrepeso si $\text{IMC} = 25\text{-}29.9 \text{ kg}/\text{m}^2$, y obesidad si $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$.
- Hábito tabáquico: no fumador, fumador o exfumador.
- Consumo de alcohol: no abuso, abuso o exabuso. Definiendo abuso como > 7 unidades por semana para el sexo femenino, y > 14 unidades por semana para el sexo masculino. Se considera 1 unidad $\approx 12 \text{ g}$ alcohol.
- Escala del estado funcional ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*): con valores desde 0 hasta 5.
- Concentraciones de biomarcadores en sangre periférica de CEA, PCR, IL-6 e YKL-40.

Además, en el grupo de pacientes del estudio REBECCA se utilizaron las siguientes variables:

- Estadio según la octava edición del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC): desde I hasta IV.
- Subclasificación en operados (estadio = I-III) o con metástasis (estadio = IV).
- Dentro de los pacientes operados se recogió:
 - o Índice de comorbilidad de Charlson no ajustado por la edad (CCI).
 - o Sistema de clasificación del estado físico de la Sociedad Estadounidense de Anestesiólogos (ASA).
 - o Si la resección fue completa con márgenes libres (R0) o no (R1: resección macroscópica completa con resto tumoral microscópico; R2: resección incompleta con resto tumoral macroscópico).
- Los pacientes con metástasis se clasificaron en función de si el tumor primario estaba *in situ* o reseccionado en el momento de la obtención de la muestra de sangre periférica.
- Durante el seguimiento de la enfermedad de los pacientes con CCR, tanto en operados como en los pacientes con metástasis, se recogió:
 - o El tiempo de la supervivencia libre de progresión (PFS).
 - o El tiempo de la supervivencia global (OS).

Procesamiento de las muestras de suero

De cada paciente se obtuvieron 1.5 mililitros de sangre periférica, cuya extracción, en el caso de los pacientes del estudio REBECCA, fue en el momento del diagnóstico y/o antes de la cirugía o del inicio del tratamiento quimioterapéutico. Las muestras de sangre de los pacientes del estudio MICA se obtuvieron en el momento de inclusión al estudio. Las muestras fueron procesadas según los protocolos MICA y REBECCA. Todas las muestras de sangre se centrifugaron a un mínimo de 2000 g a 4°C durante 10 minutos dentro de las 3 horas posteriores a la toma de sangre, y el suero se distribuyó en alícuotas en tubos y posteriormente se almacenó a -80°C.

Los análisis de CEA y PCR se determinaron en muestras frescas (no congeladas), ya que formaban parte de las pruebas de rutina realizadas a los pacientes. Mientras que los valores de IL-6, YKL-40 y los termogramas se determinaron en muestras congeladas. La concentración de CEA se analizó utilizando un ensayo de inmunoquimioluminiscencia, en Immulite 2000 GI-MA (número de catálogo L2KG12, Siemens, Ballerup, Dinamarca). La cuantificación de los niveles de PCR, IL-6 e YKL-40 ya se han comentado anteriormente en el apartado **Transformación del diagnóstico de PDAC: análisis comparativo integral de biomarcadores clínicos, TLB y enfoques integrados**, al igual que la obtención de los termogramas a partir de muestras de suero.

Análisis de los datos

Metodología para obtener los modelos de clasificación a comparar

Se obtuvieron tres modelos usando la misma metodología que en el apartado **Transformación del diagnóstico de PDAC: análisis comparativo integral de biomarcadores clínicos, TLB y enfoques integrados**, pero cambiando las variables predictoras a introducir:

4. **Modelo-iClin:** Para obtener el modelo iClin se utilizaron las siguientes variables predictoras:
 - La edad dicotomizada en pacientes \leq / $>$ de 50 años.
 - La concentración de biomarcadores en sangre periférica de CEA, IL-6, PCR e YKL-40, todas ellas en su forma de logaritmo natural. En estas variables se realizó un preprocesado (mediante la librería *caret* de R) para eliminar las variables con varianza igual a cero, con correlación elevada (correlación de Pearson > 0.9) y para centrar y normalizar a partir de la concentración del logaritmo natural.
5. **Modelo iTLB:** El modelo iTLB se basa en el análisis de las curvas de termogramas de muestras de suero. Para ello, se utilizan parejas de temperaturas como variables predictoras, como está descrito previamente (**Desarrollo de un modelo de aprendizaje automatizado para el diagnóstico y pronóstico del cáncer de páncreas mediante muestras de suero analizadas por TLB**).
6. **Modelo iTLB+iClin:** Las variables clínicas frecuentes del modelo iClin y las parejas de temperaturas frecuentes obtenidas en el modelo iTLB se combinaron para ajustar un tercer modelo mixto, llamado modelo iTLB+iClin.

Comparación de los tres modelos

El resultado de los modelos de clasificación es un único valor o número por paciente que puede ir desde menos infinito hasta infinito. De manera estándar, el umbral o punto de corte establecido por el modelo es cero. Esto quiere decir que cuando el modelo de clasificación proporciona un número negativo, clasifica ese paciente como control (paciente sin cáncer), mientras que, si el número es positivo, el modelo clasifica a ese paciente con CCR. Se compararon los resultados obtenidos usando el punto de corte estándar con el punto de corte calculado según Youden. (100)

El rendimiento de las pruebas diagnósticas se evaluó mediante el cálculo de índices de rendimiento comunes procedentes de una tabla de contingencia (sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, y valor predictivo negativo), así como la curva de característica operativa del receptor (ROC) y su área bajo la curva (AUC) junto con su intervalo de confianza al 95% de significación estadística (IC_{95%}).

Cada modelo se relacionó con las variables clínicas recogidas tanto en el momento de la extracción de la muestra de suero, con el objetivo de buscar posibles causas de falsos positivos y negativos en cada modelo, como durante su seguimiento (PFS y OS) para evaluar la posible aplicación de los modelos en el pronóstico de los pacientes.

Además, se comparó el modelo iClin con el modelo iTLB+iClin, para valorar si la TLB podía mejorar el modelo formado por variables clínicas. Para ello, se evaluó la capacidad diagnóstica de cada uno de ellos para diferenciar entre el grupo control (pacientes sintomáticos sin diagnóstico de cáncer) y:

- El grupo de pacientes con CCR.
- El grupo de pacientes con CCR y operados (estadio = I-III).
- El grupo de pacientes con CCR y con metástasis (estadio = IV).
- El grupo de pacientes con CCR en estadios primarios (estadio = I-II).
- El grupo de pacientes con CCR en estadios avanzados (estadio = III-IV).

Para mostrar estos resultados, se usó el 100% de los datos (el 70% de entrenamiento y el 30% de validación), para evitar tener grupos con pequeños tamaños y que la estadística tenga mayor potencia.

Análisis de muestras de suero mediante espectrometría de masas

Todo el proceso desde la preparación de las muestras hasta su análisis con cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), se realizó aleatorizando las muestras para minimizar la variabilidad en la adquisición de las proteínas.

La preparación de la muestra de suero se realizó de acuerdo con un protocolo publicado, (145) que fue adaptado de tres estudios previos. (138–140) Brevemente, se añadió 1 μL de suero (60-70 μg de proteína) a 24 μL de tampón SDC (desoxicolato de sodio al 1%, clorhidrato de tris(2-carboxietil) fosfina 10 mM, cloroacetamida 40 mM y Tris-ácido clorhídrico 100 mM, pH 8.5) en un pocillo de 500 μL de una placa de 96 pocillos. Después de sellarlo (con una tapa de silicona, Eppendorf), las muestras se incubaron a 95°C durante 10 minutos a 1000 rpm en un Eppendorf Thermomixer-C con ThermoTop (tapa calentada) para desnaturalizar, reducir y alquilar proteínas. Una vez enfriado a temperatura ambiente y diluido 10 veces con agua, se agregaron LysC y tripsina (a partir de soluciones madre de 1 mg/mL en agua o ácido acético 50 mM, respectivamente) para digerir las proteínas en una proporción de 1:100 (cada proteasa:proteína, $\mu\text{g}/\mu\text{g}$) y se incubó a 37°C durante 16 h a 1000 rpm en un Eppendorf Thermomixer-C con ThermoTop (tapa calentada). Se añadió un volumen igual (250 μL) de 99% de acetato de etilo/1% de ácido trifluoroacético (TFA) a los péptidos digeridos para obtener una concentración final de 49.50% de acetato de etilo y 0.50% de TFA.

Las *StageTips* se generaron perforando discos SDB-RPS® de doble apilamiento (Sigma, Cat #66886-U) con una aguja de calibre 18 y se montaron en puntas de 200 μL (Eppendorf). Para el procesamiento de *StageTip* y utilizando *Spin96*, los *StageTips* se insertaron en un soporte y se colocaron en la parte superior, que luego se apiló en el fondo de lavado que contenía una placa de microtitulación de 96 pocillos de polipropileno para recolectar el flujo de muestra y los lavados. Cada punta se humedeció con 100 μL de acetonitrilo al 100% y se centrifugó a 1000 g durante 1 min. Después de la humectación, cada *StageTip* se equilibró con 100 μL de TFA al 0.1% en agua y metanol al 30%/TFA al 1% con centrifugación para cada uno a 1000 g durante 3 minutos. Luego, cada *StageTip* se cargó con el equivalente de ~ 10 μg de péptido en acetato de etilo al 49.50% y TFA al 0.50% (se utilizaron volúmenes iguales de cada fase). Los péptidos se lavaron dos veces con 100 μL de acetato de etilo al 99%/TFA al 1%, seguido de un lavado con 100 μL de TFA al 0.20% en agua. Para la elución de péptidos, el fondo de lavado se intercambió por un fondo que contenía un accesorio que soportaba una placa de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) sin faldón que se recortó para ajustarse. Para la elución, se agregaron 100 μL de hidróxido de amonio al 5%/acetonitrilo al 80% a cada punta y se centrifugó como se indicó anteriormente durante 5 minutos. Las muestras en la placa de PCR se secaron usando un GeneVac EZ-2 usando la configuración de amoníaco a 40°C durante 1 h. Los péptidos secos se resuspendieron en 30 μL de ácido fórmico al 5%. Finalmente, las muestras se almacenaron a 4°C hasta que se analizaron mediante LC-MS.

Los péptidos de plasma digeridos con tripsina agrupados (100 μg en total) en ácido fórmico al 5% se sometieron a cromatografía de fase reversa de pH elevado en un sistema Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 BioRS con un muestreador automático de fraccionamiento, utilizando una columna Waters XBridge Peptide BEH C18 (130 Å, 3.5 μm ,

4.6 mm × 250 mm, número de catálogo 186003570). La columna se incubó a 30 °C con un flujo constante de 1 mL/min, con el tampón A que contenía 2 % de acetonitrilo (ACN) y formiato de amonio 10 mM (pH 9.0) y el tampón B que contenía 80% de ACN y formiato de amonio 10 mM. (pH 9.0). Las fracciones se recogieron cada 8.75 s durante un tiempo de retención de 2 a 16 minutos (96 pseudofracciones, concatenadas en 16 fracciones en total). Los péptidos se separaron mediante un gradiente lineal de 10% a 40% de tampón B durante los primeros 11 minutos y 100% de tampón B durante el tiempo restante.

Usando un nanoUHPLC Thermo Easy-nLC 1200, se inyectaron directamente péptidos en ácido fórmico al 5% (v/v) (volumen de inyección 3 µL) en un C18AQ de 50 cm × 75 µm (Dr. Maisch, Ammerbuch, Alemania, 1.9 µm) fusionado a una columna analítica de sílice con una punta extraída de ~10 µm, acoplada en línea a una fuente ESI (ionización por electrospray) de nanopulverización. Los péptidos se resolvieron sobre un gradiente de 5% de ACN a 40% de ACN durante 45 min con un caudal de 300 nL min⁻¹ a 60 °C. Los péptidos se ionizaron mediante ionización por electropulverización a 2.3 kV. El análisis de espectrometría de masas en tándem se llevó a cabo en un espectrómetro de masas Q-Exactive HF (ThermoFisher) utilizando fragmentación HCD (disociación colisional de alta energía) en modo positivo.

El método de adquisición independiente de los datos utilizó espectros MS/MS adquiridos de todos los iones en cualquier punto durante el gradiente. Los escaneos MS1 se adquirieron a partir de 350-1400 m/z (resolución de 60,000, objetivo AGC (*automatic gain control*) 3 × 10⁶, tiempo máximo de inyección de 50 ms) y los escaneos MS2 que tenían un primer m/z fijo de 140 (resolución de 15,000, objetivo AGC 1 × 10⁵. El tiempo máximo de inyección fue de 25 ms, 27 NCE, ancho de aislamiento de 1.4 m/z).

Los archivos sin formato se transformaron en archivos *mzml* y se desmultiplexaron usando *msconvert* (Proteowizard). La identificación de proteínas y la cuantificación sin etiquetas se realizaron en el modo sin biblioteca en DIA-NN (v1.8.1) utilizando una biblioteca *Human FASTA* recuperada de UniProt. La función de coincidencia entre series y el clasificador de redes neuronales de doble paso se utilizaron para péptidos que tenían: (i) un máximo de 2 escisiones tripticas omitidas y (ii) permitían 3 modificaciones variables (escisión M del término N, carbamidometilación y oxidación de metionina). Los péptidos considerados fueron (i) entre 7 y 30 aminoácidos con (ii) carga precursora entre 1 y 4, (iii) rango de masas de 300 – 1800 m/z, y (iv) rango de masas de iones producto de 200 – 1800 m/z. Los péptidos se identificaron con una confianza de FDR del 1.0% según los espectros de aprendizaje profundo y el tiempo de retención generados a partir del conjunto de datos de UniProt.

Análisis estadístico aplicado

Se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors o de Shapiro-Wilk (según el tamaño muestral) para evaluar la normalidad de las variables. Las medianas entre dos grupos independientes se compararon mediante la prueba de Wilcoxon de muestras no pareadas en variables no distribuidas normalmente, mientras que las medias entre dos grupos independientes se compararon mediante la prueba t-Student en variables distribuidas normalmente. La asociación entre grupos para variables cualitativas se evaluó mediante la prueba χ^2 de Pearson con la corrección de Yates, excepto cuando el tamaño muestral era pequeño (≤ 20) donde se utilizó la prueba de Fisher. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de dos grupos se compararon mediante la prueba de Log-Rank. La comparación de AUC de las curvas ROC se realizó mediante la prueba de DeLong. Para todas las pruebas, un p-valor bilateral inferior a 0.05 se consideró estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el lenguaje y entorno para la informática estadística del equipo central de R, en su versión 4.3.2 (31 de octubre de 2023).

La cuantificación de proteínas se evaluó utilizando el software Perseus (v.2.0.11.0), incluido el análisis estadístico, el cual incluye la prueba t-Student bilateral, con un umbral de significancia estadística de $p < 0.05$, y aplicando una penalización por realizar múltiples comparaciones (FDR), después de la transformación log₂ de las áreas de los picos, la filtración de las proteínas seleccionando aquellas para las que al menos se disponía de información en un 50% en uno de los grupos, y la imputación de valores faltantes de la distribución normal, tras el análisis con DIA-NN. Mediante un gráfico tipo volcán se realizó la búsqueda de posibles nuevos biomarcadores.

RESULTADOS

Se analizaron 683 muestras de suero, de las cuales el 45.68% eran de sexo masculino, con una mediana de edad de 67.00 años [57.00; 74.00]. La mediana del IMC fue de 24.77 kg/m² [21.76; 27.60] (na = 148), el cual se categorizó en: peso insuficiente (3.93%, 21/535), normopeso (48.22%, 258/535), sobrepeso (30.47%, 163/535), y obesidad (17.38%, 93/535). Se consideraron dos grupos:

1/ Grupo control constituido por 355 pacientes (51.98%; edad de 64.00 años [52.00; 72.00]) sin diagnóstico de cáncer ni en el momento de la inclusión ni durante todo el seguimiento del estudio. Dentro del grupo control, el 39.15% (139/355) fueron de sexo masculino. Según el IMC (na = 5), la mediana en este grupo fue de 24.27 kg/m² [21.45; 27.75], clasificándose en: 4.29% con peso insuficiente (15/350), 50.86% con normopeso (178/350), 27.14% con sobrepeso (95/350), y 17.71% con obesidad (62/350). Al dicotomizar el IMC en < 25 (incluyendo los pacientes con peso insuficiente y normopeso) y ≥ 25 (incluyendo los pacientes con sobrepeso y obesidad), no se observó ninguna relación entre la edad, el sexo y el IMC en el grupo control (Tabla 26).

2/ Grupo formado por 328 pacientes (48.02%; mediana de edad de 69.00 [63.00; 75.00]) con un diagnóstico de CCR. Dentro de este grupo, el 52.74% (173/328) fueron de sexo masculino. Según el IMC, la mediana en este grupo fue de 25.34 kg/m² [22.95; 28.09] (na = 143), clasificándose en: 3.24% con peso insuficiente (6/185), 43.24% con normopeso (80/185), 36.76% con sobrepeso (68/185), y 16.76% con obesidad (31/185). Al dicotomizar el IMC (</≥ 25 kg/m²), tampoco se encontró ninguna relación entre la edad, el sexo y el IMC en el grupo con CCR (Tabla 26).

Tabla 26: Relación entre edad, sexo y IMC en cada grupo (controles y CCR).

Controles				CCR		
Edad (años)		p-valor		Edad (años)		p-valor
Sexo:		0.459				0.904
Masculino	63.00 [52.50;71.00]			69.00 [63.00;75.00]		
Femenino	64.00 [51.75;73.00]			71.00 [62.50;75.50]		
IMC (kg/m²):		0.132				0.231
< 25	65.00 [52.00;73.00]			71.00 [64.20;77.00]		
≥ 25	62.00 [51.00;71.00]			69.00 [62.50;74.00]		
Sexo	Masculino	Femenino	p-valor	Masculino	Femenino	p-valor
IMC (kg/m²):		0.091				0.173
< 25	67 (34.72%)	126 (65.28%)		40 (46.51%)	46 (53.49%)	
≥ 25	70 (44.59%)	87 (55.41%)		60 (60.61%)	39 (39.39%)	

Notas: las variables continuas están representadas por Q2 [Q1; Q3] debido a su distribución no paramétrica, mientras que las variables categóricas están representadas por el número (%) de pacientes en cada categoría; los p-valores se obtienen con la prueba de Wilcoxon al comparar una variable continua entre dos grupos, y la prueba de χ^2 (con la corrección de Yates) al comparar dos variables categóricas; CCR: cáncer colorrectal; IMC: índice de masa corporal.

Se observó una relación entre la edad y el sexo según los grupos (controles y CCR), de manera que los pacientes con CCR tenían una mayor mediana de edad y una mayor proporción de pacientes de sexo masculino. En cambio, no se observó una asociación con el IMC (Tabla 27 y Figura 40.A y B).

Respecto a las variables recogidas relacionadas con los hábitos de vida de los pacientes, se disponía de la información del consumo de tabaco (fumador, no fumador o exfumador), y del abuso del alcohol (no abuso, abuso o exabuso). Del total de los pacientes, se contaba con la información sobre el consumo de tabaco en 519 pacientes (75.99%, na = 164), de manera que el 40.46% (210/519) nunca habían fumado, el 22.74% (118/519) fumaban en ese momento, y el 36.80% (191/519) eran exfumadores. Respecto al abuso del alcohol, se tenía información en 499 pacientes (73.06%, na = 184), de manera que el 78.56% (392/499) no abusaban del alcohol, el 17.23% (86/499) hacían un abuso del consumo del

alcohol, y el 4.21% restante (21/499) hicieron un abuso del alcohol, pero en ese momento no (exabuso). Al dicotomizar el hábito tabáquico como “No fumador” y “Fumador+Exfumador”, y el abuso de alcohol como “No abuso” y “Abuso+Exabuso”, y relacionarlo con los grupos (controles y pacientes con CCR), no se observó una asociación con el hábito tabáquico, pero sí con el consumo de alcohol, de manera que había una mayor proporción de pacientes controles que abusaban o habían abusado del consumo de alcohol (Tabla 27 y Figura 40.C).

Para estratificar a los pacientes se contaba con diferentes escalas. Una de ellas era la escala del estado funcional ECOG, donde se tenía información en ambos grupos en 681 de los pacientes (99.71%, $n = 2$), de manera que el 75.92% (517/681) se definieron como ECOG = 0, el 19.38% (132/681) como ECOG = 1, y el 4.70% (32/681) como ECOG = 2-3. Al dicotomizar la escala ECOG como ECOG = 0 y ECOG = 1-3, se observó una asociación con los grupos (controles y CCR), de manera que había una mayor proporción de pacientes con CCR y con ECOG = 1-3 (Tabla 27 y Figura 40.D).

En el grupo de pacientes con CCR, además se disponía de información sobre el estadio de la enfermedad, de manera que el 15.24% eran estadio = I (50/328), el 22.56% fueron estadio = II (74/328), el 18.90% fueron estadio = III (62/328) y el 43.29% restante eran estadio = IV (142/328) (Figura 41.A). Otra forma de dividir a los pacientes con CCR, y relacionado con el estadio, fue dividirlos en: operados (56.71%, 186/328) y con metástasis (43.29%, 142/328) (Figura 41.B). Dentro de los pacientes operados, se disponía de tres escalas para clasificarlos: escala CCI, escala ASA, y si la resección del tumor fue total o no. Respecto a la escala CCI, el 56.99% tenían comorbilidad baja (106/186, CCI = 2) y el 43.01% tenían comorbilidad alta (80/186, CCI ≥ 3) (Figura 41.C). Respecto a la escala ASA, el 38.17% (71/186) se clasificaron como ASA = I, el 50.00% (93/186) como ASA = II, y el 11.83% (22/186) restante como ASA = III (Figura 41.D). También se evaluó si la resección de la operación fue total o no, de manera que en el 89.78% la resección del tumor fue total (R0, 167/186), mientras que en el 10.22% la resección no fue total (R1 en el 7.53%, 14/186; y R2 en el 2.69%, 5/186) (Figura 41.E).

Por otro lado, estaban los pacientes con metástasis, cuyo número variaba desde 1 metástasis hasta 5 (51.41% con una metástasis, el 35.92% con dos, el 10.56% con tres, y el 2.11% restante entre cuatro y cinco), y se localizaban en hígado (82.39%, 117/142), pulmón (38.03%, 54/142), peritoneo (23.94%, 34/142), nódulos linfáticos (16.90%, 24/142), hueso (4.22%, 6/142), músculo (0.70%, 1/142), y otras localizaciones (10.56%, 15/142). La mayoría de este grupo de pacientes con metástasis tenían el tumor primario *in situ* en el momento de la extracción de la muestra de suero (73.94%, 105/142), mientras que en el 26.06% restante (37/142) el tumor primario fue resecado (Figura 41.F).

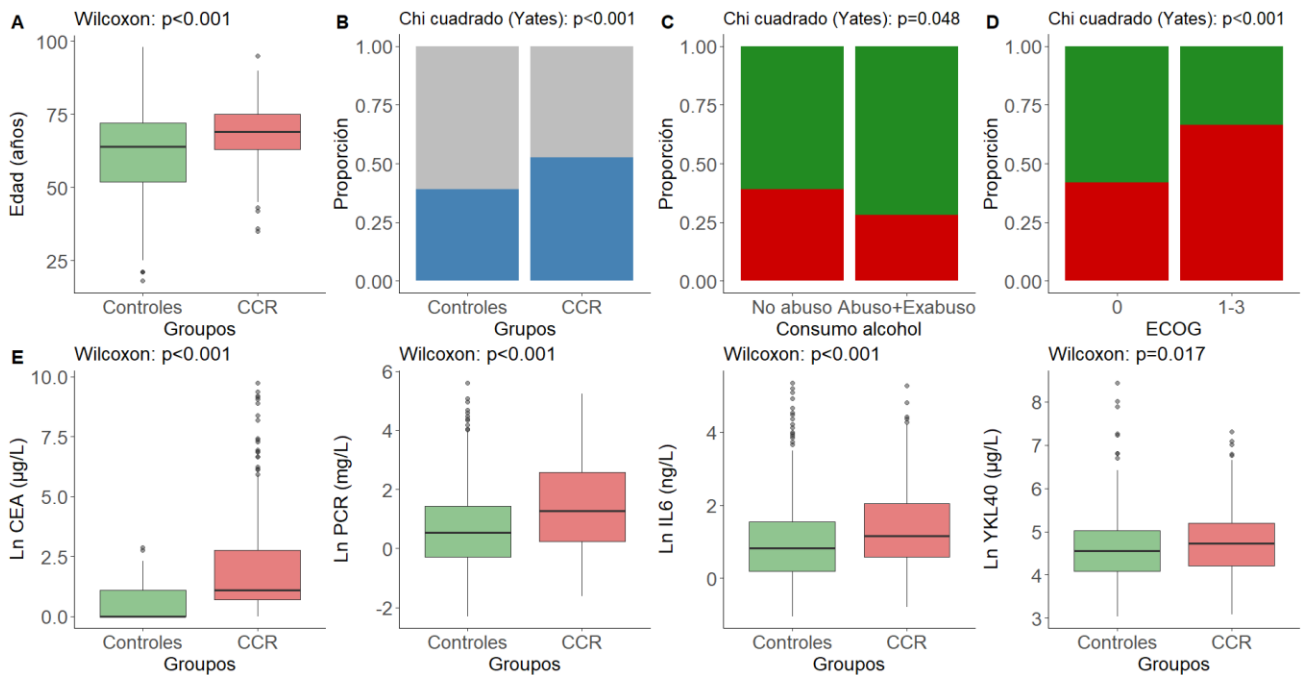
Tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con CCR, se recogieron las concentraciones de los biomarcadores CEA, PCR, IL-6 e YKL-40 en sangre periférica. Se disponía de la información de las cuatro variables en 570 de los pacientes (83.45%, $n = 113$). Se observaron diferencias estadísticamente significativas en las medianas de las concentraciones (en su forma de logaritmo natural) de todos los biomarcadores entre el grupo control y el grupo de pacientes con CCR (Tabla 27 y Figura 40.E).

Además, en todos los pacientes con CCR se realizó un seguimiento exhaustivo para estimar la PFS y la OS. En los pacientes operados, la mediana fue de 82.77 [47.53; 96.81] meses y 90.25 [55.79; 97.32] meses de PFS y OS. Mientras que, para el grupo de pacientes con metástasis, la mediana fue de 7.50 [3.54; 13.73] meses y 19.13 [9.67; 34.78] meses, respectivamente.

Tabla 27: Relación de la edad, el sexo, el IMC, el hábito tabáquico, el abuso del alcohol, la escala ECOG y las concentraciones de las variables bioquímicas entre los grupos (controles y CCR).

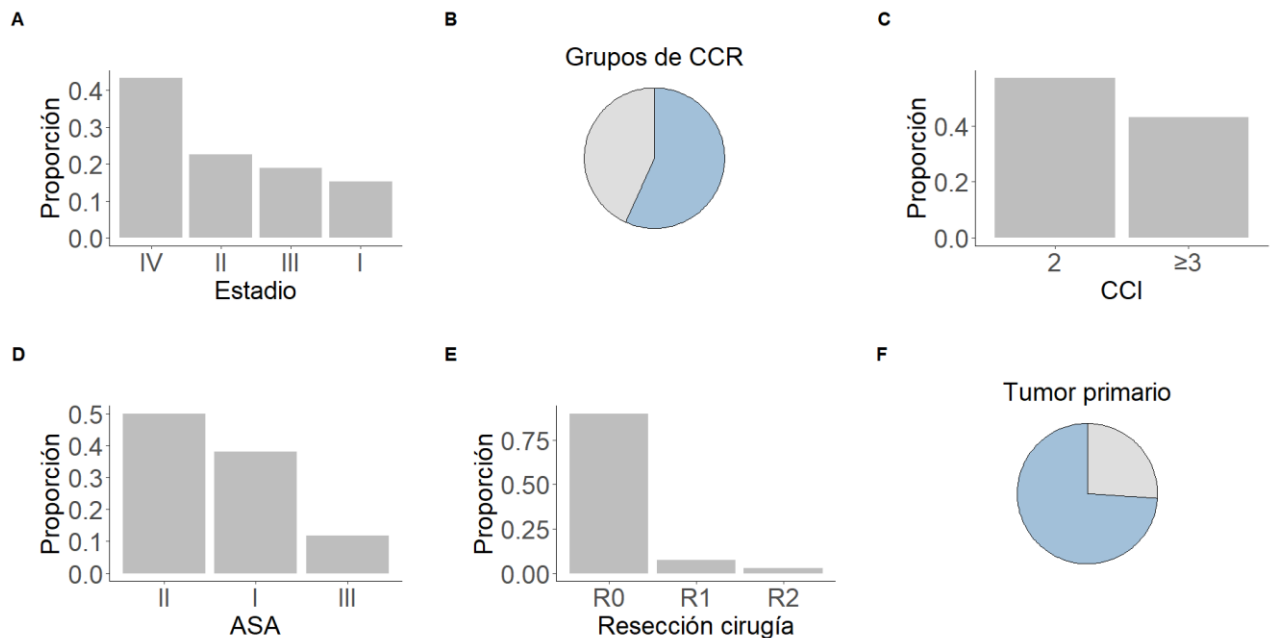
	Controles	CCR	p-valor
Edad (años)	64.00 [52.00;72.00]	69.00 [63.00;75.00]	< 0.001
Sexo:			< 0.001
Masculino	139 (44.55%)	173 (55.45%)	
Femenino	216 (58.22%)	155 (41.78%)	
IMC (kg/m²):			0.069
< 25	193 (69.18%)	86 (30.82%)	
≥ 25	157 (61.33%)	99 (38.67%)	
Tabaco:			0.362
No fumador	131 (62.38%)	79 (37.62%)	
Fumador+Exfumador	206 (66.67%)	103 (33.33%)	
Alcohol:			0.048
No abuso	239 (60.97%)	153 (39.03%)	
Abuso+Exabuso	77 (71.96%)	30 (28.04%)	
ECOG:			< 0.001
0	300 (58.03%)	217 (41.97%)	
1-3	55 (33.54%)	109 (66.46%)	
Ln CEA (µg/L)	0.00 [0.00;1.10]	1.10 [0.69;2.42]	< 0.001
Ln PCR (mg/L)	0.55 [-0.29;1.42]	1.28 [0.24;2.61]	< 0.001
Ln IL-6 (ng/L)	0.83 [0.19;1.55]	1.13 [0.59;1.80]	< 0.001
Ln YKL-40 (µg/L)	4.56 [4.08;5.03]	4.79 [4.22;5.31]	0.017

Notas: las variables continuas están representadas por Q2 [Q1; Q3] debido a su distribución no paramétrica, mientras que el resto de las variables están representadas por el número (%) de pacientes en cada categoría; los p-valores se obtienen de la prueba de Wilcoxon al comparar una variable continua entre dos grupos, y de la prueba de χ^2 (con la corrección de Yates) al comparar dos variables categóricas; CCR: cáncer colorrectal; IMC: índice de masa corporal; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; CEA: antígeno carcinoembrionario; PCR: proteína C reactiva; IL-6: interleucina 6; YKL-40: proteína 1 similar a quitinasa-3.



Notas: CCR: cáncer colorrectal; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; CEA: antígeno carcinoembrionario; PCR: proteína C reactiva; IL-6: interleucina 6; YKL-40: proteína 1 similar a quitinasa-3.

Figura 40: Relación estadísticamente significativa de diferentes variables entre los grupos (**controles** y **CCR**). **A/** Diferencia de la mediana de la edad (años); **B/** Asociación con el sexo (**masculino** y **femenino**); **C/** Asociación con el consumo de alcohol; **D/** Asociación con la escala ECOG del estado funcional; **E/** Diferencia de la mediana del logaritmo natural de la concentración de biomarcadores: CEA, PCR, IL-6 e YKL-40.



Notas: CCR: cáncer colorrectal; estadio según la octava edición del AJCC; CCI: índice de comorbilidad de Charlson; CCI = 0-1: ausencia de comorbilidad, CCI = 2: comorbilidad baja, CCI ≥ 3 : comorbilidad alta; ASA: Sistema de clasificación del estado físico de la Sociedad Americana de Anestesiólogos; R0: resección completa con márgenes libres, R1: resección macroscópica completa con resto tumoral microscópico; R2: resección incompleta con resto tumoral macroscópico.

Figura 41: Proporción de pacientes con CCR según: **A/** El estadio; **B/** Los subgrupos: operados y con metástasis; **C/** Escala CCI, dentro del subgrupo de operados; **D/** Escala ASA, dentro del subgrupo de operados; **E/** La resección de la cirugía en los operados; **F/** Si el tumor primario fue **resecado** o estaba **in situ** dentro del grupo de pacientes metastásicos.

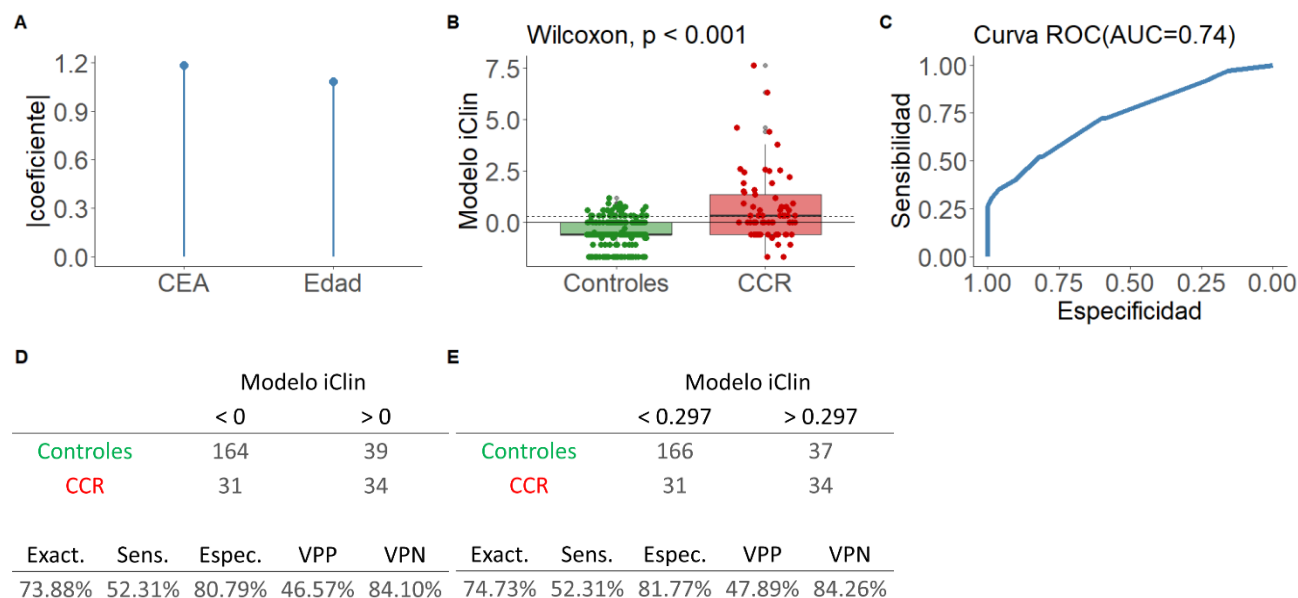
1. Modelo iClin

A partir de variables clínicas, y aplicando una estrategia similar a la propuesta por el grupo para obtener un modelo de clasificación de termogramas, se construyó un primer modelo (modelo iClin) para distinguir entre la población control (pacientes sintomáticos sin diagnóstico de cáncer) y pacientes con un diagnóstico de CCR. El modelo iClin se entrenó y validó en 570 pacientes (62.10% corresponden al grupo control), los cuales constituyen los pacientes que tienen la información de las seis variables predictoras clínicas consideradas: la edad dicotomizada (\leq/\gt de 50 años) y el logaritmo natural de las concentraciones en sangre periférica de CEA, PCR, IL-6 e YKL-40, éstas últimas preprocesadas. Debido a que las poblaciones estaban desbalanceadas, se realizó un entrenamiento balanceado con 151 pacientes de cada grupo (controles y CCR).

El modelo iClin obtenido finalmente estaba formado por dos variables (edad y concentración de CEA), es decir, se eliminaron tres de las variables (concentración de PCR, IL-6 e YKL-40). Se observó que la concentración de CEA era la que tenía mayor peso estadístico clasificatorio para distinguir entre controles y pacientes con CCR (Figura 42.A). La media de AUC en los grupos de entrenamiento fue de 0.76 (± 0.02), y en los grupos de validación fue de 0.76 (± 0.03).

Al considerar la respuesta numérica del modelo iClin como una variable continua, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la mediana del resultado del modelo iClin entre el grupo control (-0.60 [-0.60; -0.01]) y el grupo con CCR (0.33 [-0.60; 1.35]) (prueba de Wilcoxon: p-valor < 0.001) (Figura 42.B), con un AUC en el grupo de validación de 0.74 (IC_{95%} = 0.66-0.81) (Figura 42.C).

Al considerar la respuesta numérica del modelo iClin como dicotómica, se compararon los resultados obtenidos al usar el punto de corte estándar de cero y el umbral de Youden de 0.297. Se observó que, aunque los cambios eran mínimos, con ambos puntos de corte los valores de especificidad y VPN eran superiores a la sensibilidad y VPP (Figura 42.D y E).



Notas: Las variables que aparecen en la figura A son el logaritmo natural de CEA y la edad dicotomizada en \leq/\gt a 50 años; CEA: antígeno carcinoembrionario; CCR: cáncer colorrectal; AUC: área bajo la curva ROC; Exact: exactitud; Sens: sensibilidad; Espec: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo.

Figura 42: Resultados del modelo iClin obtenido para diferenciar a los pacientes controles (sintomáticos) de los pacientes con CCR. **A/** Valor absoluto de los coeficientes del modelo iClin en cada una de las variables predictoras; **B/** Diferencia de medianas de la respuesta numérica del modelo iClin en el grupo de validación (**controles** y **CCR**), representando con una

línea horizontal continua el punto de corte estándar, y con una línea discontinua el de Youden; **C/** Área bajo la curva ROC del modelo iClin en el grupo de validación; **D/** En la parte superior aparece la tabla de contingencia de la predicción del modelo iClin en el grupo de validación empleando el punto de corte estándar. En la parte inferior se indican los índices del rendimiento del modelo iClin; **E/** En la parte superior aparece la tabla de contingencia de la predicción del modelo iClin en el grupo de validación empleando el punto de corte de Youden. En la parte inferior se indican los índices del rendimiento del modelo iClin.

Relación de los resultados del modelo iClin con variables clínicas

El modelo iClin mostró una capacidad diagnóstica aceptable para diferenciar entre controles sintomáticos y pacientes con CCR. Posteriormente se relacionó con las diferentes variables clínicas para buscar posibles causas de los falsos positivos y negativos. Debido a que el punto de corte de Youden condujo a un resultado muy parecido al proporcionado por el punto de corte estándar, sólo se buscaron asociaciones con el modelo dicotomizado por el punto de cero, además de buscar relaciones considerando el resultado del modelo como una variable continua.

Se encontró una asociación con los falsos positivos en el grupo control, de manera que se observó una mayor proporción de pacientes fumadores, que abusaban del alcohol y clasificados con la escala del estado funcional ECOG = 1-3. También se encontró una asociación con los falsos negativos en el grupo de pacientes con CCR, los cuales eran sobre todo no fumadores, con concentraciones de PCR ≤ 10 mg/L, clasificados con una comorbilidad de CCI = 0-2 y con el tumor primario reseado.

Además, se observaron diferencias estadísticamente significativas en las medianas de las concentraciones de PCR, IL-6 e YKL-40 entre los pacientes clasificados según el punto de corte estándar del modelo iClin. Respecto a los pacientes con metástasis, se observó un menor valor numérico del modelo iClin en los pacientes donde el tumor primario fue reseado. Respecto a las variables recogidas durante el seguimiento de los pacientes con CCR (PFS, y OS), sólo se observó diferencias estadísticamente significativas en los pacientes con metástasis y el tiempo de supervivencia global.

Los resultados de las relaciones entre el modelo iClin y todas las variables clínicas están en las Tabla 28, Tabla 29 y Tabla 30, y en la Figura 43.

Tabla 28: Relación de variables clínicas con la respuesta numérica del modelo iClin como variable continua, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con CCR.

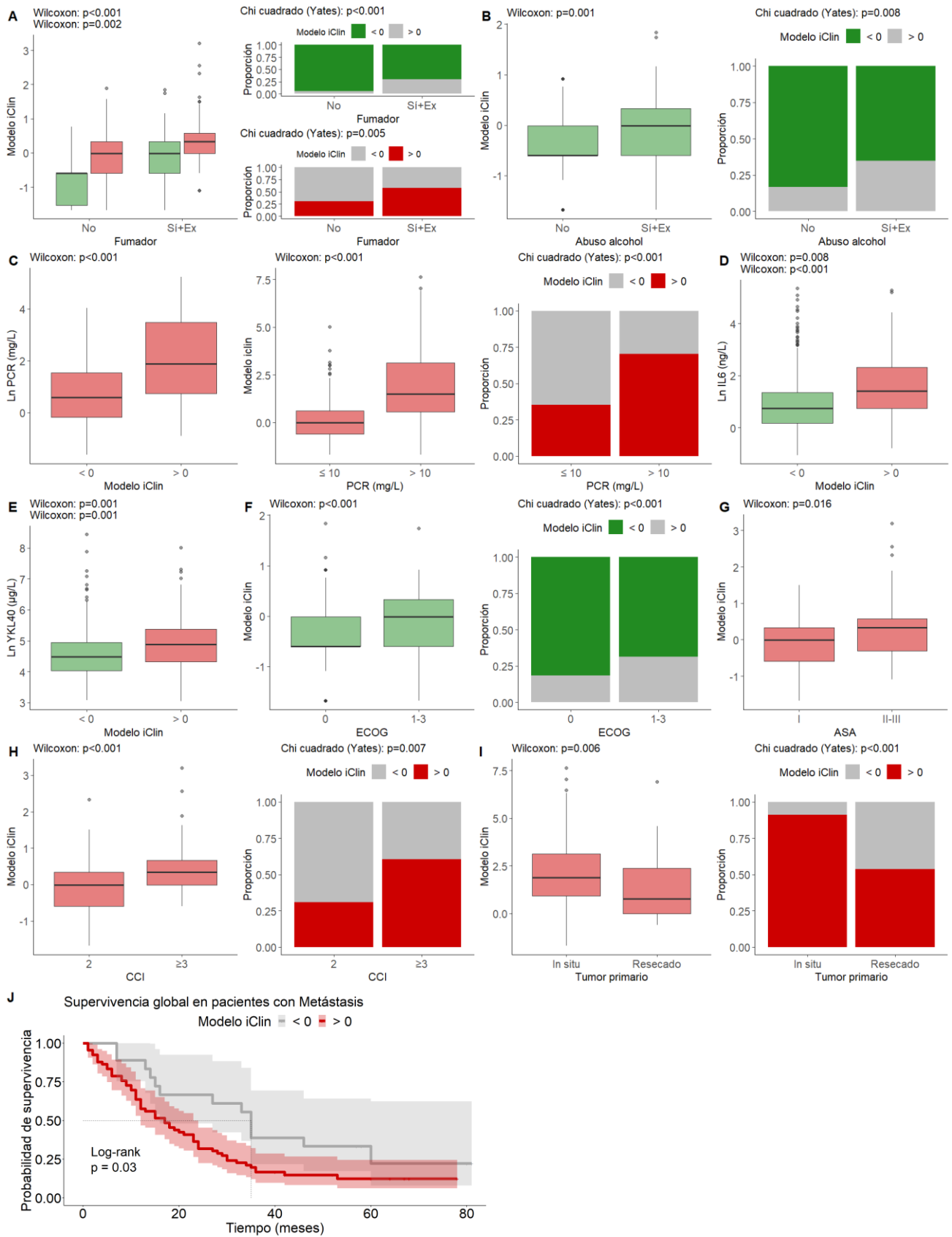
	Controles	p-valor	CCR	p-valor
Sexo:		0.676		0.949
Masculino	-0.60 [-0.60; -0.01]		0.33 [-0.16; 1.37]	
Femenino	-0.60 [-0.60; -0.01]		0.33 [-0.01; 1.45]	
IMC (kg/m²):		0.149		0.509
< 25	-0.60 [-0.60; -0.01]		-0.01 [-0.60; 0.57]	
≥ 25	-0.60 [-0.60; -0.01]		-0.01 [-0.60; 0.57]	
Tabaco:		<0.001		0.002
No fumador	-0.60 [-1.53; -0.60]		-0.01 [-0.60; 0.33]	
Fumador+Exfumador	-0.01 [-0.60; 0.33]		0.33 [-0.01; 0.57]	
Alcohol:		0.001		0.312
No abuso	-0.60 [-0.60; -0.01]		-0.01 [-0.60; 0.57]	
Abuso+Exabuso	-0.01 [-0.60; 0.33]		0.33 [-0.16; 0.57]	
PCR:		0.994		<0.001
≤ 10 mg/L	-0.60 [-0.60; -0.01]		-0.01 [-0.60; 0.62]	
> 10 mg/L	-0.60 [-0.60; -0.01]		1.50 [0.57; 3.13]	
ECOG:		<0.001		0.052
0	-0.60 [-0.60; -0.01]		0.33 [-0.60; 1.05]	
1-3	-0.01 [-0.60; 0.33]		0.57 [-0.01; 1.63]	
CCI:				<0.001
0-2			-0.01 [-0.60; 0.33]	
≥ 3			0.33 [-0.01; 0.67]	
ASA:				0.016
I			-0.01 [-0.60; 0.33]	
II-III			0.33 [-0.30; 0.57]	
Resección:				0.765
Completa (R0)			-0.01 [-0.60; 0.57]	
Incompleta (R1/R2)			-0.01 [-0.60; 0.57]	
Tumor primario:				0.006
Resecado			0.76 [-0.01; 2.38]	
<i>In situ</i>			1.89 [0.92; 3.13]	

Notas: Los resultados del modelo iClin están representados como Q2 [Q1; Q3] debido a su carácter no paramétrico; p-valores obtenidos de la prueba de Wilcoxon; CCR: cáncer colorrectal; IMC: índice de masa corporal; PCR: proteína C reactiva; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; CCI: índice de comorbilidad de Charlson; CCI = 0-1: ausencia de comorbilidad, CCI = 2: comorbilidad baja, CCI ≥ 3: comorbilidad alta; ASA: Sistema de clasificación del estado físico de la Sociedad Americana de Anestesiólogos; R0: resección completa con márgenes libres, R1: resección macroscópica completa con resto tumoral microscópico; R2: resección incompleta con resto tumoral macroscópico. Los pacientes clasificados según las escalas CCI y ASA y según la resección corresponden a pacientes operados, mientras que los pacientes clasificados según el tumor primario corresponden a pacientes con metástasis.

Tabla 29: Relación de variables clínicas con la respuesta numérica del modelo iClin dicotomizada según el punto de corte estándar, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con CCR.

Modelo iClin	Controles		p-valor	CCR		p-valor
	< 0	> 0		< 0	> 0	
Sexo:			0.093			1.000
Masculino	116 (83.45%)	23 (16.55%)		49 (42.24%)	67 (57.76%)	
Femenino	162 (75.35%)	53 (24.65)		43 (43.00%)	57 (57.00%)	
IMC (kg/m²):			0.396			0.428
< 25	147 (76.56%)	45 (23.44%)		32 (51.61%)	30 (48.39%)	
≥ 25	127 (80.89%)	30 (19.11%)		42 (60.00%)	28 (40.00%)	
Tabaco:			<0.001			0.005
No fumador	120 (92.31%)	10 (7.69%)		40 (68.97%)	18 (31.03%)	
Fumador+Exfumador	144 (69.90%)	62 (30.10%)		30 (42.86%)	40 (57.14%)	
Alcohol:			0.008			0.218
No abuso	194 (81.51%)	44 (18.49%)		61 (58.09%)	44 (41.90%)	
Abuso+Exabuso	51 (66.23%)	26 (23.77%)		10 (41.67%)	14 (58.33%)	
Ln PCR (mg/L)	0.52 [-0.31;1.38]	0.67 [-0.10;1.53]	0.452 [#]	0.58 [-0.17;1.54]	1.87 [0.74;3.47]	<0.001 [#]
PCR:			1.000			<0.001
≤ 10 mg/L	243 (78.39%)	67 (21.61%)		81 (53.29%)	71 (46.71%)	
> 10 mg/L	35 (79.55%)	9 (20.45%)		11 (17.19%)	53 (82.81%)	
Ln IL-6 (ng/L)	0.72 [0.16;1.42]	1.06 [0.44;2.02]	0.008 [#]	0.77 [0.26;1.20]	1.57 [0.88;2.51]	<0.001 [#]
Ln YKL-40 (µg/L)	4.48 [4.04;4.90]	4.85 [4.32;5.31]	0.001 [#]	4.50 [4.09;5.00]	4.88 [4.37;5.39]	0.001 [#]
ECOG:			0.017			0.104
0	242 (80.94%)	57 (19.06%)		67 (46.85%)	76 (53.15%)	
1-3	36 (65.45%)	19 (34.55%)		25 (34.25%)	48 (65.75%)	
CCI:						0.007
0-2				49 (67.12%)	24 (32.88%)	
≥ 3				25 (42.37%)	34 (57.63%)	
ASA:						0.068
I				33 (67.35%)	16 (32.65%)	
II-III				41 (49.40%)	42 (50.60%)	
Resección:						0.776
Completa (R0)				64 (55.17%)	52 (44.83%)	
Incompleta (R1/R2)				10 (62.50%)	6 (37.50%)	
Tumor primario:						<0.001
Resecado				13 (44.83%)	16 (55.17%)	
<i>In situ</i>				5 (9.09%)	50 (90.91%)	

Notas: En las variables categóricas se representa el número (%) de pacientes en cada categoría, mientras que en variables continuas se representa Q2 [Q1; Q3]; p-valores obtenidos mediante la prueba de χ^2 con la corrección de Yates; #: p-valor obtenido mediante la prueba de Wilcoxon, debido a su distribución no paramétrica; CCR: cáncer colorrectal; IMC: índice de masa corporal; PCR: proteína C reactiva; IL-6: interleucina 6; YKL-40: proteína 1 similar a quitinasa-3; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; CACI: índice de comorbilidad de Charlson; CCI = 0-1: ausencia de comorbilidad, CCI = 2: comorbilidad baja, CCI ≥ 3: comorbilidad alta; ASA: Sistema de clasificación del estado físico de la Sociedad Americana de Anestesiólogos; R0: resección completa con márgenes libres, R1: resección macroscópica completa con resto tumoral microscópico; R2: resección incompleta con resto tumoral macroscópico. Los pacientes clasificados según las escalas CCI y ASA y según la "resección" corresponden a pacientes operados, mientras que los pacientes clasificados según el tumor primario corresponden a pacientes con metástasis.



Nota: CCR: cáncer colorrectal; PCR: proteína C reactiva; IL-6: interleucina 6; YKL-40: proteína 1 similar a quitinasa-3; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; CACI: índice de comorbilidad de Charlson; CCI = 0-1: ausencia de comorbilidad, CCI = 2: comorbilidad baja, CCI ≥ 3 : comorbilidad alta; ASA: Sistema de clasificación del estado físico de la Sociedad Americana de Anestesiólogos; R0: resección completa con márgenes libres, R1: resección macroscópica completa con resto tumoral microscópico; R2: resección

incompleta con resto tumoral macroscópico; Los pacientes clasificados según las escalas CCI y ASA y según la “resección” corresponden a pacientes operados, mientras que los pacientes clasificados según el tumor primario corresponden a pacientes con metástasis.

Figura 43: Relación estadísticamente significativa entre el modelo iClin y variables clínicas recogidas en el grupo **control** y en el grupo de pacientes con **CCR**. **A/** A la izquierda, diferencia de mediana del modelo iClin según el hábito tabáquico. A la derecha, asociación entre el modelo iClin y el hábito tabáquico; **B/** A la izquierda, diferencia de la mediana del modelo iClin según el abuso de alcohol. A la derecha, asociación entre el modelo iClin y el abuso de alcohol; **C/** De izquierda a derecha: diferencia de la mediana del logaritmo natural de la concentración de PCR en sangre periférica según el modelo iClin. Diferencia de la mediana del modelo iClin según la concentración de PCR. Asociación del modelo iClin con la concentración de PCR; **D/** Diferencia de la mediana del logaritmo natural de la concentración de IL-6 en sangre periférica según el modelo iClin; **E/** Diferencia de la mediana del logaritmo natural de la concentración de YKL-40 en sangre periférica según el modelo iClin; **F/** A la izquierda, diferencia de la mediana del modelo iClin según la escala del estado funcional ECOG. A la derecha, asociación entre el modelo iClin y la escala ECOG del estado funcional; **G/** Diferencia de la mediana del modelo iClin según la escala ASA; **H/** A la izquierda, diferencia de la mediana del modelo iClin según la escala CCI. A la derecha, asociación entre el modelo iClin y la escala CCI; **I/** A la izquierda, diferencia de la mediana del modelo iClin según el tumor primario. A la derecha, asociación entre el modelo iClin y el tumor primario; **J/** Diferencia en la mediana del tiempo de OS en pacientes con metástasis, según el modelo iClin dicotomizado por el punto de corte estándar.

Tabla 30: Relación de las variables recogidas durante el seguimiento de los pacientes con CCR según el resultado del modelo iClin, para estudiar su posible relación en el pronóstico de la enfermedad.

Modelo iClin	CCR Operados		p-valor
	< 0	> 0	
PFS (meses)	NA [NA; NA]	NA [27.00; NA]	0.150
OS (meses)	NA [93.00; NA]	NA [60.00; NA]	0.170

Modelo iClin	CCR con Metástasis		p-valor
	< 0	> 0	
PFS (meses)	12.00 [5.00; 15.00]	8.00 [4.00; 14.00]	0.190*
OS (meses)	35.00 [15.00; 60.00]	17.00 [9.00; 30.00]	0.030

Notas: Se representa Q2 [Q1; Q3] del tiempo en cada grupo; p-valor obtenido con la prueba de Log-Rank; *: p-valor obtenido de la prueba de Gehan-Breslow; NA: *not available*; PFS: supervivencia libre de progresión; OS: supervivencia global.

La relación entre el modelo iClin y el tiempo de supervivencia global daba una idea de su posible aplicación en el pronóstico de los pacientes con CCR. Al relacionar de manera individual las variables bioquímicas de uso clínico recogidas en los pacientes con CCR (CEA y PCR), también se observó una relación entre la concentración de CEA y la OS de los operados, y entre la concentración de PCR y la OS de los pacientes con Metástasis (Tabla 31).

Tabla 31: Relación de las variables recogidas durante el seguimiento de los pacientes con CCR según la concentración de las variables bioquímicas de uso clínico, para ver su posible aplicación en el pronóstico de la enfermedad.

PDAC Operados						
	CEA ($\mu\text{g/L}$)		p-valor	PCR (mg/L)		p-valor
	< 5	≥ 5		≤ 10	> 10	
PFS (meses)	NA [82.00; NA]	NA [21.5; NA]	0.170*	NA [66.00; NA]	NA [30.00; NA]	0.710*
OS (meses)	NA [85.00; NA]	83.00 [47.00; NA]	0.039*	NA [75.00; NA]	NA [65.00; NA]	0.670*

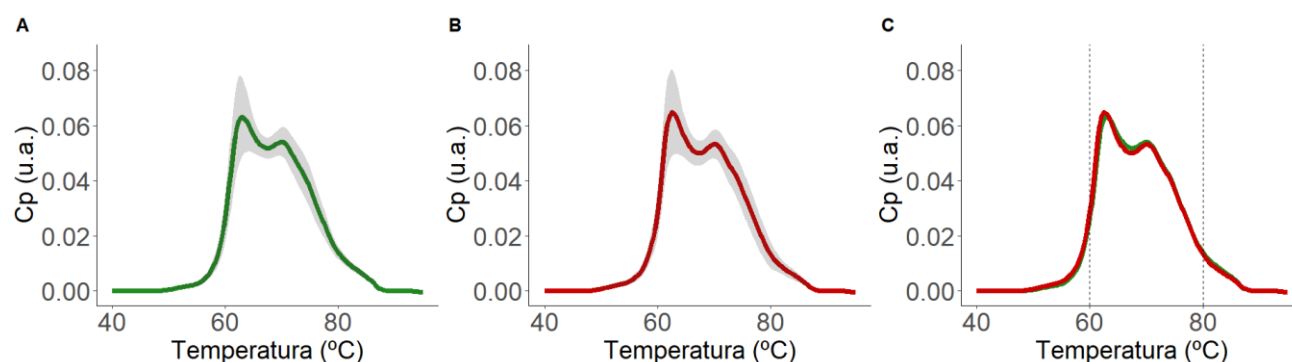
PDAC con Metástasis						
	CEA ($\mu\text{g/L}$)		p-valor	PCR (mg/L)		p-valor
	< 5	≥ 5		≤ 10	> 10	
PFS (meses)	12.00 [5.00; 15.00]	8.00 [4.00; 13.00]	0.120*	11.00 [5.00; 14.00]	8.00 [3.00; 14]	0.170*
OS (meses)	25.50 [13.50; 53.00]	17.00 [8.50; 31.00]	0.095	30.00 [14.00; 53.00]	13.00 [7.00; 27.00]	0.012

Notas: Se representa el tiempo como Q2 [Q1; Q3]; p-valor obtenido de la prueba de Log-Rank; *: p-valor obtenido por la prueba de Gehan-Breslow; CEA: antígeno carcinoembrionario; PCR: proteína C reactiva; PFS: supervivencia libre de progresión; OS: supervivencia global; NA: *not available*.

2. Modelo iTLB

El modelo iClin obtenido previamente tuvo una aceptable capacidad para diferenciar entre el grupo de controles (pacientes sintomáticos sin diagnóstico de cáncer) y el grupo de pacientes con CCR, incluso se observó cierta relación con el pronóstico de los pacientes. Además, se observó una elevada asociación de los falsos negativos y positivos con variables clínicas, que podría más adelante permitir refinar el modelo o modular la interpretación resultante del modelo. Con el objetivo de incorporar la TLB al modelo iClin, previamente era necesario elaborar un modelo iTLB para identificar las parejas de temperaturas más frecuentes, y posteriormente incorporarlas junto a las variables clínicas en un tercer modelo mixto (modelo iTLB+iClin).

El modelo iTLB de clasificación se elaboró a partir de los termogramas normalizados por el área de las muestras de suero obtenidas en cada paciente. Se contaba con 683 muestras, de los cuales 355 (51.98%) correspondían al grupo control (pacientes sintomáticos sin diagnóstico de cáncer), y 328 (48.02 %) a pacientes con diagnóstico de CCR. En las Figura 44.A y B se observan las medias y las desviaciones estándar de las curvas de termogramas normalizadas por el área en cada grupo respectivamente. En la Figura 44.C, donde se superponen ambas medias, se marca con líneas discontinuas verticales a 60°C y 80°C, correspondiente a la información que utilizada para entrenar el modelo de clasificación.



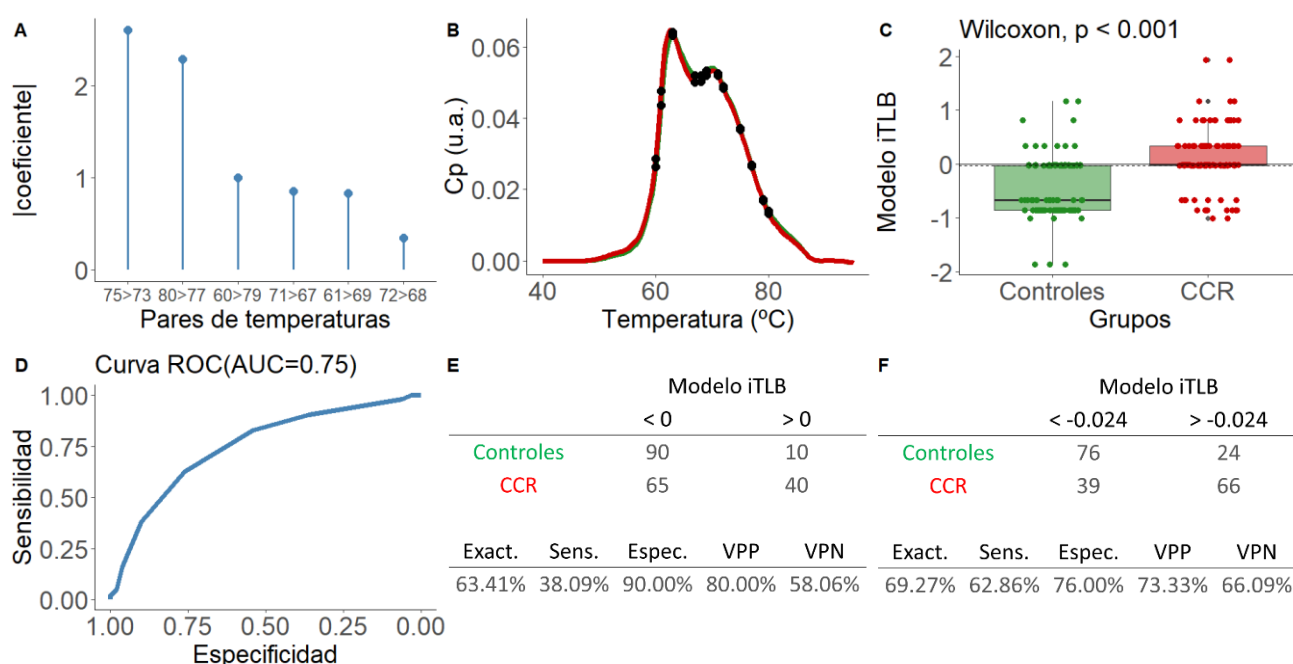
Nota: Cp: capacidad calorífica; u.a.: unidades arbitrarias; CCR: cáncer colorrectal.

Figura 44: Representación de las medias de los termogramas normalizados por el área en cada uno de los grupos (**controles** y pacientes con **CCR**). El sombreado en gris hace referencia a la media \pm desviación estándar en cada grupo.

Además, en la figura C se marca con líneas verticales discontinuas las temperaturas de 60°C y 80°C, ya que este rango de temperaturas fue el utilizado para entrenar el modelo de clasificación.

Se elaboró un modelo iTLB formado por seis parejas de temperaturas, las cuales se pueden observar en la Figura 45.A, junto a los coeficientes en valor absoluto asignados a cada uno de ellos. Estas parejas de temperaturas también se pueden ver situadas en las medias de los termogramas de cada grupo en la Figura 45.B. La media de AUC en los grupos de entrenamiento fue de 0.69 (± 0.01), y en los grupos de validación fue de 0.67 (± 0.03).

Al considerar la respuesta numérica del modelo iTLB como una variable continua, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la mediana del resultado numérico del modelo iTLB entre el grupo control (-0.67 [-0.86; -0.03]) y el grupo con CCR (-0.01 [-0.03; 0.33]) (test de Wilcoxon: p-valor < 0.001) (Figura 45.C), con un AUC en el grupo de validación de 0.75 (IC_{95%} = 0.68-0.81) (Figura 45.D). Al comparar los resultados obtenidos utilizando el punto de corte estándar y el punto de corte calculado de Youden de -0.024, en este último caso se observó que la sensibilidad y el VPN aumentaron considerablemente, con menos falsos negativos en pacientes con CCR, aunque sacrificando un poco la especificidad y el VPP (Figura 45.E y F).



Notas: Cp: capacidad calorífica; u.a.: unidades arbitrarias; CCR: cáncer colorrectal; AUC: área bajo la curva ROC; iTLB: *intelligent Thermal Liquid Biopsy*; Exact: exactitud; Sens: sensibilidad; Espec: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo.

Figura 45: Resultados del modelo iTLB obtenido para diferenciar los termogramas de cada grupo. **A/** Valor absoluto de los coeficientes del modelo iTLB en cada una de las variables predictoras; **B/** Representación de las medias de los termogramas normalizados en cada grupo (**controles** y **CCR**) y marcado con puntos negros se representa las temperaturas utilizadas en el modelo iTLB; **C/** Diferencia de medianas del modelo iTLB en cada grupo (**controles** y **CCR**), representando en líneas horizontales el punto de corte estándar (línea continua) y el de Youden (línea discontinua); **D/** Área bajo la curva ROC del modelo iTLB en el grupo de validación; **E/** Arriba: Tabla de contingencia de la predicción en el grupo de validación, usando el punto de corte estándar. Abajo: índices de rendimiento del modelo iTLB; **F/** Arriba: tabla de contingencia de la predicción en el grupo de validación, usando como punto de corte el de Youden. Abajo: índices de rendimiento del modelo iTLB.

Relación de los resultados del modelo iTLB con variables clínicas

En el modelo iTLB se observó una capacidad para diferenciar a los pacientes controles (enfermos sin diagnóstico de cáncer) de los pacientes con CCR parecida a la del modelo iClin, a partir únicamente de la información de los termogramas. Por ello, se relacionó el modelo iTLB con las variables clínicas recogidas para ver si los valores numéricos del modelo TLB

también presentaban asociación con dichas variables clínicas y si también se podían relacionar con el pronóstico de los pacientes.

Se encontraron relaciones entre el modelo iTLB con el sexo en el grupo control, y con el tabaco en el grupo con CCR, de manera que la mediana del resultado numérico del modelo iTLB era menor en el sexo femenino y en los no fumadores, además de observarse una mayor proporción de falsos negativos en los no fumadores (independientemente del punto de corte utilizado).

También se encontró una relación del modelo iTLB con las cuatro variables bioquímicas (CEA, PCR, IL-6 e YKL-40). En el caso del CEA sólo en el grupo de pacientes con CCR, pero para el resto de los biomarcadores se observó dicha relación en ambos grupos (controles y CCR). En todos los casos se observó que la mediana de las concentraciones de los biomarcadores era menor en los pacientes con un resultado numérico del modelo iTLB por debajo del punto de corte (tanto el punto de corte estándar como el de Youden). Además, en el caso de CEA y de PCR, de las cuales se dispone de un valor de referencia, se observó una mayor proporción de falsos negativos/positivos en los pacientes con concentraciones normales/elevadas de los biomarcadores en sangre periférica.

Además, en el modelo iTLB se encontró únicamente relación con la diferencia de las medianas del tiempo de supervivencia global en los pacientes con metástasis.

Los resultados de las relaciones entre el modelo iTLB y la clínica están en las Tabla 32, Tabla 33, Tabla 34 y Tabla 35. En la Figura 46 se ilustran las diferencias con significancia estadística.

Tabla 32: Relación de variables clínicas con la respuesta numérica del modelo iTLB como variable continua, en cada grupo (controles y CCR).

	Controles	p-valor	CCR	p-valor
Sexo:		0.021		0.180
Masculino	-0.03 [-0.86; -0.01]		-0.01 [-0.03; 0.33]	
Femenino	-0.67 [-0.86; -0.01]		-0.01 [-0.03; 0.33]	
IMC (kg/m²):		0.216		0.617
< 25	-0.03 [-0.86; -0.01]		-0.01 [-0.03; 0.33]	
≥ 25	-0.03 [-0.86; -0.01]		-0.03 [-0.67; 0.33]	
Tabaco:		0.767		0.023
No fumador	-0.03 [-0.86; -0.01]		-0.03 [-0.67; -0.01]	
Fumador+Exfumador	-0.03 [-0.86; -0.01]		-0.01 [-0.03; 0.33]	
Alcohol:		0.060		0.173
No abuso	-0.03 [-0.86; -0.01]		-0.01 [-0.03; 0.33]	
Abuso+Exabuso	-0.67 [-0.86; -0.01]		-0.01 [-0.03; 0.70]	
CEA:		0.307		<0.001
< 5 µg/L	-0.03 [-0.86; -0.01]		-0.01 [-0.03; 0.16]	
≥ 5 µg /L	-0.67 [-0.86; -0.03]		-0.01 [-0.03; 0.33]	
PCR:		<0.001		<0.001
≤ 10 mg/L	-0.03 [-0.86; -0.01]		-0.03 [-0.67; -0.01]	
> 10 mg/L	-0.03 [-0.67; 0.33]		0.33 [-0.01; 0.82]	
ECOG:		0.228		0.068
0	-0.03 [-0.86; -0.01]		-0.01 [-0.03; 0.33]	
I-III	-0.03 [-0.67; -0.01]		-0.01 [-0.03; 0.33]	
CCI:				0.260
0-2			-0.01 [-0.51; -0.01]	
≥ 3			-0.01 [-0.03; 0.33]	
ASA:				0.138
I			-0.03 [-0.67; 0.16]	
II-III			-0.01 [-0.03; 0.33]	
Resección:				0.896
Completa (R0)			-0.01 [-0.67; 0.33]	
Incompleta (R1/R2)			-0.03 [-0.03; 0.16]	
Tumor primario:				0.431
Resecado			-0.01 [-0.03; 0.33]	
<i>In situ</i>			-0.01 [-0.03; 0.82]	

Nota: Los resultados del modelo iTLB están representados como Q2 [Q1; Q3] debido a su carácter no paramétrico; p-valores obtenidos de la prueba de Wilcoxon; CCR: cáncer colorrectal; IMC: índice de masa corporal; CEA: antígeno carcinoembrionario; PCR: proteína C reactiva; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; CCI: índice de comorbilidad de Charlson; CCI = 0-1: ausencia de comorbilidad, CCI = 2: comorbilidad baja, CCI ≥ 3: comorbilidad alta; ASA: Sistema de clasificación del estado físico de la Sociedad Americana de Anestesiólogos; R0: resección completa con márgenes libres, R1: resección macroscópica completa con resto tumoral microscópico; R2: resección incompleta con resto tumoral macroscópico. Los pacientes clasificados según las escalas CCI y ASA y según la "resección" corresponden a pacientes operados, mientras que los pacientes clasificados según el tumor primario corresponden a pacientes con metástasis.

Tabla 33: Relación de variables clínicas con la respuesta numérica del modelo iTLB dicotomizada según el punto de corte estándar de cero, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con CCR.

Modelo iTLB	Controles		p-valor	CCR		p-valor
	< 0	> 0		< 0	> 0	
Sexo:			0.089			0.464
Masculino	117 (84.17%)	22 (15.83%)		116 (67.05%)	57 (32.95%)	
Femenino	196 (90.74%)	20 (9.26%)		97 (62.58%)	58 (37.42%)	
Edad (años)	64.00 [53.00;72.00]	64.50 [48.50;70.00]	0.452 [#]	69.00 [63.00;75.00]	70.00 [64.00;76.00]	0.509 [#]
IMC:			0.226			0.779
< 25 kg/m ²	174 (90.16%)	19 (9.84%)		60 (69.77%)	26 (30.23%)	
≥ 25 kg/m ²	134 (85.35%)	23 (14.65%)		72 (72.73%)	27 (27.27%)	
Tabaco:			0.797			0.023
No fumador	115 (87.79%)	16 (12.21%)		63 (79.75%)	16 (20.25%)	
Fumador+Exfumador	184 (89.32%)	22 (10.68%)		65 (63.11%)	38 (36.89%)	
Alcohol:			0.685			0.110
No abuso	214 (89.54%)	25 (10.46%)		112 (73.20%)	41 (26.80%)	
Abuso+Exabuso	67 (87.01%)	10 (12.99%)		17 (56.67%)	13 (43.33%)	
Ln CEA (µg/L)	0.00 [0.00;1.10]	0.00 [0.00;0.69]	0.618 [#]	1.10 [0.69;2.15]	1.79 [0.69;3.87]	<0.001 #
CEA:			0.744*			<0.001
< 5 µg/L	293 (88.25%)	39 (11.75%)		128 (74.85%)	43 (25.15%)	
≥ 5 µg/L	20 (86.96%)	3 (13.04%)		70 (53.43%)	61 (46.57%)	
Ln PCR (mg/L)	0.50 [- 0.36;1.34]	1.20 [0.25;2.58]	0.001 [#]	0.76 [-0.04;1.71]	2.47 [1.22;3.83]	<0.001 #
PCR:			0.002			<0.001
≤ 10 mg/L	281 (90.35%)	30 (9.65%)		124 (77.50%)	36 (22.50%)	
> 10 mg/L	32 (72.73%)	12 (27.27%)		25 (38.46%)	40 (61.54%)	
Ln IL-6 (ng/L)	0.75 [0.16;1.47]	1.27 [0.70;2.25]	0.010 [#]	0.99 [0.41;1.55]	1.70 [1.10;2.94]	<0.001 #
Ln YKL-40 (µg/L)	4.51 [4.07;4.96]	4.88 [4.17;5.62]	0.014 [#]	4.56 [4.16;5.09]	4.94 [4.50;5.44]	<0.001 #
ECOG:			0.652			0.116
0	266 (88.67%)	34 (11.33%)		148 (68.20%)	69 (31.80%)	
I-III	47 (85.45%)	8 (14.55%)		64 (58.72%)	45 (41.28%)	
CCI:						0.163
0-2				80 (75.47%)	26 (24.53%)	
≥ 3				52 (65.00%)	28 (35.00%)	
ASA:						0.482
I				53 (74.65%)	18 (25.35%)	
II-III				79 (68.70%)	36 (31.30%)	
Resección:						0.993
Completa (R0)				118 (70.66%)	49 (29.34%)	
Incompleta (R1/R2)				14 (73.68%)	5 826.32%)	
Tumor primario:						0.590
Resecado				23 (62.16%)	14 (37.84%)	
<i>In situ</i>				58 (55.24%)	47 (44.76%)	

Notas: Se representa el número (%) de pacientes en variables categóricas, mientras que se representa Q2 [Q1; Q3] debido a su distribución no paramétrica; p-valores obtenidos mediante la prueba χ^2 con la corrección de Yates; *: p-valor obtenido mediante la prueba de Fisher; #: p-valor obtenido mediante la prueba de Wilcoxon; iTLB: *intelligence Thermal Liquid Biopsy*; CCR: cáncer colorrectal; IMC: índice de masa corporal; CEA: antígeno carcinoembrionario; IL-6: interleucina 6; PCR: proteína C reactiva; YKL-40: proteína 1 similar a quitinasa-3; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; CCI: índice de comorbilidad de Charlson; CCI = 0-1: ausencia de

comorbilidad, CCI = 2: comorbilidad baja, CCI ≥ 3: comorbilidad alta; ASA: Sistema de clasificación del estado físico de la Sociedad Americana de Anestesiólogos; R0: resección completa con márgenes libres, R1: resección macroscópica completa con resto tumoral microscópico; R2: resección incompleta con resto tumoral macroscópico. Los pacientes clasificados según las escalas CCI y ASA y según la “resección” corresponden a pacientes operados, mientras que los pacientes clasificados según el tumor primario corresponden a pacientes con metástasis.

Tabla 34: Relación de variables clínicas con la respuesta numérica del modelo iTLB dicotomizada según el punto de corte calculado de Youden, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con CCR.

Modelo iTLB	Controles		p-valor	CCR		p-valor
	< -0.024	> -0.024		< -0.024	> -0.024	
Sexo:			0.218			0.108
Masculino	91 (76.47%)	48 (34.53%)		81 (46.82%)	92 (53.18%)	
Femenino	156 (72.22%)	60 (27.78%)		58 (37.42%)	97 (62.58%)	
Edad (años)	63.00 [51.00;72.00]	67.50 [53.00;72.25]	0.144 [#]	69.00 [63.00;75.00]	69.00 [63.00;75.00]	0.640 [#]
IMC:			0.101			0.304
< 25 kg/m ²	141 (73.06%)	52 (26.94%)		36 (41.86%)	50 (58.14%)	
≥ 25 kg/m ²	101 (64.33%)	56 (35.67%)		50 (50.51%)	49 (49.49%)	
Tabaco:			0.878			0.032
No fumador	91 (69.47%)	40 (30.53%)		45 (56.96%)	34 (43.04%)	
Fumador+Exfumador	146 (70.87%)	60 (29.13%)		41 (39.81%)	62 (60.19%)	
Alcohol:			0.590			0.330
No abuso	164 (68.62%)	75 (31.38%)		74 (48.37%)	79 (51.63%)	
Abuso+Exabuso	56 (72.73%)	21 (27.27%)		11 (36.67%)	19 (63.33%)	
Ln CEA (µg/L)	0.00 [0.00;1.10]	0.00 [0.00;0.69]	0.410 [#]	1.10 [0.52;1.86]	1.61 [0.69;3.51]	0.003[#]
CEA:			0.483			0.005
< 5 µg/L	229 (68.98%)	103 (31.02%)		85 (49.71%)	86 (50.29%)	
≥ 5 µg/L	18 (78.26%)	5 (21.74%)		43 (32.82%)	88 (67.18%)	
Ln PCR (mg/L)	0.32 [-0.43;1.21]	0.86 [0.14;1.83]	<0.001[#]	0.62 [-0.07;1.60]	1.63 [0.77;3.09]	<0.001[#]
PCR:			0.013			<0.001
≤ 10 mg/L	224 (72.03%)	87 (27.97%)		81 (50.63%)	79 (49.37%)	
> 10 mg/L	23 (52.27%)	21 (47.73%)		13 (20.00%)	52 (80.00%)	
Ln IL-6 (ng/L)	0.65 [0.07;1.40]	1.04 [0.56;1.71]	<0.001[#]	0.83 [0.34;1.53]	1.44 [0.82;2.44]	<0.001[#]
Ln YKL-40 (µg/L)	4.45 [4.01;4.92]	4.75 [4.30;5.25]	<0.001[#]	4.51 [4.09;5.10]	4.86 [4.34;5.31]	0.001[#]
ECOG:			0.230			0.098
0	213 (71.00%)	87 (29.00%)		100 (46.08%)	117 (53.92%)	
I-III	34 (61.82%)	21 (38.17%)		39 (35.78%)	70 (64.22%)	
CCI:						0.460
0-2				52 (49.06%)	54 (50.94%)	
≥ 3				34 (42.50%)	46 (57.50%)	
ASA:						0.266
I				37 (52.11%)	34 (47.89%)	
II-III				49 (42.61%)	66 (57.39%)	
Resección:						0.728
Completa (R0)				76 (45.51%)	91 (54.49%)	
Incompleta (R1/R2)				10 (52.63%)	9 (47.37%)	
Tumor primario:						0.902
Resecado				13 (35.14%)	24 (64.86%)	
In situ				40 (38.10%)	65 (61.90%)	

Notas: Se representa el número (%) de pacientes en variables categóricas, mientras que se representa Q2 [Q1; Q3] debido a su distribución no paramétrica; p-valores obtenidos mediante la prueba χ^2 con la corrección de Yates; #: p-valor obtenido mediante la prueba de Wilcoxon; iTLB: *intelligence Thermal Liquid Biopsy*; CCR: cáncer colorrectal; IMC: índice de masa corporal; CEA: antígeno carcinoembrionario; IL-6: interleucina 6; PCR: proteína C reactiva; YKL-40: proteína 1 similar a quitinasa-3; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; CCI: índice de comorbilidad de Charlson; CCI = 0-1: ausencia de comorbilidad, CCI = 2: comorbilidad baja, CCI ≥ 3: comorbilidad alta; ASA: Sistema de clasificación del estado físico de la Sociedad Americana de Anestesiólogos; R0: resección completa

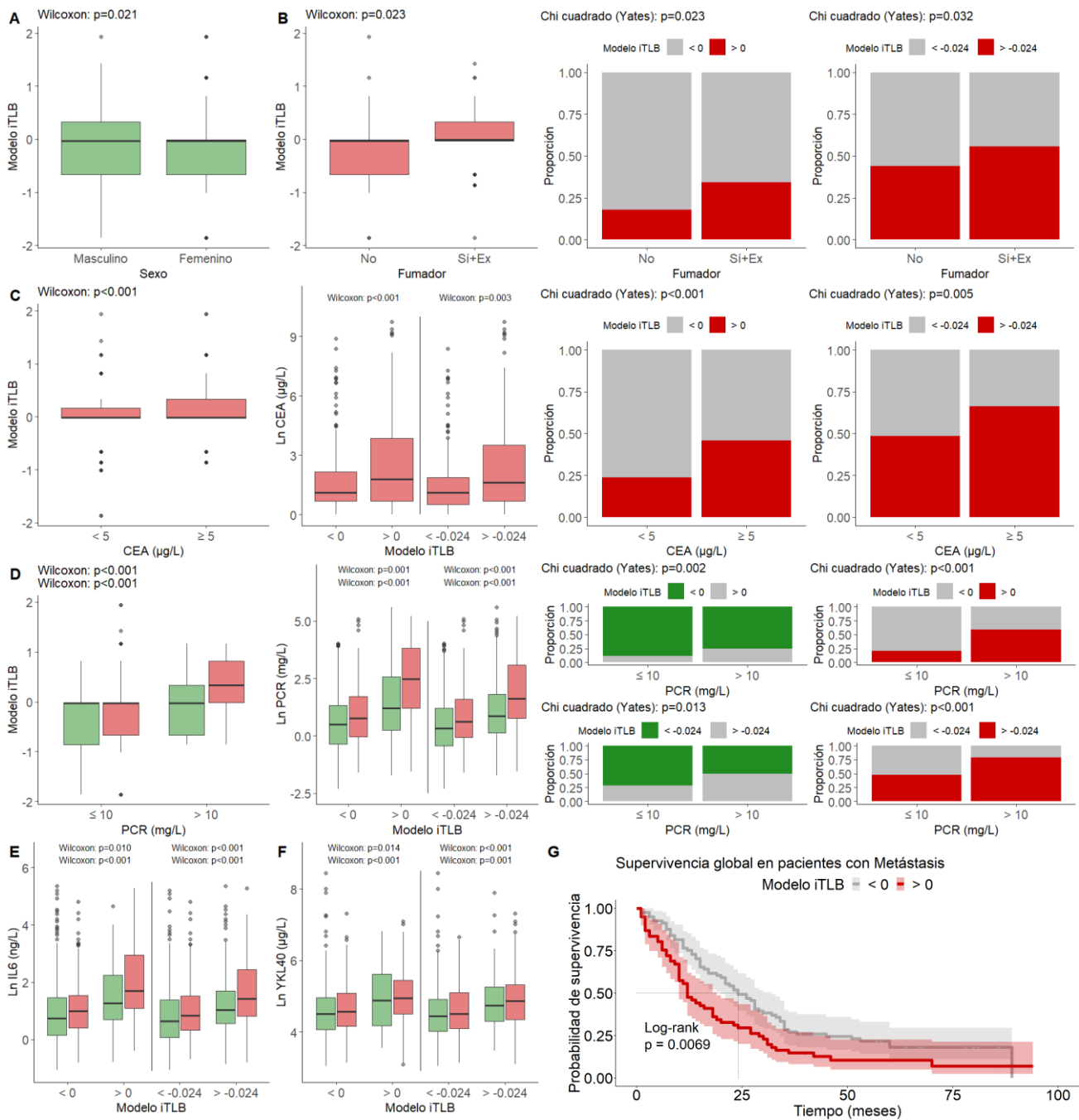
con márgenes libres, R1: resección macroscópica completa con resto tumoral microscópico; R2: resección incompleta con resto tumoral macroscópico. Los pacientes clasificados según las escalas CCI y ASA y según la “resección” corresponden a pacientes operados, mientras que los pacientes clasificados según el tumor primario corresponden a pacientes con metástasis.

Tabla 35: Relación de las variables recogidas durante el seguimiento de los pacientes con CCR según el resultado del modelo iTLB, para ver su posible aplicación en el pronóstico de la enfermedad.

CCR Operados						
Modelo iTLB	< 0	> 0	p-valor	< -0.024	> -0.024	p-valor
PFS (meses)	NA [82.00; NA]	NA [NA; NA]	0.700*	NA [66.00; NA]	NA [NA; NA]	0.820*
OS (meses)	NA [72.00; NA]	NA [72.00; NA]	0.540	NA [73.00; NA]	NA [67.00; NA]	0.300

CCR con Metástasis						
Modelo iTLB	< 0	> 0	p-valor	< -0.024	> -0.024	p-valor
PFS (meses)	10.00 [6.00; 15.00]	8.00 [4.00; 17.00]	0.110*	12.00 [6.00; 16.00]	9.00 [4.00; 15.00]	0.150*
OS (meses)	24.00 [13.00; 45.00]	12.00 [7.00; 29.00]	0.007	22.00 [12.00; 51.00]	16.00 [9.00; 33.00]	0.230

Notas: Se representa el tiempo como Q2 [Q1; Q3]; p-valor obtenido de la prueba de Log-Rank; *: p-valor obtenido por la prueba de Gehan-Breslow; iTLB: *intelligence Thermal Liquid Biopsy*; CCR: cáncer colorrectal; PFS: supervivencia libre de progresión; OS: supervivencia global; NA: *not available*.



Nota: CCR: cáncer colorrectal; iTLB: *intelligence Thermal Liquid Biopsy*; CEA: antígeno carcinoembrionario; PCR: proteína C reactiva; IL-6: interleucina 6; YKL-40: proteína 1 similar a quitinasa-3.

Figura 46: Relación estadísticamente significativa entre el modelo iTLB y variables clínicas recogidas en el grupo control y en el grupo de pacientes con CCR. **A/** Diferencia de mediana del modelo iTLB según el sexo; **B/** De izquierda a derecha: diferencia de la mediana del modelo iTLB según el hábito tabáquico. Asociación entre el hábito tabáquico y el modelo iTLB dicotomizado por el punto de corte estándar. Asociación entre el hábito tabáquico y el modelo iTLB dicotomizado por el punto de corte de Youden; **C/** De izquierda a derecha: diferencia de la mediana del modelo iTLB según la concentración de CEA. Diferencia de la mediana del logaritmo natural de la concentración de CEA en sangre periférica según el modelo iTLB. Asociación entre la concentración de CEA y el modelo iTLB dicotomizado por el punto de corte estándar. Asociación entre la concentración de CEA y el modelo iTLB dicotomizado por el punto de corte de Youden; **D/** De izquierda a derecha: diferencia de la mediana del modelo iTLB según la concentración de PCR. Diferencia de la mediana del logaritmo natural de la concentración de PCR en sangre periférica según el modelo iTLB. Asociación entre la concentración de PCR y el modelo iTLB en el grupo control. Asociación entre la concentración de CEA y el modelo iTLB en el grupo de pacientes con CCR; **E/** Diferencia de la mediana del logaritmo natural de la concentración de IL-6 en sangre

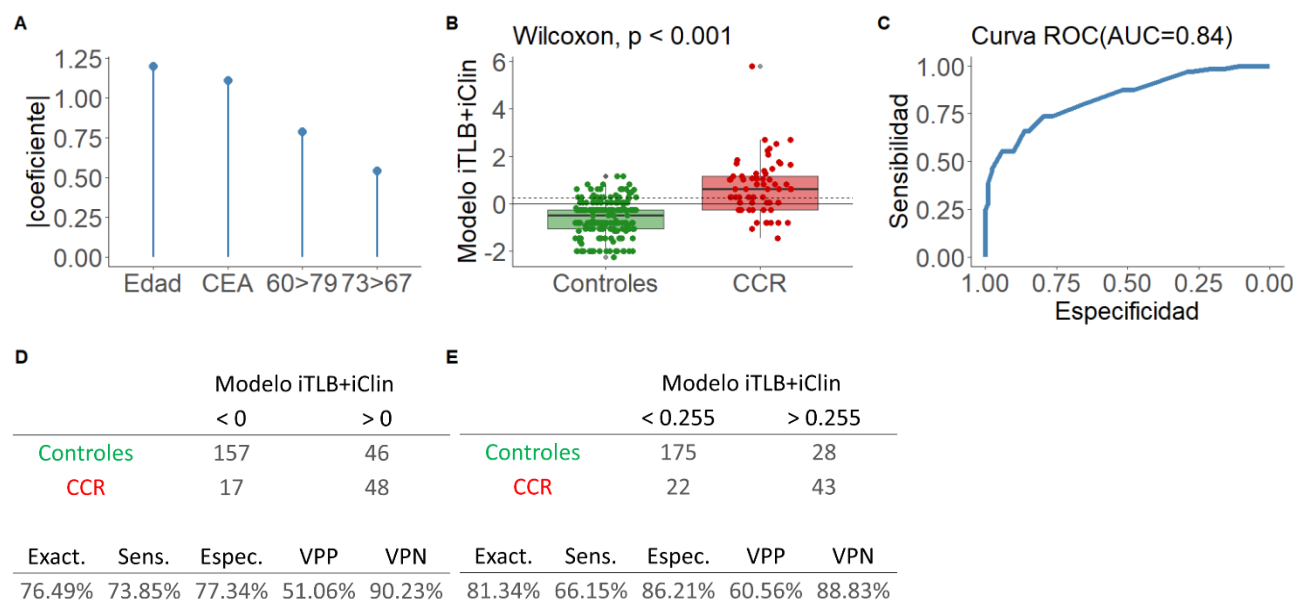
periférica según el modelo iTLB; **F/** Diferencia de la mediana del logaritmo natural de la concentración de YKL-40 en sangre periférica según el modelo iTLB; **G/** Diferencia en la mediana del tiempo de OS en el grupo de pacientes con metástasis, según el modelo iTLB dicotomizado por el punto de corte estándar.

3. Modelo iTLB+iClin

Con el objetivo de mejorar conjuntamente los resultados obtenidos en los modelos iClin y iTLB, se elaboró un tercer modelo mixto (iTLB+iClin), donde se incluyeron variables clínicas (edad y concentración de CEA) y variables procedentes del termograma de suero (pares de temperaturas más frecuentes del modelo iTLB). Para ello se contaba con 570 pacientes (62.11% controles, 354/570), que eran los que tenían información de todas las variables predictoras

Se ajustó un modelo iTLB+iClin a partir de las cuatro variables predictoras con mayor poder predictivo, dos variables clínicas y dos parejas de temperaturas, donde la edad tuvo el mayor coeficiente en valor absoluto (Figura 47.A). La media del AUC en los grupos de entrenamiento fue de 0.79 (\pm 0.02), y en los grupos de validación fue de 0.78 (\pm 0.03).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la mediana del resultado del modelo iTLB+iClin entre el grupo control y el grupo de pacientes con CCR (-0.50 [-1.05; -0.25] y 0.61 [-0.25; 1.15] respectivamente, según la prueba de Wilcoxon (p-valor <0.001) (Figura 47.B), con un AUC de 0.84 (IC_{95%} = 0.78-0.89) en el grupo de validación (Figura 47.C). Al comparar los resultados obtenidos usando el punto de corte estándar de cero y el calculado de Youden de 0.255, se observó una mejora en la especificidad y en el VPP, sacrificando sobre todo la sensibilidad (Figura 47.D y E).



Notas: Las variables que aparecen en la figura **A** es el logaritmo natural de CEA, mientras que la edad está dicotomizada en \leq /> a 50 años; iTLB: *intelligence Thermal Liquid Biopsy*; CEA: antígeno carcinoembrionario; CCR: cáncer colorrectal; AUC: área bajo la curva ROC; Exact: exactitud; Sens: sensibilidad; Espec: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo.

Figura 47: Resultados del modelo iTLB+iClin obtenido para diferenciar al grupo de controles sin diagnóstico de cáncer de los pacientes con CCR. **A/** Valor absoluto de los coeficientes del modelo iTLB+iClin en cada una de las variables predictoras; **B/** Diferencia de medianas de la respuesta numérica del modelo iTLB+iClin en el grupo de validación (**controles** y **CCR**), representando con una línea horizontal continua el punto de corte estándar, y discontinua el de Youden; **C/** Área bajo la curva ROC del modelo iTLB+iClin en el grupo de validación; **D/** Arriba: Tabla de contingencia de la predicción en el grupo de validación, usando el punto de corte estándar. Abajo: índices de rendimiento del modelo iTLB+iClin; **E/** Arriba: tabla de contingencia de la predicción en el grupo de validación, usando como punto de corte el de Youden. Abajo: índices de rendimiento del modelo iTLB+iClin.

Relación de los resultados del modelo iTLB+iClin con variables clínicas

El modelo iTLB+iClin presentó una capacidad mejorada, respecto a iClin y iTLB, para diferenciar entre el grupo control sintomático y el grupo de pacientes con CCR. Por ello, había interés en relacionarlo con las variables clínicas para buscar posibles explicaciones sobre los falsos negativos y positivos y, además, para comprobar su posible aplicación en el pronóstico de los pacientes, de igual manera que se hizo con los anteriores modelos.

Se observó que los pacientes no fumadores y que no abusaban del alcohol tenían una mediana en valor numérico del modelo iTLB+iClin menor que los pacientes fumadores y que abusaban del alcohol. Así, además se encontró una asociación entre los falsos positivos y pacientes fumadores en el grupo control, al igual que falsos negativos y no fumadores en el grupo de pacientes con CCR.

Se encontró una relación entre el modelo iTLB+iClin y las variables bioquímicas (PCR, IL-6 e YKL-40). En el caso de PCR, había relación sólo en el grupo de pacientes con CCR, de manera que los falsos negativos tenían concentraciones de PCR dentro del valor de referencia. En el caso de la IL-6 y del YKL-40, se observó una mayor concentración de ambos biomarcadores en los pacientes con un resultado en el modelo iTLB+iClin por encima de punto de corte (independientemente del punto de corte utilizado, el estándar y el de Youden) tanto en controles como en pacientes con CCR.

Respecto a las escalas recogidas en estos pacientes, se observó que la mediana del modelo iTLB+iClin era mayor en los pacientes con escala del estado funcional ECOG = 1-3, CCI \geq 3 y ASA = II-III. De igual manera, se observó que los pacientes falsos negativos correspondían a las escalas menos graves (ECOG = 0, CCI = 0-2 y ASA = I). Además, se encontraron diferencias en el modelo según si el tumor primario esta reseado o no.

Al comparar con las variables relacionadas con el pronóstico de los pacientes (PFS y OS), se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las medianas de los tiempos de supervivencia global en los pacientes operados.

Los resultados de las relaciones entre el modelo iTLB+iClin y la clínica están en las Tabla 36, Tabla 37, Tabla 38 y Tabla 39. En las Figura 48 y Figura 49 vienen representado donde hay significancia estadística.

Tabla 36: Relación de variables clínicas con el modelo iTLB+iClin considerado como variable continua, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con CCR.

	Controles	p-valor	CCR	p-valor
Sexo:		0.615		0.660
Masculino	-0.26 [-0.80; -0.25]		0.29 [-0.26; 1.42]	
Femenino	-0.50 [-1.05; 0.05]		0.54 [-0.26; 1.32]	
IMC (kg/m²):		0.522		0.517
< 25	-0.50 [-0.91; 0.07]		0.29 [-0.26; 0.61]	
≥ 25	-0.26 [-1.05; -0.25]		-0.18 [-0.26; 0.61]	
Tabaco:		<0.001		0.001
No fumador	-0.80 [-1.46; -0.26]		-0.26 [-0.80; 0.29]	
Fumador+Exfumador	-0.26 [-0.80; 0.19]		0.29 [-0.25; 0.78]	
Alcohol:		0.015		0.392
No abuso	-0.43 [-1.05; -0.18]		0.07 [-0.26; 0.61]	
Abuso+Exabuso	-0.26 [-0.80; 0.29]		0.29 [-0.26; 0.66]	
PCR:		0.523		<0.001
≤ 10 mg/L	-0.50 [-1.05; 0.05]		0.07 [-0.26; 0.61]	
> 10 mg/L	-0.26 [-0.83; -0.18]		1.67 [0.83; 3.22]	
ECOG:		0.001		0.031
0	-0.72 [-1.05; -0.25]		0.29 [-0.26; 1.19]	
1-3	-0.25 [-0.80; 0.29]		0.61 [0.07; 1.70]	
CCI:				0.001
0-2			-0.25 [-0.80; 0.29]	
≥ 3			0.29 [-0.25; 0.83]	
ASA:				0.010
I			-0.26 [-0.80; 0.29]	
II-III			0.29 [-0.26; 0.61]	
Resección:				0.527
Completa (R0)			0.18 [-0.26; 0.61]	
Incompleta (R1/R2)			-0.26 [-0.80; 0.43]	
Tumor primario:				0.018
Resecado			0.61 [-0.26; 2.52]	
<i>In situ</i>			1.84 [1.03; 3.16]	

Nota: Los resultados del modelo iTLB+iClin están representados como Q2 [Q1; Q3] debido a su carácter no paramétrico; p-valores obtenidos con la prueba de Wilcoxon; CCR: cáncer colorrectal; IMC: índice de masa corporal; PCR: proteína C reactiva; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; CCI: índice de comorbilidad de Charlson; CCI = 0-1: ausencia de comorbilidad, CCI = 2: comorbilidad baja, CCI ≥ 3: comorbilidad alta; ASA: Sistema de clasificación del estado físico de la Sociedad Americana de Anestesiólogos; R0: resección completa con márgenes libres, R1: resección macroscópica completa con resto tumoral microscópico; R2: resección incompleta con resto tumoral macroscópico. Los pacientes clasificados según las escalas CCI y ASA y según la "resección" corresponden a pacientes operados, mientras que los pacientes clasificados según el tumor primario corresponden a pacientes con metástasis.

Tabla 37: Relación de variables clínicas con el modelo iTLB+iClin dicotomizada según el punto de corte estándar, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con CCR.

Modelo iTLB+iClin	Controles		p-valor	CCR		p-valor
	< 0	> 0		< 0	> 0	
Sexo:			0.337			0.613
Masculino	108 (77.70%)	31 (22.30%)		42 (36.21%)	74 (63.79%)	
Femenino	156 (72.56%)	59 (27.44%)		32 (32.00%)	68 (68.00%)	
IMC (kg/m²):			0.462			0.360
< 25	139 (72.40%)	53 (27.60%)		26 (41.94%)	36 (58.06%)	
≥ 25	120 (76.43%)	37 (23.57%)		36 (51.43%)	34 (48.57%)	
Tabaco:			<0.001			<0.001
No fumador	116 (89.23%)	14 (10.77%)		37 (63.79%)	21 (36.21%)	
Fumador+Exfumador	134 (65.05%)	72 (34.95%)		22 (31.43%)	48 (68.57%)	
Alcohol:			0.141			0.829
No abuso	180 (75.63%)	58 (24.37%)		49 (46.67%)	56 (53.33%)	
Abuso+Exabuso	51 (66.23%)	26 (33.77%)		10 (41.67%)	14 (58.33%)	
Ln PCR (mg/L)	0.50 [-0.32;1.38]	0.70 [-0.06;1.53]	0.219 [#]	0.35 [-0.18;1.55]	1.62 [0.74;3.33]	<0.001 [#]
PCR:			0.799			<0.001
≤ 10 mg/L	230 (74.19%)	80 (25.81%)		68 (44.74%)	84 (55.26%)	
> 10 mg/L	34 (77.27%)	10 (22.73%)		6 (9.38%)	58 (90.62%)	
Ln IL-6 (ng/L)	0.70 [0.14;1.45]	1.04 [0.52;1.97]	0.005 [#]	0.74 [0.20;1.19]	1.49 [0.79;2.43]	<0.001 [#]
Ln YKL-40 (µg/L)	4.45 [4.03;4.89]	4.82 [4.33;5.30]	<0.001 [#]	4.42 [4.06;4.96]	4.87 [4.33;5.37]	0.002 [#]
ECOG:			<0.001			0.048
0	234 (78.26%)	65 (21.74%)		56 (39.16%)	87 (60.84%)	
1-3	30 (54.55%)	25 (45.45%)		18 (24.66%)	55 (75.36%)	
CCI:						0.029
0-2				41 (56.16%)	32 (43.84%)	
≥ 3				21 (35.59%)	38 (64.41%)	
ASA:						0.106
I				28 (57.14%)	21 (42.86%)	
II-III				34 (40.96%)	49 (59.04%)	
Resección:						0.289
Completa (R0)				52 (44.83%)	64 (55.17%)	
Incompleta (R1/R2)				10 (66.67%)	5 (33.33%)	
Tumor primario:						0.003*
Resecado				3 (5.45%)	52 (94.55%)	
In situ				9 (31.03%)	20 (68.67%)	

Notas: Se representa el número (%) de pacientes en variables categóricas, mientras que se representa el Q2 [Q1; Q3] debido a su distribución no paramétrica; p-valores obtenidos mediante la prueba de χ^2 con la corrección de Yates; #: p-valor obtenido mediante la prueba de Wilcoxon; iTLB: *intelligence Thermal Liquid Biopsy*; CCR: cáncer colorrectal; IMC: índice de masa corporal; IL-6: interleuquina 6; PCR: proteína C reactiva; YKL-40: proteína 1 similar a quitinasa-3; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; CCI: índice de comorbilidad de Charlson; CCI = 0-1: ausencia de comorbilidad, CCI = 2: comorbilidad baja, CCI ≥ 3: comorbilidad alta; ASA: Sistema de clasificación del estado físico de la Sociedad Americana de Anestesiólogos; R0: resección completa con márgenes libres, R1: resección macroscópica completa con resto tumoral microscópico; R2: resección incompleta con resto tumoral macroscópico. Los pacientes clasificados según las escalas CCI y ASA y según la "resección" corresponden a pacientes operados, mientras que los pacientes clasificados según el tumor primario corresponden a pacientes con metástasis.

Tabla 38: Relación de variables clínicas con el modelo iTLB+iClin dicotomizada según el punto de corte calculado de Youden, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con CCR.

Modelo iTLB+iClin	Controles		p-valor	CCR		p-valor
	< 0.255	> 0.255		< 0.255	> 0.255	
Sexo:			0.741			0.219
Masculino	113 (81.29%)	26 (18.71%)		50 (43.10%)	66 (56.90%)	
Femenino	179 (83.26%)	36 (16.74%)		34 (34.00%)	66 (66.00%)	
IMC (kg/m²):			0.695			0.616
< 25	156 (81.25%)	36 (18.75%)		30 (48.39%)	32 (51.61%)	
≥ 25	131 (83.44%)	26 (16.56%)		38 (54.29%)	32 (45.71%)	
Tabaco:			<0.001			0.012
No fumador	120 (92.31%)	10 (7.69%)		37 (63.79%)	21 (36.21%)	
Fumador+Exfumador	157 (76.21%)	49 (23.79%)		28 (40.00%)	42 (60.00%)	
Alcohol:			0.072			0.788
No abuso	200 (84.03%)	38 (15.97%)		54 (51.43%)	51 (48.57%)	
Abuso+Exabuso	57 (74.03%)	20 (25.97%)		11 (45.83%)	13 (54.17%)	
Ln PCR (mg/L)	0.52 [-0.32;1.38]	0.72 [0.07;1.64]	0.130	0.61 [-0.15;1.54]	1.76 [0.74;3.43]	<0.001
PCR:			1.000			<0.001
≤ 10 mg/L	256 (82.58%)	54 (17.42%)		78 (51.32%)	74 (48.68%)	
> 10 mg/L	36 (85.71%)	6 (14.29%)		6 (9.38%)	58 (90.62%)	
Ln IL-6 (ng/L)	0.74 [0.16;1.46]	1.09 [0.55;2.30]	0.004	0.74 [0.24;1.24]	1.52 [0.83;2.51]	<0.001
Ln YKL-40 (µg/L)	4.48 [4.04;4.93]	4.87 [4.33;5.58]	<0.001	4.44 [4.05;5.00]	4.88 [4.37;5.37]	0.001
ECOG:			0.008			0.042
0	254 (84.95%)	45 (15.05%)		63 (44.06%)	80 (55.94%)	
1-3	38 (69.09%)	17 (30.91%)		21 (28.77%)	52 (71.23%)	
CCI:						0.006
0-2				46 (63.01%)	27 (36.99%)	
≥ 3				22 (37.29%)	37 (62.71%)	
ASA:						0.024
I				32 (65.31%)	17 (34.69%)	
II-III				36 (43.37%)	47 (56.63%)	
Resección:						0.502
Completa (R0)				58 (50.00%)	58 (50.00%)	
Incompleta (R1/R2)				10 (62.50%)	6 (37.50%)	
Tumor primario:						0.082
Resecado				7 (12.73%)	48 (87.27%)	
<i>In situ</i>				9 (31.03%)	20 (68.97%)	

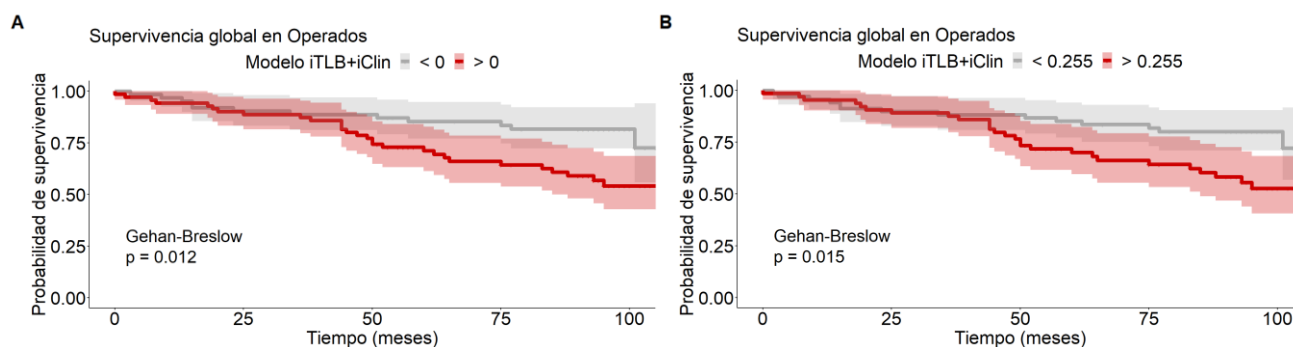
Notas: Se representa el número (%) de pacientes en variables categóricas, mientras que se representa el Q2 [Q1; Q3] debido a su distribución no paramétrica; p-valores obtenidos mediante la prueba de χ^2 con la corrección de Yates; #: p-valor obtenido mediante la prueba de Wilcoxon; iTLB: *intelligence Thermal Liquid Biopsy*; CCR: cáncer colorrectal; IMC: índice de masa corporal; IL-6: interleuquina 6; PCR: proteína C reactiva; YKL-40: proteína 1 similar a quitinasa-3; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; CCI: índice de comorbilidad de Charlson; CCI = 0-1: ausencia de comorbilidad, CCI = 2: comorbilidad baja, CCI ≥ 3: comorbilidad alta; ASA: Sistema de clasificación del estado físico de la Sociedad Americana de Anestesiólogos; R0: resección completa con márgenes libres, R1: resección macroscópica completa con resto tumoral microscópico; R2: resección incompleta con resto tumoral macroscópico. Los pacientes clasificados según las escalas CCI y ASA y según la "resección" corresponden a pacientes operados, mientras que los pacientes clasificados según el tumor primario corresponden a pacientes con metástasis.

Tabla 39: Relación de las variables recogidas durante el seguimiento de los pacientes con CCR según el resultado del modelo iTLB+iClin, para ver su posible aplicación en el pronóstico de la enfermedad.

CCR Operados						
Modelo iTLB+iClin	< 0	> 0	p-valor	< 0.255	> 0.255	p-valor
PFS (meses)	NA [NA; NA]	NA [27.00; NA]	0.150	NA [NA; NA]	NA [22.00; NA]	0.100
OS (meses)	NA [101.00; NA]	NA [50.00; NA]	0.012*	NA [101.00; NA]	NA [50.00; NA]	0.015*

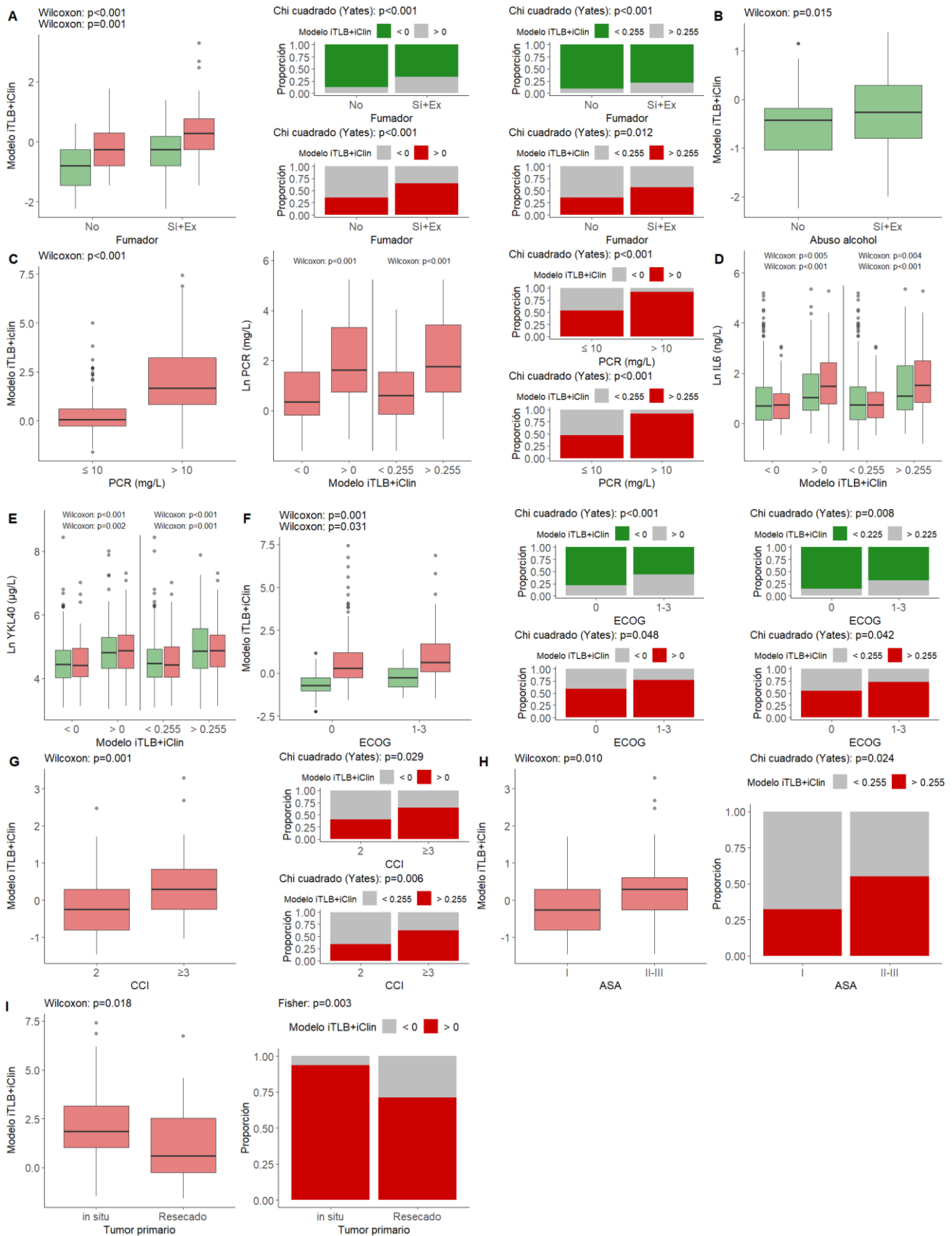
CCR con Metástasis						
Modelo iTLB+iClin	< 0	> 0	p-valor	< 0.255	> 0.255	p-valor
PFS (meses)	13.00 [6.00; 19.50]	8.00 [4.00; 14.00]	0.110	12.00 [4.50; 16.50]	8.00 [4.00; 14.00]	0.200
OS (meses)	35.00 [14.00; NA]	18.00 [9.50; 33.50]	0.077	29.50 [12.00; 70.50]	18.00 [9.50; 33.50]	0.096

Notas: Se representa el tiempo como el Q2 [Q1; Q3]; p-valor obtenido con la prueba de Log-Rank; *: p-valor obtenido por la prueba de Gehan-Breslow; iTLB: *intelligence Thermal Liquid Biopsy*; CCR: cáncer colorrectal; PFS: supervivencia libre de progresión; OS: supervivencia global; NA: *not available*.



Notas: CCR: cáncer colorrectal; iTLB: *intelligence Thermal Liquid Biopsy*; OS: supervivencia global.

Figura 48: Asociación estadísticamente significativa entre el modelo iTLB+iClin y la supervivencia global de los pacientes con **CCR** operados. **A/** Según el modelo iTLB+iClin dicotomizado por el punto de corte estándar; **B/** Según el modelo iTLB+iClin dicotomizado por el punto de corte de Youden.



Notas: CCR: cáncer colorrectal; iTLB: *intelligence Thermal Liquid Biopsy*; PCR: proteína C reactiva; IL-6: interleuquina 6; YKL-40: proteína 1 similar a quitinasa-3; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; CCI: índice de comorbilidad de Charlson; CCI = 0-1: ausencia de comorbilidad, CCI = 2: comorbilidad baja, CCI ≥ 3 : comorbilidad alta; ASA: Sistema de clasificación del estado físico de la Sociedad

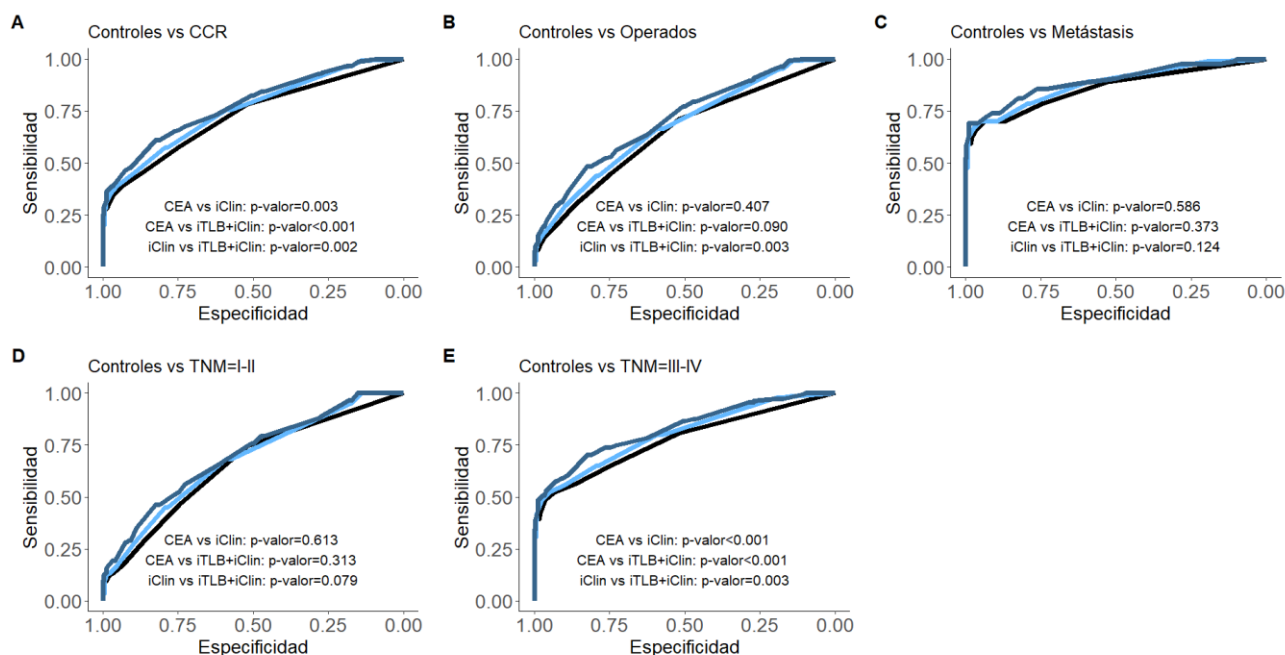
Americana de Anestesiólogos. Los pacientes clasificados según las escalas CCI y ASA y según la “resección” corresponden a pacientes operados, mientras que los pacientes clasificados según el tumor primario corresponden a pacientes con metástasis.

Figura 49: Relación estadísticamente significativa entre el modelo iTLB+iClin y variables clínicas recogidas en el grupo control y en el grupo de pacientes con CCR. **A/** De izquierda a derecha: Diferencia de mediana del modelo iTLB+iClin según el hábito tabáquico. Asociación entre el hábito tabáquico y el modelo iTLB+iClin dicotomizado por el punto de corte estándar. Asociación entre el hábito tabáquico y el modelo iTLB+iClin dicotomizado por el punto de corte de Youden; **B/** Diferencia de la mediana del modelo iTLB+iClin según el abuso del consumo de alcohol; **C/** De izquierda a derecha: Diferencia de la mediana del modelo iTLB+iClin según la concentración de PCR. Diferencia de la mediana del logaritmo natural de la concentración de PCR en sangre periférica según el modelo iTLB+iClin. Asociación entre la concentración de PCR y el modelo iTLB+iClin dicotomizado por el punto de corte estándar (arriba) y de Youden (abajo); **D/** Diferencia de la mediana del logaritmo de la concentración de IL-6 según el modelo iTLB+iClin dicotomizado por el punto de corte estándar (izquierda) y de Youden (derecha); **E/** Diferencia de la mediana del logaritmo de la concentración de YKL-40 según el modelo iTLB+iClin dicotomizado por el punto de corte estándar (izquierda) y de Youden (derecha); **F/** De izquierda a derecha: Diferencia de la mediana del modelo iTLB+iClin según la escala del estado funcional ECOG. Asociación entre la escala ECOG y el modelo iTLB+iClin dicotomizado por el punto de corte estándar. Asociación entre la escala ECOG y el modelo iTLB+iClin dicotomizado por el punto de corte de Youden; **G/** A la izquierda, diferencia en la mediana del modelo iTLB+iClin según la escala CCI. A la derecha, asociación entre la escala CCI y el modelo iTLB+iClin dicotomizado por el punto de corte estándar (arriba) y de Youden (abajo); **H/** A la izquierda, diferencia de la mediana del modelo iTLB+iClin según la escala ASA. A la derecha, asociación entre la escala ASA y el modelo iTLB+iClin según el punto de corte de Youden. **I/** A la derecha, diferencia de la mediana del modelo iTLB+iClin según el tumor primario. A la derecha, asociación entre las características del tumor primario y el modelo iTLB+iClin dicotomizado por el punto de corte estándar.

Comparación de modelos

Para comparar los modelos obtenidos se utilizó como referencia la capacidad diagnóstica del biomarcador individual CEA, que se comparó con el modelo iClin y con el modelo iTLB+iClin (utilizando todos los pacientes, los del entrenamiento y los de validación). De igual manera se compararon estos dos modelos entre sí para analizar si se observaban diferencias estadísticamente significativas al combinar iTLB con iClin.

Primero se utilizaron las áreas bajo las curvas ROC para comparar la capacidad diagnóstica de diferenciar al grupo de pacientes con CCR respecto al grupo control. La AUC del biomarcador CEA fue de 0.73 (IC_{95%} = 0.69-0.77), observándose diferencias estadísticamente significativas con la AUC del modelo iClin (0.76 (IC_{95%} = 0.72-0.80)) y con el modelo iTLB+iClin (0.78 (IC_{95%} = 0.74-0.82)) (Figura 50.A). Después se utilizó la subdivisión del grupo de pacientes con CCR (operados y con metástasis) para analizar la capacidad diagnóstica en cada uno de los grupos. Así, por un lado, la AUC del biomarcador CEA para diferenciar entre controles y pacientes con CCR operados fue de 0.65 (IC_{95%} = 0.59-0.70), la AUC del modelo iClin fue de 0.68 (IC_{95%} = 0.63-0.73) y la del modelo iTLB+iClin fue de 0.71 (IC_{95%} = 0.66-0.76). En este caso, únicamente se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el modelo iClin y el modelo iTLB+iClin (Figura 50.B). Por otro lado, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las áreas bajo las curvas ROC del biomarcador CEA (0.86 (IC_{95%} = 0.81-0.91)), del modelo iClin (0.88 (IC_{95%} = 0.83-0.93)) y del modelo iTLB+iClin (0.89 (IC_{95%} = 0.85-0.94)) para diferenciar entre controles y pacientes con metástasis (Figura 50.C). Por último, se compararon las capacidades diagnósticas de estos tres modelos para diferenciar estadios tempranos (estadio = I-II) y avanzados (estadio = III-IV). En el caso de los estadios tempranos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el marcador tumoral CEA (0.66 (IC_{95%} = 0.60-0.72)), el modelo iClin (0.68 (IC_{95%} = 0.62-0.74)) y el modelo iTLB+iClin (0.70 (IC_{95%} = 0.64-0.77)) (Figura 50). Por el contrario, en los estadios avanzados se encontraron diferencias entre las tres herramientas diagnósticas, obteniendo unas AUC de 0.77 (IC_{95%} = 0.72-0.82), 0.80 (IC_{95%} = 0.76-0.85) y 0.83 (IC_{95%} = 0.78-0.87) para CEA, iClin y iTLB+iClin, respectivamente (Figura 50.E).



Notas: p-valores obtenidos con la prueba de Delong; CCR: cáncer colorrectal; iTLB: *intelligent Thermal Liquid Biopsy*; Estadio según la octava edición de la AJCC.

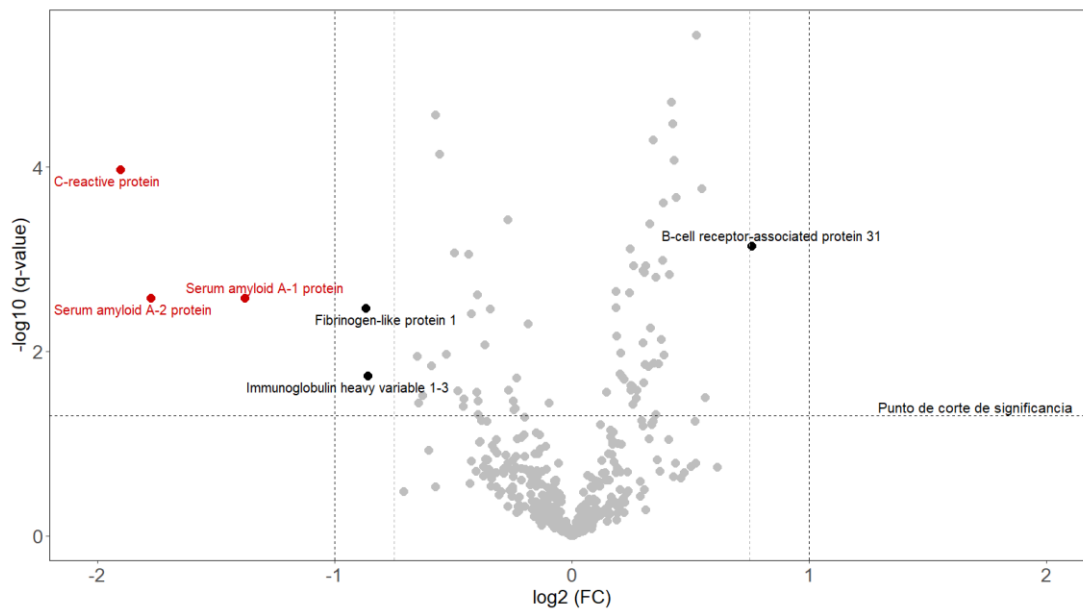
Figura 50: AUC de las curvas ROC del biomarcador **CEA**, del **modelo iClin** y del **modelo iTLB+iClin** para diferenciar el grupo control respecto del: **A/** grupo de pacientes con CCR; **B/** grupo de pacientes con CCR operados; **C/** grupo de pacientes con metástasis; **D/** grupo de pacientes en estadios tempranos (estadio = I-II); y **E/** grupo de pacientes con estadios avanzados (estadio = III-IV).

Análisis de proteómica

Respecto a las variables relacionadas con el pronóstico de los pacientes, concretamente respecto a la supervivencia global, se observó una diferencia estadísticamente significativa en la mediana de los tiempos de OS en los tres modelos propuestos (iClin e iTLB para pacientes con metástasis, y iTLB+iClin para pacientes operados). También se encontró una diferencia en los tiempos de OS según la concentración de CEA (en pacientes operados) y de PCR (en pacientes con metástasis). Debido a que el biomarcador CEA tenía un peso estadístico elevado en el modelo iTLB+iClin, este hecho podía explicar las diferencias observadas en los tiempos de OS. Pero en el caso del modelo iTLB, que se basa en el DSC, técnica que da como resultado un termograma global que no indica qué proteínas son las responsables de los diferentes patrones, era necesario un análisis proteómico para buscar qué proteínas son responsables de las diferencias entre ambos grupos (pacientes con iTLB < 0 y > 0).

Se realizó un análisis proteómico basado en la espectrometría de masas en tándem de alta resolución de 100 muestras (50 de pacientes operados y 50 de pacientes con metástasis) de suero aleatorizadas (67.00% con iTLB < 0) para identificar qué proteínas eran diferentes según el modelo iTLB (< 0/> 0), lo que podría ayudar a explicar el diferente pronóstico en los pacientes según la OS.

Se identificaron y cuantificaron 451 proteínas inicialmente, las cuales se analizaron primero conjuntamente (en las 100 muestras) para buscar diferencias según el modelo iTLB. Tras el proceso de filtrado (al menos en el 50% de uno de los grupos), se redujeron a 408 proteínas. Tras el análisis de los datos, se encontraron tres proteínas estadísticamente diferentes en ambos grupos y con valores de log2 significativos: PCR y las proteínas amiloides A-1 y A-2. Al aplicar un criterio más laxo (*fold change* entre ± 1 y ± 0.75), se encontraron otras tres proteínas que se pudieron considerar estadísticamente significativas: proteína similar a fibrinógeno-1 (FGL1), dominios 1-3 de la cadena pesada de inmunoglobulina, y la proteína 31 asociada al receptor de células B (Figura 51).



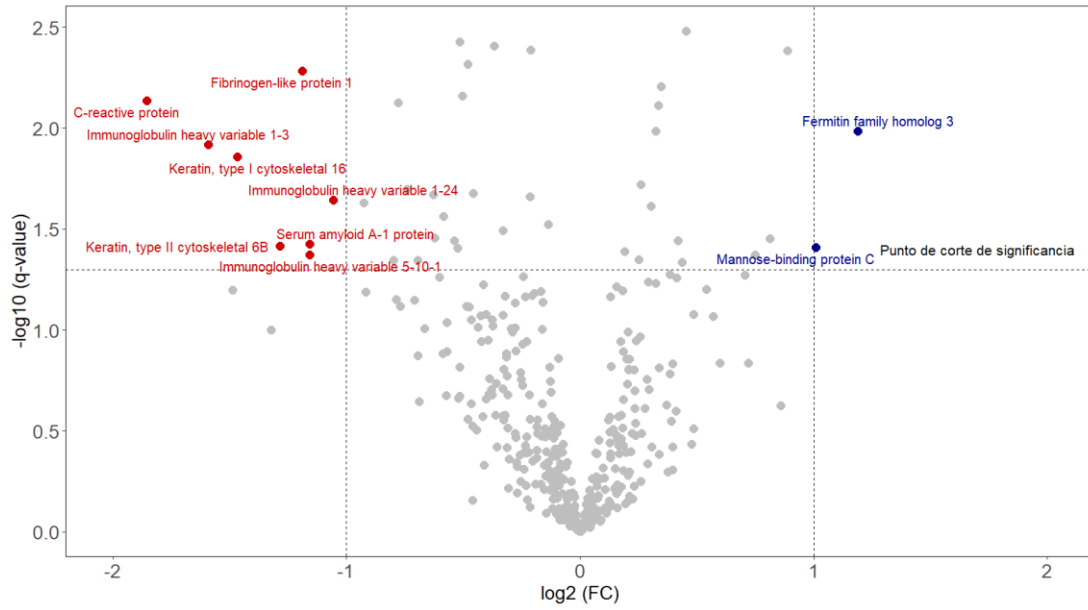
Notas: FC: fold change

Figura 51: Gráfico tipo volcán de 100 muestras de suero de pacientes operados y con metástasis de CCR. Se muestra las proteínas cuya concentración relativa es estadísticamente mayor en el grupo con iTLB > 0 o mayor en el grupo con iTLB < 0 aplicando un umbral de **FC < ±1**, además de las que superan un umbral más laxo de **FC ± 0.75**.

Se repitió el análisis proteómico, pero de manera independiente el grupo de pacientes operados y el grupo de pacientes con metástasis. Las proteínas con diferencias significativas según el valor del modelo iTLB en el grupo de pacientes operados fueron las mismas que cuando se hizo el análisis de manera conjunta, pero aumentaron las diferencias en la proteína FGL1 y en el dominio 1-3 de la cadena pesada de inmunoglobulina, superando el umbral de $FC < -1$. Además, aparecieron otras proteínas significativas y exclusivas del grupo de pacientes operados de CCR (Figura 52).

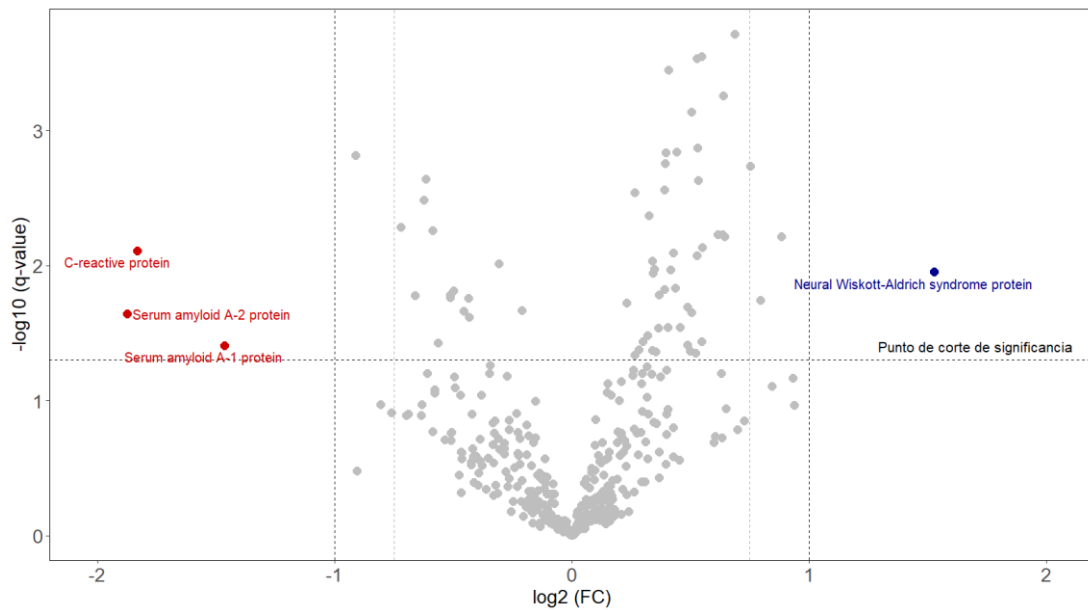
De las proteínas encontradas en el grupo de pacientes operados se hizo una búsqueda bibliográfica para encontrar si alguna de las proteínas identificadas estaba relacionada con pacientes con cáncer y/o con su pronóstico. De esta manera, se encontró que la proteína FGL1 estaba producida por células cancerosas humanas y sus niveles elevados en sangre periférica se asociaba a un mal pronóstico y a una resistencia al tratamiento (anti-PD-1/B7H1); (147,148) Se han encontrado niveles de un tipo de queratina (K20) elevados después de la cirugía y relacionado con una peor supervivencia; (149) La expresión genética de la proteína FERMT3 (*fermitin family homolog 3*) se ha visto relacionada con mejor supervivencia de adenocarcinoma gástrico. (150) La lectina fijadora de manosa (*mannose-binding protein C*) es una molécula implicada en la inmunidad anticancerígena, (151) gracias a un efecto protector contra ciertas infecciones o el desarrollo de algunas neoplasias malignas mediante la lisis directa de células reconocidas o mediante la mejora de la fagocitosis. (152)

El análisis proteómico en el grupo de 50 pacientes con metástasis mostró una relación indirecta entre los niveles relativos de la PCR y las proteínas amiloides A-1 y A-2 con la supervivencia global (al aumentar su concentración relativos, disminuye la OS), mientras que la *neural Wiskott-Aldrich syndrome protein* (WASP) mostraría una relación directa (al aumentar su concentración relativa, aumenta la OS) (Figura 53). En esta última se ha encontrado una relación con el proceso de metástasis a través de la promoción de la migración celular y la remodelación de la matriz extracelular, (153) al mismo tiempo que un aumento de su expresión se ha visto relacionado con mejor pronóstico de los pacientes con CCR. (154)



Notas: FC: *fold change*.

Figura 52: Gráfico tipo volcán de 50 muestras de suero de pacientes operados de CCR. Se muestra las proteínas cuya concentración relativa es estadísticamente mayor en el grupo con **iTLB > 0** o mayor en el grupo con **iTLB < 0** aplicando un umbral de FC < ±1.

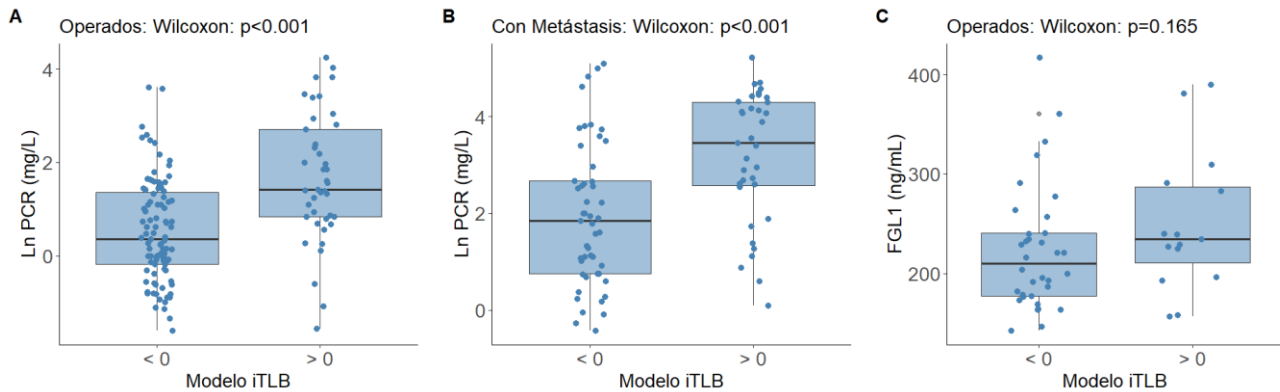


Notas: FC: *fold change*.

Figura 53: Gráfico tipo volcán de 50 muestras de suero de pacientes con metástasis. Se muestra las proteínas cuya concentración relativa es estadísticamente mayor en el grupo con **iTLB > 0** o mayor en el grupo con **iTLB < 0** aplicando un umbral de FC < ±1.

De las proteínas obtenidas en los resultados de proteómica, únicamente se disponía de la concentración en suero de la PCR. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de PCR en suero según el valor de la TLB, tanto en los pacientes operados como en los pacientes con metástasis (Figura 54.A y B).

Del resto de proteínas halladas en los resultados de proteómica, hasta ahora sólo se han obtenido las concentraciones de FGL1 mediante la técnica de ELISA (Elabscience®, catálogo nº E-El-H1667) en las 50 muestras de pacientes operados. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las medianas de las concentraciones de FGL1 en función del modelo iTLB (Figura 54.C).



Notas: PCR: proteína C reactiva; iTLB: *intelligent Thermal Liquid Biopsy*; FGL1: proteína similar a fibrinógeno-1.

Figura 54: Diferencia de medianas de: **A/** La concentración de PCR según el modelo iTLB dicotomizado por el punto de corte estándar en el grupo de pacientes operados; **B/** La concentración de PCR según el modelo iTLB dicotomizado por el punto de corte estándar en el grupo de pacientes con metástasis; **C/** La concentración de FGL1 según el modelo iTLB dicotomizado por el punto de corte estándar, en el grupo de 50 pacientes operados que se analizaron por proteómica.

DISCUSIÓN

Se ha realizado un estudio relacionado con el cáncer de colon (CCR), por ser uno de los más frecuentes, con el objetivo de desarrollar herramientas de clasificación y predictivas dirigidas a mejorar el diagnóstico de los estadios tempranos. Si el CCR se detecta a tiempo, es un tipo de cáncer que tiene baja mortalidad, ya que la cirugía en etapas de desarrollo temprano de CCR tiene un resultado curativo.

Los estudios previos realizados en pacientes con PDAC han demostrado la posible utilidad del TLB en clínica para ayudar en el diagnóstico y/o seguimiento de pacientes. Por ese motivo se ha estudiado el TLB en la patología del CCR.

En el apartado **Transformación del diagnóstico de PDAC: análisis comparativo integral de biomarcadores clínicos, TLB y enfoques integrados** hubo dos conclusiones importantes. Una de ellas fue la importancia de utilizar controles sintomáticos, ya que, aunque se obtienen resultados peores que cuando se utilizan controles asintomáticos, debido a que las diferencias entre controles y pacientes enfermos son menores, los resultados obtenidos tienen mayor relevancia e interés para la translación de la metodología al ámbito clínico. Este fue el motivo por el que se volvió a utilizar la cohorte de controles MICA, pacientes sintomáticos, pero sin un diagnóstico de cáncer durante todo su seguimiento. La segunda conclusión fue la posibilidad de utilizar la metodología propuesta para analizar las curvas de los termogramas TLB junto con variables clínicas para obtener un modelo de clasificación, e incluso el uso de únicamente variables clínicas como variables predictoras del modelo de clasificación. En este estudio sobre CCR se aplicó la misma metodología que con PDAC, con el fin de evaluar si la introducción de la TLB en el modelo iClin, elaborado únicamente con variable clínicas, podía mejorar el diagnóstico.

Para realizar el estudio se contaba con un tamaño muestral de 683 pacientes, divididos casi a partes iguales en controles (pacientes del estudio MICA) y pacientes con un diagnóstico de CCR (de la cohorte REBECCA). Se observó que los pacientes con CCR tenían una mediana de edad mayor, en torno a 70 años, que corresponde con la media de edad de pacientes con CCR en Dinamarca. (155) Se observó una mayor proporción de pacientes de sexo masculino con diagnóstico de CCR, resultado que se relaciona con la mayor incidencia observada en el sexo masculino de manera general (según datos de GLOBOCAN del 2022). Curiosamente en esta población se observó una mayor proporción de pacientes con CCR que no abusaban del alcohol. Este resultado no se relaciona con la bibliografía contrastada, sobre todo porque el abuso del consumo de alcohol, al igual que el tabaco, son factores de riesgo del CCR. (74) Habría que comprobar si este resultado se debe al muestreo o porque hay muchos valores de esta variable ausentes, lo que puede sesgar el resultado obtenido.

Se han obtenido tres modelos (iClin, iTLB, y iTLB+iClin). En el caso del modelo iTLB, los grupos estaban balanceados, es decir, la proporción de controles y de pacientes con CCR era parecida. En cambio, en los modelos iClin y iTLB+iClin, debido a que no se realizó una imputación de datos faltantes, se contaba con un menor número de pacientes en el total y estaban los grupos desbalanceados (en torno al 60% eran controles). Esta información es importante porque puede existir un sesgo si se entrena un modelo a partir de una población desbalanceada, ya que el modelo puede tender a clasificar a los pacientes en la categoría mayoritaria. Se dispone de varias estrategias para evitar este problema, como el muestreo ascendente (*oversampling*) o descendente (*undersampling*), que consiste, respectivamente, en replicar o eliminar aleatoriamente observaciones. (156) En cambio, en este estudio se ha propuesto otra manera de evitar un entrenamiento desbalanceado, que consiste en aleatorizar la selección de 100 pacientes de cada grupo para el grupo de entrenamiento. De esta manera, el ajuste del modelo se realizó con los grupos balanceados (100 pacientes controles y 100 pacientes con CCR).

Otra cuestión a tener en cuenta a la hora de analizar modelos con grupos desbalanceados es la comparación de los modelos según los índices de rendimiento comunes procedentes de la tabla de contingencia, ya que el VPP y el VPN están influenciados por la prevalencia de la enfermedad, es decir, si no están los grupos balanceados estos valores están sesgados. Esto no ocurre con la sensibilidad y la especificidad. Por este motivo, la discusión de los modelos se va a centrar en estos dos últimos parámetros, además de la AUC bajo la curva ROC.

Se ha entrenado un primer modelo basado en variables clínicas, modelo iClin. Se decidió introducir en el modelo la edad, por ser uno de los principales factores de riesgo del CCR. (119) De hecho, la edad es el único criterio de inclusión de los pacientes para el programa de cribado del CCR. (157,158) Además, se introdujo en el modelo la concentración de variables bioquímicas relacionadas con inflamación, como PCR, IL6 e YKL40, debido al importante papel que juega la inflamación en el cáncer. (122–125) Y también se introdujo el biomarcador CEA, que, aunque no es específico, es uno de los más utilizados en CCR. Se comprobó que tanto en la edad como en las variables bioquímicas existían diferencias

estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo con CCR. Debido a que el modelo de clasificación de aprendizaje automatizado incluye una penalización tipo Lasso, de todas las variables introducidas sólo fueron relevantes la edad (dicotomizada en \leq / $>$ de 50 años) y el logaritmo natural de la concentración de CEA. El modelo iClin obtenido se asoció al hábito tabáquico. Este resultado se puede explicar porque está comprobado que los niveles de CEA varían en los fumadores. (159) Por lo tanto, debido a que el modelo iClin incluía la variable CEA y era la que tenía mayor peso (mayor valor absoluto de su coeficiente), también se vio afectado por los factores que condicionan al CEA. De igual manera, se justifica la asociación encontrada entre el modelo y el abuso del consumo del alcohol en el grupo control, debido a que la mayoría de los pacientes que abusan del alcohol también era fumadores.

Las relaciones encontradas entre el modelo iClin y las escalas (ECOG, CCI y ASA) indican que a mayor valor en el modelo iClin, peor era el estado de salud general de los pacientes (mayor valor en las escalas). Además, se encontró una asociación entre el modelo iClin y la supervivencia global de los pacientes con metástasis.

El segundo modelo obtenido, iTLB, construido a partir de variables procedentes de los termogramas TLB de suero (parejas de temperaturas significativas de los termogramas), proporcionó unos resultados que indican que el uso exclusivo del TLB no es suficiente para realizar un diagnóstico o pronóstico de pacientes con CCR, de manera similar al resto de las herramientas disponibles en clínica, ya que no existe una prueba no invasiva *gold standard* para el diagnóstico CCR. Las asociaciones observadas entre el modelo iTLB con el sexo y el hábito tabáquico refuerzan la necesidad de realizar estudios de variaciones en TLB según el sexo, edad, hábito tabáquico, consumo de alcohol, etc. Además, se volvió a encontrar una asociación entre el modelo iTLB y la supervivencia global de los pacientes con metástasis.

El último modelo obtenido, iTLB+iClin, era una combinación de las variables clínicas del modelo iClin y variables del modelo iTLB, siendo su combinación la más significativa. Aunque los coeficientes de las parejas de temperaturas eran menores en valor absoluto que las variables clínicas, no hay que menospreciar que no han sido eliminadas por completo del modelo, como ha ocurrido con otras variables. Las asociaciones encontradas entre el modelo iTLB+iClin fueron las mismas que las encontradas en los dos primeros modelos de manera individual, excepto que en esta ocasión se encontró una asociación con la supervivencia global de los pacientes operados. Este hallazgo se puede justificar porque también se observó una relación entre los niveles de CEA y la OS de los pacientes operados, siendo el biomarcador CEA una de las variables predictivas con mayor peso en el modelo iTLB+iClin.

Aunque a simple vista parece que los modelo iClin y iTLB+iClin eran muy parecidos, por lo que se puede pensar que la TLB realmente no ha mejorado el modelo iClin, si se entra en detalle se puede observar que la sensibilidad se ha mejorado al introducir la TLB, pasando de un 52% a superar el 70%, siendo ésta el punto débil del modelo iClin, y sin sacrificar la especificidad. Además, al comparar las AUC bajo las curvas ROC, se observó que el modelo iClin mejoró al incluir la TLB en el diagnóstico general de los pacientes con CCR, y, particularmente, en los estadios tempranos de la enfermedad (TNM = I-III). Siendo esta población el objetivo para mejorar el diagnóstico y evitar que progresen a estadios más avanzados donde su tratamiento es mucho más complicado.

Por último, en este estudio se ha buscado una nueva aplicación de la TLB. De esta manera, debido a que el modelo iTLB estaba correlacionado con un pronóstico diferente según la supervivencia global de los pacientes con CCR, se aleatorizaron 100 muestras (50% operados y 50% con metástasis) con las que se realizó un estudio proteómico mediante LC-MS, comparando las poblaciones de proteínas encontradas en los dos grupos de pacientes según el valor en el modelo iTLB (\neq cero). De igual manera se repitió el análisis en cada subgrupo de pacientes con CCR (operados y con metástasis). Una de las proteínas encontradas y, que por tanto podría estar relacionada con el pronóstico de los pacientes, es la PCR. Gracias a que se disponía de los niveles de dicha proteína en suero, se confirmó el hallazgo encontrado tanto en los pacientes operados como en los pacientes con metástasis. Además, se han encontrado otras proteínas de las que actualmente no se dispone de su concentración en las muestras de suero. Debido a que la técnica de MS proporciona concentraciones relativas, es necesario confirmar los hallazgos obtenidos mediante técnicas de ELISA. Hasta ahora se ha podido analizar las concentraciones de la proteína FGL1 en los 50 pacientes operados. Son necesarios ampliar al análisis en el resto de los pacientes operados, además de confirmar por ELISA el resto de las proteínas significativas mediante proteómica. Independientemente de esta confirmación, los resultados de proteómica dan una idea de que las diferencias entre los diferentes grupos (en este caso según el modelo iTLB \neq 0) de deben a cambios en un grupo de proteínas, y no en una sola proteína de manera aislada. Además, con estos resultados se quiere resaltar el potencial de la aplicación de la TLB como herramienta para agrupar a los pacientes según los perfiles de termogramas. De esta manera se pueden

establecer grupos que mediante otras escalas de clasificación no sería posibles, con el objetivo último de buscar biomarcadores diferenciales asociados a los patrones de termogramas de TLB, ya sea procedente de una muestra de suero o de otra muestra biológica.

TLB en cribado de cáncer colorrectal

Efecto de la preparación previa a la colonoscopia

El programa de cribado, el cual consiste en la realización del test de SOH y de una colonoscopia en caso de ser, ha reducido la mortalidad del CCR. La colonoscopia se considera la prueba *gold standard* para el diagnóstico de CCR por su elevada sensibilidad, pero además esta técnica permite la eliminación de los pólipos cuando el tamaño lo permite. El test de SOH es una prueba de bajo coste con un valor predictivo negativo elevado, pero con menor especificidad. Por esta razón, existe un elevado porcentaje de pacientes que, aunque dan positivo en el test de SOH, posteriormente no se encuentra ningún hallazgo patológico en la colonoscopia. La principal razón de este hecho es la existencia de otra causa que provoque un sangrado diferente a un pólipo, siendo las más frecuentes las hemorroides y los divertículos. Esto provoca por un lado que un número considerado de pacientes se realicen una colonoscopia, intervención con ciertos riesgos, y por otro lado provoca un aumento en las listas de espera y, que los pacientes que sí tengan pólipos o cáncer tengan que sufrir un retraso en su diagnóstico. Por estas razones son necesarios nuevas herramientas que mejoren el programa de cribado de CCR.

Se propuso la TLB como segunda prueba después del positivo en el test de SOH. Para ello, se realizó un primer reclutamiento de pacientes (n = 514), tomando una muestra de suero el mismo día de la colonoscopia, para evitar visitas innecesarias de los pacientes al hospital, al igual que se ha realizado en otros estudios. (160–164) El día de la colonoscopia los pacientes acuden tras haber tomado una preparación (laxante), además de estar 24 horas sin tomar sólidos. Además se recogió el resultado de la colonoscopia para clasificar a los pacientes en: 1/ Grupo normal (n = 247), que incluye a los pacientes sin hallazgos en el colon y a los pacientes con pólipos no patológicos (hiperplásicos); 2/ Grupo patológico (n = 267), incluidos cualquiera de los siguientes pacientes: 2.A/ Pólipo no avanzado (adenoma tubular < 10 mm y con displasia de bajo grado o pólipo serrado < 10 mm y sin displasia); 2.B/ Pólipo avanzado (adenoma con histología vellosa, ≥ 10 mm, o con displasia de alto grado; o pólipo serrado ≥ 10 mm o con displasia; o más de dos lesiones ya sean adenomas tubulares o serrados, independientemente de sus características); 2.C/ CCR.

Todos los pacientes firmaron un consentimiento voluntariamente, aprobado por el CEICA de Zaragoza (CI: PI19/059 fecha 13 de marzo de 2019, no. 05/2019). El procesamiento de las muestras y la obtención de los termogramas se realizó como se ha descrito previamente en el resto de los apartados.

Cada termograma se analizó aplicando el procedimiento fenomenológico de deconvolución multiparamétrica de seis componentes, para posteriormente obtener un modelo de regresión logística (GLM) mediante la aplicación de los once parámetros secundarios procedentes de cada transición, llamado TLB score. (42,44) Se obtuvo un TLB score con unos resultados no tan prometedores como se habían obtenido previamente en los anteriores estudios. En este punto se puso el foco en el grupo de pacientes con colonoscopia normal y se comparó sus termogramas con los de un grupo de sanos donantes de banco de sangre. Se observó visualmente que existían diferencias entre ambos grupos. Se analizó qué diferencias podían existir entre ellos. Una de las hipótesis era las condiciones preanalíticas de cada grupo, es decir, el grupo de pacientes del programa de cribado habían realizado una preparación justo antes de la toma de la muestra, mientras que los sanos de banco de sangre no. Por esta razón, se inició un estudio secundario para analizar si la preparación de la colonoscopia podía tener un reflejo en suero y detectarse cambios mediante la TLB.

Para estudiar el efecto de la preparación, se reclutó a 55 de pacientes entre enero y febrero del 2020, cuya colonoscopia había sido normal en el primer reclutamiento. En este grupo de pacientes se le tomó una segunda muestra de suero en condiciones preanalíticas estándar (ayuno entre 8-10 horas). Se comparó estos 55 termogramas con los de banco de sangre, donde las diferencias eran mínimas, mientras que al realizar un análisis pareado con sus 55 termogramas de muestras extraídas con preparación, las diferencias eran claras.

A modo de comprobación, se comparó la concentración de la PCR (proteína reactante de fase aguda) y de la albúmina (principal proteína del suero), al igual que los espectros de fluorescencia entre las 55 muestras tomadas con y sin preparación, existiendo diferencias estadísticamente significativas en todos los casos.

Por tanto, las condiciones preanalíticas del paciente son relevantes para la fiabilidad de la TLB. La preparación de la colonoscopia altera los niveles de proteínas sanguíneas (y posiblemente de otros componentes), lo que hace que la TLB (y posibles otras pruebas clínicas basadas en la composición del suero) no sea fiable en términos de clasificar a los pacientes según los resultados de la colonoscopia. En algunos protocolos de investigación que se llevan a cabo en los programas de cribado de CCR, es habitual obtener muestras de sangre en el momento del procedimiento de colonoscopia, pero esto es algo que debe reconsiderarse o se debe analizar el posible efecto de la preparación en la técnica estudiada. La validación del estudio de la TLB en el programa de cribado de CCR se rediseñó según estas conclusiones y, desde entonces, las muestras de suero de los pacientes se recogieron en condiciones preanalíticas estándar (ayuno de 8-10 h).

(Todos los detalles, material y métodos, resultados y discusión se puede ver en detalle en el apartado de **PUBLICACIONES**).

Efecto del diluyente y del tipo de muestra y primera aproximación del modelo iTLB

INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal (CCR), aunque es uno de los más frecuentes, sobre todo en países desarrollados, su mortalidad ha ido disminuyendo en las últimas décadas. (165) Esta reducción se debe en gran parte a la implementación de programas de cribado poblacional. Se ha demostrado que los programas de detección reducen la mortalidad por CCR en ambos sexos. (165,166)

El cribado se define por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como “la identificación presuntiva, con ayuda de pruebas, exámenes u otras técnicas susceptibles de aplicación rápida, de los sujetos afectados por una enfermedad o por una anomalía que hasta entonces había pasado desapercibida”. En el caso del cribado de CCR, el objetivo es la reducción de la mortalidad, ya que la detección temprana mejora drásticamente su pronóstico, pudiendo llegar a ser curable. De hecho, el cribado de CCR es considerado, desde hace tiempo, uno de los programas más eficaces. (84)

En el caso de España, la población diana del actual programa de cribado de CCR son los pacientes asintomáticos entre 50 y 70 años. Consiste en un cribado bifásico o de dos etapas. Una primera fase donde se realiza la prueba de sangre oculta en heces (SOH), seguida de una segunda fase donde se realiza una colonoscopia en caso de que la prueba de SOH sea positivo ($> 20 \mu\text{g}$ de hemoglobina/g de heces). La prueba SOH se caracteriza por ser barata y coste-efectiva. En cambio, es más sensible que específica. Es decir, aproximadamente el 50% de los pacientes con SOH positivo no tienen ninguna lesión patológica observable en la colonoscopia. Una prueba de baja especificidad estadística no sólo aumenta el coste del programa de cribado, sino que también expone innecesariamente a los pacientes a un procedimiento invasivo y con ciertos riesgos como la colonoscopia. Además, aumenta las listas de espera para la colonoscopia (133) y, por tanto, retrasa el diagnóstico de pacientes con lesiones patológicas.

El uso de la TLB como prueba complementaria intermedia entre la SOH y la colonoscopia (después de SOH positivo) podría servir como herramienta no invasiva para seleccionar y priorizar mejor a los pacientes dirigidos a colonoscopia. Uno de los aspectos que se ha estudiado menos frecuentemente son las condiciones preanalíticas de las pruebas de laboratorio, es decir, las condiciones y elementos que abarcan desde la toma de la muestra hasta el análisis de la misma en el laboratorio. En el caso de la TLB, debido a que no es una prueba establecida en los circuitos del laboratorio clínico, no se han realizado demasiados estudios preanalíticos, pero esto es un aspecto que podría afectar a cualquier prueba analítica. Uno de los factores a tener en cuenta en la toma de una muestra de sangre periférica son las condiciones de ayuno del paciente. En el caso de la colonoscopia, los pacientes deben realizar una preparación que consiste en una limpieza del colon. Para ello, deben realizar una dieta libre en residuos y, durante las 24 horas previas a la colonoscopia, deben tomar sólo alimentos líquidos además de un laxante (Citrifleet®). Esta situación no patológica tiene un reflejo en sangre periférica, de manera que técnicas tan sensibles como la TLB pueden detectarlas como patológicas (ver artículo en el apartado de **PUBLICACIONES**). Así, debido a la preparación del paciente, la composición de la sangre periférica (fundamentalmente proteínas, pero en principio también otras biomoléculas) se puede ver alterada. Por esta razón, es muy importante que, si se quiere estudiar la potencial utilización de la TLB en pacientes del programa de cribado de CCR, deben realizarse las extracciones de sangre periférica antes de empezar con la preparación.

Otra de las cuestiones preanalíticas que no se ha estudiado es el tipo de muestra. En el caso de muestras de sangre periférica, la más habitual es la muestra de suero, pero existen otras como el plasma tratado con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), con heparina, etc. Existen pruebas de laboratorio que permiten el uso de varios tipos de muestras indistintamente, como por ejemplo la concentración de glucosa en suero y en plasma de heparina de litio, pero otras pruebas no lo permiten debido a interferencias y/o incompatibilidades. Un caso típico es la concentración del ion potasio en plasma-EDTA, cuya concentración está sobreestimada. En el caso de la TLB, la mayoría de los estudios han empleado muestras de plasma-EDTA, (9,12,15–18,20,33) mientras que unos pocos utilizaron suero, (8,13,21) e incluso existe un estudio que utilizó plasma de heparina de sodio. (41) Además, existe un grupo de publicaciones donde nombran a las muestras como “plasma” sin dejar claro qué tipo de plasma es. (6,7,10,14) Una forma fácil y rápida de saber si el termograma procede de una muestra de suero o de plasma (independientemente del tipo que sea) consiste en observar la transición térmica del fibrinógeno en torno a los 50°C. (167) Lo que no se sabe es si el resto del termograma también cambia según el tipo de muestra. Debido a que no existe ningún estudio de muestras pareadas procedentes de los mismos pacientes y en la misma extracción tratadas de forma diferente (diferente tipo de muestra), no se puede confirmar que se puedan usar indistintamente muestras de suero o plasma.

De igual manera, otra de las variables preanalíticas a tener en cuenta en la TLB es el uso del diluyente de la muestra. La mayoría de los estudios utilizan como diluyente el tampón fosfato salino (PBS), (8,10,13,16,21,29,33,42–44) mientras que hay otros grupos que utilizaron suero fisiológico o cloruro sódico (NaCl) al 0.9%. (12,15,17,18,20,168) Tampoco existe ninguna publicación donde se estudie si el uso de un diluyente u otro puede ser intercambiable, excepto un estudio donde compara el uso de agua con el uso de PBS, en el que concluyen que los termogramas son visualmente diferentes. (169)

Por todas estas razones, en este estudio se propone como **objetivos** analizar el resultado de la TLB en muestras de sangre periférica de pacientes del programa de cribado de CCR para evaluar:

1. Si el uso de suero y plasma-EDTA se puede utilizar indistintamente, mediante la aplicación de la metodología propuesta por nuestro grupo donde se utiliza únicamente el rango entre 60°C y 80°C, evitando la región del fibrinógeno.
2. Si el uso de diferentes diluyentes (PBS, NaCl 0.9% y agua Milli-Q) proporciona diferentes termogramas o se pueden utilizar indistintamente.
3. En el caso de que estas condiciones proporcionen diferentes perfiles de termogramas, se buscarán las condiciones óptimas (más informativas o reproducibles) para su aplicación en el programa de cribado de CCR.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos

Entre marzo del 2021 y mayo del 2022 se reclutaron pacientes procedentes del programa de cribado de cáncer colorrectal que habían dado positivo en la prueba de SOH (punto de corte de 20 µg de hemoglobina por gramo de heces) y que estaban pendientes de la realización de la colonoscopia en el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (HCULB). Se creó un circuito mediante el cual se disponía semanalmente de un listado de pacientes, a los cuales se les había enviado previamente la notificación del resultado del test de SOH positivo. Se contactó telefónicamente con cada paciente para informar del estudio que se estaba realizando, de si querían participar voluntariamente en él y de qué implicaba su participación. Los pacientes que aceptaron fueron citados en el mismo hospital para la obtención de muestras de sangre periférica, antes de empezar con la preparación previa a la colonoscopia (es decir, antes de tomar Citrafleet®). El día de la extracción habían pasado al menos tres horas desde la última comida, sin llegar a ser un ayuno prolongado. Para ello, la hora de la cita era entre las 13h y las 14h aproximadamente, permitiendo tomar el desayuno y no realizar la comida hasta después de la extracción. La toma de líquidos, como agua durante la mañana, sí estaba permitida, incluso muy recomendada en los meses de más calor para facilitar la extracción de sangre. De cada paciente se obtuvo una muestra de suero y una muestra de plasma-EDTA. Se aprovechó el día de la extracción para la firma de los consentimientos informados por parte de los pacientes, de acuerdo con las recomendaciones del Comité de Ética de la Investigación de la Comunidad Autónoma de Aragón (CEICA) (España, CI: PI22/133 a fecha de 18 de mayo de 2022, no. 10/2022).

Los criterios de exclusión fueron:

- Pacientes sintomáticos con indicación de una colonoscopia diagnóstica, con antecedentes de enfermedad inflamatoria intestinal, con riesgo elevado de CCR (CCR familiar, CCR hereditario y síndrome de poliposis, incluido el síndrome de Lynch, poliposis adenomatosa familiar, poliposis asociada a *MUTYH*, síndrome de Peutz-Jeghers, poliposis juvenil, etc.), así como los pacientes remitidos por pólipos y/o vigilancia de CCR.
- Paciente con colonoscopia incompleta donde no se alcanzó el ciego, o con una preparación intestinal inadecuada según la Escala de Preparación Intestinal de Boston. (170)
- Pacientes donde no se recuperó algún pólipo durante la colonoscopia, ya que no permitía una correcta clasificación de los pacientes.

Por lo tanto, se incluyeron en el estudio pacientes asintomáticos con una visualización completa del colon, así como aquellos con una colonoscopia incompleta por la visualización de una masa neoplásica, y cuya extracción de muestras de sangre periférica se realizó antes de la primera colonoscopia, en caso de haber una segunda por mala preparación.

Se recogieron datos demográficos (edad y sexo) y los resultados del informe de la colonoscopia y de anatomía patológica de los pólipos extirpados. En el caso de los pacientes que realizaron dos colonoscopias, debido a que la primera tenía una preparación inadecuada, se tuvieron en cuenta los hallazgos encontrados en ambas colonoscopias.

Clasificación del resultado de la colonoscopia

Se utilizó el informe de la colonoscopia para determinar el número y tamaño de las lesiones, y el resultado del laboratorio de Anatomía Patológica para determinar la displasia y vellosidad de los pólipos, así como la confirmación de los adenocarcinomas. En función de estos resultados, se utilizaron dos guías para la clasificación del resultado de la colonoscopia:

- Según la actualización del 1018 de la Guía de Práctica Clínica del Diagnóstico y Prevención del Cáncer de Colon: (85,86)
 - *Colonoscopia sin Hallazgos*: se incluyen aquellos pacientes en cuya colonoscopia no se encontró ninguna lesión, donde algunos de ellos podían tener alguna patología que pudiera justificar el sangrado en heces (hemorroides, divertículos, etc.). También se incluyó en este grupo a los pacientes con pólipos no patológicos conocidos como hiperplásicos.

- *Colonoscopia con Pólipos No Avanzados*: pacientes con 1 o 2 pólipos, menores a 10 mm y con displasia de bajo grado.
 - *Colonoscopia con Pólipos Avanzados*: pacientes que cumplen uno de los siguientes criterios: con 3 o más pólipos independientemente de su tamaño y displasia; o que algún pólipo tenga más de 10 mm; o que algún pólipo tenga displasia de alto grado.
 - *Colonoscopia con CCR*: pacientes con adenocarcinoma.
- Según la actualización del 2020 de la Sociedad Europea de Endoscopias Digestivas: (86)
 - *Colonoscopia sin Hallazgos*: pacientes sin lesiones patológicas, como los incluidos en la guía del 2018.
 - *Colonoscopia sin Seguimiento*: pacientes entre 1 y 4 pólipos, menores de 10 mm y con displasia de bajo grado.
 - *Colonoscopia con Seguimiento a los 3 años*: se incluyen en este grupo aquellos pacientes que cumplen una de las siguientes características: tener 5 o más pólipos; o tener un pólipo mayor a 10 mm; o tener un pólipo con displasia de alto grado.
 - *Colonoscopia con Seguimiento a los 3-6 meses*: tener al menos un pólipo de 20 mm o más.
 - *Colonoscopia con CCR*: pacientes con adenocarcinoma, como en la guía del 2018.

Para aplicar la metodología de análisis de los termogramas propuesta y descrita previamente en el apartado **Desarrollo de un modelo de aprendizaje automatizado para el diagnóstico y pronóstico del cáncer de páncreas mediante muestras de suero analizadas por TLB**, era necesario dividir en dos grupos a los pacientes. De esta manera, se utilizaron tres clasificaciones del resultado de la colonoscopia:

- Clasificación A: Sin Hallazgos vs Pólipos (no avanzados y avanzados) y CCR, según la guía del 2018.
- Clasificación B: Sin Hallazgos y Pólipos No Avanzados vs Pólipos Avanzados y CCR, según la guía del 2018.
- Clasificación C: Sin Hallazgos y Sin Seguimiento vs Con seguimiento (a los 3 años y a los 3-6 meses) y CCR, según la guía del 2020.

Procesamiento de las muestras de suero

De cada paciente se obtuvo una muestra de suero y una muestra de plasma-EDTA, ambas tras centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se separó en alícuotas y se prepararon las diferentes diluciones para su análisis en por la TLB. De cada muestra (suero y plasma-EDTA) se realizaron tres tipos de diluciones, cada una de ellas con un diluyente diferente. Específicamente, en este estudio se utilizó PBS, NaCl 0.9% y agua Milli-Q, aplicando en todas ellas el mismo factor de dilución de 1:25. Las diferentes diluciones y las alícuotas de suero y plasma-EDTA sobrante se guardó a -80°C. Las diluciones se descongelaron el día del análisis en el calorímetro automático de alta sensibilidad VP-DSC (MicroCal, Malvern-Panalytical, Malvern, UK). Todas las muestras, alícuotas y diluciones recibieron un código interno para asegurar el anonimato de las muestras, de acuerdo con las recomendaciones del CEICA aprobadas.

La obtención de los termogramas a partir de muestras de suero y plasma-EDTA se realizó como se ha explicado en el apartado **Desarrollo de un modelo de aprendizaje automatizado para el diagnóstico y pronóstico del cáncer de páncreas mediante muestras de suero analizadas por TLB**.

Análisis de los datos

Metodología para obtener los modelos de clasificación

Según el tipo de muestra (suero y plasma-EDTA), el tipo de diluyente usado (PBS, NaCl 0.9% y agua Milli-Q) y el tipo de clasificación de la colonoscopia (Clasificación A, B y C), se aplicó la metodología propuesta previamente en el apartado **Desarrollo de un modelo de aprendizaje automatizado para el diagnóstico y pronóstico del cáncer de páncreas mediante muestras de suero analizadas por TLB**, para el análisis de termogramas y la obtención de un modelo de

clasificación basado en algoritmos de aprendizaje automatizado, caracterizado por el uso de parejas de temperaturas como variables predictivas, aplicando penalizaciones tipo Lasso y aleatorizando 100 veces el grupo de entrenamiento y validación. Debido a que se disponía siempre de grupos desbalanceados, el entrenamiento se realizó con 50 pacientes de un grupo (sin hallazgos patológicos en la colonoscopia) y 50 pacientes del otro (con hallazgos patológicos en la colonoscopia), aleatorizando 100 veces su selección, y validando con el resto de los pacientes de cada grupo. Se aplicaron todas las combinaciones posibles (muestra, diluyente y clasificación según la colonoscopia) obteniendo 18 modelos iTLB basados únicamente en el análisis de termogramas (Tabla 40).

Tabla 40: Combinaciones según el tipo de muestra, el tipo de diluyente y el tipo de clasificación según el resultado de la colonoscopia, para obtener 18 modelos iTLB distintos, uno para cada condición.

Diluyente:	Muestra:	
	Suero	Plasma-EDTA
PBS	Clasificación A	Clasificación A
	Clasificación B	Clasificación B
	Clasificación C	Clasificación C
NaCl 0.9%	Clasificación A	Clasificación A
	Clasificación B	Clasificación B
	Clasificación C	Clasificación C
Agua mili-Q	Clasificación A	Clasificación A
	Clasificación B	Clasificación B
	Clasificación C	Clasificación C

Notas: Clasificación A: sin hallazgos vs pólipos no avanzados o avanzados o CCR; Clasificación B: sin hallazgos o pólipos no avanzados vs pólipos avanzados o CCR; Clasificación C: sin hallazgos o sin seguimiento vs con seguimiento a los 3 años o a los 3-6 meses o con CCR; PBS: tampón fosfato salino; NaCl: cloruro sódico; EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

Comparación de los termogramas según el tipo de diluyente y el tipo de muestra utilizada

Con el objetivo de analizar si el uso de diferentes diluyentes/muestras proporcionaba diferentes curvas de termogramas y, si en algún caso sería compatible el uso de un diluyente/muestra u otro indistintamente, primero se compararon las curvas de los termogramas visualmente. En el caso de que visualmente no se observasen diferencias, se compararon las parejas de temperaturas (variables predictoras de los modelos iTLB), partiendo de la hipótesis de que, si los termogramas eran intercambiables, se seleccionarían parejas de temperaturas iguales o parecidas en los modelos iTLB ajustados cuando se cambiaban las condiciones (el tipo de muestra o el tipo de diluyente). En el caso de que se encontrasen modelos iTLB con las mismas parejas de temperaturas o parecidas, se aplicó el modelo iTLB ajustado bajo unas condiciones (un tipo de muestra y un tipo de diluyente) sobre los termogramas obtenidos bajo otras condiciones (otro tipo de muestra u otro tipo de diluyente). En este caso, se utilizó los resultados del modelo iTLB usando el punto de corte estándar de cero para comparar si el modelo iTLB clasificaba de igual manera (< o > cero) a los termogramas obtenidos bajo unas condiciones u otras.

Selección del modelo iTLB óptimo para el programa de cribado de cáncer colorrectal

Se obtuvieron 18 modelos iTLB procedentes únicamente del análisis de los termogramas, cada uno de ellos con diferentes condiciones (tipo de muestra, de diluyente y de clasificación según el resultado de la colonoscopia). La selección del modelo óptimo para poder aplicar en el programa de cribado de cáncer colorrectal se decidió aplicando el siguiente criterio: el mejor equilibrio entre clasificar correctamente al mayor número de pacientes con CCR, y maximizar la especificidad (reducir el número de falsos negativos).

Posteriormente se propuso la introducción de las variables sexo (masculino/femenino) y edad (dicotomizado por su mediana). Para introducir alguna de estas variables, primero se analizó si existían diferencias estadísticamente

significativas entre los grupos que se pretendían diferenciar (colonoscopia sin hallazgos patológicos vs colonoscopia con hallazgos patológicos). En este caso particular se consideró un p-valor de 0.25 para valorar la introducción de estas variables. Si cumplían este requisito, se introducían en el modelo junto con las parejas de temperaturas más frecuentes de cada modelo iTLB (de igual manera que se ha realizado en el apartado **Transformación del diagnóstico de PDAC: análisis comparativo integral de biomarcadores clínicos, TLB y enfoques integrados**, y en el apartado **Aportación de la TLB en el diagnóstico temprano del CCR y en la búsqueda de nuevos biomarcadores junto con la espectrometría de masas**). De esa forma se obtuvieron otros 18 nuevos modelos. La selección del óptimo se realizó aplicando los mismos criterios descritos anteriormente.

Análisis estadístico aplicado

La prueba de Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors o de Shapiro-Wilk (según el tamaño muestral) se realizó para evaluar la normalidad de las variables. Las medianas entre dos grupos independientes se compararon mediante la prueba de Wilcoxon de muestras no pareadas para variables no distribuidas normalmente. La asociación entre grupos para variables cualitativas se evaluó mediante la prueba de χ^2 de Pearson con la corrección de Yates. La comparación de AUC de las curvas ROC se realizó mediante la prueba de Delong. Para todos los test, un p-valor bilateral inferior a 0.05 se consideró estadísticamente significativo, excepto cuando se relacionó la edad y el sexo con el resultado de la colonoscopia, donde se aplicó un p-valor de 0.25 para la introducción de estas variables en el modelo. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el lenguaje y entorno para la informática estadística del equipo central de R, en su versión 4.3.2 (31 de octubre de 2023).

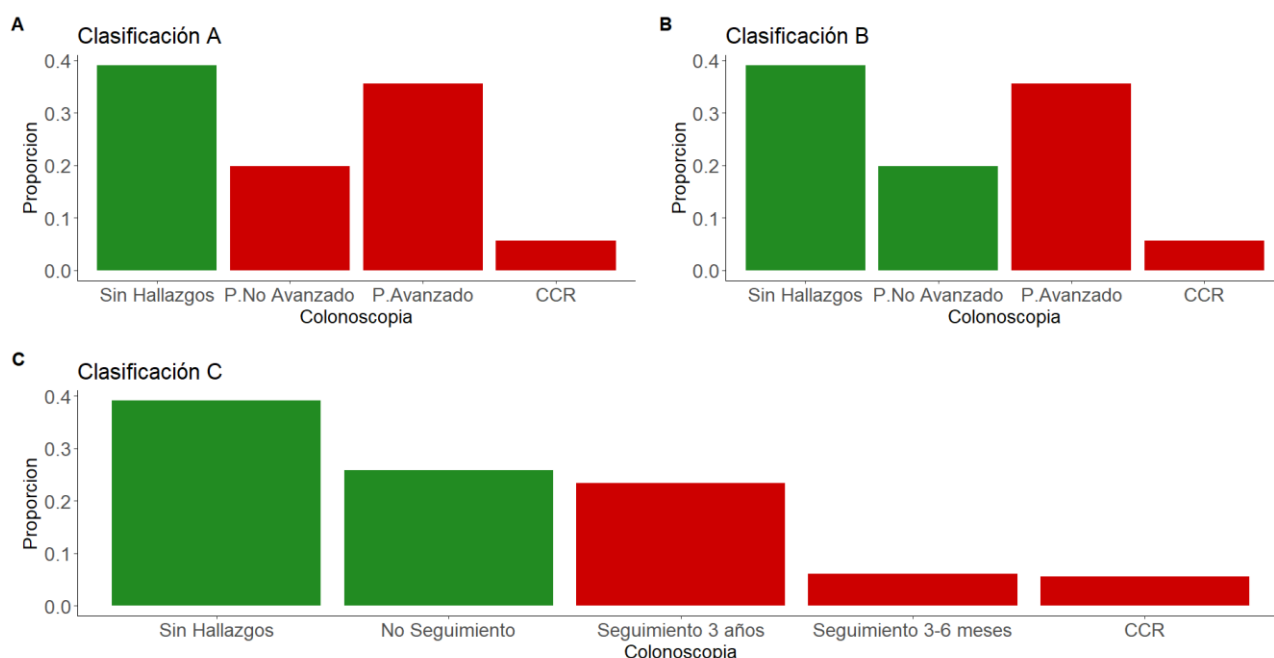
RESULTADOS

Se reclutaron 209 pacientes procedentes del programa de cribado de CCR, los cuales dieron positivo en el test de SOH. De los 209 pacientes, 12 de ellos fueron excluidos del estudio por los siguientes motivos: 9 pacientes no pudieron clasificarse por no tener un resultado fiable de la colonoscopia, sobre todo porque no se había recuperado algún pólipo; hubo 2 pacientes con diagnóstico de enfermedad inflamatoria digestiva (colitis); a uno de los pacientes se le realizó la extracción de sangre periférica justo antes de la segunda colonoscopia, ya que se le pidió repetir la primera por no estar suficientemente limpio el colon para realizar la visualización por parte de los endoscopistas. A los 197 pacientes restantes se les extrajo una muestra de suero y una muestra de plasma-EDTA, excepto a dos pacientes cuya muestra de plasma-EDTA no se pudo realizar debido a una extracción complicada. Por lo tanto, finalmente se dispuso de 197 muestras de suero y 195 muestras de plasma-EDTA.

De los 197 pacientes incluidos en el estudio, el 53.81% (106/197) eran de sexo masculino, con una mediana de edad de 64.00 años [61.00; 67.00]. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la mediana de la edad de los pacientes de sexo masculino (64.00 [61.00; 67.00] años) y femenino (64.00 [61.00; 67.00] años) (prueba de Wilcoxon: p-valor = 0.803).

Según el resultado de la colonoscopia y de las guías aplicadas (la del 2018 y la del 2020), se clasificó a los pacientes según:

- **Clasificación A:** el 39.09% (77/197) tuvieron una colonoscopia sin hallazgos y el 60.91% (120/197) restante tenían algún pólipo (no avanzado o avanzado) o CCR (Figura 55.A).
- **Clasificación B:** el 58.89% (116/197) tuvieron una colonoscopia sin hallazgos o con pólipos no avanzados, mientras que el 41.11% (81/197) tuvieron pólipos avanzados o CCR (Figura 55.B).
- **Clasificación C:** el 64.97% (128/197) no necesitaron un seguimiento tras la colonoscopia (bien porque no hubo hallazgos en la colonoscopia o porque las lesiones encontradas no requerían de un seguimiento), y el 35.03% (69/197) sí lo necesitaron (algunos a los 3 años, otros a los 3-6 meses y un pequeño grupo, por recibir un diagnóstico de CCR) (Figura 55.C).



Notas: P: pólipo; CCR: cáncer colorrectal.

Figura 55: Proporción de pacientes del programa de cribado de cáncer de colorrectal, según el resultado de la colonoscopia. **A/** Clasificación A: Sin Hallazgos vs Pólipos (no avanzados, avanzados) y CCR; **B/** Clasificación B: Sin Hallazgos

y Pólipos No Avanzado vs Pólipos Avanzados y CCR; **C/** Clasificación C: Sin Hallazgos y Sin Seguimiento vs Con seguimiento (a los 3 años y a los 3-6 meses) y CCR.

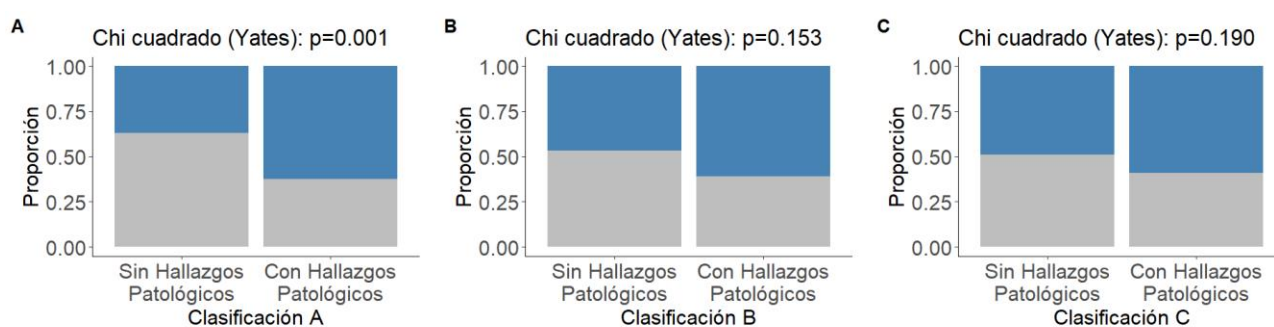
No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la mediana de edad de los dos grupos generados según el resultado de la colonoscopia (Clasificación A, B y C) (Tabla 41). En cambio, sí se observó una mayor proporción de pacientes de sexo masculino en los grupos con hallazgos patológicos en la colonoscopia, aunque sólo fue estadísticamente significativo en la Colonoscopia A (Tabla 41 y Figura 56).

Tabla 41: Relación de la edad y el sexo según el resultado de la colonoscopia (Clasificación A, B y C).

	Edad (años)		p-valor
	Sin Hallazgos Patológicos	Con Hallazgos Patológicos	
Clasificación A	64.00 [61.00; 67.00]	64.00 [61.00; 67.00]	0.823
Clasificación B	64.00 [61.00; 67.00]	64.00 [61.00; 67.00]	0.795
Clasificación C	64.00 [61.00; 67.00]	63.00 [61.00; 68.00]	0.774

	Sexo				p-valor
	Sin Hallazgos Patológicos		Con Hallazgos Patológicos		
	Masculino	Femenino	Masculino	Femenino	
Clasificación A	30 (38.96%)	47 (61.04%)	76 (63.33%)	44 (36.67%)	0.001
Clasificación B	57 (49.14%)	59 (50.86%)	49 (60.49%)	32 (39.51%)	0.153
Clasificación C	64 (50.00%)	64 (50.00%)	42 (60.87%)	27 (39.13%)	0.190

Notas: Se representa Q2 [Q1; Q3] de las variables continuas, y el número (%) de las variables categóricas; p-valores obtenidos con la prueba de Wilcoxon al comparar la mediana de una variable continua entre dos grupos, o mediante la prueba de χ^2 (con la corrección de Yates) al analizar la asociación de dos variables categóricas; CCR: cáncer colorrectal; Sin Hallazgos Patológicos en Clasificación A: sin hallazgos; Sin Hallazgos Patológicos en Clasificación B: sin hallazgos o con pólipos no avanzados; Sin Hallazgos Patológicos en Clasificación C: sin hallazgos o sin seguimiento; Con Hallazgos Patológicos en Clasificación A: pólipos no avanzados o avanzados o CCR; Con Hallazgos Patológicos en Clasificación B: con pólipos avanzados o CCR; Con Hallazgos Patológicos en Clasificación C: con seguimiento a los 3 años o 3-6 meses o con CCR.



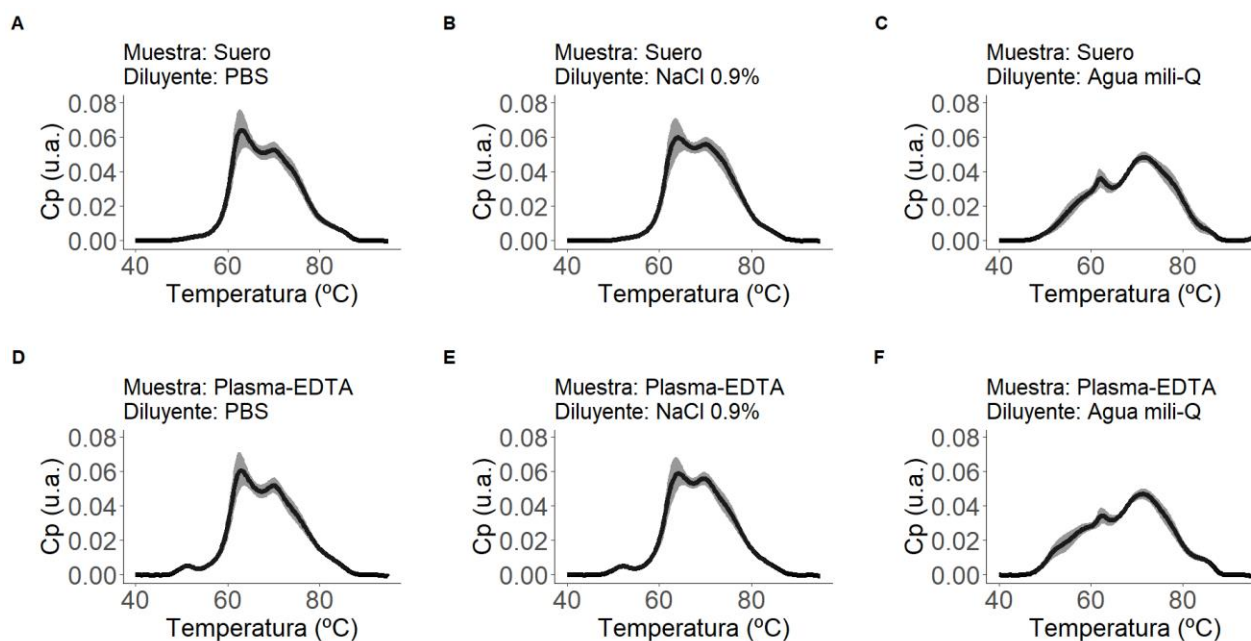
Notas: Sin Hallazgos Patológicos en Clasificación A: sin hallazgos; Sin Hallazgos Patológicos en Clasificación B: sin hallazgos o con pólipos no avanzados; Sin Hallazgos Patológicos en Clasificación C: sin hallazgos o sin seguimiento; Con Hallazgos Patológicos en Clasificación A: pólipos no avanzados o avanzados o CCR; Con Hallazgos Patológicos en Clasificación B: con pólipos avanzados o CCR; Con Hallazgos Patológicos en Clasificación C: con seguimiento a los 3 años o 3-6 meses o con CCR.

Figura 56: Asociación entre el sexo (**masculino** y **femenino**) de los pacientes del programa de cribado de cáncer colorrectal y el resultado de la colonoscopia. **A/** Según la Clasificación A; **B/** Según la Clasificación B; **C/** Según la Clasificación C.

A. Comparación de los termogramas obtenidos al utilizar diferentes diluyentes (PBS, NaCl 0.9% y agua mili-Q) y distintos tipos de muestras (suero y plasma-EDTA)

Comparaciones visuales de los termogramas

La comparación de los termogramas obtenidos según el tipo de diluyente usado (PBS, NaCl 0.9% y agua mili-Q) y según el tipo de muestra (suero y plasma-EDTA) se realizó primero de forma visual. Como se puede ver en la Figura 57, los termogramas obtenidos cuando se usaba agua Milli-Q como diluyente eran muy diferentes a cuando se usaba PBS o NaCl 0.9%. Mientras que al comparar los termogramas según el tipo de muestra, se observa el pico en torno a los 50°C en las muestras de plasma-EDTA. Este pico se aprecia sobre todo al usar como diluyente PBS o NaCl 0.9%. Es decir, al usar como diluyente el agua Milli-Q no se observa dicho pico, lo que disminuye las diferencias entre las muestras de suero y plasma-EDTA.



Notas: Cp: capacidad calorífica; u.a.: unidades arbitrarias; PBS: tampón fosfato salino; NaCl: cloruro sódico; EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

Figura 57: Medias y desviación estándar en sombreado de los termogramas obtenidos según diferentes tipos de muestras y distintos diluyentes.

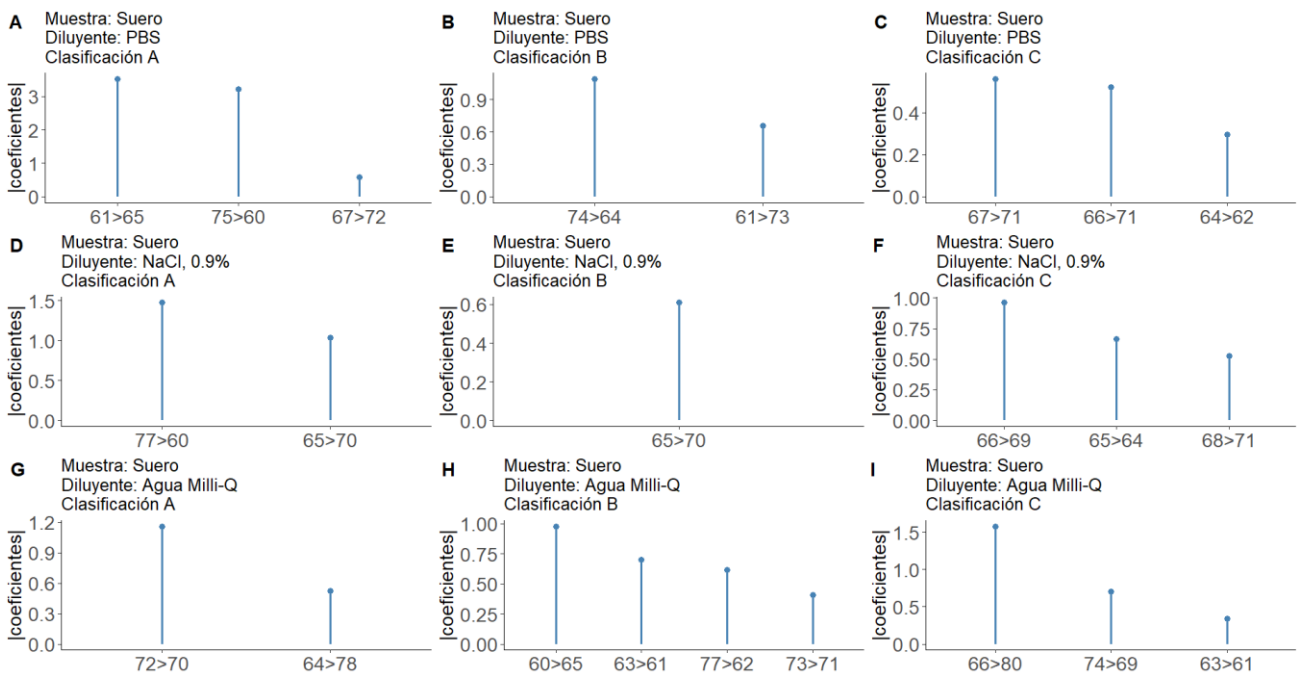
Efecto del diluyente a través de los coeficientes de los modelos iTLB

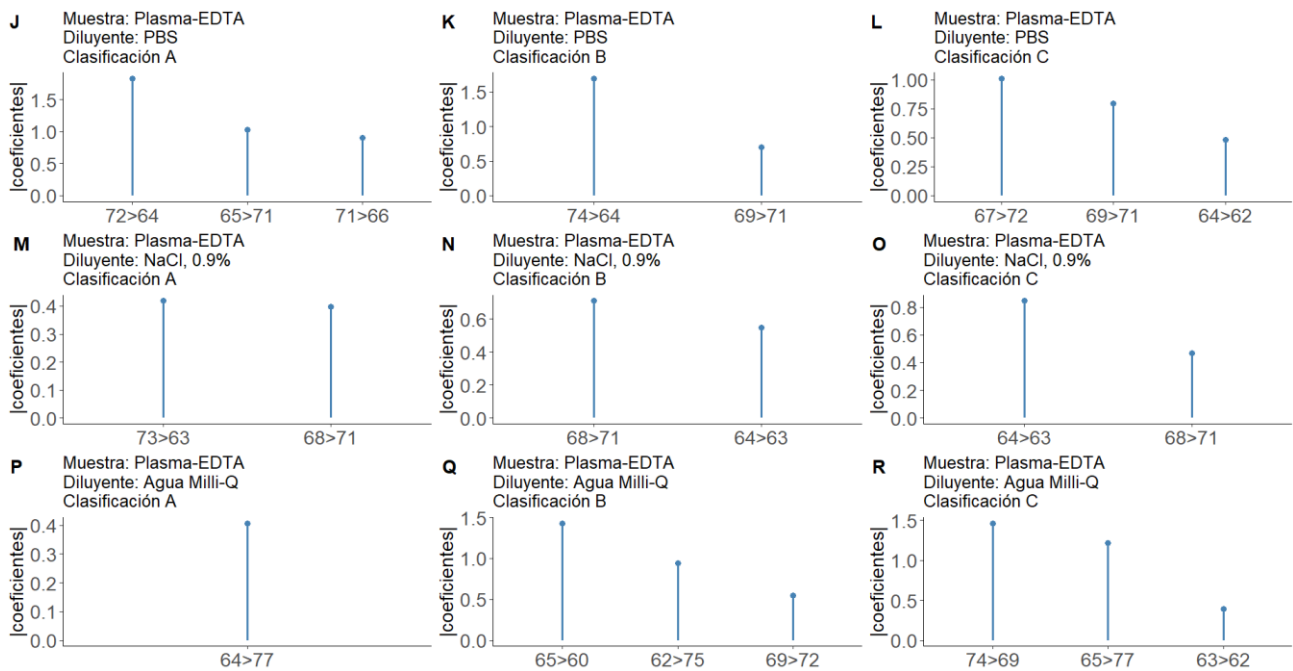
Debido a que los termogramas obtenidos cuando se usaba como diluyente PBS y NaCl 0.9% eran muy parecidos, posteriormente se compararon las parejas de temperaturas seleccionadas en los modelos iTLB ajustados usando cada uno de los diluyentes, según la metodología propuesta para el análisis de termogramas. Para cada una de las condiciones se obtuvieron tres modelos iTLB, según el resultado de la colonoscopia (Clasificación A, B y C). Como se puede observar en la Figura 58, se compararon las parejas de temperaturas según mismo resultado en la colonoscopia (Clasificación A, B y C) y según mismo tipo de muestra (suero o plasma-EDTA), es decir, se compararon las parejas de temperaturas de las Figura 58.A, B, C, J, K y L con las parejas de temperaturas de las Figura 58.D, E, F, M, N y O respectivamente. No se observó ninguna pareja de temperatura que se repitiera en cada una de las comparaciones predichas.

Efecto de la muestra a través de los coeficientes de los modelos iTLB

Debido a que visualmente no era posible distinguir entre suero y plasma-EDTA dentro del rango entre los 60°C y los 80°C, rango que se utiliza en la metodología propuesta para obtener los modelos iTLB, se compararon las parejas de

temperaturas seleccionadas en los modelos iTLB obtenidos según se emplease muestra de suero o de plasma-EDTA. Es decir, se compararon las Figura 58.A, B, C, D, E, F, G, H e I con las Figura 58. J, K, L, M, N, O, P, Q y R respectivamente. Se observó que la pareja de temperaturas “74>64” se repetía tanto en suero como en plasma-EDTA cuando se utilizaba el PBS como diluyente y se obtenía un modelo para diferenciar los pacientes según la Clasificación B (Figura 58.B y K). Lo mismo ocurría con la pareja de temperaturas “68>71” en suero y plasma-EDTA al usar NaCl 0.9% como diluyente y obtener un modelo para diferenciar a los pacientes según la Clasificación C (Figura 58.F y O). Además, se encontró una mayor similitud en las parejas de temperaturas seleccionadas entre los modelos obtenidos en suero y plasma-EDTA al usar como diluyente el PBS y diferenciar a los pacientes según la Clasificación C (Figura 58.C y L), ya que las tres parejas de temperaturas, aunque no eran exactamente las mismas en todos los casos, tenían valores muy próximos. También, se observó una elevada similitud en las parejas de temperaturas entre los modelos obtenidos en suero y plasma-EDTA al usar como diluyente el agua Milli-Q y diferenciar a los pacientes según la Clasificación C (Figura 58.I y R).





Notas: PBS: tampón fosfato salino; NaCl: cloruro sódico; EDTA: ácido etilendiaminotetraacético; Clasificación A: sin hallazgos vs pólipos no avanzados o avanzados o CCR; Clasificación B: sin hallazgos o pólipos no avanzados vs pólipos avanzados o CCR; Clasificación C: sin hallazgos o sin seguimiento vs con seguimiento a los 3 años o a los 3-6 meses o con CCR.

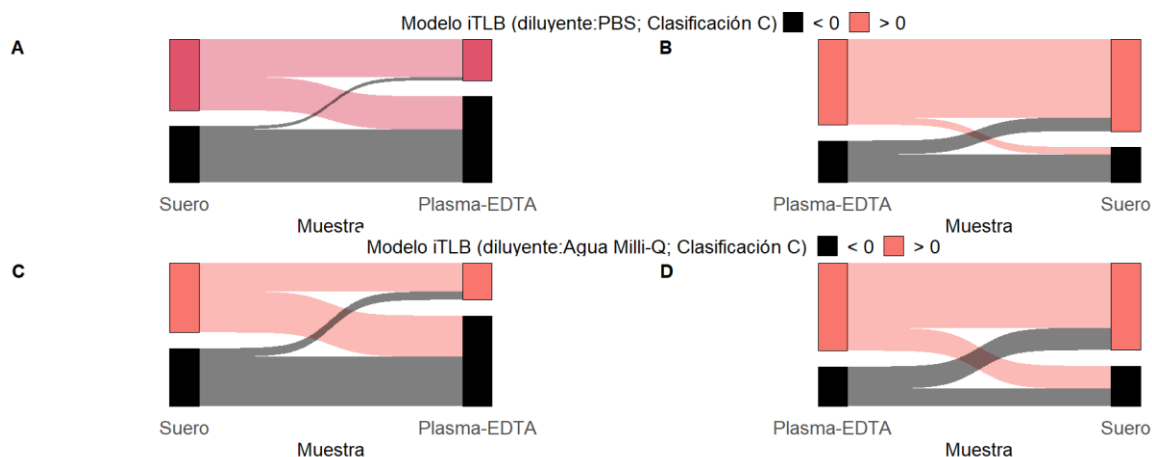
Figura 58: Valor absoluto de los coeficientes de las variables predictoras (parejas de temperaturas) seleccionadas en los diferentes modelos iTLB obtenidos en cada una de las condiciones: según el tipo de muestra, suero (A-I) o plasma-EDTA (J-R); según el diluyente empleado, PBS (A-C, J-L) o NaCl 0.9% (D-F, M-O) o agua Milli-Q (G-I, P-R); según el resultado de la colonoscopia, Clasificación A (A, D, G, J, M, P) o Clasificación B (B, E, H, K, N, Q) o Clasificación C (C, F, I, L, O, R).

Efecto de la muestra aplicando los modelos iTLB ajustados en suero, sobre los termogramas de plasma-EDTA y viceversa

Se encontraron elevadas semejanzas en las parejas de temperaturas de los modelos iTLB al comparar el tipo de muestra (suero y plasma-EDTA), para diferenciar según la Clasificación C, tanto al usar PBS como agua Milli-Q como diluyente. Para comprobar si eran intercambiables las muestras de suero y plasma-EDTA bajo estas condiciones, por un lado, se aplicó el modelo iTLB obtenido en muestras de suero a los termogramas de muestras de plasma-EDTA de los mismos pacientes, usando en ambos casos PBS como diluyente y la categoría Clasificación C. Se observó que 5 pacientes con resultado negativo (< 0) en el modelo iTLB en suero obtenían luego un resultado positivo (> 0) al usar la información de sus termogramas de muestras de plasma-EDTA. Además, 51 pacientes con resultado positivo en el modelo iTLB en suero obtuvieron un resultado negativo al aplicar dicho modelo sobre los termogramas de muestras de plasma-EDTA (Figura 59.A). Es decir, un 28.72% (56/195) de los pacientes no tuvieron los mismos resultados cuando se usó la información de sus termogramas de muestras de suero o de plasma-EDTA. Se repitió lo mismo, pero aplicando el modelo iTLB en plasma-EDTA sobre los termogramas en suero (Figura 59.B), obteniendo que 21 pacientes con resultado negativo (< 0) en el modelo iTLB en plasma-EDTA obtenían luego un resultado positivo (> 0) al usar la información de sus termogramas de muestras de suero. Y 11 pacientes con resultado positivo en el modelo iTLB en plasma-EDTA, obtuvieron un resultado negativo al aplicar dicho modelo sobre los termogramas de muestras de suero. Es decir, un 16.41% (32/195) de los pacientes no obtuvieron los mismos resultados según la muestra utilizada (plasma-EDTA o suero) al usar PBS como diluyente.

Por otro lado, se aplicó el modelo iTLB obtenido en muestras de suero a los termogramas de muestras de plasma-EDTA y viceversa, usando en ambos casos como diluyente el agua Milli-Q y para diferenciar según la Clasificación C. Se observó que 13 pacientes con resultado negativo (< 0) en el modelo iTLB en suero obtenían luego un resultado positivo (> 0) al usar la información de sus termogramas de muestras de plasma-EDTA. Además, 63 pacientes con resultado positivo en el modelo iTLB en suero obtuvieron un resultado negativo al aplicar dicho modelo sobre los termogramas de muestras de plasma-EDTA (Figura 59.C). Es decir, un 38.97% (76/195) de los pacientes no tuvieron los mismos resultados cuando se

usó la información de sus termogramas de muestras de suero o de plasma-EDTA. Se repitió lo mismo, pero aplicando el modelo iTLB en plasma-EDTA sobre los termogramas en suero (Figura 59.D), obteniendo que 34 pacientes con resultado negativo (< 0) en el modelo iTLB en plasma-EDTA obtenían luego un resultado positivo (> 0) al usar la información de sus termogramas de muestras de suero. Y 35 pacientes con resultado positivo en el modelo iTLB en plasma-EDTA, obtuvieron un resultado negativo al aplicar dicho modelo sobre los termogramas de muestras de suero. Es decir, un 35.38% (69/195) de los pacientes no obtuvieron los mismos resultados según la muestra utilizada (plasma-EDTA o suero) al usar agua Milli-Q como diluyente.

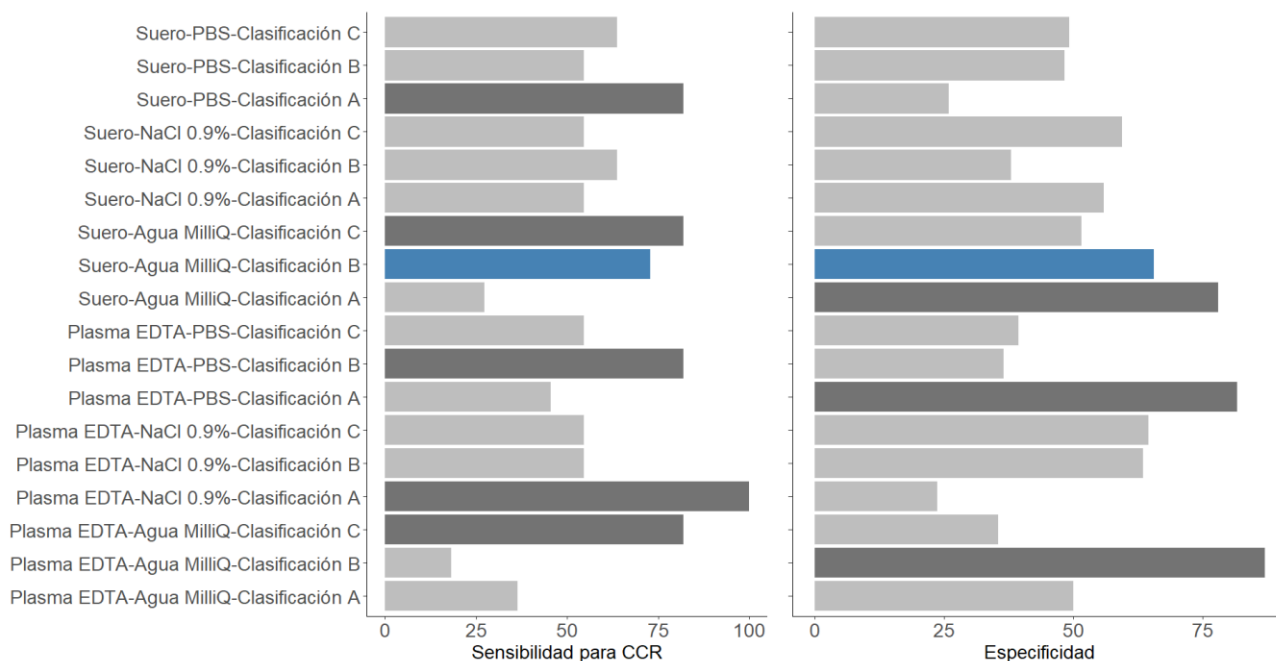


Notas: iTLB: *intelligent Thermal Liquid Biopsy*; PBS: tampón fosfato salino; EDTA: ácido etilendiaminotetraacético; Clasificación C: sin hallazgos o sin seguimiento vs con seguimiento a los 3 años o a los 3-6 meses o con CCR.

Figura 59: Modelo iTLB para diferenciar según la Clasificación. **A/** Obtenido en muestras de suero y aplicado a los mismos pacientes, pero en muestras de plasma-EDTA, usando PBS como diluyente; **B/** Obtenido en muestras de plasma-EDTA y aplicado a los mismos pacientes, pero en muestras de suero, usando PBS como diluyente; **C/** Obtenido en muestras de suero y aplicado a los mismos pacientes, pero en muestras de plasma-EDTA, usando agua Milli-Q como diluyente; **D/** Obtenido en muestras de plasma-EDTA y aplicado a los mismos pacientes, pero en muestras de suero, usando agua Milli-Q como diluyente.

B. Selección del modelo iTLB para el programa de cribado de cáncer colorrectal

Una vez que se comprobó que se obtenían diferentes termogramas según la muestra usada (suero o plasma-EDTA) y según el diluyente usado (PBS, NaCl 0.9% y agua Milli-Q), se realizaron todas las combinaciones posibles para obtener un modelo iTLB en cada una de ellas. Además, en cada una de las combinaciones se obtuvieron tres modelos iTLB según el resultado de la colonoscopia (Clasificación A, B y C). Así, se obtuvieron 18 modelos iTLB. Aplicando en todos ellos el mismo punto de corte estándar de cero, se consideró el mejor modelo aquel que tenía el mejor equilibrio entre clasificar erróneamente al menor número de pacientes con CCR y mayor especificidad. Usando este criterio, el modelo que tenía el mejor equilibrio era el modelo iTLB para diferenciar según la Clasificación B, usando muestras de suero y como diluyente agua Milli-Q (Figura 60).

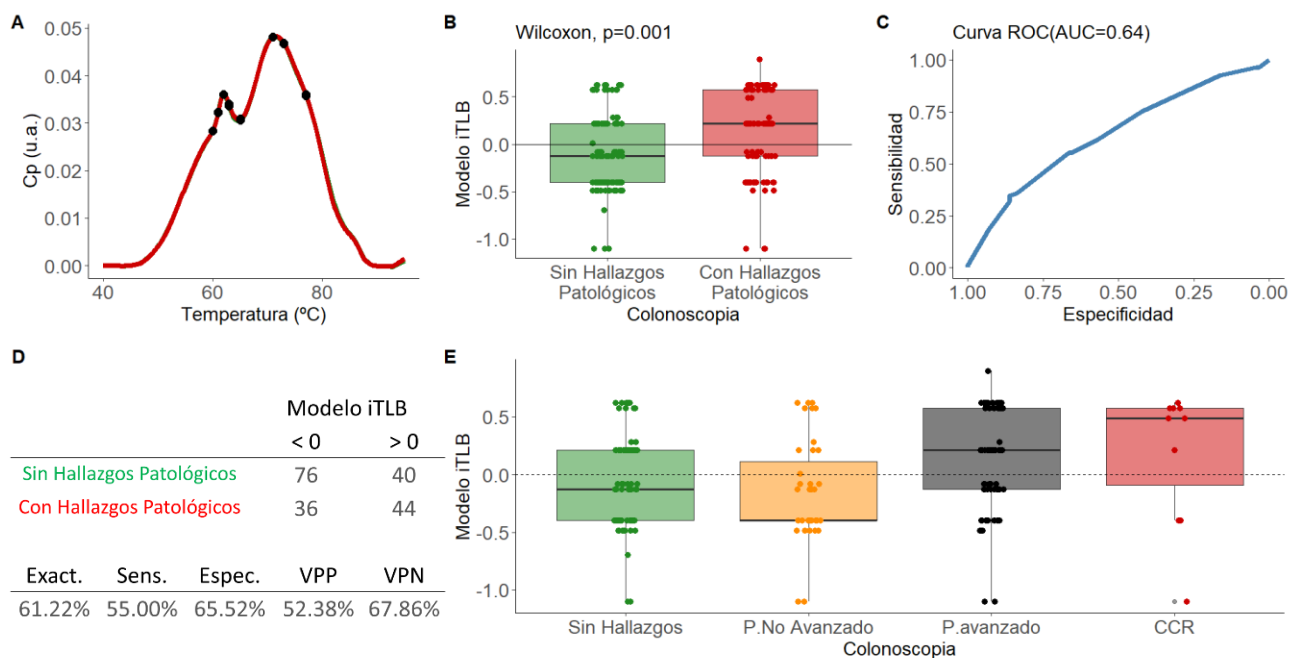


Notas: Se representa en color gris oscuro los modelos con mayor porcentaje de pacientes con CCR correctamente diagnosticados (en la izquierda) y mayor especificidad (en la derecha), mientras que se representa en color azul el modelo que cumple ambos criterios (clasificar correctamente a un elevado porcentaje de pacientes con CCR y tener elevada especificidad); CCR: cáncer colorrectal; iTLB: *intelligent Thermal Liquid Biopsy*; PBS: tampón fosfato salino; EDTA: ácido etilendiaminotetraacético; NaCl: cloruro sódico; Clasificación A: sin hallazgos vs pólipos no avanzados o avanzados o CCR; Clasificación B: sin hallazgos o pólipos no avanzados vs pólipos avanzados o CCR; Clasificación C: sin hallazgos o sin seguimiento vs con seguimiento a los 3 años o a los 3-6 meses o con CCR.

Figura 60: En la izquierda, porcentaje de pacientes con CCR clasificados correctamente según cada modelo iTLB. En la derecha, porcentaje de especificidad en cada modelo iTLB.

El modelo iTLB seleccionado estaba formado por cuatro parejas de temperaturas (Figura 58.H). Las parejas de temperaturas se pueden ver situadas en las medias de los termogramas de cada grupo en la Figura 61.A. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el modelo iTLB entre el grupo de pacientes con colonoscopias sin hallazgos patológicos (-0.12 [-0.40;0.21]) y los pacientes con pólipos o CCR (0.21 [-0.12;0.58]). Prueba de Wilcoxon: p-valor = 0.001 (Figura 61.B). Se obtuvo una AUC de 0.64 (IC_{95%} = 0.56-0.72) teniendo en cuenta todos los datos (los de entrenamiento y los de validación) (Figura 61.C). Según el punto de corte estándar de cero, se obtuvo una sensibilidad de 55.00% y una especificidad de 65.52%, además de un VPP y VPN de 52.38% y 67.86% respectivamente (Figura 61.D). En la Figura 61.E se puede observar cómo clasifica el modelo iTLB según el resultado de la colonoscopia (sin hallazgos, pólipo no avanzado, pólipo avanzado o CCR).

En el escenario hipotético donde se hubiera podido aplicar la prueba TLB después de la prueba de SOH positiva, se hubieran ahorrado 112 colonoscopias a realizar (57.14%, 112/196), a costa de no indicar la realización de la colonoscopia a 33 pacientes con pólipos avanzados y 3 pacientes con CCR. Es decir, no se hubieran realizado la colonoscopia al 45.00% (36/80) de aquellos pacientes con hallazgos patológicos avanzados.

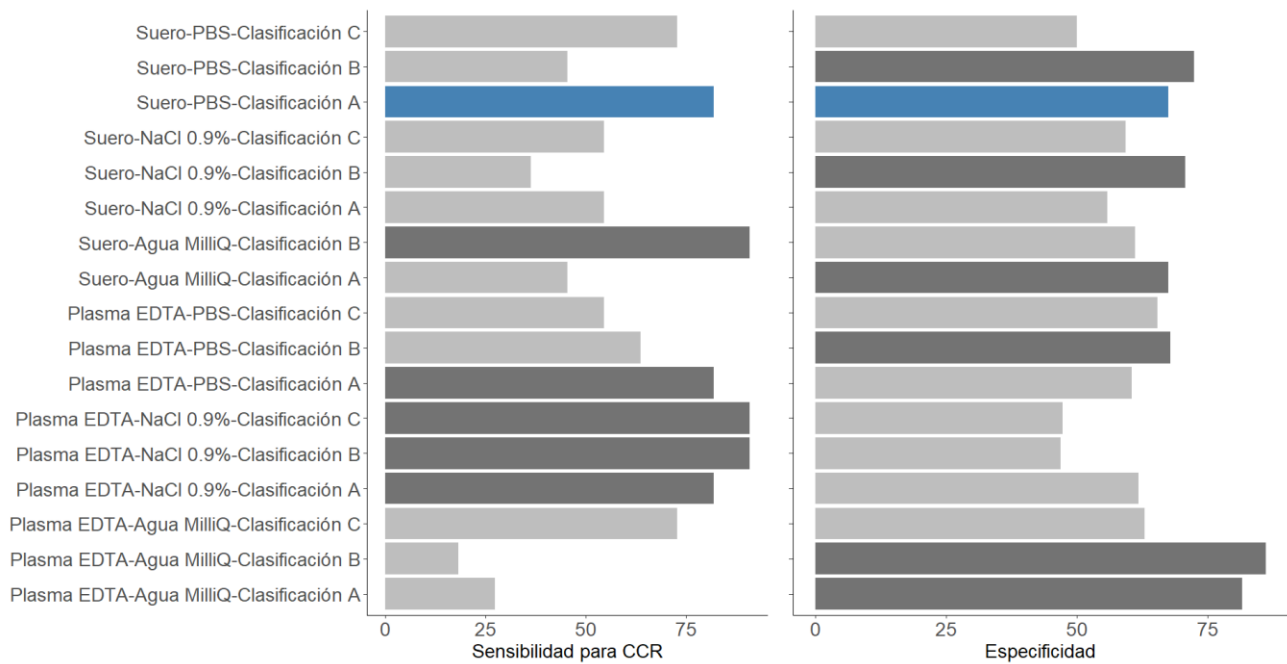


Notas: Cp: capacidad calorífica; u.a.: unidades arbitrarias; Sin Hallazgos Patológicos: Sin hallazgos o con pólipos no avanzados; Con Hallazgos Patológicos: Con pólipos avanzados o CCR; AUC: área bajo la curva ROC; iTLB: *intelligent Thermal Liquid Biopsy*; P: pólipo; CCR: cáncer colorrectal; Exact: exactitud; Sens: sensibilidad; Espec: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo.

Figura 61: Resultados del modelo iTLB seleccionado (usando muestras de suero y agua Milli-Q como diluyente) para diferenciar los termogramas de cada grupo según el resultado de la colonoscopia con la Clasificación B. **A/** Representación de las medias de los termogramas normalizados en cada grupo según la Clasificación B (**Sin Hallazgos o Pólipos No avanzados** y **Pólipos Avanzados o CCR**) y marcado con puntos negros se representa las temperaturas utilizadas en el modelo iTLB; **B/** Diferencia de la mediana del modelo iTLB según cada grupo (**Sin Hallazgos o Pólipos No avanzados** y **Pólipos Avanzados o CCR**), representando en línea horizontal el punto de corte estándar; **C/** Área bajo la curva ROC del modelo iTLB en todos los datos; **D/** Arriba: Tabla de contingencia de la predicción en todos los datos, usando el punto de corte estándar. Abajo: rendimiento del modelo iTLB; **E/** Diferencia de medianas del modelo iTLB en cada grupo según el resultado de la colonoscopia (**Sin Hallazgos, con Pólipos No Avanzados, con Pólipos Avanzados y con CCR**), representando en línea horizontal el punto de corte estándar.

Introducción de las variables sexo y edad al modelo iTLB

Con el objetivo de mejorar el modelo iTLB planteado, se consideró la introducción de las variables sexo y edad. De estas dos, solamente la variable sexo cumplió el requisito de tener un p-valor < 0.25 al comparar entre los dos grupos a diferenciar (Tabla 41). Por esta razón, únicamente se introdujo la variable sexo (masculino/femenino) en los 18 modelos iTLB planteados anteriormente (con cada una de las muestras, diluyentes y resultado de colonoscopia), obteniendo 17 modelos, llamados iTLB_sex, ya que en uno de ellos (el obtenido a partir de una muestra de suero, usando como diluyente agua Milli-Q y para diferenciar según la Clasificación C) no se seleccionó la variable sexo en el entrenamiento. De las 17 opciones de modelos obtenidos, el que cumplía mejor el criterio de tener un equilibrio entre perder al menor número de pacientes con CCR y maximizar la especificidad, fue el modelo iTLB_sex obtenido con muestras de suero, usando PBS como diluyente y la diferenciar según la Clasificación A (Figura 62).

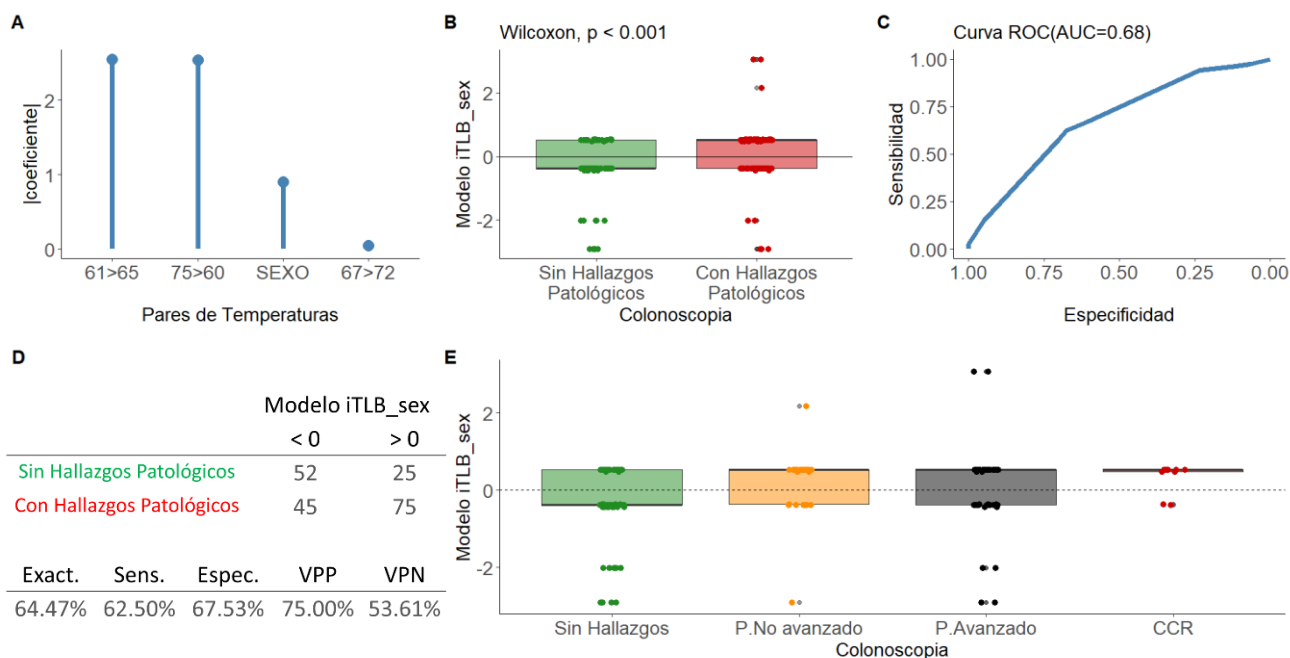


Notas: Se representa en color gris oscuro los modelos con mayor porcentaje de pacientes con CCR correctamente diagnosticados (en la izquierda) y mayor especificidad (en la derecha), mientras que se representa en color azul el modelo que cumple ambos criterios (clasificar correctamente a un elevado porcentaje de pacientes con CCR y tener elevada especificidad); CCR: cáncer colorrectal; iTLB: *intelligent Thermal Liquid Biopsy*; PBS: tampón fosfato salino; EDTA: ácido etilendiaminotetraacético; NaCl: cloruro sódico; Clasificación A: sin hallazgos vs pólipos no avanzados o avanzados o CCR; Clasificación B: sin hallazgos o pólipos no avanzados vs pólipos avanzados o CCR; Clasificación C: sin hallazgos o sin seguimiento vs con seguimiento a los 3 años o a los 3-6 meses o con CCR.

Figura 62: En la izquierda, porcentaje de pacientes con CCR clasificados correctamente según cada modelo iTLB_sex. En la derecha, porcentaje de especificidad en cada modelo iTLB_sex.

El modelo iTLB_sex seleccionado estaba formado por cuatro variables predictivas, tres parejas de temperaturas y la variable sexo (masculino/femenino). El peso estadístico de cada una de las variables se puede ver la Figura 63.A. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la mediana del resultado del modelo iTLB_sex entre ambos grupos (-0.38 [-0.38;0.52] y 0.52 [-0.38;0.52]). Prueba de Wilcoxon: p-valor < 0.001 (Figura 63.B). Respecto al anterior modelo iTLB, se mejoró el AUC obteniendo un valor de 0.68 (IC_{95%} = 0.61-0.75) (Figura 63.C), aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas (prueba de Delong: p-valor = 0.479). Además, se mejoró la sensibilidad, especificidad y VPP, excepto el VPN que se redujo ligeramente (Figura 63.D). En la Figura 63.E se puede observar cómo clasifica el modelo iTLB_sex según el resultado de la colonoscopia (sin hallazgos, pólipo no avanzado, pólipo avanzado o CCR).

En el hipotético escenario donde se hubiera podido aplicar el modelo iTLB_sex después de un test SOH positivo, se hubieran ahorrado 97 colonoscopias a realizar (49.24%, 97/197), de las cuales 34 de ellas correspondían a pacientes con hallazgos importantes en la colonoscopia (32 a pacientes con pólipos avanzados y 2 a pacientes con CCR). Es decir, no se hubiera indicado la realización de la colonoscopia al 41.98% (34/81) de aquellas con hallazgos patológicos avanzados.



Notas: Cp: capacidad calorífica; u.a.: unidades arbitrarias; Sin Hallazgos Patológicos: Sin hallazgos; Con Hallazgos Patológicos: Con pólipos no avanzados o avanzados o CCR; AUC: área bajo la curva ROC; iTLB: *intelligent Thermal Liquid Biopsy*; P: pólipo; CCR: cáncer colorrectal; Exact: exactitud; Sens: sensibilidad; Espec: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo.

Figura 63: Resultados del modelo iTLB_sex seleccionado (usando muestras de suero y PBS como diluyente) para diferenciar los termogramas de cada grupo según el resultado de la colonoscopia con la Clasificación A. **A/** Valor absoluto de los coeficientes de las variables predictoras del modelo iTLB_sex; **B/** Diferencia de la mediana del modelo iTLB_sex según cada grupo (**Sin Hallazgos** y **Pólipos No Avanzados o Avanzados o CCR**), representando en línea horizontal el punto de corte estándar; **C/** Área bajo la curva ROC del modelo iTLB_sex en todos los datos; **D/** Arriba: Tabla de contingencia de la predicción en todos los datos, usando el punto de corte estándar. Abajo: rendimiento del modelo iTLB_sex; **E/** Diferencia de medianas del modelo iTLB_sex en cada grupo según el resultado de la colonoscopia (**Sin Hallazgos**, **con Pólipos No Avanzados**, **con Pólipos Avanzados** y **con CCR**), representando en línea horizontal el punto de corte estándar.

DISCUSIÓN

Los programas de cribado de CCR han demostrado su eficacia en los últimos años debido a la reducción de la mortalidad del CCR. Aun así, son necesarios más estudios para mejorar los programas implantados. El principal motivo de mejora radica en el número de colonoscopias indicadas y, concretamente, en reducir el número de colonoscopias innecesarias a pacientes sin lesiones en el colon. Esta necesidad aumenta cuando se plantea reducir a 45 años la edad de inclusión en el programa de cribado, ya que esto aumentaría considerablemente la población objetivo del cribado contando con el mismo número de colonoscopias disponibles en los sistemas de salud. En este contexto se propone que la TLB podría servir como segunda herramienta, después de un test SOH positivo, para seleccionar mejor a los pacientes a los que realizar una colonoscopia.

Se ha realizado un estudio con pacientes del programa de cribado de CCR, iniciando el reclutamiento de los pacientes en el periodo postpandemia. Los objetivos de este estudio eran, por un lado, analizar diferentes condiciones preanalíticas de la TLB para saber si se puede usar indistintamente suero y plasma-EDTA, y si se pueden equiparar los resultados obtenidos según el diluyente usado (PBS, NaCl 0.9% o agua Milli-Q). Por otro lado, se buscaron las condiciones preanalíticas óptimas para incorporar la TLB al programa de cribado de CCR.

Se reclutaron unos 200 pacientes y se extrajeron muestras de suero y de plasma-EDTA a cada uno de ellos. Cada muestra fue diluida en cada tipo de diluyente para, posteriormente, analizar el termograma. En cada condición preanalítica (muestra y diluyente), se obtuvieron tres modelos iTLB, cada uno según la categorización de la colonoscopia, denominadas Colonoscopia 1, 2 y 3. La razón por la que se utilizaron tres tipos de clasificaciones fue porque cada una era menos restrictiva que la anterior, pero en todos los casos se incluía a las lesiones avanzadas en el grupo patológico. Por lo tanto, se obtuvieron 18 modelos iTLB, uno por cada condición (muestra, diluyente y colonoscopia).

Se observaron los termogramas según el tipo de diluyente y el tipo de muestra, y se visualizó que los obtenidos con agua Milli-Q eran muy diferentes a los obtenidos con PBS y NaCl 0.9%. Además, el tipo de termograma obtenido en agua Milli-Q era parecido al reportado en la bibliografía. (169) También se observó que los termogramas de suero y plas-EDTA se diferenciaban en el pico correspondiente a la transición del fibrinógeno, como ya está reportado. (167) Esto sobre todo se apreciaba al utilizar PBS o NaCl 0.9% como diluyente.

La metodología propuesta para analizar los termogramas y obtener modelos de clasificación (modelos iTLB) utiliza el rango de temperaturas entre los 60°C y 80°C. Dicho rango corresponde con aquel donde visualmente no se aprecian diferencias en los termogramas según el diluyente (PBS y NaCl 0.9%) o según la muestra (suero o plasma-EDTA). Teniendo en mente la hipótesis de si los diluyentes/muestras son intercambiables, se obtendrían variables predictoras parecidas en los diferentes modelos iTLB al cambiar las condiciones (muestra o diluyente), se realizó una comparación de las parejas de temperaturas de los diferentes modelos iTLB obtenidos. Al realizar esta comparación cambiando el diluyente, no se encontraron parejas de temperaturas parecidas. En cambio, al compararlas según el tipo de muestra, se observaron modelos iTLB con variables predictoras parecidas. En estos casos, se aplicó el modelo iTLB ajustado en suero sobre los termogramas obtenidos con muestras de plasma-EDTA, y viceversa, observando que existía entre un 16% y un 35% de pacientes diferentemente clasificados según la muestra utilizada.

Por lo tanto, se demostró por primera vez que no se pueden utilizar ni comparar resultados relacionados con TLB cuando se utilizan diferentes muestras y diferentes diluyentes y se aplica la metodología propuesta. Sería muy interesante estudiar en un futuro si es posible buscar un patrón de cambio según el tipo de muestra usada, por ejemplo, para convertir el termograma de suero en uno de plasma-EDTA o viceversa, y así poder utilizar indistintamente ambos tipos de muestra, ya que algunas veces se solicitan muestras a biobancos y pueden disponer muestras muy heterogéneas (de suero de un grupo y muestras de plasma-EDTA de otro).

Una vez que se concluyó que las condiciones preanalíticas condicionan el termograma, se buscó el modelo iTLB óptimo para aplicar en el programa de cribado de CCR. La media de los termogramas observados en ambos grupos (pacientes con hallazgos no patológicos y pacientes con hallazgos patológicos en la colonoscopia) eran muy parecidos. Previamente se ha observado lo mismo al comparar un grupo control sintomático con un grupo con PDAC o CCR. En este caso, el grupo control utilizado es un grupo asintomático, por lo que esto no justifica la elevada similitud de los termogramas. En cambio,

una característica de estos pacientes es la edad, ya que todos tienen más de 50 años. En el apartado **Transformación del diagnóstico de PDAC: análisis comparativo integral de biomarcadores clínicos, TLB y enfoques integrados**, en su apartado de discusión, se hace referencia a la relación observada entre la edad y la TLB, haciendo hincapié en que actualmente no existen estudios que analicen los cambios producidos por la edad, pero una de las hipótesis podría ser que a medida que avanza la edad, se produzcan cambios en el organismo (algunos patológicos y otros fisiológicos) con un reflejo en el torrente sanguíneo, posiblemente detectados con el TLB. Estos resultados obtenidos podrían apoyar esta hipótesis. Otra de las razones de la poca diferencia entre los termogramas podría ser el gran reto de detectar estadios muy tempranos de la enfermedad, donde un reflejo en sangre periférica es menor que cuando la enfermedad está más avanzada.

Se aplicó el criterio de seleccionar el modelo iTLB que tuviera el mejor equilibrio entre maximizar la sensibilidad en los pacientes con CCR y maximizar la especificidad. Es decir, reducir el mayor número de colonoscopias, dejando mal diagnosticados al menor número de pacientes con CCR. Se seleccionó un modelo con un AUC de 0.64 ($IC_{95\%} = 0.56-0.72$), donde se hubieran ahorrado un 57% de las colonoscopias, pero sacrificando no indicar la colonoscopia a un 45% de los pacientes con patologías avanzadas en el colon (33 pacientes con pólipos avanzados y 3 CCR). Teniendo en cuenta que anteriormente ya se ha planteado la introducción de variables clínicas o demográficas junto a variables procedentes de los termogramas (**Transformación del diagnóstico de PDAC: análisis comparativo integral de biomarcadores clínicos, TLB y enfoques integrados; Aportación de la TLB en el diagnóstico temprano del CCR y en la búsqueda de nuevos biomarcadores junto con la espectrometría de masas**), y que en situaciones postpandemia se habían estudiado estrategias para priorizar las colonoscopias con la consideración de factores de riesgo como el sexo y la edad avanzada, (82) se planteó la introducción de las variables sexo y edad en el modelo iTLB. Finalmente, sólo la variable sexo fue estadísticamente significativa, obteniendo 17 modelos iTLB_sex, de los cuales, el que tenía el mejor equilibrio entre máxima sensibilidad para CCR y máxima especificidad, fue un modelo iTLB_sex con un AUC de 0.68 ($IC_{95\%} = 0.61-0.75$). Al incluir la variable sexo, en general se mejoró los resultados de AUC, sensibilidad, especificidad y VPP, aunque las diferencias no fueron significativas. Aplicando el modelo iTLB_sex en el programa de cribado, después del test de SOH positivo, se hubieran ahorrado el 49% de las colonoscopias, pero se hubieran dejado de indicarlo al 42% de los pacientes con hallazgos patológicos avanzados (32 pacientes con pólipos avanzados y 2 CCR). Estos resultados también son muy parecidos a los obtenidos en el modelo iTLB.

Para salvar a los pacientes a los que no se les ha indicado una colonoscopia y tienen hallazgos patológicos, una opción sería realizar un nuevo seguimiento más cercano a los pacientes que dieron negativo en TLB, por ejemplo, repetir la prueba después de un año, con el objetivo de evitar saturar las colonoscopias disponibles, a la vez que no demorar demasiado la colonoscopia de los pacientes con lesiones no avanzadas y, sobre todo, avanzadas.

Aunque los modelos iTLB y iTLB_sex óptimos dieron resultados muy parecidos, cada uno de ellos utilizó un diluyente diferente (agua Milli-Q y PBS respectivamente). Sin embargo, ambos modelos utilizaron muestras de suero. Hacen falta más estudios para comprobar si realmente la muestra de suero es la óptima para el estudio de la TLB en los pacientes del programa de cribado de CCR.

Al comparar los resultados obtenidos del modelo iTLB_sex con los publicados del biomarcador aprobado por la FDA basado en marcadores de DNA anormal, (89) se obtuvieron sensibilidades ligeramente inferiores para diagnosticar CCR (82% el modelo iTLB_sex y 92% el ADN anormal). En cambio, el modelo iTLB_sex obtuvo mejores valores de sensibilidad para diagnosticar pacientes con lesiones tipo pólipos avanzados. En particular, se obtuvo una sensibilidad del 54%, mientras que el biomarcador aprobado por la FDA obtuvo una sensibilidad del 42% en lesiones avanzadas.

Son necesarios más estudios para aumentar el tamaño muestral y comprobar los resultados obtenidos con la TLB, al igual que sería muy interesante la realización de estudios multicéntricos. Para la búsqueda de un biomarcador más específico para el cribado de CCR serían necesarios estudios proteómicos. El grupo está pendiente de unos resultados donde se analiza la proteómica de muestras de sangre total EDTA, con un protocolo específico de toma de muestra en VAMS (*Volumetric Absorptive MicroSampling*) y de preparación de las muestras para su análisis por espectrometría de masas. Si los resultados son prometedores, se plantea iniciar una colaboración con ese grupo.

CONCLUSIONES

- Se ha propuesto una nueva metodología para el análisis de curvas de termogramas de suero, basado en el ajuste de un modelo de clasificación utilizando herramientas de aprendizaje automatizado, aplicando algoritmos de penalización para evitar el sobreajuste y aleatorizando los grupos de entrenamientos y validación hasta 100 veces para potenciar la robustez.
- Hacen falta más estudios para pulir la metodología propuesta como evitar la selección de temperaturas consecutivas cuando se generan las parejas de temperaturas. Además de probar otros algoritmos como los basados en agrupación no supervisada de los perfiles de termogramas.
- El modelo obtenido, llamado modelo iTLB, es de fácil interpretación: el modelo proporciona un número que si es menor de cero significa que el modelo clasifica a ese paciente sin patología oncológica, mientras que, si el número es mayor de cero, el modelo considera a ese paciente con patología oncológica.
- Se han utilizado como ejemplo dos grupos independientes (sanos donantes de sangre y pacientes con PDAC), y posteriormente se ha aplicado a dos estudios para el diagnóstico y pronóstico de PDAC y de CCR. En estos dos estudios se han utilizado como grupo control una cohorte de pacientes sintomáticos sin diagnóstico de cáncer, para acercarse a la situación de los clínicos en las consultas.
- Se ha puesto de manifiesto la versatilidad de la metodología propuesta para incluir variables clínicas junto a las variables predictoras procedentes de los termogramas (modelo iTLB+iClin). Incluso se han ajustado modelos con únicamente variables clínicas como predictoras (modelo iClin).
- El modelo iClin del estudio de PDAC tuvo una elevada capacidad diagnóstica para diferenciar ambos grupos, incluso estadios tempranos de PDAC. Al incluir la TLB a ese modelo, se pudo aplicar también para el pronóstico de los pacientes.
- La combinación del modelo iTLB con el modelo iClin permitió mejorar el diagnóstico de los pacientes con CCR en estadios más tempranos de la enfermedad y establecer una correlación con la supervivencia global. Además, se propone una nueva aplicación del TLB de muestras biológicas, donde se podrían obtener grupos de pacientes según el análisis de sus termogramas que, tras un análisis proteómico, podría ayudar a identificar nuevos biomarcadores.
- Se debe evitar la extracción de sangre cuando el paciente se encuentra bajo la preparación para la colonoscopia. De lo contrario, cambios considerables y significativos en la composición del suero pueden distorsionar el resultado analítico de la prueba en la muestra de biopsia líquida. Es importante resaltar que las alteraciones observadas en la TLB y causadas por las condiciones preanalíticas del paciente sugieren que existe un cambio en la composición plasma/suero, y esto también podría afectar y alterar el resultado de otras pruebas clínicas analíticas basadas en la cuantificación de otros biomarcadores (proteínas y ácidos nucleicos).
- Se ha propuesto una primera aproximación de un modelo iTLB_sex como segunda prueba del programa de cribado de CCR, después del test de SOH positivo y tomando la muestra antes de empezar con la preparación de la colonoscopia. Los primeros resultados muestran que, aunque se han obtenido resultados parecidos a los del último test aprobado por la FDA, el modelo propuesto no clasifica correctamente a un 42% de los pacientes con hallazgos patológicos avanzados.
- Se ha planteado por primera vez un estudio sobre las condiciones preanalíticas para la TLB. Por un lado, se ha estudiado el efecto de la ictericia, donde a partir de concentraciones superiores a 25 mg/dL se observa principalmente el perfil de desnaturalización de la bilirrubina. Esto podría llevar a error al comparar patologías donde ambas cursan con hiperbilirrubinemia. La TLB indicaría este aumento de la bilirrubina en suero, pero harían falta otras pruebas para conocer la etiología. Ante estos resultados, sería muy interesante realizar el estudio de lipemia y de hemólisis para completar los tres principales interferentes.
- Además, se ha demostrado que no se puede utilizar indistintamente cualquier tipo de muestra o de diluyente sin previa comprobación, siendo necesaria una estandarización estricta para cada estudio o aplicación clínica. Estos resultados abren una puerta a valorar diferentes condiciones preanalíticas según la patología estudiada, para buscar aquellas que mejoren el diagnóstico o el pronóstico, según el objetivo del estudio.

CONCLUSIONS

- A new methodology has been proposed for the analysis of serum thermogram curves, based on the adjustment of a classification model using machine learning tools, applying penalty algorithms to avoid overfitting, and randomizing the training and validation groups up to 100 times to enhance robustness.
- More studies are needed to refine the proposed methodology, such as avoiding the selection of consecutive temperatures when generating temperature pairs. In addition to testing other algorithms such as those based on unsupervised grouping of thermogram profiles.
- The model obtained, called the iTLB model, is easy to interpret: the model provides a number that, if it is less than zero, means that the model classifies that patient as having no oncological pathology, while, if the number is greater than zero, the model considers that patient to have oncological pathology.
- Two independent groups have been used as an example (healthy blood donors and patients with PDAC), and it has subsequently been applied to two studies for the diagnosis and prognosis of PDAC and CRC. In these two studies, a cohort of symptomatic patients without a diagnosis of cancer have been used as a control group, to get closer to the situation of clinicians in consultations.
- The versatility of the proposed methodology has been revealed to include clinical variables along with the predictor variables from thermograms (iTLB+iClin model). Models have even been adjusted with only clinical variables as predictors (iClin model).
- The iClin model of the PDAC study had a high diagnostic capacity to differentiate both groups, even early stages of PDAC. By including TLB in this model, it could also be applied to the prognosis of patients.
- The combination of the iTLB model with the iClin model allowed improving the diagnosis of patients with CRC in earlier stages of the disease and establishing a correlation with overall survival. Furthermore, a new application of TLB of biological samples is proposed, where groups of patients could be obtained according to the analysis of their thermograms which, after a proteomic analysis, could help identify new biomarkers.
- Blood collection should be avoided when the patient is undergoing colonoscopy preparation. Otherwise, considerable, and significant changes in serum composition may distort the analytical result of the test on the liquid biopsy sample. It is important to highlight that the alterations observed in the TLB and caused by the patient's preanalytical conditions suggest that there is a change in the plasma/serum composition, and this could also affect and alter the result of other clinical analytical tests based on the quantification of other biomarkers (proteins and nucleic acids).
- A first approximation of an iTLB_{sex} model has been proposed as the second test of the CRC screening program, after the positive SOH test and taking the sample before starting the colonoscopy preparation. The first results show that, although results like those of the last test approved by the FDA have been obtained, the proposed model does not correctly classify 42% of patients with advanced pathological findings.
- A study on pre-analytical conditions for TLB has been proposed for the first time. On the one hand, the effect of jaundice has been studied, where from concentrations higher than 25 mg/dL the bilirubin denaturation profile is mainly observed. This could lead to error when comparing pathologies where both present with hyperbilirubinemia. TLB would indicate this increase in serum bilirubin, but other tests would be necessary to determine the etiology. Given these results, it would be very interesting to carry out the study of lipemia and hemolysis to complete the three main interferences.
- Furthermore, it has been shown that any type of sample or diluent cannot be used interchangeably without prior verification, requiring strict standardization for each study or clinical application. These results open the door to evaluating different preanalytical conditions according to the pathology studied, to search for those that improve the diagnosis or prognosis, depending on the objective of the study.

BIBLIOGRAFÍA

1. Teresa Gil Ruiz M, Martínez Huedo S. Papel del laboratorio clínico en la gestión de la demanda: un nuevo horizonte. *Revista del Laboratorio Clínico*. 2014 Jul;7(3):104–10.
2. Garbett NC, Miller JJ, Jenson AB, Chaires JB. Calorimetric Analysis of the Plasma Proteome. *Semin Nephrol*. 2007;27(6):621–6.
3. Zhou M, Lucas DA, Chan KC, Issaq HJ, Petricoin EF, Liotta LA, et al. An investigation into the human serum “interactome.” *Electrophoresis*. 2004 May 14;25(9):1289–98.
4. Vidal M, Cusick ME, Barabási AL. Interactome Networks and Human Disease. *Cell*. 2011 Mar;144(6):986–98.
5. Menche J, Sharma A, Kitsak M, Ghiassian SD, Vidal M, Loscalzo J, et al. Uncovering disease-disease relationships through the incomplete interactome. *Science* (1979). 2015 Feb 20;347(6224).
6. Garbett NC, Miller JJ, Jenson AB, Chaires JB. Calorimetry outside the box: A new window into the plasma proteome. *Biophys J*. 2008;94(4):1377–83.
7. Garbett NC, Mekmaysy CS, Helm CW, Jenson AB, Chaires JB. Differential scanning calorimetry of blood plasma for clinical diagnosis and monitoring. Vol. 86, *Experimental and Molecular Pathology*. Academic Press; 2009. p. 186–91.
8. Todinova S, Krumova S, Gartcheva L, Robeerst C, Taneva SG. Microcalorimetry of blood serum proteome: A modified interaction network in the multiple myeloma case. *Anal Chem*. 2011;83(20):7992–8.
9. Zapf I, Fekecs T, Ferencz A, Tizedes G, Pavlovics G, Kálmán E, et al. DSC analysis of human plasma in breast cancer patients. *Thermochim Acta*. 2011;524(1–2):88–91.
10. Todinova S, Krumova S, Kurtev P, Dimitrov V, Djongov L, Dudunkov Z, et al. Calorimetry-based profiling of blood plasma from colorectal cancer patients. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* [Internet]. 2012;1820(12):1879–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.08.001>
11. Szalai Z, Molnár TF, Lórinçzy D. Differential scanning calorimetry (DSC) of blood serum in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): A new diagnostic tool ahead? *J Therm Anal Calorim*. 2013;113(1):259–64.
12. Mehdi M, Fekecs T, Zapf I, Ferencz A, Lórinçzy D. Differential scanning calorimetry (DSC) analysis of human plasma in different psoriasis stages. *J Therm Anal Calorim*. 2013;111(3):1801–4.
13. 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* [Internet]. 2013;572:59–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tca.2013.09.015>
14. 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 Gen Subj* [Internet]. 2013;1830(10):4675–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.007>
15. Moezzi M, Ferencz A, Lórinçzy D. Evaluation of blood plasma changes by differential scanning calorimetry in psoriatic patients treated with drugs. *J Therm Anal Calorim*. 2014;116(2):557–62.
16. Kim NA, Jin JH, Kim KH, 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*. 2016;39(5):668–76.
17. Zapf I, Moezzi M, Fekecs T, Nedvig K, Lorinczy D, Ferencz A. Influence of oxidative injury and monitoring of blood plasma by DSC on breast cancer patients. *J Therm Anal Calorim*. 2016;123(3):2029–35.
18. Ferencz A, Zapf I, Lórinçzy D. Harmful effect of neoadjuvant chemotherapy monitoring by DSC on breast cancer patients’ blood plasma. *J Therm Anal Calorim*. 2016;126(1):55–9.
19. Szalai Z, Molnár TF, Lórinçzy D. Role of differential scanning calorimetry (DSC) in the staging of COPD: A new approach to an old definition problem. *J Therm Anal Calorim*. 2017;127(2):1231–8.

20. Ferencz A, Lőrinczy D. DSC measurements of blood plasma on patients with chronic pancreatitis and operable and inoperable pancreatic adenocarcinoma. *J Therm Anal Calorim.* 2017;127(2):1187–92.
21. Michnik A, Sadowska-Krępa E, Cholewa J, Schisler I, Kiełboń A, Drzazga Z. Differential scanning calorimetry study of early and advanced stages in Parkinson's disease using human blood serum. *Thermochim Acta.* 2018;662(February):64–8.
22. Tsvetkov PO, Tabouret E, Roman AY, Romain S, Bequet C, Ishimbaeva O, et al. Differential scanning calorimetry of plasma in glioblastoma: Toward a new prognostic / monitoring tool. *Oncotarget.* 2018;9(10):9391–9.
23. Todinova S, Krumova S, Danailova A, Petkova V, Guenova M, Mihaylov G, et al. Calorimetric markers for monitoring of multiple myeloma and Waldenström's macroglobulinemia patients. *European Biophysics Journal [Internet].* 2018;47(5):549–59. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00249-018-1277-3>
24. Lőrinczy D, Moezzi M, Ferencz A. Deconvoluted plasma DSC curves on patients with psoriasis. *J Therm Anal Calorim [Internet].* 2020;142(2):789–96. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10973-020-09443-y>
25. Lőrinczy D, Ferencz A. Comparison of deconvoluted plasma DSC curves on patients with solid tumors. *J Therm Anal Calorim [Internet].* 2020;142(3):1243–8. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10973-020-09442-z>
26. Schneider G, Kaliappan A, Nguyen TQ, Buscaglia R, Brock GN, Hall MB, et al. The Utility of Differential Scanning Calorimetry Curves of Blood Plasma for Diagnosis, Subtype Differentiation and Predicted Survival in Lung Cancer. *Cancers (Basel) [Internet].* 2021 Oct 23;13(21):5326. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/21/5326>
27. Krumova S, Todinova S, Taneva SG. Calorimetric Markers for Detection and Monitoring of Multiple Myeloma. *Cancers (Basel) [Internet].* 2022 Aug 11;14(16):3884. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/16/3884>
28. Briere LAK, Brandt JM, Medley JB. Measurement of protein denaturation in human synovial fluid and its analogs using differential scanning calorimetry. *J Therm Anal Calorim.* 2010;102(1):99–106.
29. Chagovetz AA, Jensen RL, Recht L, Glantz M, Chagovetz AM. Preliminary use of differential scanning calorimetry of cerebrospinal fluid for the diagnosis of glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* 2011;105(3):499–506.
30. Dandé, Nöt LG, Wiegand N, Kocsis B, Lőrinczy D. DSC analysis of human synovial fluid samples in the diagnostics of non-septic and septic arthritis. *J Therm Anal Calorim.* 2017;130(3):1249–52.
31. Hermoso-Durán S, García-Rayado G, Ceballos-Laita L, Sostres C, Vega S, Millastre J, et al. Thermal liquid biopsy (TLB) focused on benign and premalignant pancreatic cyst diagnosis. *J Pers Med.* 2021 Jan 1;11(1):1–19.
32. Pultrone L, Schmid R, Waltimo T, Braissant O, Astasov-Frauenhoffer M. Saliva profiling with differential scanning calorimetry: A feasibility study with ex vivo samples. *PLoS One.* 2022;17(6 June).
33. 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).
34. Brudar S, Černigoj U, Podgornik H, Kržan M, Prislán I. Use of differential scanning calorimetry and immunoaffinity chromatography to identify disease induced changes in human blood plasma proteome. *Acta Chim Slov.* 2017;64(3):564–70.
35. Fish DJ, Brewood GP, Kim JS, Garbett NC, Chaires JB, Benight AS. Statistical analysis of plasma thermograms measured by differential scanning calorimetry. *Biophys Chem [Internet].* 2010;152(1–3):184–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpc.2010.09.007>
36. Rai S, Pan, Cambon, Chaires, Garbett. Group classification based on high-dimensional data: application to differential scanning calorimetry plasma thermogram analysis of cervical cancer and control samples. *Open Access Med Stat.* 2013;1.

37. Sun Y, Li J. Iterative RELIEF for feature weighting. In: Proceedings of the 23rd international conference on Machine learning - ICML '06. New York, New York, USA: ACM Press; 2006. p. 913–20.
38. Garbett NC, Brock GN. Differential scanning calorimetry as a complementary diagnostic tool for the evaluation of biological samples. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* [Internet]. 2016;1860(5):981–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.10.004>
39. Kendrick SK, Zheng Q, Garbett NC, Brock GN. Application and interpretation of functional data analysis techniques to differential scanning calorimetry data from lupus patients. *PLoS One*. 2017;12(11):1–21.
40. Garbett NC, Brock GN, Chaires JB, Mekmaysy CS, DeLeeuw L, Sivils KL, et al. Characterization and classification of lupus patients based on plasma thermograms. Zhou X jie, editor. *PLoS One* [Internet]. 2017 Nov 17 [cited 2021 Feb 16];12(11):e0186398. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0186398>
41. Rai SN, Srivastava S, Pan J, Wu X, Rai SP, Mekmaysy CS, et al. Multi-group diagnostic classification of high-dimensional data using differential scanning calorimetry plasma thermograms. *PLoS One*. 2019;14(8):1–17.
42. Vega S, Garcia-Gonzalez MA, Lanás A, Velazquez-Campoy A, Abian O. Deconvolution analysis for classifying gastric adenocarcinoma patients based on differential scanning calorimetry serum thermograms. *Sci Rep*. 2015;5.
43. 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 Gen Subj*. 2018 Aug 1;1862(8):1701–10.
44. 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 (Basel)* [Internet]. 2019 Jul 19 [cited 2021 Feb 16];11(7):1012. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/11/7/1012>
45. Annesi F, Hermoso-Durán S, Rizzuti B, Bruno R, Pirritano D, Petrone A, et al. Thermal liquid biopsy (TLb) of blood plasma as a potential tool to help in the early diagnosis of multiple sclerosis. *J Pers Med*. 2021;11(4).
46. Casado D, Tocino RV, Fonseca E, Cigarral B, Barrios B, Escalera E, et al. Cáncer de páncreas. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 2021 Jan;13(24):1345–52.
47. Navarro S, Vaquero E, Maurel J, Bombí JA, De Juan C, Feliu J, et al. Recomendaciones para el diagnóstico, la estadificación y el tratamiento del cáncer de páncreas (parte I). *Med Clin (Barc)*. 2010 May;134(14):643–55.
48. Humphris JL, Chang DK, Johns AL, Scarlett CJ, Pajic M, Jones MD, et al. The prognostic and predictive value of serum CA19.9 in pancreatic cancer. *Annals of Oncology*. 2012 Jul;23(7):1713–22.
49. Tzeng CWD, Balachandran A, Ahmad M, Lee JE, Krishnan S, Wang H, et al. Serum carbohydrate antigen 19-9 represents a marker of response to neoadjuvant therapy in patients with borderline resectable pancreatic cancer. *HPB*. 2014 May;16(5):430–8.
50. 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*. 2017 Sep 3;117(7):1017–25.
51. Lindgaard SC, Sztupinszki Z, Maag E, Chen IM, Johansen AZ, Jensen B V., et al. Circulating Protein Biomarkers for Use in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Identification. *Clinical Cancer Research*. 2021 May 1;27(9):2592–603.
52. Mellby LD, Nyberg AP, Johansen JS, Wingren C, Nordestgaard BG, Bojesen SE, et al. Serum Biomarker Signature-Based Liquid Biopsy for Diagnosis of Early-Stage Pancreatic Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2018 Oct 1;36(28):2887–94.
53. Crawford HC, Pasca di Magliano M, Banerjee S. Signaling Networks That Control Cellular Plasticity in Pancreatic Tumorigenesis, Progression, and Metastasis. *Gastroenterology*. 2019 May;156(7):2073–84.

54. Babic A, Schnure N, Neupane NP, Zaman MM, Rifai N, Welch MW, et al. Plasma inflammatory cytokines and survival of pancreatic cancer patients. *Clin Transl Gastroenterol*. 2018 Apr;9(4):e145.
55. Haas M, Heinemann V, Kullmann F, Laubender RP, Klose C, Bruns CJ, et al. Prognostic value of CA 19-9, CEA, CRP, LDH and bilirubin levels in locally advanced and metastatic pancreatic cancer: results from a multicenter, pooled analysis of patients receiving palliative chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013 Apr 13;139(4):681–9.
56. Mitsunaga S, Ikeda M, Shimizu S, Ohno I, Takahashi H, Okuyama H, et al. C-Reactive Protein Level Is an Indicator of the Aggressiveness of Advanced Pancreatic Cancer. *Pancreas*. 2016 Jan;45(1):110–6.
57. Szkandera J, Stotz M, Absenger G, Stojakovic T, Samonigg H, Kornprat P, et al. Validation of C-reactive protein levels as a prognostic indicator for survival in a large cohort of pancreatic cancer patients. *Br J Cancer*. 2014 Jan 7;110(1):183–8.
58. Vainer N, Dehlendorff C, Johansen JS. Systematic literature review of IL-6 as a biomarker or treatment target in patients with gastric, bile duct, pancreatic and colorectal cancer. *Oncotarget*. 2018 Jul 3;9(51):29820–41.
59. Xue P, Zhu L, Wan Z, Huang W, Li N, Chen D, et al. A prognostic index model to predict the clinical outcomes for advanced pancreatic cancer patients following palliative chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015 Sep 20;141(9):1653–60.
60. Chen IM, Johansen AZ, Dehlendorff C, Jensen B V., Bojesen SE, Pfeiffer P, et al. Prognostic Value of Combined Detection of Serum IL6, YKL-40, and C-reactive Protein in Patients with Unresectable Pancreatic Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2020 Jan 1;29(1):176–84.
61. Schultz NA, Christensen IJ, Werner J, Giese N, Jensen B V., Larsen O, et al. Diagnostic and Prognostic Impact of Circulating YKL-40, IL-6, and CA 19.9 in Patients with Pancreatic Cancer. *PLoS One*. 2013 Jun 26;8(6):e67059.
62. Khomiak A, Brunner M, Kordes M, Lindblad S, Miksch RC, Öhlund D, et al. Recent Discoveries of Diagnostic, Prognostic and Predictive Biomarkers for Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020 Nov 2;12(11):3234.
63. Nurmi AM, Mustonen HK, Stenman UH, Seppänen HE, Haglund CH. Combining CRP and CA19-9 in a novel prognostic score in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Sci Rep*. 2021 Jan 12;11(1):781.
64. Kjaergaard AD, Chen IM, Johansen AZ, Nordestgaard BG, Bojesen SE, Johansen JS. Inflammatory Biomarker Score Identifies Patients with Six-Fold Increased Risk of One-Year Mortality after Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021 Sep 13;13(18):4599.
65. Michl P, Löhr M, Neoptolemos JP, Capurso G, Rebours V, Malats N, et al. UEG position paper on pancreatic cancer. Bringing pancreatic cancer to the 21st century: Prevent, detect, and treat the disease earlier and better. *United European Gastroenterol J*. 2021 Sep 25;9(7):860–71.
66. Samandari M, Julia MG, Rice A, Chronopoulos A, del Rio Hernandez AE. Liquid biopsies for management of pancreatic cancer. *Translational Research*. 2018 Nov;201:98–127.
67. Kaczor-Urbanowicz KE, Cheng J, King JC, Sedarat A, Pandol SJ, Farrell JJ, et al. Reviews on Current Liquid Biopsy for Detection and Management of Pancreatic Cancers. *Pancreas*. 2020 Oct;49(9):1141–52.
68. Rofi E, Vivaldi C, Del Re M, Arrigoni E, Crucitta S, Funel N, et al. The emerging role of liquid biopsy in diagnosis, prognosis and treatment monitoring of pancreatic cancer. *Pharmacogenomics*. 2019 Jan;20(1):49–68.
69. Allen PJ, Kuk D, Castillo CF del, Basturk O, Wolfgang CL, Cameron JL, et al. Multi-institutional Validation Study of the American Joint Commission on Cancer (8th Edition) Changes for T and N Staging in Patients With Pancreatic Adenocarcinoma. *Ann Surg*. 2017 Jan;265(1):185–91.
70. Zubrod CG, Schneiderman M, Frei E, Brindley C, Lennard Gold G, Shnider B, et al. Appraisal of methods for the study of chemotherapy of cancer in man: Comparative therapeutic trial of nitrogen mustard and triethylene thiophosphoramide. *J Chronic Dis*. 1960 Jan;11(1):7–33.

71. 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*. 2009 Jan;45(2):228–47.
72. Bagni K, Chen IM, Johansen AZ, Dehlendorff C, Jensen B V., Hansen CP, et al. Prognostic impact of Charlson's Age-Comorbidity Index and other risk factors in patients with pancreatic cancer. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2020 May 6;29(3).
73. Fontana CM, Van Doan H. Zebrafish xenograft as a tool for the study of colorectal cancer: a review. *Cell Death Dis*. 2024 Jan 9;15(1):23.
74. Berbecka M, Berbecki M, Gliwa AM, Szewc M, Sitarz R. Managing Colorectal Cancer from Ethology to Interdisciplinary Treatment: The Gains and Challenges of Modern Medicine. *Int J Mol Sci*. 2024 Feb 7;25(4):2032.
75. Hossain MdS, Karuniawati H, Jairoun AA, Urbi Z, Ooi DJ, John A, et al. Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers (Basel)*. 2022 Mar 29;14(7):1732.
76. Bacchiddu S, Álvarez-Urturri AC, Bessa Caserras X. Pólipos colorrectales. *FMC*. 2012 Oct;19(8):472–80.
77. Grothey A, Fakih M, Tabernero J. Management of BRAF-mutant metastatic colorectal cancer: a review of treatment options and evidence-based guidelines. *Annals of Oncology*. 2021 Aug;32(8):959–67.
78. John SKP, George S, Primrose JN, Fozard JBJ. Symptoms and signs in patients with colorectal cancer. *Colorectal Disease*. 2011 Jan 23;13(1):17–25.
79. Soares F, Becker K, Anzanello MJ. A hierarchical classifier based on human blood plasma fluorescence for non-invasive colorectal cancer screening. *Artif Intell Med*. 2017 Oct;82:1–10.
80. Quintero E, Castells A, Bujanda L, Cubiella J, Salas D, Lanas Á, et al. Colonoscopy versus Fecal Immunochemical Testing in Colorectal-Cancer Screening. *New England Journal of Medicine*. 2012 Feb 23;366(8):697–706.
81. Vives N, Binefa G, Vidal C, Milà N, Muñoz R, Guardiola V, et al. Short-term impact of the COVID-19 pandemic on a population-based screening program for colorectal cancer in Catalonia (Spain). *Prev Med (Baltim)*. 2022 Feb;155:106929.
82. Aznar-Gimeno R, Carrera-Lasfuentes P, del-Hoyo-Alonso R, Doblaré M, Lanas Á. Evidence-Based Selection on the Appropriate FIT Cut-Off Point in CRC Screening Programs in the COVID Pandemic. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Jul 27;8.
83. Davidson KW, Barry MJ, Mangione CM, Cabana M, Caughey AB, Davis EM, et al. Screening for Colorectal Cancer. *JAMA*. 2021 May 18;325(19):1965.
84. Shaukat A, Levin TR. Current and future colorectal cancer screening strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2022 Aug 3;19(8):521–31.
85. Mangas-Sanjuan C, Jover R, Cubiella J, Marzo-Castillejo M, Balaguer F, Bessa X, et al. Vigilancia tras resección de pólipos de colon y de cáncer colorrectal. Actualización 2018. *Gastroenterol Hepatol*. 2019 Mar;42(3):188–201.
86. Hassan C, Antonelli G, Dumonceau JM, Regula J, Bretthauer M, Chaussade S, et al. Post-polypectomy colonoscopy surveillance: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline – Update 2020. *Endoscopy*. 2020 Aug 22;52(08):687–700.
87. Hanoglu SB, Man E, Harmanci D, Tozan Ruzgar S, Sanli S, Keles NA, et al. Magnetic Nanoparticle-Based Electrochemical Sensing Platform Using Ferrocene-Labelled Peptide Nucleic Acid for the Early Diagnosis of Colorectal Cancer. *Biosensors (Basel)*. 2022 Sep 7;12(9):736.
88. Świdarska M, Choromańska B, Dąbrowska E, Konarzewska-Duchnowska E, Choromańska K, Szczurko G, et al. Review The diagnostics of colorectal cancer. *Współczesna Onkologia*. 2014;1:1–6.

89. Bevan R, Rutter MD. Colorectal Cancer Screening—Who, How, and When? *Clin Endosc*. 2018 Jan 31;51(1):37–49.
90. Shen Z, Zhang J, Chen H, Wang W, Xu W, Lu X, et al. Does Pre-operative Biliary Drainage Influence Long-Term Survival in Patients With Obstructive Jaundice With Resectable Pancreatic Head Cancer? *Front Oncol*. 2020 Sep 16;10.
91. Gheorghe G, Bungau S, Ilie M, Behl T, Vesa CM, Brisc C, et al. Early Diagnosis of Pancreatic Cancer: The Key for Survival. *Diagnostics*. 2020 Oct 24;10(11):869.
92. Li Y, Liu H, Chen K, Wu X, Wu J, Yang Z, et al. Pathological Significance and Prognostic Roles of Indirect Bilirubin/Albumin Ratio in Hepatic Encephalopathy. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Aug 30;8.
93. Adin CA. Bilirubin as a Therapeutic Molecule: Challenges and Opportunities. *Antioxidants*. 2021 Sep 28;10(10):1536.
94. Soligard HT, Nilsen OG, Bratlid D. Displacement of Bilirubin From Albumin by Ibuprofen In Vitro. *Pediatr Res*. 2010 Jun;67(6):614–8.
95. Abe S, Fujioka K, Nakasone R, Suga S, Ashina M, Nishida K, et al. Bilirubin/albumin (B/A) ratios correlate with unbound bilirubin levels in preterm infants. *Pediatr Res*. 2021 May 19;89(6):1427–31.
96. Karin A, Higgins V, Miller J, Brinc D, Kulasingam V, Selvaratnam R. Evaluation of hemolysis, lipemia, and icterus interference with common clinical immunoassays. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2023 May 25;61(6):1035–45.
97. Zaninotto M, Plebani M. Understanding and managing interferences in clinical laboratory assays: the role of laboratory professionals. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2020 Feb 25;58(3):350–6.
98. Mainali S, Merrill AE, Krasowski MD. Frequency of icteric interference in clinical chemistry laboratory tests and causes of severe icterus. *Pract Lab Med*. 2021 Nov;27:e00259.
99. Afsari B, Fertig EJ, Geman D, Marchionni L. switchBox: an R package for k-Top Scoring Pairs classifier development. *Bioinformatics*. 2015 Jan 15;31(2):273–4.
100. Fluss R, Faraggi D, Reiser B. Estimation of the Youden Index and its Associated Cutoff Point. *Biometrical Journal*. 2005 Aug 4;47(4):458–72.
101. KETCHEN Jr. DJ, SHOOK CL. THE APPLICATION OF CLUSTER ANALYSIS IN STRATEGIC MANAGEMENT RESEARCH: AN ANALYSIS AND CRITIQUE. *Strategic Management Journal*. 1996 Jun;17(6):441–58.
102. Ho WJ, Erbe R, Danilova L, Phyo Z, Bigelow E, Stein-O’Brien G, et al. Multi-omic profiling of lung and liver tumor microenvironments of metastatic pancreatic cancer reveals site-specific immune regulatory pathways. *Genome Biol*. 2021 Dec 13;22(1):154.
103. Kruger S, Haas M, Burger PJ, Ormanns S, Modest DP, Westphalen CB, et al. Isolated pulmonary metastases define a favorable subgroup in metastatic pancreatic cancer. *Pancreatology*. 2016 Jul;16(4):593–8.
104. Yamashita K, Miyamoto A, Hama N, Asaoka T, Maeda S, Omiya H, et al. Survival Impact of Pulmonary Metastasis as Recurrence of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Dig Surg*. 2015;32(6):464–71.
105. Christensen TD, Maag E, Larsen O, Feltoft CL, Nielsen KR, Jensen LH, et al. Development and validation of circulating protein signatures as diagnostic biomarkers for biliary tract cancer. *JHEP Reports [Internet]*. 2023;5(3):100648. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2022.100648>
106. Park J, Choi Y, Namkung J, Yi SG, Kim H, Yu J, et al. Diagnostic performance enhancement of pancreatic cancer using proteomic multimarker panel. *Oncotarget*. 2017 Nov 3;8(54):93117–30.
107. Park J, Lee E, Park KJ, Park HD, Kim JW, Woo HI, et al. Large-scale clinical validation of biomarkers for pancreatic cancer using a mass spectrometry-based proteomics approach. *Oncotarget*. 2017 Jun 27;8(26):42761–71.

108. Sturm N, Ettrich TJ, Perkhofer L. The Impact of Biomarkers in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma on Diagnosis, Surveillance and Therapy. *Cancers (Basel)*. 2022 Jan 3;14(1):217.
109. Azizian A, Rühlmann F, Krause T, Bernhardt M, Jo P, König A, et al. CA19-9 for detecting recurrence of pancreatic cancer. *Sci Rep*. 2020 Jan 28;10(1):1332.
110. Chen IM, Willumsen N, Dehlendorff C, Johansen AZ, Jensen B V., Hansen CP, et al. Clinical value of serum hyaluronan and propeptide of type III collagen in patients with pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 2020 May 15;146(10):2913–22.
111. Pedersen RS, Nissen NI, Jensen C, Thorlacius-Ussing J, Manon-Jensen T, Olesen ML, et al. Plasma Kallikrein-Activated TGF- β Is Prognostic for Poor Overall Survival in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Associates with Increased Fibrogenesis. *Biomolecules*. 2022;12(9).
112. Nissen NI, Johansen AZ, Chen IM, Johansen JS, Pedersen RS, Hansen CP, et al. Collagen Biomarkers Quantify Fibroblast Activity In Vitro and Predict Survival in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers (Basel)*. 2022;14(3).
113. Nissen NI, Johansen AZ, Chen IM, Jensen C, Madsen EA, Hansen CP, et al. High serum levels of the C-propeptide of type V collagen (PRO-C5) are prognostic for short overall survival in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Front Mol Biosci*. 2023;10(March):1–13.
114. Johansen JS, Calatayud D, Albieri V, Schultz NA, Dehlendorff C, Werner J, et al. The potential diagnostic value of serum microRNA signature in patients with pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 2016 Nov 15;139(10):2312–24.
115. Henriksen SD, Stubbe BE, Madsen PH, Johansen JS, Jensen B V., Hansen CP, et al. Cell-free DNA promoter hypermethylation as a diagnostic marker for pancreatic ductal adenocarcinoma – An external validation study. *Pancreatology*. 2021 Sep;21(6):1081–91.
116. Videmark AN, Christensen IJ, Feltoft CL, Villadsen M, Borg FH, Jørgensen BM, et al. Combined plasma C-reactive protein, interleukin 6 and YKL-40 for detection of cancer and prognosis in patients with serious nonspecific symptoms and signs of cancer. *Cancer Med*. 2023;12(6):6675–88.
117. Partyka O, Pajewska M, Kwaśniewska D, Czerw A, Deptała A, Budzik M, et al. Overview of Pancreatic Cancer Epidemiology in Europe and Recommendations for Screening in High-Risk Populations. *Cancers (Basel)*. 2023 Jul 15;15(14):3634.
118. Korc M, Jeon CY, Edderkaoui M, Pandolfi SJ, Petrov MS. Tobacco and alcohol as risk factors for pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2017 Oct;31(5):529–36.
119. Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019 Dec 27;16(12):713–32.
120. Ferrucci L, Fabbri E. Inflammaging: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol*. 2018 Sep 31;15(9):505–22.
121. Franceschi C, Campisi J. Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2014 Jun 1;69(Suppl 1):S4–9.
122. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011 Mar;144(5):646–74.
123. Sharma BR, Kanneganti TD. Inflammasome signaling in colorectal cancer. *Translational Research*. 2023 Feb;252:45–52.
124. Terzić J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology*. 2010 May;138(6):2101-2114.e5.
125. Michels N, van Aart C, Morisse J, Mullee A, Huybrechts I. Chronic inflammation towards cancer incidence: A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021 Jan;157:103177.

126. Hart PC, Rajab IM, Alebraheem M, Potempa LA. C-Reactive Protein and Cancer—Diagnostic and Therapeutic Insights. *Front Immunol*. 2020 Nov 19;11.
127. Jones SA, Jenkins BJ. Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. *Nat Rev Immunol*. 2018 Dec 25;18(12):773–89.
128. Zhao T, Su Z, Li Y, Zhang X, You Q. Chitinase-3 like-protein-1 function and its role in diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2020 Sep 14;5(1):201.
129. Wang Z, Wu P, Wu D, Zhang Z, Hu G, Lai Y, et al. Prognostic and clinicopathological significance of serum interleukin-6 expression in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Onco Targets Ther*. 2015 Dec;3793.
130. Bian B, Li L, Yang J, Liu Y, Xie G, Zheng Y, et al. Prognostic value of YKL-40 in solid tumors: a meta-analysis of 41 cohort studies. *Cancer Cell Int*. 2019 Dec 10;19(1):259.
131. Tarpgaard LS, Guren TK, Glimelius B, Christensen IJ, Pfeiffer P, Kure EH, et al. Plasma YKL-40 in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Treated with First Line Oxaliplatin-Based Regimen with or without Cetuximab: RESULTS from the NORDIC VII Study. *PLoS One*. 2014 Feb 3;9(2):e87746.
132. Hippisley-Cox J, Coupland C. Symptoms and risk factors to identify men with suspected cancer in primary care: derivation and validation of an algorithm. *British Journal of General Practice*. 2013 Jan 1;63(606):e1–10.
133. Domper Arnal MJ, García Mateo S, Hermoso-Durán S, Abad D, Carrera-Lasfuentes P, Velazquez-Campoy A, et al. False-positive fecal immunochemical test results in colorectal cancer screening and gastrointestinal drug use. *Int J Colorectal Dis*. 2021 Sep 12;36(9):1861–9.
134. Larance M, Lamond AI. Multidimensional proteomics for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015 May 10;16(5):269–80.
135. Elias JE, Haas W, Faherty BK, Gygi SP. Comparative evaluation of mass spectrometry platforms used in large-scale proteomics investigations. *Nat Methods*. 2005 Sep 23;2(9):667–75.
136. Ishihama Y, Rappsilber J, Mann M. Modular Stop and Go Extraction Tips with Stacked Disks for Parallel and Multidimensional Peptide Fractionation in Proteomics. *J Proteome Res*. 2006 Apr 1;5(4):988–94.
137. Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc*. 2007 Aug 2;2(8):1896–906.
138. Kulak NA, Pichler G, Paron I, Nagaraj N, Mann M. Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nat Methods*. 2014 Mar 2;11(3):319–24.
139. Geyer PE, Kulak NA, Pichler G, Holdt LM, Teupser D, Mann M. Plasma Proteome Profiling to Assess Human Health and Disease. *Cell Syst*. 2016 Mar;2(3):185–95.
140. Geyer PE, Wewer Albrechtsen NJ, Tyanova S, Grassl N, Iepsen EW, Lundgren J, et al. Proteomics reveals the effects of sustained weight loss on the human plasma proteome. *Mol Syst Biol*. 2016 Dec 22;12(12).
141. de Graaf EL, Giansanti P, Altelaar AFM, Heck AJR. Single-step Enrichment by Ti4+-IMAC and Label-free Quantitation Enables In-depth Monitoring of Phosphorylation Dynamics with High Reproducibility and Temporal Resolution. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2014 Sep;13(9):2426–34.
142. Humphrey SJ, Azimifar SB, Mann M. High-throughput phosphoproteomics reveals in vivo insulin signaling dynamics. *Nat Biotechnol*. 2015 Sep 1;33(9):990–5.
143. Kanshin E, Bergeron-Sandoval LP, Isik SS, Thibault P, Michnick SW. A Cell-Signaling Network Temporally Resolves Specific versus Promiscuous Phosphorylation. *Cell Rep*. 2015 Feb;10(7):1202–14.
144. Olsen J V., Blagoev B, Gnäd F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, et al. Global, In Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks. *Cell*. 2006 Nov;127(3):635–48.

145. Harney DJ, Hutchison AT, Hatchwell L, Humphrey SJ, James DE, Hocking S, et al. Proteomic Analysis of Human Plasma during Intermittent Fasting. *J Proteome Res.* 2019 May 3;18(5):2228–40.
146. Dolin T, Christensen I, Johansen A, Nielsen H, Jakobsen H, Klein M, et al. Pre- and Perioperative Inflammatory Biomarkers in Older Patients Resected for Localized Colorectal Cancer: Associations with Complications and Prognosis. *Cancers (Basel).* 2021 Dec 29;14(1):161.
147. Hara H, Yoshimura H, Uchida S, Toyoda Y, Aoki M, Sakai Y, et al. Molecular cloning and functional expression analysis of a cDNA for human hepassocin, a liver-specific protein with hepatocyte mitogenic activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression.* 2001 Jul;1520(1):45–53.
148. Li CY, Cao CZ, Xu WX, Cao MM, Yang F, Dong L, et al. Recombinant human hepassocin stimulates proliferation of hepatocytes in vivo and improves survival in rats with fulminant hepatic failure. *Gut.* 2010 Jun 1;59(6):817–26.
149. Li WX, Xiao HW, Hong XQ, Niu WX. Predictive value of CK20 in evaluating the efficacy of treatment and prognosis after surgery for colorectal cancer. *Genetics and Molecular Research.* 2015;14(2):5823–9.
150. Sun M, Qiu J, Zhai H, Wang Y, Ma P, Li M, et al. Prognostic Implications of Novel Gene Signatures in Gastric Cancer Microenvironment. *Medical Science Monitor.* 2020 Aug 2;26.
151. Bąk-Romaniszyn L, Świerzko AS, Sokołowska A, Durko Ł, Mierzwa G, Szala-Poździej A, et al. Mannose-binding lectin (MBL) in adult patients with inflammatory bowel disease. *Immunobiology.* 2020 Jan;225(1):151859.
152. Nakagawa T, Kawasaki N, Ma Y, Uemura K, Kawasaki T. Antitumor Activity of Mannan-Binding Protein. In 2003. p. 26–33.
153. Hidalgo-Sastre A, Desztics J, Dantes Z, Schulte K, Ensarioglu HK, Bassej-Archibong B, et al. Loss of Wasl improves pancreatic cancer outcome. *JCI Insight.* 2020 May 21;5(10).
154. Molinie N, Gautreau A. The Arp2/3 Regulatory System and Its Deregulation in Cancer. *Physiol Rev.* 2018 Jan 1;98(1):215–38.
155. Dolin TG, Mikkelsen M, Jakobsen HL, Nordentoft T, Pedersen TS, Vinther A, et al. Geriatric assessment and intervention in older vulnerable patients undergoing surgery for colorectal cancer: a protocol for a randomised controlled trial (GEPOC trial). *BMC Geriatr.* 2021 Jan 30;21(1):88.
156. Mohammed R, Rawashdeh J, Abdullah M. Machine Learning with Oversampling and Undersampling Techniques: Overview Study and Experimental Results. In: 2020 11th International Conference on Information and Communication Systems (ICICS). IEEE; 2020. p. 243–8.
157. Rex DK, Boland CR, Dominitz JA, Giardiello FM, Johnson DA, Kaltenbach T, et al. Colorectal Cancer Screening: Recommendations for Physicians and Patients From the U.S. Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2017 Jul;153(1):307–23.
158. Ladabaum U, Dominitz JA, Kahi C, Schoen RE. Strategies for Colorectal Cancer Screening. *Gastroenterology.* 2020 Jan;158(2):418–32.
159. Herbeth B, Bagrel A. A study of factors influencing plasma CEA levels in an unselected population. *Oncodev Biol Med.* 1980;1(4–5):191–8.
160. Evans MD, Barton K, Pritchard GA, Williams EJ, Karandikar SS. Plasma magnesium should be monitored perioperatively in patients undergoing colorectal resection. *Colorectal Disease.* 2009;11(6):613–8.
161. Goni E, Venerito M, Schulz C, Weigt J, Langner C, Link A, et al. Influence of laboratory-related and endoscopy-related factors on the assessment of serum pepsinogens and gastrin-17. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2017;29(12):1340–5.

162. Holte K, Nielsen KG, Madsen JL, Kehlet H. Physiologic effects of bowel preparation. *Dis Colon Rectum* [Internet]. 2004 Jun 29 [cited 2021 Feb 16];47(9):1397–402. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10350-004-0592-1>
163. Ogino N, Aridome G, Oshima J, Shibata M, Watanabe T, Kume K, et al. Serum Albumin Concentrations Predict hypovolaemia Caused by Polyethylene Glycol Plus Ascorbic Acid Prior to Colonoscopy in Elderly Patients. *Drugs Aging*. 2016;33(5):355–63.
164. Turnage RH, Guice KS, Gannon P, Gross M. The Effect of Polyethylene Glycol Gavage on Plasma Volume. *Journal of surgical research*. 1994;57:284–8.
165. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Gastroenterology Review*. 2019;14(2):89–103.
166. Gini A, Jansen EEL, Zielonke N, Meester RGS, Senore C, Anttila A, et al. Impact of colorectal cancer screening on cancer-specific mortality in Europe: A systematic review. *Eur J Cancer*. 2020;127:224–35.
167. Qiu H, Ferrell EP, Nolan N, Phelps BH, Tabibiazar R, Whitney DH, et al. Fluorescence single-molecule counting assays for high-sensitivity detection of cytokines and chemokines. *Clin Chem*. 2007;53(11):2010–2.
168. Kędra-Królik K, Chmielewska I, Michnik A, Zarzycki P. Blood Serum Calorimetry Indicates the Chemotherapeutic Efficacy in Lung Cancer Treatment. *Sci Rep*. 2017;7(1):6–10.
169. Michnik A, Kielboń A, Duch K, Sadowska-Krepa E, Pokora I. Comparison of human blood serum DSC profiles in aqueous and PBS buffer solutions. *J Therm Anal Calorim* [Internet]. 2022;147(12):6739–43. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10973-021-11008-6>
170. Lai EJ, Calderwood AH, Doros G, Fix OK, Jacobson BC. The Boston bowel preparation scale: a valid and reliable instrument for colonoscopy-oriented research. *Gastrointest Endosc*. 2009 Mar;69(3):620–5.
171. Maag JLV. gganatogram: An R package for modular visualisation of anatograms and tissues based on ggplot2. *F1000Res*. 2018 Sep 28;7:1576.
172. Petryszak R, Keays M, Tang YA, Fonseca NA, Barrera E, Burdett T, et al. Expression Atlas update—an integrated database of gene and protein expression in humans, animals and plants. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jan 4;44(D1):D746–52.

ANEXOS

Listado de tablas

Tabla 1: Etapas del cáncer de páncreas según la clasificación de la AJCC y su agrupación según las características del tumor descrita en los parámetros TNM (tamaño, metástasis y propagación a nódulos).	32
Tabla 2: Escala <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i> (Escala ECOG).	33
Tabla 3: Sistema de clasificación del estado físico de la Sociedad Estadounidense de Anestesiólogos.	38
Tabla 4: Alícuotas de concentraciones crecientes de bilirrubina, indicando los volúmenes usados de la solución madre, la solución blanco y de la mezcla de suero en cada una de ellas.	44
Tabla 5: Relación de variables clínicas de los pacientes con PDAC según el resultado del modelo iTLB.	59
Tabla 6: Diferencia de media/mediana de la concentración de biomarcadores en sangre periférica y del modelo iTLB, entre las muestras extraídas antes (basal) y después del tratamiento (mes y 2 meses).	61
Tabla 7: Relación de la respuesta RECIST1.1 con los tiempos de PFS y OS.	63
Tabla 8: Categorización de los pacientes según la respuesta del modelo iTLB en cada muestra, antes y después del tratamiento.	64
Tabla 9: Relación del cambio de la concentración de CA19.9 entre la muestra basal y la muestra al mes, y del resultado del modelo iTLB en la muestra al mes categorizado por el punto de corte estándar de cero, según el tiempo de OS.	65
Tabla 10: Relación entre edad, sexo, IMC y etnia en cada grupo (controles y PDAC).	75
Tabla 11: Relación de edad, sexo, IMC, tabaco, alcohol, escala del estado funcional ECOG y variables bioquímicas entre los grupos (controles y PDAC).	77
Tabla 12: Relación de variables clínicas con la respuesta del modelo iClin dicotomizada según el punto de corte estándar, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con PDAC.	81
Tabla 13: Relación de variables clínicas con la respuesta del modelo iClin dicotomizada según el punto de corte calculado de Youden, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con PDAC.	82
Tabla 14: Relación de variables clínicas con la respuesta del modelo iClin como variable continua, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con PDAC.	83
Tabla 15: Relación de las variables recogidas durante el seguimiento de los pacientes con PDAC según el resultado del modelo iClin, para estudiar su posible aplicación en el pronóstico de la enfermedad.	84
Tabla 16: Relación de variables clínicas con la respuesta del modelo iTLB como variable continua, en cada grupo (controles y PDAC).	87
Tabla 17: Relación de variables clínicas con la respuesta del modelo iTLB dicotomizada según el punto de corte estándar de cero, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con PDAC.	88
Tabla 18: Relación de variables clínicas con la respuesta del modelo iTLB dicotomizada según el punto de corte calculado de Youden, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con PDAC.	89
Tabla 19: Relación de las variables recogidas durante el seguimiento de los pacientes con PDAC según el resultado del modelo iTLB, para ver su posible aplicación en el pronóstico de la enfermedad.	90
Tabla 20: Relación de las variables recogidas durante el seguimiento de los pacientes con PDAC según la concentración de las variables bioquímicas de uso clínico, para ver su posible aplicación en el pronóstico de la enfermedad.	93
Tabla 21: Relación de variables clínicas con el modelo iTLB+iClin como variable continua, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con PDAC.	95
Tabla 22: Relación de variables clínicas con el modelo iTLB+iClin dicotomizada según el punto de corte estándar, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con PDAC.	96
Tabla 23: Relación de las variables recogidas durante el seguimiento de los pacientes con PDAC según el resultado del modelo iTLB+iClin, para ver su posible aplicación en el pronóstico de la enfermedad.	97
Tabla 24: Resultado del modelo iTLB+iClin según los estadios (I-II, III-IV).	98
Tabla 25: Resultados del modelo iTLB+iClin dicotomizado, relacionados con los estadios (I-II, III-IV).	98
Tabla 26: Relación entre edad, sexo y IMC en cada grupo (controles y CCR).	111
Tabla 27: Relación de la edad, el sexo, el IMC, el hábito tabáquico, el abuso del alcohol, la escala ECOG y las concentraciones de las variables bioquímicas entre los grupos (controles y CCR).	113

Tabla 28: Relación de variables clínicas con la respuesta numérica del modelo iClin como variable continua, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con CCR.	117
Tabla 29: Relación de variables clínicas con la respuesta numérica del modelo iClin dicotomizada según el punto de corte estándar, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con CCR.	118
Tabla 30: Relación de las variables recogidas durante el seguimiento de los pacientes con CCR según el resultado del modelo iClin, para estudiar su posible relación en el pronóstico de la enfermedad.	120
Tabla 31: Relación de las variables recogidas durante el seguimiento de los pacientes con CCR según la concentración de las variables bioquímicas de uso clínico, para ver su posible aplicación en el pronóstico de la enfermedad.	121
Tabla 32: Relación de variables clínicas con la respuesta numérica del modelo iTLB como variable continua, en cada grupo (controles y CCR).	124
Tabla 33: Relación de variables clínicas con la respuesta numérica del modelo iTLB dicotomizada según el punto de corte estándar de cero, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con CCR.	125
Tabla 34: Relación de variables clínicas con la respuesta numérica del modelo iTLB dicotomizada según el punto de corte calculado de Youden, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con CCR.	126
Tabla 35: Relación de las variables recogidas durante el seguimiento de los pacientes con CCR según el resultado del modelo iTLB, para ver su posible aplicación en el pronóstico de la enfermedad.	127
Tabla 36: Relación de variables clínicas con el modelo iTLB+iClin considerado como variable continua, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con CCR.	131
Tabla 37: Relación de variables clínicas con el modelo iTLB+iClin dicotomizada según el punto de corte estándar, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con CCR.	132
Tabla 38: Relación de variables clínicas con el modelo iTLB+iClin dicotomizada según el punto de corte calculado de Youden, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con CCR.	133
Tabla 39: Relación de las variables recogidas durante el seguimiento de los pacientes con CCR según el resultado del modelo iTLB+iClin, para ver su posible aplicación en el pronóstico de la enfermedad.	134
Tabla 40: Combinaciones según el tipo de muestra, el tipo de diluyente y el tipo de clasificación según el resultado de la colonoscopia, para obtener 18 modelos iTLB distintos, uno para cada condición.	152
Tabla 41: Relación de la edad y el sexo según el resultado de la colonoscopia (Clasificación A, B y C).	155

Listado de figuras

Figura 1: Esquema del instrumento DSC (calorimetría diferencial de barrido). Figura adaptada de (36).	24
Figura 2: Tipos de aprendizaje automatizado.	25
Figura 3: Fórmula del modelo de regresión logística múltiple.	26
Figura 4: Diagrama de árbol de decisión.	26
Figura 5: Algoritmo de K vecinos más próximos.	27
Figura 6: Estimación de la incidencia y la mortalidad del cáncer de páncreas a nivel mundial, desde el 2020 hasta el 2040, según el sexo.	30
Figura 7: Localización del páncreas y sus principales metástasis. Imagen creada mediante la librería gganatogram. (171,172).	31
Figura 8: Mapa de incidencia del cáncer colorrectal en el mundo según rangos de edad. A/ En el sexo masculino; B/ En el sexo femenino.	36
Figura 9: Evolución de la mucosa normal a cancerosa en el intestino grueso.	37
Figura 10: Esquema del programa de cribado población del cáncer colorrectal.	39
Figura 11: Media y desviación estándar (sombreado en gris) de los duplicados de los termogramas procedentes de las alícuotas con concentraciones crecientes de bilirrubina.	45
Figura 12: Termogramas de las alícuotas con concentraciones crecientes de bilirrubina, junto a los termogramas de los pacientes con adenocarcinoma con concentraciones de bilirrubina parecida al de la alícuota.	46
Figura 13: Termogramas de la media de las alícuotas a cada concentración crecientes de bilirrubina, junto a la media de los termogramas de los pacientes con adenocarcinoma con concentraciones de bilirrubina parecida al de la alícuota, junto con su desviación estándar representada como sombreado en gris.	46
Figura 14: Top Scoring Pair de la librería switchBox de R aplicado a los datos de las curvas de termogramas de muestras biológicas.	52
Figura 15: Diagrama de frecuencias de las variables clínicas del grupo de pacientes con PDAC. A/ Proporción de pacientes en cada etapa según el estadio de la octava edición del AJCC; B/ Proporción de pacientes según si el tumor es resecable o no resecable.	54
Figura 16: Representación de las medias de los termogramas normalizados por el área en cada uno de los grupos (control sano y PDAC). El sombreado en gris hace referencia a la media \pm desviación estándar en cada grupo. Además, en la figura C están marcadas con líneas verticales discontinuas las temperaturas de 60°C y 80°C, ya que este rango de temperaturas fue el utilizado para entrenar el modelo de clasificación.	55
Figura 17: Representación paso a paso (1-5) de la metodología propuesta para analizar las curvas de termogramas normalizadas por el área y obtener un modelo de clasificación (modelo iTLB), según el ejemplo expuesto. 1/ En el gráfico de la izquierda se representa la proporción de pacientes en cada uno de los grupos (controles y PDAC); En el gráfico de la derecha se representa la proporción utilizada para entrenar y validar el modelo; 2/ Mediana de las AUC de los 100 grupos de validación, en cada rango de parejas de temperaturas. El objetivo de este gráfico es buscar el número de parejas de temperaturas óptimo (método del codo); 3/ Frecuencia de la selección de cada pareja de temperaturas en los 100 entrenamientos, cuando se aplicó la función ncvreg. La línea roja horizontal representa que las parejas de temperaturas que tienen una frecuencia mayor a 50 en los 100 remuestros es óptimo para introducirlos en el siguiente paso; 4/ Frecuencia de la selección de cada pareja de temperaturas que pasaron el punto de corte de 50 en el paso anterior, en los 100 nuevos entrenamientos; 5/ Media \pm 2 veces la desviación estándar de los coeficientes para los 100 últimos entrenamientos, en cada una de las parejas de temperaturas que constituyen el modelo iTLB.	56
Figura 18: Resultados del modelo iTLB obtenido para diferenciar los termogramas de un grupo control sano y un grupo de pacientes con PDAC. A/ Valor absoluto de los coeficientes del modelo iTLB en cada una de las variables predictoras (parejas de temperaturas); B/ Medias de los termogramas normalizados en cada grupo (controles y PDAC) y marcado con puntos negros se representa las temperaturas utilizadas en el modelo iTLB; C/ Diferencia de la mediana de la respuesta del modelo iTLB en el grupo de validación; D/ Área bajo la curva ROC del modelo iTLB en el grupo de validación; E/ En la parte superior aparece la tabla de contingencia de la predicción en el grupo de validación, usando como punto de corte el valor estándar de cero. En la parte inferior viene indicado los resultados del rendimiento del modelo iTLB; F/ En la parte superior aparece la tabla de contingencia de la predicción en el grupo de validación, usando como punto de corte el calculado según Youden (0.215). En la parte inferior viene indicado los resultados del rendimiento del modelo iTLB.	57

Figura 19: Patrones obtenidos como resultado del modelo iTLB en todas las muestras. Se representa la media y en sombreado la desviación estándar de los termogramas en cada uno de los grupos (controles y PDAC). En cada patrón viene indicado el valor del modelo iTLB, el número de pacientes controles y con PDAC con ese patrón, y, mediante un gráfico circular, la proporción de controles y pacientes con PDAC en cada patrón.	58
Figura 20: Relación del modelo iTLB con variables clínicas en los pacientes con PDAC. De izquierda a derecha: Modelo iTLB como variable continua, modelo iTLB dicotomizado por el punto de corte estándar, modelo iTLB dicotomizado por el punto de Youden y modelo iTLB dicotomizado por el punto de 1.464 obtenido de los patrones. A/ Relación del modelo iTLB con el estadio; B/ Asociación del modelo iTLB con la clasificación del tumor según si fue reseccable o no.	59
Figura 21: Descriptiva de variables clínica recogidas en la cohorte de 20 pacientes con PDAC. A/ Proporción de pacientes según la escala del estado funcional ECOG; B/ Proporción de pacientes según el grado de diferenciación histológica; C/ Proporción de pacientes según la respuesta al tratamiento por la escala RECIST1.1.	60
Figura 22: Diferencia de medias/medianas de la concentración de biomarcadores en sangre periférica y del modelo iTLB, entre las muestras extraídas antes y después del tratamiento. A/ Diferencia de medias de albúmina; B/ Diferencia de medias de hemoglobina; C/ Diferencia de medias de LDH; D/ Diferencia de medias del logaritmo natural de CA19.9; E/ Diferencia de medianas del modelo iTLB.	61
Figura 23: Cambios en cada paciente de los valores medidos en las muestras de suero (antes y después del tratamiento), según la respuesta RESCIST1.1. (RP, EE, PE). A/ Cambios en la concentración de albúmina; B/ Cambios en la concentración de hemoglobina; C/ Cambios en la concentración de LDH; D/ Cambios en la concentración del logaritmo natural de CA19.9; E/ Cambios en la respuesta del modelo iTLB.	62
Figura 24: Relación de la respuesta RESCIST1.1 (RP, EE, PE) con la supervivencia de los pacientes con PDAC. A/ Relación con la PFS; B/ Relación con la OS.	63
Figura 25: Relación del cambio producido en la concentración de CA19.9 y del TLB entre la muestra basal y la muestra extraída al mes, tras el tratamiento, con la supervivencia global (OS) de los pacientes. A/ Relación con el cambio de concentración de CA19.9 (“aumenta” vs “no cambia” vs “disminuye”); B/ Relación con todos los cambios de la respuesta del modelo iTLB; C/ Relación con el cambio de concentración de CA19.9 (“aumenta” vs “no cambia/disminuye”); D/ Relación con la respuesta del modelo iTLB en la muestra extraída al mes, categorizado por el punto de corte de cero. .	64
Figura 26: A/ Resultados del modelo iTLB en la muestra basal y los cambios producidos en la segunda muestra tras el tratamiento. El ancho de las barras está directamente relacionado con el número de pacientes con ese resultado; B/ Mediana del tiempo de supervivencia global de los pacientes según su valor en el resultado del modelo iTLB en la muestra al mes.	65
Figura 27: Relación estadísticamente significativa de diferentes variables entre los grupos (controles y PDAC). A/ Diferencia de la mediana de la edad (años); B/ Asociación del sexo (masculino y femenino); C/ Asociación del IMC (kg/m ²); D/ Asociación de la escala ECOG del estado funcional; E/ Diferencia de la mediana del logaritmo natural de la concentración de biomarcadores: CA19.9, PCR, IL-6 e YKL-40.	78
Figura 28: Proporción de pacientes con PDAC según: A/ la escala CACI; B/ el estadio; C/ el diagnóstico previo de diabetes (NO/SÍ); D/ la sintomatología de caquexia (NO/SÍ); E/ si cumplen o no los requisitos para operarse; F/ dentro de los pacientes operados, si la resección fue completa o no (SÍ/NO o R0/R1).	78
Figura 29: Resultados del modelo iClin obtenido para diferenciar a los pacientes controles (sintomáticos) de los pacientes con PDAC. A/ Valor absoluto de los coeficientes del modelo iClin en cada una de las variables predictoras; B/ Diferencia de medianas de la respuesta del modelo iClin en el grupo de validación (controles y PDAC), representando con una línea horizontal continua el punto de corte estándar, y discontinua el de Youden; C/ Área bajo la curva ROC del modelo iClin en el grupo de validación; D/ En la parte superior aparece la tabla de contingencia de la predicción del modelo iClin dicotomizado por el punto de corte estándar, en el grupo de validación. En la parte inferior viene indicado los resultados del rendimiento del modelo iClin; E/ En la parte superior aparece la tabla de contingencia de la predicción del modelo iClin dicotomizado por el punto de corte de Youden, en el grupo de validación. En la parte inferior viene indicado los resultados del rendimiento del modelo iClin.	79
Figura 30: Relación entre el modelo iClin y variables clínicas recogidas en el grupo de pacientes con PDAC. A/ Diferencia de la media del modelo iClin según el estadio; B/ Diferencia de la media del modelo iClin según si los pacientes cumplían los requisitos para operarse o no.	84
Figura 31: Representación de las medias de los termogramas normalizados por el área en cada uno de los grupos (controles y PDAC). El sombreado en gris hace referencia a la media ± desviación estándar en cada grupo. Además, en la	

figura C se marca con líneas verticales discontinuas las temperaturas de 60°C y 80°C, ya que este rango de temperaturas fue el utilizado para entrenar el modelo de clasificación.	85
Figura 32: Resultados del modelo iTLB obtenido para diferenciar los termogramas de cada grupo. A/ Valor absoluto de los coeficientes del modelo iTLB en cada una de las variables predictoras; B/ Representación de las medias de los termogramas normalizados en cada grupo (controles y PDAC) y marcado con puntos negros se representa las temperaturas utilizadas en el modelo iTLB; C/ Diferencia de medianas del modelo iTLB en cada grupo (controles y PDAC), representando en líneas horizontales el punto de corte estándar (línea continua) y el de Youden (línea discontinua); D/ Área bajo la curva ROC del modelo iTLB en el grupo de validación; E/ Arriba: Tabla de contingencia de la predicción en el grupo de validación, usando el punto de corte estándar. Abajo: rendimiento del modelo iTLB; F/ Arriba: tabla de contingencia de la predicción en el grupo de validación, usando como punto de corte el de Youden. Abajo: resultados del rendimiento del modelo iTLB.....	86
Figura 33: Relación estadísticamente significativa entre el modelo iTLB y variables clínicas recogidas en el grupo control y en el grupo de pacientes con PDAC. A/ Diferencia de mediana de la edad según el modelo iTLB dicotomizado por el punto de corte estándar (izquierda) y el de Youden (derecha); B/ A la izquierda, diferencia de la mediana del modelo iTLB según el IMC (kg/m ²). A la derecha, asociación entre el modelo iTLB y el IMC (kg/m ²); C/Diferencia de mediana del modelo iTLB según la escala ECOG; D/ De izquierda a derecha: diferencia de la mediana del modelo iTLB según la concentración de PCR. Diferencia de la media del logaritmo natural de la concentración de PCR según el modelo iTLB dicotomizado por el punto de corte estándar (izquierda) y el de Youden (derecha); Asociación entre la concentración de PCR y el modelo iTLB dicotomizado por el punto de Youden, en el grupo control. Asociación entre la concentración de PCR y el modelo iTLB dicotomizado por el punto estándar (arriba) y el de Youden (abajo), en el grupo PDAC; E/ A la izquierda, asociación entre el modelo iTLB dicotomizado según el punto de corte de Youden y la concentración de CA19.9; A la derecha, diferencia de la media del logaritmo natural de la concentración de CA19.9 según el modelo iTLB dicotomizado por el punto de corte de Youden; F/ Diferencia de la mediana del logaritmo natural de IL-6 según el modelo iTLB por el punto de corte estándar (derecha) y el de Youden (izquierda); G/ Diferencia de la mediana del logaritmo natural de YKL-40 según el modelo iTLB según el punto de corte estándar (derecha) y el de Youden (izquierda).	91
Figura 34: Asociación del modelo iTLB con las variables relacionadas con el pronóstico de los pacientes con PDAC. A/ Diferencia en la mediana del tiempo hasta la recaída en los pacientes operados, según el modelo iTLB dicotomizado por el punto de corte de Youden; B/ Diferencia de la mediana del tiempo de OS de los pacientes operados, según el modelo iTLB dicotomizado por el punto de corte estándar; C/ Diferencia de la mediana del tiempo de OS de los pacientes operados, según el modelo iTLB dicotomizado por el punto de Youden; D/ Diferencia de la mediana del tiempo de OS de los pacientes no operados, según el modelo iTLB dicotomizado por el punto de corte estándar; E/ Diferencia de la mediana del tiempo de OS de los pacientes no operados, según el modelo iTLB dicotomizado por el punto de Youden.	92
Figura 35: Resultados del modelo iTLB+iClin obtenido para diferenciar a los pacientes controles (sin diagnóstico de cáncer) de los pacientes con PDAC. A/ Valor absoluto de los coeficientes del modelo iTLB+iClin en cada una de las variables predictoras; B/ Diferencia de medianas de la respuesta del modelo iTLB+iClin en el grupo de validación (controles y PDAC), representando con una línea horizontal continua el punto de corte estándar, y discontinua el de Youden; C/ Área bajo la curva ROC del modelo iTLB+iClin en el grupo de validación; D/ En la parte superior aparece la tabla de contingencia de la predicción en el grupo de validación. En la parte inferior viene indicado los resultados del rendimiento del modelo iTLB+iClin.....	94
Figura 36: Relación entre el modelo iTLB+iClin y variables clínicas recogidas en el grupo de pacientes con PDAC. A/ Diferencias de medias del modelo iTLB+iClin según el estadio; B/ Diferencia de medias del modelo iTLB+iClin según si cumple los criterios para operarse o no; C/ Diferencia de la mediana del tiempo de supervivencia global de los pacientes operados, según el modelo iTLB+iClin dicotomizado por el punto de corte estándar; D/ Diferencia de la mediana del tiempo de supervivencia global de los pacientes no operados, según el modelo iTLB+iClin dicotomizado por el punto de corte estándar.	97
Figura 37: A/ Diferencia de medianas del modelo iTLB+iClin según los estadios (I-II vs III-IV); B/ Área bajo la curva ROC del modelo iTLB+iClin para diferenciar a los pacientes con estadios = I-II, y estadios = III-IV.....	98
Figura 38: Clasificación, según cada uno de los tres modelos obtenidos, de los pacientes de la cohorte MICA con diagnóstica de cáncer durante su seguimiento.	99
Figura 39: Gráfico de incidencias de los cánceres más frecuentes en Europa, en ambos sexos.....	104
Figura 40: Relación estadísticamente significativa de diferentes variables entre los grupos (controles y CCR). A/ Diferencia de la mediana de la edad (años); B/ Asociación con el sexo (masculino y femenino); C/ Asociación con el consumo de	

alcohol; D/ Asociación con la escala ECOG del estado funcional; E/ Diferencia de la mediana del logaritmo natural de la concentración de biomarcadores: CEA, PCR, IL-6 e YKL-40. 114

Figura 41: Proporción de pacientes con CCR según: A/ El estadio; B/ Los subgrupos: operados y con metástasis; C/ Escala CCI, dentro del subgrupo de operados; D/ Escala ASA, dentro del subgrupo de operados; E/ La resección de la cirugía en los operados; F/ Si el tumor primario fue resecado o estaba in situ dentro del grupo de pacientes metastásicos. 115

Figura 42: Resultados del modelo iClin obtenido para diferenciar a los pacientes controles (sintomáticos) de los pacientes con CCR. A/ Valor absoluto de los coeficientes del modelo iClin en cada una de las variables predictoras; B/ Diferencia de medianas de la respuesta numérica del modelo iClin en el grupo de validación (controles y CCR), representando con una línea horizontal continua el punto de corte estándar, y con una línea discontinua el de Youden; C/ Área bajo la curva ROC del modelo iClin en el grupo de validación; D/ En la parte superior aparece la tabla de contingencia de la predicción del modelo iClin en el grupo de validación empleando el punto de corte estándar. En la parte inferior se indican los índices del rendimiento del modelo iClin; E/ En la parte superior aparece la tabla de contingencia de la predicción del modelo iClin en el grupo de validación empleando el punto de corte de Youden. En la parte inferior se indican los índices del rendimiento del modelo iClin. 115

Figura 43: Relación estadísticamente significativa entre el modelo iClin y variables clínicas recogidas en el grupo control y en el grupo de pacientes con CCR. A/ A la izquierda, diferencia de mediana del modelo iClin según el hábito tabáquico. A la derecha, asociación entre el modelo iClin y el hábito tabáquico; B/ A la izquierda, diferencia de la mediana del modelo iClin según el abuso de alcohol. A la derecha, asociación entre el modelo iClin y el abuso de alcohol; C/ De izquierda a derecha: diferencia de la mediana del logaritmo natural de la concentración de PCR en sangre periférica según el modelo iClin. Diferencia de la mediana del modelo iClin según la concentración de PCR. Asociación del modelo iClin con la concentración de PCR; D/ Diferencia de la mediana del logaritmo natural de la concentración de IL-6 en sangre periférica según el modelo iClin; E/ Diferencia de la mediana del logaritmo natural de la concentración de YKL-40 en sangre periférica según el modelo iClin; F/ A la izquierda, diferencia de la mediana del modelo iClin según la escala del estado funcional ECOG. A la derecha, asociación entre el modelo iClin y la escala ECOG del estado funcional; G/ Diferencia de la mediana del modelo iClin según la escala ASA; H/ A la izquierda, diferencia de la mediana del modelo iClin según la escala CCI. A la derecha, asociación entre el modelo iClin y la escala CCI; I/ A la izquierda, diferencia de la mediana del modelo iClin según el tumor primario. A la derecha, asociación entre el modelo iClin y el tumor primario; J/ Diferencia en la mediana del tiempo de OS en pacientes con metástasis, según el modelo iClin dicotomizado por el punto de corte estándar. 120

Figura 44: Representación de las medias de los termogramas normalizados por el área en cada uno de los grupos (controles y pacientes con CCR). El sombreado en gris hace referencia a la media \pm desviación estándar en cada grupo. Además, en la figura C se marca con líneas verticales discontinuas las temperaturas de 60°C y 80°C, ya que este rango de temperaturas fue el utilizado para entrenar el modelo de clasificación. 121

Figura 45: Resultados del modelo iTLB obtenido para diferenciar los termogramas de cada grupo. A/ Valor absoluto de los coeficientes del modelo iTLB en cada una de las variables predictoras; B/ Representación de las medias de los termogramas normalizados en cada grupo (controles y CCR) y marcado con puntos negros se representa las temperaturas utilizadas en el modelo iTLB; C/ Diferencia de medianas del modelo iTLB en cada grupo (controles y CCR), representando en líneas horizontales el punto de corte estándar (línea continua) y el de Youden (línea discontinua); D/ Área bajo la curva ROC del modelo iTLB en el grupo de validación; E/ Arriba: Tabla de contingencia de la predicción en el grupo de validación, usando el punto de corte estándar. Abajo: índices de rendimiento del modelo iTLB; F/ Arriba: tabla de contingencia de la predicción en el grupo de validación, usando como punto de corte el de Youden. Abajo: índices de rendimiento del modelo iTLB. 122

Figura 46: Relación estadísticamente significativa entre el modelo iTLB y variables clínicas recogidas en el grupo control y en el grupo de pacientes con CCR. A/ Diferencia de mediana del modelo iTLB según el sexo; B/ De izquierda a derecha: diferencia de la mediana del modelo iTLB según el hábito tabáquico. Asociación entre el hábito tabáquico y el modelo iTLB dicotomizado por el punto de corte estándar. Asociación entre el hábito tabáquico y el modelo iTLB dicotomizado por el punto de corte de Youden; C/ De izquierda a derecha: diferencia de la mediana del modelo iTLB según la concentración de CEA. Diferencia de la mediana del logaritmo natural de la concentración de CEA en sangre periférica según el modelo iTLB. Asociación entre la concentración de CEA y el modelo iTLB dicotomizado por el punto de corte estándar. Asociación entre la concentración de CEA y el modelo iTLB dicotomizado por el punto de corte de Youden; D/ De izquierda a derecha: diferencia de la mediana del modelo iTLB según la concentración de PCR. Diferencia de la mediana del logaritmo natural de la concentración de PCR en sangre periférica según el modelo iTLB. Asociación entre la concentración de PCR y el modelo iTLB en el grupo control. Asociación entre la concentración de CEA y el modelo iTLB en el grupo de pacientes con CCR; E/ Diferencia de la mediana del logaritmo natural de la concentración de IL-6 en sangre periférica según el modelo iTLB; F/ Diferencia de la mediana del logaritmo natural de la concentración de YKL-40 en sangre

periférica según el modelo iTLB; G/ Diferencia en la mediana del tiempo de OS en el grupo de pacientes con metástasis, según el modelo iTLB dicotomizado por el punto de corte estándar..... 128

Figura 47: Resultados del modelo iTLB+iClin obtenido para diferenciar al grupo de controles sin diagnóstico de cáncer de los pacientes con CCR. A/ Valor absoluto de los coeficientes del modelo iTLB+iClin en cada una de las variables predictoras; B/ Diferencia de medianas de la respuesta numérica del modelo iTLB+iClin en el grupo de validación (controles y CCR), representando con una línea horizontal continua el punto de corte estándar, y discontinua el de Youden; C/ Área bajo la curva ROC del modelo iTLB+iClin en el grupo de validación; D/ Arriba: Tabla de contingencia de la predicción en el grupo de validación, usando el punto de corte estándar. Abajo: índices de rendimiento del modelo iTLB+iClin; E/ Arriba: tabla de contingencia de la predicción en el grupo de validación, usando como punto de corte el de Youden. Abajo: índices de rendimiento del modelo iTLB+iClin..... 129

Figura 48: Asociación estadísticamente significativa entre el modelo iTLB+iClin y la supervivencia global de los pacientes con CCR operados. A/ Según el modelo iTLB+iClin dicotomizado por el punto de corte estándar; B/ Según el modelo iTLB+iClin dicotomizado por el punto de corte de Youden. 134

Figura 49: Relación estadísticamente significativa entre el modelo iTLB+iClin y variables clínicas recogidas en el grupo control y en el grupo de pacientes con CCR. A/ De izquierda a derecha: Diferencia de mediana del modelo iTLB+iClin según el hábito tabáquico. Asociación entre el hábito tabáquico y el modelo iTLB+iClin dicotomizado por el punto de corte estándar. Asociación entre el hábito tabáquico y el modelo iTLB+iClin dicotomizado por el punto de corte de Youden; B/ Diferencia de la mediana del modelo iTLB+iClin según el abuso del consumo de alcohol; C/ De izquierda a derecha: Diferencia de la mediana del modelo iTLB+iClin según la concentración de PCR. Diferencia de la mediana del logaritmo natural de la concentración de PCR en sangre periférica según el modelo iTLB+iClin. Asociación entre la concentración de PCR y el modelo iTLB+iClin dicotomizado por el punto de corte estándar (arriba) y de Youden (abajo); D/ Diferencia de la mediana del logaritmo de la concentración de IL-6 según el modelo iTLB+iClin dicotomizado por el punto de corte estándar (izquierda) y de Youden (derecha); E/ Diferencia de la mediana del logaritmo de la concentración de YKL-40 según el modelo iTLB+iClin dicotomizado por el punto de corte estándar (izquierda) y de Youden (derecha); F/ De izquierda a derecha: Diferencia de la mediana del modelo iTLB+iClin según la escala del estado funcional ECOG. Asociación entre la escala ECOG y el modelo iTLB+iClin dicotomizado por el punto de corte estándar. Asociación entre la escala ECOG y el modelo iTLB+iClin dicotomizado por el punto de corte de Youden; G/ A la izquierda, diferencia en la mediana del modelo iTLB+iClin según la escala CCI. A la derecha, asociación entre la escala CCI y el modelo iTLB+iClin dicotomizado por el punto de corte estándar (arriba) y de Youden (abajo); H/ A la izquierda, diferencia de la mediana del modelo iTLB+iClin según la escala ASA. A la derecha, asociación entre la escala ASA y el modelo iTLB+iClin según el punto de corte de Youden. I/ A la derecha, diferencia de la mediana del modelo iTLB+iClin según el tumor primario. A la derecha, asociación entre las características del tumor primario y el modelo iTLB+iClin dicotomizado por el punto de corte estándar. 136

Figura 50: AUC de las curvas ROC del biomarcador CEA, del modelo iClin y del modelo iTLB+iClin para diferenciar el grupo control respecto del: A/ grupo de pacientes con CCR; B/ grupo de pacientes con CCR operados; C/ grupo de pacientes con metástasis; D/ grupo de pacientes en estadios tempranos (estadio = I-II); y E/ grupo de pacientes con estadios avanzados (estadio = III-IV)..... 137

Figura 51: Gráfico tipo volcán de 100 muestras de suero de pacientes operados y con metástasis de CCR. Se muestra las proteínas cuya concentración relativa es estadísticamente mayor en el grupo con iTLB > 0 o mayor en el grupo con iTLB < 0 aplicando un umbral de FC < ±1, además de las que superan un umbral más laxo de FC ± 0.75. 138

Figura 52: Gráfico tipo volcán de 50 muestras de suero de pacientes operados de CCR. Se muestra las proteínas cuya concentración relativa es estadísticamente mayor en el grupo con iTLB > 0 o mayor en el grupo con iTLB < 0 aplicando un umbral de FC < ±1. 139

Figura 53: Gráfico tipo volcán de 50 muestras de suero de pacientes con metástasis. Se muestra las proteínas cuya concentración relativa es estadísticamente mayor en el grupo con iTLB > 0 o mayor en el grupo con iTLB < 0 aplicando un umbral de FC < ±1. 139

Figura 54: Diferencia de medianas de: A/ La concentración de PCR según el modelo iTLB dicotomizado por el punto de corte estándar en el grupo de pacientes operados; B/ La concentración de PCR según el modelo iTLB dicotomizado por el punto de corte estándar en el grupo de pacientes con metástasis; C/ La concentración de FGL1 según el modelo iTLB dicotomizado por el punto de corte estándar, en el grupo de 50 pacientes operados que se analizaron por proteómica. 140

Figura 55: Proporción de pacientes del programa de cribado de cáncer de colorrectal, según el resultado de la colonoscopia. A/ Clasificación A: Sin Hallazgos vs Pólipos (no avanzados, avanzados) y CCR; B/ Clasificación B: Sin Hallazgos

y Pólipos No Avanzado vs Pólipos Avanzados y CCR; C/ Clasificación C: Sin Hallazgos y Sin Seguimiento vs Con seguimiento (a los 3 años y a los 3-6 meses) y CCR.....	154
Figura 56: Asociación entre el sexo (masculino y femenino) de los pacientes del programa de cribado de cáncer colorrectal y el resultado de la colonoscopia. A/ Según la Clasificación A; B/ Según la Clasificación B; C/ Según la Clasificación C. .	155
Figura 57: Medias y desviación estándar en sombreado de los termogramas obtenidos según diferentes tipos de muestras y distintos diluyentes.	156
Figura 58: Valor absoluto de los coeficientes de las variables predictoras (parejas de temperaturas) seleccionadas en los diferentes modelos iTLB obtenidos en cada una de las condiciones: según el tipo de muestra, suero (A-I) o plasma-EDTA (J-R); según el diluyente empleado, PBS (A-C, J-L) o NaCl 0.9% (D-F, M-O) o agua Milli-Q (G-I, P-R); según el resultado de la colonoscopia, Clasificación A (A, D, G, J, M, P) o Clasificación B (B, E, H, K, N, Q) o Clasificación C (C, F, I, L, O, R).	158
Figura 59: Modelo iTLB para diferenciar según la Clasificación. A/ Obtenido en muestras de suero y aplicado a los mismos pacientes, pero en muestras de plasma-EDTA, usando PBS como diluyente; B/ Obtenido en muestras de plasma-EDTA y aplicado a los mismos pacientes, pero en muestras de suero, usando PBS como diluyente; C/ Obtenido en muestras de suero y aplicado a los mismos pacientes, pero en muestras de plasma-EDTA, usando agua Milli-Q como diluyente; D/ Obtenido en muestras de plasma-EDTA y aplicado a los mismos pacientes, pero en muestras de suero, usando agua Milli-Q como diluyente.....	159
Figura 60: En la izquierda, porcentaje de pacientes con CCR clasificados correctamente según cada modelo iTLB. En la derecha, porcentaje de especificidad en cada modelo iTLB.	160
Figura 61: Resultados del modelo iTLB seleccionado (usando muestras de suero y agua Milli-Q como diluyente) para diferenciar los termogramas de cada grupo según el resultado de la colonoscopia con la Clasificación B. A/ Representación de las medias de los termogramas normalizados en cada grupo según la Clasificación B (Sin Hallazgos o Pólipos No avanzados y Pólipos Avanzados o CCR) y marcado con puntos negros se representa las temperaturas utilizadas en el modelo iTLB; B/ Diferencia de la mediana del modelo iTLB según cada grupo (Sin Hallazgos o Pólipos No avanzados y Pólipos Avanzados o CCR), representando en línea horizontal el punto de corte estándar; C/ Área bajo la curva ROC del modelo iTLB en todos los datos; D/ Arriba: Tabla de contingencia de la predicción en todos los datos, usando el punto de corte estándar. Abajo: rendimiento del modelo iTLB; E/ Diferencia de medianas del modelo iTLB en cada grupo según el resultado de la colonoscopia (Sin Hallazgos, con Pólipos No Avanzados, con Pólipos Avanzados y con CCR), representando en línea horizontal el punto de corte estándar.	161
Figura 62: En la izquierda, porcentaje de pacientes con CCR clasificados correctamente según cada modelo iTLB_sex. En la derecha, porcentaje de especificidad en cada modelo iTLB_sex.	162
Figura 63: Resultados del modelo iTLB_sex seleccionado (usando muestras de suero y PBS como diluyente) para diferenciar los termogramas de cada grupo según el resultado de la colonoscopia con la Clasificación A. A/ Valor absoluto de los coeficientes de las variables predictoras del modelo iTLB_sex; B/ Diferencia de la mediana del modelo iTLB_sex según cada grupo (Sin Hallazgos y Pólipos No Avanzados o Avanzados o CCR), representando en línea horizontal el punto de corte estándar; C/ Área bajo la curva ROC del modelo iTLB_sex en todos los datos; D/ Arriba: Tabla de contingencia de la predicción en todos los datos, usando el punto de corte estándar. Abajo: rendimiento del modelo iTLB_sex; E/ Diferencia de medianas del modelo iTLB_sex en cada grupo según el resultado de la colonoscopia (Sin Hallazgos, con Pólipos No Avanzados, con Pólipos Avanzados y con CCR), representando en línea horizontal el punto de corte estándar.	163

PUBLICACIONES

Los trabajos realizados durante esta Tesis Doctoral han proporcionado los siguientes trabajos científicos, algunos de ellos pendientes de publicar:

- Hermoso-Durán, S., García-Rayado, G., Ceballos-Laita, L., Sostres, C., Vega, S., Millastre, J., ... & Abian, O. (2020). Thermal liquid biopsy (TLB) focused on benign and premalignant pancreatic cyst diagnosis. *Journal of Personalized Medicine*, 11(1), 25.
- Annesi, F., Hermoso-Durán, S., Rizzuti, B., Bruno, R., Pirritano, D., Petrone, A., ... & Guzzi, R. (2021). Thermal Liquid Biopsy (TLB) of blood plasma as a potential tool to help in the early diagnosis of multiple sclerosis. *Journal of Personalized Medicine*, 11(4), 295.
- Morcuende-Ventura, V., Hermoso-Durán, S., Abian-Franco, N., Pazo-Cid, R., Ojeda, J. L., Vega, S., ... & Abian, O. (2021). Fluorescence liquid biopsy for cancer detection is improved by using cationic dendronized hyperbranched polymer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6501.
- Domper Arnal, M. J., García Mateo, S., Hermoso-Durán, S., Abad, D., Carrera-Lasfuentes, P., Velazquez-Campoy, A., ... & Lanas, A. (2021). False-positive fecal immunochemical test results in colorectal cancer screening and gastrointestinal drug use. *International Journal of Colorectal Disease*, 36(9), 1861-1869.
- Hermoso-Durán, S., Domper-Arnal, M. J., Roncales, P., Vega, S., Sanchez-Gracia, O., Ojeda, J. L., ... & Abian, O. (2023). Bowel Preparation for Colonoscopy Changes Serum Composition as Detected by Thermal Liquid Biopsy and Fluorescence Spectroscopy. *Cancers*, 15(7), 1952.
- Sonia Hermoso-Durán, Nicolas Fraunhofer, Judith Millastre-Bocos, Oscar Sanchez-Gracia, Pablo F. Garrido, Sonia Vega1, Ángel Lanas, Adrián Velázquez-Campoy, Olga Abian. Development of a Machine Learning Model for Diagnosis of Pancreatic Cancer from Serum Samples Analyzed by Thermal Liquid Biopsy. (*Pendiente de publicar*)
- Sonia Hermoso-Durán, Astrid Z. Johansen, Julia S. Johansen, Claus L. Feltoft, Carsten P. Hansen, Nicolas Fraunhofer, Oscar Sanchez-Gracia, Pablo F. Garrido, Sonia Vega, Ángel Lanas, Adrian Velazquez-Campoy, Olga Abian. Transforming Pancreatic Cancer Diagnostics: A Comprehensive Comparative Analysis of Clinical Biomarkers, Thermal Liquid Biopsy, and Integrated Approaches. (*Pendiente de publicar*)

Article

Bowel Preparation for Colonoscopy Changes Serum Composition as Detected by Thermal Liquid Biopsy and Fluorescence Spectroscopy

Sonia Hermoso-Durán ^{1,2,3} , María José Domper-Arnal ^{2,3,4}, Pilar Roncales ^{2,3,4}, Sonia Vega ¹, Oscar Sanchez-Gracia ^{5,6}, Jorge L. Ojeda ⁷, Ángel Lanas ^{2,3,4,8} , Adrian Velazquez-Campoy ^{1,2,3,9,*}  and Olga Abian ^{1,2,3,9,*} 

- ¹ Institute of Bio computation and Physics of Complex Systems (BIFI), Joint Unit GBsC-CSIC-BIFI, University of Zaragoza, 50018 Zaragoza, Spain
- ² Aragón Health Research Institute (IIS Aragón), 50009 Zaragoza, Spain
- ³ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), 28029 Madrid, Spain
- ⁴ Department of Gastroenterology, Lozano Blesa Clinic University Hospital, 50009 Zaragoza, Spain
- ⁵ Department of Electronic Engineering and Communications, University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain
- ⁶ SOTER BioAnalytics, Enrique Val, 50011 Zaragoza, Spain
- ⁷ Department of Statistical Methods, University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain
- ⁸ Department of Medicine, Psychiatry and Dermatology, University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain
- ⁹ Department of Biochemistry and Molecular and Cell Biology, University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain
- * Correspondence: adrianvc@unizar.es (A.V.-C.); oabifra@unizar.es (O.A.)

Simple Summary: Considering thermal liquid biopsy (TLB) as a potential secondary test after fecal immunochemical test positivity (FIT+), the aim of this work was to study possible interferences of colonoscopy bowel preparation on TLB outcome on a retrospective study. TLB parameters together with fluorescence spectra and other serum indicators (albumin and C-reactive protein) confirmed the statistically significant differences between normal colonoscopy patients with and without bowel preparation, revealing the distorting effect of bowel preparation on serum composition and discrimination of disease status. The diagnostic capability of other liquid-biopsy-based methods might also be compromised. Blood extraction after bowel preparation for colonoscopy should be avoided.



Citation: Hermoso-Durán, S.; Domper-Arnal, M.J.; Roncales, P.; Vega, S.; Sanchez-Gracia, O.; Ojeda, J.L.; Lanas, Á.; Velazquez-Campoy, A.; Abian, O. Bowel Preparation for Colonoscopy Changes Serum Composition as Detected by Thermal Liquid Biopsy and Fluorescence Spectroscopy. *Cancers* **2023**, *15*, 1952. <https://doi.org/10.3390/cancers15071952>

Academic Editor: Nichola C. Garbett

Received: 20 January 2023

Revised: 20 March 2023

Accepted: 22 March 2023

Published: 24 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: (1) Background: About 50% of prescribed colonoscopies report no pathological findings. A secondary screening test after fecal immunochemical test positivity (FIT+) would be required. Considering thermal liquid biopsy (TLB) as a potential secondary test, the aim of this work was to study possible interferences of colonoscopy bowel preparation on TLB outcome on a retrospective study; (2) Methods: Three groups were studied: 1/514 FIT(+) patients enrolled in a colorectal screening program (CN and CP with normal and pathological colonoscopy, respectively), with blood samples obtained just before colonoscopy and after bowel preparation; 2/55 patients from the CN group with blood sample redrawn after only standard 8–10 h fasting and no bowel preparation (CNR); and 3/55 blood donors from the biobank considered as a healthy control group; (3) Results: The results showed that from the 514 patients undergoing colonoscopy, 247 had CN and 267 had CP. TLB parameters in these two groups were similar but different from those of the blood donors. The resampled patients (with normal colonoscopy and no bowel preparation) had similar TLB parameters to those of the blood donors. TLB parameters together with fluorescence spectra and other serum indicators (albumin and C-reactive protein) confirmed the statistically significant differences between normal colonoscopy patients with and without bowel preparation; (4) Conclusions: Bowel preparation seemed to alter serum protein levels and altered TLB parameters (different from a healthy subject). The diagnostic capability of other liquid-biopsy-based methods might also be compromised. Blood extraction after bowel preparation for colonoscopy should be avoided.

Keywords: thermal liquid biopsy; colonoscopy; colorectal cancer; fluorescence spectroscopy

1. Introduction

Although colorectal cancer (CRC) incidence is steadily rising worldwide, its mortality has greatly decreased in recent decades [1]. This reduction is largely attributed to the implementation of population-based screening programs. Screening programs have been shown to reduce CRC mortality in men and women at screening age [1,2]. Colonoscopy is the gold standard technique for CRC detection (statistical sensitivity between 92 and 99%) [3] and it allows, not only the detection of a pathology at an early stage, but also the removal of noncancerous polyps preventing their progression to CRC. However, colonoscopy is an invasive technique, with considerable risk and discomfort for the patient.

Currently, the fecal immunochemical test (FIT) for occult blood testing is the most widely used standard noninvasive method for detecting precursor lesions and early stage CRC prior to colonoscopy [4,5]. Although FIT is cost-effective, it has low clinical potential due to its high false positive rate regarding colonoscopy outcome [6]: about 50% of the FIT(+) colonoscopies performed reveal no findings [7]. A low statistical specificity test not only increases the cost of the screening program but also unnecessarily exposes patients to an invasive and risky procedure such as colonoscopy. In addition, it increases waiting lists for colonoscopy [6] and thus delays the diagnosis of true positives.

TLB analyzes plasma or serum samples using differential scanning calorimetry (DSC). The TLB thermogram reflects the global denaturation of major proteins in serum, which has been shown to be different in healthy and diseased subjects. Other groups have applied DSC to serum/plasma samples associated to inflammation and tumor diseases [8–12]. In our group, we have been working on the development of thermal liquid biopsy (TLB) as a diagnostic technique, applying it to different pathologies such as gastric adenocarcinoma [13], melanoma [14], lung cancer [15], pancreatic cyst [16], and multiple sclerosis [17]. Our goal is to propose an additional test based on TLB for reducing the number of colonoscopy unnecessary arising from FIT(+). Thus, once a case is identified as FIT(+), and prior to prescribing the colonoscopy procedure, TLB would offer the clinician a secondary test helping in the decision to whether or not prescribe a colonoscopy and providing a tool to stratify/prioritize patients in the waiting list. When TLB is applied to a serum sample, a TLB score between zero and one is obtained from the TLB profile, indicating a low (value close to zero) or high (value close to one) probability of presenting a pathology. As any other technique similar to liquid biopsy, TLB is a minimally invasive and low-cost test that could be very useful when applied sequentially after a FIT(+) result. Thus, patients who are FIT(+) and have a TLB score above 0.5 would be further considered for colonoscopy.

Several techniques based on fluid biopsy have been developed in the last decade. It might be reasonable to think that their application in routine clinical practice would be straightforward, but there are still some practical issues that need to be addressed before their extensive use in the clinic [18]. Some concerns are related to biomarker levels/thresholds in samples, a lack of consensus on the preanalytical and analytical conditions, clinical validation, regulatory compliance, and cost-effectiveness [19–21]. These methodological problems have led to the current situation where the use of fluid biopsy in clinical practice is limited [21–23]. Therefore, it is necessary to work towards a consensus that will allow a full implementation of fluid biopsy techniques in the near future. The advantages of the technique are obvious: information-rich, minimally invasive, low cost, and high adherence for periodic testing. In the case of TLB, an aspect needs to be addressed: the preanalytical conditions during the sample extraction.

Many validation studies for liquid biopsy applied to serum diagnosis of CRC are usually carried out with patient samples collected at the same time as the colonoscopy procedure to avoid an additional hospital visit [24–28]. Standard preparation for colonoscopy includes two days on a low-residue diet with 24 h of fasting (fluid intake only) and administration of laxatives prior to the procedure. There are studies reporting altered serum composition after preparation for colonoscopy, and therefore, any analysis (e.g., proteomic, metabolomic) performed on those samples may potentially be distorted [24–28].

In this study, we examined how patient preparation associated with the colonoscopy procedure affects the TLB outcome. Additionally, we provided further evidence for changes in protein serum composition using serum fluorescence spectroscopy and concentrations of albumin and C-reactive protein (CRP) measured by conventional biochemical methods.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects and Samples

2.1.1. Serum Samples for Primary TLB Study

The first group of serum samples ($n = 514$) was collected from patients enrolled in the regional CRC screening program at Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (HCULB) in Zaragoza, from April to October of 2019, and FIT was positive in all subjects (cut-off value of $20 \mu\text{g}$ hemoglobin per gram of stool). Samples were drawn the same day of the colonoscopy procedure, when patients were under standard bowel preparation (Citrafleet®). Clinical variables were collected from the patients, such as demographic data (age and sex) and colonoscopy diagnosis (gastroenterologist's findings confirmed by a histopathological analysis).

The first group of patients was classified into: 1. Normal group (CN, $n = 247$), including subjects with non-neoplastic colon pathologies for whom the FIT(+) result could be justified with other pathologies such as hemorrhoids, diverticulitis, fissures, or non-pathological (hyperplastic) polyps. This group also included subjects with no findings in their colonoscopies, but with a FIT(+) diagnosis. 2. Pathological group (CP, $n = 267$), including subjects with any of the following colonoscopy findings: 2.A. nonadvanced polyp (tubular adenoma <10 mm and with a low-grade dysplasia or serrated polyp <10 mm and without dysplasia); 2.B. advanced polyp (adenoma with villous histology, ≥ 10 mm, or with high-grade dysplasia; or serrated polyp ≥ 10 mm or with dysplasia; or more than two lesions (adenomas or serrated polyps)), independently of the characteristics of the lesions; and 2.C. CRC.

Symptomatic patients with a prescribed colonoscopy were excluded. Subjects with a history of inflammatory bowel disease, elevated risk of CRC (familial CRC, hereditary CRC, and polyposis syndromes, including Lynch Syndrome, familial adenomatous polyposis, MUTYH-associated polyposis, serrated polyposis syndrome, and hamartomatous polyposis condition, such as Peutz–Jeghers syndrome and juvenile polyposis syndrome), and subjects who underwent colonoscopy referred for polyps and/or under CRC surveillance were also excluded. Other exclusion criteria were patients with an incomplete colonoscopy in which the cecum was not reached, with a mean withdrawal time of less than 6 min, or with inadequate bowel preparation according to the validated Boston Bowel Preparation Scale. Therefore, asymptomatic patients with complete visualization of the colon and appropriate withdrawal time were included, as well as those with an incomplete colonoscopy due to a neoplastic structure.

A summary of the characteristic data of these patients, is provided in Table S1.

2.1.2. Serum Samples for Secondary TLB Study

Given potential serum alterations as a consequence of the bowel preparation for a colonoscopy, a second group of samples was collected: a subcohort of 55 patients already enrolled in the primary TLB study (from CN) with normal colonoscopy diagnosis (no pathological findings) were invited to participate in a secondary study by resampling (CNR, $n = 55$). These patients were requested, from January to February 2020, eight months (on average) after their colonoscopy procedure, to attend a blood draw appointment under standard preanalytical conditions, corresponding to a routine blood test (about 8–10 h fasting without any other treatment).

The third group of patients was a cohort of 55 healthy blood donors (similar in age and sex to the 55-subject CNR subcohort) from a regional blood bank (BD, $n = 55$) who were considered as a healthy control. Their serum samples were drawn under the same standard preanalytical conditions (about 8–10 h fasting) and they had no evidence of disease (blood

bank ensured the quality of these samples through a health questionnaire and a standard blood transmission pathogen analysis).

An overview of the design and detailed summary of the subjects recruited in these primary and secondary studies is shown in Figure 1.

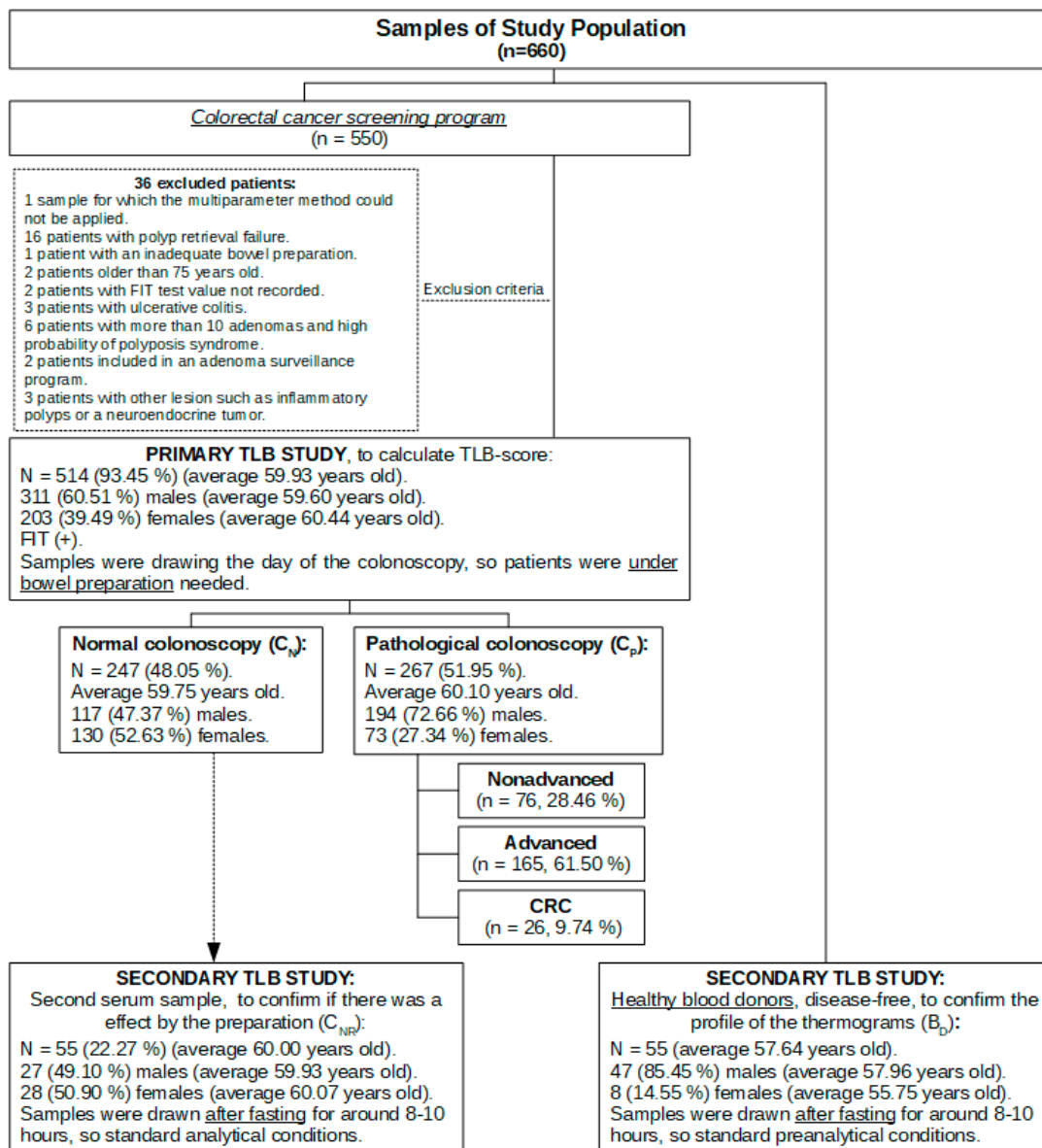


Figure 1. Sample study population flow chart.

All participating volunteers were informed of the purpose and nature of the study before giving written consent. The study protocol was approved by the Regional Research Ethics Committee in Zaragoza (Spain, CI: PI19/059 dated 13 March 2019, no. 05/2019). The preanalytical conditions of all the participants by the time of the sample extraction were registered in the sample data file.

2.2. Blood Samples Processing

Five milliliters of blood were drawn and collected in tubes with separating gel (BD Vacutainer®), after which they were centrifuged at 3000 rpm for 10 min and immediately aliquoted and stored at -80°C . All samples were labeled with an internal code to guarantee patient anonymity following the protocol described in the procedure approved by the ethics committee.

2.3. TLB Profile Determination

TLB profiles and TLB scores were determined after analyzing the thermograms obtained from the serum samples. These thermograms were recorded using an automated high-sensitivity differential scanning VP-DSC microcalorimeter (MicroCal, Malvern-Panalytical, Malvern, UK). The thermogram consists of the experimental determination of the excess heat capacity of the sample, with regard to a buffer reference solution, as a function of temperature along the thermal denaturation process. Each serum sample was diluted (1:25) in filtered phosphate-buffered saline (PBS) and 400 μL was taken for the assay. Experiments were performed at a scanning rate of 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Thermograms were baseline-corrected and analyzed using software developed in our laboratory implemented in Origin 7 (OriginLab).

2.4. Fluorescence Spectroscopy

From each serum sample diluted (1:25) in PBS, 80 μL was transferred into 96-well microplates (96-well PCR plate, non-skirted, from 4titude, Waltham, MA, USA). Fluorescence measurements were performed in a CLARIOstar plate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) by selecting an excitation wavelength of 330 nm, with excitation and emission bandwidths of 10 nm, and recording the fluorescence emission spectra in the 400–700 nm range.

From the fluorescence spectra, $F(\lambda)$, where F is the fluorescence emission intensity at wavelength λ , two parameters (Max and SNR) were calculated. Max is the maximal fluorescence intensity of the spectrum, whereas the SNR (signal-to-noise-ratio) quantifies the fluorescence signal relative to the sample noise.

2.5. Albumin and C-Reactive Protein Serum Concentration

Albumin concentration was determined by employing a Flex[®] reagent cartridge (Dimension[®] clinical chemistry system, Siemens, Erlangen, Germany), which is an adaptation of the bromocresol purple (BCP)-dye-binding method reported by Carter [29]. Because of an enhanced specificity of BCP for albumin, this method is not affected by globulin interference [30]. Multiple wavelengths blanking increases the sensitivity and minimizes the spectral interference from lipemia. The reference values for albumin were 3.2–4.8 g/dL.

The CRP concentration was determined with the Dimension[®] clinical chemistry system, based on a particle-enhanced turbidimetric immunoassay (PETIA) technique. The reference values for the CRP were 0–5.0 mg/L.

2.6. Data and Statistical Analysis

TLB thermogram raw data were processed using Origin software (OriginLab, Northampton, MA, USA) as previously described [13]. We have developed a multiparametric phenomenological model in which the TLB serum thermogram is deconvoluted into six individual transitions, modeling each individual transition using the logistic peak or Hubbert function [13,15]. This model has been successfully applied in the analysis of serum samples from patients with melanoma, gastric and lung cancer, pancreatic cysts, and multiple sclerosis [13–17]. The primary parameters obtained directly from the thermogram deconvolution (center temperature, height, and width of each individual transition) were combined to define a new final set of 11 parameters, more convenient for extracting and summarizing the essential geometric features of the thermogram. The parameters obtained in this multiparametric data analysis were used to derive the TLB score by applying a generalized linear model (GLM) [15]. The TLB score represents the probability of an individual to show serum alterations according to the corresponding TLB thermogram. Therefore, the TLB score is a single value for classifying a given subject as healthy or diseased, with a certain probability, as it was previously proven for lung cancer and multiple sclerosis [15,17]. Like any probability, the TLB score ranges from 0 to 1: the model classifies the subjects as exhibiting serum alterations (i.e., expected pathological outcome at colonoscopy) for TLB score values >0.5 , and lacking relevant serum alterations (i.e., expected normal outcome

at colonoscopy) for values <0.5 . The performance of the diagnostic test was evaluated by calculating common performance indexes (sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value), as well as the receiver operating characteristic (ROC) curve.

The Kolmogorov–Smirnov–Lilliefors test or the Shapiro–Wilk test (according to sample size) was performed to assess the normality of the variables. Averages between two independent/dependent groups were compared using the Student *t*-test for variables with normal behavior (previously verifying homoscedasticity with Bartlett’s test), whereas medians between two independent/dependent groups were compared using the Wilcoxon test for variables with a non-normal behavior. The dependence between groups for dichotomous qualitative variables was assessed using the Pearson chi-square test, and the dependence between a dichotomous group and an ordinal group (three or more categories) was assessed using a linear Pearson chi-square test. Medians between three or more independent groups were compared using the Kruskal–Wallis test (previously verifying homoscedasticity with Levene’s test) for variables with a non-normal behavior.

The statistical analyses were performed using Rstudio, R version 3.6.1 (5 July 2019). For all tests, a two-sided *p*-value of less than 0.05 was considered statistically significant. In case of multiple testing, *p*-values were adjusted according to the FDR method.

3. Results

3.1. Clinical Characteristics of the Study Population

In the first group, we recruited a total of 550 FIT(+) patient samples drawn for this study. Of these, 514 (93.45%) were analyzed and 36 were discarded due to different methodological reasons: 16 patients with polyp retrieval failure, 6 patients in whom more than 10 adenomas were found (indicating a high probability of polyposis syndrome), 3 patients with ulcerative colitis, 3 patients with other lesion such as inflammatory polyps or neuroendocrine tumor, 2 patients older than 75 years, 2 patients included in an adenoma surveillance program, 2 patients with a FIT value not recorded, 1 patient with inadequate bowel preparation, and 1 patient whose sample could not be accurately analyzed by DSC for applying TLB.

According to sex, 311 and 203 samples (60.51% and 39.49%) corresponded to males and females, respectively. According to age, there were no statistically significant differences: A. in median age between sexes (*p*-value = 0.091, Wilcoxon test for independent samples); B. in median age between normal colonoscopy or pathological diagnosis (*p*-value = 0.427, Wilcoxon test for independent samples); and C. in median age between each colonoscopy result (*p*-value = 0.275, Kruskal–Wallis test for independent samples). A complete and detailed descriptive analysis of age and sex can be found in the Supplementary Materials section (Table S2).

A certain association was found between sex and pathological colonoscopy diagnosis (*p*-value < 0.001 , Pearson chi-square test; Table S3). In addition, the greater the severity of the pathology, the higher the percentage of males compared to the female patient cohort (*p*-value < 0.001 , linear Pearson chi-square test) (Figure S1A, Table S4). Colonoscopy diagnosis revealed that almost half of them (247/514, 48.05%) were classified as normal (FIT (+) with no pathological findings, CN). Moreover, for those with colonoscopy findings (CP), they were classified into several diagnostic groups: 32.10% with an advanced polyp (165/514), 14.79% with a nonadvanced polyp (76/514), and 5.06% with CRC (26/514) (Figure S1B, Table S4).

In the second group of samples (resampling of a subcohort of 55 patients already enrolled in the primary TLB study who showed normal colonoscopy diagnosis, CNR) there was no statistically significant difference between the average age in both sexes (*p*-value = 0.902, Student’s *t*-test for dependent samples; Table S5).

In the third group, a cohort of healthy BD who were considered as healthy controls, there was no statistically significant difference between the median age in both sexes (*p*-value = 0.320, Wilcoxon test for independent samples; Table S6).

3.2. Primary TLB Study: Normal Colonoscopy Group vs. Pathological Colonoscopy Group

TLB thermograms were recorded from all subjects included in the primary study CN and CP (Figure 2). These thermograms reflected serum protein composition and their overall stability against thermal denaturation. Unexpectedly, thermograms from patients with a CN diagnosis were visually very similar to those thermograms from patients with a pathological colonoscopy CP diagnosis.

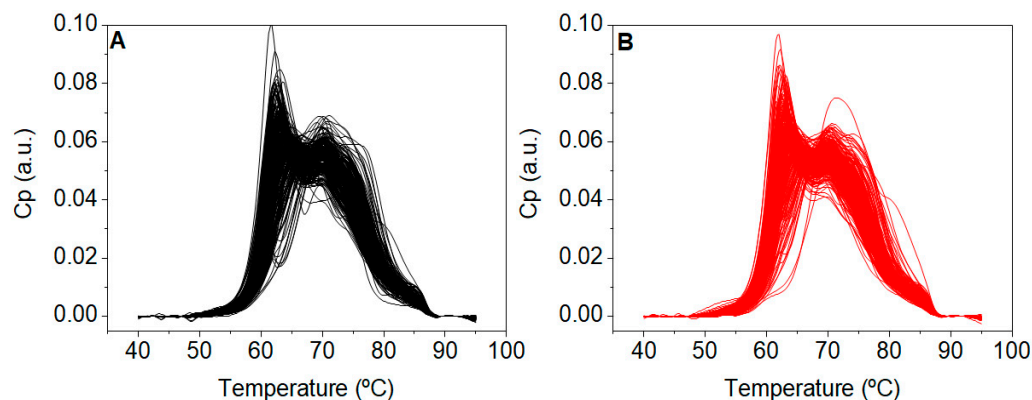


Figure 2. Thermograms from patients with (A) normal (CN, $n = 247$) and (B) pathological (CP, $n = 267$) colonoscopy diagnosis.

Each thermogram was analyzed by applying the six-component phenomenological multiparametric deconvolution procedure (as described in [13]), and a final set of eleven TLB-associated parameters was obtained. We determined the three boundaries (Q1, Q2, Q3) of the quartiles, and the minimum and maximum for the distribution of these TLB-associated parameter in each group (Table S7).

A bivariate statistical analysis of each TLB-associated parameter (CN values vs. CP values) was performed in order to identify statistically significant differences according to the colonoscopy diagnosis (normal vs. pathological). Previously, a normality test was performed for each parameter, and therefore, the Wilcoxon test for independent samples was applied (TLB-associated parameters were not normally distributed). None of the parameters showed statistically significant differences between the two groups (patients with CN and patients with CP) with a p -value lower than 0.05 being considered significant (Figure S2, Table S8), confirming the initial visual inspection of the thermograms. This result suggested that, unlike previous studies on other tumor diseases (melanoma, lung, and gastric cancer), TLB would not be able to discriminate between CN healthy and CP patients.

A more in-depth study was performed by building a global classification model according to the TLB score value for each subject, following our previously developed methodology [15,17]. Briefly, TLB scores were obtained by applying a multivariate GLM as a statistical classification/predictive tool. TLB scores did not exhibit any statistical significance (all p -values >0.05 , Table S9) for discriminating between a CN and CP diagnosis. Considering a TLB-score threshold value of 0.5, values between 0 and 0.5 would be considered as a nonpathological status and values between 0.5 and 1 would be considered as a pathological status. The results obtained showed that there were 183 patients with normal colonoscopy exhibiting a TLB score >0.5 (74.1% false positive rate) and 39 patients with a pathological colonoscopy exhibiting a TLB score <0.5 (14.6% false negative rate) (Table S10). In terms of predictive power, the area under the ROC curve value was 0.57 (0.52, 0.61) (Figure S3), revealing a success ratio of 57%, with 85.4% sensitivity and 25.9% specificity. This result pointed to a lack of discriminatory ability of TLB with respect to normal/pathological colonoscopy, derived mainly from an unexpectedly low statistical specificity (most subjects with a normal colonoscopy were classified as diseased subjects).

This result contrasted with previously published studies, in which we proved that GLM applied to TLB was capable of successfully classifying patients into normal and pathological groups, providing a unique value with potential direct application in clinical practice.

At this point we wondered: (1) why did the TLB thermograms of patients with a CN and CP diagnosis showed a high similarity? (2) Why was the TLB score unable to successfully classify patients into those groups? (3) Was this drawback the result of a fundamental flaw in TLB specific for CRC? Then, we focused our attention on those subjects with no colonoscopy findings (normal colonoscopy diagnosis, CN) and compared them to the group of healthy blood donors (disease-free subjects, BD). Visually, the TLB thermograms of patients with a CN diagnosis were very different from the TLB thermograms of the group of healthy BD (Figure 3). Moreover, importantly, the TLB thermograms of our healthy BD group in this study were very similar to the TLB profiles from healthy subjects previously reported in the literature by other research groups [31] and in our own work [15].

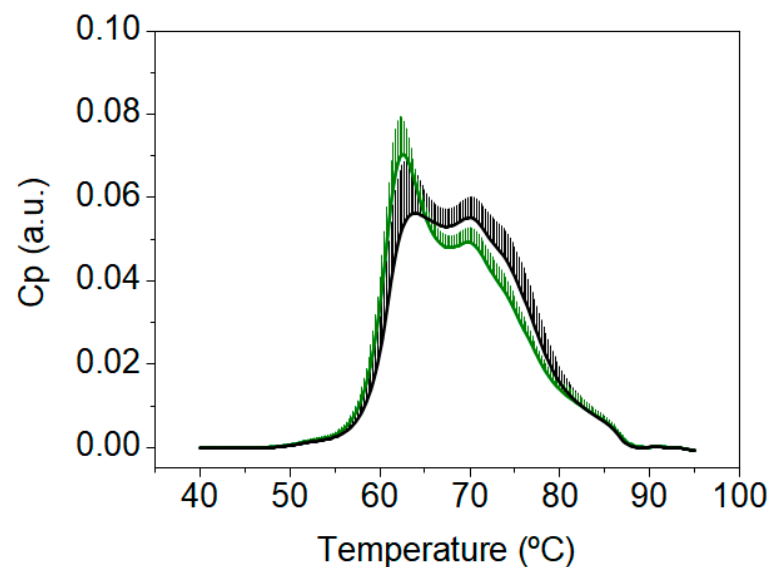


Figure 3. Average and standard deviation of the thermograms from healthy blood donors (BD, green, $n = 55$), and from patients with a normal colonoscopy diagnosis (CN, black, $n = 247$).

When the TLB parameters were determined for this healthy BD group (detailed description of can be found in Table S11) and the bivariate statistical analysis was performed, statistically significant differences could be determined for all parameters, except AUCn3, AUCn4, and APn4, when comparing patients from the colorectal screening program with a CN diagnosis and healthy BD (p -value < 0.05) (Figure 4 and Table S12).

Differences observed in TLB-associated parameters between the CN patients and healthy BD confirmed the features of the thermograms observed visually in Figure 3. This suggested that the subjects from the CN group did not show TLB thermograms typical of healthy BD subjects but showed TLB thermograms similar to those from the CP group. Of course, that would be possible, because the patients undergoing colonoscopy, albeit with no clinical findings, were FIT(+). However, that was a major drawback, because we were interested in discriminating between CN and CP subjects, with the ultimate goal of reducing unnecessary colonoscopy interventions. Then, under the conditions of the study, the CN group was not a good control group for the CP group.

3.3. Secondary TLB Study: Resampled Normal Colonoscopy Group vs. Healthy Group

Next, we focused on one of the main differences between CN patients and healthy BD: the preanalytical conditions for blood collection (i.e., colonoscopy bowel preparation vs. standard 8–10 h fasting). We hypothesized that, most likely, the TLB thermograms from the CN patients were altered as a consequence of the harsh conditions imposed

by laxative treatment and stringent diet intake, resulting in TLB thermograms similar to those from CP patients. Our direct approach was (1) selecting randomly a subcohort of 55 patients (CNR) from the 247 patients with a CN diagnosis; (2) obtaining new serum samples after standard fasting conditions to be tested by TLB; and (3) comparing the new TLB thermograms with the previous TLB thermograms obtained with the samples collected after colonoscopy preparation.

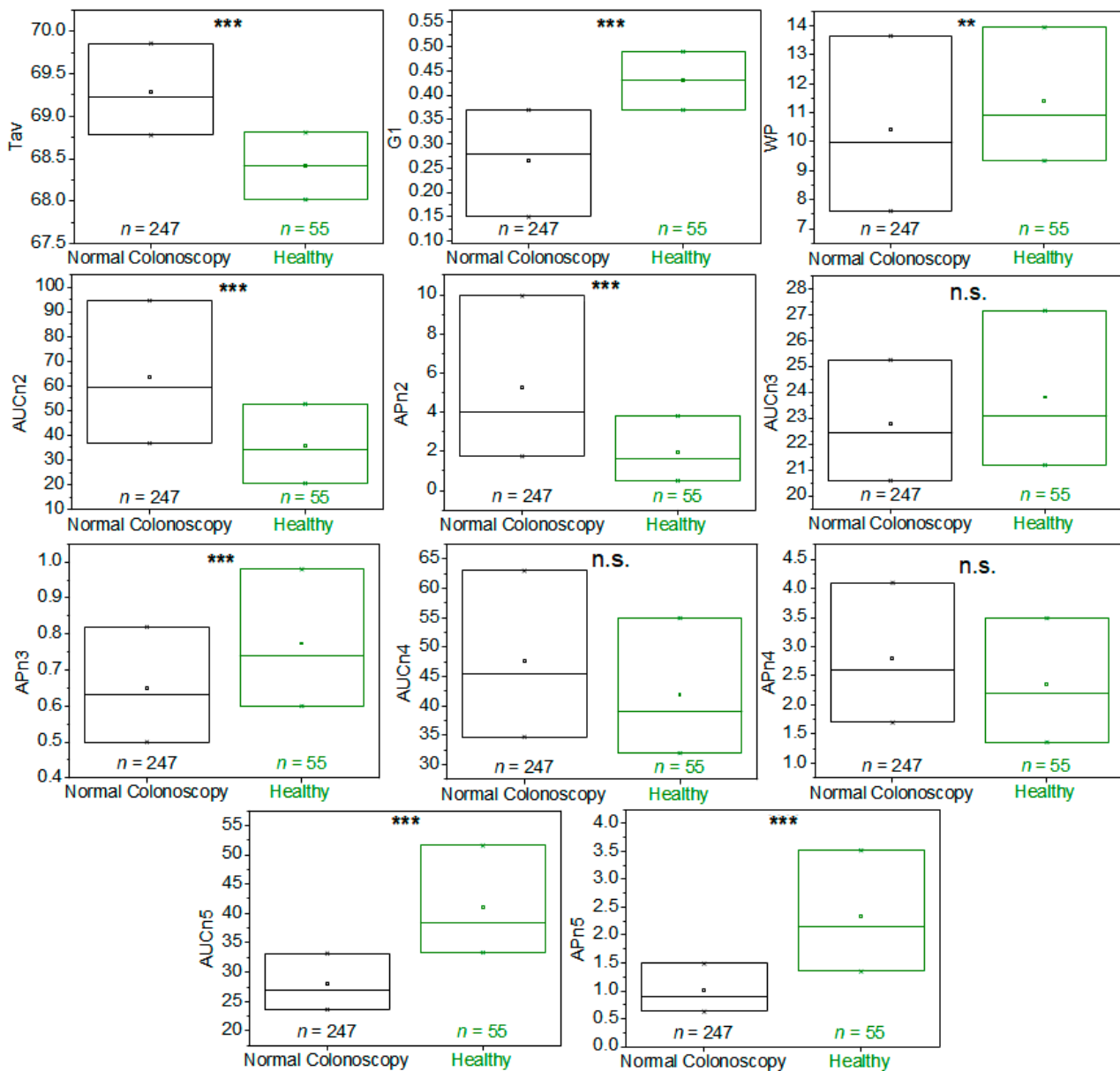


Figure 4. Box-plot diagrams indicating Q1, Q2, and Q3, together with the average value (square) for each TLB parameter, illustrating the distribution of the p -values (asterisks indicate the order of magnitude of p -values) between patients with a normal colonoscopy diagnosis (CN, black) and healthy blood donors (BD, green). It was calculated according to Student's t -test or a Wilcoxon test for independent samples, depending on the normality character of the parameter distribution. Note: n.s.: p -value is not significant; **: p -value = 0.050–0.010; ***: p -value = 0.009–0.001.

When comparing the new TLB thermograms for these 55 patients CNR under standard preparation (CNR) with the TLB thermograms of healthy BD, only minor differences were found (Figure 5A). These results were remarkably different from the results previously described in Figure 3, confirming that these new samples were similar to the well-known

healthy TLB profiles. TLB parameters were also determined for these 55 subjects with a CNR diagnosis under standard preanalytical conditions and the detailed description is presented in Table S13.

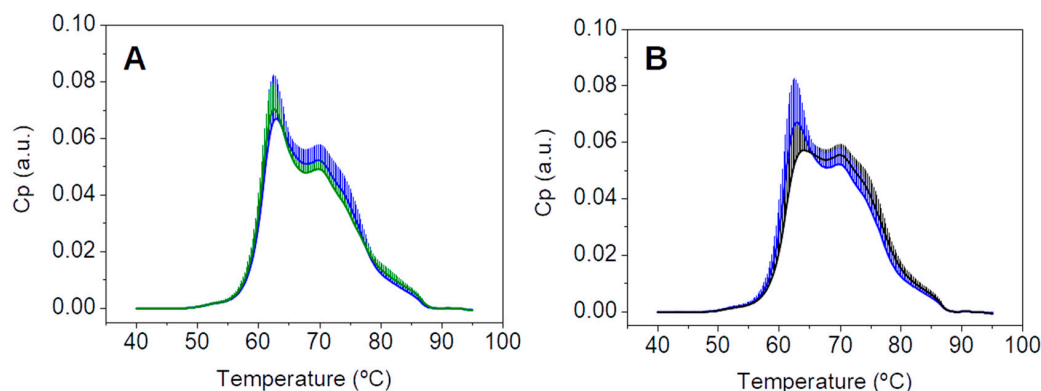


Figure 5. (A) Average and standard deviation of the thermograms from healthy BD (green, $n = 55$) and patients (blue, $n = 55$); (B) average and standard deviation of the thermograms from 55 selected patients with a normal colonoscopy diagnosis in two blood draw conditions: with colonoscopy preparation (CN, black) and with standard analytical conditions (CNR, blue).

The direct comparison of average TLB thermograms of the 55 selected patients with a normal colonoscopy under the two different conditions, a first blood sample drawn under a colonoscopy preparation and a second blood sample drawn under standard pre-analytical conditions, is shown in Figure 5B. As it can be observed, the average thermograms exhibited markedly different features. Detailed examples of each patient comparison, corresponding to 16 individual TLB thermograms, are presented in Figure S4. In most of them, the second blood sample (drawn under standard preanalytical conditions) could be easily identified as it showed uniform, conserved features among all patients (blue curves in Figure S4) and, very importantly, they seemed quite similar to the typical healthy TLB thermogram. Regarding the first blood sample (drawn under colonoscopy preparation conditions), a greater variability was found between patients (black curves in Figure S4), and their TLB profiles differed much more from the typical healthy TLB thermogram.

Following our established procedure, the TLB parameters were determined for the second samples of the 55 CNR patients, and a bivariate statistical analysis comparison with the first sample extracted was performed (a detailed description of the 55 patients with preparation can be found in Table S14). Many of the TLB-associated parameters (Tav, G1, AUCn2, APn2, APn3, AUCn4, AUCn5, and APn5) showed statistically significant differences between the averages/medians of both groups (p -value < 0.05 ; p -values were calculated according to Student's t -test or a Wilcoxon test, both for dependent samples, depending on the normality character of the parameter distribution) (Figure 6 and Table S15).

Considering these results, at this point it was reasonable to think that TLB profiles from serum samples collected during the colonoscopy procedure might have been distorted by alterations in serum composition as a consequence of the harsh bowel preparation procedure. Of course, this observation could be specific to TLB, since TLB monitors the thermal denaturation behavior of the major proteins in serum. Nevertheless, colonoscopy preparation might also alter other serum components (e.g., circulating cells, miRNA, cfDNA, ctDNA, etc.).

In addition, could this serum alteration upon colonoscopy preparation be detected using other biophysical techniques? Fluorescence has proven to be a versatile tool for studying molecular properties in analytical chemistry, biochemistry, cell biology, photochemistry, and environmental science. Fluorescence detection has four major advantages over other light-based investigation methods: a high sensitivity, high speed, broad availability, and safety. When excited at suitable wavelengths, some biomolecules emit radiation over a

wide spectral range in the ultraviolet–visible region. Changes in serum composition will be reflected in changes occurring in biochemical, physicochemical, and histological properties, and in particular, changes in the fluorescence emission spectrum [32].

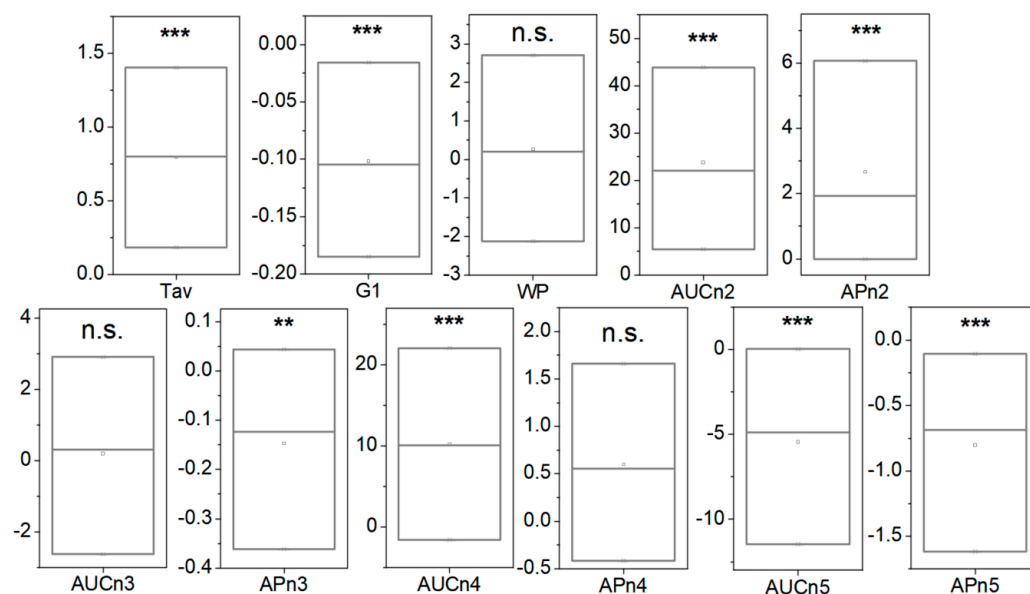


Figure 6. Box-plot diagrams indicating Q1, Q2, and Q3, together with the average value (square) for each TLB parameter, illustrating the difference between 55 samples without preparation and 55 samples with preparation (asterisks indicate the order of magnitude of the p -value). Note: n.s.: p -value is not significant; **: p -value = 0.050–0.010; ***: p -value = 0.009–0.001. p -values were calculated according to Student's t -test or a Wilcoxon test, both for dependent samples, depending on the normality character of the parameter distribution.

We analyzed the fluorescence spectrum of the serum samples drawn from the 55 CN and CNR patients with a normal colonoscopy under a colonoscopy preparation and under standard preanalytical conditions (8–10 h fasting). As an example, the fluorescence spectra of 16 subjects (same individuals as in Figure S4) are represented in Figure S5.

The differences in serum fluorescence obtained under the two conditions (with or without colonoscopy preparation) could be easily observed in most cases. However, to compare both fluorescence spectra quantitatively (Figure S5), two parameters from the spectra, the Max and SNR, were calculated as previously described in the Materials and Methods section. The bivariate analysis of the Max and SNR parameters from samples with or without preparation showed statistically significant differences between both groups (p -value < 0.05; p -values were calculated according to Student's t -test for dependent samples) (Figure S6 and Table S16).

Finally, looking for additional evidence for alterations caused by the bowel preparation, we determined the concentration of two serum proteins used in clinical diagnostic tests: albumin (main serum protein) and CRP (acute phase protein) concentrations, both in the 55 normal colonoscopy patients under colonoscopy preparation and under preanalytical conditions. As expected, there were statistically significant differences (p -value < 0.05; p -values were calculated according to Student's t -test for dependent samples) in serum albumin and CRP concentration levels between CN samples and CNR samples (Figure S7, Table S17).

4. Discussion

Current CRC diagnosis in cancer screening programs is performed through a combination of FIT and colonoscopy when required. FIT is convenient and appropriate for patient compliance, but it suffers from a high false positive rate. On the other hand, colonoscopy provides direct evidence of malignancy but presents a potential risk of serious complica-

tions for the patient, is a resource-intensive procedure, and is characterized by a notable discomfort for the patient. Therefore, new efficient, simple, inexpensive diagnostic tools are needed for clinical practice to improve patient management and increase quality of life during surveillance and monitoring.

Towards this goal, we proposed a study to develop a simple, risk-free, and low-cost clinical test to discriminate FIT(+) patients with a high risk of CRC who should undergo a further colonoscopy procedure, with the aim of reducing the excessive number of unnecessary colonoscopies in current screening programs. Because thermal liquid biopsy (TLB) measures the denaturation profile of blood samples in a simple manner and it is very sensitive to changes in serum protein composition associated with cancer [13–15], we considered it a suitable technique for this purpose.

We compared the TLB thermograms of 247 patients from a colorectal screening program with normal colonoscopy (CN) with the TLB thermograms of 267 patients with pathological colonoscopy (CP), all subjects being FIT(+). Samples were obtained the same day of the colonoscopy, and patients were under bowel preparation. The TLB thermograms from CN subjects were similar to those from CP subjects, resulting in a TLB score with a low predictive ability (AUC ROC of 0.57 (0.52, 0.61)). After these results and a thorough review of the study process, we put into question the sample extraction procedure itself (timing, patient preparation, mainly). First, thermograms from the CN (normal colonoscopy result) group were compared with an additional group of 55 age- and sex-matched healthy blood donors (BD), whose thermograms matched those previously reported in the literature for healthy subjects [31]. We observed significant differences between CN and BD thermograms, as well as in the TLB parameters derived from them. All these results indicated CN was not an appropriate control group for CP and for developing a good classification model. Next, we collected a second serum sample from 55 patients from the CN group, but this time blood samples were drawn under standard pre-analytical conditions (8–10 h fasting, CNR) and no bowel preparation eight months after colonoscopy. Here, it is important to note that previous studies in our group showed that the TLB profile for a given subject under the same preanalytical conditions remained unaltered with time, unless a pathological event arose; annual samples in the absence of diagnosed disease were compared and TLB was almost identical after a six-year follow-up. Therefore, TLB profiles are very robust over time and not affected much by additional factors other than disease. The TLB thermograms from the CNR group (standard preanalytical conditions) were significantly different from those of the CN group (after bowel preparation for colonoscopy) and were very similar to those from the (BD) healthy blood donor group, indicating that the CNR group was an appropriate control group for CRC screening purposes. In this comparison, we selected the same patients, with and without bowel preparation (paired samples), in order to reduce interindividual variability in the comparison.

Summarizing the results: (1) bowel preparation for colonoscopy alters the composition of serum to a large extent, and consequently, the TLB thermograms of patients with a normal colonoscopy (CN) are similar to those of patients with pathological findings (CP); (2) TLB thermograms of samples collected after standard preanalytical conditions (8–10 h fasting) from patients with a normal colonoscopy are similar to TLB thermograms from healthy blood donor subjects (BD); and (3) TLB thermograms from samples collected after standard preanalytical conditions (8–10 h fasting) from patients with a normal colonoscopy (CNR) are different from TLB thermograms from samples drawn from the same subjects drawn under bowel preparation conditions (CN). Thus, preanalytical conditions are relevant for the reliability of the analytical test based on TLB. Bowel colonoscopy preparation alters blood protein (and possibly other components) levels, rendering TLB (and possible other clinical tests based on serum composition) unreliable in terms of classifying patients according to colonoscopy outcomes. These results reveal that the timing and conditions for blood draw (or, in other words, the preanalytical conditions of the patient) are a key factor for obtaining meaningful data for diagnosis or surveillance from blood samples.

As the TLB thermogram reveals the behavior of the major serum proteins against thermal denaturation, bowel preparation must alter the serum protein composition. In particular, we assessed the alteration of protein concentration levels in serum by fluorescence spectroscopy and by determining the concentration of individual proteins in serum: albumin (major serum protein) and C-reactive protein (acute phase protein). In all cases, there were statistically significant differences between the two groups (same patient with and without bowel preparation).

In the clinical routine and research protocols conducted in CRC screening programs, it is usual to obtain blood samples at the time of the colonoscopy procedure, but this is something that should be reconsidered. The results reported in this manuscript would represent a call of attention for past, current, and future studies with this type of design. Certainly, the results reported here will contribute to establish optimal preanalytical conditions for TLB.

As in any other analytical technique, there are some limitations in our study based on TLB. TLB is a technique reporting an overview of the protein composition of plasma/serum samples, reflecting changes in protein concentrations, and/or changes in structural stability elicited by interactions with disease-specific biomolecules. Thus, it is not possible, at this moment, to discriminate the molecular basis for the alterations observed in the thermograms of diseased patients. TLB provides a phenomenological observation reflecting alterations caused by colorectal cancer, and this study was prompted by the necessity to remove other (non-disease-related) sources of changes in plasma composition.

5. Conclusions

The study presented in this work clearly demonstrated that preanalytical conditions must be well-established and defined for diagnostic techniques based on blood samples, such as TLB. We propose that, although logistically convenient, blood collection should be avoided when the patient is under colonoscopy preparation conditions; otherwise, considerable and significant changes in serum composition may distort the analytical outcome of the test on the fluid biopsy sample. It is essential to establish robust preanalytical conditions to ensure the accuracy and the reliability of the test. In our case, the TLB study validation in colorectal screening program has been currently redesigned according to these conclusions and, since then, patient serum samples have been collected under standard preanalytical conditions (8–10 h fasting). A manuscript with the results will be published soon.

It is important to emphasize that alterations observed in TLB and caused by the preanalytical conditions suggest there is a change in plasma/serum composition, and this could also affect and alter the outcome from other analytical clinical tests based on quantifying other biomarkers (proteins and nucleic acids).

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers15071952/s1>, Figure S1: (A) Proportion of males (dark grey) and females (light grey) according to the colonoscopy result, for patients from CRC screening program. (B) Distribution of colonoscopy results for patients from CRC screening program. Figure S2: Box-plot for each individual TLB-parameter illustrating the distribution of the p -values between patients with normal (CN) or pathological colonoscopy (CP) diagnosis. Figure S3: ROC curve illustrating the statistical performance of the TLB-score and its AUC (95 % CI) for discriminating patients with CN diagnosis from patients with CP diagnosis. Figure S4: Comparison of individual examples of 16 patient thermograms with normal colonoscopy diagnosis. Samples were drawn in two different conditions: under colonoscopy preparation (CN, black) and under standard analytical conditions (CNR, blue). Figure S5: Comparison of individual examples of 16 patient fluorescence spectra with normal colonoscopy diagnosis. Samples were drawn in two different conditions: under colonoscopy preparation (CN, black) and under standard pre-analytical conditions (CNR, blue). Figure S6: Plot and distribution of the difference in MAX and SNR between samples without preparation and samples with preparation. Figure S7: Plot and distribution of the difference in albumin concentration and C-reactive protein concentration between samples without preparation and samples with preparation. Table S1. Summary of characteristics data of patients from colorectal cancer (CRC) screening program,

with fecal immunochemical test positive. Table S2. Age distribution for patients from (CRC) screening program according to the sex and to the colonoscopy findings. Table S3. Descriptive of sex for patients from (CRC) screening program depending on colonoscopy result. Table S4. Descriptive of sex for patients from (CRC) screening program depending on each category of colonoscopy result. Table S5. Age distribution for patients from (CRC) screening program with normal colonoscopy result and without colonoscopy preparation (CNR, n = 55) according to the gender. Table S6. Age distribution for healthy blood donors (BD, n = 55) according to the sex. Table S7: Main descriptive indexes for the eleven TLB-associated parameters in patients with normal colonoscopy result (CN, n = 247) and pathological colonoscopy result (CP, n = 267). Table S8: Bivariate analysis of TLB parameters of patients with normal colonoscopy result (CN) and patients with pathological colonoscopy result (CP). Table S9: Summary of the application of multivariate Binomial Generalized Linear Model with Logistic Regression (GLM). Table S10: Contingency table for predict risk of pathological colonoscopy finding. Table S11: Main descriptive indexes for the eleven TLB-associated parameters in healthy blood donors (BD, n = 55). Table S12: Bivariate analysis of TLB parameters between patients with normal colonoscopy result (CN) and healthy blood donors (BD). Table S13: Main descriptive indexes for the eleven TLB-associated parameters in patients with normal colonoscopy result and without colonoscopy preparation (CNR, n = 55). Table S14: Main descriptive indexes for the eleven TLB-associated parameters in patients with normal colonoscopy result and with colonoscopy preparation (CNN, n = 55). Table S15: Bivariate analysis of TLB parameters of patients with normal colonoscopy result with (CN) and without (CNR) colonoscopy preparation. Table S16: Bivariate analysis of Fluorescence Spectrum parameters (Max and SNR) of patients with normal colonoscopy result with (CN) and without (CNR) colonoscopy preparation. Table S17: Bivariate analysis of albumin and C-reactive protein concentration of patients with normal colonoscopy result with (CN) and without (CNR) colonoscopy preparation.

Author Contributions: Conceptualization, A.V.-C. and O.A.; methodology, S.H.-D., J.L.O., O.S.-G., A.V.-C. and O.A.; software, S.H.-D., J.L.O., O.S.-G., A.V.-C. and O.A.; validation, J.L.O., S.V., O.S.-G., A.V.-C. and O.A.; formal analysis, J.L.O., S.V., O.S.-G., O.A. and A.V.-C.; investigation, P.R., M.J.D.-A., S.V., A.V.-C. and O.A.; resources, J.L.O., O.S.-G., Á.L., M.J.D.-A., A.V.-C. and O.A.; data curation, S.H.-D., J.L.O. and O.A.; writing—original draft preparation, S.H.-D., J.L.O., A.V.-C. and O.A.; writing—review and editing, S.H.-D., J.L.O., S.V., O.S.-G., Á.L., A.V.-C. and O.A.; visualization, J.L.O., O.S.-G., A.V.-C. and O.A.; supervision, Á.L., A.V.-C. and O.A.; project administration, O.A. and A.V.-C.; funding acquisition, Á.L., O.A. and A.V.-C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Ministry of Science and Innovation MCIN/AEI/10.13039/501100011033/ and “ERDF A way of Making Europe” (PID2021-127296OB-I00 to A.V.C.); projects were funded by Instituto de Salud Carlos III and co-funded by European Union (ESF, “Investing in your future”): “PI18/00349 and PI21/00394 (FIS project to O.A.)”, “FI19/00146 (PFIS contract for S.H.-D.)”; Protein Targets and Bioactive Compounds Group E45_17R to A.V.-C. and Digestive Pathology Group B25_17R to S.H.-D., O.A., Á.L., P.R. and M.J.D.-A.); and the Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd).

Institutional Review Board Statement: All subjects gave their informed consent for inclusion before they participated in the study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Aragon Research Ethics Committee (CEICA) (PI19/059), at its meeting held on 5 February 2020, Act No. 03/2020, after the assessment of the procedure and all the consent and patient information documents that the researchers provided.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Rawla, P.; Sunkara, T.; Barsouk, A. Epidemiology of Colorectal Cancer: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors. *Prz. Gastroenterol.* **2019**, *14*, 89–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Gini, A.; Jansen, E.E.L.; Zielonke, N.; Meester, R.G.S.; Senore, C.; Anttila, A.; Segnan, N.; Mlakar, D.N.; de Koning, H.J.; Lansdorp-Vogelaar, I.; et al. Impact of Colorectal Cancer Screening on Cancer-Specific Mortality in Europe: A Systematic Review. *Eur. J. Cancer* **2020**, *127*, 224–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Soares, F.; Becker, K.; Anzanello, M.J. A Hierarchical Classifier Based on Human Blood Plasma Fluorescence for Non-Invasive Colorectal Cancer Screening. *Artif. Intell. Med.* **2017**, *82*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Lansdorp-Vogelaar, I.; Knudsen, A.B.; Brenner, H. Cost-Effectiveness of Colorectal Cancer Screening. *Epidemiol. Rev.* **2011**, *33*, 88–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Navarro, M.; Nicolas, A.; Ferrandez, A.; Lanás, A. Colorectal Cancer Population Screening Programs Worldwide in 2016: An Update. *World J. Gastroenterol.* **2017**, *23*, 3632–3642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Domper Arnal, M.J.; García Mateo, S.; Hermoso-Durán, S.; Abad, D.; Carrera-Lasfuentes, P.; Velazquez-Campoy, A.; Abian Franco, O.; Lanás, A. False-Positive Fecal Immunochemical Test Results in Colorectal Cancer Screening and Gastrointestinal Drug Use. *Int. J. Colorectal Dis.* **2021**, *36*, 1861–1869. [[CrossRef](#)]
7. Hijos-Mallada, G.; Lué, A.; Velamazán, R.; Saura, N.; Abril, C.; Lorenzo, M.; Navarro, M.; Chueca, E.; Arechavaleta, S.; Gomollón, F.; et al. The Addition of Other Fecal Biomarkers Does Not Improve the Diagnostic Accuracy of Immunochemical Fecal Occult Blood Test Alone in a Colorectal Cancer Screening Cohort. *Front. Med.* **2021**, *8*, 665786. [[CrossRef](#)]
8. Faroongsang, D.; Sunpaweravong, S.; Raksawong, A. Thermally Induced Denaturing Energetics of Human Blood Plasma Albumin by Differential Scanning Calorimetry (DSC) as an Indicator for Breast Cancer Diagnosis in Female Patients. *AAPS PharmSciTech* **2019**, *20*, 146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Schneider, G.; Kaliappan, A.; Nguyen, T.Q.; Buscaglia, R.; Brock, G.N.; Hall, M.B.; DeSpirito, C.; Wilkey, D.W.; Merchant, M.L.; Klein, J.B.; et al. The Utility of Differential Scanning Calorimetry Curves of Blood Plasma for Diagnosis, Subtype Differentiation and Predicted Survival in Lung Cancer. *Cancers* **2021**, *13*, 5326. [[CrossRef](#)]
10. Chagovetz, A.A.; Quinn, C.; Damarse, N.; Hansen, L.D.; Chagovetz, A.M.; Jensen, R.L. Differential Scanning Calorimetry of Gliomas. *Neurosurgery* **2013**, *73*, 289–295. [[CrossRef](#)]
11. Krumova, S.; Todinova, S.; Taneva, S.G. Calorimetric Markers for Detection and Monitoring of Multiple Myeloma. *Cancers* **2022**, *14*, 3884. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Kim, N.A.; Jin, J.H.; Kim, K.H.; Lim, D.G.; Cheong, H.; Kim, Y.H.; Ju, W.; Kim, S.C.; Jeong, S.H. Investigation of Early and Advanced Stages in Ovarian Cancer Using Human Plasma by Differential Scanning Calorimetry and Mass Spectrometry. *Arch. Pharm. Res.* **2016**, *39*, 668–676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Vega, S.; Garcia-Gonzalez, M.A.; Lanás, A.; Velazquez-Campoy, A.; Abian, O. Deconvolution Analysis for Classifying Gastric Adenocarcinoma Patients Based on Differential Scanning Calorimetry Serum Thermograms. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 7988. [[CrossRef](#)]
14. Velazquez-Campoy, A.; Vega, S.; Sanchez-Gracia, O.; Lanás, A.; Rodrigo, A.; Kaliappan, A.; Hall, M.B.; Nguyen, T.Q.; Brock, G.N.; Chesney, J.A.; et al. Thermal Liquid Biopsy for Monitoring Melanoma Patients under Surveillance during Treatment: A Pilot Study. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2018**, *1862*, 1701–1710. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Rodrigo, A.; Ojeda, J.L.; Vega, S.; Sanchez-Gracia, O.; Lanás, A.; Isla, D.; Velazquez-Campoy, A.; Abian, O. Thermal Liquid Biopsy (TLB): A Predictive Score Derived from Serum Thermograms as a Clinical Tool for Screening Lung Cancer Patients. *Cancers* **2019**, *11*, 1012. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Hermoso-Durán, S.; García-Rayado, G.; Ceballos-Laita, L.; Sostres, C.; Vega, S.; Millastre, J.; Sánchez-Gracia, O.; Ojeda, J.L.; Lanás, A.; Velázquez-Campoy, A.; et al. Thermal Liquid Biopsy (TLB) Focused on Benign and Premalignant Pancreatic Cyst Diagnosis. *J. Pers. Med.* **2021**, *11*, 25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Annesi, F.; Hermoso-Durán, S.; Rizzuti, B.; Bruno, R.; Pirritano, D.; Petrone, A.; Del Giudice, F.; Ojeda, J.; Vega, S.; Sanchez-Gracia, O.; et al. Thermal Liquid Biopsy (TLB) of Blood Plasma as a Potential Tool to Help in the Early Diagnosis of Multiple Sclerosis. *J. Pers. Med.* **2021**, *11*, 295. [[CrossRef](#)]
18. Beije, N.; Martens, J.W.M.; Sleijfer, S. Incorporating Liquid Biopsies into Treatment Decision-Making: Obstacles and Possibilities. *Drug Discov. Today* **2019**, *24*, 1715–1719. [[CrossRef](#)]
19. Kolencík, D.; Shishido, S.N.; Pitule, P.; Mason, J.; Hicks, J.; Kuhn, P. Liquid Biopsy in Colorectal Carcinoma: Clinical Applications and Challenges. *Cancer* **2020**, *12*, 1376. [[CrossRef](#)]
20. Leers, M.P.G. Circulating Tumor DNA and Their Added Value in Molecular Oncology. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2019**, *58*, 152–161. [[CrossRef](#)]
21. Salvianti, F.; Gelmini, S.; Costanza, F.; Mancini, I.; Sonnati, G.; Simi, L.; Pazzagli, M.; Pinzani, P. The Pre-Analytical Phase of the Liquid Biopsy. *N. Biotechnol.* **2020**, *55*, 19–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Hong, B.; Zu, Y. Detecting Circulating Tumor Cells: Current Challenges and New Trends. *Theranostics* **2013**, *3*, 377–394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Mamdouhi, T.; Twomey, J.D.; McSweeney, K.M.; Zhang, B. Fugitives on the Run: Circulating Tumor Cells (CTCs) in Metastatic Diseases. *Cancer Metastasis Rev.* **2019**, *38*, 297–305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Evans, M.D.; Barton, K.; Pritchard, G.A.; Williams, E.J.; Karandikar, S.S. Plasma Magnesium Should Be Monitored Perioperatively in Patients Undergoing Colorectal Resection. *Color. Dis.* **2009**, *11*, 613–618. [[CrossRef](#)]

25. Goni, E.; Venerito, M.; Schulz, C.; Weigt, J.; Langner, C.; Link, A.; Malfertheiner, P. Influence of Laboratory-Related and Endoscopy-Related Factors on the Assessment of Serum Pepsinogens and Gastrin-17. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *29*, 1340–1345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Holte, K.; Nielsen, K.G.; Madsen, J.L.; Kehlet, H. Physiologic Effects of Bowel Preparation. *Dis. Colon Rectum* **2004**, *47*, 1397–1402. [[CrossRef](#)]
27. Ogino, N.; Aridome, G.; Oshima, J.; Shibata, M.; Watanabe, T.; Kume, K.; Yoshikawa, I.; Harada, M. Serum Albumin Concentrations Predict Hypovolaemia Caused by Polyethylene Glycol Plus Ascorbic Acid Prior to Colonoscopy in Elderly Patients. *Drugs Aging* **2016**, *33*, 355–363. [[CrossRef](#)]
28. Turnage, R.H.; Guice, K.S.; Gannon, P.; Gross, M. The Effect of Polyethylene Glycol Gavage on Plasma Volume. *J. Surg. Res.* **1994**, *57*, 284–288. [[CrossRef](#)]
29. Carter, P. Ultramicroestimation of Human Serum Albumin: Binding Cationic Dye 5,5'-dibromo-o Cresolsulfonphthalein. *Microchem. J.* **1970**, *15*, 531–539. [[CrossRef](#)]
30. Lasky, F.D.; Li, Z.M.C.; Shaver, D.D.; Savory, J.; Savory, M.G.; Willey, D.G.; Mikolak, B.J.; Lantry, C.L. Evaluation of a Bromocresol Purple Method for the Determination of Albumin Adapted to the DuPont Aca Discrete Clinical Analyzer. *Clin. Biochem.* **1985**, *18*, 290–296. [[CrossRef](#)]
31. Garbett, N.C.; Brock, G.N.; Chaires, J.B.; Mekmaysy, C.S.; DeLeeuw, L.; Sivils, K.L.; Harley, J.B.; Rovin, B.H.; Kulasekera, K.B.; Jarjour, W.N. Characterization and Classification of Lupus Patients Based on Plasma Thermograms. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0186398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Morcuende-Ventura, V.; Hermoso-Durán, S.; Abian-Franco, N.; Pazo-Cid, R.; Ojeda, J.L.; Vega, S.; Sanchez-Gracia, O.; Velazquez-Campoy, A.; Sierra, T.; Abian, O. Fluorescence Liquid Biopsy for Cancer Detection Is Improved by Using Cationic Dendronized Hyperbranched Polymer. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

"Construye tu vida como si no fueras a tener a nadie jamás a tu lado, porque las personas que estén a tu lado entonces, no las necesitarás, querrás que estén"

Elísabet Benavent

