



## **METABOLÓMICA Y APRENDIZAJE AUTOMÁTICO EN LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES PLASMÁTICOS DE CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO: IMPACTO DE LA RADIOTERAPIA**

**MAURICIO MURCIA MEJÍA**

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

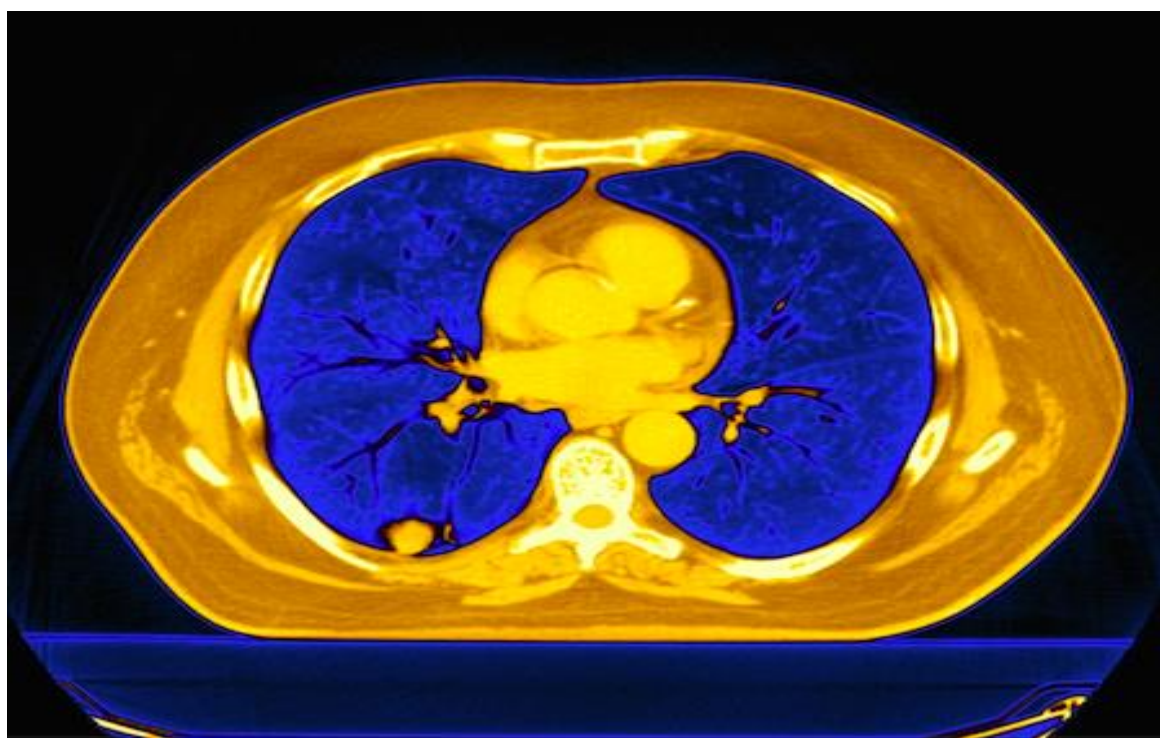


**UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI**

# **METABOLÓMICA Y APRENDIZAJE AUTOMÁTICO EN LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES PLASMÁTICOS DE CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO: IMPACTO DE LA RADIOTERAPIA**

---

**MAURICIO MURCIA MEJÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**2024**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
METABOLÓMICA Y APRENDIZAJE AUTOMÁTICO EN LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES PLASMÁTICOS DE CÁNCER DE PULMÓN NO  
MICROCÍTICO: IMPACTO DE LA RADIOTERAPIA  
MAURICIO MURCIA MEJÍA

Mauricio Murcia Mejía

**METABOLÓMICA Y APRENDIZAJE AUTOMÁTICO EN LA  
IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES PLASMÁTICOS  
DE CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO: IMPACTO  
DE LA RADIOTERAPIA**

TESIS DOCTORAL

Dirigida por:

Dra. Meritxell Arenas Prat

Dr. Jorge Camps Andreu

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud



**UNIVERSITAT  
ROVIRA i VIRGILI**

2024

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
METABOLÓMICA Y APRENDIZAJE AUTOMÁTICO EN LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES PLASMÁTICOS DE CÁNCER DE PULMÓN NO  
MICROCÍTICO: IMPACTO DE LA RADIOTERAPIA  
MAURICIO MURCIA MEJÍA



FAIG CONSTAR que aquest treball, titulat "Metabolómica y aprendizaje automático en la identificación de biomarcadores plasmáticos de cáncer de pulmón no microcítico: impacto de la radioterapia", que presenta Mauricio Murcia Mejía per a l'obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la meva direcció al Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques d'aquesta universitat.

---

HAGO CONSTAR que el presente trabajo, titulado "Metabolómica y aprendizaje automático en la identificación de biomarcadores plasmáticos de cáncer de pulmón no microcítico: impacto de la radioterapia", que presenta Mauricio Murcia Mejía para la obtención del título de Doctor, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento Ciencias Médicas Básicas de esta universidad.

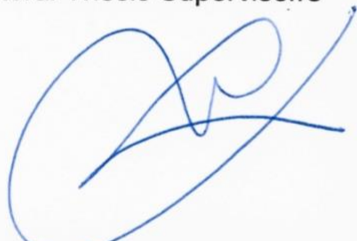
---

I STATE that the present study, entitled "Metabolómica y aprendizaje automático en la identificación de biomarcadores plasmáticos de cáncer de pulmón no microcítico: impacto de la radioterapia", presented by Mauricio Murcia Mejía for the award of the degree of Doctor, has been carried out under my supervision at the Department of Basic Medical Sciences of this university.

---

Reus , 25 de juliol 2024

El/s director/s de la tesi doctoral  
El/los director/es de la tesis doctoral  
Doctoral Thesis Supervisor/s



Dra. Meritxell Arenas Prat



Dr. Jorge Camps Andreu

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
METABOLÓMICA Y APRENDIZAJE AUTOMÁTICO EN LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES PLASMÁTICOS DE CÁNCER DE PULMÓN NO  
MICROCÍTICO: IMPACTO DE LA RADIOTERAPIA  
MAURICIO MURCIA MEJÍA

# AGRADECIMENTOS



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
METABOLÓMICA Y APRENDIZAJE AUTOMÁTICO EN LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES PLASMÁTICOS DE CÁNCER DE PULMÓN NO  
MICROCÍTICO: IMPACTO DE LA RADIOTERAPIA  
MAURICIO MURCIA MEJÍA

Quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido de diversas maneras a la culminación de esta tesis doctoral.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, la Dra. Meritxell Arenas y el Dr. Jordi Camps. Sus conocimientos, orientación y apoyo constante han sido fundamentales para el desarrollo de esta investigación. Al Dr. Camps, que con su visión crítica de los problemas y su vasta experiencia en investigación ha sido una fuente de motivación para llevar a cabo este trabajo, gracias por su paciencia infinita. A la Dra. Arenas, jefa, colega y sobre todo amiga, gracias por tu apoyo incondicional, gracias por tu perseverancia y constancia, por motivarme a investigar y publicar, por los valiosos consejos que han enriquecido mi trabajo. A ambos, les agradezco profundamente por su paciencia, confianza y dedicación.

Agradezco especialmente a Marta Canela, Raquel García, Rocío Benavides y Joan Badia por sus aportes, discusiones y consejos, han sido invaluable para el progreso de esta tesis. A los compañeros del Centro de Investigación Biomédica (CRB) Andrea, Helena y especialmente al Dr. Joven por sus consejos.

Asimismo, quiero extender mi agradecimiento a mis compañeros del servicio de oncología radioterápica del Hospital Universitari Sant Joan de Reus, médicos, enfermeros, técnicos de radioterapia, así como físicos y técnicos de dosimetría del servicio de física médica. Su apoyo diario, tanto en el ámbito profesional como personal, ha sido fundamental para mantenerme enfocado y motivado. Gracias a Nuria, Johana, Miguel, Junior y Víctor por su implicación en este proyecto de investigación y especialmente a la Dra. Monica Arguís, gracias por tu amistad y apoyo, por esos cafés a media mañana y por ser parte de este proyecto desde el principio.

No puedo dejar de mencionar a mis colegas de los comités de tumores torácicos de la provincia de Tarragona, oncólogos médicos, cirujanos torácicos, neumólogos, patólogos, radiólogos, médicos nucleares, gestoras de casos, agradezco su compromiso y dedicación para realizar un manejo integral de nuestros pacientes con cáncer de pulmón, en especial a Sergio, Cristina, Clara, Laia, Gabi y Pau por su amistad y apoyo.

A todos los amigos y seres queridos que de una manera u otra han sido parte de este viaje, en especial a Mónica y Silvia gracias por su paciencia, comprensión y apoyo.

Quisiera hacer una mención especial a mi familia, cuyo amor y apoyo incondicional a pesar de la distancia han sido mi pilar a lo largo de esta ardua pero gratificante travesía. A mi papá, gracias por inculcarme el valor del esfuerzo y la dedicación. A mi mamá, gracias por tu amor incondicional, por tu comprensión y por ser siempre mi mayor apoyo. A mis hermanas, Angélica y Marcela gracias por su cariño, comprensión y por ser siempre una fuente de alegría y motivación. A Daniel, tu presencia en mi vida ha sido esencial para mantener el equilibrio y la felicidad, gracias por tu paciencia durante estos meses de duro trabajo.

**Fuentes de financiamiento:** El presente trabajo fue financiado por la SOCIETAT CATALANO-BALEAR D'ONCOLOGIA, **BECA ONCO ES MOU (RECERCA) 2021** y la **ASSOCIACIÓ ONCOLÒGICA DR. AMADEU PELEGRÍ (AODAP)**.



## TABLA DE CONTENIDO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>ABREVIATURAS</b> .....  | <b>3</b>  |
| <b>RESUMEN</b> .....   | <b>7</b>  |
| <b>RESUM</b> .....   | <b>8</b>  |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | <b>9</b>  |
| <b>JUSTIFICACIÓN</b> .....   | <b>13</b> |
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....  | <b>17</b> |
| 1. EPIDEMIOLOGÍA.....  | 17        |
| 2. FACTORES DE RIESGO.....   | 18        |
| 3. ETIOLOGÍA Y PATOGENIA .....                                     | 18        |
| 3.1. Señalización proliferativa sostenida .....                    | 20        |
| 3.2. Evasión de supresores de crecimiento.....                     | 20        |
| 3.3. Resistencia a la muerte celular – Apoptosis y autofagia ..... | 20        |
| 3.4. Inmortalidad replicativa .....                                | 21        |
| 3.5. Inducción de angiogénesis .....                               | 22        |
| 3.6. Activación de invasión y metástasis .....                     | 22        |
| 3.7. Inestabilidad genómica y mutaciones.....                      | 22        |
| 3.8. Microambiente tumoral .....                                   | 23        |
| 3.9. Evasión de la respuesta inmune.....                           | 24        |
| 3.10. Reprogramación epigenética no mutacional.....                | 24        |
| 3.11. Microbiomas polimórficos .....                               | 25        |
| 3.12. Plasticidad fenotípica .....                                 | 25        |
| 3.13. Células senescentes.....                                     | 26        |
| 3.14. Reprogramación metabólica.....                               | 26        |
| 4. CRIBADO EN EL CP .....  | 30        |
| 5. PRESENTACIÓN Y DIAGNÓSTICO .....                                | 32        |
| 6. TRATAMIENTO DEL CP .....  | 34        |
| 6.1. Estadios iniciales.....                                       | 34        |
| 6.2. Estadios localmente avanzados .....                           | 35        |
| 6.3. Estadios avanzados - metastásicos .....                       | 37        |
| 6.4. Valoración de respuesta y seguimiento.....                    | 38        |
| 6.5. Valoración de la toxicidad de la RT .....                     | 39        |
| 7. RADIOBIOLOGÍA.....  | 42        |
| 7.1. Ecuación lineal cuadrática y fraccionamientos.....            | 42        |

|   |            |
|---|------------|
| 7.2. Efectos Biológicos de la RT sobre el ADN.....                                  | 42         |
| 7.3. Efectos Biológicos de la RT sobre estructuras intracelulares.....              | 44         |
| 7.4. Microambiente Tumoral y Sistema Inmunitario.....                               | 44         |
| 7.5. Las 6 Rs de la Radioterapia.....   | 45         |
| 7.6. Respuesta inmunitaria y dosis.....   | 46         |
| 8. BIOMARCADORES Y ÓMICAS EN CP.....  | 48         |
| 8.1. Biomarcadores en CP.....   | 48         |
| 8.2. Ómicas en el CP.....   | 49         |
| 9. METABOLÓMICA EN CP.....  | 52         |
| <b>HIPÓTESIS.....</b>   | <b>57</b>  |
| <b>OBJETIVOS.....</b>   | <b>61</b>  |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>  | <b>65</b>  |
| 1. DISEÑO DEL ESTUDIO Y POBLACIÓN.....  | 65         |
| 2. ANÁLISIS METABOLÓMICO.....   | 67         |
| 3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....  | 69         |
| 3.1. Cálculo tamaño de muestra.....   | 71         |
| 4. ASPECTOS ÉTICOS.....   | 71         |
| 5. PUBLICACIONES.....   | 72         |
| <b>RESULTADOS.....</b>  | <b>75</b>  |
| 1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DEMOGRÁFICAS DE LOS PARTICIPANTES.....                | 75         |
| 2. METABOLITOS BASALES EN EL GRUPO DE PACIENTES CON CPNM Y EN EL GRUPO CONTROL..... | 77         |
| 3. CAMBIOS EN EL PERFIL METABOLÓMICO INDUCIDOS POR CRT Y SBRT....                   | 84         |
| <b>DISCUSIÓN.....</b>   | <b>91</b>  |
| <b>LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO.....</b>                                   | <b>101</b> |
| <b>CONCLUSIONES.....</b>  | <b>107</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>  | <b>111</b> |
| <b>ANEXO 1.....</b>   | <b>129</b> |
| <b>ANEXO 2.....</b>   | <b>131</b> |
| <b>ANEXO 3.....</b>   | <b>135</b> |

# ABREVIATURAS



## ABREVIATURAS

|                |   |
|----------------|---|
| <b>ADN</b>     | Ácido desoxirribonucleico                                   |
| <b>ALK</b>     | Receptor tirosina quinasa del linfoma anaplásico            |
| <b>ARN</b>     | Ácido ribonucleico  |
| <b>ATP</b>     | Adenosín trifosfato   |
| <b>AUC</b>     | Area Under the Curve  |
| <b>BED</b>     | Dosis biológica equivalente                                 |
| <b>CEA</b>     | Antígeno carcinoembrionario                                 |
| <b>CP</b>      | Cáncer de pulmón  |
| <b>CPNM</b>    | Cáncer de pulmón no microcítico                             |
| <b>CRT</b>     | Radioterapia conformada                                     |
| <b>CTLA-4</b>  | Antígeno 4 de los linfocitos T citotóxicos                  |
| <b>EGFR</b>    | Receptor del factor de crecimiento epidérmico               |
| <b>EMT</b>     | Transición epitelial-mesenquimal                            |
| <b>ESMO</b>    | Sociedad Europea de oncología medica                        |
| <b>ESTRO</b>   | Sociedad Europea de radioterapia y oncología                |
| <b>GLUT</b>    | Transportadores de glucosa                                  |
| <b>IASLC</b>   | International Association for the Study of Lung Cancer      |
| <b>IMRT</b>    | Radioterapia de intensidad modulada                         |
| <b>LDCT</b>    | Tomografía computarizada de baja dosis                      |
| <b>MEC</b>     | Matriz extracelular   |
| <b>miARN</b>   | MicroARN  |
| <b>mSv</b>     | miliSievert   |
| <b>mTOR</b>    | Mammalian/mechanistic target of rapamycin                   |
| <b>NCI</b>     | National Cancer Institute                                   |
| <b>NGS</b>     | Secuenciación de nueva generación                           |
| <b>NK</b>      | Células asesinas naturales                                  |
| <b>NLST</b>    | National Lung Screening Trial                               |
| <b>OAR</b>     | Organ at risk   |
| <b>OPLS-DA</b> | Regresión ortogonal de mínimos cuadrados parciales          |
| <b>PD-L1</b>   | Ligando de muerte programada 1                              |
| <b>PET-FDG</b> | Tomografía por Emisión de Positrones 18F-fluorodeoxiglucosa |
| <b>PI3K</b>    | Fosfatidilinositol-3–quinasa                                |
| <b>PORT</b>    | Radioterapia postoperatoria                                 |
| <b>PPP</b>     | Pentosa 6 fosfato   |



|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>QT</b>                     | Quimioterapia                                   |
| <b>RM</b>                     | Resonancia magnética                            |
| <b>ROC</b>                    | Receiver Operating Characteristic               |
| <b>ROS</b>                    | Radicales libres                                |
| <b>RT</b>                     | Radioterapia                                    |
| <b>RTOG</b>                   | Radiation Therapy Oncology Group                |
| <b>RU</b>                     | Unidades relativas                              |
| <b>SBRT</b>                   | Radioterapia corporal estereotáctica            |
| <b>SG</b>                     | Supervivencia global                            |
| <b>SLP</b>                    | Supervivencia libre de progresión               |
| <b>SVM</b>                    | Support Vector Machine                          |
| <b>TC</b>                     | Tomografía computarizada                        |
| <b>TCA</b>                    | Ácido tricarboxílico                            |
| <b>TGF-<math>\beta</math></b> | Factor de crecimiento transformante $\beta$     |
| <b>TILs</b>                   | Linfocitos infiltrantes de tumores              |
| <b>TME</b>                    | Microambiente tumoral                           |
| <b>TNF</b>                    | Factor de necrosis tumoral                      |
| <b>Tregs</b>                  | Linfocitos T reguladores                        |
| <b>VMAT</b>                   | Arco terapia volumétrica de intensidad modulada |
| <b>VIP</b>                    | Variable Importance Projection                  |

# RESUMEN



## **METABOLÓMICA Y APRENDIZAJE AUTOMÁTICO EN LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES PLASMÁTICOS DE CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO: IMPACTO DE LA RADIOTERAPIA**

### **RESUMEN**

El cáncer de pulmón (CP) es el cáncer más común a nivel mundial, y es la principal causa de muerte por esta enfermedad, según datos reportados por Globocan 2022. En España, es el cuarto cáncer más común en incidencia y mortalidad. Actualmente, las líneas de investigación optan por identificar biomarcadores sanguíneos poco invasivos, sensibles y específicos para la detección temprana del CP, y para estimar la respuesta a los tratamientos oncológicos y la progresión tumoral. La integración de la metabolómica en la investigación del CP puede facilitar la identificación de biomarcadores plasmáticos de diagnóstico, de pronóstico, así como la personalización de los tratamientos oncológicos.

En esta tesis doctoral se analizaron los cambios en los niveles circulantes de metabolitos en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) en comparación con controles sanos, y se determinaron los efectos de la radioterapia conformada (CRT) y la radioterapia corporal esterotáctica (SBRT). Se reclutaron 91 pacientes con CPNM (38 CRT y 53 SBRT) y 40 controles sanos. Los niveles de 74 metabolitos plasmáticos se evaluaron utilizando la técnica de metabolómica semidirigida, observando 32 metabolitos elevados y 18 disminuidos en los pacientes tratados con CPNM. Metabolitos como el ácido etilmalónico, la maltosa, el ácido 3-fosfoglicérico, la taurina, el ácido glutámico, el ácido glicólico y la d-arabinosa, mostraron una curva ROC con una clara discriminación entre pacientes y controles. Tras la administración de la RT, con ambas técnicas, CRT y SBRT, se observaron diferentes cambios metabólicos, con una tendencia a la normalización de las vías de metabolismo energético y de aminoácidos.

En conclusión, la metabolómica identificó firmas metabólicas específicas en pacientes con CPNM, demostrando su papel como potenciales biomarcadores diagnósticos. Las diferentes respuestas metabólicas a la CRT y SBRT podrían estar relacionadas con las variaciones en la dosis, las técnicas de tratamiento y las características clínicas de los pacientes. Los resultados de la presente tesis subrayan la posible utilidad de la metabolómica para la identificación de biomarcadores de diagnóstico precoz, de valoración de la respuesta a la RT y de pronóstico.

## **METABOLÒMICA I APRENTATGE AUTOMÀTIC EN LA IDENTIFICACIÓ DE BIOMARCADORS PLASMÀTICS DE CÁNCER DE PULMÓ NO MICROCÍTIC: IMPACTE DE LA RADIOTERÀPIA**

### **RESUM**

El càncer de pulmó (CP) és el càncer més comú en l'àmbit mundial, i és la principal causa de mort per aquesta malaltia, segons dades reportades per Globocan 2022. A Espanya, és el quart càncer més comú en incidència i mortalitat. Actualment, les vies de recerca opten per identificar biomarcadors sanguinis poc invasius, sensibles i específics per a la detecció precoç del CP, i per avaluar la resposta als tractaments oncològics i la progressió tumoral. La integració de la metabolòmica en la recerca del CP pot facilitar la identificació de biomarcadors plasmàtics de diagnòstic i de pronòstic, així com la personalització dels tractaments oncològics.

En aquesta tesi doctoral es van analitzar els canvis en els nivells circulants de metabòlits en pacients amb càncer de pulmó no microcític (CPNM) en comparació amb controls sans, i es van determinar els efectes de la radioteràpia conformada (CRT) i la radioteràpia corporal esterotàxica (SBRT). Es van reclutar 91 pacients amb CPNM (38 CRT i 53 SBRT) i 40 controls sans. Els nivells de 74 metabòlits plasmàtics es van avaluar utilitzant la tècnica de metabolòmica semidirigida, observant 32 metabòlits elevats i 18 disminuïts en els pacients tractats amb CPNM. Metabòlits com l'àcid etilmalònic, la maltosa, l'àcid 3-fosfoglicèric, la taurina, l'àcid glutàmic, l'àcid glicòlic i la d-arabinosa, van mostrar una corba ROC amb una clara discriminació entre pacients i controls. Després de l'administració de RT amb ambdues tècniques, CRT i SBRT, es van observar diferents canvis metabòlics, amb una tendència a la normalització.

Com a conclusió, la metabolòmica va identificar signatures metabòliques específiques en pacients amb CPNM, demostrant el seu paper com a potencials biomarcadors diagnòstics. Les diferents respostes metabòliques a la CRT i la SBRT podrien estar relacionades amb les variacions en les dosis, les tècniques de tractament i les característiques clíniques dels pacients. Els resultats de la present tesis subratllen la possible utilitat de la metabolòmica per a la identificació de biomarcadors de diagnòstic precoç, de valoració de la resposta a la RT i de pronòstic.

## **METABOLOMICS AND MACHINE LEARNING IN THE IDENTIFICATION OF PLASMA BIOMARKERS OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER: IMPACT OF RADIOTHERAPY**

### **ABSTRACT**

Lung cancer (LC) is the most commonly occurring cancer worldwide and the leading cause of cancer-related deaths globally, reported by Globocan 2022. In Spain, LC is the fourth site of cancer in incidence and cancer deaths. Current research focuses on identifying minimally invasive, sensitive, and specific blood biomarkers for early detection of LC, and to estimate responses to cancer treatments and tumor progression. The integration of metabolomics into LC research may facilitate the identification of plasma biomarkers for diagnosis, prognosis, and personalization of cancer treatments.

This PhD thesis explored shifts in circulating metabolite levels in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients versus healthy controls and examined the effects of conventionally radiation therapy (CRT) and stereotactic body radiation therapy (SBRT). We enrolled 91 NSCLC patients (38 CFRT and 53 SBRT) and 40 healthy controls. Plasma metabolite levels were assessed using semi-targeted metabolomics, revealing 32 elevated and 18 reduced metabolites in patients. Key discriminatory metabolites included ethylmalonic acid, maltose, 3-phosphoglyceric acid, taurine, glutamic acid, glycolic acid, and d-arabinose, with a combined ROC curve indicating perfect discrimination between patients and controls. CRT and SBRT affected different metabolites, but both changes suggested a partial normalization of energy and amino acid metabolism pathways.

In conclusion, metabolomics identified distinct metabolic signatures in NSCLC patients with potential as diagnostic biomarkers. . The different metabolic responses to CRT and SBRT may be related to variations in dosage, treatment techniques, and clinical characteristics of the patients. The results of this thesis emphasize the potential utility of metabolomics for identifying early diagnostic biomarkers, assessing RT response, and prognosis.



# JUSTIFICACIÓN





## JUSTIFICACIÓN

El cáncer de pulmón (CP) es el cáncer más común a nivel mundial, y es la principal causa de muerte por esta enfermedad, según datos reportados por Globocan 2022. En España, es el cuarto cáncer más común en incidencia y mortalidad <sup>[1]</sup>. La susceptibilidad genética, los agentes ambientales y el estilo de vida son factores importantes que contribuyen a la etiología del CP, siendo el principal factor de riesgo el tabaco, responsable del 85%-90% de los casos <sup>[2,3]</sup>. El cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) representa más del 85% de los casos de CP y se clasifica en tres subtipos histológicos principales: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células grandes. A pesar de los avances en el tratamiento en los últimos años, las tasas de supervivencia global a 5 años siguen siendo bajas, variando del 72% en los estadios iniciales hasta el 15% en los estadios avanzados <sup>[4]</sup>. La radioterapia (RT) es uno de los pilares del tratamiento multidisciplinar del CP, junto con la cirugía, la quimioterapia, la inmunoterapia y las terapias dirigidas. La RT conformada (CRT) con quimioterapia concomitante es el tratamiento estándar para el CPNM localmente avanzado, mientras que la RT corporal estereotáctica (SBRT del inglés stereotactic body radiation therapy) es el tratamiento de elección en pacientes con CPNM en estadios iniciales inoperables, debido a la edad, a comorbilidades o por decisión del propio paciente <sup>[5,6]</sup>.

Aunque la tomografía computarizada de baja dosis (LDCT) ha demostrado ser una buena técnica para el diagnóstico precoz del CP, su papel sigue siendo controvertido debido a su baja especificidad, falta de rentabilidad y exposición del paciente a pequeñas dosis de radiación <sup>[7]</sup>. Actualmente, las vías de investigación optan por identificar biomarcadores sanguíneos poco invasivos, sensibles y específicos para la detección precoz del CP, y para estimar la respuesta a los tratamientos oncológicos y la progresión tumoral <sup>[8,9]</sup>.

Las células tumorales sufren alteraciones metabólicas, como el aumento de la glicólisis aeróbica (efecto Warburg) y la glutaminólisis, así como en las vías de síntesis de aminoácidos y lípidos <sup>[10,11]</sup>.

La metabolómica es una herramienta que permite identificar alteraciones metabólicas y relacionarlas con los mecanismos patológicos de enfermedades como el CP <sup>[12,13]</sup>. La integración de la metabolómica en el manejo del CP puede facilitar la identificación de biomarcadores plasmáticos de diagnóstico y de pronóstico <sup>[14,15]</sup>.



# INTRODUCCIÓN

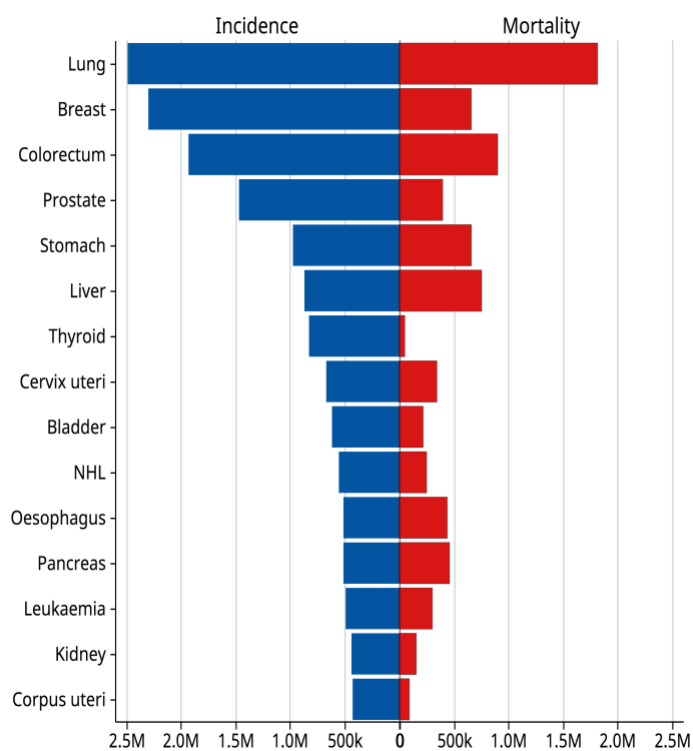


## INTRODUCCIÓN

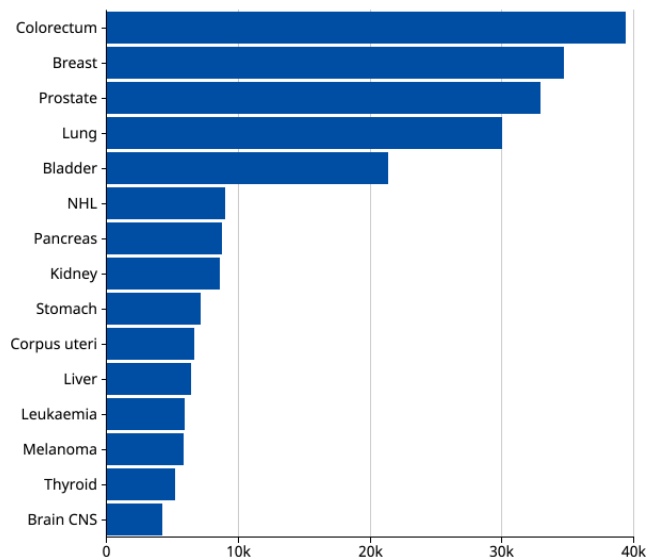
### 1. EPIDEMIOLOGÍA

El CP es uno de los tumores con mayor prevalencia a nivel mundial, con una incidencia anual de 2.480.677 nuevos casos, y es el responsable de 1.8 millones de muertes al año, según datos de Globocan en 2022 (Figura 1). En España, ocupa el cuarto lugar en prevalencia en ambos sexos, con una mortalidad conjunta del 21%, es decir uno de cada 5 pacientes fallece (Figura 2) <sup>[1,16,17]</sup>. El CP afecta con mayor frecuencia a personas entre 40 y 70 años con un pico de incidencia máxima entre los 60 y 70 años.

El CPNM supone el 80% del total del CP. Las tasas de supervivencia global (SG) a 5 años varían del 51% al 72% para tumores en estadios iniciales y del 15% en estadios avanzados <sup>[18]</sup>.



**Figura 1. Incidencia y mortalidad mundial por CP en 2022.** Extraído de Globocan 2024 <sup>[1]</sup>  
Artículo open access. Licencia CC (Creative Commons)



**Figura 2. Prevalencia de CP en España en 2022.** Extraído de Globocan 2024 <sup>[1]</sup>.  
Artículo open access. Licencia CC (Creative Commons)

## 2. FACTORES DE RIESGO

La susceptibilidad genética, la contaminación ambiental, la polución, la exposición ocupacional y el estilo de vida son factores importantes que contribuyen a la etiología del CP <sup>[19,20]</sup>. El aumento de la incidencia de este cáncer está relacionado principalmente con el consumo de tabaco, siendo éste el principal factor de riesgo, presente en el 80-90% de los casos <sup>[2]</sup>. Este riesgo está presente de igual forma en fumadores pasivos, fumadores de pipa o fumadores de puros y se relaciona con la cantidad y el tiempo de exposición. La detección de cotinina en sangre, el principal metabolito de la nicotina, demuestra la intensidad de la exposición y niveles elevados de la misma se asocian a un mayor riesgo de desarrollar CP <sup>[21]</sup>. El cese o reducción de dicha exposición reduce el riesgo de CP <sup>[22]</sup>.

## 3. ETIOLOGÍA Y PATOGENIA

La transformación de una célula normal a una célula neoplásica o carcinogénesis es un proceso complejo que comprende múltiples pasos y que se caracteriza por una alteración de la proliferación celular que lleva a un crecimiento celular incontrolado. El trabajo de Hanahan y Weinberg en 2000 "Hallmarks of Cancer" <sup>[23]</sup> establece un marco conceptual fundamental para entender la biología del cáncer, definiendo los

mecanismos necesarios o facilitadores para su desarrollo y progresión del cáncer, describiendo seis características adquiridas esenciales y dos facilitadoras:

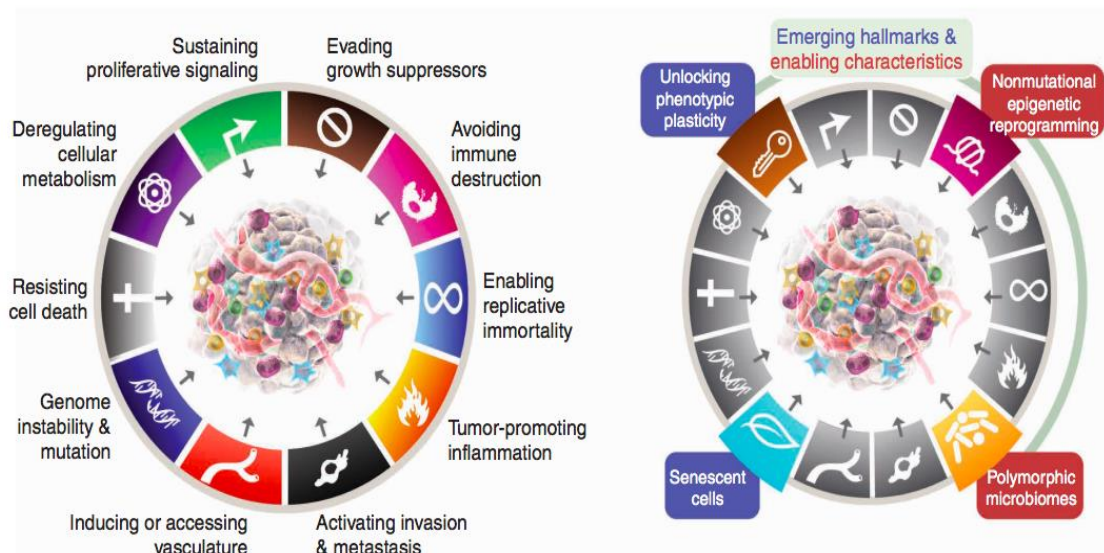
- Señalización proliferativa sostenida.
- Evasión de supresores de crecimiento.
- Resistencia a la muerte celular.
- Inmortalidad replicativa.
- Inducción de angiogénesis.
- Activación de invasión y metástasis.
- Inestabilidad genómica y mutaciones.
- Microambiente tumoral.

En 2011, se añadieron dos características emergentes [24]:

- Reprogramación metabólica.
- Evasión de la respuesta inmune.

La revisión del año 2022 amplía aún más este marco, incorporando cuatro nuevas características emergentes (Figura 3) [25]:

- Reprogramación epigenética no mutacional.
- Microbiomas polimórficos.
- Plasticidad fenotípica.
- Células senescentes.



**Figura 3. "Hallmarks of Cancer".** Mecanismos que describen la etiología del cáncer. Extraído de Hanahan [25]. Licencia de American Association for Cancer Research.



### 3.1. Señalización proliferativa sostenida

La señalización proliferativa sostenida es la capacidad adquirida por las células tumorales para mantener activas las señales de crecimiento que les permiten proliferar de manera incontrolada. Esto se logra de dos formas, una autocrina, produciendo sus propios factores de crecimiento, alterando los receptores de los factores de crecimiento, manteniéndolos activos, y otra exocrina, alterando componentes de la vía de señalización, afectando la transducción de señales y la expresión génica, como ocurre con las alteraciones de la vía de señalización de la oncoproteína Ras o KRAS [23]. También se pueden presentar disrupciones en los mecanismos de retroalimentación negativa, encargados de atenuar la señal proliferativa, como ocurre con la vía de la molécula diana de la rapamicina (mTOR) y fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), en la cual el aumento de actividad de PI3K detiene el efecto antiproliferativo de mTOR, favoreciendo la tumorigénesis y la progresión del CPNM [26].

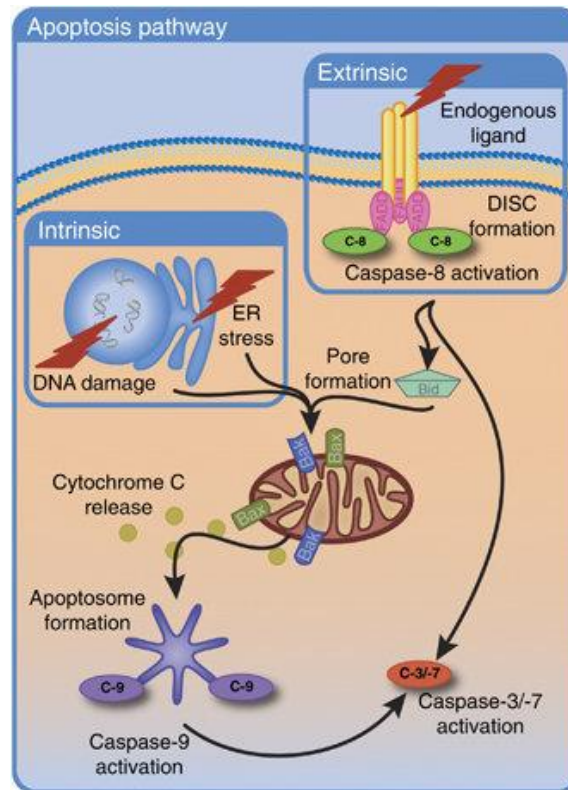
### 3.2. Evasión de supresores de crecimiento

Las células neoplásicas desarrollan la capacidad de ignorar las señales que normalmente restringen el crecimiento celular. Esto puede involucrar la inactivación de genes supresores de tumores como la proteína p53 (p53) o la proteína del retinoblastoma, que regulan el ciclo celular y previenen la proliferación incontrolada. En el caso de CPNM, alteraciones de p53 se relacionan con tumores más agresivos y con peor pronóstico [27]. Por otra parte, el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) tiene normalmente un efecto antiproliferativo, pero en algunos casos la señal se redirige hacia una activación del ciclo celular llevando a una transición epitelial-mesenquimal (EMT) que confiere a las células un alto grado de malignidad [28].

### 3.3. Resistencia a la muerte celular – Apoptosis y autofagia

La apoptosis o muerte celular programada es una barrera natural contra el desarrollo del cáncer, eliminando las células dañadas o anormales. Este mecanismo se activa en estados de estrés, como el daño del ADN, privación de nutrientes, presencia de hipoxia, interferón y ligandos, como el factor de necrosis tumoral (TNF) relacionados con la expresión del oncogén *c-Myc* y citocromo C. Presenta dos circuitos, un programa extrínseco de estímulo extracelular y otro intrínseco o de origen intracelular, y ambos culminan con la activación de las caspasas, enzimas que inician una cascada de

proteólisis llevando a la muerte de la célula. Las células tumorales evitan la apoptosis mediante las alteraciones en las vías de señalización apoptótica, como la sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, mutaciones de p53, alteración de las caspasas o desregulación de *c-Myc* (Figura 4) [27,29,30].



**Figura 4. Mecanismo de la apoptosis.** Extraído de Boland et al [31]. Licencia CC (Creative Commons).

Al igual que la apoptosis, la autofagia es un mecanismo regulador del proceso de muerte celular programada que se activa ante estrés celular o deficiencia de nutrientes. La activación la vía de señalización de la PI3K y mTOR se encuentra relacionada con la inhibición de la autofagia permitiendo la supervivencia de las células tumorales [32].

### 3.4. Inmortalidad replicativa

Las células normales tienen un número limitado de divisiones celulares antes de entrar en senescencia o morir, un fenómeno controlado por los telómeros dentro del núcleo celular. Las células cancerosas mantienen su capacidad de dividirse indefinidamente mediante la sobreexpresión de la telomerasa, permitiendo replications continuas, evadiendo los mecanismos de senescencia a pesar del acortamiento de los telómeros.

Una presencia de telómeros cortos está relacionada con una peor supervivencia en casos de CPNM en estadios iniciales y avanzados <sup>[33,34]</sup>.

### 3.5. Inducción de angiogénesis

Los tumores necesitan un suministro constante de nutrientes y oxígeno, lo cual es facilitado por la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), inducida mediante la producción de factores angiogénicos, como el factor de crecimiento endotelial vascular, el factor de crecimiento endotelial derivado de las plaquetas, el factor de crecimiento de los fibroblastos, angiopoyetinas, proteasas, cadherinas, integrinas, osteopontina y productos de los mastocitos <sup>[35]</sup>.

### 3.6. Activación de invasión y metástasis

La capacidad de invadir tejidos circundantes y diseminarse a otros órganos es una característica distintiva de los tumores malignos. Alteraciones en la adhesión celular, como la pérdida de expresión de E-cadherina y catenina, y la sobreexpresión de N-cadherina, seguida de una EMT de la célula tumoral son esenciales para la iniciación de las metástasis en el CPNM, así como la degradación de la matriz extracelular (MEC), permitiendo a las células cancerosas migrar y establecerse en nuevos entornos <sup>[36,37]</sup>. El CPNM metastásico también se asocia con la activación de macrófagos estimulados por la interleucina 4 que degradan la MEC y facilitan la invasión local o sobreexpresión de TGF- $\beta$  que estimula la EMT <sup>[28]</sup>.

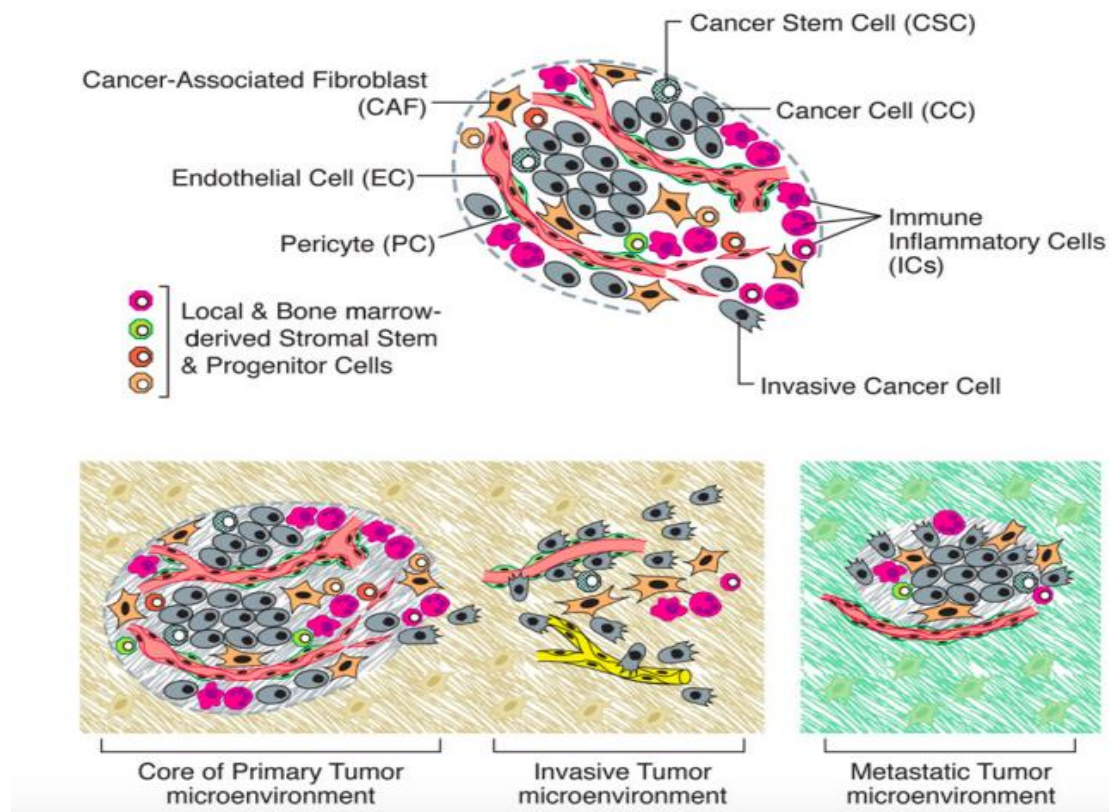
### 3.7. Inestabilidad genómica y mutaciones

La inestabilidad genómica es una característica habilitadora fundamental del cáncer que proporciona una fuente de variabilidad genética, responsable de la expresión de un fenotipo de malignidad. Esta variabilidad permite a las células cancerosas adaptarse rápidamente y evolucionar. Las mutaciones genéticas son el resultado de errores en la replicación del ADN, reparaciones defectuosas del ADN, y daño del ADN por agentes mutagénicos, como la exposición a carcinógenos ambientales, el tabaco y la radiación. Estas mutaciones pueden activar oncogenes, inactivar genes supresores de tumores y afectar las vías de señalización claves que regulan el crecimiento y la supervivencia celular <sup>[38,39]</sup>. Un ejemplo serían las mutaciones del gen p53, ya que p53 tiene un papel importante en la estabilización del genoma <sup>[27,40]</sup>. La sobreexpresión del receptor del

factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o mutaciones de EGFR están presentes en 43-89% de los casos de CPNM [41].

### 3.8. Microambiente tumoral

El microambiente tumoral (TME), compuesto por células tumorales y una variedad de células estromales (células inmunitarias, fibroblastos), vasos sanguíneos y MEC, juega un papel crucial en la progresión y malignidad del cáncer. En el CPNM el TME mantiene una inflamación crónica mediada por citocinas como la interleucina 6 y factores de crecimiento derivados de los fibroblastos asociados al cáncer que regulan la plasticidad de las células madre cancerosas a la vez que modulan la rigidez estromal y la angiogénesis. El TME también desempeña un papel crucial en la evasión inmunitaria. Las células tumorales y fibroblastos asociados al cáncer pueden expresar moléculas inmunosupresoras como ligando de muerte programada (PD-L1), que inhiben la activación de células T citotóxicas (Figura 5) [42].



**Figura 5. Componentes del microambiente tumoral (TME).** Células madre cancerosas, fibroblastos asociados al cáncer, células inmunitarias. Extraído de Hanahan [24].  
Artículo open acces. Licencia de Elsevier.

### 3.9. Evasión de la respuesta inmune

Normalmente, el sistema inmune mantiene una vigilancia constante sobre las células y los tejidos para reconocer y eliminar la mayoría de las células tumorales incipientes.

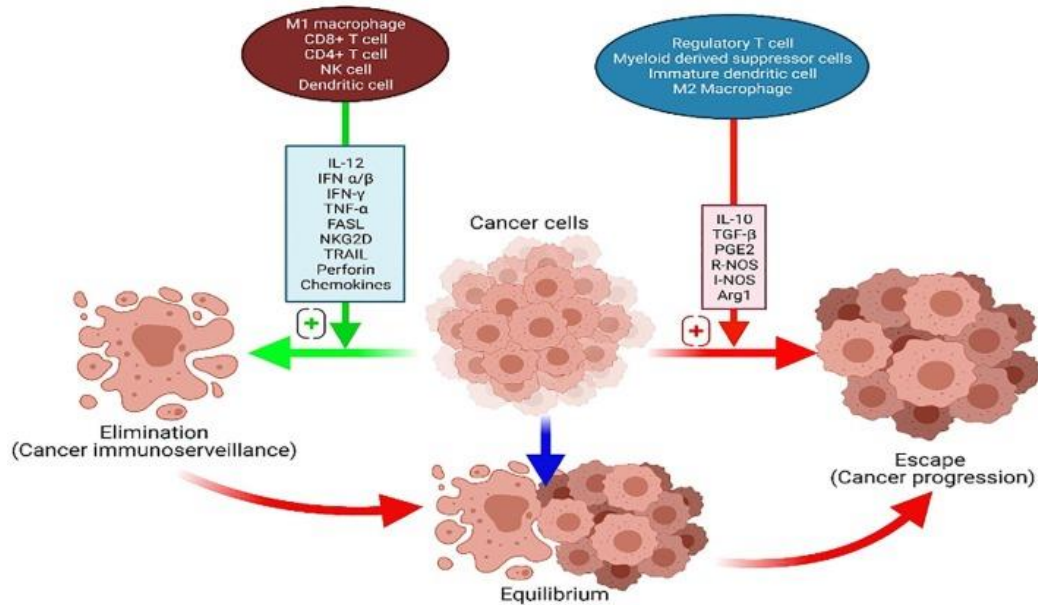
El sistema inmune juega un doble papel en el proceso de carcinogénesis, por una parte, puede suprimir el crecimiento tumoral, destruyendo las células cancerosas o inhibiendo su crecimiento y, por otra, puede promover la progresión tumoral seleccionando células cancerígenas aptas para sobrevivir en un huésped inmunocompetente, además de establecer condiciones dentro del TME que faciliten el crecimiento tumoral. Schreiber et al. (2011) establecieron el concepto de "inmunoedición del cáncer", que describe las complejas interacciones entre el sistema inmunitario y el cáncer a lo largo de tres fases principales: eliminación, equilibrio y escape (Figura 6) <sup>[43]</sup>.

El TME desempeña un papel importante en la evasión inmunitaria. Las células tumorales y los fibroblastos asociados al cáncer pueden expresar moléculas inmunosupresoras como la PD-L1 y el antígeno 4 de los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), que inhiben la activación de células T citotóxicas. Además, el TME puede secretar factores que reclutan células inmunosupresoras como la interleucina 6 y el TGF- $\beta$ , creando un entorno que protege al tumor de la vigilancia inmunitaria <sup>[42,44,45]</sup>. Los linfocitos infiltrantes de tumores (TILs) pueden inducir respuestas inmunitarias antitumorales que destruyen células cancerosas, pero también pueden ser captados por el tumor para facilitar su crecimiento y progresión. Es así como subtipos de células inmunitarias, como los linfocitos T citotóxicos CD8+, los linfocitos T auxiliares CD4+ y linfocitos T reguladores (Tregs) pueden influir en la evolución del tumor. Los linfocitos T citotóxicos son cruciales para la eliminación de células cancerosas, mientras que los Tregs pueden suprimir la respuesta inmunitaria y favorecer la progresión tumoral <sup>[46]</sup>.

### 3.10. Reprogramación epigenética no mutacional

Es una característica emergente crucial en la biología del cáncer, que permite a las células cancerosas alterar su comportamiento sin cambios en la secuencia de ADN, facilitando la adquisición de capacidades malignas. La metilación del ADN, por ejemplo, implica la adición de grupos metilo a las bases de citosina en el ADN. En el caso del CPNM, los patrones aberrantes de metilación pueden silenciar genes supresores de tumores y activar oncogenes. Las histonas, por otra parte, son proteínas alrededor de las cuales se envuelve el ADN para formar la cromatina. Modificaciones de las histonas, como la acetilación, metilación y fosforilación, pueden alterar la estructura de la

cromatina y por ende la accesibilidad del ADN para la transcripción. Los ARN no codificantes, como los microARN (miARN) y los ARN largos no codificantes (lncARN), juegan roles críticos en la regulación de la expresión génica al prevenir la traducción de ARN mensajero (ARNm) o promover su degradación [47].



**Figura 6. Inmunomodulación del cáncer.** Extraído de Mallick et al [48]. Artículo open access. Licencia CC (Creative Commons).

### 3.11. Microbiomas polimórficos

Componentes de la microbiota pulmonar pueden contribuir a la progresión en el CPNM produciendo metabolitos con un potencial oncogénico. Algunos estudios reportan una relación entre la microbiota pulmonar y cambios en los metabolitos implicados en la vía de señalización de la autofagia [49].

### 3.12. Plasticidad fenotípica

Es un aspecto crucial de la biología del cáncer, que confiere a las células cancerosas el poder de cambiar de un tipo celular a otro en respuesta a diversas señales del TME, aumentando su adaptabilidad, facilitando las metástasis y generando resistencia a los tratamientos. Esta capacidad la observamos en las células madre cancerosas y en la EMT [50].

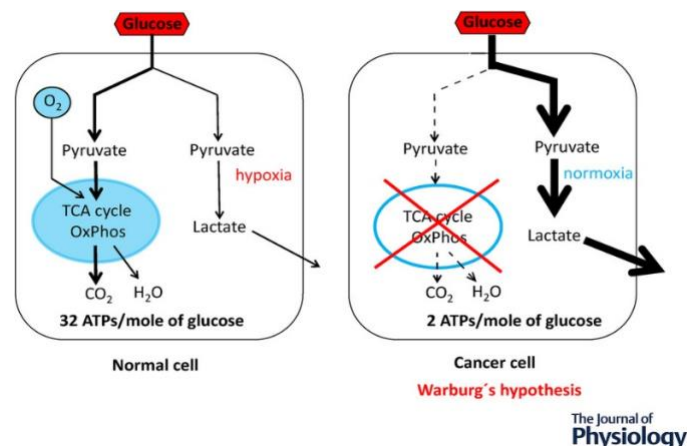
### 3.13. Células senescentes

La senescencia celular se activa al detectar un daño en el ADN, una alteración de los telómeros o una exposición a radiaciones ionizantes, activando genes proinflamatorios y generando una respuesta antitumoral. De manera paradójica, este mecanismo puede promover el crecimiento y progresión tumoral, alterando el TME [51].

### 3.14. Reprogramación metabólica

Este proceso permite un aumento anormal en la actividad metabólica de la célula tumoral, incrementando la producción de energía y de precursores biosintéticos de las diferentes vías metabólicas, como la glicólisis y el metabolismo de los aminoácidos, concediéndole la capacidad de sobrevivir, proliferar e incluso permitir la progresión [47]. En condiciones aeróbicas, las células normales metabolizan la glucosa a piruvato en el citosol, por la vía de la glicólisis y, posteriormente, a CO<sub>2</sub> en la mitocondria por la vía de la fosforilación oxidativa o ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), produciendo 32 moléculas de adenosín trifosfato (ATP). En ausencia de oxígeno, la glicólisis anaeróbica descompone la glucosa en dos moléculas de piruvato que posteriormente se convierte en lactato, mediante la acción enzimática de la lactato deshidrogenasa, produciendo dos moléculas de ATP [52].

Las células cancerosas metabolizan la glucosa, principalmente a través de la glicólisis aeróbica en lugar de la fosforilación oxidativa, esto permite una rápida generación de ATP y de metabolitos, necesarios para la biosíntesis de macromoléculas, además de permitir su adaptación a entornos hipóxicos, aunque menos eficiente en términos de producción (solo 4 moléculas de ATP), una condición conocida como efecto Warburg, descrito por Otto Warburg en 1923 (Figura 7) [53].

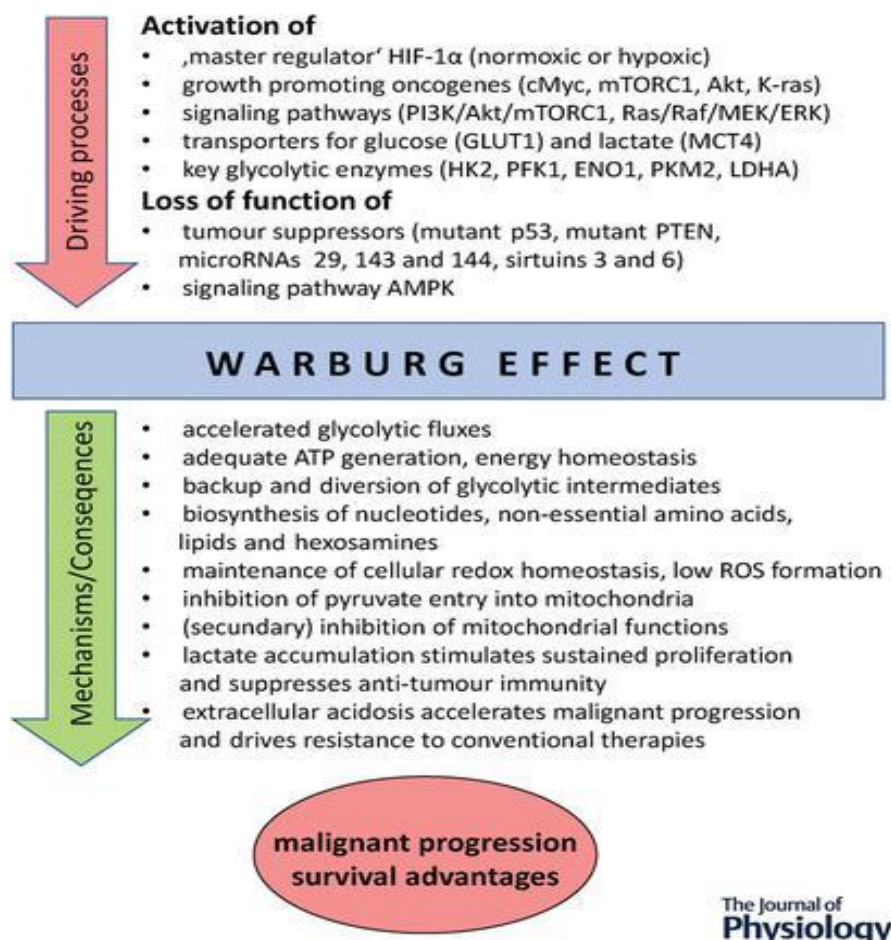


[54] **Figura 7. Efecto Warburg.** Fosforilación oxidativa, glicólisis anaeróbica y glicólisis aeróbica. Extraído de Vaupel et al [54]. Artículo open access. Licencia CC (Creative Commons).



Este incremento en la captación de glucosa por el citoplasma de la célula tumoral a través GLUT1 y el aumento de la glicolisis son las bases fisiológicas de la Tomografía por Emisión de Positrones 18F-fluorodeoxiglucosa (PET-FDG)<sup>[55]</sup>.

Los cambios en el metabolismo de la glucosa en el CPNM se asocian a alteraciones o mutaciones de EGFR y p53, así como, del receptor tirosina quinasa del linfoma anaplásico (ALK), del receptor tirosina cinasa ROS1 o de la M2 piruvato cinasa, esta última implicada en la expresión de PD-L1 <sup>[27,56]</sup>. Kerr et al. (2021) demostraron un aumento en la captación de glucosa, así como la sobreexpresión de GLUT y aumento en la actividad de las enzimas implicadas en la glicólisis dirigidas hacia el ciclo de TCA, en el CPNM con KRAS mutado (Figura 8) <sup>[38,54,57]</sup>.



**Figura 8. Efecto Warburg- Reprogramación metabólica.** Implicaciones metabólicas de la alteración de la glicólisis y los procesos de malignidad. Extraído de Vaupel et al <sup>[54]</sup>. Artículo open access. Licencia CC (Creative Commons).

El incremento en la glicólisis conlleva a la vez cambios en otras vías metabólicas como en el ciclo de TCA derivado del aumento de lactato intracelular, de la vía de las pentosas 6 fosfato (PPP), hexosaminas y biosíntesis de serina <sup>[53]</sup>. La PPP es una vía metabólica paralela a la glicólisis, que se lleva a cabo en el citoplasma y que desempeña un papel



crucial en la supervivencia y crecimiento de las células tumorales al generar pentosas fosfato para la síntesis de ácidos nucleicos y proporcionar nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, necesario para la síntesis de ácidos grasos y la supervivencia celular en condiciones de estrés. La sobreexpresión de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, enzima de la PPP se relaciona con bajas tasas de supervivencia en pacientes con CPNM [58].

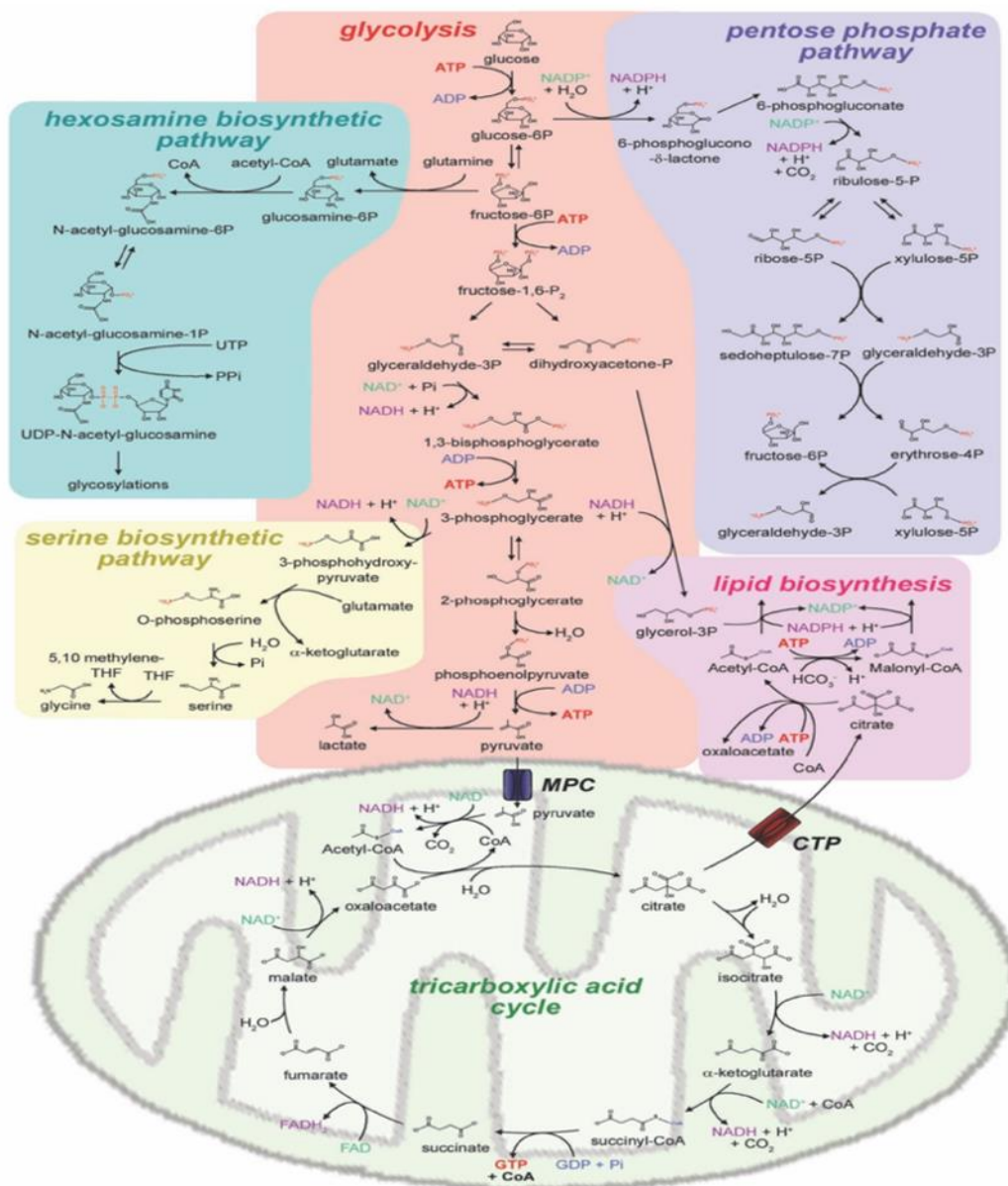
Por otra parte, el metabolismo de los aminoácidos juega un papel importante en la reprogramación metabólica por su interacción con el metabolismo de la glucosa. Para compensar la reducción de productos intermedios del ciclo TCA en el CPNM, se activa el mecanismo de glutaminólisis en la que la glutamina intracelular se convierte en glutamato mediante la glutaminasa 1 y posteriormente a alfa-cetoglutarato a nivel mitocondrial. La glutaminasa 1 está frecuentemente elevada en el CPNM [59]. El bloqueo del metabolismo de la glutamina puede alterar el TME inmunosupresor de los tumores, promoviendo la activación de células T anti-tumorales o citotóxicas [60].

Otros transportadores de aminoácidos, como la alanina-serina-cisteína-transportador 2, encargado de la captación de glutamina dentro de la célula tumoral y el transportador de L-aminoácidos, responsable del intercambio de glutamina por valina, metionina y fenilalanina, se encuentran elevados en el CPNM. La serina obtenida por la glutaminólisis y la glicólisis se oxida a 3-fosfoserina por medio de 3 fosfoglicerato y se convierte en glicina a través de la fosfoserina aminotransferasa.

Alteraciones del metabolismo serina/glicina, como la elevación de la fosfoserina aminotransferasa se relacionan con la proliferación, metástasis y quimioresistencia (Figura 9) [61].

El triptófano, aminoácido esencial para formar el citoesqueleto y las proteínas intracelulares, se degrada por la vía de la quineurina. El triptófano y sus metabolitos están disminuidos en el plasma de pacientes con CPNM [62].

La síntesis de ácidos grasos también está alterada en la célula tumoral. Los lípidos son usados para producir ATP a partir de su oxidación a nivel mitocondrial y son esenciales para la síntesis de membranas celulares, vitaminas, hormonas y metabolitos de vías de señalización intracelular. Enzimas como la ácido graso sintasa necesaria para la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga y la Acyl CoA sintetasa implicada en la oxidación de ácidos grasos están sobreexpresadas en CPNM con KRAS mutado, comparado con pacientes sanos [63,64].



**Figura 9. Vías metabólicas de la glucosa en CPNM.** Glicólisis, ciclo de TCA, vía de PPP, vía de hexosaminas, biosíntesis de lípidos y de serina. Extraído de Martínez et al <sup>[53]</sup>. Artículo open access. Licencia CC (Creative Commons).

#### 4. CRIBADO EN EL CP

El papel del LDCT en la detección del CP sigue siendo motivo de controversia, a pesar de los estudios recientes que han demostrado que el uso de esta técnica puede reducir significativamente las muertes por esta enfermedad <sup>[7]</sup>. La tasa promedio de dosis efectiva del LDCT es de aproximadamente 1,5 mSv, mientras que la dosis efectiva de una tomografía computarizada (TC) de diagnóstico es aproximadamente 8 mSv <sup>[65]</sup>.

El cribado en CP se recomienda en las personas con un alto riesgo de padecerlo, individuos con edades entre 55 y 74 años, historia de tabaquismo de 30 paquetes/año o de 15 años si se consume dos paquetes al día, fumadores activos o exfumadores que dejaron de fumar en los últimos 15 años <sup>[66]</sup>.

El Ensayo Nacional de Detección de Cáncer de Pulmón (NLST) diseñado por el National Cancer Institute (NCI) en 2002, es uno de los estudios más grandes realizados en este campo, en el que se incluyeron 53.454 fumadores y exfumadores con riesgo alto para padecer CP, distribuidos aleatoriamente para la detección anual con LDCT o con radiografía simple de tórax durante 3 años. Este estudio demostró una reducción del 20% en la mortalidad por CP en el grupo de alto riesgo que fue sometido a LDCT, comparado con el grupo de la radiografía de tórax, pero mostrando una tasa de falsos positivos del 96% <sup>[67]</sup>.

Por otra parte, el ensayo NELSON, un estudio belga- holandés, que incluyó 15,792 individuos (13,195 hombres y 2,597 mujeres) de entre 50 y 74 años con alto riesgo de CP, que fueron aleatorizados para la detección con LDCT basal y posteriormente a 1 año, a 3 años y finalmente a 5.5 años versus un seguimiento sin detección radiológica, con una tasa de adherencia al estudio del 86%, demostró una reducción de la mortalidad del 26% a 10 años, en hombres asintomáticos con riesgo de CP, en el grupo de cribado con LDCT <sup>[68,69]</sup>.

Ante la baja especificidad, poca rentabilidad y el riesgo de exposición a bajas dosis de radiación se han propuesto diferentes estrategias para mejorar la detección con LDCT. Una de ellas el sistema Lung-RADS, una herramienta desarrollada por el Colegio Americano de Radiología (ACR) que permite estandarizar la interpretación de los hallazgos de LDCT, clasificando los nódulos pulmonares en cinco categorías principales, cada una asociada con un riesgo de malignidad y recomendaciones de manejo específicas, reduciendo la tasa de falsos positivos y guiando eficazmente el manejo clínico de los nódulos pulmonares, equilibrando la detección temprana del CP con la reducción de intervenciones innecesarias (Tabla 1) <sup>[70]</sup>.

Por otra parte, la integración de algoritmos de deep learning con LDCT han demostrado ser capaces de diferenciar con mayor precisión nódulos benignos de malignos, permitiendo mejorar la especificidad y sensibilidad de las pruebas de cribado, reduciendo la tasa de falsos positivos y de procedimientos invasivos innecesarios [71,72].

**Tabla 1. Guías de manejo del nódulo pulmonar solitario por LDCT.**

| Tamaño del Nódulo | Nivel de Riesgo | Fleischner 2017  | NCCN 2018   | Lung-RADS 2014  |
|-------------------|-----------------|--|---|---|
| < 6 mm            | Bajo            | No se necesita seguimiento.  | Continuar con cribado anual si es parte de un programa de detección.  | Lung-RADS 1: Cribado anual recomendado; nódulo probablemente benigno.   |
| < 6 mm            | Alto            | No se necesita seguimiento.  | Considerar seguimiento a los 12 meses si es parte del cribado; de lo contrario, no se necesita seguimiento.   | Lung-RADS 1: Cribado anual recomendado; nódulo probablemente benigno.   |
| 6 - 8 mm          | Bajo            | TC de seguimiento a los 6-12 meses; si es estable, no se necesita más seguimiento.         | TC a los 6 meses; seguimiento adicional si hay características sospechosas.                                   | Lung-RADS 2: Cribado anual; Lung-RADS 3: Seguimiento a los 6 meses, luego cribado anual si se mantiene estable.       |
| 6 - 8 mm          | Alto            | TC de seguimiento a los 6-12 meses; seguimiento adicional a los 18-24 meses si es estable. | TC a los 6 meses; considerar PET/TC o biopsia si hay características sospechosas o alto riesgo de malignidad. | Lung-RADS 3: Seguimiento a los 6 meses; considerar PET/TC o biopsia si se sospecha malignidad.                        |
| > 8 mm            | Ambos           | TC de seguimiento a los 3 meses, PET/TC, o biopsia según el contexto clínico.              | PET/TC, biopsia o evaluación quirúrgica dependiendo del crecimiento o características sospechosas.            | Lung-RADS 4A: TC de seguimiento a los 3 meses; Lung-RADS 4B: PET/TC o biopsia recomendado para evaluación definitiva. |

Lung-RADS: Lung Imaging Reporting and Data System. NCCN: National Comprehensive Cancer Network, LDCT: Tomografía de baja dosis, TC: Tomografía computarizada, PET: Tomografía por emisión de positrones.

Actualmente, el proyecto CASSANDRA (Cancer Screening, Smoking Cessation and Respiratory Assessment) ideado por la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR), y en colaboración con todas las sociedades médicas dedicadas al diagnóstico, tratamiento e investigación en CP, como la Sociedad Española de Oncología Radioterápica (SEOR), Sociedad Española de Radiología Médica (SERAM), Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), Grupo Español de Cáncer de Pulmón (GECP) y Sociedad Española de Cirugía Torácica (SECT), entre otras, tiene como propósito realizar un proyecto piloto asistencial multicéntrico que demuestre la viabilidad del cribado en nuestro país, proporcionando la evidencia científica adaptada al contexto español [73].

## 5. PRESENTACIÓN Y DIAGNÓSTICO

La clínica del CP es muy inespecífica, en el 10% de los casos pueden ser asintomáticos. Los signos y síntomas más frecuentes son la tos, dolor torácico, disnea, hemoptisis, astenia, anorexia, pérdida de peso e infecciones respiratorias. Según la extensión torácica también se puede presentar disfagia por afectación o estenosis del esófago, síndrome de vena cava superior, tromboembolismo pulmonar, disfonía por parálisis de la cuerda vocal secundaria a compresión del nervio recurrente o frénico, taponamiento cardiaco, dolor a nivel costal por infiltración del tumor como en el tumor de Pancoast, derrame pleural o dolor pleurítico por infiltración de la pleura [74,75]. En los casos de metástasis, la clínica depende de la localización, dolor o fracturas si hay metástasis óseas, alteración hepática si hay metástasis hepáticas, clínica neurológica si hay afectación del sistema nervioso central o periférico. También se puede presentar como un síndrome paraneoplásico, como síndrome de secreción inadecuada de la hormona antidiurética, hipercalcemia, hipocalcemia, hiponatremia, síndrome de Cushing, miastenia, anemia o alteraciones dermatológicas [76].

Ante la sospecha de un CPNM se recomienda remitir al paciente al neumólogo, a la unidad de diagnóstico rápido y ser valorado por un equipo multidisciplinar. Se debe iniciar el estudio con una TC [77]. El PET-FDG es fundamental para el diagnóstico, estadificación y planificación del tratamiento, además de la resonancia magnética (RM) cerebral [78].

Se recomienda realizar biopsia a todos los ganglios >1,5 cm PET-FDG negativo y PET-FDG positivo de cualquier tamaño, mediante la ultrasonografía endobronquial o la ultrasonografía endoscópica digestiva [79-81]. En los casos no concluyentes, la mediastinoscopia convencional o la videomediastinoscopia y la videotoracoscopia son las alternativas quirúrgicas para obtener muestras [82].

Por otra parte, la punción aspirativa con aguja fina transtorácica guiada por TC permite el estudio de lesiones pulmonares periféricas [83]. En pacientes con lesión única a distancia y captación en la PET es necesaria la confirmación patológica [84].

El diagnóstico patológico del CPNM se debe realizar de acuerdo con la clasificación de la Organización Mundial de la Salud. Es importante obtener el diagnóstico histológico y diferenciar entre el carcinoma de células escamosas, el adenocarcinoma, que es el tipo histológico más frecuente, los tumores neuroendocrinos y el carcinoma de células grandes. La International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) propone un sistema de clasificación para el adenocarcinoma con implicaciones pronósticas [85,86]. Se deben realizar estudios inmunohistoquímicos de alteraciones moleculares, como las

mutaciones EGFR, KRAS y ALK, ya que son predictores de respuesta a ciertos fármacos o terapias dirigidas. Se debe evitar la clasificación genérica de tumores CPNM o carcinoma NOS<sup>[87]</sup>.

El estadiaje se realiza de acuerdo con la 8ª edición del TNM de la IASLC, que nos permite describir el tamaño y la extensión del tumor primario, la afectación de los ganglios linfáticos regionales y la presencia de metástasis a distancia, esta clasificación del cáncer en función de su extensión en el cuerpo permite definir el tipo de tratamiento y a su vez indica el pronóstico de la enfermedad (Tabla 2). Aunque está próxima la publicación de la 9ª edición que, aparte de identificar el tumor, las adenopatías o la metástasis (TNM), incluye la R como indicador del grado de resección del tumor en el caso del abordaje quirúrgico, ya que la presencia de tumor residual micro o macroscópico influye en el pronóstico<sup>[88-90]</sup>.

**Tabla 2. TNM 8ª Edición IASLC para el estadiaje del CP.**

| <b>Stage</b> | <b>T</b>    | <b>N</b> | <b>M</b> |
|--------------|-------------|----------|----------|
| Stage 0      | Tis         | N0       | M0       |
| Stage IA1    | T1a(mi)/T1a | N0       | M0       |
| Stage IA2    | T1b         | N0       | M0       |
| Stage IA3    | T1c         | N0       | M0       |
| Stage IB     | T2a         | N0       | M0       |
| Stage IIA    | T2b         | N0       | M0       |
| Stage IIB    | T1a-c       | N1       | M0       |
|              | T2a-b       | N1       | M0       |
|              | T3          | N0       | M0       |
| Stage IIIA   | T1a-c       | N2       | M0       |
|              | T2a-b       | N2       | M0       |
|              | T3          | N1       | M0       |
|              | T4          | N0-1     | M0       |
| Stage IIIB   | T1a-c       | N3       | M0       |
|              | T2a-b       | N3       | M0       |
|              | T3          | N2       | M0       |
|              | T4          | N2       | M0       |
| Stage IIIC   | T3          | N3       | M0       |
|              | T4          | N3       | M0       |
| Stage IVA    | Any T       | Any N    | M1a/M1b  |
| Stage IVB    | Any T       | Any N    | M1c      |

CP: Cáncer de pulmón, T: Tumor, N: Nódulos linfáticos, M: Metástasis

Adaptado de Carter et al<sup>[90]</sup>.

## 6. TRATAMIENTO DEL CP

### 6.1. Estadios iniciales

Los estadios iniciales, estadio I y II (tumores T1-T2 N0), representan el 20-30% del total de los CPNM. La resección quirúrgica es el tratamiento estándar, con unas tasas de SG a 5 años que varían del 55% al 72% para enfermedad patológica en estadio I, y del 51% para la enfermedad en estadio II. El abordaje de elección es la lobectomía asociada a linfadenectomía mediastínica, en los casos en los que la función respiratoria y el estado general del paciente lo permita <sup>[91]</sup>. La resección sublobar, como la segmentectomía y la resección en cuña, se debe considerar en el caso de tumores periféricos, T1ab N0, cuando el paciente presente un riesgo alto para lobectomía, ya que estos abordajes se asocian a peores resultados <sup>[92,93]</sup>. La cirugía toracoscópica asistida por vídeo junto con la cirugía robótica presentan menos complicaciones, comparadas con la toracotomía tradicional <sup>[94]</sup>.

Existe un subgrupo de pacientes médicamente inoperables, por edad o comorbilidades médicas, o que por decisión propia rechazan el procedimiento quirúrgico, en los cuales el tratamiento radical de elección es la RT <sup>[95,96]</sup>. La SBRT se ha convertido en el tratamiento de elección en pacientes con CPNM médicamente inoperables con una pobre función pulmonar (volumen espiratorio forzado en 1 segundo < 40% o <1.2 L, capacidad de difusión de monóxido de carbono < 60% o capacidad vital forzada < 70 %), estados de hipoxia-hipercapnia, hipertensión pulmonar, alto riesgo quirúrgico u otras comorbilidades o que rechazan la cirugía <sup>[97-99]</sup>, presentado una gran mejoría, respecto a la RT conformada (CRT) en cuanto a datos de control local, llegando a un 90-92 %, y de supervivencia a 5 años del 70 %, demostrado en múltiples estudios aleatorizados y logrando resultados similares a los descritos en las diferentes series quirúrgicas <sup>[100-102]</sup>. La SBRT es una técnica de RT externa en la que se administran dosis altas de radiación en pocas sesiones y con gran precisión, a lesiones pulmonares < 5cm, permitiendo proteger los órganos sanos u órganos de riesgo (OAR) que rodean el tumor, ofreciendo un mayor control local y supervivencia. Se utilizan esquemas de hipofraccionamiento que consisten en administrar dosis de radiación de 8 - 20 Gy por fracción en 1 - 10 sesiones, alcanzando de esta manera una dosis biológica equivalente (BED) entre 100 y 120 Gy, mientras que con la CRT con esquemas de normofraccionamiento se administran dosis en 60 - 70 Gy en 30 - 35 sesiones donde apenas se logran una BED 70 -80 Gy <sup>[103]</sup>

Existen diferentes esquemas de hipofraccionamiento publicados en la literatura

derivados de estudios prospectivos en los que la localización del tumor ya sea central, ultracentral o periférico, el tamaño, las comorbilidades o los OAR, son los factores que determinan las dosis de tratamiento y son llamados esquemas de tratamiento riesgo-adaptado (Tabla 3) [6,104–107].

**Tabla 3. SBRT- Esquema de fraccionamiento riesgo-adaptado.**

| <b>Localización del Tumor</b>                         | <b>Dosis Total (Gy)</b> | <b>Número Fracciones</b> | <b>Dosis por Fracción (Gy)</b>        |
|---|-------------------------|--------------------------|---------------------------------------|
| Periférico <2cm                                       | 54 - 60Gy               | 3 fracciones             | 18 – 20 Gy                            |
| Periférico  | 50 - 60 Gy              | 5 fracciones             | 10 - 12Gy                             |
| Central   | 60 Gy                   | 8 fracciones             | 7.5 Gy                                |
| Central   | 70 Gy                   | 10 fracciones            | 7 Gy                                  |
| Intermedio/<br>Comorbilidades                         | 45-55 Gy                | 5-8 fracciones           | Dependiendo del<br>esquema            |
| Tumores centrales<br>cerca de estructuras<br>críticas | 30-50 Gy                | 5-10 fracciones          | 6-10 Gy (ajustado<br>según ubicación) |

Adaptado de Lagerwaard et al [104].

## 6.2. Estadios localmente avanzados

En el momento del diagnóstico, aproximadamente, el 35-40% de los pacientes con CPNM presentan enfermedad localmente avanzada (estadios IIB–III), para los cuales el tratamiento estándar es la CRT. La dosis total recomendada de RT es de 60 - 66 Gy en normofraccionamiento de 2 Gy/día en 30-33 fracciones, asociada a quimioterapia concomitante. Aumentar la dosis de radiación en combinación con quimioterapia no ha demostrado mejoría en los resultados, pero sí aumento en las tasas de toxicidad [108]. La quimiorradioterapia concomitante ha demostrado un aumento de la SG frente a la quimiorradioterapia secuencial en un 5.7% a los 3 años y un 4.5% a los 5 años, con una media de supervivencia de 22-25 meses y una SG a 5 años del 20% [109]. Recientemente, los datos del ensayo fase III PACIFIC mostraron que la terapia de consolidación con durvalumab en pacientes con PD-L1 > 1% y sin progresión después de la quimiorradioterapia concomitante, mejoraba las tasas de supervivencia y control local obtenidas hasta el momento, llegando a una SG a 1 año del 86% y del 50% a 5 años, y una supervivencia libre de progresión (SLP) a 1 año del 62% y del 36% a 5 años [110,111]. Por otra parte, diferentes estudios, incluidos el SAKK Lung Cancer Project Group Trial y el Lung Intergroup Trial 0139 han evaluado el papel de la quimiorradioterapia neoadyuvante seguido de cirugía, encontrando que este enfoque mejora la SLP en pacientes que reciben tratamiento trimodal, pero sin ningún beneficio en cuanto a SG



se refiere. Esta falta de beneficio en el brazo quirúrgico se relaciona con mayores tasas de mortalidad temprana, especialmente en pacientes sometidos a neumonectomía derecha. Un subanálisis posterior encontró un aumento significativo de la supervivencia en pacientes tratados con quimiorradioterapia de inducción seguida de lobectomía, frente a aquellos que recibieron quimiorradioterapia concomitante radical [112,113]. En general, se ha demostrado que la quimiorradioterapia de inducción juega un papel importante en cuanto al control local de la enfermedad, logrando una mayor reducción en la re-estadificación a nivel del tumor primario y del mediastino y con mayores tasas de resecciones completas, comparada con la quimioterapia sola, pero sin beneficio en la SG, excepto para los tumores del surco superior potencialmente resecables, para los cuales el tratamiento de elección es la quimiorradioterapia concomitante a dosis de 45-54 Gy a 1.8-2 Gy/día [114-116].

En cuanto a la RT postoperatoria (PORT) su papel fue evaluado recientemente en dos ensayos fase III. Por una parte, el estudio Lung-ART en el que los pacientes con afectación N2 fueron aleatorizados a recibir PORT a una dosis de 54 Gy versus observación después de la resección completa del tumor. Los resultados iniciales mostraron que la PORT no mostraba beneficio a nivel de SLP ni SG, aunque se observaron menos recaídas torácicas en el grupo tratado con PORT (25% frente al 46.1%). La falta de mejora en los resultados de supervivencia se relaciona con mayores tasas de toxicidad cardiopulmonar  $\geq$  grado 3 (10.8% frente al 4.9%). En este sentido, cabe destacar que el 89% de los pacientes fueron tratados con CRT y solo el 11% con RT de intensidad modulada (IMRT) [117]. El segundo ensayo fase III recientemente publicado incluyó 394 pacientes con enfermedad estadio IIIA-pN2 aleatorizados a recibir PORT a dosis de 50 Gy versus observación después de la resección completa y cuatro ciclos de quimioterapia adyuvante. La mayoría de los pacientes (89.3%) fueron tratados con IMRT. En el análisis por intención de tratar, PORT no mejoró la SLP. Los resultados de un análisis posterior estratificado según el número de ganglios resecados ( $\leq$  20 frente a  $>$  20) y los ganglios afectados (1-3) frente a  $\geq$  4 revelaron una mejora significativa en la SLP. En este estudio el PORT no tuvo impacto en la SG. Las tasas de toxicidad fueron más bajas que las observadas en el ensayo Lung-ART, probablemente debido a la alta proporción de pacientes tratados con IMRT, límites de dosis más estrictos para los OAR y la exclusión de los ganglios mediastínicos contralaterales del volumen de tratamiento [118]. A pesar de la mejora significativa del control local mostrada en ambos ensayos, esto no condujo a mejores resultados de supervivencia. Por esta razón, PORT no se recomienda actualmente como parte del tratamiento estándar en pacientes con

afectación N2 y resección R0. Sin embargo, los pacientes en estadio IIIA-N2 son un grupo heterogéneo y algunos de estos pacientes podrían beneficiarse de PORT, como sugieren los datos de estudios anteriores y los hallazgos recientemente publicados del ensayo Lung-ART (ESMO 2021), que muestran que una proporción de afectación nodal mediastínica (ganglios afectados / ganglios evaluados)  $\geq 25\%$  es un factor pronóstico para la SLP, sugiriendo que la extensión de la afectación ganglionar podría ayudar a seleccionar a los pacientes que pueden beneficiarse de PORT. No obstante, se necesitan más estudios para determinar mejor, a través de un análisis de las características clínicas y moleculares, qué pacientes presentan un mayor beneficio de PORT. Según los hallazgos patológicos postoperatorios, las dosis recomendadas de PORT son las siguientes: en resecciones R0 una dosis total de 50 - 54 Gy a 1.8-2 Gy/fracción; en presencia de márgenes afectados o enfermedad microscópica, una dosis total de 54 - 60 Gy; y en el caso de enfermedad residual macroscópica dosis totales  $\geq 60$  Gy <sup>[119]</sup>.

En cuanto al papel del fraccionamiento acelerado e hiperfraccionamiento, tres ensayos fase III compararon diferentes esquemas hiperfraccionados con CRT, demostrando el beneficio en cuanto SG de la RT hiperfraccionada cuando se administra sola o después de quimioterapia de inducción en los pacientes con CPNM no metastásico. Como era de esperar, hubo un aumento en la toxicidad esofágica aguda <sup>[120]</sup>.

Por otra parte, algunos pacientes, debido a la edad avanzada, la presencia de comorbilidades y/o las dificultades relacionadas con los desplazamientos, serían candidatos recibir un esquema de hipofraccionamiento moderado, administrando dosis entre 2.75 - 4 Gy por fracción <sup>[121-123]</sup>. En el supuesto de pacientes que, por edad, comorbilidades u otro motivo no pueden tolerar la quimiorradioterapia concomitante, se recomienda realizar un esquema secuencial o RT exclusiva. En estos casos también se pueden considerar esquemas de hipofraccionamiento <sup>[124]</sup>.

### 6.3. Estadios avanzados - metastásicos

Aproximadamente, el 60% de los pacientes con CPNM son diagnosticados en estadios avanzados o estadios IV <sup>[125]</sup>. De estos, el 20% son pacientes oligometastásicos, detectados gracias a la implementación del PET-FDG en el diagnóstico de CP <sup>[126]</sup>. La oligometástasis puede presentarse en diferentes escenarios: 1) Oligometástasis "de novo", es decir en pacientes con 3-5 lesiones al diagnóstico (sincrónica) o posterior al tratamiento del tumor primario (metacrónica). 2) Oligometástasis inducida en paciente polimetastásico que presenta 3-5 localizaciones persistentes después del tratamiento

sistémico. 3) Oligopersistencia, enfermedad persistente y estable con < 5 lesiones después del tratamiento sistémico. 4) Oligoprogresión en el caso de progresión en 3-5 localizaciones después del tratamiento sistémico. 5) Oligorecurrencia o enfermedad recurrente en 3-5 localizaciones en pacientes que no reciben tratamiento activo [127].

En este grupo de pacientes se ha demostrado que el tratamiento local puede aumentar la SG, especialmente en aquellos cuya enfermedad permanece estable o responde a la terapia sistémica. El impacto de la SBRT en la SG fue mayor en los pacientes con CPNM oligometastásico que no progresaron después de la terapia sistémica de primera línea. La terapia de consolidación local prolongó la SLP y la SG en comparación con la terapia de mantenimiento u observación [128-130]. Actualmente, están en marcha diferentes estudios que buscan evaluar el papel de la RT local con SBRT asociada a inmunoterapia y su combinación en estadios localmente avanzados [131,132]. Finalmente resaltar el papel de la RT con intención paliativa en la enfermedad metastásica, cuyo objetivo principal es aliviar los síntomas y mejorar la calidad de vida del paciente, nos referimos a la RT antiálgica, hemostática, descompresiva y de consolidación a nivel torácico y otras localizaciones [133].

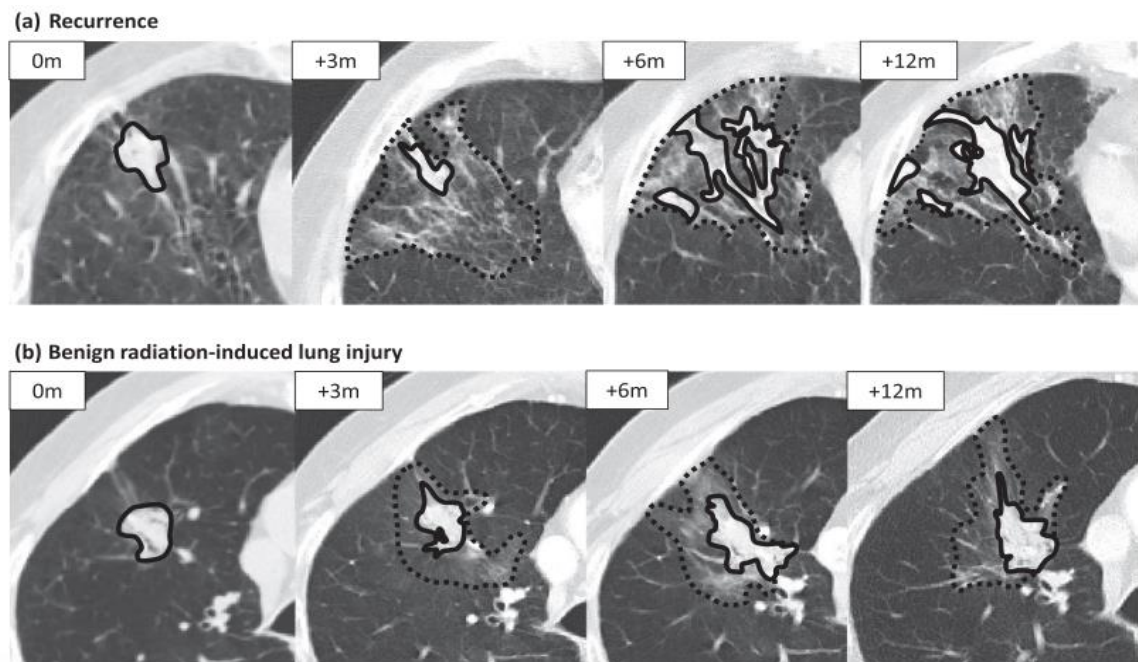
#### 6.4. Valoración de respuesta y seguimiento

Aproximadamente, el 40% de los pacientes con CP presentarán una recurrencia a distancia de 3 a 5 años después de la finalización del tratamiento. A los 3 años, aproximadamente el 30% de los pacientes desarrollarán una recurrencia locorregional potencialmente curable [109]. Para el seguimiento después de CRT - IMRT ó Arco terapia volumétrica de intensidad modulada (VMAT) en el CPNM localmente avanzado, la ESMO recomienda realizar un TC de tórax cada 6 meses durante 2 años y posteriormente realizar TC a los 12 y 24 meses, con seguimiento anual en el supuesto de pacientes irreseables. En pacientes rescatables recomienda realizar un TC con contraste endovenoso cada 3-6 meses los 3 primeros años, después cada 6 meses el cuarto y quinto año, y posteriormente un LDCT anual [119].

En el caso de la SBRT, la mayoría de las recurrencias ocurren a los 6 meses después de finalizar el tratamiento y aproximadamente el 12% de los pacientes desarrollan una recurrencia locorregional a los 4 años [134]. Es por esto que la ESTRO recomienda realizar el primer TC dentro de los 3 primeros meses después de finalizar la SBRT, seguido de un TC cada 3 meses el primer año, y posteriormente cada 3-6 meses hasta

completar los 5 años <sup>[135]</sup>. Se recurre al uso de PET-FDG y/o biopsia ante una alta sospecha de recurrencia.

Los cambios pulmonares a nivel de la TC, inducidos por la RT después de la SBRT difieren de aquellos observados con la CRT, todo esto relacionado con las altas dosis que la SBRT deposita en el tumor, creando gradientes de dosis pronunciados alrededor del volumen blanco, con un volumen del pulmón recibiendo dosis bajas/intermedias entre 5 y 40 Gy. En algunos casos, los cambios en la TC después de la SBRT pueden presentarse como patrones similares a masas que imitan la apariencia de una enfermedad recurrente. Estos cambios son comunes y las recurrencias dentro del campo de tratamiento son poco comunes, distinguir entre estas dos entidades es de suma importancia en pacientes que pueden ser candidatos para la terapia de rescate, incluida la resección quirúrgica <sup>[136–138]</sup>.



**Figura 10. Cambios post- SBRT (fibrosis benigna versus recurrencia).**

Extraído de Mattonen et al <sup>[137]</sup>. Licencia de John Wiley and Sons.

## 6.5. Valoración de la toxicidad de la RT

La RT es un tratamiento locorregional, las propiedades anatómicas de los órganos y tejidos sanos irradiados influyen en la patogénesis y en la presentación clínica de los efectos secundarios o la toxicidad. Los órganos pueden considerarse como unidades funcionales dispuestas en paralelo, como el hígado y el pulmón o en serie, como el esófago o los nervios <sup>[139]</sup>.

Los efectos secundarios de la RT se categorizan como agudos, subagudos o tardíos. Los efectos agudos comienzan dentro de 1 o 2 semanas después de iniciar la RT y a menudo son inflamatorios o reflejan la despoblación de células epiteliales de rápido crecimiento. Los efectos tardíos muestran fibrosis, lesión vascular u otros cambios graduales en tejidos de división lenta, con un daño que posiblemente se manifieste años después del tratamiento. El daño residual del ADN rara vez puede causar carcinogénesis tardía <sup>[140]</sup>. Entre el 10 y el 30% de todos los pacientes con CP que reciben RT torácica desarrollan algún tipo de toxicidad local o sistémica asociada al tratamiento, como puede ser la neumonitis inducida por radiación, una toxicidad subaguda que tiene un alto riesgo de desarrollar fibrosis pulmonar inducida como toxicidad tardía <sup>[141]</sup>. Otros efectos secundarios del tratamiento del CP con RT incluyen, esofagitis, epitelitis, dolor en la pared torácica, fracturas costales, estenosis bronquial, derrame pleural, plexopatía braquial, astenia y adinamia entre otros <sup>[142]</sup>.

La toxicidad pulmonar sigue siendo un factor crucial que limita la dosis, y los ensayos clínicos de escalada de dosis con CRT se han visto limitados por la toxicidad pulmonar, aunque las nuevas técnicas de RT, como la IMRT y la VMAT permiten el tratamiento de volúmenes tumorales relativamente grandes, disminuyendo la exposición a la radiación de los tejidos sanos especialmente el pulmonar, esofágico y cardíaco<sup>[108]</sup>. Por otra parte, la SBRT permite la administración de radiación a dosis altas con gran precisión sobre volúmenes más pequeños, asociados con diferentes perfiles de riesgo de neumonitis o fibrosis relacionadas con las dosis administradas y los volúmenes a tratar, esquemas de tratamiento riesgo-adaptado (Tabla 3) <sup>[143]</sup>. La esofagitis inducida por radiación es otra toxicidad aguda local muy común en el tratamiento del CP. La quimioterapia concurrente, tumores centrales y dosis altas de RT se asocian con un mayor riesgo de esofagitis. Los síntomas leves de esofagitis aguda suelen ser autolimitados, y las opciones de manejo de apoyo incluyen analgésicos, modificación de la dieta y protectores de la mucosa. La estenosis esofágica es la secuela tardía más común de la irradiación esofágica y puede tratarse con dilatación endoscópica <sup>[144,145]</sup>.

El diagnóstico de la toxicidad secundaria a la RT como la neumonitis radica, la fibrosis pulmonar, la esofagitis, la epitelitis, entre otros, se basa en la presentación clínica y pueden estar respaldados por hallazgos radiológicos. Se utilizan varias escalas de graduación. En la práctica clínica, los criterios del Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) y los Criterios Terminológicos Comunes para Eventos Adversos (CTCAE) son los más ampliamente utilizados (Tablas 4-6) <sup>[146,147]</sup>.

**Tabla 4. Clasificación de la toxicidad aguda pulmonar según la RTOG**

| <b>Grado</b> | <b>Descripción</b>                              | <b>Síntomas y Signos</b>   |
|--------------|---|--|
| Grado 1      | Leve, no se necesita intervención.              | Tos leve, cambios mínimos en la función pulmonar.                                |
| Grado 2      | Moderado, intervención médica mínima.           | Tos persistente que requiere medicamentos, disnea al esfuerzo.                   |
| Grado 3      | Grave, limitación de la actividad diaria.       | Tos intensa que interfiere con la vida diaria, disnea en reposo, uso de oxígeno. |
| Grado 4      | Peligro de vida, requiere intervención urgente. | Insuficiencia respiratoria grave, necesidad de ventilación asistida.             |
| Grado 5      | Muerte relacionada con la toxicidad pulmonar.   | Muerte atribuida a la toxicidad pulmonar aguda por radioterapia.                 |

**Tabla 5. Clasificación de la toxicidad crónica pulmonar según la RTOG**

| <b>Grado</b> | <b>Descripción</b>                              | <b>Síntomas y Signos</b>  |
|--------------|---|---|
| Grado 1      | Leve, sin o con síntomas mínimos.               | Tos seca leve, infiltrados mínimos en radiografía o TC de tórax                               |
| Grado 2      | Moderado, requiere tratamiento mínimo.          | Tos persistente, disnea con esfuerzo moderado, fibrosis moderada en radiografía o TC de tórax |
| Grado 3      | Grave, interfiere con la vida diaria.           | Disnea en reposo o con poca actividad, fibrosis extensa, necesita oxígeno.                    |
| Grado 4      | Amenaza de vida, requiere intervención urgente. | Insuficiencia respiratoria grave, cor pulmonale, dependencia de oxígeno.                      |
| Grado 5      | Muerte relacionada con la toxicidad pulmonar.   | Muerte debido a toxicidad crónica pulmonar por radioterapia.                                  |

**Tabla 6. Clasificación de la toxicidad esofágica según RTOG**

| <b>Grado</b> | <b>Descripción</b> | <b>Síntomas y Signos</b>  |
|--------------|--------------------|---|
| Grado 1      | Leve.              | Disfagia leve u odinofagia que no requiere intervención médica significativa. Puede haber cambios mínimos en la dieta.  |
| Grado 2      | Moderada.          | Disfagia u odinofagia que requiere intervención médica, como medicación o modificación significativa de la dieta.   |
| Grado 3      | Grave.             | Disfagia u odinofagia que limita la ingesta de alimentos sólidos a solo líquidos o nutrición enteral/parenteral. Necesidad de intervención médica agresiva o hospitalización. |
| Grado 4      | Peligro de vida.   | Complicaciones graves como perforación esofágica, fístula o úlcera sangrante que requiere intervención quirúrgica o cuidados intensivos.                                      |
| Grado 5      | Muerte.            | Muerte atribuida a toxicidad esofágica por radioterapia.  |

Tablas 4-6 adaptadas de Cox et al<sup>[146]</sup>.

## 7. RADIOBIOLOGÍA

### 7.1. Ecuación lineal cuadrática y fraccionamientos

Aproximadamente, el 60% de los pacientes diagnosticados de cáncer recibirán RT exclusiva o asociada a algún otro tratamiento (cirugía, quimioterapia o inmunoterapia) [148]. Es por esto que es importante conocer los efectos de la radiación en las células sanas y tumorales. La radiobiología es la ciencia que estudia los efectos de las radiaciones ionizantes sobre los organismos vivos. La radiación ejerce su efecto sobre las células tumoral y tejidos sanos. El efecto biológico de la RT se puede medir a través del modelo lineal cuadrático en el cual, el efecto biológico (E) de la RT depende de la dosis de manera lineal y cuadrática:

$$E = n(\alpha d + \beta d^2)$$

donde n es el número de fracciones, d es la dosis por fracción, y  $\alpha$  y  $\beta$  son parámetros que determinan la pendiente inicial y la curva de la supervivencia celular subyacente. A partir de esta ecuación, es posible calcular la BED.

$$BED = nd[1 + d/(\alpha/\beta)]$$

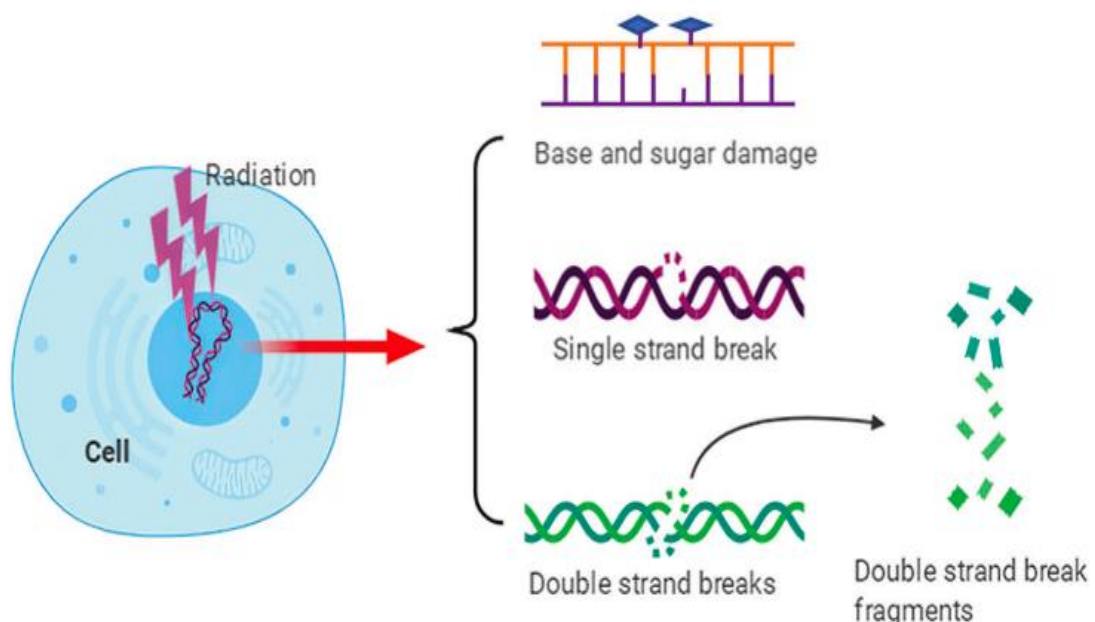
La BED varía según la dosis por fracción, el número de fracciones y las características del tejido que contribuyen a la relación  $\alpha/\beta$ , permitiendo estimar el efecto y la alteración de la repoblación celular tanto en el tumor, como en los tejidos sanos. [149].

En el caso del CP, los tumores localmente avanzados reciben habitualmente una dosis total de 60-66 Gy 2Gy/día en 33 fracciones, este esquema de normofraccionamiento administra una BED de 70-85 Gy, mientras que en los tumores en estadios iniciales el esquema hipofraccionado, como el usado en la SBRT, logra alcanzar una BED > 100 Gy con los que se puede conseguir un control local del 90% en los tumores T1 [5].

### 7.2. Efectos Biológicos de la RT sobre el ADN

La radiación ejerce su efecto sobre el ADN de dos maneras, una como consecuencia de un solo evento ionizante que causa rupturas de la doble cadena en el ADN, causando un daño letal (muerte irreversible de la célula), o como consecuencia de eventos ionizantes separados y subletales (que permiten a la célula autorrepararse en algunas horas, a menos que sufra nuevamente otro evento subletal) para crear un daño letal o muerte celular (Figura 11).

El daño puede ser directo sobre la estructura de la doble hélice del ADN, ocasionando fracturas simples y dobles de la cadena, alteraciones estructurales de las bases, y rupturas de los puentes de hidrógeno. Las fracturas dobles llevan a la fragmentación de la molécula de ADN y dan origen a aberraciones cromosómicas estructurales, responsables de los efectos mutagénicos y oncogénicos de las radiaciones ionizantes. Estas alteraciones activan señales de daño en el ADN que inducen apoptosis, necrosis y senescencia. En el caso de las células neoplásicas, este daño puede alterar la mitosis y la replicación. Por otra parte, el daño indirecto es aquel que genera la radiación por medio de la radiólisis de las moléculas de agua presentes en la célula, u otras moléculas orgánicas también presentes en el medio, generando radicales libres (ROS). Estos ROS interactúan con los extremos libres de las moléculas de ADN impidiendo su reparación, alterando las funciones de la célula y ocasionando su muerte. La cantidad de ROS producidos por la radiación, será proporcional a la dosis total. Los efectos biológicos de la radiación se clasifican en dos categorías: estocásticos y determinísticos. Los llamados estocásticos son aquellos que ocurren de forma aleatoria y cuya probabilidad se incrementa con la dosis. Los efectos determinísticos se producen a altas dosis y generan daños graves <sup>[150,151]</sup>.



**Figura 11. Efectos Biológicos de la RT sobre el ADN.** Rupturas simples o dobles de la cadena de ADN, alteración de bases y azúcares. Extraído de Huang et al <sup>[150]</sup>. Artículo open access. Licencia CC (Creative Commons).

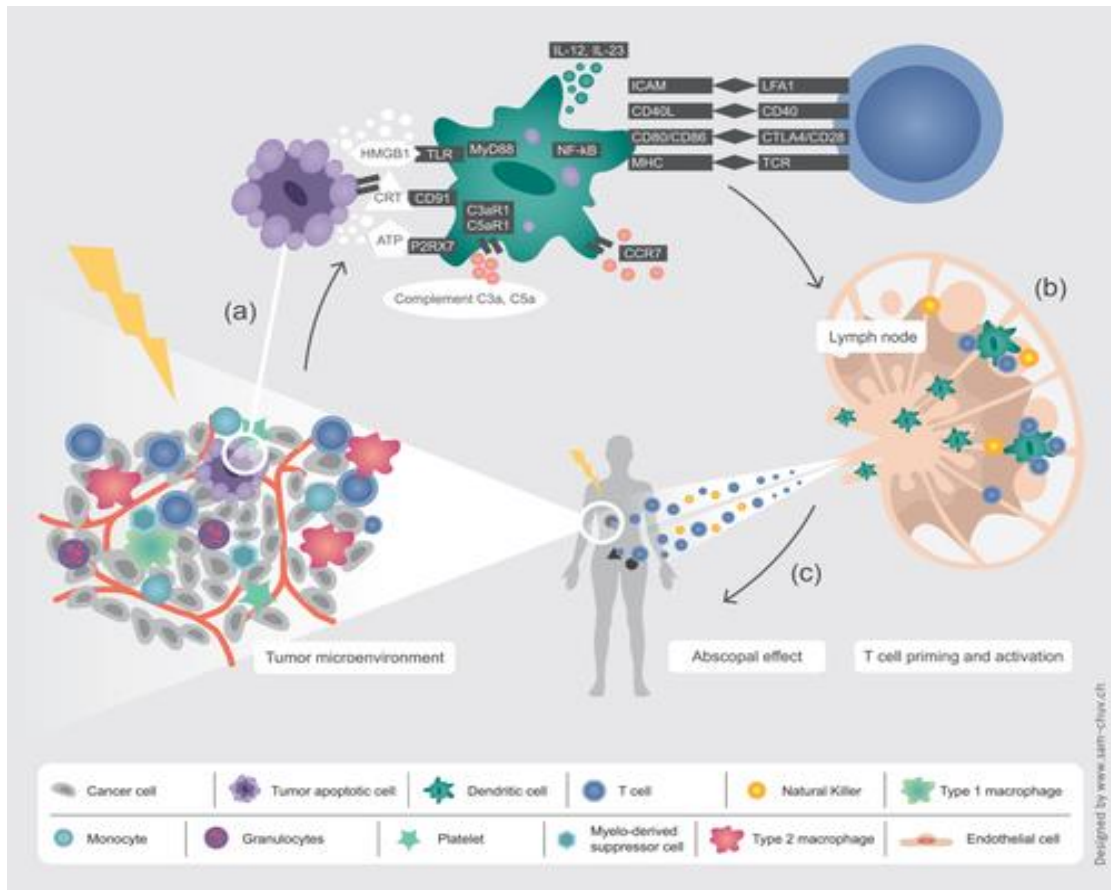


### 7.3. Efectos Biológicos de la RT sobre estructuras intracelulares

La radiación también afecta a las estructuras subcelulares que regulan diversas actividades biológicas en las células tumorales. A nivel de la membrana citoplasmática, la radiación puede alterar la composición de lípidos y proteínas de la membrana, afectando su permeabilidad, integridad y movilidad, activando respuestas inmunológicas y desencadenando la apoptosis. Con relación a las mitocondrias, la radiación puede inducir la liberación de citocromo C mediada por ROS, desencadenando la apoptosis a través de la activación de caspasas. También puede afectar la membrana de los lisosomas con la consiguiente liberación de enzimas hidrolíticas en el citoplasma, llevando a la desintegración celular. De igual manera, se observan daños a nivel del retículo endoplásmico y de los ribosomas <sup>[152]</sup>.

### 7.4. Microambiente Tumoral y Sistema Inmunitario

La RT también puede cambiar el fenotipo celular, la inmunogenicidad y el TME, alterando globalmente el comportamiento biológico de las células tumorales. La RT induce respuestas inmunitarias, provocando la liberación de proteínas de choque térmico y otros mediadores que pueden aumentar la inmunogenicidad de las células tumorales. Este proceso incluye la sobreexpresión del complejo mayor de histocompatibilidad I, la activación de células dendríticas y la presentación de antígenos tumorales al sistema inmunitario, modificando el TME, haciéndolo más susceptible a la acción de las células inmunitarias y permitiendo una destrucción más efectiva de las células tumorales (Figura 12). De manera paradójica, la radiación también puede regular las moléculas de señalización de la membrana plasmática y los mensajeros secundarios en las células neoplásicas. Por ejemplo, puede activar el EGFR y las vías MAPK y PI3K, o inducir a la expresión de metaloproteinasas y factores de crecimiento, promoviendo el crecimiento y la invasión de las células tumorales, aumentando su capacidad metastásica. Es decir, que la RT no solo daña el ADN para inhibir la proliferación tumoral, sino que también modifica la expresión de moléculas asociadas con la invasión tumoral y metástasis <sup>[153,154]</sup>.



**Figura 12. Respuesta inmunogénica de la RT.** Activación de células dendríticas, presentación de antígenos tumorales, activación de linfocitos. Cambios en el TME. Extraído de Herrera et al [154]. Licencia de John Wiley and Sons

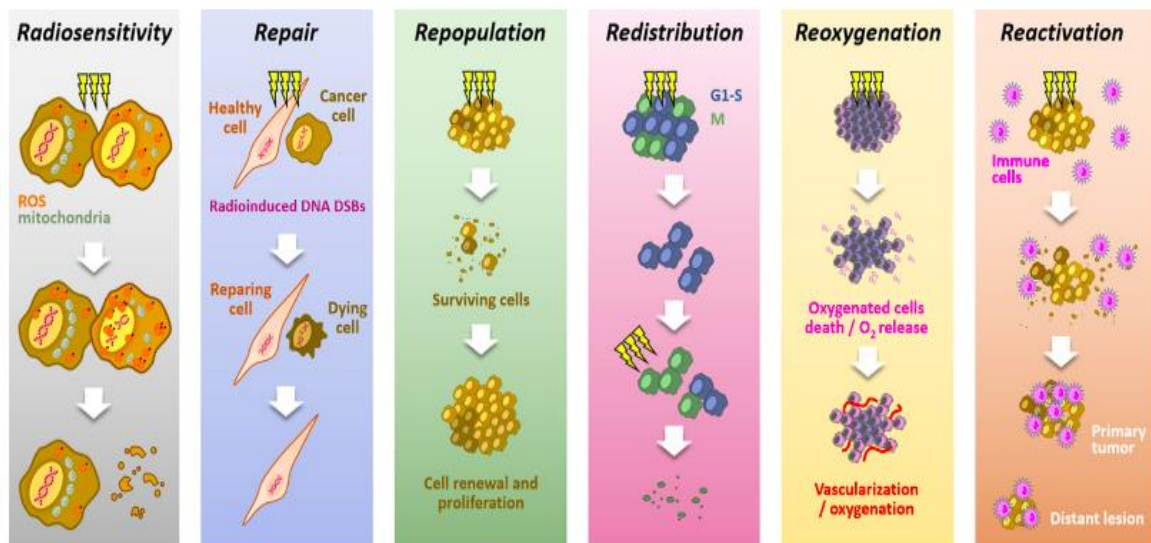
### 7.5. Las 6 Rs de la Radioterapia

Los factores biológicos que influyen en el efecto de la RT sobre el tumor y los tejidos sanos se explican mediante el concepto de las 6Rs de la RT que consisten en:

- 1) Radiosensibilidad intrínseca, referida a los efectos letales inherentes a la radiación por parte de las células tumorales y las células sanas.
- 2) Reparación del daño subletal en el ADN inducido por la radiación. Las células sanas generalmente tienen una mayor capacidad de reparación que las células tumorales.
- 3) Repoblación de células tumorales y sanas después de la exposición a la radiación.
- 4) Redistribución de las células tumorales a fases más sensibles del ciclo celular.
- 5) Reoxigenación de las células supervivientes, ya que las células hipóxicas son más resistentes a la RT.
- 6) Reactivación de la respuesta inmune antitumoral (Figura 13) [155].

Diferentes estudios sugieren que el tipo de fraccionamiento tiene un impacto real sobre la regulación del sistema inmune, es por esto que la reactivación de la respuesta

antitumoral adquiere mayor importancia ya que puede regular diferentes tipos de respuestas [156].



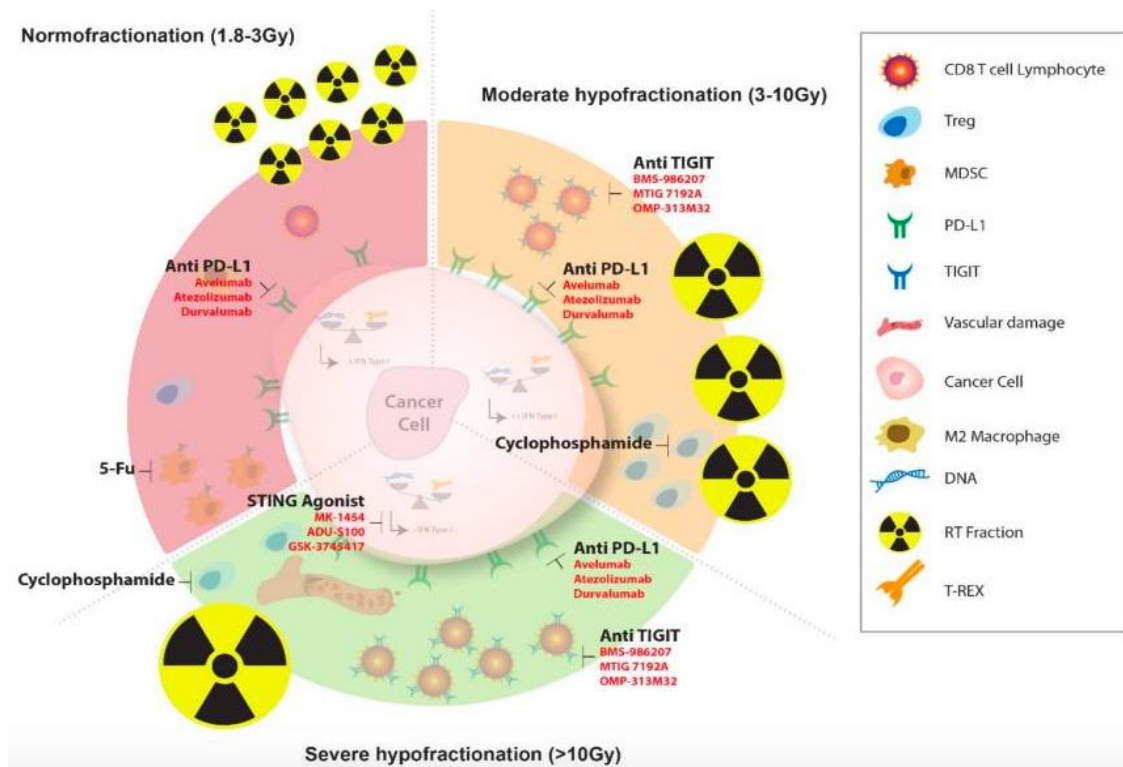
**Figura 13. Las 6 Rs de la Radioterapia.** Radiosensibilidad, reparación, repoblación, redistribución, reoxigenación y reactivación. Extraído de Rakotomalala et al. [155]. Artículo open access. Licencia CC (Creative Commons).

## 7.6. Respuesta inmunitaria y dosis

La hormesis es un tipo de respuesta inmunitaria relacionada con la administración de radiación a dosis bajas. Estas dosis pueden estimular la proliferación de células inmunitarias como células natural-killer, macrófagos, células dendríticas y linfocitos T, también pueden promover la liberación de citocinas, y mejorar la interacción entre las células inmunitarias innatas y adaptativas. Un ejemplo es su acción sobre los Tregs, que tienen la habilidad de producir inmunosupresión para controlar enfermedades autoinmunes, como la artritis o retrasar la progresión del cáncer [157,158].

Por otra parte, se encuentra el efecto bystander, se refiere al efecto causado sobre células no irradiadas pero próximas al campo de tratamiento después de administrar dosis altas de RT, ocasionando la muerte de las células fuera del campo de irradiación, probablemente por emisión de alguna señal o toxina al TME por parte de las células irradiadas al morir [159]. Por último, se destaca el efecto abscopal, descrito por Mole en 1953, que describe un efecto sistémico de la radiación, es decir un efecto a distancia del campo de tratamiento [160].

Diferentes publicaciones han demostrado una relación entre el efecto abscopal y la administración de tratamientos hipofraccionados, particularmente con la SBRT, que produce mayor actividad inmunogénica y muerte celular (Figura 14).



**Figura 14. Respuesta inmunitaria según el fraccionamiento de RT.**

Extraído de Boustani et al [156]. Artículo open access. Licencia CC (Creative Commons).

La liberación de ADN de doble cadena puede activar la vía de señalización del interferón y reclutar células dendríticas que pueden captar antígenos tumorales, migrar a los ganglios linfáticos y presentar antígenos a las células T. Estas células T pueden migrar al tumor, infiltrar el TME y destruir células tumorales, también pueden impulsar la polarización de macrófagos proinflamatorios e incrementar la expresión de PD-L1 en el tumor [161–164]. Algunos estudios han demostrado el aumento de linfocitos T CD4+ y CD8+ de memoria a nivel periférico, induciendo una respuesta antitumoral a distancia, en pacientes tratados con SBRT [165,166]. Estos hallazgos han abierto el camino al desarrollo de varias estrategias terapéuticas destinadas a la re-activación de las respuestas inmunitarias antitumorales en pacientes con CPNM. En particular, la inhibición de puntos de control inmunitarios de CTLA4 y PD1/PD-L1, potenciando la respuesta inmunitaria y, por lo tanto, llevando a un reconocimiento inmune y a la destrucción de células tumorales [45,154].

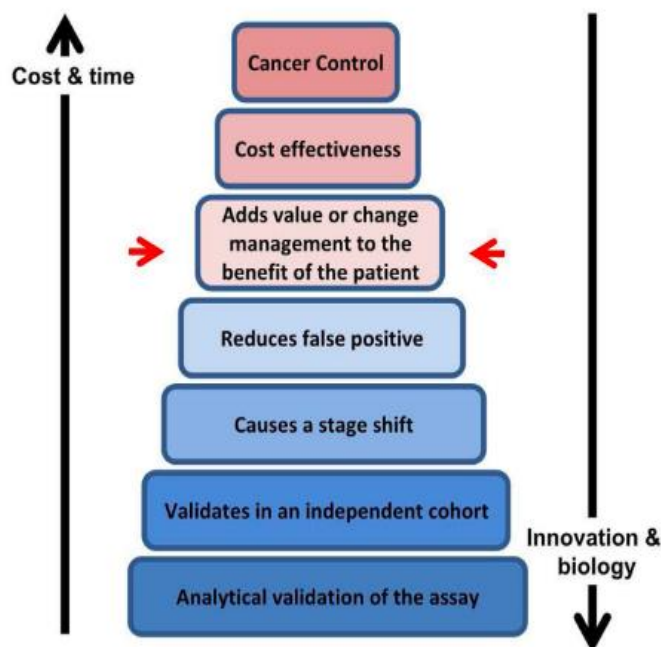
La combinación de RT e inmunoterapia ofrece una nueva y prometedora estrategia para mejorar los resultados en el tratamiento del cáncer, abriendo nuevas posibilidades para nuevos y mejores tratamientos. Un ejemplo es el estudio fase I KEYNOTE 001 en el que se observó que pacientes con CPNM avanzado tratados con RT y seguido de pembrolizumab presentaban mejor SLP y SG que aquellos que no recibieron RT [167].

## 8. BIOMARCADORES Y ÓMICAS EN CP

### 8.1. Biomarcadores en CP

The National Institute of Health define biomarcador como una característica que se puede medir y evaluar objetivamente, siendo éste un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o de respuesta a una intervención terapéutica <sup>[168]</sup>.

El biomarcador ideal no solo debe tener un papel en la detección y diagnóstico inicial de la enfermedad, sino también en el seguimiento, evaluación y pronóstico de la misma. Además, debe ser fácil de obtener y analizar, mínimamente invasivo, económico, preciso y altamente informativo, actuando como potencial indicador predictivo y pronóstico (Figura 15). Uno de los mayores desafíos en la búsqueda de biomarcadores es la validación clínica, por ejemplo, la sensibilidad y la especificidad a menudo son inestables frente a múltiples variables como la edad o el estadio de la enfermedad. Los valores predictivos positivos y negativos, dependen de la prevalencia de la enfermedad. Las curvas ROC (del inglés Receiver Operating Characteristic) que representan las tasas de verdaderos positivos frente a falsos positivos son útiles, pero complican la toma de decisiones debido a la necesidad de valores de corte dicotómicos <sup>[169]</sup>.



**Figura 15. Criterios para el uso clínico de biomarcadores.**  
Extraído de Seijo et al <sup>[14]</sup>. Artículo open acces. Licencia de Elsevier

En el CP se han estudiado algunos biomarcadores obtenidos a partir de muestras de sangre (suero o plasma), tejido bronquial y pulmonar, esputo o incluso del aliento.

Actualmente, no existe un biomarcador clínico disponible para la detección temprana o cribado del CP. A diferencia de otros tumores como el adenocarcinoma de páncreas, el cáncer de ovario o cáncer de mama, en los cuales marcadores serológicos como CA19.9, CA125, CA15.3 o el antígeno carcinoembrionario (CEA) forman parte del cribado, en el CP tienen escaso valor pronóstico. El CEA es uno de los marcadores tumorales más estudiados en el CP y aunque en algunos estudios se ha relacionado con un peor pronóstico y tasas de recurrencias más elevadas, presenta limitaciones para seleccionar o diferenciar pacientes con CP de pacientes con patologías pulmonares no tumorales. Es por esto, que el uso de marcadores serológicos no se ha aplicado en la práctica clínica diaria, optando por biomarcadores emergentes como autoanticuerpos, proteínas, patrones de metilación del ADN, miARN, células tumorales circulantes, ADN circulante y varios metabolitos <sup>[170]</sup>. En el caso de miARN y la biopsia líquida no ha demostrado su papel en la detección temprana, pero sí como un indicador de recaída. En algunos ensayos se ha asociado el uso conjunto de miARN y de LDTC para reducir la tasa de falsos positivos <sup>[171]</sup>. Respecto a la detección de ADN circulante, se ha demostrado una mayor sensibilidad al detectar estadios avanzados, pero muy baja en estadios iniciales. En algunos estudios se ha integrado el análisis de la metilación del ADN con las imágenes de TC para mejorar la caracterización del nódulo pulmonar solitario <sup>[14]</sup>. Por otra parte, se ha evaluado el papel de los biomarcadores histológicos como la expresión de PD-L1, EGFR, ALK y ROS1, pero su efectividad puede verse afectada por factores como la respuesta al tratamiento previo y las comorbilidades <sup>[38]</sup>, aunque tienen un papel importante en el tratamiento y pronóstico del CPNM avanzado.

## 8.2. Ómicas en el CP

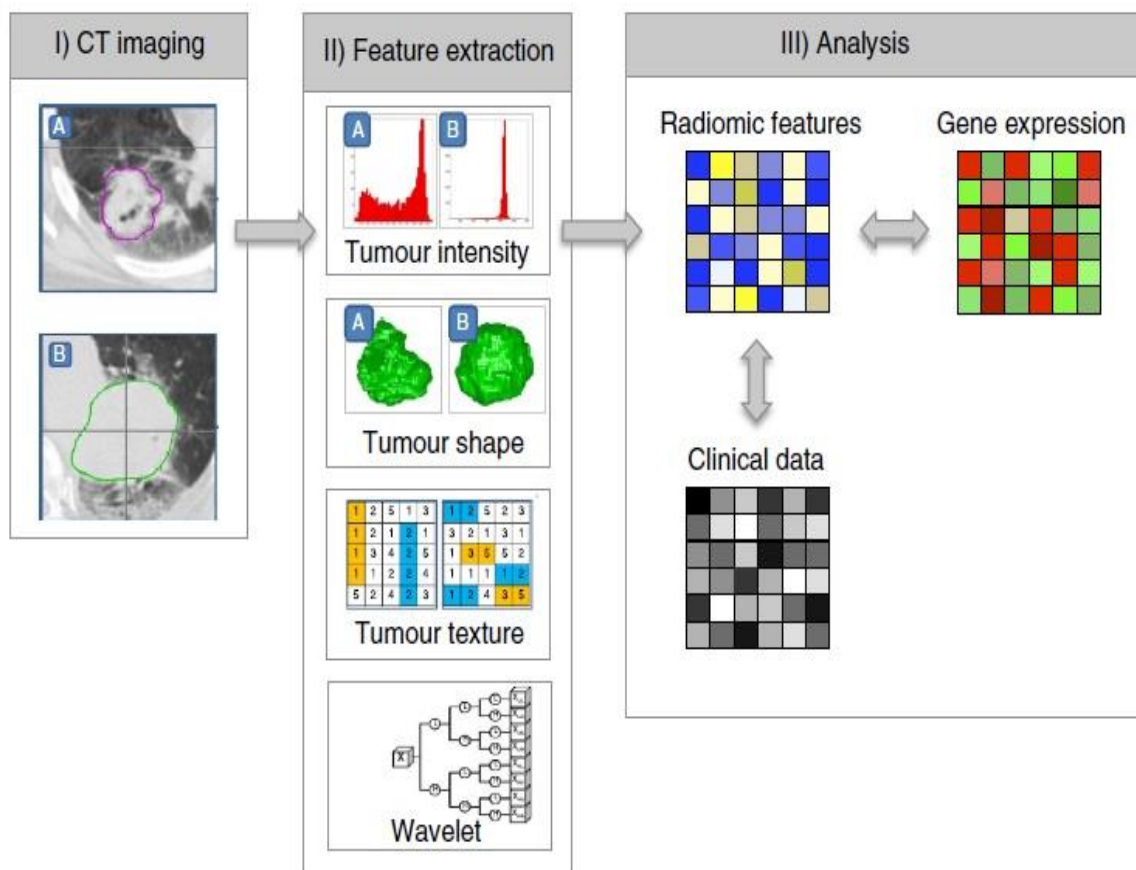
Actualmente, se apuesta por tecnologías de alto rendimiento, como la secuenciación masiva y el análisis de proteomas completos, para identificar firmas moleculares complejas en lugar de depender de un solo marcador. Esto ha dado lugar al surgimiento de las ciencias ómicas, que tienen como función identificar, medir y analizar de forma simultánea una enorme cantidad de biomoléculas, para que puedan ser validadas como biomarcadores en la detección de enfermedades y predecir la probabilidad de respuesta a tratamientos específicos y trasladar su uso a la práctica clínica <sup>[172]</sup>.

Dentro de estas ómicas se encuentran la genómica, la transcriptómica, la proteómica, la lipidómica, la epigenómica, la metabolómica y la radiómica, entre otras.

La genómica se enfoca en la estructura, función, evolución y mapeo de los genomas. A través de métodos de secuenciación masiva, como la secuenciación de nueva generación (NGS) que analiza miles de secuencias de ADN para identificar alteraciones genéticas que pueden contribuir al desarrollo y progresión del CP [14,38]. Por otra parte, la epigenómica estudia los cambios en la expresión génica que no involucran alteraciones en la secuencia de ADN, como la metilación del ADN o modificaciones de las histonas. La transcriptómica, analiza todos los ARN transcritos a partir del ADN en un órgano, tejido o célula. Esto permite interpretar los elementos funcionales del genoma y revelar los perfiles de expresión génica global asociados con la enfermedad [173,174]. En el caso de la proteómica, el análisis se centra en el proteoma, es decir en todas las proteínas expresadas en una célula en un momento dado y que representa el resultado final de la expresión entre el genoma y el transcriptoma. La proteómica proporciona información directa sobre las funciones biológicas y el comportamiento celular al analizar las proteínas, como es el caso de proteínas o citoquinas relacionadas con el sistema inmune y progresión en el CPNM [175-177]. Por su parte, la lipidómica evalúa cuantitativamente cientos de especies lipídicas a la vez, para establecer un perfil lipídico. La alteración del metabolismo lipídico se relaciona con el inicio y progresión de diferentes enfermedades, como la diabetes, la enfermedad de Alzheimer o el cáncer. Algunos estudios relacionan marcadores lipídicos con detección de CPNM en estadios iniciales [178-181].

Para finalizar, la radiómica que extrae y analiza características cuantitativas de imágenes médicas, como TC, RM y PET, utilizando algoritmos avanzados de inteligencia artificial y deep learning. Estas características, que incluyen parámetros de textura, forma, e intensidad, pueden revelar patrones no visibles a simple vista y proporcionar información valiosa sobre la biología del tumor y su microambiente. La radiómica tiene el potencial de mejorar el diagnóstico, el pronóstico y la personalización del tratamiento en pacientes con CP [182-185]. La integración mediante la inteligencia artificial de los datos radiómicos con la información obtenida por las ómicas, proporciona una visión integral de la biología del tumor y su microambiente, mejorando significativamente el diagnóstico, el pronóstico y la personalización de los tratamientos (Figura 16) [14,173,183,186].



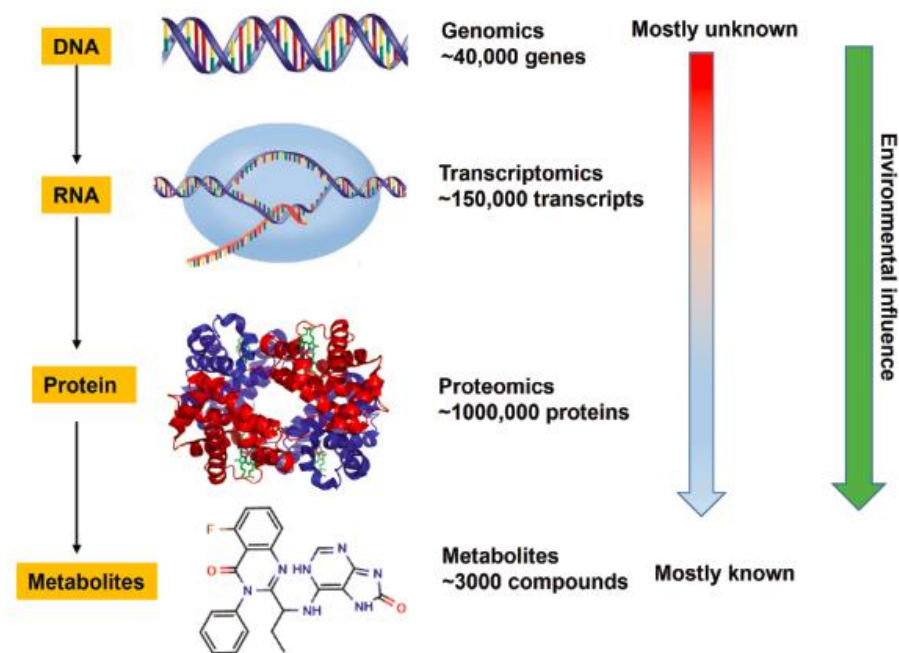


**Figura 16. Radiómica en CP.** Segmentación de imágenes, extracción de características (forma y textura), análisis de datos. Extraído de Aerts et al <sup>[184]</sup>. Artículo open access. Licencia CC (Creative Commons).



## 9. METABOLOMICA EN CP

Los metabolitos juegan un papel importante en el mantenimiento de la fisiología normal de las células y los órganos. Son un componente esencial de la traducción de señales, es decir, el producto final de la actividad de los genes y las proteínas. La concentración de estos metabolitos en un momento dado constituye el metaboloma celular, siendo este la huella metabólica representativa del estado de un organismo. El metaboloma está formado por aproximadamente 3000 metabolitos involucrados en unas 70 vías metabólicas, mientras que el genoma está compuesto por más de 40.000 genes y el proteoma por más de 1.000.000 de proteínas, todas involucradas en el metabolismo celular. Esto permite que el análisis del metaboloma sea mucho más simple y ágil. La metabolómica es la ciencia que permite el análisis y la cuantificación integral del metaboloma, proporcionando una visión detallada de los cambios metabólicos en las células sanas o en las células tumorales (Figura 17) [187,188].



**Figura 17. Ómicas en CP.** Extraído de Yu et al [189]  
Artículo open access. Licencia CC (Creative Commons).

Los metabolitos en el CP se encuentran clasificados en 4 categorías según las vías metabólicas involucradas. Un primer grupo lo conforman los metabolitos energéticos como la glucosa y el ácido cítrico. Algunos de ellos relacionados con el CP. Ya se ha explicado el papel de la glucosa en el crecimiento de las células tumorales, mediado por

el aumento de la glicólisis y del TCA, así como el efecto Warburg <sup>[190]</sup>. Por otra parte, las acilcarnitinas están involucradas en la oxidación de los ácidos grasos a nivel de la mitocondria para producir energía, siendo éstas indicadoras del estado funcional de la mitocondria. Niveles bajos de acilcarnitinas se encuentran relacionados con el CPNM <sup>[191]</sup>. El segundo grupo de metabolitos está formado por aminoácidos y precursores de la síntesis de proteínas como treonina, alanina y ácido glutámico <sup>[15]</sup>. Niveles elevados de glutamina y glutamato en pacientes con CP confirman el aumento de glutaminólisis, que se relaciona con la supervivencia y proliferación de las células tumorales <sup>[64]</sup>. Por otra parte, alteraciones en el metabolismo del triptófano se relacionan con desarrollo de CP mediado por el escape del sistema inmune <sup>[62]</sup>. Un tercer grupo está formado por los metabolitos relacionados con la síntesis de la membrana celular como la colina, la carnitina, el glicerol, el ácido láctico y los ácidos grasos. La colina tiene un papel importante a nivel de la síntesis de materiales lipídicos, además interfiere en el proceso de expresión genética y reparación del ADN debido a su capacidad para proveer el grupo metilo para la metilación del ADN. El glicerol es una molécula necesaria para la biosíntesis de los lípidos, y los niveles aumentados en suero se relacionan con el desarrollo de CP. El ácido láctico se encuentra relacionado con la proliferación celular y en consecuencia con el desarrollo de metástasis <sup>[13]</sup>. Y por último, cabe considerar el grupo de los metabolitos derivados del metabolismo del microbioma tanto de las vías respiratorias como a nivel intestinal <sup>[49]</sup>.

Diferentes estudios han demostrado la relación entre las alteraciones metabólicas y el CP, evidenciando su papel como biomarcadores para el diagnóstico temprano del CP. Concretamente, en el trabajo de Mazzone et al. <sup>[12]</sup> se identificaron alteraciones en 10 aminoácidos, 44 lípidos, 12 péptidos, 4 carbohidratos, 5 nucleótidos y 30 xenobióticos y que permitían diferenciar individuos con CP de individuos sanos, asimismo se correlaciona con el estadio clínico.

Los métodos de metabolómica tradicional, como la cromatografía de gases - GS, la espectrometría de masas - MS, la resonancia nuclear - NMR o la cromatografía líquida - LC solo permiten cubrir una parte limitada del metaboloma. Sin embargo, actualmente se dispone de plataformas de metabolómica de nueva generación como, la LC-Q-TOF (del inglés Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-Flight) o la GC-QTOF-MS (del inglés Gas Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry), técnicas avanzadas de espectrometría de masas combinadas con cromatografía de gases o cromatografía líquida y que permiten cubrir la mayoría del metaboloma incluyendo metabolitos polares y no polares. La detección de los metabolitos puede ser una

metabolómica no dirigida (non-targeted metabolomics) utilizada para identificar y cuantificar de manera integral todos los metabolitos presentes en una muestra biológica sin hipótesis previa, o metabolómica dirigida (targeted metabolomics) que se enfoca en medir concentraciones de metabolitos específicos previamente identificados como relevantes en un proceso biológico o patológico particular [189,192,193].

La metabolómica en combinación con las técnicas de aprendizaje automático o machine learning permiten analizar de una forma más rápida y eficiente diferentes perfiles metabolómicos. Además, la incorporación de datos clínicos del paciente permite identificar nuevos biomarcadores, creando modelos predictivos tanto para la detección precoz, como para predecir la supervivencia. Los algoritmos de machine learning como las máquinas de vectores de soporte (SVM del inglés Support Vector Machine) y la regresión ortogonal de mínimos cuadrados parciales (OPLS-DA del inglés Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis) juntamente con herramientas estadísticas y gráficas, como las curvas ROC pueden mostrar la capacidad de un biomarcador para discriminar entre pacientes con y sin cáncer. Un AUC - Área Bajo la Curva (del inglés Area Under the Curve) es una medida para cuantificar el rendimiento de un modelo predictivo. Muchos autores consideran una AUC > 0.80 como un eficiente clasificador [194–196].

Por esta razón, la metabolómica tiene un gran potencial en la identificación de biomarcadores en el CP. Los trabajos de Klupczynska et al., Zhang et al., Miyagi et al. y Ni et al. demostraron que las alteraciones en ciertos aminoácidos detectados por medio de la metabolómica pueden ser útiles, tanto para el cribado y el diagnóstico precoz, como para la detección de estadios avanzados de CP [197–200]. En otros estudios se demostró que la determinación de metabolitos relacionados con el metabolismo del glutamato, como el 2 hidroxiglutarato puede discriminar entre adenocarcinoma y otros tipos histológicos de CPNM [201–203] o incluso algunos pueden ser indicadores de progresión, como es el caso de las alteraciones de los niveles de prolina, entre otros [9,204–207].

# HIPÓTESIS



## **HIPÓTESIS**

El CP es el cáncer más frecuente a nivel mundial y la principal causa de muerte por esta enfermedad. Actualmente, en la práctica clínica asistencial no existe un biomarcador plasmático disponible para la detección precoz del CP ni para la valoración de la respuesta a los tratamientos oncológicos.

Las alteraciones metabólicas inducidas por el cáncer y los tratamientos oncológicos, como la RT, pueden ser detectadas a través de la metabolómica. El uso de técnicas de análisis multivariante y algoritmos de aprendizaje automático podrían facilitar la identificación y validación de biomarcadores potenciales.

La hipótesis de la presente tesis es que la determinación de una firma metabolómica podría permitir la identificación de biomarcadores plasmáticos útiles en el diagnóstico precoz del CP, así como en la evaluación de la respuesta a la RT y su pronóstico.



# OBJETIVOS





## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO PRINCIPAL**

El objetivo principal de esta tesis es identificar potenciales biomarcadores en CP, a partir de la combinación de firmas metabólicas plasmáticas, análisis multivariante y algoritmos de aprendizaje automático, eficaces en el diagnóstico precoz de este tipo de tumor, en la valoración de la respuesta a la RT y en su pronóstico.

### **OBJETIVOS SECUNDARIOS**

- Identificar las alteraciones metabólicas más relevantes que permitan discriminar entre pacientes con CPNM y controles sanos.
- Determinar los cambios metabólicos pre-RT y post-RT en pacientes con CPNM, para valorar la respuesta al tratamiento y su posible influencia en el pronóstico de la enfermedad.
- Estudiar las diferencias en los cambios en los perfiles metabólicos de pacientes con CPNM según la modalidad de RT recibida, CRT o SBRT.



# MATERIALES Y MÉTODOS



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. DISEÑO DEL ESTUDIO Y POBLACIÓN

Se llevó a cabo un estudio prospectivo no aleatorizado, reclutando una cohorte de 91 pacientes diagnosticados de tumores primarios de CPNM en estadios I, II y III y candidatos a recibir CRT (38 pacientes) o SBRT (53 pacientes) con intención radical. En total se trataron 102 lesiones pulmonares. Todos los participantes fueron tratados en el Servicio de Oncología Radioterápica del Hospital Universitari Sant Joan de Reus entre febrero de 2013 y octubre de 2022. Los pacientes incluidos presentaron un Índice de Karnofsky > 70 y según la escala funcional del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 0 o 1 (Tabla 7).

**Tabla 7. Criterios de Inclusión y Exclusión**

| Criterios de Inclusión   | Criterios de Exclusión  |
|--|---|
| Pacientes que aceptan y son capaces de dar su consentimiento informado por escrito.                            | Pacientes que no cumplan alguno de los criterios de inclusión.                  |
| Pacientes diagnosticados de CPNM en estadios I, II y III, candidatos a tratamiento radical con RT: SBRT o CRT. | Pacientes que hayan recibido tratamiento de RT previa en la misma localización. |
| Pacientes que acepten la realización de al menos 2 extracciones sanguíneas.                                    | Pacientes que sean mujeres gestantes o en período de lactancia.                 |
| Mujeres u hombres > 18 años y < 80 años.   |   |
| Pacientes con un índice de Karnofsky (IK) > 70 o ECOG 0-1.   |   |
| Pacientes con esperanza de vida de > 6 meses.  |   |

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group.

Los protocolos de RT incluyeron RT normofraccionada (dosis total de 54-70 Gy administrada a 2 Gy/día, 5 días/semana), RT hipofraccionada (dosis total de 60 Gy administrada a 4 Gy/día, 5 días/semana) o SBRT riesgo adaptado (dosis total de 54-60 Gy administrada en 3 – 8 fracciones) utilizando arco terapia volumétrica de intensidad modulada (VMAT) a través del sistema Varian RapidArc® (Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, EE. UU.) (Tabla 8). Además, 14 pacientes con CPNM tratados con CRT recibieron tratamiento concomitante con cisplatino (50 mg/m<sup>2</sup>) y etopósido (50 mg/m<sup>2</sup>) por vía endovenosa cada tres semanas.

**Tabla 8. Protocolo de tratamiento de radioterapia (RT)**

| <b>Tipo de RT</b>    | <b>Dosis Total (Gy)</b> | <b>Fracción (Gy/día)</b> | <b>Número de Fracciones</b> | <b>Frecuencia</b> | <b>Técnica Utilizada</b> |
|----------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------|--------------------------|
| RT Normofraccionada  | 54-70 Gy                | 2 Gy                     | 27-35                       | 5 días/semana     | CRT/IMRT/VMAT            |
| RT Hipofraccionada   | 60 Gy                   | 4 Gy                     | 15                          | 5 días/semana     | IMRT/VMAT                |
| SBRT Riesgo adaptado | 54-60 Gy                | 7,5-20 Gy                | 3-8                         | Días alternos     | VMAT                     |

RT: Radioterapia, CRT: Radioterapia conformada, IMRT: Radioterapia de intensidad modulada, VMAT: Arco terapia volumétrica de intensidad modulada.

Se obtuvieron muestras de sangre en ayunas basal antes y al mes de finalizar del tratamiento, y se almacenaron en alícuotas de plasma con EDTA a -80°C hasta que se realizaron los análisis metabolómicos.

La evaluación de la toxicidad aguda durante el curso del tratamiento se realizó semanalmente, empleando los criterios establecidos por el Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) y la European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) [146,208].

Como grupo de control, se utilizaron muestras de plasma de 40 voluntarios sanos, sin evidencia clínica o analítica de enfermedad infecciosa, insuficiencia renal, enfermedad hepática, neoplasia o trastornos neurológicos. Estos individuos fueron reclutados de un estudio poblacional realizado en nuestra zona [209].

## 2. ANÁLISIS METABOLÓMICO

### *Metabolitos analizados:*

Mediante metabolómica semidirigida se evaluaron los niveles plasmáticos de 74 metabolitos involucrados en el metabolismo energético, carbohidratos, aminoácidos, lípidos, cofactores, vitaminas, nucleótidos, y biodegradación de xenobióticos [192,210]:  $\alpha$ -tocoferol, ácido  $\alpha$ -cetoglutarico, ácido 2-ceto-3-metilvalérico, ácido 2-hidroxi-butírico, ácido 2-hidroxiisobutírico, ácido 2-hidroxiisovalérico, ácido 3-fosfoglicérico, ácido 3-hidroxi-butírico / ácido 3-hidroxiisobutírico, ácido 3-hidroxiisovalérico, ácido 3-metil-2-oxobutírico, ácido 4-hidroxi-benzoico, ácido 4-hidroxi-feniláctico, 4-hidroxi-prolina, ácido benzoico, ácido cítrico, ácido d-manónico, ácido dodecanoico, ácido dl-2-hidroxi-glutarico, ácido eritrónico, ácido etilmalónico, ácido fosfórico, ácido fumárico, ácido galactónico, ácido galacturónico, ácido glicérico, ácido glicólico, ácido glutámico, ácido hipúrico, ácido hidrocínámico, ácido indol-3-propanoico, ácido indoleláctico, ácido láctico, ácido linoleico, ácido málico, ácido oleico, oxoprolina, ácido pirúvico, ácido ribónico, ácido sacárico, ácido succínico, ácido tetradecanoico, ácido treónico, ácido úrico, ácido vanililmandélico, ácido xilónico, alanina, d-arabinosa, d-arabitol, d-fructosa, d-galactitol, d-manitol, d-sacarosa, d-treitol, d-xilitol, d-xilosa, etanolamina, fenilalanina, glicina, glucosa 6-fosfato, glutamina, glicerol, glicerol-1-fosfato, isoleucina, leucina, maltosa, metionina, mio-inositol, ornitina, prolina, sedoheptulosa, serina, taurina, treonina y valina.

### *Reactivos:*

Agua Milli-Q (Millipore Sigma, Burlington, MA, USA), metanol LC-MS (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA), metoxiamina (Sigma Aldrich), piridina (Sigma Aldrich), N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA, Thermo, Waltham, MA, USA), cloruro de trimetilsilano (TMCS, Waltham, MA, USA).

### *Calibradores:*

Ácido succínico D4, ácido mirístico D27, d-glucosa 13C6 y L-metionina-(carboxi-13C, metil-D3) (Sigma Aldrich), mezcla de calibradores de aminoácidos marcados (Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, MA, USA).



*Preparación de muestras:*

100 µL de plasma se añadieron a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se mezclaron con 400 µL de una solución de metanol (8:2, v/v) que contenía los calibradores internos. Las muestras se mezclaron en un vórtex y se centrifugaron durante 5 minutos a 15000 rpm y 4°C. Los sobrenadantes (400 µL) se transfirieron a un tubo nuevo y se evaporaron en un SpeedVac (Thermo) a 45 °C. Las muestras se reconstituyeron con 30 µL de metoxiamina y se incubaron durante 90 minutos a 37°C. Finalmente, se derivatizaron con 45 µL de MSTFA + 1 % TMCS a temperatura ambiente durante 60 minutos.

*Instrumentación:*

Se utilizó un cromatógrafo de gases 7890A acoplado a una fuente de impacto electrónico con un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo cuádrupolo 7200, equipado con un módulo de autosampler 7693 y una columna J&W Scientific HP-5MS (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm) (GC-QTOF-MS, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). La separación cromatográfica se realizó con helio (pureza >99.999%) como gas portador a un flujo constante de 1.1 mL/min. La temperatura inicial del horno del GC fue de 60°C; 1 minuto después de la inyección, la temperatura del horno del GC se incrementó a 10°C/min hasta alcanzar 320°C y se mantuvo a 320°C durante 10 minutos. Las muestras se inyectaron en modo split 1:20 a una temperatura de inyección de 250°C. La detección se realizó utilizando MS en modo de ionización por impacto electrónico (70 eV) y monitoreo de escaneo completo (m/z 50–600) con una velocidad de adquisición de 5 espectros/seg. La temperatura de la fuente de iones se fijó en 250°C y la del cuádrupolo en 200°C.

Los analitos fueron identificados utilizando sus calibradores analíticos puros. Específicamente, se seleccionaron y utilizaron iones para la cuantificación basándose en sus espectros de impacto electrónico (70 eV) y los iones principales específicos descritos en la biblioteca espectral registrada Fiehn-pct-2013. Se realizó un análisis semicuantitativo utilizando calibradores marcados para corregir la señal analítica, el efecto de lote y las diferencias en la extracción de metabolitos. Los resultados se han reportado como una relación de respuesta con el calibrador interno (relative units, RU).

### 3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis y gráficos se ejecutaron utilizando RStudio versión 4.3.1 y las versiones más recientes de los paquetes disponibles en CRAN (Comprehensive R Archive Network) a partir del 28 de abril de 2024.

Con el fin de normalizar la distribución de los datos metabólicos y evitar sesgos en el análisis, se aplicó una transformación logarítmica en base 10. El análisis univariante de los datos clínicos y metabólicos para la comparación entre grupos se realizó utilizando pruebas estadísticas apropiadas según el tipo de variable. Las variables cuantitativas se analizaron mediante pruebas no paramétricas. En el caso de variables independientes, se empleó la prueba U de Mann-Whitney. Para las variables relacionadas, se aplicó la prueba de Wilcoxon. Los resultados obtenidos se muestran como medianas acompañadas de sus respectivos rangos intercuartílicos. Por otro lado, las variables categóricas se evaluaron mediante la prueba de  $\chi^2$ , y los resultados se muestran como número de casos seguido del porcentaje de la población que representan. El umbral de significancia se determinó en un valor de  $p < 0.05$ . Los resultados descriptivos de los datos clínicos y metabólicos se resumieron utilizando el paquete TableOne, que permite generar tablas descriptivas de manera eficiente y detallada. Para la visualización de los resultados, se emplearon gráficos de volcán y diagramas de caja, generados utilizando el paquete ggplot2, que es ampliamente utilizado.

Para identificar los metabolitos más relevantes para la segregación entre los grupos de estudio, se optó por utilizar un enfoque basado en machine learning. Esta decisión se fundamenta en la capacidad del machine learning para manejar grandes volúmenes de datos y su eficacia en la detección de patrones complejos y correlaciones entre variables. Los análisis metabólicos suelen implicar un elevado número de metabolitos y la presencia de numerosas variables interrelacionadas.

En primer lugar, se utilizó el OPLS-DA, una técnica de machine learning utilizada para la clasificación y discriminación de datos principalmente "ómicos". Esta técnica de análisis combina características del análisis de componentes principales (PCA) y del análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS), reduciendo la dimensionalidad de manera supervisada y teniendo en cuenta la variable respuesta. El OPLS-DA descompone los datos en dos componentes principales: uno correlacionado con la variable respuesta y otro ortogonal que captura la variabilidad no relacionada con la discriminación entre las clases. Gracias a la reducción de dimensionalidad y a la proyección de los datos se facilita la visualización de los datos y mejora la interpretación de las diferencias entre clases. Específicamente, esta técnica de análisis se realizó

usando el paquete ropls, y permitió optimizar la discriminación entre pacientes con CPNM e individuos sanos. Además, se evaluó la importancia de cada variable predictora para la clasificación de las clases mediante la métrica de Importancia de la Variable en la Proyección (VIP, del inglés Variable Importance in Projection). Aquellos metabolitos que presentaron una puntuación VIP superior a 1.5, se consideraron relevantes y que contribuían significativamente en la discriminación entre grupos.

Para evaluar la capacidad discriminadora de los metabolitos de forma individual, se generaron curvas ROC univariantes mediante el paquete pROC. También se calculó e indicó en las gráficas ROC el índice de Youden, el cual representa el punto de corte óptimo para maximizar la especificidad y sensibilidad de cada metabolito evaluado. El índice Youden se obtiene seleccionando el punto dónde el valor Y es máximo.

$$Y = \text{Sensibilidad} + \text{Especificidad} - 1$$

Para confirmar la influencia de cada metabolito en la segregación entre grupos en presencia de diversos factores clínicos, se ajustaron modelos multivariantes de regresión logística para cada metabolito junto con las variables clínicas significativamente distintas entre los grupos de estudio.

Finalmente, con la utilización del paquete caret se entrenó y validó un modelo multivariante con los metabolitos seleccionados basado en el algoritmo de SVM con un núcleo lineal. Este algoritmo de aprendizaje supervisado busca encontrar el hiperplano óptimo, que maximice el margen entre las diferentes clases. El modelo fue entrenado con el 70% de los datos, seleccionados de manera aleatoria, y su rendimiento fue evaluado mediante un método de validación cruzada en 5 pliegues. Este proceso consiste en dividir el conjunto de entrenamiento en 5 subconjuntos o pliegues, aproximadamente iguales. En cada iteración, uno de estos pliegues se utiliza como conjunto de validación y los otros 4 como conjunto de entrenamiento. Este procedimiento se repite 5 veces, asegurando que cada pliegue actúe como conjunto de validación una vez. Este enfoque permite obtener una estimación más precisa de la capacidad predictiva del modelo, ya que se entrena y valida en diferentes subconjuntos de datos, reduciendo así el riesgo de sobreajuste (overfitting), es decir, la excesiva adaptación del modelo a los datos de entrenamiento. Finalmente, el modelo se validó de manera externa usando el 30% restante de los datos, asegurando así una evaluación independiente y robusta de su capacidad predictiva.

### 3.1. Cálculo tamaño de muestra

Dado el número limitado de pacientes incluidos en el estudio, quisimos calcular *a posteriori* el tamaño mínimo de muestra necesario para obtener conclusiones estadísticamente válidas. Para ello, escogimos como diana el metabolito taurina que es uno de los que presentan menores diferencias entre los distintos grupos. En lo referente a las diferencias basales entre los pacientes con CPNM y el grupo control, si  $\alpha = 0,05$ ,  $\beta = 0,2$ ,  $q_0 = 0,3$  y  $q_1 = 0,7$ , se necesitaron como mínimo 33 casos en el grupo control y 75 en el grupo CPNM. Por otro lado, en lo referente a las diferencias pre- y post-SBRT, si  $\alpha = 0,05$ ,  $\beta = 0,2$ ,  $q_0 = 0,5$  y  $q_1 = 0,5$ , se necesitaron como mínimo 45 casos en cada uno de los grupos. Para calcular el tamaño de muestra en el estudio de las diferencias pre- y post-CRT, escogimos la glicina, ya que la taurina no presentaba diferencias significativas. Si  $\alpha = 0,05$ ,  $\beta = 0,2$ ,  $q_0 = 0,5$  y  $q_1 = 0,5$ , se necesitan como mínimo 11 casos en cada uno de los grupos. Por tanto, nuestro estudio ha cumplido los criterios de tamaño mínimo de muestra. Para realizar estos cálculos se ha usado la calculadora online Sample Size Calculators for Designing Clinical Research (<https://sample-size.net/>).

## 4. ASPECTOS ÉTICOS

Este estudio se realizó de acuerdo con la declaración de Helsinki y según la legislación vigente, siguiendo la normativa de Buena Práctica Clínica (Good Clinical Practice) promulgada por la Conferencia Internacional de Armonización (International Conference of Harmonization). A cada sujeto que se le solicitó la participación en el estudio se le entregó un documento escrito que contenía información sobre la finalidad del estudio, los beneficios y los riesgos derivados del mismo, el carácter voluntario de su participación, así como la posibilidad de retirarse del estudio en cualquier momento sin que ello alterase la relación médico-enfermo, ni produjera perjuicio en su tratamiento. Se asignó un código numérico aleatorio manteniendo la confidencialidad de todos los datos de carácter personal, cumpliendo la normativa legal sobre confidencialidad de datos: reglamento 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de abril de 2016, relativo a la protección de las personas físicas, en lo que respecta al tratamiento de sus datos personales y la Ley Orgánica 3/2018, del 5 de diciembre, de protección datos personales y garantía de los derechos digitales.

El protocolo, junto con la hoja de información al paciente y el consentimiento informado, fue evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), código CEIm 14/2017 dentro del estudio:

“Biomarcadores de la oxidación, la inflamación y el metabolismo energético para la evaluación de la respuesta al tratamiento con radioterapia en pacientes con cáncer de pulmón”, dirigido por el servicio de oncología radioterápica del Hospital Universitari Sant Joan de Reus (Anexo 1). Todos los pacientes o su representante legal firmaron el consentimiento informado para la inclusión en el estudio, proporcionando una copia del formulario de consentimiento informado y la hoja de información al paciente en un lenguaje no técnico y fácilmente comprensible (Anexo 2).

## 5. PUBLICACIONES

Los resultados presentados en esta tesis han sido publicados en el artículo: “Combining Metabolomics and Machine Learning to Identify Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Pre- and Post-Radiation Therapy”. *Biomolecules*. DOI: 10.3390/ biom14080898 (Anexo 3).

# RESULTADOS



## RESULTADOS

### 1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DEMOGRÁFICAS DE LOS PARTICIPANTES

La mayoría de los participantes fueron hombres, y se observaron notables diferencias entre los pacientes con CPNM y el grupo control. Estas variaciones abarcaron la edad, comorbilidades como la diabetes mellitus, la hipertensión arterial y la dislipemia, así como factores de estilo de vida, como el tabaquismo y el consumo de alcohol. El grupo de pacientes tratados con SBRT presentó una mayor proporción de mujeres y una menor prevalencia de fumadores en comparación con aquellos que recibieron CRT (Tabla 9).

Tabla 9. Características clínicas de la cohorte de pacientes.

|                                  | Grupo control     | Pacientes CPNM    | CRT               | SBRT              | p   |
|----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----|
| <b>Características pacientes</b> | <b>n = 40</b>     | <b>n = 91</b>     | <b>n = 38</b>     | <b>n = 53</b>     |     |
| Edad                             | 69.50 [65.0-74.0] | 73.00 [66.5-79.0] | 71.50 [66.8-77.8] | 74.00 [67.0-79.0] | *   |
| Mujeres                          | 12 (30.0)         | 39 (42.9)         | 8 (21.1)          | 31 (58.5)         | #   |
| Habito tabáquico                 | 9 (22.5)          | 69 (76.7)         | 34 (91.9)         | 35 (66.0)         | * # |
| Enolismo                         | 20 (50.0)         | 20 (22.0)         | 11 (28.9)         | 9 (17.0)          | *   |
| Diabetes mellitus                | 3 (7.5)           | 27 (30.0)         | 11 (29.7)         | 16 (30.2)         | *   |
| Hipertensión arterial            | 13 (32.5)         | 56 (62.2)         | 21 (56.8)         | 35 (66.0)         | *   |
| Dislipemia                       | 6 (15.0)          | 43 (47.3)         | 19 (50.0)         | 24 (45.3)         | *   |
| Enfermedad pulmonar              | NA                | 58 (63.7)         | 31 (81.6)         | 27 (50.9)         | NS  |
| Enfermedad cardiovascular        | NA                | 34 (37.4)         | 20 (52.6)         | 14 (26.4)         | #   |
| <b>Características del tumor</b> |                   | <b>n = 99</b>     | <b>n = 38</b>     | <b>n = 61</b>     |     |
| <b>Histología</b>                |                   |                   |                   |                   | NS  |
| Adenocarcinoma                   | NA                | 44 (44.4)         | 15 (39.5)         | 29 (47.5)         |     |
| Carcinoma escamoso               | NA                | 42 (42.4)         | 21 (55.3)         | 21 (34.4)         |     |
| Otros                            | NA                | 8 (8.1)           | 2 (5.3)           | 6 (9.8)           |     |
| No determinado                   | NA                | 5 (5.1)           | -                 | 5 (8.2)           |     |
| <b>Estadio</b>                   |                   |                   |                   |                   | #   |
| Ia                               | NA                | 60 (60.6)         | 13 (34.2)         | 47 (77.0)         |     |
| Ib                               | NA                | 15 (15.2)         | 6 (15.8)          | 9 (14.8)          |     |
| IIa                              | NA                | 1 (1.0)           | 1 (2.6)           | 0 (0.0)           |     |
| IIb                              | NA                | 8 (8.1)           | 3 (7.9)           | 5 (8.2)           |     |
| IIIa                             | NA                | 5 (5.1)           | 5 (13.2)          | 0 (0.0)           |     |
| IIIb                             | NA                | 8 (8.1)           | 8 (21.1)          | 0 (0.0)           |     |
| IIIc                             | NA                | 2 (1.9)           | 2 (5.2)           | 0 (0.0)           |     |
| <b>Localización</b>              |                   |                   |                   |                   | NS  |
| LSD                              | NA                | 27 (27.6)         | 10 (26.3)         | 17 (28.3)         |     |
| LM                               | NA                | 5 (5.1)           | 2 (5.3)           | 3 (5.0)           |     |
| LID                              | NA                | 21 (21.4)         | 11 (28.9)         | 10 (16.7)         |     |
| LSI                              | NA                | 27 (27.6)         | 11 (28.9)         | 16 (26.7)         |     |
| LII                              | NA                | 18 (18.4)         | 4 (10.5)          | 14 (23.3)         |     |

\* p < 0.05, cáncer vs. grupo control; # p < 0.05, SBRT vs. CRT. La edad se muestra como mediana [rango intercuartílico] y las diferencias se analizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney. Las variables cualitativas se muestran como n (%) y las diferencias se analizaron mediante la prueba de X<sup>2</sup>. NA: no aplica, NS: no significativo, LSD: Lóbulo Superior Derecho, LM: Lóbulo Medio, LID: Lóbulo Inferior Derecho, LSI: Lóbulo Superior Izquierdo, LII: Lóbulo Inferior Izquierdo, CPNM: Carcinoma de pulmón no microcítico. SBRT: Radioterapia corporal estereotáctica, CRT: Radioterapia conformada.



Los tipos histológicos predominantes entre los pacientes con CPNM fueron adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas, con la mayoría de las lesiones ubicadas en el lóbulo superior derecho, lóbulo inferior derecho o lóbulo superior izquierdo. Los tumores tratados fueron principalmente de estadios iniciales I y II. Sin embargo, el 39,5 % de los pacientes tratados con CRT fueron tumores localmente avanzados estadio III (Tabla 9). Los pacientes con CPNM estadio III tratados con CRT recibieron tratamiento concomitante con cisplatino (50 mg/m<sup>2</sup>) y etopósido (50 mg/m<sup>2</sup>) por vía intravenosa cada tres semanas.

La respuesta radiológica de los tumores de CPNM tratados con RT mostró diferencias significativas entre los grupos de tratamiento. En particular, el grupo tratado con SBRT presentó una mayor proporción de respuestas completas y una menor tasa de progresión frente al grupo tratado con CRT. Además, el grupo tratado con SBRT presentó una tasa significativamente menor de toxicidad aguda y difirió en el tipo específico de toxicidad aguda presentada. Los pacientes tratados con SBRT presentaron principalmente astenia (G1 80% y G2 20%) y toxicidad pulmonar (G1), mientras que los tratados con CRT desarrollaron predominantemente epitelitis (G1 75%, G2 20% y G3 4,1%), esofagitis y toxicidad pulmonar (G1 88% y G2 12%). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos por lo que refiere a la toxicidad crónica (Tabla 10).

**Tabla 10. Respuesta y toxicidad a la radioterapia.**

|  | <b>CRT</b>       | <b>SBRT</b>      | <b>p</b>         |
|--|------------------|------------------|------------------|
| <b>Respuesta y toxicidad a la radioterapia</b> | <b>n = 38</b>    | <b>n = 61</b>    |                  |
| <b>Respuesta radiológica</b>                   |                  |                  | <b>&lt;0.001</b> |
| Completa                                       | 3 (8.3)          | 17 (28.3)        |                  |
| Parcial  | 14 (38.9)        | 27 (45.0)        |                  |
| Estable  | 2 (5.6)          | 13 (21.7)        |                  |
| Progresión                                     | 17 (47.2)        | 3 (5.0)          |                  |
| <b>Toxicidad aguda</b>                         | <b>25 (78.1)</b> | <b>18 (29.5)</b> | <b>&lt;0.001</b> |
| Astenia  | 20 (52.6)        | 15 (24.6)        |                  |
| Toxicidad pulmonar                             | 17 (44.7)        | 3 (4.9)          |                  |
| Esofagitis                                     | 5 (13.2)         | 0 (0.0)          |                  |
| Epitelitis                                     | 24 (63.2)        | 0 (0.0)          |                  |
| <b>Toxicidad crónica</b>                       | <b>8 (25.0)</b>  | <b>8 (13.1)</b>  | <b>0.249</b>     |
| Fibrosis                                       | 8 (25.0)         | 8 (13.1)         |                  |
| Estenosis                                      | 0                | 1 (1.6)          |                  |

Las variables se muestran como n (%) y las diferencias se analizaron mediante la prueba de X<sup>2</sup>. CPNM: Carcinoma de pulmón no microcítico. CRT: Radioterapia conformada, SBRT: Radioterapia corporal estereotáctica.

## 2. METABOLITOS BASALES EN EL GRUPO DE PACIENTES CON CPNM Y EN EL GRUPO CONTROL

En total se analizaron un total de 74 metabolitos (Tabla 11). El análisis univariante mostró que los pacientes con CPNM presentaron concentraciones plasmáticas significativamente elevadas de 32 metabolitos y disminuidas de 18, en comparación con el grupo control (Figura 18A). El análisis OPLS-DA basado en los datos metabolómicos distinguió de manera precisa los perfiles metabólicos de individuos sanos y pacientes con CPNM. Metabolitos específicos como el ácido etilmalónico, la maltosa, el glicerol, el ácido 3-fosfoglicérico, la taurina, el ácido glutámico, el ácido glicólico y la d-arabinosa mostraron una mayor capacidad discriminadora para segregar los grupos, como lo indican sus puntuaciones VIP que exceden los 1.5 puntos (Figura 18B). Entre estos, las concentraciones plasmáticas de ácido etilmalónico, glicerol y ácido glicólico fueron más bajas en pacientes con CPNM. En contraste, la maltosa, el ácido 3-fosfoglicérico, la taurina, el ácido glutámico y la d-arabinosa fueron más altos. Estos hallazgos sugieren posibles alteraciones metabólicas asociadas con el metabolismo de aminoácidos, carbohidratos y lípidos (Figura 18C).

**Tabla 11. Perfiles metabolómicos plasmáticos en pacientes CPNM y en el grupo control.**

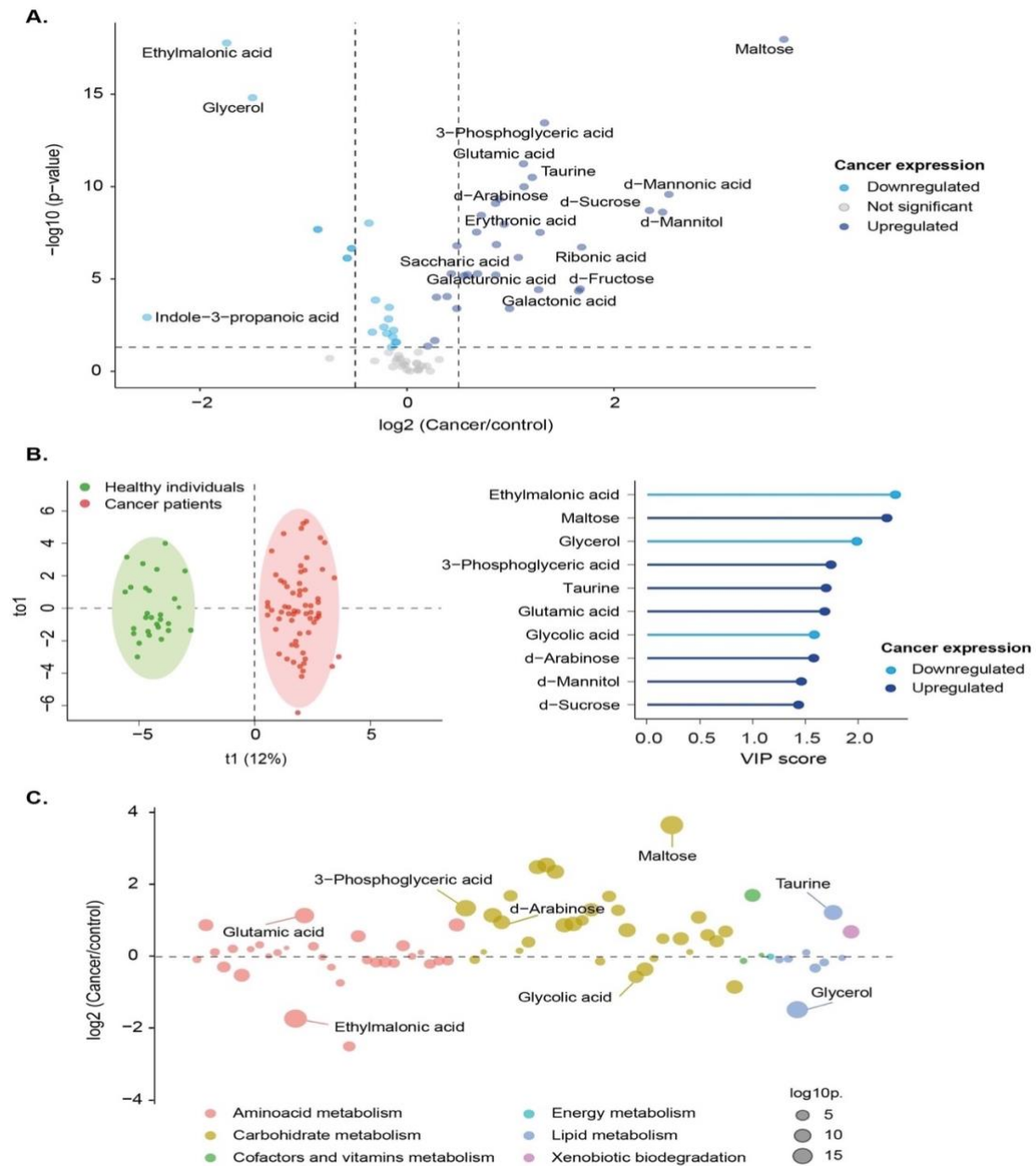
| Metabolitos plasmáticos                                 | Grupo control<br>n = 40 | Pacientes CPNM<br>n = 91 | p                |
|---|-------------------------|--------------------------|------------------|
| Ácido pirúvico  | 6.11 [5.06-7.46]        | 6.40 [4.72-8.46]         | 0.725            |
| Ácido láctico   | 15.93 [13.27-17.39]     | 14.28 [12.56-16.91]      | 0.202            |
| Ácido 2-hidroxiisobutírico                              | 0.33 [0.27-0.42]        | 0.44 [0.35-0.65]         | <b>&lt;0.001</b> |
| Ácido glicólico   | 0.26 [0.23-0.28]        | 0.19 [0.16-0.23]         | <b>&lt;0.001</b> |
| Alanina   | 2.80 [2.34-3.49]        | 2.91 [2.53-3.49]         | 0.357            |
| Ácido 2-hidroxiisobutírico                              | 4.38 [3.60-5.76]        | 4.02 [2.86-5.58]         | 0.205            |
| Ácido 3-metil-2-oxobutírico                             | 0.17 [0.13-0.20]        | 0.11 [0.09-0.15]         | <b>&lt;0.001</b> |
| Ácido 3-hidroxiisobutírico / ácido 3-hidroxiisobutírico | 1.88 [1.35-2.67]        | 1.59 [0.89-4.44]         | 0.518            |
| Ácido 2-hidroxiisovalérico                              | 1.29 [1.03-1.64]        | 1.50 [1.08-2.74]         | 0.093            |
| Ácido 2-ceto-3-metilvalérico                            | 0.30 [0.23-0.34]        | 0.22 [0.17-0.28]         | <b>&lt;0.001</b> |
| Ácido 3-hidroxiisovalérico                              | 0.25 [0.21-0.30]        | 0.30 [0.21-0.36]         | <b>0.043</b>     |
| Valina  | 18.91 [17.34-20.69]     | 17.29 [14.90-20.19]      | <b>0.006</b>     |
| Ácido benzoico  | 0.26 [0.18-0.35]        | 0.25 [0.20-0.34]         | 0.974            |
| Etanolamina   | 0.33 [0.28-0.38]        | 0.29 [0.25-0.36]         | 0.136            |
| Leucina   | 10.00 [9.32-11.28]      | 8.99 [7.23-10.85]        | <b>0.001</b>     |
| Ácido fosfórico   | 3.83 [2.99-4.83]        | 3.73 [2.88-4.39]         | 0.449            |
| Glicerol  | 2.44 [1.72-3.16]        | 0.80 [0.51-1.25]         | <b>&lt;0.001</b> |
| Ácido etilmalónico                                      | 3.74 [2.79-4.33]        | 1.02 [0.75-1.44]         | <b>&lt;0.001</b> |
| Isoleucina  | 5.40 [4.79-6.01]        | 4.70 [3.95-5.85]         | <b>0.027</b>     |
| Prolina   | 20.83 [17.32-28.22]     | 22.19 [14.21-30.23]      | 0.863            |
| Glicina   | 1.26 [1.20-1.36]        | 1.26 [1.15-1.36]         | 0.405            |
| Ácido succínico   | 0.08 [0.07-0.09]        | 0.10 [0.09-0.13]         | <b>&lt;0.001</b> |
| Ácido glicérico   | 0.58 [0.52-0.74]        | 0.70 [0.56-0.93]         | <b>0.022</b>     |
| Ácido fumárico  | 0.52 [0.38-0.74]        | 0.42 [0.25-0.61]         | <b>0.049</b>     |
| Serina  | 7.30 [5.90-7.96]        | 5.87 [4.89-7.20]         | <b>0.004</b>     |
| Treonina  | 7.68 [6.56-8.83]        | 6.71 [5.71-8.01]         | <b>0.014</b>     |
| Ácido hidrocínámico                                     | 0.15 [0.08-0.23]        | 0.11 [0.07-0.18]         | 0.196            |

|                              |                      |                      |                  |
|------------------------------|----------------------|----------------------|------------------|
| Ácido málico                 | 0.09 [0.08-0.12]     | 0.14 [0.10-0.19]     | <b>&lt;0.001</b> |
| d-Treitol                    | 0.02 [0.02-0.03]     | 0.03 [0.03-0.04]     | <b>&lt;0.001</b> |
| Metionina                    | 1.91 [1.77-2.09]     | 1.61 [1.29-1.98]     | <b>&lt;0.001</b> |
| Oxoprolina                   | 50.23 [42.98-56.01]  | 61.32 [49.51-69.37]  | <b>&lt;0.001</b> |
| 4-Hidroxiprolina             | 1.75 [1.26-2.67]     | 1.71 [1.27-2.33]     | 0.836            |
| Ácido treónico               | 1.66 [1.51-1.94]     | 2.40 [1.79-3.55]     | <b>&lt;0.001</b> |
| Ácido eritrónico             | 0.06 [0.05-0.09]     | 0.11 [0.08-0.22]     | <b>&lt;0.001</b> |
| Ácido DL-2-hidroxiglutarico  | 0.05 [0.04-0.05]     | 0.06 [0.05-0.08]     | <b>&lt;0.001</b> |
| Ácido a-cetoglutarico        | 0.80 [0.69-0.93]     | 0.73 [0.59-0.87]     | <b>0.026</b>     |
| Ácido glutámico              | 3.59 [2.73-4.86]     | 8.07 [5.55-10.34]    | <b>&lt;0.001</b> |
| Ácido 4-hidroxibenzoico      | 0.02 [0.02-0.03]     | 0.03 [0.03-0.05]     | <b>&lt;0.001</b> |
| Fenilalanina                 | 6.81 [6.43-7.27]     | 6.60 [5.56-7.72]     | 0.285            |
| Ácido dodecanoico            | 0.22 [0.16-0.29]     | 0.23 [0.17-0.33]     | 0.284            |
| d-Xilosa                     | 0.03 [0.03-0.06]     | 0.05 [0.04-0.08]     | <b>&lt;0.001</b> |
| Taurina                      | 0.62 [0.45-0.82]     | 1.33 [0.91-1.73]     | <b>&lt;0.001</b> |
| d-Arabinosa                  | 0.08 [0.06-0.09]     | 0.14 [0.11-0.23]     | <b>&lt;0.001</b> |
| d-Xilitol                    | 0.00 [0.00-0.00]     | 0.00 [0.00-0.00]     | <b>&lt;0.001</b> |
| d-Arabitol                   | 0.02 [0.01-0.02]     | 0.02 [0.02-0.03]     | <b>&lt;0.001</b> |
| Glicerol-1-fosfato           | 0.06 [0.06-0.08]     | 0.07 [0.05-0.09]     | 0.380            |
| Glutamina                    | 41.02 [35.52-50.56]  | 27.16 [14.54-38.64]  | <b>&lt;0.001</b> |
| Ácido xilónico               | 0.14 [0.10-0.18]     | 0.05 [0.04-0.11]     | <b>&lt;0.001</b> |
| Ácido ribónico               | 0.01 [0.01-0.01]     | 0.02 [0.01-0.04]     | <b>&lt;0.001</b> |
| Ácido 3-fosfoglicérico       | 0.01 [0.01-0.01]     | 0.03 [0.02-0.05]     | <b>&lt;0.001</b> |
| Ornitina                     | 21.03 [16.59-24.92]  | 16.81 [13.13-23.86]  | <b>0.009</b>     |
| Ácido cítrico                | 87.69 [68.20-110.80] | 86.26 [58.21-125.49] | 0.867            |
| Ácido tetradecanoico         | 1.03 [0.81-1.34]     | 1.03 [0.72-1.37]     | 0.537            |
| Ácido hipúrico               | 1.01 [0.71-2.20]     | 0.91 [0.30-1.89]     | 0.275            |
| Ácido vanililmandélico       | 0.02 [0.01-0.02]     | 0.03 [0.02-0.04]     | <b>&lt;0.001</b> |
| Ácido 4-hidroxifenil láctico | 2.16 [1.67-2.56]     | 2.36 [1.86-3.23]     | 0.229            |
| d-Fructosa                   | 0.03 [0.03-0.04]     | 0.05 [0.03-0.14]     | <b>&lt;0.001</b> |
| d-Manitol                    | 0.03 [0.02-0.06]     | 0.14 [0.07-0.51]     | <b>&lt;0.001</b> |
| Ácido d-manónico             | 0.07 [0.05-0.10]     | 0.16 [0.11-0.30]     | <b>&lt;0.001</b> |
| d-Galactitol                 | 0.02 [0.02-0.03]     | 0.02 [0.02-0.03]     | 0.519            |
| Ácido galacturónico          | 0.05 [0.04-0.06]     | 0.07 [0.05-0.12]     | <b>&lt;0.001</b> |
| Ácido galactónico            | 0.00 [0.00-0.01]     | 0.01 [0.00-0.02]     | <b>&lt;0.001</b> |
| Ácido sacárico               | 0.04 [0.03-0.07]     | 0.08 [0.05-0.13]     | <b>&lt;0.001</b> |
| Ácido indol-3-propanoico     | 0.09 [0.05-0.17]     | 0.06 [0.03-0.09]     | <b>0.001</b>     |
| Myo-inositol                 | 0.64 [0.55-0.70]     | 0.89 [0.71-1.08]     | <b>&lt;0.001</b> |
| Ácido úrico                  | 12.86 [7.95-16.96]   | 12.55 [7.92-16.87]   | 0.974            |
| Sedoheptulosa                | 0.05 [0.04-0.06]     | 0.07 [0.05-0.09]     | <b>&lt;0.001</b> |
| Ácido indoleláctico          | 0.32 [0.28-0.47]     | 0.50 [0.39-0.61]     | <b>&lt;0.001</b> |
| Ácido linoleico              | 1.83 [1.39-3.40]     | 1.39 [0.86-2.59]     | <b>0.008</b>     |
| Ácido oleico                 | 11.46 [8.53-16.61]   | 9.83 [5.38-17.30]    | 0.096            |
| Glucosa 6-fosfato            | 0.00 [0.00-0.00]     | 0.01 [0.01-0.01]     | <b>&lt;0.001</b> |
| d-Sacarosa                   | 0.02 [0.01-0.03]     | 0.07 [0.04-0.15]     | <b>&lt;0.001</b> |
| Maltosa                      | 0.01 [0.01-0.01]     | 0.12 [0.05-0.22]     | <b>&lt;0.001</b> |
| a-Tocoferol                  | 0.44 [0.31-0.56]     | 0.42 [0.27-0.60]     | 0.574            |

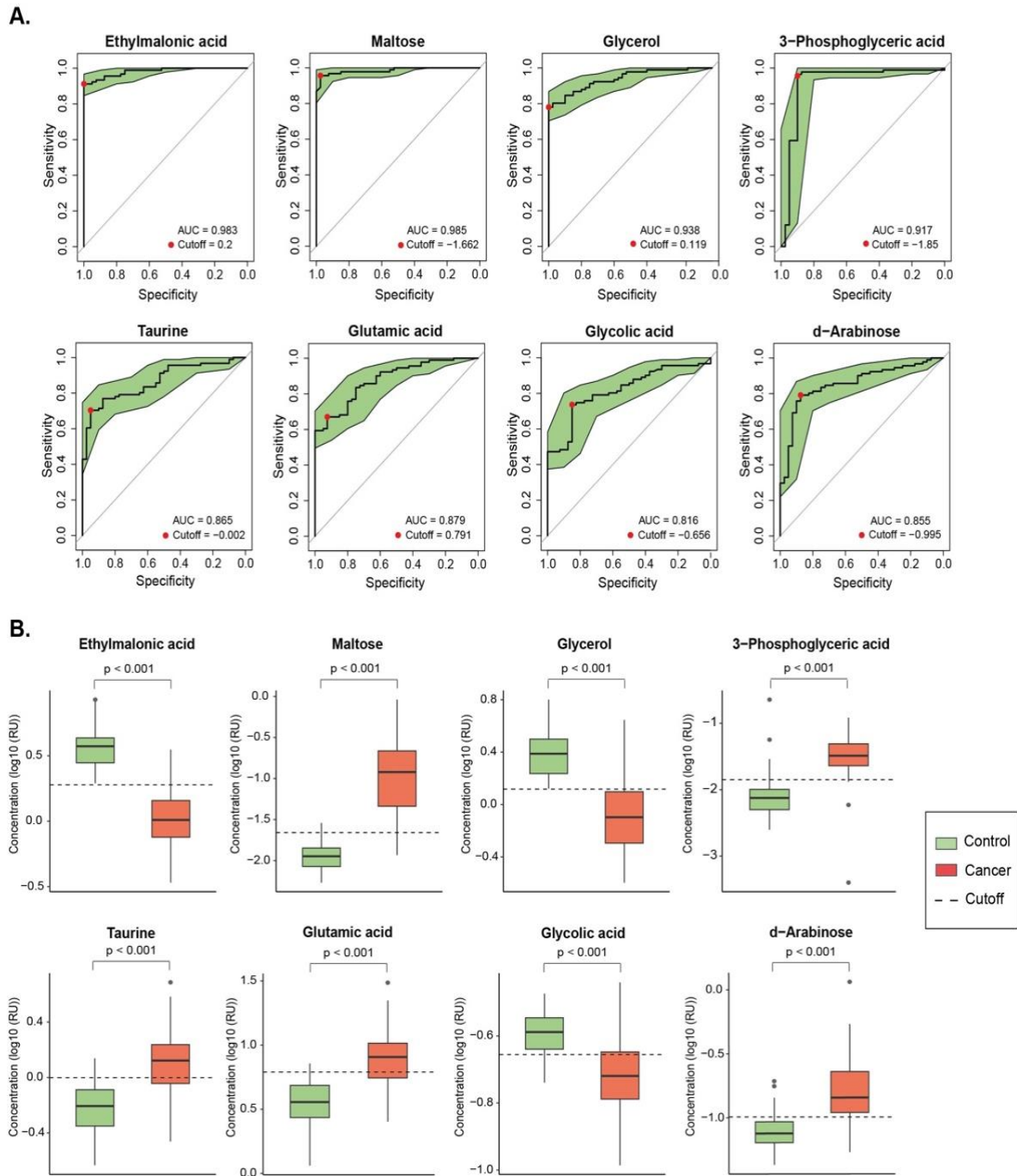
Los datos se expresan como mediana [rango intercuartílico] y las diferencias se analizaron mediante la prueba de Wilcoxon. CPNM: Carcinoma de pulmón no microcítico.

Para aquellos metabolitos que obtuvieron puntuaciones VIP mayores de 1.5 puntos, se realizaron curvas ROC univariantes con el fin de evaluar su capacidad individual discriminadora entre los grupos y su potencial como biomarcadores. Todos ellos mostraron un AUC superior a 0.8, lo que sugiere un alto nivel de precisión y capacidad de discriminación entre pacientes con CPNM y los individuos sanos. Adicionalmente,

para cada curva ROC se calculó el índice de Youden, que permitió identificar el punto de corte óptimo dónde se maximiza la sensibilidad y especificidad de cada metabolito, proceso fundamental para definir un umbral de decisión clínico. Las curvas ROC y los respectivos índices de Youden se representaron gráficamente para facilitar la visualización e interpretación de los datos (Figuras 19A y 19B).



**Figura 18. Análisis comparativo de perfiles de metabolitos plasmáticos en pacientes con CPNM y en el grupo control.** A) Metabolitos significativamente elevados o disminuidos en pacientes comparado con el grupo control. B) El análisis OPLS-DA mostró una clara distinción entre los perfiles metabólicos de pacientes con CPNM y personas sanas, con ocho metabolitos que exhiben una puntuación VIP superior a 1.5. C) Los metabolitos más significativos que distinguen a los pacientes con CPNM del grupo control estuvieron asociados con el metabolismo de aminoácidos, carbohidratos y lípidos.



**Figura 19. Las concentraciones plasmáticas de los metabolitos con un alto poder discriminatorio para clasificar a los pacientes con CPNM del grupo control. A) Las curvas ROC mostraron un AUC superior a 0.8. Los puntos rojos representan el valor de corte óptimo determinado por el índice de Youden para la clasificación de pacientes. B) La prueba U de Mann-Whitney reveló diferencias significativas en las concentraciones de metabolitos plasmáticos entre los pacientes con CPNM y los individuos sanos. Los resultados y los puntos de corte se muestran como log<sub>10</sub> de Unidades Relativas (RU).**

Para evaluar el impacto de los metabolitos en la discriminación entre los grupos considerando también las variables clínicas significativamente diferentes entre ellos, se

ajustaron varios modelos multivariantes de regresión logística. En cada modelo se incluyó un metabolito específico, junto con las variables clínicas seleccionadas (edad, tabaquismo, enolismo, diabetes mellitus, hipertensión arterial y dislipidemia).

Los resultados indican que los metabolitos estudiados contribuyen de manera significativa a la discriminación entre los grupos. Además, algunas de las variables clínicas consideradas también tienen un efecto en la clasificación de pacientes con CPNM y controles sanos. En particular, el hábito tabáquico y el enolismo destacan como variables influyentes (Tablas 12 -20).

**Tabla 12. Resultados de la regresión logística multivariante para la maltosa.**

|                          | Estimación | Error estándar | Valor z | p-valor      |
|--------------------------|------------|----------------|---------|--------------|
| <b>Intercepto</b>        | -33.33667  | 16.25301       | -2.051  | 0.040        |
| <b>Maltosa</b>           | -20.10201  | 8.58472        | -2.342  | <b>0.019</b> |
| <b>Edad</b>              | 0.04534    | 0.08382        | 0.541   | 0.589        |
| <b>Hábito tabáquico</b>  | -7.09917   | 3.34766        | -2.121  | 0.034        |
| <b>Enolismo</b>          | 4.9805     | 3.65354        | 1.363   | 0.173        |
| <b>Diabetes Mellitus</b> | -3.8076    | 2.78181        | -1.369  | 0.171        |
| <b>Hipertensión</b>      | -2.75427   | 2.00979        | -1.37   | 0.171        |
| <b>Dislipemia</b>        | -0.79143   | 1.37377        | -0.576  | 0.565        |

**Tabla 13. Resultados de la regresión logística multivariante para el ácido etilmalónico.**

|                           | Estimación | Error estándar | Valor z | p-valor      |
|---------------------------|------------|----------------|---------|--------------|
| <b>Intercepto</b>         | 10.8493    | 12.0264        | 0.902   | 0.367        |
| <b>Ácido etilmalónico</b> | 38.7982    | 20.4138        | 1.901   | <b>0.050</b> |
| <b>Edad</b>               | -0.2937    | 0.2301         | -1.277  | 0.202        |
| <b>Hábito tabáquico</b>   | -6.0979    | 4.3267         | -1.409  | 0.159        |
| <b>Enolismo</b>           | 5.9661     | 4.7606         | 1.253   | 0.210        |
| <b>Diabetes Mellitus</b>  | -1.8831    | 2.9129         | -0.646  | 0.518        |
| <b>Hipertensión</b>       | -3.6088    | 2.0489         | -1.761  | 0.078        |
| <b>Dislipemia</b>         | -3.1132    | 3.307          | -0.941  | 0.347        |

**Tabla 14. Resultados de la regresión logística multivariante para el glicerol.**

|                          | Estimación | Error estándar | Valor z | p-valor           |
|--------------------------|------------|----------------|---------|-------------------|
| <b>Intercepto</b>        | 9.09337    | 4.20491        | 2.163   | 0.031             |
| <b>Glicerol</b>          | 12.00125   | 3.49392        | 3.435   | <b>&lt; 0.001</b> |
| <b>Edad</b>              | -0.13802   | 0.06048        | -2.282  | 0.022             |
| <b>Hábito tabáquico</b>  | -3.78561   | 1.26817        | -2.985  | <b>0.003</b>      |
| <b>Enolismo</b>          | 3.00665    | 1.20745        | 2.49    | <b>0.012</b>      |
| <b>Diabetes Mellitus</b> | -2.30035   | 1.4472         | -1.59   | 0.112             |
| <b>Hipertensión</b>      | -1.81159   | 1.0648         | -1.701  | 0.089             |
| <b>Dislipemia</b>        | -1.44918   | 1.23076        | -1.177  | 0.239             |

**Tabla 15. Resultados de la regresión logística multivariante para la taurina.**

|                   | Estimación | Error estándar | Valor z | p-valor           |
|-------------------|------------|----------------|---------|-------------------|
| Intercepto        | 4.75473    | 2.99625        | 1.587   | 0.113             |
| Taurina           | -8.35706   | 2.17809        | -3.837  | <b>&lt; 0.001</b> |
| Edad              | -0.05789   | 0.04146        | -1.396  | 0.163             |
| Hábito tabáquico  | -3.83066   | 0.9725         | -3.939  | <b>&lt; 0.001</b> |
| Enolismo          | 2.53509    | 0.95736        | 2.648   | <b>0.008</b>      |
| Diabetes Mellitus | -1.78179   | 1.0067         | -1.77   | 0.077             |
| Hipertensión      | -1.09415   | 0.77555        | -1.411  | 0.158             |
| Dislipemia        | -1.03329   | 0.88516        | -1.167  | 0.243             |

**Tabla 16. Resultados de la regresión logística multivariante para el ácido glutámico.**

|                   | Estimación | Error estándar | Valor z | p-valor           |
|-------------------|------------|----------------|---------|-------------------|
| Intercepto        | 9.29391    | 3.3234         | 2.797   | 0.005             |
| Ácido glutámico   | -8.8567    | 2.39118        | -3.704  | <b>&lt; 0.001</b> |
| Edad              | -0.02639   | 0.03961        | -0.666  | 0.505             |
| Hábito tabáquico  | -3.03474   | 0.92333        | -3.287  | <b>0.001</b>      |
| Enolismo          | 2.95339    | 0.96203        | 3.07    | <b>0.002</b>      |
| Diabetes Mellitus | -2.1854    | 1.13256        | -1.93   | 0.053             |
| Hipertensión      | -1.48553   | 0.76119        | -1.952  | 0.051             |
| Dislipemia        | -1.42388   | 0.79916        | -1.782  | 0.075             |

**Tabla 17. Resultados de la regresión logística multivariante para el ácido 3-fosfoglicérico.**

|                        | Estimación | Error estándar | Valor z | p-valor           |
|------------------------|------------|----------------|---------|-------------------|
| Intercepto             | -1.92177   | 3.34544        | -0.574  | 0.566             |
| Ácido 3-fosfoglicérico | -3.23908   | 0.97827        | -3.311  | <b>&lt; 0.001</b> |
| Edad                   | -0.04052   | 0.03841        | -1.055  | 0.292             |
| Hábito tabáquico       | -2.98469   | 0.92294        | -3.234  | <b>0.001</b>      |
| Enolismo               | 1.96722    | 0.90012        | 2.186   | <b>0.029</b>      |
| Diabetes Mellitus      | -1.37402   | 0.9969         | -1.378  | 0.168             |
| Hipertensión           | -0.80526   | 0.70561        | -1.141  | 0.254             |
| Dislipemia             | -0.99735   | 0.78929        | -1.264  | 0.206             |

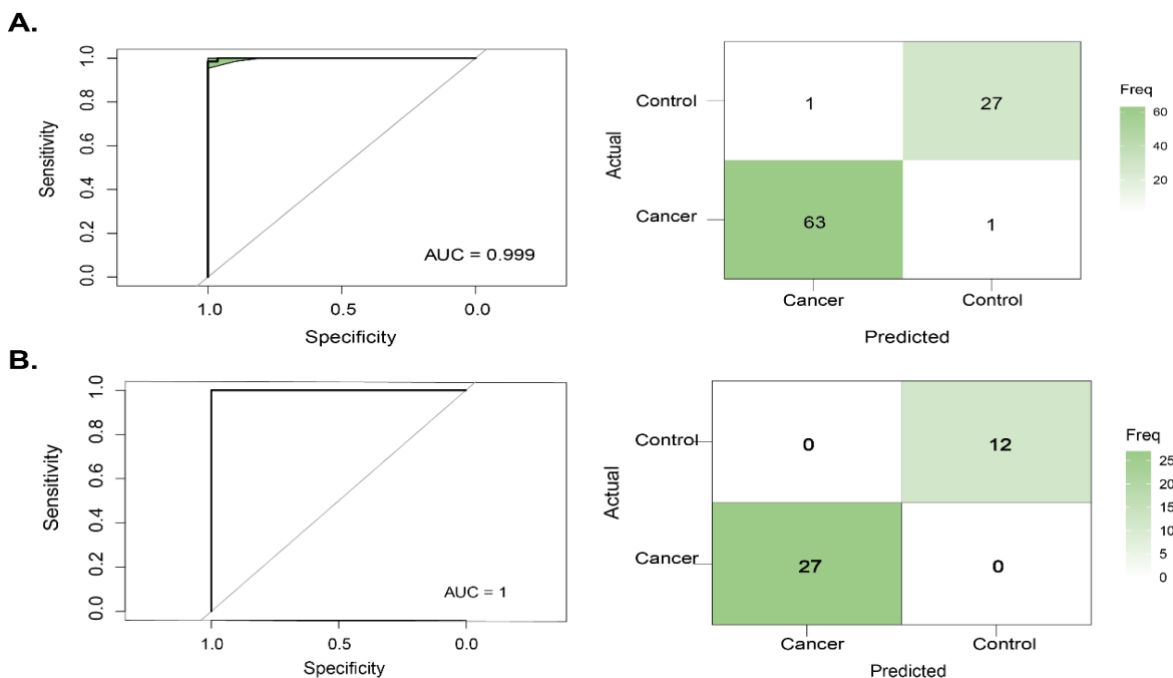
**Tabla 18. Resultados de la regresión logística multivariante para la d-arabinosa.**

|                   | Estimación | Error estándar | Valor z | p-valor           |
|-------------------|------------|----------------|---------|-------------------|
| Intercepto        | -4.2846    | 3.54678        | -1.208  | 0.227             |
| d-arabinosa       | -7.72922   | 2.25804        | -3.423  | <b>&lt; 0.001</b> |
| Edad              | -0.0323    | 0.03987        | -0.81   | 0.418             |
| Hábito tabáquico  | -3.90625   | 0.97243        | -4.017  | <b>&lt; 0.001</b> |
| Enolismo          | 2.79893    | 0.92001        | 3.042   | <b>0.002</b>      |
| Diabetes Mellitus | -1.81408   | 1.0368         | -1.75   | 0.081             |
| Hipertensión      | -1.21821   | 0.74963        | -1.625  | 0.104             |
| Dislipemia        | -0.66827   | 0.82192        | -0.813  | 0.416             |

**Tabla 20. Resultados de la regresión logística multivariante para el ácido glicólico.**

|                          | Estimación | Error estándar | Valor z | p-valor           |
|--------------------------|------------|----------------|---------|-------------------|
| <b>Intercepto</b>        | 15.87715   | 4.90564        | 3.237   | 0.001             |
| <b>Ácido glicólico</b>   | 18.14854   | 4.93233        | 3.68    | <b>&lt; 0.001</b> |
| <b>Edad</b>              | -0.03423   | 0.04789        | -0.715  | 0.475             |
| <b>Hábito tabáquico</b>  | -4.7259    | 1.0859         | -4.352  | <b>&lt; 0.001</b> |
| <b>Enolismo</b>          | 2.13776    | 0.94536        | 2.261   | <b>0.024</b>      |
| <b>Diabetes Mellitus</b> | -0.85069   | 1.12064        | -0.759  | 0.448             |
| <b>Hipertensión</b>      | -1.31428   | 0.73793        | -1.781  | 0.075             |
| <b>Dislipemia</b>        | -2.21359   | 0.93015        | -2.38   | 0.017             |

Finalmente, se entrenó y probó un modelo predictivo multivariante utilizando un algoritmo SVM basado exclusivamente en aquellos metabolitos que habían obtenido en el análisis previo una puntuación VIP superior a 1.5 puntos. La curva ROC generada para evaluar el rendimiento del modelo en el conjunto de datos de entrenamiento mostró un AUC de 0.999, sugiriendo una alta precisión para clasificar los individuos sanos de los pacientes con CPNM (Figura 19A). El modelo fue evaluado de manera independiente con un conjunto de datos de validación y los resultados fueron aún más notables, consiguiendo un AUC de 1, lo que indica una discriminación perfecta entre los dos grupos y un potencial considerable para su aplicación en entornos clínicos (Figura 19B).



**Figura 20. El modelo multivariante SMV mostró un rendimiento excepcional para la discriminación entre pacientes con CPNM y el grupo control. A) La curva ROC obtenida con los datos de entrenamiento alcanzó un AUC de 0.999 y una matriz de confusión con pocos errores. B) La curva ROC presentó un AUC de 1 para el conjunto de datos de validación.**

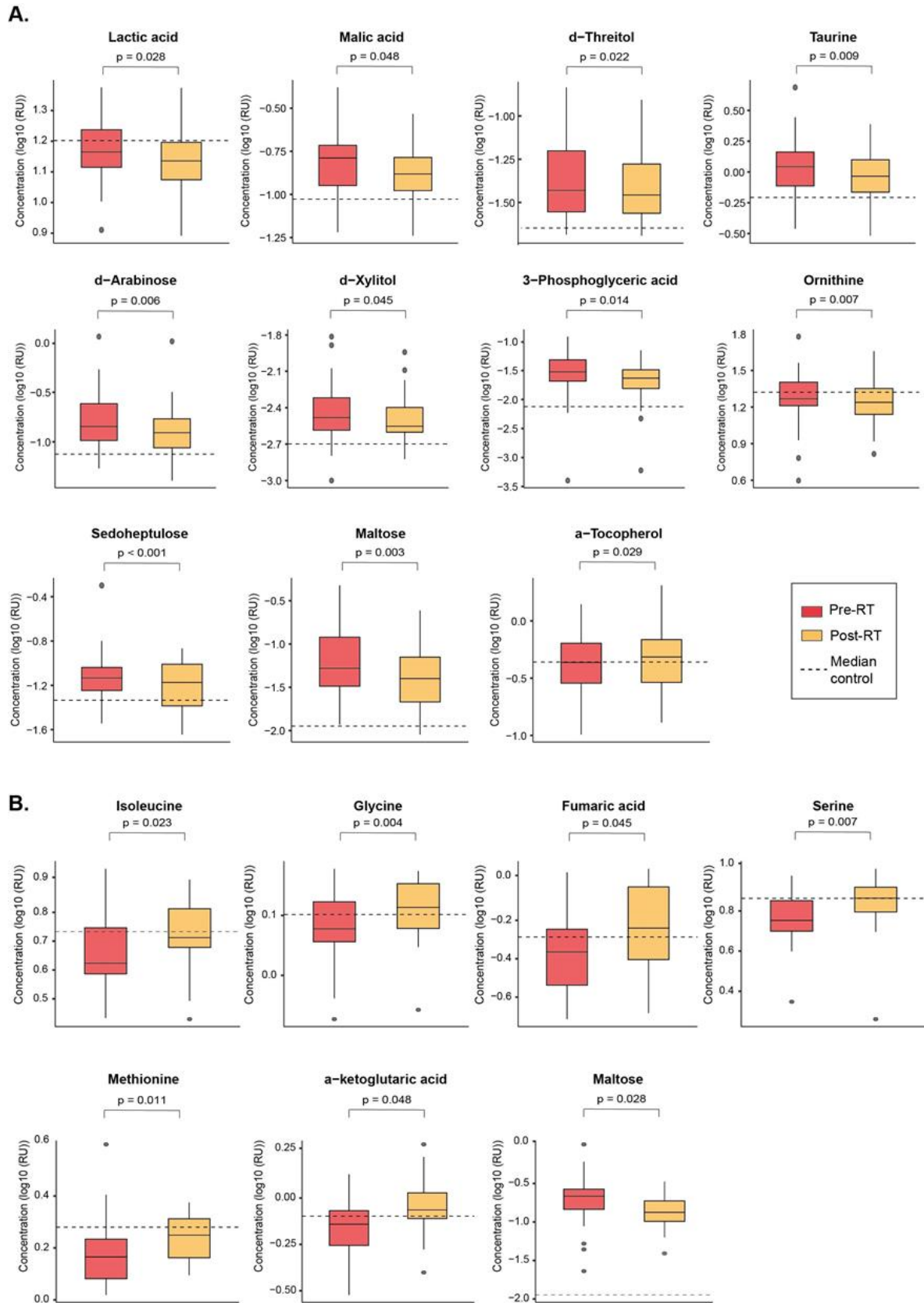


### 3. CAMBIOS EN EL PERFIL METABOLÓMICO INDUCIDOS POR CRT Y SBRT

Las dos modalidades de RT produjeron cambios en los perfiles metabólicos de los pacientes con CPNM. En los pacientes tratados con SBRT, se observó una tendencia hacia la normalización de algunos metabolitos, con una disminución significativa en las concentraciones plasmáticas de maltosa, ácido 3-fosfoglicérico, taurina, d-arabinosa, sedoheptulosa, ácido málico, d-xilitol y d-treitol. Sin embargo, no todos los cambios fueron en dirección a la normalización. También se observó una disminución en los niveles de ácido láctico y ornitina, junto con un aumento de los niveles de  $\alpha$ -tocoferol, alejándose aún más de los perfiles del grupo control (Figura 21A y Tabla 21).

En contraste, aquellos pacientes tratados con CRT presentaron una menor concentración de maltosa y mayores concentraciones de metionina, serina, isoleucina, glicina, ácido  $\alpha$ -cetoglutárico y ácido fumárico. Estos cambios indican un retorno parcial a los niveles normales para estos metabolitos (Figura 21B y Tabla 22).

Cabe destacar que la maltosa fue el único metabolito que mostró cambios similares después de ambas modalidades, SBRT y CRT.



**Figura 21. Cambios significativos en el perfil metabólico después de recibir (A) SBRT o (B) CRT.** Las significancias estadísticas se calcularon utilizando la prueba de Wilcoxon. La línea discontinua representa el valor medio de los controles sanos. Los resultados se muestran como log<sub>10</sub> de Unidades Relativas (RU). SBRT: Radioterapia corporal estereotáctica, CRT: Radioterapia conformada.

**Tabla 21. Perfil metabólico de pacientes con CPNM pre- SBRT y post-SBRT.**

|   | Pre - SBRT           | Post - SBRT          | p            |
|---|----------------------|----------------------|--------------|
| <b>Metabolitos plasmáticos</b>                          | <b>n = 45</b>        | <b>n = 45</b>        |              |
| Ácido pirúvico  | 6.18 [4.91, 7.79]    | 4.83 [3.56, 7.19]    | 0.052        |
| Ácido láctico   | 14.61 [12.94, 17.27] | 13.68 [11.86, 15.70] | <b>0.028</b> |
| Ácido 2-hidroxiisobutírico                              | 0.45 [0.37, 0.64]    | 0.52 [0.37, 0.71]    | 0.495        |
| Ácido glicólico   | 0.20 [0.17, 0.22]    | 0.18 [0.16, 0.22]    | 0.297        |
| Alanina   | 2.94 [2.62, 3.56]    | 2.87 [2.56, 3.53]    | 0.346        |
| Ácido 2-hidroxiisobutírico                              | 3.98 [2.88, 5.72]    | 3.75 [2.36, 4.89]    | 0.105        |
| Ácido 3-metil-2-oxobutírico                             | 0.11 [0.09, 0.14]    | 0.11 [0.09, 0.15]    | 0.947        |
| Ácido 3-hidroxiisobutírico / ácido 3-hidroxiisobutírico | 2.07 [0.99, 6.44]    | 2.11 [1.26, 3.99]    | 0.687        |
| Ácido 2-hidroxiisovalérico                              | 1.57 [1.13, 2.58]    | 1.62 [1.06, 2.17]    | 0.200        |
| Ácido 2-ceto-3-metilvalérico                            | 0.21 [0.17, 0.27]    | 0.20 [0.16, 0.26]    | 0.395        |
| Ácido 3-hidroxiisovalérico                              | 0.30 [0.24, 0.34]    | 0.29 [0.22, 0.33]    | 0.313        |
| Valina  | 17.68 [15.62, 20.25] | 18.20 [15.55, 20.60] | 1.000        |
| Ácido benzoico  | 0.30 [0.22, 0.38]    | 0.26 [0.20, 0.37]    | 0.341        |
| Etanolamina   | 0.30 [0.25, 0.35]    | 0.29 [0.27, 0.35]    | 0.576        |
| Leucina   | 9.39 [7.90, 11.13]   | 9.13 [8.13, 10.79]   | 0.553        |
| Ácido fosfórico   | 3.62 [2.78, 4.12]    | 3.88 [3.04, 4.32]    | 0.440        |
| Glicerol  | 0.94 [0.68, 1.31]    | 0.85 [0.70, 1.24]    | 0.754        |
| Ácido etilmalónico                                      | 1.16 [0.79, 1.42]    | 1.01 [0.84, 1.20]    | 0.297        |
| Isoleucina  | 5.16 [3.95, 6.09]    | 4.95 [4.18, 6.21]    | 0.938        |
| Prolina   | 23.07 [13.62, 28.29] | 19.91 [12.78, 29.03] | 0.788        |
| Glicina   | 1.31 [1.17, 1.40]    | 1.29 [1.24, 1.37]    | 0.257        |
| Ácido succínico   | 0.10 [0.09, 0.14]    | 0.10 [0.08, 0.13]    | 0.061        |
| Ácido glicérico   | 0.66 [0.55, 0.89]    | 0.65 [0.54, 0.79]    | 0.584        |
| Ácido fumárico  | 0.48 [0.22, 0.72]    | 0.37 [0.24, 0.57]    | 0.440        |
| Serina  | 5.82 [4.41, 6.94]    | 5.95 [5.18, 7.32]    | 0.531        |
| Treonina  | 6.75 [5.98, 8.00]    | 7.37 [6.11, 8.62]    | 0.143        |
| Ácido hidrocínámico                                     | 0.12 [0.07, 0.17]    | 0.11 [0.08, 0.16]    | 0.858        |
| Ácido málico  | 0.14 [0.10, 0.19]    | 0.13 [0.11, 0.16]    | <b>0.048</b> |
| d-Treitól   | 0.04 [0.03, 0.06]    | 0.03 [0.03, 0.05]    | <b>0.022</b> |
| Metionina   | 1.66 [1.44, 2.17]    | 1.72 [1.54, 2.03]    | 0.252        |
| Oxoprolina  | 62.55 [50.28, 69.05] | 52.12 [47.24, 70.23] | 0.163        |
| 4-Hidroxioprolina                                       | 1.91 [1.58, 2.68]    | 2.09 [1.45, 3.21]    | 0.335        |
| Ácido treónico  | 2.40 [1.84, 4.07]    | 2.37 [1.97, 3.53]    | 1.000        |
| Ácido eritrónico  | 0.13 [0.09, 0.26]    | 0.15 [0.09, 0.22]    | 0.771        |
| Ácido DL-2-hidroxiisovalérico                           | 0.06 [0.05, 0.08]    | 0.06 [0.05, 0.07]    | 0.639        |
| Ácido a-cetoglutarico                                   | 0.75 [0.59, 0.87]    | 0.68 [0.55, 0.87]    | 0.084        |
| Ácido glutámico   | 5.94 [4.29, 7.36]    | 5.33 [4.12, 6.95]    | 0.185        |
| Ácido 4-hidroxiisovalérico                              | 0.03 [0.03, 0.04]    | 0.03 [0.02, 0.04]    | 0.069        |
| Fenilalanina  | 6.72 [5.89, 8.17]    | 6.82 [5.92, 7.49]    | 0.453        |
| Ácido dodecanoico                                       | 0.25 [0.16, 0.34]    | 0.22 [0.17, 0.31]    | 0.849        |
| d-Xilosa  | 0.06 [0.04, 0.09]    | 0.05 [0.03, 0.07]    | 0.181        |
| Taurina   | 1.10 [0.77, 1.52]    | 0.92 [0.69, 1.25]    | <b>0.009</b> |
| d-Arabinosa   | 0.15 [0.10, 0.24]    | 0.12 [0.09, 0.17]    | <b>0.006</b> |
| d-Xilitol   | 0.00 [0.00, 0.00]    | 0.00 [0.00, 0.00]    | <b>0.045</b> |
| d-Arabitól  | 0.02 [0.02, 0.03]    | 0.02 [0.02, 0.04]    | 0.823        |
| Glicerol-1-fosfato                                      | 0.07 [0.06, 0.09]    | 0.08 [0.06, 0.09]    | 0.071        |
| Glutamina   | 37.53 [23.67, 43.96] | 35.99 [24.35, 43.01] | 0.128        |

|                              |                        |                       |              |
|------------------------------|------------------------|-----------------------|--------------|
| Ácido xilónico               | 0.08 [0.05, 0.12]      | 0.09 [0.05, 0.12]     | 0.341        |
| Ácido ribónico               | 0.02 [0.01, 0.05]      | 0.02 [0.02, 0.04]     | 0.866        |
| Ácido 3-fosfoglicérico       | 0.03 [0.02, 0.05]      | 0.02 [0.02, 0.03]     | <b>0.014</b> |
| Ornitina                     | 18.54 [16.25, 25.32]   | 17.31 [13.80, 22.48]  | <b>0.007</b> |
| Ácido cítrico                | 100.70 [68.09, 138.61] | 85.88 [69.23, 136.88] | 0.488        |
| Ácido tetradecanoico         | 1.03 [0.74, 1.45]      | 0.94 [0.77, 1.33]     | 0.663        |
| Ácido hipúrico               | 1.05 [0.61, 2.12]      | 1.35 [0.50, 2.67]     | 0.297        |
| Ácido vanililmandélico       | 0.03 [0.02, 0.05]      | 0.03 [0.02, 0.04]     | 0.938        |
| Ácido 4-hidroxifenil láctico | 2.41 [1.93, 3.76]      | 2.42 [1.72, 3.31]     | 0.352        |
| d-Fructosa                   | 0.04 [0.03, 0.09]      | 0.03 [0.03, 0.08]     | 0.225        |
| d-Manitol                    | 0.16 [0.09, 0.55]      | 0.16 [0.07, 0.59]     | 0.884        |
| Ácido d-manónico             | 0.17 [0.10, 0.28]      | 0.17 [0.11, 0.30]     | 0.704        |
| d-Galactitol                 | 0.02 [0.02, 0.03]      | 0.02 [0.01, 0.03]     | 0.192        |
| Ácido galacturónico          | 0.08 [0.05, 0.11]      | 0.07 [0.06, 0.12]     | 0.893        |
| Ácido galactónico            | 0.01 [0.00, 0.02]      | 0.01 [0.00, 0.02]     | 0.623        |
| Ácido sacárico               | 0.10 [0.06, 0.17]      | 0.10 [0.07, 0.18]     | 0.248        |
| Ácido indol-3-propanoico     | 0.06 [0.03, 0.10]      | 0.06 [0.04, 0.09]     | 0.407        |
| Myo-inositol                 | 0.89 [0.73, 1.19]      | 0.79 [0.61, 1.14]     | 0.276        |
| Ácido úrico                  | 12.55 [8.16, 15.79]    | 11.77 [10.17, 15.28]  | 0.576        |
| Sedoheptulosa                | 0.08 [0.06, 0.09]      | 0.07 [0.04, 0.10]     | <b>0.024</b> |
| Ácido indoleláctico          | 0.53 [0.45, 0.68]      | 0.49 [0.38, 0.74]     | 0.540        |
| Ácido linoleico              | 1.68 [1.09, 2.84]      | 1.91 [1.18, 2.70]     | 0.427        |
| Ácido oleico                 | 11.53 [5.67, 20.14]    | 12.17 [7.40, 17.05]   | 0.553        |
| Glucosa 6-fosfato            | 0.01 [0.00, 0.01]      | 0.01 [0.00, 0.01]     | 0.240        |
| d-Sacarosa                   | 0.07 [0.02, 0.17]      | 0.05 [0.02, 0.13]     | 0.313        |
| Maltosa                      | 0.05 [0.03, 0.12]      | 0.04 [0.02, 0.07]     | <b>0.003</b> |
| a-Tocoferol                  | 0.43 [0.26, 0.62]      | 0.48 [0.29, 0.69]     | <b>0.029</b> |

Los datos se expresan como mediana [rango intercuartílico] y las diferencias se analizaron mediante la prueba de Wilcoxon. SBRT: Radioterapia corporal estereotáctica.

**Tabla 22. Perfil metabólico de pacientes con CPNM pre- CRT y post- CRT.**

|   | Pre - CRT            | Post -CRT            | p     |
|---|----------------------|----------------------|-------|
| Metabolitos plasmáticos                               | n = 23               | n = 23               |       |
| Ácido pirúvico  | 8.02 [5.22, 10.28]   | 6.44 [5.39, 8.70]    | 0.709 |
| Ácido láctico   | 13.87 [12.53, 18.87] | 15.75 [14.12, 19.51] | 0.520 |
| Ácido 2-hidroxiisobutírico                            | 0.38 [0.35, 0.49]    | 0.43 [0.32, 0.52]    | 0.393 |
| Ácido glicólico                                       | 0.19 [0.16, 0.23]    | 0.18 [0.17, 0.23]    | 0.560 |
| Alanina   | 3.02 [2.52, 3.37]    | 3.52 [3.08, 3.68]    | 0.111 |
| Ácido 2-hidroxi butírico                              | 4.02 [2.58, 5.54]    | 3.89 [3.05, 5.15]    | 0.754 |
| Ácido 3-metil-2-oxobutírico                           | 0.11 [0.09, 0.14]    | 0.11 [0.08, 0.13]    | 0.893 |
| Ácido 3-hidroxi butírico / ácido 3-hidroxiisobutírico | 1.41 [0.85, 2.72]    | 1.71 [0.80, 2.56]    | 0.731 |
| Ácido 2-hidroxiisovalérico                            | 1.17 [1.06, 2.32]    | 1.44 [1.03, 1.80]    | 0.377 |
| Ácido 2-ceto-3-metilvalérico                          | 0.25 [0.16, 0.29]    | 0.25 [0.20, 0.34]    | 0.119 |
| Ácido 3-hidroxiisovalérico                            | 0.24 [0.20, 0.30]    | 0.25 [0.22, 0.30]    | 0.800 |
| Valina  | 16.11 [13.51, 20.49] | 17.48 [14.35, 19.98] | 0.540 |
| Ácido benzoico  | 0.21 [0.18, 0.25]    | 0.19 [0.16, 0.23]    | 0.377 |
| Etanolamina   | 0.27 [0.25, 0.32]    | 0.27 [0.24, 0.32]    | 0.329 |
| Leucina   | 7.44 [6.60, 11.02]   | 8.75 [7.78, 11.34]   | 0.126 |
| Ácido fosfórico                                       | 4.11 [3.01, 4.79]    | 4.42 [3.52, 5.27]    | 0.111 |
| Glicerol  | 0.51 [0.38, 0.81]    | 0.51 [0.37, 0.84]    | 0.893 |
| Ácido etilmalónico                                    | 0.92 [0.69, 1.20]    | 0.87 [0.71, 1.24]    | 0.917 |

|                             |                       |                        |              |
|-----------------------------|-----------------------|------------------------|--------------|
| Isoleucina                  | 4.25 [3.88, 5.68]     | 5.16 [4.77, 6.49]      | <b>0.023</b> |
| Prolina                     | 30.04 [23.39, 34.46]  | 32.01 [23.99, 39.55]   | 0.520        |
| Glicina                     | 1.19 [1.12, 1.32]     | 1.30 [1.20, 1.42]      | <b>0.004</b> |
| Ácido succínico             | 0.10 [0.08, 0.11]     | 0.09 [0.08, 0.11]      | 0.445        |
| Ácido glicérico             | 0.78 [0.52, 1.03]     | 0.65 [0.54, 0.89]      | 0.988        |
| Ácido fumárico              | 0.46 [0.30, 0.58]     | 0.57 [0.39, 0.94]      | <b>0.045</b> |
| Serina                      | 6.57 [5.00, 7.48]     | 7.30 [6.24, 8.29]      | <b>0.007</b> |
| Treonina                    | 6.71 [5.48, 7.60]     | 7.30 [6.47, 8.93]      | 0.061        |
| Ácido hidrocínámico         | 0.09 [0.04, 0.17]     | 0.08 [0.05, 0.11]      | 0.377        |
| Ácido málico                | 0.11 [0.09, 0.15]     | 0.12 [0.08, 0.17]      | 0.964        |
| d-Treitól                   | 0.03 [0.03, 0.04]     | 0.03 [0.02, 0.04]      | 0.463        |
| Metionina                   | 1.45 [1.26, 1.70]     | 1.77 [1.45, 2.05]      | <b>0.011</b> |
| Oxoprolina                  | 53.20 [45.73, 65.12]  | 49.38 [44.43, 59.26]   | 0.427        |
| 4-Hidroxiprolina            | 1.60 [1.18, 1.80]     | 1.89 [1.27, 2.87]      | 0.151        |
| Ácido treónico              | 2.64 [2.16, 3.13]     | 2.96 [2.23, 3.78]      | 0.179        |
| Ácido eritrónico            | 0.07 [0.06, 0.09]     | 0.07 [0.06, 0.09]      | 0.709        |
| Ácido DL-2-hidroxiglutámico | 0.05 [0.04, 0.06]     | 0.05 [0.04, 0.06]      | 0.360        |
| Ácido a-cetoglutámico       | 0.73 [0.62, 0.93]     | 0.86 [0.78, 1.07]      | <b>0.048</b> |
| Ácido glutámico             | 9.80 [8.85, 11.61]    | 9.64 [7.46, 13.22]     | 0.463        |
| Ácido 4-hidroxibenzoico     | 0.04 [0.03, 0.05]     | 0.03 [0.02, 0.04]      | 0.134        |
| Fenilalanina                | 6.48 [5.41, 7.38]     | 6.85 [5.91, 7.99]      | 0.080        |
| Ácido dodecanoico           | 0.23 [0.18, 0.26]     | 0.19 [0.16, 0.26]      | 0.540        |
| d-Xilosa                    | 0.04 [0.03, 0.06]     | 0.04 [0.03, 0.06]      | 0.974        |
| Taurina                     | 1.49 [1.12, 1.69]     | 1.27 [0.85, 1.63]      | 0.111        |
| d-Arabinosa                 | 0.15 [0.11, 0.18]     | 0.12 [0.08, 0.19]      | 0.160        |
| d-Xilitol                   | 0.00 [0.00, 0.00]     | 0.00 [0.00, 0.00]      | 0.465        |
| d-Arabitól                  | 0.02 [0.02, 0.03]     | 0.02 [0.02, 0.03]      | 0.893        |
| Glicerol-1-fosfato          | 0.06 [0.05, 0.07]     | 0.06 [0.05, 0.07]      | 0.501        |
| Glutamina                   | 23.29 [14.34, 28.37]  | 27.46 [17.09, 36.59]   | 0.151        |
| Ácido xilónico              | 0.03 [0.03, 0.05]     | 0.04 [0.03, 0.05]      | 0.709        |
| Ácido ribónico              | 0.01 [0.01, 0.02]     | 0.01 [0.01, 0.02]      | 0.823        |
| Ácido 3-fosfoglicérico      | 0.04 [0.03, 0.05]     | 0.04 [0.03, 0.06]      | 0.284        |
| Ornitina                    | 14.43 [12.52, 17.51]  | 17.37 [13.03, 22.16]   | 0.427        |
| Ácido cítrico               | 97.40 [68.36, 123.65] | 105.55 [70.49, 148.37] | 0.234        |
| Ácido tetradecanoico        | 1.00 [0.81, 1.12]     | 0.79 [0.74, 1.17]      | 0.731        |
| Ácido hipúrico              | 0.81 [0.12, 1.40]     | 0.62 [0.06, 1.58]      | 0.754        |
| Ácido vanililmandélico      | 0.02 [0.02, 0.03]     | 0.02 [0.02, 0.03]      | 0.687        |
| Ácido 4-hidroxifeniláctico  | 2.28 [1.86, 2.87]     | 2.22 [1.90, 3.15]      | 0.223        |
| d-Fructosa                  | 0.05 [0.04, 0.17]     | 0.05 [0.03, 0.12]      | 0.871        |
| d-Manitol                   | 0.08 [0.05, 0.30]     | 0.05 [0.04, 0.08]      | 0.065        |
| Ácido d-manónico            | 0.12 [0.10, 0.20]     | 0.11 [0.08, 0.23]      | 0.643        |
| d-Galactitol                | 0.02 [0.02, 0.03]     | 0.03 [0.02, 0.03]      | 0.673        |
| Ácido galacturónico         | 0.07 [0.06, 0.09]     | 0.06 [0.04, 0.08]      | 0.329        |
| Ácido galactónico           | 0.01 [0.00, 0.02]     | 0.01 [0.00, 0.01]      | 0.665        |
| Ácido sacárico              | 0.06 [0.04, 0.08]     | 0.05 [0.04, 0.07]      | 0.345        |
| Ácido indol-3-propanoico    | 0.05 [0.03, 0.09]     | 0.05 [0.04, 0.09]      | 0.846        |
| Myo-inositol                | 0.95 [0.69, 1.06]     | 0.83 [0.68, 1.02]      | 0.665        |
| Ácido úrico                 | 9.96 [6.60, 19.11]    | 8.98 [4.79, 20.50]     | 0.520        |
| Sedoheptulosa               | 0.05 [0.04, 0.07]     | 0.05 [0.04, 0.06]      | 0.200        |
| Ácido indoleláctico         | 0.46 [0.32, 0.62]     | 0.37 [0.29, 0.47]      | 0.061        |
| Ácido linoleico             | 0.93 [0.63, 1.55]     | 1.04 [0.69, 1.96]      | 0.731        |
| Ácido oleico                | 8.05 [4.04, 11.33]    | 9.58 [4.69, 14.85]     | 0.777        |
| Glucosa 6-fosfato           | 0.01 [0.01, 0.01]     | 0.01 [0.01, 0.01]      | 0.846        |
| d-Sacarosa                  | 0.09 [0.05, 0.13]     | 0.08 [0.04, 0.13]      | 0.870        |
| Maltosa                     | 0.22 [0.13, 0.24]     | 0.13 [0.10, 0.19]      | <b>0.028</b> |
| a-Tocoferol                 | 0.39 [0.27, 0.43]     | 0.40 [0.24, 0.60]      | 0.893        |

Los datos se expresan como mediana [rango intercuartílico] de Unidades Relativas (RU) y las diferencias se analizaron mediante la prueba de Wilcoxon. CRT: Radioterapia conformada.

# DISCUSIÓN



## DISCUSIÓN

El CP es actualmente el tumor con mayor prevalencia a nivel mundial. La oncología se enfrenta a un gran desafío en el abordaje del CPNM, siendo necesaria la búsqueda de biomarcadores que permitan realizar un diagnóstico precoz y a la vez, determinar la respuesta al tratamiento oncológico y a los posibles efectos secundarios derivados del mismo, lo que podría mejorar significativamente la calidad de vida de los pacientes.

Los resultados de esta tesis, a partir de un ensayo clínico, prospectivo, no aleatorizado con un grupo control y un grupo intervención de pacientes con CPNM tratados con diferentes modalidades de RT (CRT y SBRT), muestran un análisis detallado de su perfil metabólico antes y después de la administración de la RT, ofreciendo una visión más profunda de las alteraciones metabólicas que caracterizan este tipo de cáncer y la respuesta metabólica al tratamiento.

Los pacientes con CPNM, en comparación con los controles sanos, presentaron alteraciones significativas en las concentraciones plasmáticas de los metabolitos involucrados en la glicólisis, el ciclo del TCA y el metabolismo de los aminoácidos antes de la administración de RT. Después de la RT (post-RT), se observó una tendencia hacia la normalización en los niveles de varios metabolitos que sugiere una respuesta terapéutica positiva y una posible reducción de la actividad metabólica tumoral.

Los metabolitos con mayor potencial para poder distinguir entre individuos sanos y pacientes con CPNM fueron la maltosa, el ácido 3-fosfoglicérico, la taurina, el ácido glutámico o glutamato y la D-arabinosa, los cuales presentaron concentraciones más elevadas en los pacientes con CPNM. Asimismo, el ácido etilmalónico, el glicerol y el ácido glicólico, que presentaron niveles disminuidos en pacientes con CPNM, también resultaron claves para la diferenciación entre los grupos. Las curvas ROC univariantes generadas para cada uno de estos metabolitos mostraron altos valores de AUC, subrayando su potencial como prometedores biomarcadores para el diagnóstico. Asimismo, las diferencias entre las concentraciones de estos 8 metabolitos entre controles y pacientes siguieron siendo significativas cuando se ajustaron por un análisis multivariante incluyendo variables clínicas y comorbilidades. Además, la curva ROC generada a partir del algoritmo de clasificación SVM y basada en este conjunto de metabolitos, demostró una alta eficiencia en la discriminación entre los pacientes con CPNM y los controles sanos, proporcionando una clasificación clara y precisa.

La maltosa es un disacárido compuesto por dos moléculas de glucosa que surge del



catabolismo de carbohidratos complejos por la acción de la maltasa. Las concentraciones plasmáticas elevadas de maltosa en pacientes con CPNM podrían ser una respuesta adaptativa al entorno metabólico alterado del tumor, con el objetivo de satisfacer sus necesidades energéticas y biosintéticas <sup>[211]</sup>. Miyamoto et al.<sup>[8]</sup> reportan niveles elevados de maltosa, glicerol y ácido láctico en sangre, que pueden discriminar los pacientes con CP de los controles sanos.

El ácido 3-fosfoglicérico es un metabolito intermediario de la glicólisis, que desempeña un papel crucial en la generación de ATP. Bajo condiciones normales, se convierte en piruvato, el cual ingresa a las mitocondrias para su completa oxidación en el ciclo del TCA. Sin embargo, la persistencia de una actividad glicolítica elevada en las células cancerosas, incluso en presencia de oxígeno, efecto Warburg y la reprogramación metabólica del tumor, priorizan la generación de metabolitos intermediarios que apoyan la biosíntesis de macromoléculas necesarias para el crecimiento y proliferación tumoral, teniendo como consecuencia, en este caso, el aumento del ácido 3-fosfoglicérico en los pacientes con CPNM <sup>[212,213]</sup>. Por otra parte, el ácido 3-fosfoglicérico interviene en la biosíntesis de serina/glicina y en la vía de producción del glicerol <sup>[214]</sup>. Ante un déficit de serina, las células tumorales utilizan hipoxantina como precursor de síntesis de purinas. Niveles elevados de ácido 3-fosfoglicérico e hipoxantina, favorecen el proceso de tumorigenesis <sup>[215]</sup>.

Por otra parte, la taurina, también conocida como ácido 2-aminoetanosulfónico, exhibe efectos reguladores en varios procesos celulares, incluida la modulación de la expresión de la N-acetil galactosaminil transferasa-2 y la inhibición de la metaloproteinasa-2 de la matriz, lo que impide la invasión y metástasis <sup>[195]</sup>. Además, la taurina muestra efectos inhibidores sobre la proliferación y propiedades pro-apoptóticas *in vitro* en células de CP A549, con su eficacia dependiendo de la dosis y la duración de la exposición <sup>[216]</sup>. Kumar et al. <sup>[217]</sup> reportan niveles elevados de taurina en suero y plasma de pacientes con CP, así como disminución de glutamina. El aumento en las concentraciones plasmáticas de taurina en pacientes con CPNM podría explicarse por un mecanismo de retroalimentación positiva que intenta contrarrestar el desarrollo del tumor.

El glutamato tiene un papel fundamental en la vía de glutaminólisis (conversión de glutamina a glutamato y alfa-cetoglutarato), un proceso catalizado por la glutaminasa en las mitocondrias. La sobreexpresión de la glutaminasa se ha descrito en pacientes con CPNM <sup>[218]</sup>. Fahrman et al. <sup>[202]</sup> correlacionan niveles elevados de glutamato y aspartato con la presencia de adenocarcinoma de pulmón, sugiriendo un papel como posibles

biomarcadores estos metabolitos. Wikoff et al. <sup>[201]</sup> describen niveles muy elevados de glutamato en pacientes con CPNM en estados iniciales y una baja concentración de glutamina, siendo los niveles de glutamato los únicos significativos en cuanto a detección de CP en este estudio. De igual manera, Zhao et al. <sup>[219]</sup> reportan niveles intratumorales elevados de glutamato comparado con el tejido peritumoral, sugiriendo un aumento de la glucogénesis tumoral, relacionado con los niveles séricos de glutamato. Mientras que otros estudios sugieren que los niveles de glutamato asociados al uso de PET-FDG podrían discriminar entre CP y enfermedades inflamatorias pulmonares <sup>[220]</sup>.

En cuanto al glicerol, una molécula que interviene en la síntesis de metabolitos intermediarios esenciales para la producción de componentes celulares vitales, como triglicéridos y fosfolípidos que forman parte de la membrana celular. Las concentraciones bajas de este metabolito en pacientes con CPNM pueden atribuirse a su consumo por parte del tejido tumoral, donde ocurre una síntesis acelerada de proteínas, ácidos nucleicos y membranas <sup>[221,222]</sup>.

Con respecto al ácido etilmalónico, es un ácido graso de cadena ramificada que ha llamado la atención en la investigación de enfermedades neurológicas asociadas con trastornos metabólicos congénitos. Curiosamente, los pacientes con errores innatos del metabolismo tienen predisposición a desarrollar cáncer <sup>[223]</sup>. Sin embargo, hasta la fecha no se ha informado sobre el papel potencial del ácido etilmalónico en la fisiopatología del inicio o desarrollo del cáncer. Algunos estudios investigan el papel del ácido etilmalónico en el cáncer de mama y próstata <sup>[224,225]</sup>.

En cuanto los niveles elevados de D-arabinosa y la disminución de los niveles plasmáticos de ácido glicólico en pacientes con CPNM, no se dispone de suficiente información. La D-arabinosa es un monosacárido de cinco carbonos que se encuentra principalmente en fuentes vegetales específicas, pero no forma parte de la ingesta dietética humana. En humanos, la síntesis endógena de D-arabinosa ocurre en cantidades insignificantes por la vía de las PPP. El ácido glicólico, un ácido orgánico simple, se deriva del metabolismo del ácido láctico catalizado por la lactato deshidrogenasa. Sin embargo, su papel en las vías metabólicas centrales es relativamente limitado en comparación con otros compuestos, y no juega un papel fundamental en ninguna vía metabólica significativa <sup>[226]</sup>. La disminución en los niveles de ácido glicólico en pacientes con CPNM podría atribuirse a su utilización como fuente

de energía. Aunque podría existir alguna relación entre D-arabinosa, las vías de PPP y metabolitos intermediarios de TCA [227].

Estas alteraciones relacionadas con el equilibrio energético en el CPNM se observan ampliamente en otras publicaciones [187,228]. Estos cambios metabólicos pueden explicarse debido a la reprogramación de múltiples vías por parte de las células tumorales (incluidas la glicólisis, el ciclo del TCA y el metabolismo de aminoácidos) para adquirir nutrientes y satisfacer las demandas biosintéticas, bioenergéticas y redox de las mismas [11,229].

En los últimos años, algunos estudios han explorado los cambios metabólicos en pacientes con CP, con el objetivo de implementarlos en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad. Estas investigaciones identificaron potenciales biomarcadores para distinguir entre pacientes con CP y personas sanas y/o incluso diferenciar entre diversas histologías y estadios de la enfermedad. Por ejemplo, Qi et al.[193] identificaron metabolitos, como el ácido palmítico, el ácido heptadecanoico, la 4-oxoprolina, el ácido tridecanoico y la ornitina como potenciales biomarcadores para el cribado del CP, logrando una capacidad discriminadora con valores de AUC que oscilan entre 0,82 y 0,86. Del mismo modo, Zhang et al.[9] destacaron el potencial predictivo de la fenilalanina, la fosfoetanolamina, la xantosina, la dehidroepiandrosterona, la glucosa, la fructosa, y los ácidos fenilacético, hidroxioxoglúterico, alcohólico, aminopentanoico y úrico en la evaluación del estadio y progresión del CP, mostrando una discriminación moderada con valores de AUC entre 0,70 y 0,80. Resultados más prometedores fueron reportados por Zhang et al.[198] con la identificación de lisofosfatidilcolina 20:3, fosfatidilcolina 40:6, ácido cítrico, ácido hidroxibutírico y ácido fumárico que muestran una precisión diagnóstica de 0,90 para el CP en estadios iniciales. Además, un estudio previo de nuestro grupo demostró que la determinación de ácido glutámico por sí sola podía diagnosticar el CP con una precisión del 0,90 [230]. Los hallazgos presentados en esta tesis subrayan la capacidad discriminadora excepcional de nuestro panel de 8 metabolitos, logrando un AUC de 1,0 y demostrando una discriminación perfecta entre pacientes con CPNM pre-RT y los casos controles. Esto representa un avance prometedor para el futuro del diagnóstico del CP.

En esta tesis se introduce un aspecto novedoso al identificar los cambios metabólicos inducidos por la CRT y la SBRT en pacientes con CPNM. Concretamente, se observó que ambas modalidades de tratamiento tienden a normalizar parcialmente las concentraciones de algunos metabolitos relacionados con el equilibrio energético,

mientras alteran otros. La comprensión de estos cambios metabólicos identificados podría facilitar la valoración de la respuesta al tratamiento, así como también contribuir en el pronóstico de los pacientes. Sin embargo, para ello se requiere considerar los mecanismos de acción de la RT y las vías biológicas alteradas por el cáncer y su tratamiento. Una disminución del metabolismo de la glucosa valorado por medio del PET-FDG, después de RT explicaría esta normalización <sup>[231]</sup>.

La CRT tuvo como efecto una normalización parcial de los niveles plasmáticos de maltosa, metionina, serina e isoleucina, mientras elevaba las concentraciones de glicina, ácido fumárico y  $\alpha$ -cetoglutarato por encima de los niveles promedios observados en controles sanos. La normalización parcial de los niveles circulantes de maltosa y aminoácidos como la metionina, serina e isoleucina después de la CRT pueden reflejar una disminución en el metabolismo de carbohidratos y la síntesis de proteínas debido a la reducción del tamaño del tumor <sup>[232]</sup>. En el estudio de Rodríguez et al. <sup>[230]</sup> el análisis PLSDA mostró que la CRT en pacientes con CPNM tendió a normalizar las concentraciones plasmáticas de  $\beta$ -hidroxibutirato, aspartato, isoleucina, leucina y serina. Esta observación sugiere que la CRT podría ayudar a restaurar las funciones celulares normales y normalizar las vías metabólicas alteradas en las células tumorales y el TME. Por otro lado, los aumentos en el ácido fumárico y el  $\alpha$ -cetoglutarato pueden indicar un aumento del estrés oxidativo y la actividad metabólica en respuesta a la radiación. Estos metabolitos son componentes del ciclo del TCA, lo que sugiere una actividad mitocondrial normalizada o una respuesta al estrés secundaria a la RT <sup>[233,234]</sup>. El  $\alpha$ -cetoglutarato juega un papel importante en la activación del sistema inmune, ya que su producción en la vía de la glutaminólisis promueve la activación de macrófagos tipo 1 <sup>[235]</sup>.

En contraste, la SBRT redujo significativamente las concentraciones plasmáticas de maltosa, ácido 3-fosfoglicérico, taurina, D-arabinosa, sedoheptulosa, ácido málico, D-xilitol y D-treitol tendiendo a la normalización. Además, la SBRT indujo disminuciones en las concentraciones de ácido láctico y ornitina, y un aumento en  $\alpha$ -tocoferol, diferenciando aún más los perfiles de metabolitos de pacientes con CPNM post-RT de los controles sanos. La reducción de los niveles circulantes de maltosa, ácido 3-fosfoglicérico, taurina, sedoheptulosa, ácido málico y ornitina producidos por la SBRT podrían indicar una restauración de vías metabólicas críticas como el ciclo TCA, el ciclo PPP y el metabolismo de aminoácidos <sup>[236–239]</sup>.

Los cambios en los niveles de metabolitos no sintetizados generalmente por el cuerpo humano, como la D-arabinosa, el D-xilitol y el D-treitol, son difíciles de interpretar. Sin embargo, se podría especular que indican alteraciones en el microbioma [49,188,240].

La disminución del ácido láctico y la ornitina puede sugerir una reducción en la glicólisis aeróbica (efecto Warburg) y una alteración en el metabolismo de los aminoácidos. De hecho, el ácido láctico es un subproducto de la glicólisis, comúnmente elevado en los tumores debido a la rápida proliferación celular [241]. Una disminución en el ácido láctico sugiere una inactivación de las células tumorales y posiblemente una mejor oxigenación de los tejidos después del tratamiento. Por otra parte, un aumento en  $\alpha$ -tocoferol sugiere un aumento de las defensas antioxidantes. El  $\alpha$ -tocoferol es un antioxidante potente, y su aumento podría ser una respuesta protectora para mitigar el daño oxidativo inducido por la radiación [242]. Comprender las diferencias en los cambios metabólicos observados en cada uno de los grupos de tratamiento es complejo, y es fundamental considerar varios factores. En primera instancia, los efectos metabólicos de la CRT y la SBRT pueden diferir significativamente debido a las características de cada tratamiento. La CRT administra dosis más bajas de radiación por fracción durante un período prolongado de días, causando un estrés metabólico sostenido, pero menos intenso. Este enfoque puede conducir a una normalización metabólica gradual y una respuesta al estrés constante. Además, la CRT se administra habitualmente a tumores o volúmenes mayores si se compara con la SBRT, afectando a un área más amplia, y con una mayor afectación de los OAR circundantes, lo que conduce a alteraciones metabólicas más extensas, ya que tanto las células tumorales como las células del tejido sano responden a la radiación, aunque cabe resaltar que en nuestro estudio los pacientes estadio I y II tratados con CRT representaron un 60,5%.

Por el contrario, la SBRT administra dosis más altas en menos fracciones, sobre tumores más pequeños, con unos márgenes de seguridad más ajustados, permitiendo una mayor protección de los OAR, lo que resulta en un estrés metabólico agudo e intenso produciendo una mayor muerte celular tumoral [243]. Además, la SBRT activa el sistema inmunológico de manera más intensa que la CRT, ejerciendo un efecto antitumoral en sitios distantes de la zona de administración de RT, conocido como efecto abscopal [154,163,244]. Este fenómeno presenta una nueva vía de investigación sobre el impacto del inmunometabolismo en el CP [245]. Todo ello nos permite deducir que el bloqueo de ciertas vías metabólicas, como la glicólisis, glutaminólisis o la vía del lactato dentro del TME producidos por la inmunoterapia y la SBRT podrían mejorar la supervivencia en el CPNM [246,247].

En cuanto a los datos de respuesta al tratamiento y efectos secundarios asociados a los mismo son muy similares a los reportados en la literatura [98,100,108,140,143].

En resumen, las diferencias observadas en los cambios metabólicos post-RT de los pacientes con CPNM tratados con CRT o SBRT, aunque pueden reflejar diferencias en las características intrínsecas de cada modalidad de tratamiento, también pueden deberse a factores relacionados con los tumores y pacientes tratados, así como a la interacción entre estos factores potencialmente influyentes. Se necesitan futuros estudios para evaluar y comprender en profundidad los cambios post-RT y así contribuir en la personalización de la RT en función de las características individuales del paciente y el tumor, optimizando la eficacia terapéutica y minimizando los efectos secundarios metabólicos.



# LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO





## LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

Una de las limitaciones más importantes de la presente tesis es el tamaño de la muestra. Asimismo, las características de la población estudiada pueden no representar completamente a la población más ampliamente afectada por el CPNM, lo que podría limitar la generalización de los hallazgos obtenidos. Los metabolitos fueron evaluados mediante la comparación de sus valores en pacientes con CP y sujetos sanos, pero sería necesaria una validación adicional para diferenciar el CPNM de otras enfermedades a nivel pulmonar.

Por otra parte, las variaciones en el estadiaje del tumor y otros factores clínicos, como la respuesta al tratamiento, el sexo o el hábito tabáquico, entre los pacientes tratados con SBRT o CRT dificulta la atribución de los cambios metabólicos observados únicamente al tipo de RT administrada, así como su relación con la respuesta.

Otro aspecto a considerar en el presente estudio es que el perfil metabólico de los pacientes con CPNM fue solamente comparado con el perfil metabólico de sujetos sanos, dificultando la distinción entre las características metabólicas de los pacientes con CPNM de aquellas relacionadas con otros tipos de CP, así como también otras enfermedades a nivel pulmonar.

Además, una limitación clave de este estudio es el conocimiento limitado sobre el papel de algunos de los metabolitos que han sido identificados como relevantes para el diagnóstico del CPNM o cuyos niveles circulantes han variado significativamente tras la RT. La falta de información clara sobre su relación con la fisiopatología del cáncer dificulta la interpretación y validación de los resultados obtenidos. Para ello, son necesarios estudios experimentales y más exhaustivos sobre las funciones específicas de estos metabolitos. Comprender los mecanismos biológicos en los que intervienen y su papel en el CPNM es fundamental para validar su potencial uso como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico de la enfermedad.

En consecuencia, aunque el presente estudio contribuye en el avance del conocimiento de los cambios metabólicos producidos por el CPNM y la administración de diferentes tipos de RT, actualmente sigue siendo un desafío detectar e interpretar cambios metabólicos en el tejido tumoral basándose solamente en la medición de metabolitos circulantes.

Para abordar las limitaciones descritas, es crucial realizar estudios multicéntricos y prospectivos más extensos. Esto no solo aumentaría la validez estadística de los resultados, sino también consideraría una mayor diversidad de características clínicas y tumorales que harían los resultados más representativos de la población real de pacientes con CPNM. Además, estudios de mayor envergadura y con un mayor tamaño muestral permitirán identificar características específicas en subgrupos de pacientes relevantes para la personalización del tratamiento.

La integración de otras disciplinas “ómicas” como la radiómica, la transcriptómica o la proteómica, en combinación con herramientas avanzadas de inteligencia artificial, también es crucial para el estudio e identificación de biomarcadores en el CPNM. Gracias a las ciencias “ómicas” es posible obtener grandes volúmenes de datos relativos al CPNM, los cuales pueden ser analizados eficientemente por la inteligencia artificial. Este enfoque multidimensional puede permitir una visión más completa y precisa del CPNM, facilitando por un lado el descubrimiento de biomarcadores para el diagnóstico precoz, y por otro, una mejor caracterización del tumor, en términos de su heterogeneidad o resistencia a la RT. Todo ello contribuye a mejorar significativamente la precisión del diagnóstico, la personalización del tratamiento y, en última instancia, la respuesta a la RT y el pronóstico del CPNM.

Actualmente, nuestro grupo de investigación trabaja en la integración de la radiómica, la metabolómica y los datos clínicos, mediante el aprendizaje automático en pacientes con CPNM en estadios iniciales, para valorar la respuesta al tratamiento con SBRT y mejorar el seguimiento de estos pacientes. El seguimiento con pruebas de imagen convencionales, como la TC y el PET-FDG continúa siendo insuficiente, ya que no permite diferenciar con precisión la persistencia o progresión de la lesión de los cambios en el parénquima pulmonar provocados por la SBRT. El análisis de dichas imágenes mediante la técnicas de radiómica e inteligencia artificial nos permitirá cuantificar y medir con mayor objetividad la forma, la densidad, la intensidad y la textura del tumor y tejidos circundantes, mediante el análisis de las características de las imágenes radiológicas por medio de programas de inteligencia artificial <sup>[182,183]</sup>. Los resultados obtenidos aportarán información sobre el fenotipo y comportamiento tanto del tumor, como de los tejidos peritumorales, que con otros métodos de diagnóstico tradicionales como la biopsia, serían difíciles de obtener <sup>[184,248,249]</sup>.

La presente tesis doctoral ha demostrado que el análisis metabolómico es una herramienta poderosa para la caracterización de los pacientes con CPNM y la evaluación de cambios metabólicos post-RT. Su capacidad para revelar alteraciones específicas en el metabolismo de los tumores y tejidos circundantes subraya su potencial en la valoración de la respuesta a la RT. Los datos “ómicos” en combinación con datos clínicos, fundamentales para la medicina de precisión, podría contribuir a predecir el pronóstico de los pacientes con CPNM e individualizar su tratamiento de RT, modulando o intensificando las dosis y los fraccionamientos administrados, o su combinación con nuevas dianas terapéuticas o inmunoterapia.



# CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

Las conclusiones de la presente tesis, de acuerdo con los objetivos propuestos y los resultados obtenidos, son las siguientes:

1. Los pacientes con CPNM muestran alteraciones metabólicas plasmáticas significativas, destacando metabolitos específicos que exhiben su potencial como biomarcadores para el diagnóstico precoz.
2. El análisis multivariante y su integración con algoritmos de aprendizaje automático permiten identificar firmas metabólicas pre-RT y post-RT. La normalización parcial post-RT de los metabolitos alterados podría relacionarse con la valoración de la respuesta al tratamiento y el pronóstico del paciente.
3. La CRT y la SBRT inducen alteraciones diferenciadas en el metaboloma plasmático, las cuales podrían estar relacionadas con las variaciones en las dosis, la técnica de administración, las diferencias en la toxicidad aguda o las características específicas de los pacientes tratados.





# BIBLIOGRAFÍA



## BIBLIOGRAFIA

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2024;74(3):229–63.
2. Nasim F, Sabath BF, Eapen GA. Lung Cancer. *Medical Clinics of North America* 2019;103(3):463–73.
3. Rodríguez-Tomás E, Murcia M, Arenas M, Arguís M, Gil M, Amigó N, et al. Serum paraoxonase-1-related variables and lipoprotein profile in patients with lung or head and neck cancer: Effect of radiotherapy. *Antioxidants* 2019;8(7).
4. Rodríguez De Dios N, Navarro-Martin A, Cigarral C, Chicas-Sett R, García R, Garcia V, et al. GOECP/SEOR radiotherapy guidelines for non-small-cell lung cancer. *World J Clin Oncol* 2022;13(4):237–66.
5. Kong FM, Zhao J, Wang J, Faivre-Finn C. Radiation dose effect in locally advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis* 2014;6(4):336–47.
6. Bezjak A, Paulus R, Gaspar LE, Timmerman RD, Straube WL, Ryan WF, et al. Safety and Efficacy of a Five-Fraction Stereotactic Body Radiotherapy Schedule for Centrally Located Non-Small-Cell Lung Cancer: NRG Oncology/RTOG 0813 Trial. *J Clin Oncol* [Internet] 2019;37(15):1316–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30943123>
7. Goulart BHL, Bensink ME, Mummy DG, Ramsey SD. Lung Cancer Screening With Low-Dose Computed Tomography: Costs, National Expenditures, and Cost-Effectiveness. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 2012;10(2):267–75.
8. Miyamoto S, Taylor SL, Barupal DK, Taguchi A, Wohlgemuth G, Wikoff WR, et al. Systemic metabolomic changes in blood samples of lung cancer patients identified by gas chromatography Time-Of-Flight mass spectrometry. *Metabolites* 2015;5(2):192–210.
9. Zhang Y, Cheng Y, Qin L, Liu Y, Huang S, Dai L, et al. Plasma metabolomics for the assessment of the progression of non-small cell lung cancer. *Int J Biol Markers* 2023;38(1):37–45.
10. Vander Heiden MG, DeBerardinis RJ. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell* 2017;168(4):657–69.
11. DeBerardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv* 2016;2(5).
12. Mazzone PJ, Wang XF, Beukemann M, Zhang Q, Seeley M, Mohny R, et al. Metabolite profiles of the serum of patients with non-small cell carcinoma. *Journal of Thoracic Oncology* 2016;11(1):72–8.
13. Xiang Y, Zhao Q, Wu Y, Liu X, Zhu J, Yu Y, et al. Serum Metabolomics Profiling Reveals Metabolic Alterations Prior to a Diagnosis with Non-Small Cell Lung Cancer among Chinese Community Residents: A Prospective Nested Case-Control Study. *Metabolites* 2022;12(10).
14. Seijo LM, Peled N, Ajona D, Boeri M, Field JK, Sozzi G, et al. Biomarkers in Lung Cancer Screening: Achievements, Promises, and Challenges. *Journal of Thoracic Oncology* 2019;14(3):343–57.
15. Vanhove K, Derveaux E, Mesotten L, Thomeer M, Criel M, Mariën H, et al. Unraveling the Rewired Metabolism in Lung Cancer Using Quantitative NMR Metabolomics. *Int J Mol Sci* 2022;23(10).
16. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71(3):209–49.

17. Pilleron S, Soto-Perez-de-Celis E, Vignat J, Ferlay J, Soerjomataram I, Bray F, et al. Estimated global cancer incidence in the oldest adults in 2018 and projections to 2050. *Int J Cancer* [Internet] 2021;148(3):601–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32706917>
18. Didkowska J, Wojciechowska U, Mańczuk M, Łobaszewski J. Lung cancer epidemiology: contemporary and future challenges worldwide. *Ann Transl Med* 2016;4(8):150–150.
19. Rodríguez-Tomás E, Murcia M, Arenas M, Arguís M, Gil M, Amigó N, et al. Serum Paraoxonase-1-Related Variables and Lipoprotein Profile in Patients with Lung or Head and Neck Cancer: Effect of Radiotherapy. *Antioxidants* (Basel) [Internet] 2019;8(7):213. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31295833>
20. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. *Mayo Clin Proc* 2008;83(5):584–94.
21. Larose TL, Guida F, Fanidi A, Langhammer A, Kveem K, Stevens VL, et al. Circulating cotinine concentrations and lung cancer risk in the Lung Cancer Cohort Consortium (LC3). *Int J Epidemiol* 2018;47(6):1760–71.
22. Alduais Y, Zhang H, Fan F, Chen J, Chen B. Non-small cell lung cancer (NSCLC): A review of risk factors, diagnosis, and treatment. *Medicine* 2023;102(8):e32899.
23. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000;100(1):57–70.
24. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011;144(5):646–74.
25. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* 2022;12(1):31–46.
26. Tan AC. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Thorac Cancer* 2020;11(3):511–8.
27. Steels E, Paesmans M, Berghmans T, Branle F, Lemaitre F, Mascaux C, et al. Role of p53 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. *European Respiratory Journal* 2001;18(4):705–19.
28. Saito A, Horie M, Nagase T. TGF- $\beta$  Signaling in Lung Health and Disease. *Int J Mol Sci* 2018;19(8):2460.
29. Shivapurkar N, Reddy J, Chaudhary PM, Gazdar AF. Apoptosis and lung cancer: A review. *J Cell Biochem* 2003;88(5):885–98.
30. Terlizzi M, Colarusso C, De Rosa I, De Rosa N, Somma P, Curcio C, et al. Circulating and tumor-associated caspase-4: a novel diagnostic and prognostic biomarker for non-small cell lung cancer [Internet]. 2018. Available from: [www.oncotarget.com](http://www.oncotarget.com)
31. Boland K, Flanagan L, Prehn JH. Paracrine control of tissue regeneration and cell proliferation by Caspase-3. *Cell Death Dis* 2013;4(7):e725–e725.
32. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell* 2008;132(1):27–42.
33. Faugeras E, Véronèse L, Jeannin G, Janicot H, Bailly S, Bay JO, et al. Telomere Status of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Offers a Novel Promising Prognostic and Predictive Biomarker. *Cancers* (Basel) 2022;15(1):290.
34. Fernandez-Garcia I, Ortiz-de-Solorzano C, Montuenga LM. Telomeres and Telomerase in Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 2008;3(10):1085–8.
35. Shijubo N, Kojima H, Nagata M, Ohchi T, Suzuki A, Abe S, et al. Tumor angiogenesis of non-small cell lung cancer. *Microsc Res Tech* 2003;60(2):186–98.

36. Bremnes RM, Veve R, Hirsch FR, Franklin WA. The E-cadherin cell–cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis. *Lung Cancer* 2002;36(2):115–24.
37. Shu J, Wang L, Han F, Chen Y, Wang S, Luo F. BTBD7 Downregulates E-Cadherin and Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition in Lung Cancer. *Biomed Res Int* 2019;2019:1–11.
38. Kerr KM, Bibeau F, Thunnissen E, Botling J, Ryška A, Wolf J, et al. The evolving landscape of biomarker testing for non-small cell lung cancer in Europe. *Lung Cancer* 2021;154:161–75.
39. Bai H, Zhou Y, Liu W, Xu W yang, Cheng L, Huo Y, et al. Genetic mutation profiling reveals biomarkers for targeted therapy efficacy and prognosis in non-small cell lung cancer. *Heliyon* 2024;10(6).
40. Feng J, Lan Y, Liu F, Yuan Y, Ge J, Wei S, et al. Combination of genomic instability score and TP53 status for prognosis prediction in lung adenocarcinoma. *NPJ Precis Oncol* 2023;7(1):110.
41. Gupta R, Dastane AM, Forozan F, Riley-Portuguez A, Chung F, Lopategui J, et al. Evaluation of EGFR abnormalities in patients with pulmonary adenocarcinoma: the need to test neoplasms with more than one method. *Modern Pathology* 2009;22(1):128–33.
42. Altorki NK, Markowitz GJ, Gao D, Port JL, Saxena A, Stiles B, et al. The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2019;19(1):9–31.
43. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* (1979) 2011;331(6024):1565–70.
44. Chan LC, Li CW, Xia W, Hsu JM, Lee HH, Cha JH, et al. IL-6/JAK1 pathway drives PD-L1 Y112 phosphorylation to promote cancer immune evasion. *Journal of Clinical Investigation* 2019;129(8):3324–38.
45. Wirsdörfer F, De Leve S, Jendrossek V. Combining radiotherapy and immunotherapy in lung cancer: Can we expect limitations due to altered normal tissue toxicity? *Int J Mol Sci* 2019;20(1).
46. Bremnes RM, Busund LT, Kilvær TL, Andersen S, Richardsen E, Paulsen EE, et al. The Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Development, Progression, and Prognosis of Non–Small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 2016;11(6):789–800.
47. Ravi S, Alencar AM, Arakelyan J, Xu W, Stauber R, Wang CCI, et al. An Update to Hallmarks of Cancer. *Cureus* 2022;
48. Mallick R, Duttaroy AK. Can interruption of innate immune recognition-mediated emergency myelopoiesis impede tumor progression? *Med Hypotheses* 2021;155:110663.
49. Liu B, Li Y, Suo L, Zhang W, Cao H, Wang R, et al. Characterizing microbiota and metabolomics analysis to identify candidate biomarkers in lung cancer. *Front Oncol* 2022;12.
50. Marjanovic ND, Hofree M, Chan JE, Canner D, Wu K, Trakala M, et al. Emergence of a High-Plasticity Cell State during Lung Cancer Evolution. *Cancer Cell* 2020;38(2):229-246.e13.
51. Asaithamby A, Shay JW, Minna JD. Cellular senescence and lung cancer prognosis. *Transl Lung Cancer Res* 2022;11(10):1982–7.
52. Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science* (1979) 2009;324(5930):1029–33.
53. Martinez CA, Scafoglio C. Heterogeneity of glucose transport in lung cancer. *Biomolecules* 2020;10(6):1–28.

54. Vaupel P, Multhoff G. Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. *Journal of Physiology* 2021;599(6):1745–57.
55. Vanhove K, Thomeer M, Derveaux E, Shkedy Z, Owokotomo OE, Adriaensens P, et al. Correlations between the metabolic profile and 18F-FDG-Positron Emission Tomography-Computed Tomography parameters reveal the complexity of the metabolic reprogramming within lung cancer patients. *Sci Rep* 2019;9(1):16212.
56. Palsson-McDermott EM, Dyck L, Zaslona Z, Menon D, McGettrick AF, Mills KHG, et al. Pyruvate Kinase M2 Is Required for the Expression of the Immune Checkpoint PD-L1 in Immune Cells and Tumors. *Front Immunol* 2017;8.
57. Doroshow DB, Herbst RS. Treatment of Advanced Non–Small Cell Lung Cancer in 2018. *JAMA Oncol* 2018;4(4):569.
58. Jin L, Zhou Y. Crucial role of the pentose phosphate pathway in malignant tumors (review). *Oncol Lett* 2019;17(5):4213–21.
59. Majem B, Nadal E, Muñoz-Pinedo C. Exploiting metabolic vulnerabilities of Non small cell lung carcinoma. *Semin Cell Dev Biol* 2020;98:54–62.
60. Leone RD, Zhao L, Englert JM, Sun IM, Oh MH, Sun IH, et al. Glutamine blockade induces divergent metabolic programs to overcome tumor immune evasion. *Science* (1979) 2019;366(6468):1013–21.
61. Sánchez-Castillo A, Heylen E, Hounjet J, Savelkoul KG, Lieuwes NG, Biemans R, et al. Targeting serine/glycine metabolism improves radiotherapy response in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2023;
62. Chuang SC, Fanidi A, Ueland PM, Relton C, Midttun O, Vollset SE, et al. Circulating biomarkers of tryptophan and the kynurenine pathway and lung cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 2014;23(3):461–8.
63. Padanad MS, Konstantinidou G, Venkateswaran N, Melegari M, Rindhe S, Mitsche M, et al. Fatty Acid Oxidation Mediated by Acyl-CoA Synthetase Long Chain 3 Is Required for Mutant KRAS Lung Tumorigenesis. *Cell Rep* 2016;16(6):1614–28.
64. Mariën H, Derveaux E, Vanhove K, Adriaensens P, Thomeer M, Mesotten L. Changes in Metabolism as a Diagnostic Tool for Lung Cancer: Systematic Review. *Metabolites* 2022;12(6).
65. Aberle DR AABCWCFRIGIGCMPSJD. Reduced Lung-Cancer Mortality with Low-Dose Computed Tomographic Screening. *New England Journal of Medicine* 2011;365(5):395–409.
66. Henschke CI, Shaham D, Yankelevitz DF, Kramer A, Kostis WJ, Reeves AP, et al. CT screening for lung cancer. *Clin Imaging* [Internet] 2006;30(1):11–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899707105001294>
67. Aberle DR BCBWCTFRGBGIGCGJGJHBJCKBLDMPMSMSDSDZCJ. The National Lung Screening Trial: Overview and Study Design 1 National Lung Screening Trial Research Team. *Radiology* 2011 Jan;258(1):243-53 [Internet] 2011;243–53. Available from: <http://radiology.rsna.org/lookup/suppl/doi:10.1148/radiol.10091808/-/DC1>
68. Yousaf-Khan U, van der Aalst C, de Jong PA, Heuvelmans M, Scholten E, Lammers JW, et al. Final screening round of the NELSON lung cancer screening trial: the effect of a 2.5-year screening interval. *Thorax* 2017;72(1):48–56.
69. De Koning H, Van Der Aalst C, Ten Haaf K, Oudkerk M. PL02.05 Effects of Volume CT Lung Cancer Screening: Mortality Results of the NELSON Randomised-Controlled Population Based Trial. *Journal of Thoracic Oncology* 2018;13(10):S185.
70. Pinsky PF, Gierada DS, Black W, Munden R, Nath H, Aberle D, et al. Performance of Lung-RADS in the National Lung Screening Trial. *Ann Intern Med* 2015;162(7):485–91.

71. Zhao W, Yang J, Sun Y, Li C, Wu W, Jin L, et al. 3D Deep Learning from CT Scans Predicts Tumor Invasiveness of Subcentimeter Pulmonary Adenocarcinomas. *Cancer Res* 2018;78(24):6881–9.
72. Setio AAA, Ciompi F, Litjens G, Gerke P, Jacobs C, Van Riel SJ, et al. Pulmonary Nodule Detection in CT Images: False Positive Reduction Using Multi-View Convolutional Networks. *IEEE Trans Med Imaging* 2016;35(5):1160–9.
73. Ward B, Koziar Vašáková M, Robalo Cordeiro C, Yorgancioğlu A, Chorostowska-Wynimko J, Blum TG, et al. Important steps towards a big change for lung health: a joint approach by the European Respiratory Society, the European Society of Radiology and their partners to facilitate implementation of the European Union's new recommendations on lung cancer screening. *ERJ Open Res* 2023;9(3):00026–2023.
74. Ost DE, Jim Yeung SC, Tanoue LT, Gould MK. Clinical and Organizational Factors in the Initial Evaluation of Patients With Lung Cancer. *Chest* 2013;143(5):e121S-e141S.
75. Kocher F, Hilbe W, Seeber A, Pircher A, Schmid T, Greil R, et al. Longitudinal analysis of 2293 NSCLC patients: A comprehensive study from the TYROL registry. *Lung Cancer* 2015;87(2):193–200.
76. Buccheri G. Lung cancer: clinical presentation and specialist referral time. *European Respiratory Journal* 2004;24(6):898–904.
77. Gould MK, Donington J, Lynch WR, Mazzone PJ, Midthun DE, Naidich DP, et al. Evaluation of Individuals With Pulmonary Nodules: When Is It Lung Cancer? *Chest* 2013;143(5):e93S-e120S.
78. Paul NS, Ley S, Metser U. Optimal Imaging Protocols for Lung Cancer Staging. *Radiol Clin North Am* 2012;50(5):935–49.
79. Silvestri GA, Gonzalez A V., Jantz MA, Margolis ML, Gould MK, Tanoue LT, et al. Methods for Staging Non-small Cell Lung Cancer. *Chest* 2013;143(5):e211S-e250S.
80. De Leyn P, Doooms C, Kuzdzal J, Lardinois D, Passlick B, Rami-Porta R, et al. Revised ESTS guidelines for preoperative mediastinal lymph node staging for non-small-cell lung cancer. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 2014;45(5):787–98.
81. Herth F, Becker HD, Ernst A. Conventional vs Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration. *Chest* 2004;125(1):322–5.
82. Adebibe M, Jarral OA, Shipolini AR, McCormack DJ. Does video-assisted mediastinoscopy have a better lymph node yield and safety profile than conventional mediastinoscopy? *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2012;14(3):316–9.
83. Baldwin DR. Management of solitary pulmonary nodules: how do thoracic computed tomography and guided fine needle biopsy influence clinical decisions? *Thorax* 2002;57(9):817–22.
84. De Wever W, Vankan Y, Stroobants S, Verschakelen J. Detection of extrapulmonary lesions with integrated PET/CT in the staging of lung cancer. *European Respiratory Journal* 2007;29(5):995–1002.
85. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *Journal of Thoracic Oncology* 2015;10(9):1243–60.
86. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology* 2011;6(2):244–85.



87. Nicholson AG, Gonzalez D, Shah P, Pynegar MJ, Deshmukh M, Rice A, et al. Refining the Diagnosis and EGFR Status of Non-small Cell Lung Carcinoma in Biopsy and Cytologic Material, Using a Panel of Mucin Staining, TTF-1, Cytokeratin 5/6, and P63, and EGFR Mutation Analysis. *Journal of Thoracic Oncology* 2010;5(4):436–41.
88. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WEE, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 2016;11(1):39–51.
89. Detterbeck FC, Ostrowski M, Hoffmann H, Rami-Porta R, Osarogiagbon RU, Donington J, et al. The International Association for the Study of Lung Cancer Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the Classification of Residual Tumor After Resection for the Forthcoming (Ninth) Edition of the TNM Classification of Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 2024;
90. Carter BW, Lichtenberger JP, Benveniste MK, de Groot PM, Wu CC, Erasmus JJ, et al. Revisions to the TNM Staging of Lung Cancer: Rationale, Significance, and Clinical Application. *RadioGraphics* 2018;38(2):374–91.
91. Ettinger DS, Wood DE, Akerley W, Bazhenova LA, Borghaei H, Camidge DR, et al. Non-Small Cell Lung Cancer, Version 1.2015. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 2014;12(12):1738–61.
92. Altorki N, Wang X, Kozono D, Watt C, Landrenau R, Wigle D, et al. Lobar or Sublobar Resection for Peripheral Stage IA Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine* 2023;388(6):489–98.
93. Koike T, Kitahara A, Sato S, Hashimoto T, Aoki T, Koike T, et al. Lobectomy Versus Segmentectomy in Radiologically Pure Solid Small-Sized Non-Small Cell Lung Cancer. *Ann Thorac Surg* 2016;101(4):1354–60.
94. Lampridis S, Maraschi A, Le Reun C, Routledge T, Billè A. Robotic versus Video-Assisted Thoracic Surgery for Lung Cancer: Short-Term Outcomes of a Propensity Matched Analysis. *Cancers (Basel)* 2023;15(8):2391.
95. Cheung PCF, Yeung LTF, Basrur V, Ung YC, Balogh J, Danjoux CE. Accelerated hypofractionation for early-stage non-small-cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys [Internet]* 2002;54(4):1014–23. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(02\)03045-6](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(02)03045-6)
96. Falkson CB, Vella ET, Yu E, El-Mallah M, Mackenzie R, Ellis PM, et al. Radiotherapy With Curative Intent in Patients With Early-stage, Medically Inoperable, Non-Small-Cell Lung Cancer: A Systematic Review. *Clin Lung Cancer [Internet]* 2017;18(2):105-121.e5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2016.10.008>
97. Timmerman RD, Herman J, Cho LC. Emergence of Stereotactic Body Radiation Therapy and Its Impact on Current and Future Clinical Practice. *Journal of Clinical Oncology* 2014;32(26):2847–54.
98. Timmerman R, Paulus R, Galvin J, Michalski J, Straube W, Bradley J, et al. Stereotactic body radiation therapy for inoperable early stage lung cancer. *JAMA [Internet]* 2010;303(11):1070–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20233825>
99. Vansteenkiste J, Crinò L, Doooms C, Douillard JY, Faivre-Finn C, Lim E, et al. 2nd ESMO Consensus Conference on Lung Cancer: early-stage non-small-cell lung cancer consensus on diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2014;25(8):1462–74.
100. Onishi H, Shirato H, Nagata Y, Hiraoka M, Fujino M, Gomi K, et al. Hypofractionated Stereotactic Radiotherapy (HypoFXSRT) for Stage I Non-small Cell Lung Cancer: Updated Results of 257 Patients in a Japanese Multi-institutional Study. *Journal of Thoracic Oncology [Internet]* 2007;2(7):S94–100. Available from: <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318074de34>

101. Onishi H, Shirato H, Nagata Y, Hiraoka M, Fujino M, Gomi K, et al. Stereotactic Body Radiotherapy (SBRT) for Operable Stage I Non-Small-Cell Lung Cancer: Can SBRT Be Comparable to Surgery? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* [Internet] 2011;81(5):1352–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2009.07.1751>
102. Videtic GM, Paulus R, Singh AK, Chang JY, Parker W, Olivier KR, et al. Long-term Follow-up on NRG Oncology RTOG 0915 (NCCTG N0927): A Randomized Phase 2 Study Comparing 2 Stereotactic Body Radiation Therapy Schedules for Medically Inoperable Patients With Stage I Peripheral Non-Small Cell Lung Cancer. *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics* 2019;103(5):1077–84.
103. Onishi H, Araki T, Shirato H, Nagata Y, Hiraoka M, Gomi K, et al. Stereotactic hypofractionated high-dose irradiation for stage I nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2004;101(7):1623–31.
104. Lagerwaard FJ, Haasbeek CJA, Smit EF, Slotman BJ, Senan S. Outcomes of Risk-Adapted Fractionated Stereotactic Radiotherapy for Stage I Non-Small-Cell Lung Cancer. *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics* 2008;70(3):685–92.
105. Grills IS, Hope AJ, Guckenberger M, Kestin LL, Werner-Wasik M, Yan D, et al. A Collaborative Analysis of Stereotactic Lung Radiotherapy Outcomes for Early-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer Using Daily Online Cone-Beam Computed Tomography Image-Guided Radiotherapy. *Journal of Thoracic Oncology* [Internet] 2012;7(9):1382–93. Available from: <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318260e00d>
106. Chang JY, Senan S, Paul MA, Mehran RJ, Louie A V, Balter P, et al. Stereotactic ablative radiotherapy versus lobectomy for operable stage I non-small-cell lung cancer: a pooled analysis of two randomised trials. *Lancet Oncol* [Internet] 2015;16(6):630–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25981812>
107. Nyman J, Hallqvist A, Lund JÅ, Brustugun OT, Bergman B, Bergström P, et al. SPACE: A randomized study of SBRT vs conventional fractionated radiotherapy in medically inoperable stage I NSCLC. *Radiotherapy and Oncology* [Internet] 2016;121(1):1–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2016.08.015>
108. Bradley JD, Paulus R, Komaki R, Masters G, Blumenschein G, Schild S, et al. Standard-dose versus high-dose conformal radiotherapy with concurrent and consolidation carboplatin plus paclitaxel with or without cetuximab for patients with stage IIIA or IIIB non-small-cell lung cancer (RTOG 0617): a randomised, two-by-two factorial phase 3 study. *Lancet Oncol* 2015;16(2):187–99.
109. Aupérin A, Le Péchoux C, Rolland E, Curran WJ, Furuse K, Fournel P, et al. Meta-Analysis of Concomitant Versus Sequential Radiochemotherapy in Locally Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2010;28(13):2181–90.
110. Spigel DR, Faivre-Finn C, Gray JE, Vicente D, Planchard D, Paz-Ares L, et al. Five-Year Survival Outcomes From the PACIFIC Trial: Durvalumab After Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2022;40(12):1301–11.
111. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine* [Internet] 2017;377(20):1919–29. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709937>
112. Pless M, Stupp R, Ris HB, Stahel RA, Weder W, Thierstein S, et al. Induction chemoradiation in stage IIIA/N2 non-small-cell lung cancer: a phase 3 randomised trial. *The Lancet* 2015;386(9998):1049–56.

113. Albain KS, Swann RS, Rusch VW, Turrisi AT, Shepherd FA, Smith C, et al. Radiotherapy plus chemotherapy with or without surgical resection for stage III non-small-cell lung cancer: a phase III randomised controlled trial. *The Lancet* 2009;374(9687):379–86.
114. Majem M, Hernández-Hernández J, Hernando-Trancho F, Rodríguez de Dios N, Sotoca A, Trujillo-Reyes JC, et al. Multidisciplinary consensus statement on the clinical management of patients with stage III non-small cell lung cancer. *Clinical and Translational Oncology* 2020;22(1):21–36.
115. Montemuiño S, Dios NR de, Martín M, Taboada B, Calvo-Crespo P, Samper-Ots MP, et al. High-dose neoadjuvant chemoradiotherapy versus chemotherapy alone followed by surgery in potentially-resectable stage IIIA-N2 NSCLC. A multi-institutional retrospective study by the Oncologic Group for the Study of Lung Cancer (Spanish Radiation Oncology Society). *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy* 2020;25(3):447–55.
116. Couñago F, Montemuiño S, Martín M, Taboada B, Calvo-Crespo P, Samper-Ots MP, et al. Prognostic factors in neoadjuvant treatment followed by surgery in stage IIIA-N2 non-small cell lung cancer: a multi-institutional study by the Oncologic Group for the Study of Lung Cancer (Spanish Radiation Oncology Society). *Clinical and Translational Oncology [Internet]* 2019;21(6):735–44. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12094-018-1976-3>
117. Le Pechoux C, Pourel N, Barlesi F, Lerouge D, Antoni D, Lamezec B, et al. Postoperative radiotherapy versus no postoperative radiotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer and proven mediastinal N2 involvement (Lung ART, IFCT 0503): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2022;23(1):104–14.
118. Hui Z, Men Y, Hu C, Kang J, Sun X, Bi N, et al. Effect of Postoperative Radiotherapy for Patients With pIIIA-N2 Non-Small Cell Lung Cancer After Complete Resection and Adjuvant Chemotherapy. *JAMA Oncol* 2021;7(8):1178.
119. Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, Senan S, Waller DA, Vansteenkiste J, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2017;28:iv1–21.
120. Mauguen A, Le Péchoux C, Saunders MI, Schild SE, Turrisi AT, Baumann M, et al. Hyperfractionated or Accelerated Radiotherapy in Lung Cancer: An Individual Patient Data Meta-Analysis. *Journal of Clinical Oncology* 2012;30(22):2788–97.
121. Maguire J, Khan I, McMenemin R, O'Rourke N, McNee S, Kelly V, et al. SOCCAR: A randomised phase II trial comparing sequential versus concurrent chemotherapy and radical hypofractionated radiotherapy in patients with inoperable stage III Non-Small Cell Lung Cancer and good performance status. *Eur J Cancer* 2014;50(17):2939–49.
122. de Dios NR, Sanz X, Foro P, Membrive I, Reig A, Ortiz A, et al. Accelerated hypofractionated radiation therapy (AHRT) for non-small-cell lung cancer: can we leave standard fractionation? *Clinical and Translational Oncology* 2017;19(4):440–7.
123. Soliman H, Cheung P, Yeung L, Poon I, Balogh J, Barbera L, et al. Accelerated Hypofractionated Radiotherapy for Early-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer: Long-Term Results. *International Journal of Radiation Oncology\*Biography\*Physics* 2011;79(2):459–65.
124. Faivre-Finn C, Fenwick JD, Franks KN, Harrow S, Hatton MQF, Hiley C, et al. Reduced Fractionation in Lung Cancer Patients Treated with Curative-intent Radiotherapy during the COVID-19 Pandemic. *Clin Oncol* 2020;32(8):481–9.
125. Guo H, Li H, Zhu L, Feng J, Huang X, Baak JPA. “How Long Have I Got?” in Stage IV NSCLC Patients With at Least 3 Months Up to 10 Years Survival,

- Accuracy of Long-, Intermediate-, and Short-Term Survival Prediction Is Not Good Enough to Answer This Question. *Front Oncol* 2021;11.
126. Nieder C, Tollåli T, Reigstad A, Pawinski A, Haukland E, Dalhaug A. Oligometastatic Non-Small Cell Lung Cancer: A Significant Entity outside of Specialized Cancer Centers? *Medical Principles and Practice* 2014;23(6):526–31.
  127. Guckenberger M, Lievens Y, Bouma AB, Collette L, Dekker A, deSouza NM, et al. Characterisation and classification of oligometastatic disease: a European Society for Radiotherapy and Oncology and European Organisation for Research and Treatment of Cancer consensus recommendation. *Lancet Oncol* 2020;21(1):e18–28.
  128. Palma DA, Olson R, Harrow S, Gaede S, Louie A V., Haasbeek C, et al. Stereotactic Ablative Radiotherapy for the Comprehensive Treatment of Oligometastatic Cancers: Long-Term Results of the SABR-COMET Phase II Randomized Trial. *Journal of Clinical Oncology* 2020;38(25):2830–8.
  129. Gomez DR, Tang C, Zhang J, Blumenschein GR, Hernandez M, Lee JJ, et al. Local Consolidative Therapy Vs. Maintenance Therapy or Observation for Patients With Oligometastatic Non–Small-Cell Lung Cancer: Long-Term Results of a Multi-Institutional, Phase II, Randomized Study. *Journal of Clinical Oncology* 2019;37(18):1558–65.
  130. Iyengar P, Wardak Z, Gerber DE, Tumati V, Ahn C, Hughes RS, et al. Consolidative Radiotherapy for Limited Metastatic Non–Small-Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol* 2018;4(1):e173501.
  131. Leaman Alcibar O, Candini D, López-Campos F, Albert Antequera M, Morillo Macías V, Conde AJ, et al. Time for radioimmunotherapy: an overview to bring improvements in clinical practice. *Clinical and Translational Oncology* 2019;21(8):992–1004.
  132. Alcibar OL, Nadal E, Palomar IR, Navarro-Martin A. Systematic review of stereotactic body radiotherapy in stage III non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 2021;10(1):529–38.
  133. Stevens R, Macbeth F, Toy E, Coles B, Lester JF. Palliative radiotherapy regimens for patients with thoracic symptoms from non-small cell lung cancer. In: Stevens R, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2015.
  134. Timmerman RD, Paulus R, Pass HI, Gore EM, Edelman MJ, Galvin J, et al. Stereotactic Body Radiation Therapy for Operable Early-Stage Lung Cancer. *JAMA Oncol* 2018;4(9):1263.
  135. Guckenberger M, Andratschke N, Dieckmann K, Hoogeman MS, Hoyer M, Hurkmans C, et al. ESTRO ACROP consensus guideline on implementation and practice of stereotactic body radiotherapy for peripherally located early stage non-small cell lung cancer. *Radiotherapy and Oncology* 2017;124(1):11–7.
  136. Huang K, Dahele M, Senan S, Guckenberger M, Rodrigues GB, Ward A, et al. Radiographic changes after lung stereotactic ablative radiotherapy (SABR) – Can we distinguish recurrence from fibrosis? A systematic review of the literature. *Radiotherapy and Oncology* 2012;102(3):335–42.
  137. Mattonen SA, Palma DA, Haasbeek CJA, Senan S, Ward AD. Early prediction of tumor recurrence based on CT texture changes after stereotactic ablative radiotherapy (SABR) for lung cancer. *Med Phys* 2014;41(3).
  138. Mattonen SA, Palma DA, Haasbeek CJA, Senan S, Ward AD. Distinguishing radiation fibrosis from tumour recurrence after stereotactic ablative radiotherapy (SABR) for lung cancer: A quantitative analysis of CT density changes. *Acta Oncol (Madr)* 2013;52(5):910–8.

139. Marks LB, Yorke ED, Jackson A, Ten Haken RK, Constine LS, Eisbruch A, et al. Use of Normal Tissue Complication Probability Models in the Clinic. *International Journal of Radiation Oncology\*Biography\*Physics* 2010;76(3):S10–9.
140. Wang K, Tepper JE. Radiation therapy-associated toxicity: Etiology, management, and prevention. *CA Cancer J Clin* 2021;71(5):437–54.
141. Chao PJ, Lee HF, Lan JH, Guo SS, Ting HM, Huang YJ, et al. Propensity-score-matched evaluation of the incidence of radiation pneumonitis and secondary cancer risk for breast cancer patients treated with IMRT/VMAT. *Sci Rep* 2017;7(1):13771.
142. Morias S, Marcu LG, Short M, Giles E, Potter A, Shepherd J, et al. Treatment-Related Adverse Effects in Lung Cancer Patients after Stereotactic Ablative Radiation Therapy. *J Oncol* 2018;2018:1–16.
143. Zhao Y, Khawandanh E, Thomas S, Zhang S, Dunne EM, Liu M, et al. Outcomes of stereotactic body radiotherapy 60 Gy in 8 fractions when prioritizing organs at risk for central and ultracentral lung tumors. *Radiation Oncology* 2020;15(1):61.
144. Rodríguez N, Algara M, Foro P, Lacruz M, Reig A, Membrive I, et al. Predictors of Acute Esophagitis in Lung Cancer Patients Treated With Concurrent Three-Dimensional Conformal Radiotherapy and Chemotherapy. *International Journal of Radiation Oncology\*Biography\*Physics* 2009;73(3):810–7.
145. Baker S, Fairchild A. Radiation-induced esophagitis in lung cancer. *Lung Cancer: Targets and Therapy* 2016;Volume 7:119–27.
146. Cox JD, Stetz J, Pajak TF. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European organization for research and treatment of cancer (EORTC). *International Journal of Radiation Oncology\*Biography\*Physics* 1995;31(5):1341–6.
147. Käsman L, Dietrich A, Staab-Weijnitz CA, Manapov F, Behr J, Rimner A, et al. Radiation-induced lung toxicity – cellular and molecular mechanisms of pathogenesis, management, and literature review. *Radiation Oncology* 2020;15(1):214.
148. Jaffray DA. Image-guided radiotherapy: from current concept to future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol* 2012;9(12):688–99.
149. O'Rourke SFC, McAneney H, Hillen T. Linear quadratic and tumour control probability modelling in external beam radiotherapy. *J Math Biol* 2009;58(4–5):799–817.
150. Huang RX, Zhou PK. DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer. *Signal Transduct Target Ther* 2020;5(1):60.
151. Puerta-Ortiz JA, Morales-Aramburo J. Efectos biológicos de las radiaciones ionizantes. *Revista Colombiana de Cardiología* 2020;27:61–71.
152. Wang J song, Wang H juan, Qian H li. Biological effects of radiation on cancer cells. *Mil Med Res* 2018;5(1).
153. Parker JJ, Jones JC, Strober S, Knox SJ. Characterization of direct radiation-induced immune function and molecular signaling changes in an antigen presenting cell line. *Clinical Immunology* 2013;148(1):44–55.
154. Herrera FG, Bourhis J, Coukos G. Radiotherapy combination opportunities leveraging immunity for the next oncology practice. *CA Cancer J Clin* 2017;67(1):65–85.
155. Rakotomalala A, Escande A, Furlan A, Meignan S, Lartigau E. Hypoxia in Solid Tumors: How Low Oxygenation Impacts the “Six Rs” of Radiotherapy. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021;12.
156. Boustani J, Grapin M, Laurent PA, Apetoh L, Mirjolet C. The 6th R of Radiobiology: Reactivation of Anti-Tumor Immune Response. *Cancers (Basel)* 2019;11(6):860.

157. Arenas M, Gil F, Gironella M, Hernández V, Jorcano S, Biete A, et al. Anti-inflammatory effects of low-dose radiotherapy in an experimental model of systemic inflammation in mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;66(2):560–7.
158. Cui J, Yang G, Pan Z, Zhao Y, Liang X, Li W, et al. Hormetic response to low-dose radiation: Focus on the immune system and its clinical implications. *Int J Mol Sci* 2017;18(2).
159. Pilonis KA, Vanpouille-Box C, Demaria S. Combination of Radiotherapy and Immune Checkpoint Inhibitors. *Semin Radiat Oncol* 2015;25(1):28–33.
160. Mole RH. Whole Body Irradiation—Radiobiology or Medicine? *Br J Radiol* 1953;26(305):234–41.
161. Van Der Woude LL, Gorris MAJ, Wortel IMN, Creemers JHA, Verrijp K, Monkhorst K, et al. Tumor microenvironment shows an immunological abscopal effect in patients with NSCLC treated with pembrolizumab-radiotherapy combination. *J Immunother Cancer* 2022;10(10).
162. Zhou P, Chen D, Zhu B, Chen W, Xie Q, Wang Y, et al. Stereotactic Body Radiotherapy Is Effective in Modifying the Tumor Genome and Tumor Immune Microenvironment in Non-Small Cell Lung Cancer or Lung Metastatic Carcinoma. *Front Immunol* 2021;11.
163. Demaria S, Ng B, Devitt ML, Babb JS, Kawashima N, Liebes L, et al. Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics* 2004;58(3):862–70.
164. Navarro-Martín A, Galiana IL, Frances MAB, Cacicedo J, Cortés RC, Anton SC, et al. Preliminary study of the effect of stereotactic body radiotherapy (SBRT) on the immune system in lung cancer patients unfit for surgery: Immunophenotyping analysis. *Int J Mol Sci* 2018;19(12).
165. Liu C, Hu Q, Xu B, Hu X, Su H, Li Q, et al. Peripheral memory and naïve T cells in non-small cell lung cancer patients with lung metastases undergoing stereotactic body radiotherapy: predictors of early tumor response. *Cancer Cell Int* 2019;19(1):121.
166. Wang Q, Li S, Qiao S, Zheng Z, Duan X, Zhu X. Changes in T Lymphocyte Subsets in Different Tumors Before and After Radiotherapy: A Meta-analysis. *Front Immunol* 2021;12.
167. Shaverdian N, Lisberg AE, Bornazyan K, Veruttipong D, Goldman JW, Formenti SC, et al. Previous radiotherapy and the clinical activity and toxicity of pembrolizumab in the treatment of non-small-cell lung cancer: a secondary analysis of the KEYNOTE-001 phase 1 trial. *Lancet Oncol* 2017;18(7):895–903.
168. Atkinson A, Colburn W, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth DF, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69(3):89–95.
169. Jantus-Lewintre E, Usó M, Sanmartín E, Camps C. Update on biomarkers for the detection of lung cancer. *Lung Cancer: Targets and Therapy* 2012;3:21–9.
170. Ortega M, Navarro F, Pekarek L, Fraile-Martínez O, García-Montero C, Saez M, et al. Exploring histopathological and serum biomarkers in lung adenocarcinoma: Clinical applications and translational opportunities (Review). *Int J Oncol* 2022;61(6).
171. Sozzi G, Boeri M, Rossi M, Verri C, Suatoni P, Bravi F, et al. Clinical Utility of a Plasma-Based miRNA Signature Classifier Within Computed Tomography Lung Cancer Screening: A Correlative MILD Trial Study. *Journal of Clinical Oncology* 2014;32(8):768–73.
172. Micheel C, Nass S, Omenn G. *Evolution of Translational Omics*. Washington, D.C.: National Academies Press; 2012.

173. Sun Q, Zhao W, Wang L, Guo F, Song D, Zhang Q, et al. Integration of metabolomic and transcriptomic profiles to identify biomarkers in serum of lung cancer. *J Cell Biochem* 2019;120(7):11981–9.
174. Ruiying C, Zeyun L, Yongliang Y, Zijia Z, Ji Z, Xin T, et al. A comprehensive analysis of metabolomics and transcriptomics in non-small cell lung cancer. *PLoS One* [Internet] 2020;15(5):e0232272–e0232272. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32374740>
175. Abolfathi H, Sheikhpour M, Shahraeini SS, Khatami S, Nojoudi SA. Studies in lung cancer cytokine proteomics: a review. *Expert Rev Proteomics* 2021;18(1):49–64.
176. Ahn JM, Sung HJ, Yoon YH, Kim BG, Yang WS, Lee C, et al. Integrated glycoproteomics demonstrates fucosylated serum paraoxonase 1 alterations in small cell lung cancer. *Mol Cell Proteomics* [Internet] 2014;13(1):30–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24085812>
177. Li XJ, Hayward C, Fong PY, Dominguez M, Hunsucker SW, Lee LW, et al. A blood-based proteomic classifier for the molecular characterization of pulmonary nodules. *Sci Transl Med* 2013;5(207).
178. Ros-Mazurczyk M, Jelonek K, Marczyk M, Binczyk F, Pietrowska M, Polanska J, et al. Serum lipid profile discriminates patients with early lung cancer from healthy controls. *Lung Cancer* 2017;112:69–74.
179. Klupczynska A, Plewa S, Kasprzyk M, Dyszkiewicz W, Kokot ZJ, Matysiak J. Serum lipidome screening in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Clin Exp Med* 2019;19(4):505–13.
180. Yu Z, Chen H, Ai J, Zhu Y, Li Y, Borgia JA, et al. Global lipidomics identified plasma lipids as novel biomarkers for early detection of lung cancer [Internet]. 2017. Available from: [www.impactjournals.com/oncotarget](http://www.impactjournals.com/oncotarget)
181. Lv M, Shao S, Du Y, Zhuang X, Wang X, Qiao T. Plasma Lipidomics Profiling to Identify the Biomarkers of Diagnosis and Radiotherapy Response for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Patients. *J Lipids* 2024;2024:1–40.
182. Gillies RJ, Kinahan PE, Hricak H. Radiomics: Images are more than pictures, they are data. *Radiology* 2016;278(2):563–77.
183. Lambin P, Rios-Velazquez E, Leijenaar R, Carvalho S, Van Stiphout RGPM, Granton P, et al. Radiomics: Extracting more information from medical images using advanced feature analysis. *Eur J Cancer* 2012;48(4):441–6.
184. Aerts HJWL, Velazquez ER, Leijenaar RTH, Parmar C, Grossmann P, Cavalho S, et al. Decoding tumour phenotype by noninvasive imaging using a quantitative radiomics approach. *Nat Commun* 2014;5.
185. Yoon HJ, Sohn I, Cho JH, Lee HY, Kim JH, Choi Y La, et al. Decoding tumor phenotypes for ALK, ROS1, and RET fusions in lung adenocarcinoma using a radiomics approach. *Medicine (United States)* 2015;94(41).
186. Lin Y, Leng Q, Jiang Z, Guarnera MA, Zhou Y, Chen X, et al. A classifier integrating plasma biomarkers and radiological characteristics for distinguishing malignant from benign pulmonary nodules. *Int J Cancer* 2017;141(6):1240–8.
187. Pedersen S, Hansen JB, Maltesen RG, Szejniuk WM, Andreassen T, Falkmer U, et al. Identifying metabolic alterations in newly diagnosed small cell lung cancer patients. *Metabol Open* 2021;12:100127.
188. Madama D, Martins R, Pires AS, Botelho MF, Alves MG, Abrantes AM, et al. Metabolomic profiling in lung cancer: A systematic review. *Metabolites* 2021;11(9).
189. Yu L, Li K, Zhang X. Next-generation metabolomics in lung cancer diagnosis, treatment and precision medicine: mini review. *Oncotarget* 2017;8(70):115774–86.
190. Kannampuzha S, Mukherjee AG, Wanjari UR, Gopalakrishnan AV, Murali R, Namachivayam A, et al. A Systematic Role of Metabolomics, Metabolic

- Pathways, and Chemical Metabolism in Lung Cancer. *Vaccines (Basel)* 2023;11(2).
191. Ni J, Xu L, Li W, Wu L. Simultaneous determination of thirteen kinds of amino acid and eight kinds of acylcarnitine in human serum by LC–MS/MS and its application to measure the serum concentration of lung cancer patients. *Biomedical Chromatography* 2016;30(11):1796–806.
  192. Costanzo M, Caterino M, Ruoppolo M. Targeted metabolomics. In: *Metabolomics Perspectives*. Elsevier; 2022. page 219–36.
  193. Qi S ang, Wu Q, Chen Z, Zhang W, Zhou Y, Mao K, et al. High-resolution metabolomic biomarkers for lung cancer diagnosis and prognosis. *Sci Rep* 2021;11(1).
  194. Miller HA, van Berkel VH, Frieboes HB. Lung cancer survival prediction and biomarker identification with an ensemble machine learning analysis of tumor core biopsy metabolomic data. *Metabolomics* 2022;18(8):57.
  195. Xie Y, Meng WY, Li RZ, Wang YW, Qian X, Chan C, et al. Early lung cancer diagnostic biomarker discovery by machine learning methods. *Transl Oncol* 2021;14(1).
  196. Mo L, Wei B, Liang R, Yang Z, Xie S, Wu S, et al. Exploring potential biomarkers for lung adenocarcinoma using LC-MS/MS metabolomics. *Journal of International Medical Research* 2020;48(4).
  197. Klupczynska A, Dereziński P, Garrett TJ, Rubio VY, Dyszkiewicz W, Kasprzyk M, et al. Study of early stage non-small-cell lung cancer using Orbitrap-based global serum metabolomics. *J Cancer Res Clin Oncol* 2017;143(4):649–59.
  198. Zhang L, Zheng J, Ahmed R, Huang G, Reid J, Mandal R, et al. A high-performing plasma metabolite panel for early-stage lung cancer detection. *Cancers (Basel)* 2020;12(3).
  199. Miyagi Y, Higashiyama M, Gochi A, Akaike M, Ishikawa T, Miura T, et al. Plasma free amino acid profiling of five types of cancer patients and its application for early detection. *PLoS One* 2011;6(9).
  200. Ni J, Xu L, Li W, Zheng C, Wu L. Targeted metabolomics for serum amino acids and acylcarnitines in patients with lung cancer. *Exp Ther Med* 2019;
  201. Wikoff WR, Grapov D, Fahrman JF, DeFelice B, Rom WN, Pass HI, et al. Metabolomic markers of altered nucleotide metabolism in early stage adenocarcinoma. *Cancer Prevention Research* 2015;8(5):410–8.
  202. Fahrman JF, Kim K, DeFelice BC, Taylor SL, Gandara DR, Yoneda KY, et al. Investigation of metabolomic blood biomarkers for detection of adenocarcinoma lung cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 2015;24(11):1716–23.
  203. Zang X, Zhang J, Jiao P, Xue X, Lv Z. Non-Small Cell Lung Cancer Detection and Subtyping by UPLC-HRMS-Based Tissue Metabolomics. *J Proteome Res* 2022;21(8):2011–22.
  204. Shingyoji M, Iizasa T, Higashiyama M, Imamura F, Saruki N, Imaizumi A, et al. The significance and robustness of a plasma free amino acid (PFAA) profile-based multiplex function for detecting lung cancer [Internet]. 2013. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/13/77>
  205. Hao D, Sarfaraz MO, Farshidfar F, Bebb DG, Lee CY, Card CM, et al. Temporal characterization of serum metabolite signatures in lung cancer patients undergoing treatment. *Metabolomics* 2016;12(3):1–9.
  206. Liu J, Shen H, Gu W, Zheng H, Wang Y, Ma G, et al. Prediction of prognosis, immunogenicity and efficacy of immunotherapy based on glutamine metabolism in lung adenocarcinoma. *Front Immunol* 2022;13.
  207. Puchades-Carrasco L, Jantus-Lewintre E, Pérez-Rambla C, García-García F, Lucas R, Calabuig S, et al. Serum metabolomic profiling facilitates the non-invasive identification of metabolic biomarkers associated with the onset and



- progression of non-small cell lung cancer [Internet]. 2016. Available from: [www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/)
208. Bergman B, Aaronson NK, Ahmedzai S, Kaasa S, Sullivan M. The EORTC QLQ-LC13: a modular supplement to the EORTC core quality of life questionnaire (QLQ-C30) for use in lung cancer clinical trials. *Eur J Cancer* 1994;30(5):635–42.
  209. Fort-Gallifa I, García-Heredia A, Hernández-Aguilera A, Simó JM, Sepúlveda J, Martín-Paredero V, et al. Biochemical indices of oxidative stress and inflammation in the evaluation of peripheral artery disease. *Free Radic Biol Med* 2016;97:568–76.
  210. Bräkling S, Hinterleitner C, Cappellin L, Vetter M, Mayer I, Benter T, et al. Gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry using parallel electron and chemical ionization with permeation tube facilitated reagent ion control for material emission analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2023;37(7).
  211. Hofman DL, van Buul VJ, Brouns FJPH. Nutrition, Health, and Regulatory Aspects of Digestible Maltodextrins. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2016;56(12):2091–100.
  212. Liberti M V., Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci* 2016;41(3):211–8.
  213. Li M, Wu C, Yang Y, Zheng M, Yu S, Wang J, et al. 3-Phosphoglycerate dehydrogenase: a potential target for cancer treatment. *Cellular Oncology* 2021;44(3):541–56.
  214. Mullarky E, Lucki NC, Beheshti Zavareh R, Anglin JL, Gomes AP, Nicolay BN, et al. Identification of a small molecule inhibitor of 3-phosphoglycerate dehydrogenase to target serine biosynthesis in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2016;113(7):1778–83.
  215. Hennequart M, Labuschagne CF, Tajan M, Pilley SE, Cheung EC, Legrave NM, et al. The impact of physiological metabolite levels on serine uptake, synthesis and utilization in cancer cells. *Nat Commun* 2021;12(1):6176.
  216. Tu S, Zhang X, Wan H, Xia Y, Liu Z, Yang X, et al. Effect of taurine on cell proliferation and apoptosis human lung cancer A549 cells. *Oncol Lett* 2018;
  217. Kumar N, Shahjaman M, Mollah MNH, Islam SMS, Hoque MA. Serum and Plasma Metabolomic Biomarkers for Lung Cancer. *Bioinformatics [Internet]* 2017;13(6):202–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28729763>
  218. Wang L, Peng W, Wu T, Deng P, Zhao YL. Increased glutamine anabolism sensitizes non-small cell lung cancer to gefitinib treatment. *Cell Death Discov* 2018;4(1):84.
  219. Zhao Q, Cao Y, Wang Y, Hu C, Hu A, Ruan L, et al. Plasma and tissue free amino acid profiles and their concentration correlation in patients with lung cancer. *Asia Pac J Clin Nutr* 2014;23(3):429–36.
  220. Vanhove K, Giesen P, Owokotomo OE, Mesotten L, Louis E, Shkedy Z, et al. The plasma glutamate concentration as a complementary tool to differentiate benign PET-positive lung lesions from lung cancer. *BMC Cancer* 2018;18(1):868.
  221. Leithner K, Triebel A, Trötz Müller M, Hinteregger B, Leko P, Wieser BI, et al. The glycerol backbone of phospholipids derives from noncarbohydrate precursors in starved lung cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2018;115(24):6225–30.
  222. Röhrig F, Schulze A. The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. *Nat Rev Cancer* 2016;16(11):732–49.
  223. Erez A, Shchelochkov OA, Plon SE, Scaglia F, Lee B. Insights into the Pathogenesis and Treatment of Cancer from Inborn Errors of Metabolism. *The American Journal of Human Genetics* 2011;88(4):402–21.

224. Wang X, Zhao X, Chou J, Yu J, Yang T, Liu L, et al. Taurine, glutamic acid and ethylmalonic acid as important metabolites for detecting human breast cancer based on the targeted metabolomics. *Cancer Biomarkers* 2018;23(2):255–68.
225. He J, Han Z, Luo W, Shen J, Xie F, Liao L, et al. Serum organic acid metabolites can be used as potential biomarkers to identify prostatitis, benign prostatic hyperplasia, and prostate cancer. *Front Immunol* 2023;13.
226. Lachaux C, Frazao CJR, Kraußer F, Morin N, Walther T, François JM. A New Synthetic Pathway for the Bioproduction of Glycolic Acid From Lignocellulosic Sugars Aimed at Maximal Carbon Conservation. *Front Bioeng Biotechnol* 2019;7.
227. Ghanem N, El-Baba C, Araji K, El-Khoury R, Usta J, Darwiche N. The Pentose Phosphate Pathway in Cancer: Regulation and Therapeutic Opportunities. *Chemotherapy* 2021;66(5–6):179–91.
228. Hori S, Nishiumi S, Kobayashi K, Shinohara M, Hatakeyama Y, Kotani Y, et al. A metabolomic approach to lung cancer. *Lung Cancer* 2011;74(2):284–92.
229. Holmes E, Wilson ID, Nicholson JK. Metabolic Phenotyping in Health and Disease. *Cell* 2008;134(5):714–7.
230. Rodríguez-Tomás E, Arguís M, Arenas M, Fernández-Arroyo S, Murcia M, Sabater S, et al. Alterations in plasma concentrations of energy-balance-related metabolites in patients with lung, or head & neck, cancers: Effects of radiotherapy. *J Proteomics* 2020;213.
231. Giovacchini G, Picchio M, Schipani S, Landoni C, Gianolli L, Bettinardi V, et al. Changes in Glucose Metabolism during and after Radiotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer. *Tumori Journal* 2009;95(2):177–84.
232. Arenas M, Rodríguez E, García-Heredia A, Fernández-Arroyo S, Sabater S, Robaina R, et al. Metabolite normalization with local radiotherapy following breast tumor resection. *PLoS One* 2018;13(11):e0207474.
233. Ablá H, Sollazzo M, Gasparre G, Iommarini L, Porcelli AM. The multifaceted contribution of  $\alpha$ -ketoglutarate to tumor progression: An opportunity to exploit? *Semin Cell Dev Biol* 2020;98:26–33.
234. Yang M, Soga T, Pollard PJ, Adam J. The emerging role of fumarate as an oncometabolite. *Front Oncol* 2012;2.
235. Liu PS, Wang H, Li X, Chao T, Teav T, Christen S, et al.  $\alpha$ -ketoglutarate orchestrates macrophage activation through metabolic and epigenetic reprogramming. *Nat Immunol* 2017;18(9):985–94.
236. Cruzat V, Macedo Rogero M, Noel Keane K, Curi R, Newsholme P. Glutamine: Metabolism and Immune Function, Supplementation and Clinical Translation. *Nutrients* 2018;10(11):1564.
237. Tomar MS, Kumar A, Shrivastava A. Mitochondrial metabolism as a dynamic regulatory hub to malignant transformation and anti-cancer drug resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 2024;694:149382.
238. Kurhaluk N. Tricarboxylic Acid Cycle Intermediates and Individual Ageing. *Biomolecules* 2024;14(3):260.
239. Stincone A, Prigione A, Cramer T, Wamelink MMC, Campbell K, Cheung E, et al. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews* 2015;90(3):927–63.
240. Xiang S, Ge Y, Zhang Y, Bao X, Su X, Shi L, et al. L-arabinose exerts probiotic functions by improving gut microbiota and metabolism in vivo and in vitro. *J Funct Foods* 2024;113:106047.
241. Li Z, Cui J. Targeting the lactic acid metabolic pathway for antitumor therapy. *Mol Ther Oncolytics* 2023;31:100740.
242. Jomova K, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, Valko M. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes,

- nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants. *Arch Toxicol* 2024;98(5):1323–67.
243. Kinj R, Bourhis J. How Stereotactic Radiotherapy Changed the Landscape in Cancer Care. *Cancers (Basel)* 2023;15(6):1734.
244. Golden EB, Demaria S, Schiff PB, Chachoua A, Formenti SC. An abscopal response to radiation and ipilimumab in a patient with metastatic non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Res* 2013;1(6):365–72.
245. Swamy K. Stereotactic Body Radiotherapy Immunological Planning—A Review With a Proposed Theoretical Model. *Front Oncol* 2022;12.
246. Bader JE, Voss K, Rathmell JC. Targeting Metabolism to Improve the Tumor Microenvironment for Cancer Immunotherapy. *Mol Cell* 2020;78(6):1019–33.
247. Peng SL, Wang R, Zhou YL, Wei W, Zhong GH, Huang XT, et al. Insight of a Metabolic Prognostic Model to Identify Tumor Environment and Drug Vulnerability for Lung Adenocarcinoma. *Front Immunol* 2022;13.
248. Maldonado F, Duan F, Raghunath SM, Rajagopalan S, Karwoski RA, Garg K, et al. Noninvasive Computed Tomography-based Risk Stratification of Lung Adenocarcinomas in the National Lung Screening Trial. *Am J Respir Crit Care Med [Internet]* 2015;192(6):737–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26052977>
249. Wang H, Schabath MB, Liu Y, Berglund AE, Bloom GC, Kim J, et al. Semiquantitative Computed Tomography Characteristics for Lung Adenocarcinoma and Their Association With Lung Cancer Survival. *Clin Lung Cancer [Internet]* 2015;16(6):e141–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26077095>

# ANEXOS



## ANEXO 1.



**CEIm**  
Comité Ètic d'Investigació amb medicaments



S 26 / 03 FEB 2017

### INFORME DEL COMITÉ ÈTIC DE INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS

**ENMIENDA RELEVANTE** por cambio de título del estudio "Paraoxonasa-1 y MCP-1 como posibles marcadores de la respuesta de la toxicidad al tratamiento con radioterapia en pacientes con cáncer de mama" pasando a denominarse "Biomarcadores de la oxidación, la inflamación y el metabolismo energético para la evaluación de la respuesta al tratamiento con radioterapia en el cáncer de pulmón".

**TÍTULO:** "Biomarcadores de la oxidación, la inflamación y el metabolismo energético para la evaluación de la respuesta al tratamiento con radioterapia en el cáncer de pulmón".

**PROTOCOLO:** no versionado  
**Referencia CEIm:** 14/2017

**D. Josep M. Alegret Colomé, Secretario del Comité de Ética de Investigación Clínica.**

#### HACE CONSTAR QUE:

1º Ha decidido emitir **informe favorable** correspondiente a la evaluación de la **enmienda relevante** por cambio de título del estudio "Paraoxonasa-1 y MCP-1 como posibles marcadores de la respuesta de la toxicidad al tratamiento con radioterapia en pacientes con cáncer de mama". Queda el título del estudio tras la enmienda: "Biomarcadores de la oxidación, la inflamación y el metabolismo energético para la evaluación de la respuesta al tratamiento con radioterapia en el cáncer de pulmón".

2º Este Comité cumple con los requisitos establecidos en la legislación vigente - Real Decreto 1090/2015 - para que la decisión del citado CEIC sea válida.

3º El CEIC del Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, tanto en su composición, como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95).

4º La composición actual del CEIm del Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili de Reus es la siguiente:

#### Presidente

**Dra. Maria Teresa Auguet Quintilla**  
Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitari Joan XXIII. Representante de la Comisión de Investigación.

#### Secretario

**Dr. Josep M<sup>a</sup> Alegret Colomé**  
Cardiólogo. Hospital Universitari Sant Joan de Reus.

#### Vocales

**Dr. Francisco Avilés Jurado**  
Otorrinolaringólogo. Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitari Joan XXIII. Representante de la Comisión de Bioética Asistencial.

Registre de Fundacions de la Generalitat de Catalunya, núm. empresa 4.154. NIF: U4381820



Edifici de Nutrició i Salut, Av. Universitat, 1, 2a planta (Campus Bellisens) - 43201 Reus (Tarragona) - Tel. 977 759 394 - Fax 977 759 393 - www.iispv.cat  
Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII - Edifici modular de Docència i Recerca - C/ Dr. Mallfré Guesch, 4 - Tel/Fax: 977 249 772  
Hospital Universitari Sant Joan de Reus, E2 - Av. del Dr. Josep Llorca, 1 - 43204 Reus (Tarragona) - Tel.: 977 310 300 - Ext.: 50517



S26 / 03 FEB 2017

**CEIm**  
Comité Ètic d'Investigació amb medicaments

**DE: DR. JOSEP M. ALEGRET COLOMÉ - SECRETARIO DEL CEIC**  
**A: DRA. MERITXELL ARENAS PRATS - ONCOLOGIA RADIOTERÀPICA**

**Asunto:** cambio de título  
**Código del protocolo:** PARAOXONASA  
**Codi CEIm:** 14/2017

Apreciada Dra. Arenas,

Le comunico que se ha evaluado la enmienda relevante por cambio de título del estudio "**Paraoxonasa-1 y MCP-1 como posibles marcadores de la respuesta de la toxicidad al tratamiento con radioterapia en pacientes con cáncer de mama.**" pasando a denominarse "**Biomarcadores de la oxidación, la inflamación y el metabolismo energético para la evaluación de la respuesta al tratamiento con radioterapia en el cáncer de pulmón.**"

Se considera la enmienda a nivel local **Favorable.**

Cordialmente,

Dr. Josep M. Alegret Colomé  
Secretario Comité de Ética de Investigación Clínica  
Insitut d'Investigació Sanitària Pèrre Virgili

Reus, 26 de Enero de 2017

Registre de Fundacions de la Generalitat de Catalunya, núm. invenció 2.206.- NIF G43814045



## ANEXO 2.



Biomarcadores de la oxidación, la inflamación y el metabolismo energético para la evaluación de la respuesta al tratamiento con radioterapia en pacientes con cáncer de pulmón.

### APÉNDICE A. HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

#### Título del estudio

Biomarcadores de la oxidación, la inflamación y el metabolismo energético para la evaluación respuesta al tratamiento con radioterapia en pacientes con cáncer de pulmón.

#### HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

##### Objetivo

El objetivo de esta hoja es darle información detallada sobre un estudio que analizará los factores genéticos y bioquímicos que pueden estar implicados en la respuesta al tratamiento así como el la toxicidad aguda y tardía del tratamiento de radioterapia.

##### Descripción de los procedimientos

Una vez leído y comprendido el estudio, si está de acuerdo en participar como voluntario, se le pedirá que firme el impreso de consentimiento informado. Algunos de los datos de su historia clínica y otros que usted nos facilite específicamente para este estudio, serán transferidos a una base de datos construida con esta finalidad, de forma anónima bajo una codificación, de manera que nada más el médico responsable podrá saber que le corresponde a usted.

Para la determinación genética y los análisis bioquímicos es necesaria la extracción de cuatro muestras de sangre. Con este volumen de sangre se pueden obtener las células suficientes que nos permitirán la realización de los estudios genéticos. Una vez realizado el análisis de los marcadores descritos en sus muestras, estas se conservarán para su posible utilización en el futuro, siempre tras la obtención de un nuevo consentimiento del paciente.



### **Beneficios**

Los beneficios de este estudio radican en poder determinar si existe relación entre los diferentes polimorfismos genéticos y la respuesta al tratamiento. La muestra obtenida no será utilizada con ninguna finalidad empresarial o que pueda implicar en la obtención de beneficios económicos.

### **Riesgos**

La participación en este estudio admite los riesgos asociados a cualquier punción venosa que se realiza por la extracción de sangre, que aunque suceden en un porcentaje muy bajo, debe saber:

- riesgo de infección aunque se realice en las condiciones de máxima asepsia.
- dolor en la zona de la punción.
- riesgo de aparición de un hematoma posteriormente a la punción.
- proceso inflamatorio local, lo que se conoce como flebitis, que se resuelve con tratamiento local pero que en muy raras ocasiones puede desencadenar un proceso tromboembólico.

### **Participación voluntaria**

La participación en este estudio es totalmente voluntaria y se podrá retirar de él en cualquier momento si lo cree conveniente sin tener que especificar los motivos y sin que su decisión perjudique en un futuro la atención médica que precisa ni la relación médicopaciente.

### **Confidencialidad**

Si usted está de acuerdo en tomar parte, su médico le pedirá que firme un consentimiento. Este significa que usted está de acuerdo en participar, y que no tiene objeciones en que las partes relevantes de su historia clínica puedan ser revisadas por personal autorizado para los propósitos del estudio. Se mantendrá la confidencialidad de todos los datos de carácter personal, ya sean derivados de su historia clínica, como del estudio de las muestras biológicas (cumpliendo la normativa legal sobre confidencialidad de datos: Ley Orgánica 15/1999 de 13 de Diciembre de Protección de Datos de carácter personal LOPD). Para mantener la confidencialidad de los datos todas las muestras se codificarán por medio de etiquetas con un código numérico exclusivo.

Si usted firma este documento de consentimiento informado no se incluirán los resultados de los estudios de biomarcadores en la historia clínica ni se informará de ellos a sus familiares, su médico personal ni a otras personas. De acuerdo con la ley española de Investigación

Biomédica 14/2007 (artículo 59), tiene usted derecho a saber (o a no saber) la información genética resultado del examen de sus muestras. Aunque el promotor no le informará de los resultados del estudio genético, si usted decide solicitar su información genética, pregunte a su médico del estudio sobre las implicaciones que esta información puede tener para usted y su familia.

Se mantendrá la confidencialidad de su historia clínica hasta el punto permitido por la legislación vigente. Si se publican los resultados del estudio, se mantendrá confidencial su identidad. En el caso de necesitar presentar resultados únicamente se le identificará por su número de paciente

### **Información adicional**

Si tiene alguna duda sobre algún aspecto o precisa algún comentario sobre el estudio, el responsable del mismo, el/la Dr/Dra..... le dará toda la información complementaria que usted desee.

Biomarcadores de la oxidación, la inflamación y el metabolismo energético para la evaluación de la respuesta al tratamiento con radioterapia en pacientes con cáncer de pulmón.

## APÉNDICE B. HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO AL PACIENTE

### HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO

**Título del estudio:** Biomarcadores de la oxidación, la inflamación y el metabolismo energético para la evaluación de la respuesta al tratamiento con radioterapia en pacientes con cáncer de pulmón.

Yo, .....(nombre y apellidos en mayúsculas)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido realizar preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con ..... (nombre del investigador en mayúsculas)

Comprendo que:

1. mi participación en este estudio es voluntaria
2. que este análisis no me supone ningún beneficio
3. que la no aceptación de participar en este estudio no repercutirá en mi atención médica
4. que la información obtenida en este estudio es confidencial.

Así pues, presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y autorizo a que mis datos obtenidos del estudio sean procesados y revisados tal y como se describe en la hoja de información al paciente.

**Firma del participante:**

**Firma del investigador:**

**Data:**

**Data:**

*1 original para el paciente; 1 original para el archivo del investigador.*

### **ANEXO 3.**

#### **Artículo**

### **Combining Metabolomics and Machine Learning to Identify Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Pre- and Post-Radiation Therapy**

Murcia-Mejía M, Canela-Capdevila M, García-Pablo R, Jiménez-Franco A, Jiménez-Aguilar JM, Badía J, Benavides-Villarreal R, Acosta J, Arguís M, Onoiu A, Castañé H, Camps J, Arenas M, Joven J

**Revista:** Biomolecules.

**Publicado:** 24 July 2024

**Quartil:** Biochemistry and Molecular Biology (Q1)

**Factor de impacto:** 4.8 (2023)

**DOI:** 10.3390/biom14080898



*biomolecules*



Article

---

# Combining Metabolomics and Machine Learning to Identify Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Pre- and Post-Radiation Therapy

---

Mauricio Murcia-Mejía, Marta Canela-Capdevila, Raquel García-Pablo, Andrea Jiménez-Franco, Juan Manuel Jiménez-Aguilar, Joan Badía, Rocío Benavides-Villarreal, Johana C. Acosta, Mónica Arguís, Alina-Iuliana Onoiu et al.

Special Issue

Molecular, Cellular, and Blood Biomarkers in Diagnosis, Prognosis, Monitoring, and Treatment

Edited by

Dr. Jordi Camps, Dr. Isabel Fort Gallifa and Dr. Xavier Gabaldó Barrios



<https://doi.org/10.3390/biom14080898>



Article

# Combining Metabolomics and Machine Learning to Identify Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Pre- and Post-Radiation Therapy

Mauricio Murcia-Mejía <sup>1,2,\*</sup>, Marta Canela-Capdevila <sup>1,2,†</sup>, Raquel García-Pablo <sup>1,2</sup>, Andrea Jiménez-Franco <sup>2</sup>, Juan Manuel Jiménez-Aguilar <sup>2</sup>, Joan Badía <sup>3</sup>, Rocío Benavides-Villarreal <sup>1,2</sup>, Johana C. Acosta <sup>1,2</sup>, Mónica Arguís <sup>1,2</sup>, Alina-Iuliana Onoiu <sup>2</sup>, Helena Castañé <sup>2</sup>, Jordi Camps <sup>2,\*</sup>, Meritxell Arenas <sup>1,2,\*</sup> and Jorge Joven <sup>2</sup>

- <sup>1</sup> Department of Radiation Oncology, Hospital Universitari de Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, 43204 Reus, Spain; mauricio.murcia@salutsantjoan.cat (M.M.-M.); marta.canela@iispv.cat (M.C.-C.); raquel.garcia@iispv.cat (R.G.-P.); americadelrocio.benavides@salutsantjoan.cat (R.B.-V.); johana.acosta@salutsantjoan.cat (J.C.A.); monica.arguis@salutsantjoan.cat (M.A.)
- <sup>2</sup> Unitat de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari de Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, 43204 Reus, Spain; andrea.jimenez@urv.cat (A.J.-F.); juanmaaguilar106@gmail.com (J.M.J.-A.); alinauliana.onoiu@urv.cat (A.-I.O.); helena.castane@iispv.cat (H.C.); jorge.joven@salutsantjoan.cat (J.J.)
- <sup>3</sup> Statistical Support Platform, Hospital Universitari de Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, 43204 Reus, Spain; joan.badia@iispv.cat
- \* Correspondence: jorge.camps@salutsantjoan.cat (J.C.); meritxell.arenas@urv.cat (M.A.); Tel.: +34-977310300 (J.C. & M.A.)
- † These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Murcia-Mejía, M.; Canela-Capdevila, M.; García-Pablo, R.; Jiménez-Franco, A.; Jiménez-Aguilar, J.M.; Badía, J.; Benavides-Villarreal, R.; Acosta, J.C.; Arguís, M.; Onoiu, A.-I.; et al. Combining Metabolomics and Machine Learning to Identify Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Pre- and Post-Radiation Therapy. *Biomolecules* **2024**, *14*, 898. <https://doi.org/10.3390/biom14080898>

Academic Editor: Kyungsook Han

Received: 14 June 2024

Revised: 22 July 2024

Accepted: 23 July 2024

Published: 24 July 2024



**Copyright:** © 2024 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:** Lung cancer is the leading cause of cancer-related deaths globally, with non-small cell lung cancer (NSCLC) accounting for over 85% of cases and poor prognosis in advanced stages. This study explored shifts in circulating metabolite levels in NSCLC patients versus healthy controls and examined the effects of conventionally fractionated radiation therapy (CFRT) and stereotactic body radiation therapy (SBRT). We enrolled 91 NSCLC patients (38 CFRT and 53 SBRT) and 40 healthy controls. Plasma metabolite levels were assessed using semi-targeted metabolomics, revealing 32 elevated and 18 reduced metabolites in patients. Key discriminatory metabolites included ethylmalonic acid, maltose, 3-phosphoglyceric acid, taurine, glutamic acid, glycolic acid, and D-arabinose, with a combined Receiver Operating Characteristics curve indicating perfect discrimination between patients and controls. CFRT and SBRT affected different metabolites, but both changes suggested a partial normalization of energy and amino acid metabolism pathways. In conclusion, metabolomics identified distinct metabolic signatures in NSCLC patients with potential as diagnostic biomarkers. The differing metabolic responses to CFRT and SBRT reflect their unique therapeutic impacts, underscoring the utility of this technique in enhancing NSCLC diagnosis and treatment monitoring.

**Keywords:** biomarkers; lung cancer; metabolomics; radiation therapy; stereotactic body radiation therapy

## 1. Introduction

Lung cancer stands as the predominant contributor to cancer-related fatalities worldwide, accounting for approximately 12% of all cases of cancer, with an annual incidence exceeding two million patients [1]. Non-small cell lung cancer (NSCLC) encompasses over 85% of lung cancer cases and is categorized into three principal histological subtypes: adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, and large cell carcinoma. The five-year survival rate for early stage, operable NSCLC averages around 70%; however, it declines to 10–13%



in advanced stages of the disease [2–4]. Presently, diagnosis heavily relies on symptomatology, often leading to late-stage detection and dismal prognoses. If the diagnosis could be shifted to early stages, the overall morbidity for this disease could profoundly decrease. Screening for lung cancer utilizing low-dose computed tomography has shown efficacy in mortality reduction [5]. However, the prevalence of individuals with indeterminate nodules, exorbitant costs, and resource constraints makes it necessary to investigate the discovery of more straightforward early diagnosis methods, ideally utilizing non-invasive or minimally invasive modalities, such as blood biomarkers [6], supplemented by clinical, epidemiological, imaging, and lifestyle data. This approach holds particular promise for individuals at high risk of lung cancer, as they may harbor subclinical disease for extended periods before symptomatic manifestation.

Recent research has underscored the pivotal role of investigating metabolic alterations in cancer development [7]. Cancer cell pathogenesis entails oncogene activation, apoptosis evasion, heightened replicative capacity, angiogenesis, and metabolic dysregulation, marked by alterations in signaling cascades, protein expression, and biochemical adaptation [8]. Predominant metabolic shifts in cancer cells encompass increased glucose consumption or aerobic glycolysis (the Warburg effect), augmented glutaminolysis, and heightened amino acid and lipid biosynthesis pathways [9–11]. Metabolomics emerges as a promising avenue in systems biology, aiming for the comprehensive interrogation of low-molecular-weight metabolites in biological specimens [12]. It is a potent tool for deciphering the biological pathways implicated in disease initiation and progression, furnishing invaluable insights into the molecular underpinnings of pathological processes [13]. Quantitative metabolomic profiling of plasma has been proposed as a candidate approach for lung cancer diagnosis and prognosis [14,15].

NSCLC patients typically undergo a treatment regimen comprising surgical resection, radiotherapy, chemotherapy, immunotherapy, and targeted therapy. In this study, we will refer to Conventionally Fractionated Radiation Therapy (CFRT) as encompassing two treatment schedules: normofractionated radiation therapy, which delivers 2 Gy per session on 30–33 consecutive fractions, and hypofractionated radiation therapy, which administers 4 Gy per session on 15 consecutive fractions. We will compare these treatments with another radiotherapy technique, stereotactic body radiation therapy (SBRT), also known as stereotactic ablative radiotherapy. SBRT has been introduced to improve treatment precision and reduce overall treatment time by delivering a narrow beam of high-dose radiation per fraction (>5 Gy to a specific target in fewer alternating fractions (between three and eight), ensuring accurate delivery to tumor tissue while sparing surrounding healthy tissue [16]. This treatment is commonly used for managing early stage tumors (less than 5 cm and with negative lymph nodes) in patients who are inoperable due to comorbidities, impaired respiratory function, or those who refuse surgery. In contrast, patients with inoperable locally advanced tumors (larger than 5 cm and with involved lymph nodes) are often treated with CFRT [17].

Therefore, this investigation aims to elucidate the shifts in circulating metabolite levels in NSCLC patients compared to healthy volunteers and delineate the effects induced by CFRT and SBRT. The overarching objective is identifying and proposing potential biomarkers for early diagnosis and prognosis of the disease.

## 2. Materials and Methods

We enrolled a cohort of 91 patients diagnosed with NSCLC who underwent either CFRT (38 patients) or SBRT (53 patients), collectively representing 99 treated lesions. All participants were treated at the Department of Radiation Oncology of the Hospital Universitari de Sant Joan de Reus between February 2013 and October 2022. Eligible patients exhibited a Karnofsky Performance Status Index > 70 and were classified as 0 or 1 on the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) scale.

The radiotherapy protocols included normofractionated radiotherapy (total dose 54–70 Gy delivered at 2 Gy/day, five days/week), hypofractionated radiotherapy (to-

tal dose 60 Gy delivered at 4 Gy/day, five days/week), or risk-adapted SBRT (total dose 54–60 Gy, three alternated days/week) utilizing Volumetric Modulated Arc Therapy (VMAT) via the Varian RapidArc<sup>®</sup> system (Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, USA). Additionally, fourteen NSCLC patients received concurrent treatment with cisplatin (50 mg/m<sup>2</sup>) and etoposide (50 mg/m<sup>2</sup>) intravenously every three weeks.

Assessment of acute toxicity throughout the course of treatment was conducted weekly, employing the criteria established by the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) [18].

Fasting blood samples were obtained at baseline and one-month post treatment. EDTA-plasma aliquots were promptly stored at −80 °C until metabolomic analyses were conducted. As a control group, we employed plasma samples from 40 healthy volunteers who had no clinical or analytical evidence of infectious disease, renal insufficiency, liver disease, neoplasia, or neurological disorders. These individuals were recruited from a population-based study conducted within our local region [19].

Semi-targeted metabolomics assessed the plasma levels of 74 metabolites involved in carbohydrates, amino acids, lipids, cofactors, vitamins, nucleotide pathways, energy metabolism, and xenobiotic biodegradation [20,21]. Plasma samples (50 µL) were mixed with an 8:2 (v/v) methanol: water solution containing internal standards, vortexed, and centrifuged. The supernatants (200 µL) were evaporated in a SpeedVac vacuum concentrator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and reconstituted with methoxyamine before silylation. Chromatographic separation was achieved using a 7890A gas chromatograph paired with a 7200-quadrupole time-of-flight mass spectrometer equipped with an electron impact source (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Moreover, the system was fitted with a 7693 autosampler module and a J&W Scientific HP-5MS column (30 ms 0.25 mm, 0.25 µm) from Agilent Technologies. Compound identification and semi-quantification were determined using Relative Units (RU) calculated based on compound area/internal standard area ratios, with ion selection guided by electron impact spectra and primary specific ions recorded in the Fiehn-pct-2013 spectral library.

Group comparisons were conducted using appropriate statistical tests based on variable types. Quantitative variables were analyzed by the Mann–Whitney U test (independent variables) or the Wilcoxon signed rank test (dependent variables), and results are shown as medians [interquartile ranges]. Categorical variables were evaluated by the  $\chi^2$  square test, and results are shown as number of cases (percentages). Significance was determined at  $p < 0.05$ . All analyses and plots were executed using RStudio version 4.3.1. Patient clinical characteristics were summarized using the TableOne package version 0.13.2. A logarithmic transformation was applied to metabolomic data. Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA) and Variable Importance in Projection (VIP) score analyses were performed using the ropls package version 1.32.0. Using the caret package version 6.0-94, a 5-fold cross-validated Support Vector Machine (SVM) multivariate model was trained on 70% of the data. The model was then tested on the remaining 30% of the data. Receiver Operating Characteristics (ROC) curves were generated using the PROC package version 1.18.5. Volcano plots and boxplots were created with the ggplot2 package version 3.5.1. All analyses utilized the latest package versions available on CRAN as of 28 April 2024.

### 3. Results

#### 3.1. Clinical Characteristics of Study Participants and Their Tumors

While most participants were men, notable differences emerged between NSCLC patients and the control group. These variances encompassed age, comorbidities such as diabetes mellitus, arterial hypertension, and dyslipidemia, as well as lifestyle factors like smoking and alcohol consumption. Patients treated with SBRT had a higher proportion of women and a lower prevalence of smokers than those receiving CFRT. The predominant tumor types among NSCLC patients were adenocarcinoma and squamous cell carcinoma,



with most lesions located in the right upper lobe, right lower lobe, or left upper lobe (Table 1).

**Table 1.** Main characteristics of lung cancer patients, their tumors, and the control group.

| Patient characteristics       | Control Group<br>n = 40 | All NSCLC Patients<br>n = 91 | CFRT<br>n = 38    | SBRT<br>n = 53    | p-Value |
|-------------------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------|-------------------|---------|
| Age (years)                   | 69.50 [65.0–74.0]       | 73.00 [66.5–79.0]            | 71.50 [66.8–77.8] | 74.00 [67.0–79.0] | *       |
| Women                         | 12 (30.0)               | 39 (42.9)                    | 8 (21.1)          | 31 (58.5)         | #       |
| Smoking habit                 | 9 (22.5)                | 69 (76.7)                    | 34 (91.9)         | 35 (66.0)         | * #     |
| Alcohol habit                 | 20 (50.0)               | 20 (22.0)                    | 11 (28.9)         | 9 (17.0)          | *       |
| Diabetes mellitus             | 3 (7.5)                 | 27 (30.0)                    | 11 (29.7)         | 16 (30.2)         | *       |
| Arterial hypertension         | 13 (32.5)               | 56 (62.2)                    | 21 (56.8)         | 35 (66.0)         | *       |
| Dyslipidemia                  | 6 (15.0)                | 43 (47.3)                    | 19 (50.0)         | 24 (45.3)         | *       |
| Non-cancer pulmonary disease  | NA                      | 58 (63.7)                    | 31 (81.6)         | 27 (50.9)         | NS      |
| Cardiovascular disease        | NA                      | 34 (37.4)                    | 20 (52.6)         | 14 (26.4)         | #       |
| <b>Cancer characteristics</b> |                         | <b>n = 99</b>                | <b>n = 38</b>     | <b>n = 61</b>     |         |
| Histology                     |                         |                              |                   |                   | NS      |
| Adenocarcinoma                | NA                      | 44 (44.4)                    | 15 (39.5)         | 29 (47.5)         |         |
| Squamous cell carcinoma       | NA                      | 42 (42.4)                    | 21 (55.3)         | 21 (34.4)         |         |
| Others                        | NA                      | 8 (8.1)                      | 2 (5.3)           | 6 (9.8)           |         |
| Not determined                | NA                      | 5 (5.1)                      | -                 | 5 (8.2)           |         |
| Stage                         |                         |                              |                   |                   | #       |
| Ia                            | NA                      | 60 (60.6)                    | 13 (34.2)         | 47 (77.0)         |         |
| Ib                            | NA                      | 15 (15.2)                    | 6 (15.8)          | 9 (14.8)          |         |
| Ila                           | NA                      | 1 (1.0)                      | 1 (2.6)           | 0 (0.0)           |         |
| Ilb                           | NA                      | 8 (8.1)                      | 3 (7.9)           | 5 (8.2)           |         |
| IIla                          | NA                      | 5 (5.1)                      | 5 (13.2)          | 0 (0.0)           |         |
| IIlb                          | NA                      | 8 (8.1)                      | 8 (21.1)          | 0 (0.0)           |         |
| IIlc                          | NA                      | 1 (1.0)                      | 1 (2.6)           | 0 (0.0)           |         |
| IV                            | NA                      | 1 (1.0)                      | 1 (2.6)           | 0 (0.0)           |         |
| Tumor location                |                         |                              |                   |                   | NS      |
| RUL                           | NA                      | 27 (27.6)                    | 10 (26.3)         | 17 (28.3)         |         |
| RML                           | NA                      | 5 (5.1)                      | 2 (5.3)           | 3 (5.0)           |         |
| RLL                           | NA                      | 21 (21.4)                    | 11 (28.9)         | 10 (16.7)         |         |
| LUL                           | NA                      | 27 (27.6)                    | 11 (28.9)         | 16 (26.7)         |         |
| LLL                           | NA                      | 18 (18.4)                    | 4 (10.5)          | 14 (23.3)         |         |

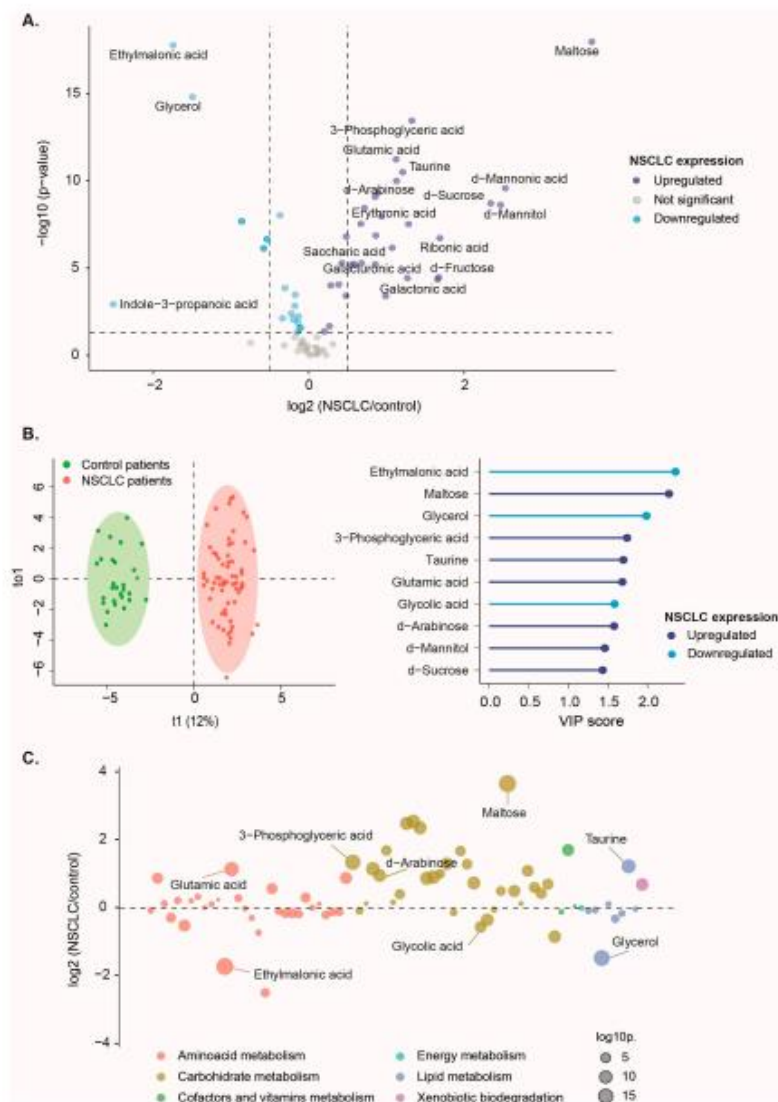
\*  $p < 0.05$ , cancer vs. control group; #  $p < 0.05$ , SBRT vs. CFRT. Age is shown as medians [interquartile ranges], and differences were analyzed by the Mann-Whitney U test. Qualitative variables are shown as n (%), and differences were analyzed by the  $\chi^2$  test. CFRT: Conventionally Fractionated Radiation Therapy; LLL: left lower lobe; LUL: left upper lobe; NA: not applicable; NS: not significant; NSCLC: non-small cell lung cancer; RLL: right lower lobe; RML: right middle lobe; RUL: right upper lobe; SBRT: stereotactic body radiation therapy.

### 3.2. Baseline Metabolite Levels Effectively Differentiate NSCLC Patients from the Control Group

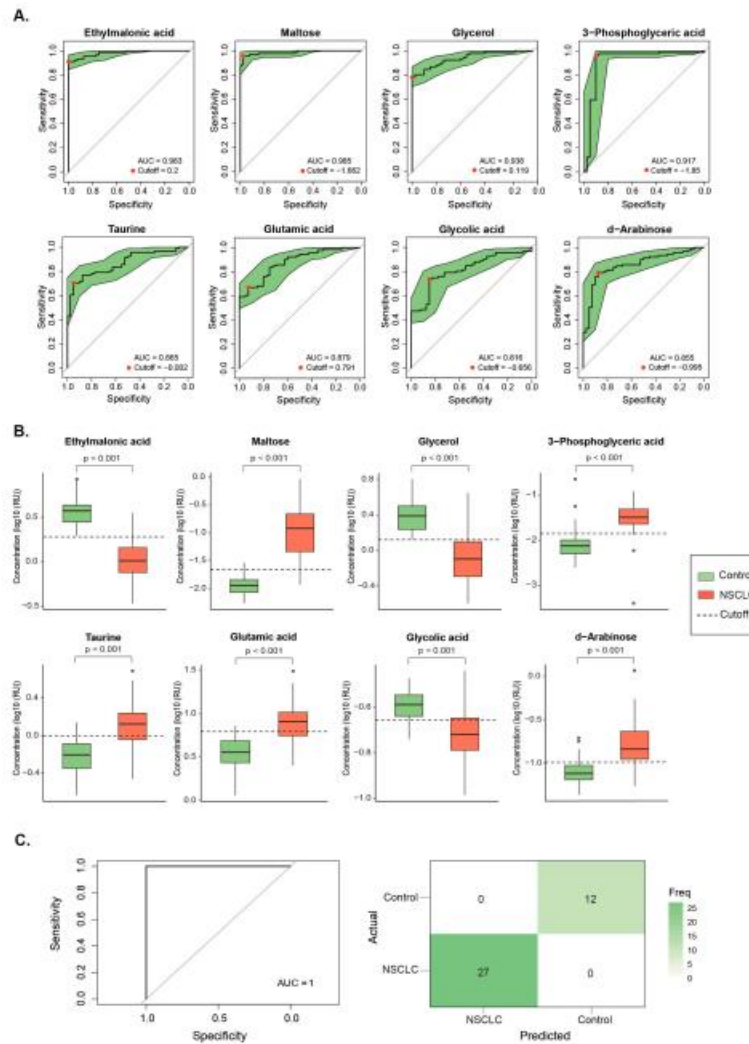
A comparison of metabolite concentrations revealed 32 significantly higher and 18 lower plasma metabolite levels in NSCLC patients compared to the control group (Figure 1A and Supplementary Table S1).

OPLS-DA successfully distinguished the metabolic profiles of healthy individuals and NSCLC patients. Specific metabolites such as ethylmalonic acid, maltose, glycerol, 3-phosphoglyceric acid, taurine, glutamic acid, glycolic acid, and d-arabinose showed higher discriminatory capacity in segregating the groups, as indicated by their VIP scores exceeding 1.5 points (Figure 1B). Among these, ethylmalonic acid, glycerol, and glycolic acid plasma concentrations were lower in NSCLC patients. In contrast, maltose, 3-phosphoglyceric acid, taurine, glutamic acid, and d-arabinose were higher. These findings suggest potential metabolic alterations associated with NSCLC, particularly in amino acid, carbohydrate, and lipid metabolism (Figure 1C).

For metabolites with VIP scores exceeding 1.5 points, we conducted univariate ROC curves, all of which yielded an area under the curve (AUC) higher than 0.8, indicating a high level of accuracy. Furthermore, the Youden index was computed for each curve to establish the optimal cutoff point for distinguishing NSCLC patients from healthy individuals (Figure 2A,B).



**Figure 1.** Comparative analysis of plasma metabolite profiles in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients and the control group. **(A)** Differential expression of plasma metabolites revealed significantly upregulated and downregulated metabolites in patients compared to the control group. **(B)** Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis showed a clear distinction between the metabolic profiles of NSCLC patients and healthy individuals, with eight metabolites exhibiting a Variable Importance in Projection (VIP) score greater than 1.5. **(C)** The most significant metabolites distinguishing NSCLC patients from the control group were associated with amino acid, carbohydrate, and lipid metabolism.

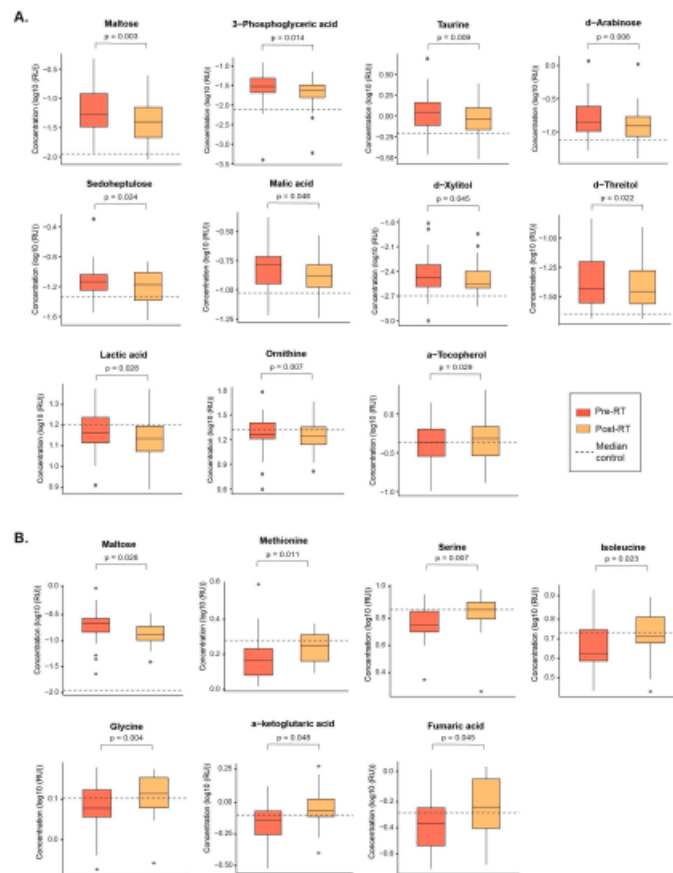


**Figure 2.** Plasma concentrations of ethylmalonic acid, maltose, glycerol, 3-phosphoglyceric acid, taurine, glutamic acid, glycolic acid, and d-arabinose had a high discriminating power to classify non-small cell lung cancer (NSCLC) patients from the control group. (A) Individual Receiver Operating Characteristics (ROC) curves showed an area under the curve (AUC) higher than 0.8. Red dots represent the optimal cutoff value determined by the Youden index for patient classification. (B) The Mann–Whitney U test revealed significant differences in plasma metabolite concentrations between NSCLC patients and healthy individuals. (C) The Support Vector Machine multivariate model showcased outstanding performance, with an ROC curve achieving an AUC of 1 and an unequivocal confusion matrix. Results and cutoffs are shown as log10 of Relative Units (RU).

Finally, a SVM multivariate model was trained and tested based on those metabolites with a VIP score higher than 1.5 points. The ROC curve yielded an AUC of 0.999 for the training dataset (Figure S1) and 1 for the testing dataset (Figure 2C), indicating perfect discrimination between classes.

### 3.3. SBRT and CFRT Induce Distinct Changes in the Plasma Metabolome

The two radiation therapy modalities produced distinct changes in the metabolic profiles of NSCLC patients. SBRT led to decreased plasma concentrations of maltose, 3-phosphoglyceric acid, taurine, d-arabinose, sedoheptulose, malic acid, d-xylitol, and d-threitol, indicating a trend toward normalization. However, it also decreased levels of lactic acid and ornithine while increasing levels of  $\alpha$ -tocopherol, further diverging from the profiles of healthy volunteers (Figure 3A and Supplementary Table S2).



**Figure 3.** This figure illustrates metabolites that exhibited significant changes after treatment compared to pre-RT values with either (A) stereotactic body radiation therapy or (B) Conventional Fractionated Radiotherapy. Statistical significance was determined using the Wilcoxon signed-rank test. The dashed line indicates the median metabolite value for healthy volunteers. Results are presented as the log<sub>10</sub> of Relative Units (RU).



In contrast, CFRT was associated with a lower concentration of maltose and higher concentrations of methionine, serine, isoleucine, glycine,  $\alpha$ -ketoglutaric acid, and fumaric acid. These changes indicate a partial return to normal levels for these metabolites (Figure 3B and Supplementary Table S3).

It is noteworthy that maltose was the only metabolite exhibiting similar changes after both SBRT and CFRT.

#### 4. Discussion

Our findings reveal a distinctive metabolic profile in individuals afflicted with NSCLC compared to healthy controls. The metabolites showing the most pronounced changes included maltose, 3-phosphoglyceric acid, taurine, glutamic acid, and d-arabinose, all of which had higher concentrations in NSCLC. Conversely, ethylmalonic acid, glycerol, and glycolic acid concentrations were decreased. The collective ROC curve generated from these metabolites effectively distinguished between patients and healthy controls, providing a clear and accurate classification.

Maltose, a disaccharide composed of two glucose molecules, arises from the breakdown of complex carbohydrates by the action of maltase. The higher plasma maltose concentrations found in NSCLC patients could be an adaptive response to the altered metabolic environment of the tumor, aiming to satisfy its energetic and biosynthetic needs [22].

3-phosphoglyceric acid is an intermediary metabolite in the glycolytic pathway that plays a crucial role in adenosine triphosphate generation. Under normal conditions, it converts into pyruvate, entering the mitochondria for complete oxidation in the tricarboxylic acid cycle. However, the persistence of heightened glycolytic activity in cancer cells, even in the presence of oxygen, is a hallmark of the Warburg effect [23]. Tumor metabolism prioritizes the generation of intermediates that support macromolecular biosynthesis, thereby providing a proliferative advantage. This metabolic shift likely leads to increased production of 3-phosphoglyceric acid; consequently, higher plasma concentrations in NSCLC patients can be found.

Taurine, also known as 2-aminoethanesulfonic acid, exhibits regulatory effects on various cellular processes, including the modulation of N-acetyl galactosaminyl transferase-2 expression and the downregulation of matrix metalloproteinase-2, thereby impeding invasion and metastasis [24]. Additionally, taurine demonstrates inhibitory effects on proliferation and pro-apoptotic properties in A549 lung cancer cells, with its efficacy being contingent upon dosage and exposure duration [25]. The increase in plasma concentrations of this amino acid in patients with NSCLC could be explained by a positive feedback mechanism attempting to counteract tumor development.

Glutamic acid assumes a pivotal role in metabolic pathways, with its involvement commencing at the onset of glutaminolysis, where glutamine undergoes conversion to glutamic acid catalyzed by glutaminase within the mitochondria. Studies have implicated glutamic acid as a discerning inflammatory marker in pulmonary pathologies [26]. Furthermore, in line with our results, consistent elevations in glutamic acid levels have been documented in patients with NSCLC, juxtaposed with a reduction in glutamine levels [27–29]. In addition, a significant increase in glutamic acid levels within lung cancer tissues compared to adjacent para-carcinomatous tissues has also been observed [30], suggesting a potential association between intratumoral gluconeogenesis and this amino acid.

The cell utilizes glycerol to synthesize intermediate metabolites essential for producing vital cellular components such as triglycerides and phospholipids. The observed lower concentrations of this metabolite in NSCLC patients may be attributed to its consumption by tumor tissue, where the accelerated synthesis of proteins, nucleic acids, and membranes occurs.

Insufficient data are available to fully interpret the underlying reasons behind the observed increase in d-arabinose concentrations and decreased glycolic acid and ethylmalonic plasma concentrations in NSCLC patients. D-arabinose is a five-carbon monosaccharide primarily found in specific plant sources, yet it is not commonly a part of human dietary

intake. In humans, the endogenous synthesis of d-arabinose occurs in negligible quantities. Glycolic acid, a simple organic acid, is derived from the metabolism of lactic acid catalyzed by lactate dehydrogenase. However, its role in central metabolic pathways is relatively limited compared to other compounds, and it does not play a pivotal role in any significant metabolic pathways [31]. The decline in glycolic acid levels of LC patients might be attributed to its utilization as an energy source. On the other hand, ethylmalonic acid is a branched-chain fatty acid that has garnered attention in investigating neurological diseases associated with inborn metabolic disorders. Interestingly, patients with inborn errors of metabolism are predisposed to developing cancer [32]. However, the potential role of ethylmalonic acid in the pathophysiology of cancer onset and development has not been reported to date.

The observed metabolic profile in individuals with NSCLC indicates potential metabolic adaptations associated with cancer progression. Elevated concentrations of maltose, 3-phosphoglyceric acid, taurine, glutamic acid, and d-arabinose suggest increased glycolytic activity, potential regulatory effects on cellular processes, and alterations in glutamine metabolism, which are consistent with metabolic reprogramming observed in cancer cells. Conversely, decreased levels of ethylmalonic acid, glycerol, and glycolic acid may reflect altered utilization of these metabolites in cancer cells for biosynthesis and energy production.

In recent years, some studies have explored metabolic changes in patients with lung cancer, aiming to utilize these alterations for improved disease diagnosis and prognosis. These investigations have identified potential biomarkers to distinguish between patients and healthy individuals and differentiate among various types and stages of the disease. For instance, Qi et al. [33] identified palmitic acid, heptadecanoic acid, 4-oxoproline, tridecanoic acid, and ornithine as potential candidates for lung cancer screening, achieving a fair discriminative ability with AUC values ranging from 0.82 to 0.86. Similarly, Zhang et al. [34] highlighted the predictive potential of phenylalanine, phosphoethanolamine, xanthosine, dehydroepiandrosterone, glucose, fructose, and phenylacetic, hydroxyoxoglutaric, allocolic, aminopentanoic, and uric acids in assessing the stage and progression of lung cancer, exhibiting moderate discrimination with AUC values between 0.70 and 0.80. More promising results were reported by Zhang et al. [35], with the identification of lysophosphatidylcholine 20:3, phosphatidylcholine 40:6, citric acid, hydroxybutyric acid, and fumaric acid showcasing a diagnostic accuracy of 0.90 for early stage NSCLC. Furthermore, a previous study from our group [36] demonstrated that glutamic acid determination alone could diagnose lung cancer with an accuracy of 0.90. Remarkably, the findings presented in our present article underscore the exceptional discriminatory capacity of our identified panel, achieving an AUC of 1.0 and demonstrating perfect discrimination between cases and controls. This development holds great promise for the future of NSCLC diagnosis.

The present study introduces a novel aspect by identifying the metabolic changes induced by CFRT and SBRT in patients with NSCLC. Both modalities tend to normalize the concentrations of some metabolites while altering others, with the affected metabolites differing between treatments. The differences in metabolic effects between CFRT and SBRT reflect the distinct biological responses to these therapies. Understanding these alterations requires considering several factors, including the mechanisms of action, the biological pathways involved, and the intensity and precision of the radiation delivered.

CFRT brought about a partial normalization of plasma levels of maltose, methionine, serine, and isoleucine while elevating the concentrations of glycine, fumaric, and  $\alpha$ -ketoglutaric acids beyond the median levels observed in healthy controls. Partial normalization of circulating levels of maltose and amino acids such as methionine, serine, and isoleucine after CFRT may reflect a decrease in carbohydrate metabolism and protein synthesis due to tumor mass reduction [36,37]. This observation suggests that CFRT might help restore normal cellular functions or reduce tumor-related disruptions in these pathways. On the other hand, increases in fumaric acid and  $\alpha$ -ketoglutaric acid may indicate



heightened oxidative stress and metabolic activity in response to radiation. These metabolites are tricarboxylic acid cycle components, suggesting enhanced mitochondrial activity or a stress response [38,39].

In contrast, SBRT significantly reduced the plasma concentrations of maltose-3-phosphoglyceric acid, taurine, d-arabinose, sedoheptulose, malic acid, d-xylitol, and d-threitol toward normalization. Furthermore, SBRT induced decreases in lactic acid and ornithine concentrations, as well as an increase in  $\alpha$ -tocopherol, thereby further distinguishing the metabolite profiles of LC patients from those of healthy controls.

The reduction of circulating levels of maltose, 3-phosphoglyceric acid, taurine, sedoheptulose, malic acid, and ornithine produced by SBRT could indicate a restoration of critical metabolic pathways such as the tricarboxylic acid cycle, the pentose cycle, and amino acid metabolism [40–43]. Changes in the levels of molecules generally foreign to the human body, such as d-arabinose, d-xylitol, and d-threitol, are challenging to interpret. However, one could speculate that they indicate alterations in the microbiome [8,44]. The decrease in lactic acid and ornithine may suggest a reduction in aerobic glycolysis (Warburg effect) and altered amino acid metabolism. Indeed, lactic acid is a byproduct of glycolysis, commonly elevated in tumors due to rapid cell proliferation [45]. A decrease in lactic acid suggests more efficient targeting of tumor cells and possibly better oxygenation of tissues post-treatment. Furthermore, an increase in  $\alpha$ -tocopherol suggests an enhancement of antioxidant defenses.  $\alpha$ -Tocopherol is a potent antioxidant, and its increase might be a protective response to mitigate radiation-induced oxidative damage [46].

The metabolic effects of CFRT and SBRT may differ significantly due to the distinct characteristics of each treatment and the cancer stage they target. CFRT administers lower doses of radiation per fraction over an extended period, causing sustained but less intense metabolic stress. This approach is typically applied to inoperable locally advanced tumors larger than 5 cm with involved lymph nodes. As a result, it may lead to gradual metabolic normalization and a steady stress response. In contrast, SBRT targets early stage tumors smaller than 5 cm with negative lymph nodes, delivering higher doses in fewer fractions, which results in acute and intense metabolic stress [47]. Moreover, CFRT affects a broader area, including surrounding healthy tissue, leading to extensive metabolic alterations as both tumor and normal cells respond to the radiation. Conversely, the high precision of SBRT targets the tumor more accurately, sparing healthy tissue and focusing the metabolic changes on tumor cell death, thereby reducing systemic metabolic disruption. In addition, SBRT activates the immune system more intensely than CFRT, potentially underlying the abscopal effect, which refers to effects observed at sites distant from the radiation administration [48–50]. This phenomenon presents a new avenue of research on the impact of these therapies on the immunometabolism of patients with lung cancer [51].

This study has its limitations. The sample size and demographics of the population studied may not fully represent the broader population affected by NSCLC, potentially limiting the generalizability of the findings. Variations in cancer stage among patients treated with SBRT or CFRT complicate attributing the observed metabolic changes solely to the type of radiotherapy administered. The cross-sectional design also hinders the establishment of causality or assessment of temporal relationships between biomarker levels and disease progression. Furthermore, interpreting metabolic changes in tumor tissue based on the measurement of circulating metabolites remains challenging. Addressing these limitations through more extensive multicenter, prospective studies, leveraging the vast amount of information provided by multi-omics approaches and artificial intelligence, could enable radiotherapy dose adjustments based on biomarkers related to tumor characteristics and radioresistance, thereby significantly improving the accuracy of NSCLC diagnosis and prognosis.

## 5. Conclusions

Our study identified significant metabolic alterations in NSCLC patients compared to healthy controls, highlighting specific metabolites which exhibited potential as biomark-

ers for early diagnosis. Both CFRT and SBRT induced distinct changes in the plasma metabolome, reflecting different metabolic responses to these treatments. Our findings underscore the potential of metabolomic profiling in improving lung cancer diagnosis, monitoring therapeutic responses, and guiding personalized treatment strategies.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biom14080898/s1>, Table S1: Plasma metabolite profiles of the control group and non-small cell lung cancer (NSCLC) patients pre-radiation therapy; Figure S1: Receiver Operating Characteristic (ROC) curve and confusion matrix generated using the training set of the data and a 5-fold cross validated Support Vector Machine model based on the 8 selected metabolites. The model distinguishes between non-small cell lung cancer patients (NSCLC) and the control group; Table S2: Plasma metabolite profiles of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients pre- and post-SBRT; Table S3: Plasma metabolite profiles of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients pre- and post-CFRT).

**Author Contributions:** Conceptualization, M.M.-M., M.C.-C., J.C. and M.A. (Meritxell Arenas); methodology, M.M.-M., M.C.-C., R.G.-P. and M.A. (Meritxell Arenas); software, M.C.-C., A.J.-F. and J.B.; validation, M.M.-M., M.C.-C., J.C. and M.A. (Meritxell Arenas); formal analysis, M.C.-C. and J.B.; investigation, M.M.-M., R.G.-P., A.J.-F., J.M.J.-A., R.B.-V., J.C.A., M.A. (Mónica Arguis), A.-I.O. and H.C.; resources, M.A. (Meritxell Arenas) and J.J.; data curation, M.M.-M., M.C.-C. and R.G.-P.; writing—original draft preparation, M.M.-M., M.C.-C. and J.C.; writing—review and editing, M.M.-M., M.C.-C., R.G.-P., A.J.-F., J.C. and M.A. (Meritxell Arenas); visualization, M.M.-M., M.C.-C., J.C. and M.A. (Meritxell Arenas); supervision, J.C., M.A. (Meritxell Arenas) and J.J.; project administration, J.C. and M.A. (Meritxell Arenas); funding acquisition, M.A. (Meritxell Arenas) and J.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study has been funded by the FUNDACIÓN CIENTÍFICA DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA CONTRA EL CÁNCER (Madrid, Spain) under the project “PRYES222747”, the FUNDACIÓ ONCOLÒGICA DR. AMADEU PELEGRÍ “AODAP/2023” (Salou, Spain), the SOCIETAT CATALANO-BALEAR D’ONCOLOGIA “OncoEsMou 2021” (Barcelona, Spain), and the INSTITUTO DE SALUD CARLOS III (Madrid, Spain) through the project “PI22/00770” and co-funded by the European Union.

**Institutional Review Board Statement:** This study was performed according to the declaration of Helsinki and was approved by the Comitè d’Ètica i Investigació en Medicaments (Institutional Review Board) of the HOSPITAL UNIVERSITARI DE SANT JOAN DE REUS and INSTITUT D’INVESTIGACIÓ SANITÀRIA PERE VIRGILI (project code: 14/2017, 26 January 2017).

**Informed Consent Statement:** Written informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors on request.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

## References

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Woodard, G.A.; Jones, K.D.; Jablons, D.M. Lung cancer staging and prognosis. *Cancer Treat. Res.* **2016**, *170*, 47–75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Goldstraw, P.; Chansky, K.; Crowley, J.; Rami-Porta, R.; Asamura, H.; Eberhardt, W.E.; Nicholson, A.G.; Groome, P.; Mitchell, A.; Bolejack, V.; et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* **2016**, *11*, 39–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Rodríguez De Dios, N.; Navarro-Martin, A.; Cigaral, C.; Chicas-Sett, R.; García, R.; García, V.; Gonzalez, J.A.; Gonzalo, S.; Murcia-Mejía, M.; Robaina, R.; et al. GOECP/SEOR radiotherapy guidelines for non-small-cell lung cancer. *World J. Clin. Oncol.* **2022**, *13*, 237–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



5. National Lung Screening Trial Research Team; Aberle, D.R.; Adams, A.M.; Berg, C.D.; Black, W.C.; Clapp, J.D.; Fagerstrom, R.M.; Gareen, I.F.; Gatsonis, C.; Marcus, P.M.; et al. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *365*, 395–409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Jantus-Lewintre, E.; Usó, M.; Sanmartín, E.; Camps, C. Update on biomarkers for the detection of lung cancer. *Lung Cancer* **2012**, *3*, 21–29. [[CrossRef](#)]
7. Kannampuzha, S.; Mukherjee, A.G.; Wanjari, U.R.; Gopalakrishnan, A.V.; Murali, R.; Namachivayam, A.; Renu, K.; Dey, A.; Vellingiri, B.; Madhyashta, H.; et al. A systematic role of metabolomics, metabolic pathways, and chemical metabolism in lung cancer. *Vaccines* **2023**, *11*, 381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: New dimensions. *Cancer Discov.* **2022**, *12*, 31–46. [[CrossRef](#)]
9. Yu, L.; Li, K.; Zhang, X. Next-generation metabolomics in lung cancer diagnosis, treatment and precision medicine: Mini review. *Oncotarget* **2017**, *8*, 115774–115786. [[CrossRef](#)]
10. Puchades-Carrasco, L.; Jantus-Lewintre, E.; Pérez-Rambla, C.; García-García, F.; Lucas, R.; Calabuig, S.; Blasco, A.; Dopazo, J.; Camps, C.; Pineda-Lucena, A. Serum metabolomic profiling facilitates the non-invasive identification of metabolic biomarkers associated with the onset and progression of non-small cell lung cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 12904–12916. [[CrossRef](#)]
11. Majem, B.; Nadal, E.; Muñoz-Pinedo, C. Exploiting metabolic vulnerabilities of non small cell lung carcinoma. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **2020**, *98*, 54–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Holmes, E.; Wilson, I.D.; Nicholson, J.K. Metabolic phenotyping in health and disease. *Cell* **2008**, *134*, 714–717. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Puchades-Carrasco, L.; Pineda-Lucena, A. Metabolomics in pharmaceutical research and development. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *35*, 73–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Seijo, L.M.; Peled, N.; Ajona, D.; Boeri, M.; Field, J.K.; Sozzi, G.; Pio, R.; Zulueta, J.J.; Spira, A.; Massion, P.P.; et al. Biomarkers in lung cancer screening: Achievements, promises, and challenges. *J. Thorac. Oncol.* **2019**, *14*, 343–357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Vanhove, K.; Derveaux, E.; Mesotten, L.; Thomeer, M.; Criel, M.; Mariën, H.; Adriaensens, P. Unraveling the rewired metabolism in lung cancer using quantitative NMR metabolomics. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 5602. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Song, X.; Wei, J.; Sun, R.; Jiang, W.; Chen, Y.; Shao, Y.; Gu, W. Stereotactic body radiation therapy versus conventional radiation therapy in pain relief for bone metastases: A systematic review and meta-analysis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2023**, *115*, 909–921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Wirsdörfer, F.; de Leve, S.; Jendrossek, V. Combining radiotherapy and immunotherapy in lung cancer: Can we expect limitations due to altered normal tissue toxicity? *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *20*, 24. [[CrossRef](#)]
18. Cox, J.D.; Stetz, J.; Pajak, T.F. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1995**, *31*, 1341–1346. [[CrossRef](#)]
19. Fort-Gallifa, I.; García-Heredia, A.; Hernández-Aguilera, A.; Simó, J.M.; Sepúlveda, J.; Martín-Paredero, V.; Camps, J.; Joven, J. Biochemical indices of oxidative stress and inflammation in the evaluation of peripheral artery disease. *Free Radic. Biol. Med.* **2016**, *97*, 568–576. [[CrossRef](#)]
20. Costanzo, M.; Caterino, M.; Ruoppolo, M. Targeted metabolomics. In *Metabolomics Perspectives: From Theory to Practical Application*; Troisy, J., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2022; pp. 219–236. [[CrossRef](#)]
21. Bräkling, S.; Hinterleitner, C.; Cappellin, L.; Vetter, M.; Mayer, I.; Benter, T.; Klee, S.; Kersten, H. Gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry using parallel electron and chemical ionization with permeation tube facilitated reagent ion control for material emission analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2023**, *37*, e9461. [[CrossRef](#)]
22. Hofman, D.L.; van Buul, V.J.; Brouns, F.J. Nutrition, health, and regulatory aspects of digestible maltodextrins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2016**, *56*, 2091–2100. [[CrossRef](#)]
23. Liberti, M.V.; Locasale, J.W. The Warburg effect: How does it benefit cancer cells? *Trends Biochem. Sci.* **2016**, *41*, 211–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Xie, Y.; Meng, W.Y.; Li, R.Z.; Wang, Y.W.; Qian, X.; Chan, C.; Yu, Z.F.; Fan, X.X.; Pan, H.D.; Xie, C.; et al. Early lung cancer diagnostic biomarker discovery by machine learning methods. *Transl. Oncol.* **2021**, *14*, 100907. [[CrossRef](#)]
25. Tu, S.; Zhang, X.; Wan, H.; Xia, Y.; Liu, Z.; Yang, X.; Wan, F. Effect of taurine on cell proliferation and apoptosis human lung cancer A549 cells. *Oncol. Lett.* **2018**, *15*, 5473–5480. [[CrossRef](#)]
26. Wang, L.; Peng, W.; Wu, T.; Deng, P.; Zhao, Y.L. Increased glutamine anabolism sensitizes non-small cell lung cancer to gefitinib treatment. *Cell. Death Discov.* **2018**, *4*, 24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Vanhove, K.; Giesen, P.; Owokotomo, O.E.; Mesotten, L.; Louis, E.; Shkedy, Z.; Thomeer, M.; Adriaensens, P. The plasma glutamate concentration as a complementary tool to differentiate benign PET-positive lung lesions from lung cancer. *BMC Cancer* **2018**, *18*, 868. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Fahrman, J.F.; Kim, K.; DeFelice, B.C.; Taylor, S.L.; Gandara, D.R.; Yoneda, K.Y.; Cooke, D.T.; Fiehn, O.; Kelly, K.; Miyamoto, S. Investigation of metabolomic blood biomarkers for detection of adenocarcinoma lung cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2015**, *24*, 1716–1723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Wikoff, W.; Grapov, D.; Fahrman, J.; DeFelice, B.; Rom, W.; Pass, H.; Kim, K.; Nguyen, U.; Taylor, S.L.; Gandara, D.R.; et al. Metabolomic markers of altered nucleotide metabolism in early stage adenocarcinoma. *Cancer Prev. Res.* **2015**, *8*, 410–418. [[CrossRef](#)]

5. National Lung Screening Trial Research Team; Aberle, D.R.; Adams, A.M.; Berg, C.D.; Black, W.C.; Clapp, J.D.; Fagerstrom, R.M.; Gareen, I.F.; Gatsonis, C.; Marcus, P.M.; et al. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *365*, 395–409. [CrossRef] [PubMed]
6. Jantus-Lewintre, E.; Usó, M.; Sanmartín, E.; Camps, C. Update on biomarkers for the detection of lung cancer. *Lung Cancer* **2012**, *3*, 21–29. [CrossRef]
7. Kannampuzha, S.; Mukherjee, A.G.; Wanjari, U.R.; Gopalakrishnan, A.V.; Murali, R.; Namachivayam, A.; Renu, K.; Dey, A.; Vellingiri, B.; Madhyastha, H.; et al. A systematic role of metabolomics, metabolic pathways, and chemical metabolism in lung cancer. *Vaccines* **2023**, *11*, 381. [CrossRef] [PubMed]
8. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: New dimensions. *Cancer Discov.* **2022**, *12*, 31–46. [CrossRef]
9. Yu, L.; Li, K.; Zhang, X. Next-generation metabolomics in lung cancer diagnosis, treatment and precision medicine: Mini review. *Oncotarget* **2017**, *8*, 115774–115786. [CrossRef]
10. Puchades-Carrasco, L.; Jantus-Lewintre, E.; Pérez-Rambla, C.; García-García, F.; Lucas, R.; Calabuig, S.; Blasco, A.; Dopazo, J.; Camps, C.; Pineda-Lucena, A. Serum metabolomic profiling facilitates the non-invasive identification of metabolic biomarkers associated with the onset and progression of non-small cell lung cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 12904–12916. [CrossRef]
11. Majem, B.; Nadal, E.; Muñoz-Pinedo, C. Exploiting metabolic vulnerabilities of non small cell lung carcinoma. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **2020**, *98*, 54–62. [CrossRef] [PubMed]
12. Holmes, E.; Wilson, I.D.; Nicholson, J.K. Metabolic phenotyping in health and disease. *Cell* **2008**, *134*, 714–717. [CrossRef] [PubMed]
13. Puchades-Carrasco, L.; Pineda-Lucena, A. Metabolomics in pharmaceutical research and development. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *35*, 73–77. [CrossRef] [PubMed]
14. Seijo, L.M.; Peled, N.; Ajona, D.; Boeri, M.; Field, J.K.; Sozzi, G.; Pio, R.; Zulueta, J.J.; Spira, A.; Massion, P.P.; et al. Biomarkers in lung cancer screening: Achievements, promises, and challenges. *J. Thorac. Oncol.* **2019**, *14*, 343–357. [CrossRef] [PubMed]
15. Vanhove, K.; Derveaux, E.; Mesotten, L.; Thomeer, M.; Criel, M.; Mariën, H.; Adriaensens, P. Unraveling the rewired metabolism in lung cancer using quantitative NMR metabolomics. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 5602. [CrossRef] [PubMed]
16. Song, X.; Wei, J.; Sun, R.; Jiang, W.; Chen, Y.; Shao, Y.; Gu, W. Stereotactic body radiation therapy versus conventional radiation therapy in pain relief for bone metastases: A systematic review and meta-analysis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2023**, *115*, 909–921. [CrossRef] [PubMed]
17. Wirsdörfer, F.; de Leve, S.; Jendrossek, V. Combining radiotherapy and immunotherapy in lung cancer: Can we expect limitations due to altered normal tissue toxicity? *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *20*, 24. [CrossRef]
18. Cox, J.D.; Stetz, J.; Pajak, T.F. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1995**, *31*, 1341–1346. [CrossRef]
19. Fort-Gallifa, I.; García-Heredia, A.; Hernández-Aguilera, A.; Simó, J.M.; Sepúlveda, J.; Martín-Paredero, V.; Camps, J.; Joven, J. Biochemical indices of oxidative stress and inflammation in the evaluation of peripheral artery disease. *Free Radic. Biol. Med.* **2016**, *97*, 568–576. [CrossRef]
20. Costanzo, M.; Caterino, M.; Ruoppolo, M. Targeted metabolomics. In *Metabolomics Perspectives: From Theory to Practical Application*; Troisy, J., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2022; pp. 219–236. [CrossRef]
21. Bräkling, S.; Hinterleitner, C.; Cappellin, L.; Vetter, M.; Mayer, I.; Benter, T.; Klee, S.; Kersten, H. Gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry using parallel electron and chemical ionization with permeation tube facilitated reagent ion control for material emission analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2023**, *37*, e9461. [CrossRef]
22. Hofman, D.L.; van Buul, V.J.; Brouns, F.J. Nutrition, health, and regulatory aspects of digestible maltodextrins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2016**, *56*, 2091–2100. [CrossRef]
23. Liberti, M.V.; Locasale, J.W. The Warburg effect: How does it benefit cancer cells? *Trends Biochem. Sci.* **2016**, *41*, 211–218. [CrossRef] [PubMed]
24. Xie, Y.; Meng, W.Y.; Li, R.Z.; Wang, Y.W.; Qian, X.; Chan, C.; Yu, Z.F.; Fan, X.X.; Pan, H.D.; Xie, C.; et al. Early lung cancer diagnostic biomarker discovery by machine learning methods. *Transl. Oncol.* **2021**, *14*, 100907. [CrossRef]
25. Tu, S.; Zhang, X.; Wan, H.; Xia, Y.; Liu, Z.; Yang, X.; Wan, F. Effect of taurine on cell proliferation and apoptosis human lung cancer A549 cells. *Oncol. Lett.* **2018**, *15*, 5473–5480. [CrossRef]
26. Wang, L.; Peng, W.; Wu, T.; Deng, P.; Zhao, Y.L. Increased glutamine anabolism sensitizes non-small cell lung cancer to gefitinib treatment. *Cell. Death Discov.* **2018**, *4*, 24. [CrossRef] [PubMed]
27. Vanhove, K.; Giesen, P.; Owokotomo, O.E.; Mesotten, L.; Louis, E.; Shkedy, Z.; Thomeer, M.; Adriaensens, P. The plasma glutamate concentration as a complementary tool to differentiate benign PET-positive lung lesions from lung cancer. *BMC Cancer* **2018**, *18*, 868. [CrossRef] [PubMed]
28. Fahrman, J.F.; Kim, K.; DeFelice, B.C.; Taylor, S.L.; Gandara, D.R.; Yoneda, K.Y.; Cooke, D.T.; Fiehn, O.; Kelly, K.; Miyamoto, S. Investigation of metabolomic blood biomarkers for detection of adenocarcinoma lung cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2015**, *24*, 1716–1723. [CrossRef] [PubMed]
29. Wikoff, W.; Grapov, D.; Fahrman, J.; DeFelice, B.; Rom, W.; Pass, H.; Kim, K.; Nguyen, U.; Taylor, S.L.; Gandara, D.R.; et al. Metabolomic markers of altered nucleotide metabolism in early stage adenocarcinoma. *Cancer Prev. Res.* **2015**, *8*, 410–418. [CrossRef]



30. Zhao, Q.; Cao, Y.; Wang, Y.; Hu, C.; Hu, A.; Ruan, L.; Bo, Q.; Liu, Q.; Chen, W.; Tao, F.; et al. Plasma and tissue free amino acid profiles and their concentration correlation in patients with lung cancer. *Asia Pac. J. Clin Nutr.* **2014**, *23*, 429–436. [\[CrossRef\]](#)
31. Lachaux, C.; Frazao, C.J.R.; Kraußer, F.; Morin, N.; Walther, T.; François, J.M. A new synthetic pathway for the bioproduction of glycolic acid from lignocellulosic sugars aimed at maximal carbon conservation. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2019**, *7*, 359. [\[CrossRef\]](#)
32. Erez, A.; Shchelochkov, O.A.; Plon, S.E.; Scaglia, F.; Lee, B. Insights into the pathogenesis and treatment of cancer from inborn errors of metabolism. *Am. J. Hum. Genet.* **2011**, *88*, 402–421. [\[CrossRef\]](#)
33. Qi, S.A.; Wu, Q.; Chen, Z.; Zhang, W.; Zhou, Y.; Mao, K.; Li, J.; Li, Y.; Chen, J.; Huang, Y.; et al. High-resolution metabolomic biomarkers for lung cancer diagnosis and prognosis. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 11805. [\[CrossRef\]](#)
34. Zhang, Y.; Cheng, Y.; Qin, L.; Liu, Y.; Huang, S.; Dai, L.; Tao, J.; Pan, J.; Su, C.; Zhang, Y. Plasma metabolomics for the assessment of the progression of non-small cell lung cancer. *Int. J. Biol. Markers* **2023**, *38*, 37–45. [\[CrossRef\]](#)
35. Zhang, L.; Zheng, J.; Ahmed, R.; Huang, G.; Reid, J.; Mandal, R.; Maksymuk, A.; Sitar, D.S.; Tappia, P.S.; Ramjiawan, B.; et al. A high-performing plasma metabolite panel for early-stage lung cancer detection. *Cancers* **2020**, *12*, 622. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Rodríguez-Tomás, E.; Arguís, M.; Arenas, M.; Fernández-Arroyo, S.; Murcia, M.; Sabater, S.; Torres, L.; Baiges-Gayà, G.; Hernández-Aguilera, A.; Camps, J.; et al. Alterations in plasma concentrations of energy-balance-related metabolites in patients with lung, or head & neck, cancers: Effects of radiotherapy. *J. Proteomics* **2020**, *213*, 103605. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Arenas, M.; Rodríguez, E.; García-Heredia, A.; Fernández-Arroyo, S.; Sabater, S.; Robaina, R.; Gascón, M.; Rodríguez-Pla, M.; Cabré, N.; Luciano-Mateo, F.; et al. Metabolite normalization with local radiotherapy following breast tumor resection. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0207474. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Abila, H.; Sollazzo, M.; Gasparre, G.; Iommarini, L.; Porcelli, A.M. The multifaceted contribution of  $\alpha$ -ketoglutarate to tumor progression: An opportunity to exploit? *Semin. Cell. Dev. Biol.* **2020**, *98*, 26–33. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Yang, M.; Soga, T.; Pollard, P.J.; Adam, J. The emerging role of fumarate as an oncometabolite. *Front. Oncol.* **2012**, *2*, 85. [\[CrossRef\]](#)
40. Stincone, A.; Prigione, A.; Cramer, T.; Wamelink, M.M.; Campbell, K.; Cheung, E.; Olin-Sandoval, V.; Grüning, N.M.; Krüger, A.; Tauqeer Alam, M.; et al. The return of metabolism: Biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **2015**, *90*, 927–963. [\[CrossRef\]](#)
41. Kurhaluk, N. Tricarboxylic acid cycle intermediates and individual ageing. *Biomolecules* **2024**, *14*, 260. [\[CrossRef\]](#)
42. Tomar, M.S.; Kumar, A.; Shrivastava, A. Mitochondrial metabolism as a dynamic regulatory hub to malignant transformation and anti-cancer drug resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2024**, *694*, 149382. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Cruzat, V.; Macedo Rogero, M.; Noel Keane, K.; Curi, R.; Newsholme, P. Glutamine: Metabolism and immune function, supplementation and clinical translation. *Nutrients* **2018**, *10*, 1564. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Xiang, S.; Ge, Y.; Zhang, Y.; Bao, X.; Su, X.; Shi, L.; Xia, Y.; Han, H.; Ying, J.; Lai, S.; et al. L-arabinose exerts probiotic functions by improving gut microbiota and metabolism in vivo and in vitro. *J. Funct. Foods* **2024**, *113*, 106047. [\[CrossRef\]](#)
45. Li, Z.; Cui, J. Targeting the lactic acid metabolic pathway for antitumor therapy. *Mol. Ther. Oncolytics* **2023**, *31*, 100740. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Jomova, K.; Alomar, S.Y.; Alwasel, S.H.; Nepovimova, E.; Kuca, K.; Valko, M. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: Antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants. *Arch. Toxicol.* **2024**, *98*, 1323–1367. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Kinj, R.; Bourhis, J. How stereotactic radiotherapy changed the landscape in cancer care. *Cancers* **2023**, *15*, 1734. [\[CrossRef\]](#)
48. Demaria, S.; Ng, B.; Devitt, M.L.; Babb, J.S.; Kawashima, N.; Liebes, L.; Formenti, S.C. Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2004**, *58*, 862–870. [\[CrossRef\]](#)
49. Gkika, E.; Firat, E.; Adebahr, S.; Graf, E.; Popp, I.; Radicioni, G.; Lo, S.S.; Nestle, U.; Nicolay, N.H.; Niedermann, G.; et al. Systemic immune modulation by stereotactic radiotherapy in early-stage lung cancer. *NPJ Precis. Oncol.* **2023**, *7*, 24. [\[CrossRef\]](#)
50. Nelson, B.E.; Adashek, J.J.; Lin, S.H.; Subbiah, V. The abscopal effect in patients with cancer receiving immunotherapy. *Med* **2023**, *4*, 233–244. [\[CrossRef\]](#)
51. Swamy, K. Stereotactic body radiotherapy immunological planning—A review with a proposed theoretical model. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 729250. [\[CrossRef\]](#)

**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.