

NUEVAS HERRAMIENTAS
APLICABLES AL ESTUDIO DE LA
POBLACIÓN EXPUESTA A AMIANTO
EN LA CAV

MEMORIA JUSTIFICATIVA DEL PROYECTO

Fundación Onkológikoa Fundazioa

30/11/2015

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 4 |
| 1.1. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PELIGROSIDAD DEL AMIANTO..... | 5 |
| 1.2. VALORACIÓN DE LA EXPOSICIÓN | 6 |
| 1.3. ENFERMEDADES SECUNDARIAS A LA EXPOSICIÓN AMIANTO..... | 7 |
| 1.4. DIAGNÓSTICO PRECOZ EN MPM | 8 |
| 1.5. UTILIDAD DE BIOMARCADORES EN EL SEGUIMIENTO DE LA POBLACIÓN EXPUESTA A AMIANTO..... | 10 |
| 1.6. REVISIÓN PERSPECTIVAS FUTURAS | 12 |
| 2. OBJETIVOS..... | 14 |
| 2.1 OBJETIVOS INICIALES..... | 14 |
| 2.1 NUEVOS OBJETIVOS | 15 |
| 3. OBJETIVO I | 16 |
| ESTUDIO DE LA CORRELACIÓN DE MESOTELINA, YKL-40 Y FIBULIN-3 EN SUERO ... | 16 |
| 3.1. PRINCIPALES BIOMARCADORES..... | 16 |
| 3.1.1. . MESOTELINA..... | 16 |
| 3.1.2. . FIBULIN-3..... | 17 |
| 3.1.3. YKL-40 | 18 |
| 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS | 19 |
| 3.2.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO CORRELACIÓN | 19 |
| 3.3. RESULTADOS | 20 |
| 3.4. DISCUSIÓN | 22 |
| 4. OBJETIVO II | 24 |
| ESTUDIO DEL VALOR DE REFERENCIA DEL CAMBIO DE YKL-40 Y FIBULIN-3 | 24 |
| 4.1. MATERIALES Y METODOS | 26 |
| 4.2. ESTIMACIÓN DEL VRC..... | 27 |
| 4.3. RESULTADOS | 27 |
| 4.4. DISCUSIÓN | 30 |
| 5. OBJETIVO III | 36 |
| ESTUDIO DE SEGUIMIENTO DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA APLICANDO EL VRC ... | 36 |
| 5.1. MATERIALES Y MÉTODOS | 36 |
| 5.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS..... | 37 |

| | | |
|----------|---|-------------------------------|
| 5.3. | RESULTADOS | 37 |
| 5.3.1. | RESULTADOS DEL SEGUIMIENTO | 37 |
| 5.3.2. | RESULTADOS DE LA AMPLIACIÓN DEL PANEL BIOQUÍMICO A FIBULIN-3 E YKL-40 | 40 |
| 5.4. | DISCUSIÓN | 41 |
| 5.4.1. | SMRP Y EL VRC | 41 |
| 5.4.2. | FACTORES DE CONFUSIÓN | 43 |
| 5.4.3. | PUNTO DE CORTE ÓPTIMO | 45 |
| 5.4.4. | DIFICULTADES Y LIMITACIONES EN EL ESTUDIO | 46 |
| 5.4.4.1. | FALTA DE CASOS | 46 |
| 5.4.4.2. | FALTA DE SEGUIMIENTO CONTINUO | 47 |
| 5.4.4.3. | PÉRDIDA DE PARTICIPANTES..... | 48 |
| 6. | OBJETIVO IV | 49 |
| | ESTUDIO CONTROLES | ¡Error! Marcador no definido. |
| 6.1. | MATERIALES Y MÉTODOS | 49 |
| 6.2. | RESULTADOS | 50 |
| 6.3. | DISCUSIÓN | 52 |
| 8. | OBJETIVO VI | 56 |
| | ANÁLISIS DE LA ENCUESTA | 56 |
| 8.1. | CUESTIONARIO O BIOMARCADOR | 57 |
| 9. | CONCLUSIONES | 59 |
| 10. | BIBLIOGRAFÍA..... | 61 |
| 11. | JUSTIFICACIÓN ECONÓMICA..... | 71 |

1. INTRODUCCIÓN

El amianto es un silicato natural estructurado en forma de fibras finas. La inhalación de fibras de amianto con suficiente intensidad incrementa el riesgo de padecer diversas enfermedades respiratorias, lo que incluye lesiones benignas como placas pleurales, derrame pleural, fibrosis pleural, o patologías más graves como mesotelioma pleural maligno, cáncer de pulmón y asbestosis (1).

El amianto ha sido un material de uso frecuente en múltiples aplicaciones industriales, ya que era un material muy económico de producir y de una gran versatilidad (2). Ya en 1898, los peligros por trabajar con amianto fueron identificados, pero lejos de ser prohibido, su uso no sólo continuó sino que se incrementó a lo largo de la década de los 70. El pico máximo en las importaciones de este material en España se dio entre 1970-1990, en 1992 era el segundo importador europeo con 25.428t (2) y, aunque a partir de los años 80 su uso comenzó a decaer, su prohibición total no llegó hasta 2002. Por ello, un gran número de trabajadores han estado expuestos a este mineral y lo seguirán estando en el futuro, dada la incorporación de amianto a numerosas estructuras y edificios.

Se trata de un mineral que ha sido muy empleado en una gran variedad de productos manufacturados, especialmente en la construcción (fibrocementos), en la automoción (pastillas de frenos, embragues...), en el sector naval (calderas, tuberías de suministro de vapor, de agua caliente, aislamientos de turbinas), para la fabricación de componentes de aviones y trenes y todo ello por resultar un excelente aislante térmico, eléctrico y acústico.

En un estudio llevado a cabo por el Dr. Antonio Agudo y su equipo (3), se identificaron las principales ocupaciones de riesgo en nuestro país; se observó un riesgo elevado de mesotelioma pleural en trabajadores de la limpieza y planchado de ropa, ajustadores, instaladores y montadores de maquinaria, electricistas, fontaneros, calefactores e instaladores de tuberías, soldadores y oxicortadores, chapistas y caldereros, albañiles, trabajadores de artes gráficas, estibadores y

cargadores, fabricación de material de transporte (incluyendo los astilleros), y trabajadores de la fabricación de productos derivados de minerales no metálicos, que incluyen la industria del fibrocemento.

1.1. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PELIGROSIDAD DEL AMIANTO

El amianto es peligroso por su morfología y no por su composición química. Los factores que tienen más importancia son la durabilidad de las fibras y la persistencia de las mismas en el organismo (biopersistencia) entre otros factores:

- . Durabilidad: está determinada por la composición química de la fibra y se refiere a la resistencia de la fibra a disolverse en los fluidos orgánicos. La durabilidad para el amianto es de unos 100 años o más, clasificándose por orden: anfíboles, crisolito, las fibras cerámicas refractarias, lana de roca, lana de escoria y fibra de vidrio. Se cree que la durabilidad para las fibras no asbestiformes es de unos diez años.
- . Biopersistencia: es el tiempo de permanencia dentro del cuerpo humano, va a depender de la durabilidad y de la morfología de la fibra.
- . Dimensión de la fibra: sólo las más largas y estrechas con diámetro menor de 3 micras, llegan al alveolo. Hay que tener en cuenta que las fibras de amianto se parten longitudinalmente originando nuevas fibras de menor diámetro y por tanto con mayor capacidad de penetración (las fibras minerales artificiales se parten transversalmente).
- . Concentración en el aire de amianto.
- . Tiempo de exposición al amianto.
- . El ritmo respiratorio asociado a las condiciones de trabajo y que junto con la concentración y el tiempo de exposición condicionan la dosis efectiva o real que recibe el trabajador.
- . El efecto sinérgico del humo de tabaco que aumenta el riesgo de contraer cáncer de pulmón.
- . Friabilidad: capacidad de un material de liberar las fibras de amianto que contiene.

Materiales friables: cuando están secos se pueden desmoronar, disgregar o desmenuzarse con los dedos: por ejemplo, calorifugados y revestimientos de superficie.

Materiales no friables: secos no pueden ser desmoronados, disgregados o desmenuzados con los dedos: por ejemplo, fibrocemento, masillas, colas, pinturas. El material no friable degradado o demolido pasa a ser material friable.

1.2. VALORACIÓN DE LA EXPOSICIÓN

Actualmente están registradas en el RERA del País Vasco aproximadamente 200 empresas. La mayoría de estas empresas se dedican a la retirada de materiales que contienen amianto, las demás son transportistas, vertederos, etc. Pero se constata que hay muchas más empresas que han trabajado con el amianto.

El principal inconveniente para conocer en muchas ocasiones la exposición laboral previa a amianto, es que al existir un período de latencia, en la mayoría de los casos superiores a 20 años, desde la primera exposición hasta que aparece la enfermedad, es difícil de saber la historia laboral de exposición y mucho más de calcular los niveles de exposición a que ha estado expuesto.

En muchas ocasiones el trabajador no es consciente de haber estado expuesto al amianto, a veces porque no se le informa y en otras ocasiones por desconocimiento del riesgo por parte del empleador y el personal sanitario responsable.

En la Comunidad Autónoma Vasca las situaciones y condiciones en que se ha producido la exposición a amianto son muy variadas, por lo que es necesaria la adecuada detección y seguimiento de los sujetos expuestos.

1.3. ENFERMEDADES SECUNDARIAS A LA EXPOSICIÓN AMIANTO

La inhalación de fibras de amianto puede dar lugar a varias alteraciones y enfermedades, algunas benignas como las placas pleurales y otras graves o muy graves como la asbestosis o el mesotelioma pleural maligno (MPM).

El MPM es un tumor poco común y muy agresivo que surge del epitelio pleural. Su incidencia tiene una tendencia creciente, de tal manera que se prevé alcance su punto máximo hacia el año 2020 (4). Desde el punto de vista histológico el mesotelioma ha sido clásicamente dividido en tres formas: epitelial, fibroso (o sarcomatoso) y mixto. En realidad, parece que todos los mesoteliomas son mixtos en mayor o menor grado: en material procedente de autopsia (actualmente poco frecuente ante el auge de las técnicas endoscópicas) o de toracotomía predominan los mesoteliomas de tipo mixto, mientras que en el material obtenido por técnicas biópsicas predominan los epiteliales. Esto es debido a que en biopsias pequeñas el componente fibroso es mucho más difícil de valorar (5).

El diagnóstico de esta neoplasia es complejo y habitualmente tardío, con una mortalidad muy elevada. Esta complejidad en el diagnóstico es debida a varias causas, como la dificultad a la hora de establecer de forma clara la exposición al amianto, la existencia de un periodo de latencia muy largo, la dificultad de establecer el diagnóstico diferencial entre enfermedad benigna y maligna secundaria a la exposición y la heterogeneidad de esta neoplasia, que comprende diversos subtipos histológicos con diferentes pautas de expresión génica, fenotipos variables y características biológicas no uniformes (6)

A la espera de conseguir la identificación de genotipos de elevado riesgo, se ha propuesto un fenotipo marcador de riesgo de mesotelioma pleural maligno en la población expuesta a amianto, y que presentaría las siguientes características:

- Exposición ocupacional precoz
- Sexo masculino
- Presencia de una segunda neoplasia

- Antecedente familiar en primer grado de cancer.

1.4. DIAGNÓSTICO PRECOZ EN MPM

El cribado o diagnóstico precoz es la detección precoz de la enfermedad, precursores de la misma o susceptibilidad individual de padecer una enfermedad en personas que no presentan ningún signo de la misma. El objetivo es realizar una selección, estimando un riesgo individual de padecer dicha enfermedad. La mayoría de las pruebas de cribado requieren la práctica de una prueba diagnóstica posterior en aquel individuo en el que la prueba ha sido positiva, es decir se ha estimado que tiene un riesgo de padecer la enfermedad que justifica la necesidad de practicar una prueba diagnóstica para su confirmación o rechazo, y si procede, iniciar el tratamiento de la enfermedad. Lo que realmente se espera de un programa de cribado es que su aplicación en una determinada población pueda disminuir la mortalidad de dicha neoplasia.

Para que una enfermedad pueda considerarse objeto de cribado debe cumplir una serie de requisitos propuestos por Wilson en 1988 (7) y que se resumen a continuación.

En primer lugar una **enfermedad** susceptible de entrar en un programa de cribado o diagnóstico precoz debe cumplir las siguientes condiciones:

- Debe constituir un problema importante para la salud pública, en términos de prevalencia y gravedad.
- Debe ser detectable en la etapa presintomática o sintomática precoz
- Su curso clínico debe ser conocido.
- El tratamiento en el estadio presintomático debe reducir la mortalidad o las complicaciones graves de manera más marcada que el tratamiento tras la aparición de los síntomas. Si dicho tratamiento no reduce la mortalidad o la incidencia de enfermedad grave, al menos debe mejorar la calidad de vida del enfermo.
- Debe ser una enfermedad tratable eficazmente.

Por su parte, la **población** susceptible de incorporarse en un programa de cribado debe cumplir los siguientes requisitos:

- Debe tener riesgo elevado para la enfermedad, es decir, una prevalencia alta de la misma.
- Debe ser población accesible, con el fin de que se puedan planificar correctamente los recursos necesarios para ejecutar el programa de cribado.

La elaboración del plan del **programa** también debe cumplir ciertos criterios:

- Su eficacia debe estar probada en ensayos aleatorios.
- La redacción del programa debe estar correctamente planificada.
- El acceso a la población debe estar garantizado.
- Garantizar que se conoce el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad.

Por último las características que debe cumplir la **prueba** de cribado son las siguientes:

- Disponer de indicadores para poder evaluar la eficacia y calidad del programa de cribado.
- Deben ser válidos, fiables, reproducibles, prácticos (fáciles de aplicar, seguras y económicas).
- Deben ser pruebas de alta sensibilidad y especificidad.

A la hora de aplicar los requisitos exigibles a las pruebas de cribado al MPM, uno de los principales retos con que nos enfrentamos en el cribado del mesotelioma radica en el hecho de que, si bien tenemos identificada la población de riesgo (individuos expuestos de una u otra forma a amianto), carecemos en la actualidad de herramientas para conseguir un diagnóstico suficientemente precoz que permita aplicar un tratamiento.

La inexistencia de un tratamiento eficaz constituye la principal limitación para la aplicación del cribado, ya que a día de hoy se considera incurable. Es un tumor

altamente agresivo que se diagnostica en fases avanzadas, con pobre respuesta al tratamiento y con una media supervivencia tras el diagnóstico de 8 a 12 meses (8, 9)

Su tratamiento ha sido por lo general desalentador con pobre respuesta a las distintas modalidades terapéuticas empleadas: quimioterapia, radioterapia, terapia regional y cirugía. El mesotelioma ha mostrado ser resistente a la terapia de radiación y sólo entre un 15% y un 20% de los pacientes con mesotelioma responden a la quimioterapia (10).

Sin embargo, en los últimos años se han introducido fármacos que han demostrado mayor efectividad clínica como el Pemetrexed (11,12). Además varios estudios fase II han demostrado el aumento de la supervivencia a 5 años en un 30-40% con terapia trimodal, en etapas iniciales de MPM de tipo epitelioide (13-17).

Actualmente la detección precoz únicamente supondría prolongar la calidad y esperanza de vida del paciente, si se detecta en etapas iniciales. Pero los avances en la investigación de tratamientos para el MPM hacen que el diagnóstico precoz cobre especial importancia. Esto implica la necesidad de seguir investigando herramientas capaces de detectar la enfermedad antes de que se desarrollen los síntomas ya que por ahora tampoco se dispone de técnicas de imagen con suficiente sensibilidad y especificidad para lograr este objetivo.

1.5. UTILIDAD DE BIOMARCADORES EN EL SEGUIMIENTO DE LA POBLACIÓN EXPUESTA A AMIANTO

Un marcador biológico ideal para el diagnóstico de MPM la exposición debería ser altamente sensible y específico, es decir, capaz de distinguir las personas con la patología de las personas sanas. Debe permanecer en el organismo un periodo de tiempo prolongado, para evitar falsos negativos. Además, sus métodos de determinación tienen que ser sencillos y económicos, ya que la cifra de personas expuestas al amianto es muy elevada. Por último, sería importante que esté relacionado con las consecuencias negativas de la exposición al amianto sobre el organismo.

La Mesotelina o proteínas solubles relacionadas con la mesotelina (SMRP) es el marcador biológico del MPM que más se ha estudiado en los últimos años y actualmente está considerado como el biomarcador con mejor rendimiento diagnóstico y pronóstico para el MPM. Esta proteína es expresada tanto por células mesoteliales normales como por células tumorales, pero en situaciones patológicas como en el MPM guarda una estrecha correlación con el tamaño y progresión tumoral (18). No obstante, sus valores se influyen por la función renal, y uno de sus mayores problemas radica en la elección de un punto de corte adecuado para distinguir entre afectación pleural benigna y maligna (19). En todo caso, parece que la mesotelina es más útil para monitorizar el tratamiento que para el diagnóstico diferencial en los derrames pleurales.

En los últimos años han emergido nuevos marcadores tumorales detectables en suero, y otros fluidos, en un intento de adelantar el diagnóstico, y monitorizar la respuesta al tratamiento, destacando entre ellos Fibulin-3 e YKL-40.

Tratando de superar los problemas de la mesotelina y otros marcadores, se ha publicado recientemente que la Fibulina-3 es capaz de distinguir con alta especificidad y sensibilidad (97% y 96% respectivamente) los pacientes con MPM de aquellos con historia de exposición al asbesto pero sin mesotelioma o de aquellos con otros procesos malignos o benignos de la pleura. (20, 21)

Pero estos excelentes resultados iniciales no han sido revalidados por otro estudio realizado recientemente en Australia (país con alta prevalencia de mesotelioma) y en el que se compararon los valores de mesotelina y fibulina-3 en las mismas muestras de plasma y líquido pleural. En este estudio se confirmó un mejor rendimiento diagnóstico de la mesotelina sobre fibulina-3, que sí mostró un buen valor predictivo de la supervivencia cuando sus valores se encontraban altos en el líquido pleural de pacientes con mesotelioma, sobre todo en el de tipo sarcomatoso o mixto (22).

El segundo, YKL-40, que, aunque sigue sin conocerse completamente su función biológica, se ha demostrado que es un potente factor de crecimiento para las células del tejido conectivo y un potente factor de migración para las células endoteliales, fenómenos que están implicados en los mecanismos de fibrogenesis que anteceden a la aparición del MPM. Según un estudio que tenía como propósito analizar el poder discriminatorio de ciertos biomarcadores, los pacientes con MPM tenían niveles séricos significativamente más altos ($p < 0,001$) de mesotelina e YKL-40 (23) que los controles. El mejor punto de corte para la mesotelina se determinó en 1,26 nM y en el caso de YKL-40 fue de 167 pg/ml. La presencia de ambos marcadores por encima de estos niveles mejoraba la especificidad de diagnóstico. El estudio concluye que la combinación de ambos marcadores puede mejorar la especificidad para identificar un mesotelioma que midiendo únicamente la mesotelina, considerado el biomarcador más aceptado del MPM.

1.6. REVISIÓN PERSPECTIVAS FUTURAS

Combinando técnicas de biología molecular y nanotecnología, en los últimos años está emergiendo el concepto de *theranostics*, que pretende unir diagnóstico y tratamiento en el mismo procedimiento mediante el uso de fármacos dirigidos específicamente a cada fenotipo de neoplasia. Si se consiguiera encontrar los ligando adecuados se podrían aplicar para el diagnóstico precoz del mesotelioma mediante PET o SPET (24-26). Ya se han desarrollado *sondas combinadas con técnicas biofluorescentes* altamente sensibles y que son capaces de detectar tumores en modelos animales (27,28), y también hay técnicas basadas en anticuerpos marcados o nanopartículas para uso con resonancia magnética nuclear (29,30), arrojando buenas perspectivas para su futura aplicación en humanos.

Aún así, parece más realista centrarse en la búsqueda de marcadores detectables en sangre periférica y que posean adecuada sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de MPM. Dentro de esta línea, el campo de investigación más

prometedor es (junto con las técnicas de imagen) la búsqueda de marcadores precoces de mesotelioma usando técnicas proteómicas, que analizan simultáneamente los perfiles de gran cantidad de proteínas (más de 1.000) (31,32). La detección de miRNA en sangre periférica constituye también otro campo emergente para lograr un diagnóstico suficientemente precoz en el mesotelioma (33).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS INICIALES

1. La realización de la encuesta (Empleo-Exposición) para otros sectores industriales del País Vasco, tales como industria naval, industria papelera, construcción, etc. Tratando de alcanzar el máximo posible de aquellos sectores y ocupaciones con peso dentro de nuestra CCAA. De forma teórica, trataremos de alcanzar un número de 100-150 encuestados.
2. Ampliación del perfil bioquímico (actualmente SMRP) con Fibulin-3 e YVL-40 a la misma población.
3. Aplicación de los resultados en materia de VRC a una población de la cual se dispone de datos de seguimiento de SMRP de los últimos 5 años
4. Seguimiento de la población ya estudiada del País Vasco mediante la aplicación de los valores obtenidos de VRC.

Se realizó un estudio de viabilidad de los objetivos planteados, concluyendo que el proyecto no se podría realizar en su conjunto.

El tercer objetivo “aplicación de los resultados en materia de VRC a una población de la cual se dispone de datos de seguimiento de SMRP de los últimos 5 años” basaba su desarrollo en el análisis de una seroteca de sujetos con un seguimiento prolongado. Este objetivo se postulaba en base a la colaboración con un investigador de otro centro contactado previamente por la investigadora principal de Onkologikoa al cargo de este proyecto en los años 2013-2014.

Tras acontecer el cambio de investigador responsable en Onkologikoa en el presente proyecto, se procedió al contacto con el susodicho investigador colaborador. El mismo se había jubilado y se hubo de solicitar la revisión de los biobancos y sortecas disponibles por el grupo que “heredó” sus líneas de investigación. Esta revisión llevo al hallazgo de que no existía la teórica seroteca con lo que este objetivo no se pudo desarrollar, debido a la imposibilidad de conseguir los datos que se adaptaran a este objetivo.

Por este motivo, se definieron nuevos objetivos

2.1 NUEVOS OBJETIVOS

1. Analizar la viabilidad metodológica de la determinación de los nuevos biomarcadores YKL-40 y Fibulin-3 y realizar un estudio preliminar de la correlación existente entre los valores de SMRP, de YKL-40 y de Fibulin-3 en suero.
2. Con el objetivo de conocer el Valor de Referencia del Cambio (VRC) de los nuevos marcadores, estudiar la variación biológica tanto interindividual como intraindividual de YKL-40 y Fibulin-3.
3. Realizar el seguimiento de la población ya estudiada del País Vasco mediante la aplicación de los valores obtenidos de VRC y ampliar el perfil bioquímico (actualmente SMRP) con Fibulina-3 e YVL-40 a la misma población.
4. Comparar las nuevas determinaciones con un grupo control para evaluar la capacidad de los biomarcadores para diferenciar los sujetos expuestos sin mesotelioma de los sujetos sanos.
5. La realización de la encuesta (Empleo-Exposición) para otros sectores industriales del País Vasco, tales como industria naval, industria papelera, construcción
6. Realizar un análisis de la encuesta en cuanto a su lógica y diseño.

3. OBJETIVO I

ESTUDIO DE LA CORRELACIÓN DE MESOTELINA, YKL-40 Y FIBULIN-3 EN SUERO

En las diferentes estrategias empleadas por los diferentes grupos implicados en el estudio del MPM, un punto común es la búsqueda e identificación de biomarcadores que puedan proporcionar un diagnóstico cuando se disponga de herramientas terapéuticas útiles.

3.1. PRINCIPALES BIOMARCADORES

3.1.1. . MESOTELINA

La mesotelina es uno de los biomarcadores del mesotelioma que más se ha estudiado. Es una glicoproteína de 40 kDa anclada en la superficie celular y que parece tener un papel en la adhesión, reconocimiento y señalización celular. Se sintetiza en forma de precursor como una proteína de 69 kDa y forma dos proteínas: una soluble en sangre, que es el factor potenciador del megacariocito (porción N-terminal) y otra unida a la membrana celular que es la mesotelina (porción C-terminal). El procesamiento postranscripcional y postransaccional del gen que codifica la mesotelina produce cuatro productos: factor potenciador del megacariocito, variante de mesotelina 1, variante de mesotelina 2 y proteínas solubles relacionadas con la mesotelina (SMRP).

Inicialmente la mesotelina fue utilizada como marcador inmunohistoquímico de mesotelioma en muestras de biopsia, comprobando que se expresaba en el 100% de mesoteliomas epiteliales y en el 39% de adenocarcinomas, sin hacerlo en los mesoteliomas sarcomatosos (34). En un estudio de Robinson y colaboradores se incluyeron 44 pacientes con mesotelioma pleural maligno y otro grupo de 160 pacientes con distintas enfermedades pulmonares, encontrando buena sensibilidad (84%) y especificidad (casi 100%) para el diagnóstico de mesotelioma (35). Los mesoteliomas tenían mayor concentración de SMRP que el resto de patologías

pleurales, incluyendo otras neoplasias, y también se observó que los niveles de SMRP séricos se encuentran más elevados en los pacientes con mayor volumen tumoral. Estos resultados han sido confirmados por otros autores en estudios posteriores (36), lo que refuerza el valor diagnóstico de la mesotelina.

Algunos autores también han evidenciado diferencias de concentración entre sujetos expuestos y no expuestos al amianto (37-39).

Evidencias adicionales de estudios similares basados en pruebas ELISA también han demostrado que los niveles de SMRP en suero pueden ser útiles para monitorizar la progresión de las enfermedades relacionadas con el amianto. (40).

Por el contrario, según otros estudios el valor de la mesotelina para detectar precozmente mesotelioma en poblaciones expuestas a amianto es muy controvertida y no está todavía bien definido (41). Además, parece claro que los niveles de mesotelina son más útiles en líquido pleural que en suero, y esto viene a limitar mucho su valor para el diagnóstico precoz en sujetos con historia de exposición a amianto pero que no presentan derrame pleural. Ante una baja probabilidad pre-test de padecer mesotelioma, niveles bajos de mesotelina pueden ayudar a descartarlo, mientras que niveles altos refuerzan el uso de técnicas diagnósticas más invasivas en un paciente con sospecha de mesotelioma (42-44).

3.1.2. . FIBULIN-3

Las fibulinas son un grupo de glicoproteínas, de la que se conocen cinco subtipos, denominadas fibulina-1 a fibulina-5. Estas proteínas interactúan con otros componentes de la matriz extracelular por lo que juegan un papel importante en el desarrollo del tejido fibrótico (45-47) cuyos resultados parecen prometedores en cuanto a la utilización de Fibulin-3 como marcador diagnóstico para el MM.

Uno de estos estudios (48) además, mostró una correlación positiva entre los niveles de Fibulin-3 en suero y en líquido pleural. Demostró que la utilización de un punto de corte de 18ng/ml de Fibulin-3 en suero, con un AUC de 0.931 (100% de

sensibilidad, 77.8% de especificidad) proporciona la diferenciación entre sujetos con MM y sujetos con derrame pleural benigno.

Pero según otro estudio de Pass et al. al analizar en paralelo muestras de suero y de plasma, los niveles de Fibulin-3 eran más bajos en suero que plasma. Además, el mismo estudio mostró una pobre correlación entre niveles de esta proteína en suero y en efusión pleural, por lo que cuestiona la validez del uso de ensayos basados en sangre para determinar la fibulin-3.

Finalmente, hay estudios que sugieren que Fibulin-3 es un mejor marcador pronóstico que de diagnóstico para el MM, porque en este estudio los niveles en plasma predicen mejor la supervivencia de pacientes con MM (49).

3.1.3. YKL-40

La proteína YKL-40 tipo quitinasa, también llamada glucoproteína 39 del cartílago humano) es una glucoproteína sintetizada por macrófagos, neutrófilos, células tumorales malignas, células mesoteliales y codrocitos, incluso se ha encontrado en el hígado fibrótico. Está involucrada en diversos procesos inflamatorios, y malignos, (50,51) y desempeña un papel fundamental en la progresión tumoral.

Los niveles en suero de YKL-40 se encuentran elevados en ciertos tipos de cáncer y enfermedades inflamatorias, asociándose con un mal pronóstico. (52-54) entre ellos el MPM (55). Además, un estudio reciente halló que los niveles de YKL-40 en suero y en derrame pleural eran significativamente mayores en pacientes con derrames malignos en comparación con los derrames no malignos (56).

Estudiar la correlación presente entre los niveles de SMRP, Fibulin-3 e YKL-40 en suero nos podría llevar a mejorar el rendimiento diagnóstico.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras que se utilizaron en esta parte del estudio provinieron del suero remanente de 66 personas a las que previamente se les extrajo sangre para realizar un examen de rutina, el cual incluía la determinación de Mesotelina. Se trata de trabajadores de la industria ferroviaria, en una empresa dada de alta en el Registro de Empresas con Riesgo de Amianto (RERA), que se encuentran bajo vigilancia periódica de la salud y a los que en su última exploración, se les ha realizado un análisis de laboratorio en la Fundación Onkologikoa. Estos sueros se conservaban congelados en el laboratorio de la Fundación Onkologikoa.

El tamaño muestral calculado para determinar el coeficiente de correlación entre las tres variables se estimó, considerando que el valor del coeficiente de correlación lineal de Pearson entre los valores de SMRP, Fibulin-3 e YKL-40 puede oscilar alrededor de $r=0,4$ (57).

Tras hacerles llegar la Hoja de Información y firmar el Consentimiento Informado, las muestras de aquellos participantes que otorgaron su consentimiento para ser incluidos en el estudio fueron anonimizadas (irreversiblemente disociadas) y cada una de las muestras de suero se analizó por duplicado.

La determinación de los biomarcadores se realizó según el protocolo de los fabricantes, mediante los kits **FBLN3** (Uscn Life Science Inc.) para Fibulin-3 y **MicroVue YKL-40™** (Quidel Corporation) para YKL-40, en un analizador automático (DS2 Dynex®) que incluye un lector de placas para absorbancia.

3.2.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO CORRELACIÓN

El análisis de los datos se realizó con el programa SPSS (versión 20, para Windows, SPSS Inc, Chicago, IL, USA). La distribución de las variables se estudió mediante la prueba Shapiro-Wilk y los resultados obtenidos se expresan como media \pm desviación estándar. Mientras que los niveles de los biomarcadores séricos se

compararon mediante el coeficiente de correlación de Spearman y de Pearson. En todos los casos se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

Además se utilizó el análisis de regresión múltiple para conocer el grado de asociación entre los niveles de biomarcadores y los posibles factores de confusión *edad* y *función renal*. El valor crítico de la probabilidad de inclusión en el análisis multivariado fue de 0,05 y de 0,1 el valor crítico de la probabilidad de salida.

3.3. RESULTADOS

El estudio incluyó 66 hombres, de entre 45 y 78 años ($X = 60,17 \pm 6,42$), trabajadores de una empresa en la que décadas atrás estuvieron directa o indirectamente expuestos al amianto.

En la tabla I se muestran los niveles en suero de los tres biomarcadores con los correspondientes intervalos de confianza del 95%.

Tabla I. *Valor de SMRP, Fibulin-3 e YKL-40 en nuestra muestra.*

| | SMRP (nM) | FIBULIN-3 (ng/ml) | YKL-40 (ng/ml) |
|-----------------------|----------------|-------------------|-------------------|
| MEDIA (95% CI) | 1,18 (0,4-3,3) | 27,54 (0,3-72,5) | 81,40 (6,3-268,2) |

El coeficiente de correlación de Spearman entre los niveles de SMRP e YKL-40 fue de 0,264 ($p = 0,04$). En la correlación entre YKL-40 y Fibulin-3 también se encontró significación estadística ($r = 0,244$; $p = 0,006$). Sin embargo, la correlación no fue significativa entre SMRP y Fibulin-3 ($r = 0,324$; $p = 0,141$).

Al relacionar y cuantificar dichos marcadores con la edad (posible variable de confusión) solo se observó correlación significativa entre la edad y SMRP ($r = 0,366$; $p = 0,00$) y entre la edad e YKL-40 ($r = 0,345$; $p = 0,00$). No se encontró significación estadística en caso de Fibulin-3 ($r = 0,287$; $p = 0,196$).

Dichas correlaciones no existieron en sujetos menores de 65 años. Las personas mayores de 65 años tenían niveles de SMRP e YKL-40 significativamente ($p = 0,00$)

mayores ($X = 1,7$ nM y $X = 105,65$ $\mu\text{g/l}$ respectivamente) en comparación con el grupo de edad más joven ($X = 1,1$ nM y $X = 51,7$ $\mu\text{g/l}$ respectivamente).

La concentración de creatinina en sangre se correlacionó positivamente con la concentración de SMRP ($r = 0,228$; $p = 0,16$), pero no así con los niveles de YKL-40 ($r = 0,035$; $p = 0,803$) y Fibulin-3 ($r = 0,068$; $p = 0,582$).

La figura 1 muestra las relaciones positivas existentes en el estudio, mientras que la Figura 2 muestra la distribución de YKL-40 y SMRP agrupando los sujetos según la edad.

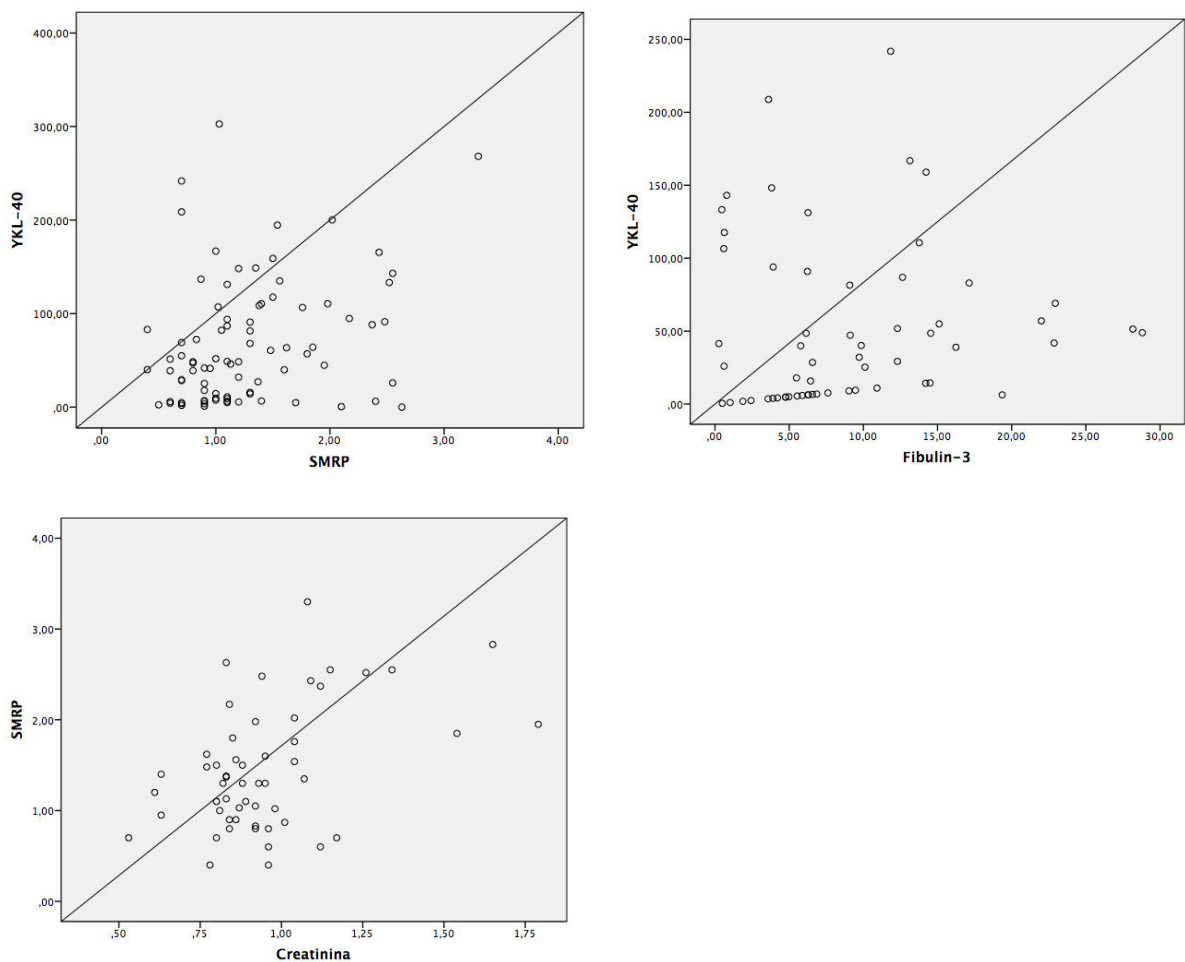


Figura 1. Representación gráfica de las correlaciones significativas.

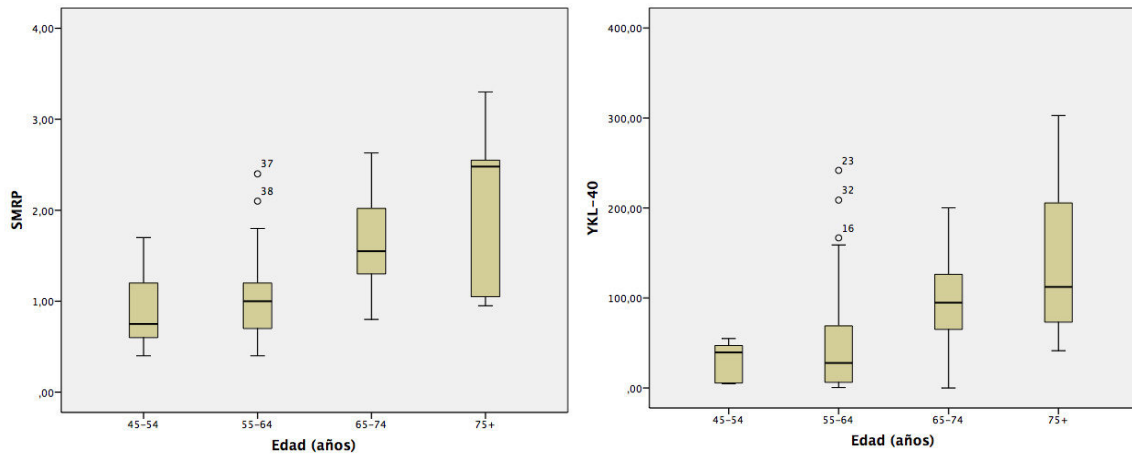


Figura 2. Gráficos de cajas correspondiente a los grupos de edad.

Tras ver el conjunto de correlaciones bivariadas existentes, se utilizó el análisis de regresión lineal múltiple para identificar si alguna de las variables de confusión estudiadas (edad y/o creatinina) influía en la concentración de los biomarcadores. Solo la edad se asoció de forma independiente con SMRP e YKL-40 con un coeficiente de correlación múltiple ajustado al cuadrado (R^2) de 34,7% y 13,91% respectivamente.

3.4. DISCUSIÓN

En nuestro estudio las únicas correlaciones que no se encontró fue entre el biomarcador Fibulin-3 y SMRP ($r = -0,065$; $p = 0,504$), obteniendo los mismos resultados que en otros estudios (58,59). Este biomarcador tampoco se correlacionó con la edad ($r = 0,12$; $p = 0,215$), al igual que en otros trabajos (60,61).

Sin embargo la edad no mostró ninguna influencia en los niveles de SMRP e YKL-40 en los sujetos de 45 a 65 años, pero a partir de entonces los niveles aumentaban significativamente. Otros estudios han obtenido resultados similares en ambos casos (62,63,64).

En cuanto al estudio de los posibles factores de confusión, el coeficiente de determinación (R^2) nos indica qué porcentaje de la variabilidad en la concentración de los biomarcadores se explica por la edad, el 34,7% en caso de SMRP y el 13,9%

en YKL-40. Esta capacidad explicativa, mayor en caso de SMRP, pero relativamente baja en los dos casos, nos indica que a parte del factor edad existen otras variables que modifican y explican la variabilidad de estos biomarcadores en sangre. La regresión múltiple lineal de Fibulin-3 no se realizó puesto que no se encontró ninguna correlación significativa con la edad, ni con la concentración de creatinina.

El motivo de que la concentración de creatinina no se incluyera en ningún modelo de regresión se debe a que existe una correlación semiparcial entre la creatinina y la edad, es decir, las variables están correlacionadas entre sí, la edad influye en la tasa de filtración glomerular y por lo tanto, en la concentración de la creatinina en sangre. La reducción del aclaramiento de la creatinina con la edad se acompaña de una reducción en la excreción urinaria de creatinina como consecuencia en parte de la disminución de la masa muscular con los años (65,66).

Este análisis identifica que la edad influyen en las concentraciones de SMRP e YKL-40, pero no en Fibulin-3. Por lo tanto actúa como factor de confusión que puede afectar a los niveles de estos dos biomarcadores en sangre. Teniendo en cuenta este factor de confusión (además de otros factores de confusión existentes) se podría reducir en número de falsos positivos en los futuros programas de diagnóstico precoz y por lo tanto aumentar la especificidad, mejorando la interpretación de los resultados. Al igual que la validación del valor pronóstico de estos biomarcadores, estas variables de confusión deben ser validadas.

Además la edad es un aspecto importante que debe tenerse en cuenta en los sujetos que estén en Programas de Vigilancia de la Salud, porque el MPM principalmente se diagnostica en personas de 61-65 años (67).

4. OBJETIVO II

ESTUDIO DEL VALOR DE REFERENCIA DEL CAMBIO DE YKL-40 Y FIBULIN-3

Los Intervalos de Referencia Poblacionales (IRP) son la referencia más habitual para la interpretación, con fines diagnósticos, de la información producida por el laboratorio. Si bien los IRP son útiles para la interpretación de un resultado aislado, los mismos pueden no serlo cuando se quiere comparar un resultado con el dato previo del mismo paciente, ya que pudo haber un cambio significativo en el valor de la magnitud medida y el resultado obtenido puede estar aún dentro de los IRP.

La interpretación adecuada de los resultados de un paciente es fundamental en la práctica clínica diaria para establecer un diagnóstico y/o realizar un seguimiento. Las variables que intervienen en la interpretación de los datos de laboratorio son, por una parte, la propia **variación biológica intra-individual** (Vbi) de cada magnitud y, por otra, la **variación analítica** (Va).

La Vbi de una magnitud bioquímica se define como una fluctuación aleatoria alrededor de un punto de ajuste homeostático, que no pueden ser explicadas por cambios asociados a la edad, presencia de procesos patológicos o ritmos cíclicos. (68,69). Por consiguiente, la variación interindividual (CVg), es la diferencia entre los puntos de ajuste homeostáticos de los individuos.

La Va o imprecisión de un método cuantitativo corresponde a la dispersión de los valores (desviación estándar) obtenidos para una misma muestra alrededor del promedio (X) expresado en porcentaje, que se calcula a partir de la siguiente fórmula: $CVa = DE \times 100/x$.

Si un método presenta un CVa pequeño, quiere decir que si repetimos la determinación en una misma muestra n veces, la medición tendrá una alta reproducibilidad o fiabilidad.

Una de las principales aplicaciones de los datos de V_{bi} y V_a es la estimación del **Valor de Referencia del Cambio (VRC)**, el cual proporciona información sobre cual es el cambio mínimo necesario para que las diferencias entre dos resultados consecutivos de un individuo sean consideradas clínicamente significativas, independientemente si éste se encuentra dentro o fuera del IRP. (70).

Sabemos que la concentración de un biomarcador puede variar por fluctuaciones biológicas intraindividuales, por la imprecisión inherente a la medición (V_a) o por un proceso patológico.

Si la diferencia entre dos resultados consecutivos de un paciente supera el VRC es altamente probable que existan diferencias clínicamente significativas entre estos dos resultados. En cambio si la diferencia es inferior al VRC, existe una gran probabilidad de que esta diferencia sólo sea debida a la variación biológica o analítica. Por lo tanto, el VRC nos permite valorar si el cambio se debe solamente a las fluctuaciones biológicas y/o analíticas o si es consecuencia de un proceso patológico.

El VRC debe utilizarse en la interpretación de magnitudes con fuerte individualidad, es decir muy reguladas por el organismo, siendo en este caso muy cuestionable la comparación de los resultados con los intervalos de referencia poblacionales. La individualidad (Índice de Individualidad) de una magnitud biológica se calcula mediante el cociente entre el valor de la variación biológica intraindividual y la interindividual (C_{vi}/C_{Vg}) (71). Se considera que si el cociente es bajo (inferior a 0,6) existe fuerte individualidad y si es alto (superior a 1,4) existe muy poca individualidad.

Este índice se ha utilizado para valorar la utilidad de los IRP de los analitos, considerándose realmente útiles si el II es $> 1,4$ y de poca utilidad si es $< 0,6$. Parece claro que, en las magnitudes con fuerte individualidad, sería mucho más informativo saber si existe diferencia clínicamente significativa entre el último

resultado y el anterior del paciente, que limitarse a mostrar si un resultado está fuera o dentro del intervalo de referencia poblacional.

4.1. MATERIALES Y METODOS

Para evaluar la variabilidad biológica intraindividual, se reclutaron 6 hombres aparentemente sanos del personal de Onkologikoa, de los cuales ninguno informó de una posible exposición al amianto. Durante el periodo de estudio, se pidió a los participantes continuar con sus hábitos alimenticios y actividades habituales. Siguiendo las directrices de la Declaración de Helsinki, explicamos a fondo el diseño y ejecución del experimento a los participantes y en todos los casos se obtuvo el consentimiento informado. Las muestras de sangre se obtuvieron 4 veces durante 3 semanas, siempre a la misma hora.

Las muestras de sangre se recolectaron en tubos con agentes coagulantes y gel para separar el suero. Una vez centrifugadas a 3000 rpm, durante 10 minutos a temperatura ambiente (dentro de una hora desde su extracción), el suero fue congelado a -20°C hasta el momento de su análisis. Todas las muestras fueron anonimizadas y procesadas por duplicado.

La evaluación de la imprecisión (CVa) se realizó procesando 20 veces por duplicado una mezcla de varios sueros (pool) realizada en el propio laboratorio, obteniendo la media y la DE.

La determinación de los marcadores se realizó mediante la técnica de enzimoimmunoanálisis (ELISA) en la Fundación Onkologikoa. Para ello, se empleó un analizador automático (DS2 Dynex®) que realiza todos los pasos de los ensayos requeridos automáticamente. Estos pasos incluyen la dilución de la muestra, además de la incubación, lavado y la lectura de la absorbancia. Así, el espectrofotómetro incorporado determina la absorbancia y a través de su sistema de lectura la convierte en datos que permiten interpretar el resultado de la prueba.

Los kits comerciales que se emplearon para la determinación de los biomarcadores

son los siguientes: FBLN3 (Uscn Life Science Inc.) para Fibulin-3 y MicroVue YKL-40™ (Quidel Corporation) para YKL-40. Todas las mediciones se realizaron de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes.

4.2. ESTIMACIÓN DEL VRC

La estimación del VRC para un analito, es decir el cambio necesario para que la diferencia entre dos resultados consecutivos de un individuo sea considerada clínicamente significativa, se calcula mediante la fórmula: (69).

$$\text{VRC} = 2^{1/2} * Z * (\text{CVa}^2 + \text{CVi}^2)^{1/2}$$

donde Z es el estadístico cuyo valor es 1,65 para la probabilidad del 95%; CVa es el coeficiente de variación analítico del laboratorio para la magnitud, y CVi es el coeficiente de variación biológico intraindividual.

La aplicación de las fórmulas para el cálculo del VRC se realizó en una hoja de cálculo Excel.

4.3. RESULTADOS

La Figura 3 y la Figura 4 consecutivamente, muestran los valores medios y rangos absolutos de Fibulin-3 e YKL-40 séricos en las 4 muestras de los 6 individuos participantes.

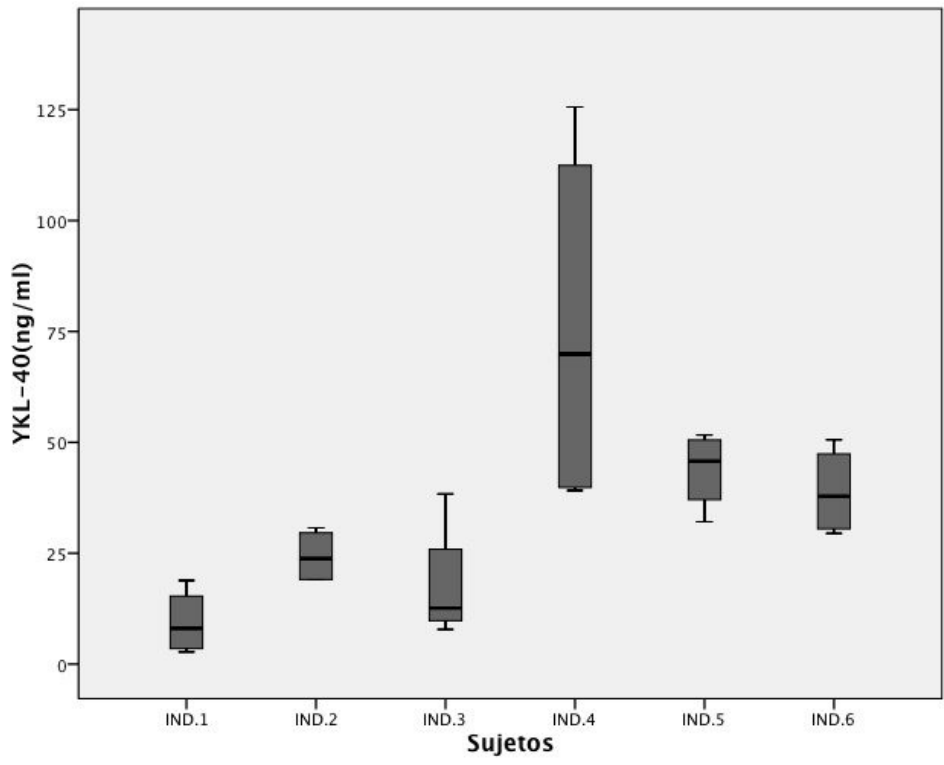


Figura 3. Valores medios y rangos absolutos de YKL-40 en individuos aparentemente sanos.

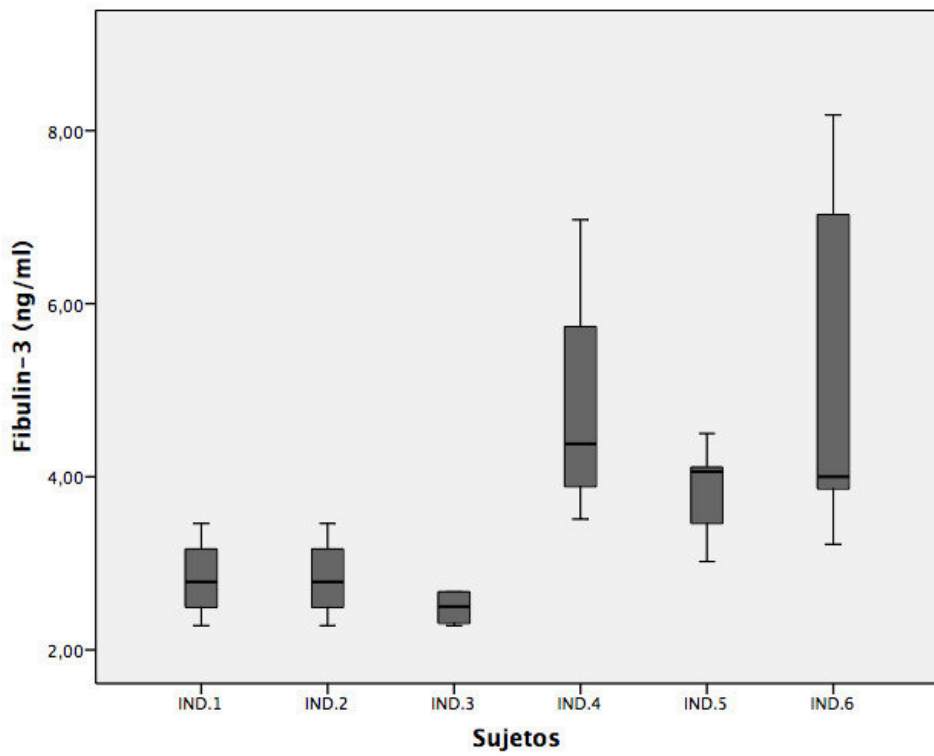


Figura 4. Valores medios y rangos absolutos de Fibulin-3 en individuos aparentemente sanos.

La concentración media de YKL-40 en suero fue de 35,67ng/ml (rango 2,74-125,61ng/ml). A simple vista, se puede observar que el individuo 4 tiene una gran variabilidad, mientras que el resto varían mucho menos durante el período observado. En cuanto a Fibulin-3, la concentración media fue de 3,7ng/ml (rango (2,28 - 8,18ng/ml). En este caso, son dos los sujetos muestran mayor variabilidad.

SMRP fue el biomarcador con menor variación analítica (5,43%), ya que la variación analítica intraserie fue de 9,05% para YKL-40 y 10,13% para Fibulin-3.

En cuanto a los coeficientes de variación interindividuales fueron mayores para SMRP (68,98%) y similares para YKL-40 (30,97%) y para Fibulin-3 (31,34%), mientras que la variación intra-individual fue mayor para YKL-40 (38,04%) que para Fibulin-3 (6,06%), siendo este último muy similar a SMRP (4,07%).

El índice de Individualidad fue muy bajo ($<0,6$) para SMRP (0,06%), bajo para Fibulin-3 (0,19%) y alto para YKL-40 (1,23).

El VRC (para IC=95%) para la mesotelina que obtuvimos en nuestra población de estudio fue del 27.26%. El VRC obtenido para el YKL-40 (IC=95%) fue del 108,06%, y en caso de Fibulin-3, teniendo en cuenta sus datos de variación biológica y analítica, la estimación del VRC fue del 32,61%. Estos resultados se resumen en la siguiente tabla II.

Tabla II. *Resultados de las variaciones biológicas y analíticas, junto a los respectivos Índices de individualidad y Valores de Referencia del Cambio.*

| MAGNITUD | CVa(%) | CVi(%) | CVg(%) | II | VRC(%) |
|------------------|--------|--------|--------|------|--------|
| Mesotelina(SMRP) | 5,43 | 4,07 | 68,98 | 0,06 | 27,26 |
| Fibulin-3 | 10,13 | 6,06 | 31,34 | 0,19 | 32,61 |
| YKL-40 | 9,05 | 38,04 | 30,97 | 1,23 | 108,06 |

Por último, en la tabla III, la variación analítica de los biomarcadores se compara con los tres niveles de exigencia analítica existentes.

Tabla III. *Tabla de variación analítica y especificaciones de la calidad.*

| MAGNITUD | CVa(%) | ESPECIFICACIONES DE CALIDAD(%) | | |
|------------------|--------|--------------------------------|----------|--------|
| | | ÓPTIMO | DESEABLE | MÍNIMO |
| Mesotelina(SMRP) | 5,43 | 1,02 | 2,04 | 3,05 |
| Fibulin-3 | 10,13 | 1,52 | 3,03 | 4,55 |
| YKL-40 | 9,05 | 9,51 | 19,02 | 28,53 |

4.4. DISCUSIÓN

La caracterización de los valores de referencia para un parámetro clínico es fundamental si queremos disponer de una herramienta diagnóstica eficaz. En general, los parámetros de interés se referirán a concentraciones de determinados metabolitos (en nuestro caso biomarcadores), actividades enzimáticas, etc. Para ello es necesario conocer la distribución de estos marcadores en sujetos sanos y así poder establecer el rango de normalidad y el punto de corte para el diagnóstico.

Pero la producción de valores de referencia biológicos para una magnitud por parte de los laboratorios clínicos es difícil y cara. Esto se debe, principalmente, a que es

difícil conseguir voluntarios que sirvan como individuos de referencia y al elevado coste económico derivado de las mediciones destinadas a la producción de valores de referencia biológicos.

Además, muchas veces una magnitud biológica depende de las características socio-biológicas de la población de referencia y de las características metrológicas del procedimiento utilizado, lo que trae como consecuencia la difícil adecuación de los estudios realizados en un país, a las condiciones propias de otro.

Relacionando este contexto con nuestro estudio la realidad es que no hay valores de referencia fijos de YKL-40 en personas aparentemente sanas (72)

. Se ha determinado que el nivel de la glicoproteína aumenta con la edad, no habiendo ninguna diferencia entre sexos (73). Además recientemente se ha publicado que los niveles de YKL-40 en personas sanas difieren entre poblaciones; la concentración media es de 43ng/ml en individuos daneses (74), mientras que en la población turca (114ng/ml) y japonesa (101,7 ng/ml) es más alta (75,76). Como se ha mencionado anteriormente, esta diferencia podría explicarse por el hecho de que algunos estudios utilizan suero y otros plasma, por el hecho de emplear diferentes técnicas (ELISA, RIA) o simplemente por diferencias entre poblaciones.

Recientemente, Fibulin-3 fue presentado como un nuevo biomarcador prometedor para el diagnóstico de MPM. Según un estudio, este biomarcador discrimina mejor el mesotelioma de sujetos sanos y respecto a los expuestos al amianto y libres de patología (77). Todo parece indicar que este marcador va a resultar útil en la detección precoz del mesotelioma, ya que funciona con los mesoteliomas en estadios I y II, pero los propios autores concluyen que es preciso realizar nuevos estudios que corroboren estos primeros resultados.

Al tratarse de un posible nuevo biomarcador, con el fin de determinar su valor clínico, se requieren llevar a cabo nuevos estudios prospectivos para conocer mejor

los niveles de Fibulin-3 tanto en sujetos sanos (para obtener los resultados de referencia) como en pacientes con mesotelioma, en personas con enfermedades pleurales benignas o en personas expuestas a amianto. Además, las investigaciones futuras deberían explorar el por qué del aumento selectivo de este marcador en el mesotelioma en comparación con otros tipos de patologías pleurales, además de estudiar la evolución de los niveles en sangre para poder correlacionar la evolución de estos niveles con la aparición de MPM en grupos de riesgo.

Por último, en caso de SMRP, aunque es el marcador más estudiado y se conoce su concentración en adultos sanos, su punto de corte ideal sigue siendo desconocido. De hecho, la escasa sensibilidad (19%-68%) con un umbral alto de especificidad (88%-100%) recogido en un metaanálisis (78) es lo que limita claramente su valor añadido para el diagnóstico precoz del mesotelioma y lo que motivó la búsqueda de nuevos marcadores.

Esta heterogeneidad se puede explicar por las diferencias tanto en la población de estudio como en el grupo control empleados o por las diferencias en la etapa y subtipo histológico de mesotelioma de los participantes, que pueden afectar significativamente la exactitud diagnóstica.

Ante esta situación, y basándonos en el cálculo del índice de individualidad, el hecho de que en los tres biomarcadores el uso de VRC sea útil en la interpretación de los resultados, facilita dicho problema. Aún así, para interpretar de forma correcta el nivel de estos marcadores son necesarios valores de referencia poblacionales.

Como se ha explicado anteriormente, el VRC proporciona la información sobre cual es el cambio necesario para que las diferencias entre dos resultados consecutivos de un individuo sean consideradas clínicamente significativas (79,80).

Los VRC para SMRP (27,26%) y Fibulin-3 (32,61%) muestran la necesidad de diferencias relativamente pequeñas entre los resultados seriados para indicar un

cambio significativo, al contrario de la diferencia crítica para YKL-40 (108,06%).

En analitos con un VRC grande (porque tienen alta V_{bi} y/o alta V_a) hay muy baja sensibilidad para detectar cambios por procesos patológicos, y muy baja capacidad de discriminar si los cambios observados se deben a fluctuaciones biológicas y/o analíticas o por un proceso patológico. Sin embargo, esto puede cambiar aumentando la sensibilidad analítica de los test, único componente del VRC modificable.

Para mejorar la confiabilidad analítica de una prueba de laboratorio, el primer paso es evaluar la variabilidad analítica en el laboratorio clínico y mejorar su precisión. La variación biológica es la base para obtener las especificaciones de la calidad analítica que satisfagan las necesidades médicas generales. Cuanto más estrechamente se controla el biomarcador en el organismo por mecanismos homeostáticos, es más estricto el requisito analítico. En nuestro caso, SMRP y Fibulin-3 tendrán mayor requisito analítico que YKL-40, porque los niveles de ambos biomarcadores se mantienen estables a nivel individual, a diferencia de YKL-40 que presenta mayor variación intraindividual.

Las especificaciones de la calidad son las establecidas por la Comisión de la Calidad Analítica de la SEQC para CV_a , deseable si es $<0,5 CV_i$, óptimo si es $<0.25 CV_i$, y en el caso de los procedimientos analíticos con los que es difícil alcanzar las especificaciones de calidad deseables con la metodología actual, se pueden utilizar las especificaciones de calidad mínimas: $CV_a < 0,75 CV_i$. Se ha considerado que las diferentes magnitudes cumplen las especificaciones analíticas cuando el indicador es, inferior al nivel de exigencia mínimo, deseable y/o óptimo según el caso. (79,81,82).

El objetivo de lograr que la variabilidad analítica sea siempre menor a la variabilidad biológica no es siempre fácil. En nuestro caso esta meta es más accesible de alcanzar para la determinación de YKL-40 ($CV_i = 38,05\%$), pero no así para la

mesotelina e Fibulin-3, debido a su baja variabilidad intraindividual.

Aunque las metas analíticas han ido reduciendo en función del desarrollo tecnológico y la disminución de la imprecisión, como consecuencia del surgimiento de los métodos automatizados, resulta imposible eliminar todas las fuentes de variación analítica.

Actualmente parece claro que la determinación de los tres biomarcadores implica un grado de imprecisión moderada. Para la determinación de SMRP y Fibulin-3 la imprecisión de las técnicas empleadas es la recomendada por las casas comerciales; $\leq 15\%$ para SMRP y $\leq 10\%$ para Fibulin-3, por lo que nos indica que en nuestro analizador automático la detección de cambios en determinaciones seriadas sería fiable. En caso de YKL-40 la estimación de la imprecisión obtenida (9,05%) en nuestro laboratorio está levemente por encima de las especificaciones de la imprecisión del fabricante (6,6%).

En función de la cuantía de la VB y de las prestaciones de la tecnología empleada se aplicará uno de los tres niveles de exigencia (mínimo, deseable y óptimo). Siempre que sea posible, lo recomendable es utilizar las especificaciones deseables, y en caso de que el laboratorio tenga dificultades para alcanzarlas, se utilizan las especificaciones mínimas. Las especificaciones óptimas son una opción libre para el laboratorio que quiera plantearse el nivel de calidad más alto.

En caso de YKL-40 la variación analítica obtenida indica que nuestro laboratorio cumple las especificaciones óptimas de calidad analítica basadas en la variación biológica. Pero en el caso de SMRP y Fibulin-3 dichas especificaciones son más estrictas, debido a sus pequeñas variaciones intraindividuales.

Por eso, SMRP y Fibulin-3 no cumplen las especificaciones de la calidad analítica, el CVa debería ser más estricto, pero dichas exigencias analíticas son inferiores (notablemente en caso de SMRP) al recomendado por el fabricante, por lo que

entendemos que con los recursos actuales estos niveles de variaciones analíticas son inalcanzables. Aún así se debería de valorar estas exigencias e intentar disminuir la imprecisión analítica al máximo posible.

El VRC entre dos determinaciones seriadas debe ser calculado en cada laboratorio con su propia variabilidad analítica para una correcta interpretación de los resultados. En un principio el VRC no es extrapolable a determinaciones realizadas en otros laboratorios, ya que cuentan con distintas variables analíticas. Sin embargo, el laboratorio que consiga sustituir el CVA individual de cada laboratorio por el objetivo deseable en imprecisión mas ampliamente aceptado, es decir, imprecisión igual o inferior a la mitad de la VB intraindividual ($0,5CV_i$), podrá compartir el VRC.(80,83).

En nuestro estudio, el VRC de YKL-40 sería el único que podría ser compartido a otro laboratorio. La especificación deseable de calidad analítica de SMRP es levemente mayor a la exigida y notablemente superior en caso de Fibulin-3, en consecuencia, dicho VRC no podría ser compartida.

A priori, en el seguimiento del mesotelioma la determinación de YKL-40 sería descartada por presentar la mayor variación intraindividual pero a su vez, SMRP y Fibulin-3 presentan variaciones analíticas que no cumplen las especificaciones analíticas de calidad. A pesar de ello, la calidad diagnóstica de cada biomarcador será lo que determine el mejor marcador para el diagnóstico del mesotelioma.

5. OBJETIVO III

ESTUDIO DE SEGUIMIENTO DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA APLICANDO EL VRC

Dado que la terminología en materia de VRC de este apartado se comparte con el apartado anterior, la información al respecto se encuentra en el apartado 4 de este documento.

5.1. MATERIALES Y MÉTODOS

El grupo de expuesto, se constituyó por 34 trabajadores de dos empresas en la que se utilizaba regularmente amianto. Se trata de trabajadores captados en el proyecto anterior "Mesotelioma Maligno: aportación del laboratorio de diagnóstico clínico en la vigilancia de la población de riesgo en el País Vasco", en 2013. Se obtuvo consentimiento informado de todos los participantes.

Se tomaron muestras de suero para la medición de niveles de SMRP, Fibulin-3 e YKL-40 en todos los participantes. En caso de algunos trabajadores las muestras de sangre fueron recolectadas y rotuladas en la misma empresa y enviadas refrigeradas al Laboratorio Clínico de la Fundación Onkologikoa, donde fueron centrifugadas y el suero fue congelado a -80°C hasta su posterior análisis. El resto de las muestras se obtuvieron en el mismo Onkologikoa. El suero se obtuvo por centrifugación a 3.000 r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después las muestras se almacenaron a -80°C hasta su utilización, al igual que las demás muestras.

La medición de niveles de SMRP para el estudio del VRC se realizó mediante el kit comercial MESOMARK® (Fujirebio Diagnostics, Inc., Malvern, PA, USA) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. El test es un enzima inmunoensayo (ELISA) de dos pasos con detección colorimétrica a 450 nm.

Las concentraciones de Fibulin-3 e YKL-40 también se midieron mediante la técnica ELISA, con los kits comerciales FBLN3 (Uscn Life Science Inc.) y MicroVue YKL-40™ (Quidel Corporation) respectivamente.

Todos los ensayos se realizaron en el analizador automático DS2 Dynex®, con las muestras codificadas y tras el análisis de los biomarcadores los restos de muestras de suero generados se eliminaron mediante autoclavado.

5.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos se efectuaron mediante el Programa SPSS version 20 para Windows (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Las diferencias en la concentración de SMRP entre diferentes grupos se evaluaron mediante la prueba ANOVA o la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, dependiendo de la presencia o ausencia de la normalidad determinada por la prueba Kolmogorov-Smirnov. En ambas pruebas la significación estadística se estableció en $p < 0,05$. Las principales variables identificadas para los análisis fueron: concentración de SMRP, variación porcentual de SMRP, riesgo teórico y puntuación de la encuesta. En el análisis de datos cuantitativos se empleó la estadística descriptiva y en el caso de variables cualitativos se utilizó la técnica de análisis por categorización. Para el análisis de las correlaciones entre las variables se utilizaron el coeficiente de correlación de Spearman o Pearson.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. RESULTADOS DEL SEGUIMIENTO

Al inicio del estudio, una de las tres empresas participantes dejó de colaborar en el proyecto, con la consecuente pérdida de 23 participantes (entre ellos los sujetos asignados al grupo control). También se perdieron 18 participantes más del resto de las empresas, la mayoría porque no quisieron volver a participar en el estudio y un número reducido de personas, porque no se consiguió contactar con ellas. El grupo

de estudio que quedó se constituyó por 34 hombres con exposición a amianto y sin MPM. La media de edad fue de $70,85 \pm 4,5$ años, con una media de tiempo de exposición de $17,9 \pm 4,53$ años.

En cuanto a las características de la exposición a amianto, la media de la puntuación de evaluación de riesgo asignado por el médico de empresa fue de $64,71 \pm 19,26$ puntos. Mientras que la puntuación media de la encuesta que recoge la intensidad de la exposición fue de $1,49 \pm 0,76$ puntos. 12 trabajadores pertenecían a la industria ferroviaria y 22 habían trabajado en el sector de la acería. Ningún sujeto vivió en las cercanías de una empresa que fabricara fibrocemento o amianto, por lo que se descartó la exposición extralaboral a estas fibras en todos los casos.

El promedio \pm desviación estándar de SMRP en estos sujetos expuestos sin MPM fue de $1,51 \pm 0,55$ nM en un rango de 0,9 a 2,9. Al analizar los valores de SMRP se observó que 16 sujetos (47,1%) presentaron valores de SMRP mayores a 1,5 nM (percentil 99 del grupo de referencia descrito por el fabricante), frente a 5 (15,2%) del año 2013.

En el anterior estudio, con una imprecisión de 5,43%, el VRC obtenido para SMRP fue de 27,26%, valor con el que se evaluaron las variaciones observadas. Los incrementos registrados para los sujetos del estudio, que oscilaron entre un 0% y un 178,6%, con una media de $44,25\% \pm 51,04\%$, fueron evaluados frente al discriminante VRC, encontrándose que de 34 sujetos expuestos, 21 personas (61,8%) mostraban un cambio (aumento) mayor que el VRC. En la Figura 5, se representa gráficamente el resultado.

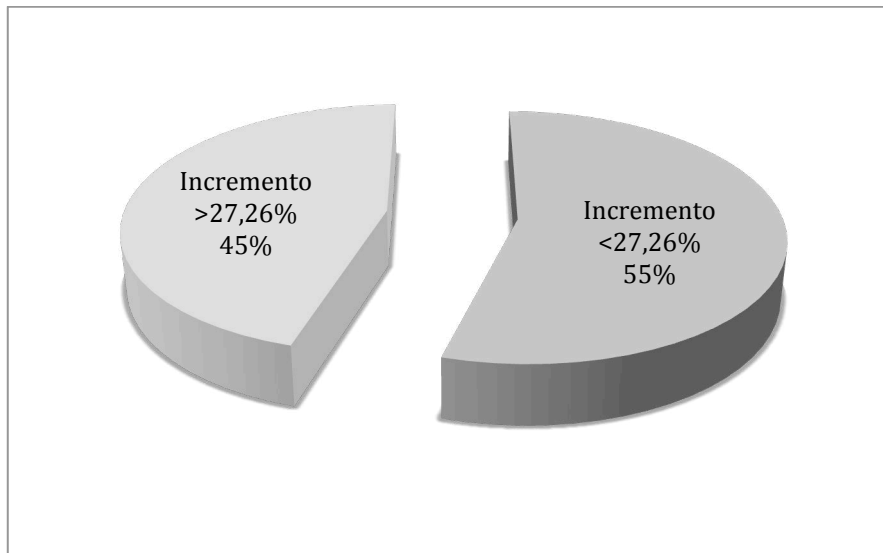


Figura 5. Resultado de los cambios en SMRP respecto al VRC.

El valor del nivel crítico ($p = 0,00$) obtenido en la prueba para dos muestras relacionadas de Wilcoxon confirma que las determinaciones seriadas de SMRP difieren significativamente y que no se han mantenido estables.

Con el fin de evaluar el aumento máximo que se puede esperar en trabajadores expuesto a amianto en nuestra población, se seleccionaron aquellos sujetos con un aumento mayor al VRC y se calculó el percentil 95 del aumento, que fue de 1,3 nmol/l.

El coeficiente de correlación de Spearman no demostró ninguna correlación entre la concentración de SMRP y la edad ($p=0,95$). Ni el porcentaje de diferencia (aumento) entre las dos determinaciones mostró ninguna correlación significativa con la edad ($p=0,86$).

En nuestro estudio tampoco hubo ninguna correlación entre el porcentaje de aumento de la mesotelina y la duración de la exposición al amianto ($r = 0,187$; $p = 0,203$), ni entre el aumento y el riesgo de exposición según el riesgo teórico ($r = 0,019$; $p = 0,89$) y el riesgo según la encuesta.

Con la prueba ANOVA se encontró que no había diferencias en la concentración de

SMRP entre las personas fumadoras y no-fumadoras ($p = 0,729$).

Los sujetos se dividieron en dos grupos de riesgo (riesgo bajo/riesgo alto) utilizando la mediana de dicha puntuación como punto de corte, que fue de 60 puntos. La diferencia (aumento) porcentual entre las dos determinaciones de SMRP en suero se analizó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis respecto a estos grupos de riesgo, no encontrándose ninguna evidencia estadísticamente significativa ($p = 0,56$) entre ambos grupos. La correlación inexistente (r de Spearman = 0,019; $p = 0,89$) entre el riesgo y la diferencia porcentual corroboran que el aumento de SMRP no se asocia con el riesgo de exposición asignado a cada trabajador por el médico de empresa.

La diferencia porcentual se categorizó estableciendo como punto de corte el VRC (27,26%), asignando a los sujetos a dos grupos: el grupo con variaciones porcentuales situadas por debajo del VRC y el grupo con variaciones porcentuales superiores al VRC. Se volvió a realizar la prueba de Kruskal-Wallis para estudiar las posibles diferencias estadísticamente significativa entre los grupos. Ni el riesgo de exposición, ni la puntuación obtenida en la encuesta presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ($p > 0,05$).

La concentración de SMRP se dicotomizó utilizando un valor de 1,5nM como punto de corte (percentil 99 del grupo de referencia descrito por el fabricante): los valores menores o iguales que el punto de corte constituyen el primer grupo y los valores mayores el segundo. Al analizar la exposición, es decir, los valores de riesgo y la puntuación de la encuesta, aplicando la prueba ANOVA, se observó que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre las dos categorías.

5.3.2. RESULTADOS DE LA AMPLIACIÓN DEL PANEL BIOQUÍMICO A FIBULIN-3 E YKL-40

La media cuantificada de los niveles de los biomarcadores fue de 11,59ng/ml \pm 8,72 para Fibulin-3 y de 109,19ng/ml \pm 65,15 en caso de YKL-40.

En cada sujeto en seguimiento las mediciones de Fibulin-3 e YKL-40 se relacionaron con las principales variables recogidas en el proyecto anterior: 1) edad; 2) duración de la exposición; 3) riesgo teórico determinado por el médico de empresa y 4) riesgo según la puntuación de la encuesta.

No se obtuvo ningún resultado relevante en el estudio correlacional ($p = 0,06-0,992$).

5.4. DISCUSIÓN

5.4.1. SMRP Y EL VRC

Las diferencias entre las dos determinaciones de SMRP fueron mayores que VRC en el 62% de los individuos estudiados. Aún así, ningún sujeto estudiado mostró un gran aumento de los niveles de mesotelina, en comparación con los pacientes con MM ($X = 17,27\text{nM} \pm 6,95\text{nM}$) (84,85) y las concentraciones obtenidas fueron similares a otros estudios (86).

El valor del percentil 95 es levemente superior a la obtenida en otros estudios (87). Aunque entendemos que estos datos no son comparables y que los sujetos han de ser estudiados en el contexto de su propia población, ya que la exposición ocupacional a amianto varía en diversas áreas del mundo, dependiendo de la cantidad de amianto utilizado en ese país y más concretamente en cada área de trabajo.

En nuestro estudio no hubo ninguna correlación entre el porcentaje de aumento de la mesotelina y la duración de la exposición al amianto, ni entre el aumento y el riesgo de exposición según el riesgo teórico y el riesgo según la encuesta. Es decir, en nuestra población la mesotelina no aumenta más en aquellos sujetos que hayan tenido más riesgo de exposición o que hayan estado expuestos durante más tiempo, al igual que en otros estudios (88).

Como bien sabemos, SMRP se encuentra elevada en pacientes con mesotelioma.

Según un estudio SMRP se encontró elevada en el 84% de los pacientes con mesotelioma, sólo en el 2% en sujetos con otra patología pleural o pulmonar (89) y sin ninguna elevación en el grupo control que no había estado expuesto al amianto, demostrando su utilidad en el diagnóstico del mesotelioma.

Pero no está claro cuando ocurre el aumento disparado del biomarcador. En un estudio de 40 sujetos con antecedentes de exposición al amianto, siete individuos presentaron concentraciones séricas de SMRP mayores y en un periodo de 1 a 5 años tres de ellos desarrollaron mesotelioma y uno de ellos cáncer de pulmón (89). Sin embargo, en otro estudio (90) las determinaciones seriadas de SMRP en un periodo de 4 años se mantuvieron estables (r de Pearson=0,96;p <0,0001). Un estudio concluye que este aumento ocurre entre 6 y 18 meses antes del desarrollo de los síntomas clínicos del mesotelioma (87).

El MPM se puede desarrollar después de una fuerte exposición al amianto. A priori, se requiere de una larga exposición al amianto para poner a alguien en riesgo de contraer la enfermedad, pero se han visto casos en los que una exposición corta pero bastante fuerte puede causar el cáncer. Ante esta heterogeneidad, evaluar la elevación de los niveles de SMRP en personas expuestas sería útil para predecir la aparición de MPM, y así aumentar el tiempo y la calidad de vida.

5.4.2. FACTORES DE CONFUSIÓN

A la hora de realizar un seguimiento, cuando se realizan dos exámenes de laboratorio seriados para el control de un paciente, es muy importante que se conozcan todos los elementos que pueden ser fuentes de variación en las mediciones. Existen cuatro fuentes principales de variación en un examen: variación pre-analítica, variación biológica, variación analítica y variaciones debidas a cambios en el estado de salud.

La fórmula del VRC considera una parte de las fuentes de variación como la variación analítica y la variación intraindividual, pero existen ciertas limitaciones.

La recogida de muestras de forma prospectiva impide que la determinación de muestras seriadas se realice en el mismo día, con los mismos reactivos y con el mismo equipo, la única forma de obtener resultados bajo las mismas fuentes de influencia o variación. En nuestro estudio, aunque se intentó reducir al mínimo la variación analítica, la variación interensayo es inevitable, más teniendo en cuenta que los resultados actuales se están comparando con resultados de hace 24 meses. En la práctica esta variación entre ensayos sería un grave problema en un programa de cribado debido a la falta de armonización de las técnicas utilizadas, con el problema añadido de que probablemente las determinaciones se realizarían en diferentes laboratorios.

La variabilidad biológica de las magnitudes bioquímicas se debe a diversos factores de variación. Algunos de estos factores son inherentes al individuo y es muy difícil o imposible que puedan ser modificados. Entre los principales factores de variación biológica se incluyen los siguientes: sexos, raza, edad, ritmos biológicos, grupo sanguíneo o la masa corporal.

Algunos de los factores de variación biológica son responsables de la variabilidad biológica intraindividual, mientras que otros lo son de la variabilidad biológica interindividual, y los hay que influyen en ambos tipo de variabilidad biológica; así, por

ejemplo, el cambio de hábitos de vida pueden producir variaciones en una magnitud de un mismo individuo en distintos momentos, el sexo o la raza del individuo pueden causar diferencias interindividuales y la edad puede originar cambios interindividuales e intraindividuales.

Son bien conocidos los factores biológicos de confusión que influyen en la concentración de la mesotelina, entre ellos las variaciones relacionadas con la edad, la tasa de filtración glomerular o el hábito tabáquico (91-93).

Aunque en esta población de estudio no ha quedado patente la correlación entre la edad y la concentración de SMRP SMRP ($p=0,95$), quizá por ser una representación muestral pequeña, los estudios correlacioales que hemos llevado a cabo en otro apartado del estudio y al igual que otros estudios han reflejado que la edad es un factor a tener en cuenta a la hora de valorar el nivel de SRMP en sangre (86).

Este estudio también tuvo en cuenta la función renal de los sujetos (determinado mediante la concentración de creatinina), otro factor de confusión en la determinación de SMRP en sangre, aunque en nuestro caso, no tuvo ninguna correlación con los niveles del biomarcador ($r = -0,273$; $p = 0,118$). Ni tampoco el habito tabáquico influyó en el nivel de SMRP ($p = 0,729$).

Otro posible problema es la degradación de la muestra debido a las diferentes condiciones de transporte y almacenamiento en los diferentes centros. Afortunadamente, la mesotelina es una molécula muy estable como se evidencia en experimentos de congelación-descongelación (94), así como en nuestro estudio de estabilidad en el tiempo en el anterior proyecto. En nuestro caso, las condiciones de almacenamiento fueron similares a las anteriores, minimizando los efectos del almacenamiento. Esta fuente de variación debería ser tomada en cuenta en cualquier futuro estudio multicéntrico.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio nos indican que una gran parte de los

individuos mostró una diferencia clínicamente significativa entre las dos determinaciones consecutivas. Pero estos resultados no se pueden considerar válidos sin tener en cuenta los valores de confusión. Podría ser que la variabilidad biológica relacionada con la edad sea el factor responsable de que en un individuo no se observe el mismo valor de SMRP a lo largo del tiempo, o podría ser la variabilidad analítica la causante de esta diferencia significativa.

Por lo tanto, es imprescindible que todas las fuentes de variación entre dos exámenes seriados realizados en un mismo laboratorio sean consideradas para la correcta interpretación de los valores de las magnitudes bioquímica, antes de decidir si hubo un cambio clínicamente significativo. En todo caso, el VRC es una herramienta útil que puede aportar información valiosa si se interpreta correctamente.

Es muy importante que en las determinaciones consecutivas la determinación se realice en el mismo laboratorio y con el mismo equipo de análisis, ya que los resultados varían mucho de unos métodos a otros, al igual que los puntos de corte y valores de referencia.

5.4.3. PUNTO DE CORTE ÓPTIMO

Para la correcta implementación del uso de biomarcadores en MPM es necesario asegurar una gran precisión diagnóstica y terapéutica y una importante optimización de recursos. Para garantizar estos requisitos es trascendental definir el punto de corte que discrimine los individuos enfermos y los sanos. Se trata de establecer un compromiso entre un nivel de riesgo aceptable y la efectividad en función del balance entre el índice de detección y de falsos positivos.

En nuestro estudio, al transformar la concentración de mesotelina (variable continua) en una variable categórica dicotómica para un mejor análisis, nos encontramos ante el problema de decidir el punto de corte. La determinación de SMRP en suero ha sido consistentemente útil para diferenciar pacientes con MM, de los pacientes

expuestos a amianto y los grupos control (95-100), pero utilizando diferentes puntos de corte (101) por lo que actualmente no existe un punto de corte fijo para el diagnóstico de MPM. Nosotros optamos por 1,5 nM como punto de corte, el valor especificado por la casa comercial MESOMARK ®.

Niveles de SMRP por encima de un punto de referencia pueden sugerir la presencia de mesotelioma u otra enfermedad pleural maligna y por lo tanto, resultados positivos sugerirían la necesidad de medidas diagnósticas más invasivas y requerimientos de mayor vigilancia. Además, consideramos que los niveles de este marcador también son útiles para identificar a las personas expuestas a amianto que aún no han desarrollado la enfermedad. Esto implica que algún día el análisis de este marcador en sangre puede servir como herramientas de vigilancia de las personas con riesgo de desarrollar un cáncer relacionado con el amianto. Aún así, la mayoría de estudios sugiere que los resultados aún no son del todo fiables, ya que debido a su baja sensibilidad no siempre excluye la enfermedad, limitando claramente su utilidad para el diagnóstico de MPM.

5.4.4. DIFICULTADES Y LIMITACIONES EN EL ESTUDIO

5.4.4.1. FALTA DE CASOS

El diseño del estudio implicó solo a sujetos expuestos sin mesotelioma y controles, impidiendo la estimación de la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos, es decir, la capacidad diagnóstica, tanto de los biomarcadores, como de sus VRC.

La propia rareza del cáncer hace que sea difícil de reclutar los casos de estudio necesarios para realizar estudios y requiere la identificación de una población muy grande en diferentes áreas geográficas, centros hospitalarios o especialistas para obtener resultados.

Además de su baja incidencia, tiene una latencia prolongada, lo que crea la necesidad de esperar el período entre la exposición y las manifestaciones de la enfermedad, que puede prolongarse por varios años, como es el caso del MPM.

En estas circunstancias la búsqueda de casos, así como la selección y búsqueda de un grupo de comparación, puede llegar a dificultar el diseño del estudio siendo la enfermedad en estudio poco prevalente y con un largo periodo de latencia, como es el caso de MPM.

Aún así, el estudio de casos y controles es la elección adecuada, y en ocasiones la única alternativa, para estudiar este tipo de enfermedades, debido a la posibilidad de detectar la mayoría de los casos de una enfermedad dentro de un entorno hospitalario. Además, los casos identificados ya desarrollaron la enfermedad, por lo que no es necesario efectuar observaciones por prolongados periodos de tiempo. En el estudio de cohortes sería necesario observar a un número muy amplio de individuos para detectar los pocos casos incidentes o prevalentes dentro de una población. Esto lo hace muy poco eficaz, ya que se tendrían que invertir enormes recursos y tiempo en el seguimiento de individuos que permanecerán libres de la enfermedad.

Los estudios de caso o de series clínicas sería otra opción. Constituyen otra modalidad de estudio descriptivo que tiene como finalidad acotar el análisis a un grupo particular de sujetos caracterizados por ser portadores de una enfermedad o condición particular. Pueden ser un conjunto de enfermos diagnosticados recientemente (casos incidentes) o constituir un pool de casos considerando aquellos ya enfermos más los nuevos casos (casos prevalentes).

5.4.4.2. FALTA DE SEGUIMIENTO CONTINUO

El diseño del estudio tampoco ha permitido un seguimiento más continuo de los niveles de SMRP en la población expuesta a amianto, para conocer su utilidad como biomarcador de MPM.

El planteamiento anual del estudio no nos ha permitido observar cómo se ha aumentado la concentración de SMRP, ya que el periodo entre las dos determinaciones ha sido de 2 años.

La obtención de determinaciones seriadas de SMRP sería totalmente necesaria para conocer cómo y cuándo aumenta el marcador antes de que se realice el diagnóstico de MPM. Además de facilitar información para conocer la fase en la que se encuentra el cáncer en el momento del aumento del marcador.

Como hemos mencionado anteriormente, un estudio concluye que este aumento ocurre entre 6 y 18 meses antes del desarrollo de los síntomas clínicos del mesotelioma (87).

5.4.4.3. PÉRDIDA DE PARTICIPANTES

Aunque inicialmente el estudio no se planteó como un estudio observacional prospectivo, se ha realizado la evolución de SMRP en el tiempo. Pero en varios sujetos este seguimiento ha sido incompleto debido a la retirada tanto de una empresa como de trabajadores individuales del estudio. Estas pérdidas han dado lugar a una disminución de datos y dificultades en análisis estadísticos.

Uno de los mayores problemas intrínsecos de los estudios prospectivos es la pérdida de participantes durante su seguimiento en el tiempo. Consideramos que es un aspecto muy importante a la hora de plantear futuros estudios observacionales prospectivos en este ámbito, ya que puede descubrirse más adelante que se ha perdido tiempo (planificación, desarrollo del protocolo, entrenamientos, recolección de datos, seguimiento de sujetos y recursos (salarios, tiempo de investigadores, pruebas de laboratorio, pagos a terceros, programas y bases de datos, asesoría) en un estudio cuyos resultados no son concluyentes por un número muy pequeño de sujetos, que no ofrece al estudio poder suficiente para encontrar las diferencias con significación clínica y estadística que se buscan.

Las numerosas dificultades que nos han surgido en el desarrollo del estudio, además de los problemas inherentes a su diseño, nos han llevado a realizar modificaciones o a desarrollar parcialmente (u omitir) algunos objetivos.

6. OBJETIVO IV

COMPARACIÓN ENTRE EXPUESTOS Y CONTROLES

La toma de decisiones clínicas es un proceso extremadamente complejo en el que la utilidad de cualquier prueba diagnóstica para el manejo del paciente debe ser valorada, a fin de reducir el posible número de falsas interpretaciones. En este contexto, es imprescindible conocer detalladamente la exactitud de las distintas pruebas (biomarcadores en nuestro caso) para clasificar correctamente a los pacientes en categorías o estados (expuestos y no expuestos, enfermos o sanos, respuesta positiva o negativa a la terapia, etc.).

Generalmente, la exactitud se expresa como sensibilidad y especificidad. Cuando se utiliza una prueba dicotómica, la sensibilidad es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo cuyo estado real sea el definido como positivo (expuesto al amianto) respecto a la condición que estudia la prueba, razón por la que también es denominada fracción de verdaderos positivos (FVP). En cambio la especificidad es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo cuyo estado real sea definido como negativo (no expuesto). Es igual al resultado de restar uno a la fracción de falso positivos (FFP). De estos dos indicadores se deduce la probabilidad de clasificar correctamente a sujetos a partir de los resultados de la prueba (102).

6.1. MATERIALES Y MÉTODOS

El grupo de estudio se compuso de los 34 trabajadores captados en el anterior proyecto, en los que se realizó el seguimiento de los niveles de SMRP y el grupo control se conformó por 31 voluntarios sanos, sin antecedentes de exposición a amianto, todos ellos trabajadores del Hospital Onkologikoa. Todos firmaron el consentimiento informado antes de participar.

La determinación de Fibulin-3 se realizó utilizando el test FBLN3 (Uscn Life Science

Inc.) y la determinación de YKL-40 mediante y MicroVue YKL-40™ (Quidel Corporation). Ambas mediciones se realizaron utilizando el analizador automático (DS2Dynex®).

Se utilizó la prueba Shapiro-Wilk para determinar la distribución normal de las variables y la comparación entre el grupo de expuestos y controles se realizó mediante la prueba Kruskal Wallis. Se construyeron curvas ROC para evaluar el rendimiento de los tres biomarcadores para diferenciar los dos grupos y se utilizó el análisis de regresión logística multivariante por pasos para determinar qué combinación de marcadores es el que mejor predice la exposición al amianto.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SPSS versión 20.0, con excepción del análisis de las curvas ROC, que se realizó mediante MedCalc.

6.2. RESULTADOS

La concentración media de SMRP fue mayor en los sujetos expuestos al amianto ($1,1\text{nM} \pm 0,5 \text{ nM}$) que en el grupo control ($0,76\text{nM} \pm 0,12 \text{ nM}$). El promedio \pm desviación estándar de Fibulin-3 fue de $0,53 \pm 0,4 \text{ nM}$ en el en el grupo expuesto y $10,68 \pm 10,28 \text{ nM}$ en el grupo control.

En caso de Ykl-40 la concentración del biomarcador en el grupo de expuestos también fue mayor ($109,19 \pm 65,15$) frente al grupo control ($13,87 \text{ ng/ml} \pm 12,6$).

En todas las comparaciones entre los valores de estos dos grupos se encontraron diferencias estadísticamente significativas. (Tabla IV).

Tabla IV. Concentraciones séricas de SMRP, Fibulin-3 e YKL-40 en los dos grupos de estudio.

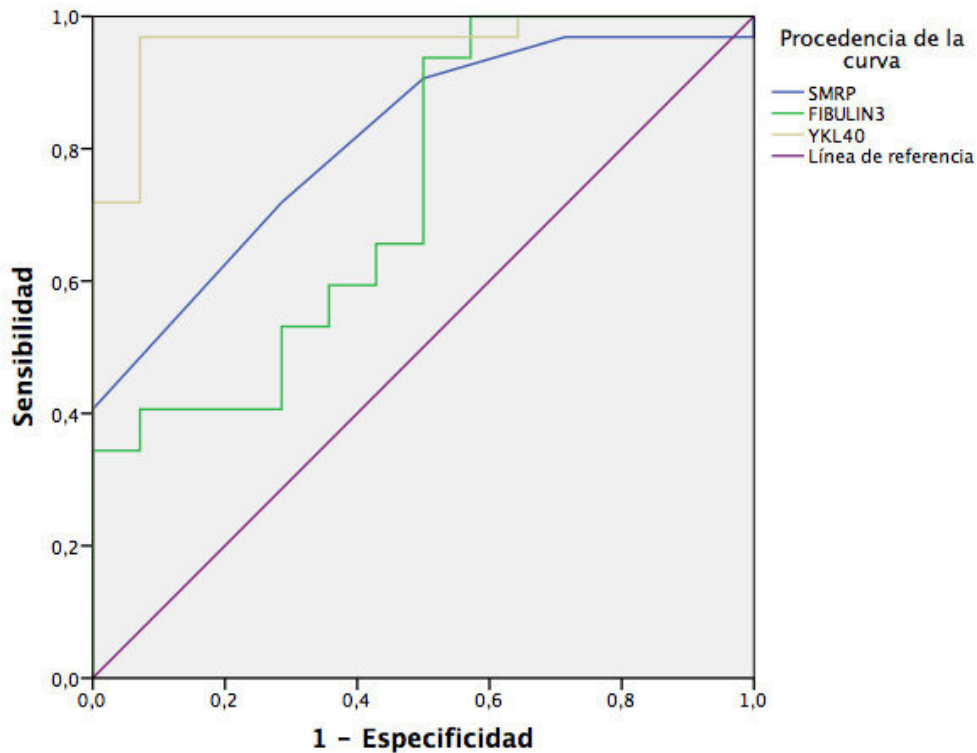
| Concentración | Control (n =31) | Expuestos (n=34) | Valor p* |
|-------------------|-----------------|------------------|----------|
| Media ± DS | | | |
| SMRP | 0,76 ±0,12 | 1,1 ± 0,5 | 0,01* |
| Fibulin-3 (ng/ml) | 8,59±3,87 | 11,59±8,72 | 0,01* |
| YKL-40 (ng/ml) | 13,87±12,6 | 109,19±65,15 | 0,00* |

* Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

El análisis de curvas ROC mostró un área bajo la curva (ABC) para SMRP en suero de 0,826 (IC 95% 0,682-0,924) para diferenciar los sujetos expuestos de los no expuestos. Este mismo análisis realizado para Fibulin-3 mostró un ABC de 0,747 (IC 95% 0,593-0,866) y en caso de YKL-40 fue de 0,98 (IC 95% 0,884-1). Estos resultados y sus correspondientes curvas ROC se muestran a continuación (tabla V, Figura 6).

Tabla V. Resultados de las ABC

| Predictores | ABC | IC95% |
|-------------|-------|-------------|
| SMRP | 0,826 | 0,682-0,924 |
| Fibulin-3 | 0,747 | 0,593-0,866 |
| YKL-40 | 0,98 | 0,884-1 |



*Los segmentos diagonales son producidos por los empates

Figura 6. Curvas ROC para valores séricos de SMRP, Fibulin-3 e YKL-40 en sujetos expuestos y no expuestos.

La comparación de las curvas ROC mostraron diferencias significativas entre Fibulin-3 e YKL-40 (diferencia de 0,233; $p=0,005$) y entre YKL-40 y SMRP (0,154; $p=0,028$), pero no así entre Fibulin-3 y SMRP (0,0794; $p=0,45$).

Según los análisis de regression lineal, la combinación de Fibulin e YKL-40 ($R^2=50\%$) es el que mejor predice la exposición al amianto junto a YKL-40 ($R^2=43\%$). Pero la áreas bajo la curva ROC conjunta no fue significativa (0,44; $p=0,41$).

6.3. DISCUSIÓN

Los sujetos expuestos a amianto mostraron concentraciones de SMRP, Fibulin-3 e YKL-40 más altos que los controles al igual que los resultados publicado en muchos estudios (103-105).

Las ABC obtenidas en este estudio oscilaron entre 0,75 y 0,98. Los intervalos de confianza del 95% que no incluyeron el cero, confirmaron la significación estadística de las curvas en todos los casos. El área bajo la curva indica la probabilidad de clasificar correctamente a sujetos a partir de los resultados de la prueba. Un área de igual a 1 indica una prueba diagnóstica perfecta, es decir diferencia a la perfección los sujetos expuestos a amianto de los no expuestos. Mientras que una prueba sin poder diagnóstico le correspondo un área igual a 0,5, es decir existiría la misma probabilidad de clasificar un expuesto como no expuesto que como expuesto. Por lo tanto, viendo nuestras ABC estamos ante curvas que se calificarían como buenas.

La mejor ABC lo mostró YKL-40 siendo el ABC de SMRP y de Fibulin-3 discretamente menores. Todas las curvas mostraron diferencias significativas entre ellas excepto Fibulin-3 y SMRP. Estos resultados no pudieron ser contrastados, porque en nuestro estudio estudiamos la sensibilidad de SMRP, Fibulin-3 e YKL-40 para diferenciar los sujetos expuestos de los no expuestos, a diferencia de la gran mayoría de los estudios, y como es lógico, el uso de la curva ROC es para evaluar la capacidad de diferenciar los casos de MPM de sujetos sanos u otras patologías pulmonares.

Respecto al tamaño de la muestra, se ha sugerido que para obtener conclusiones significativas, las curvas ROC deben realizarse para tamaños de muestra de al menos 100 observaciones (106). Debe existir un mínimo de 50 casos en cada uno de los grupos, de manera que 1 caso no representa más del 2% de las observaciones. Entendemos que el tamaño muestral empleado en nuestro estudio no es suficiente para generalizar los resultados obtenidos.

Aún así, mediante estos resultados se demuestra que estas biomarcadores pueden ser marcadores prometedores para ser utilizados en la vigilancia de los trabajadores expuestos al amianto.

7. OBJETIVO V

REALIZACIÓN DE LA ENCUESTA (EMPLEO-EXPOSICIÓN) PARA OTROS SECTORES INDUSTRIALES DEL PAÍS VASCO

Un total de 24 empresas de la CAPV inscritas en R.E.R.A. (Registro de Empresas con Riesgo por Amianto) o registradas como empresas con actividad en España, con alguna evidencia de uso del amianto, y ausentes del R.E.R.A fueron contactadas. Tras el contacto inicial por teléfono con la empresa, se hizo llegar una presentación del estudio a las personas encargadas del Servicio de Prevención por correo electrónico.

De las empresas contactadas solo 13 dieron una respuesta. La mayoría de las veces estas respuestas eran evasivas o muy incompletas, dejando ver que el amianto es un tema polémico en la actualidad. Sólo una empresa accedió a reunirse con nosotros y participar en el estudio, la empresa constructora ALTUNA Y URIA, S.A.

La primera reunión con dicha empresa se realizó en enero de 2015, en donde se presentó el estudio al Director de Prevención de Riesgos Laborales de la empresa, el cual mostró interés en colaborar en el estudio. Pero debido a su excesiva carga de trabajo, la siguiente reunión no se produjo hasta Octubre de 2015, con el consiguiente retraso en tiempo para gestionar su participación y llevar a cabo adecuadamente las tareas correspondientes que se han programado para antes de final de año.

Estos resultados, así pues, estarán disponibles antes de fin de año si se cumplen los objetivos temporales marcados en la colaboración con Altuna & Uria y los mismo se incluirán en una memoria actualizada a remitir con esta fecha.

Sin la colaboración de las empresas ha resultado imposible desarrollar plenamente el objetivo 1, “la realización de la encuesta (Empleo-Exposición) para otros sectores industriales del País Vasco, tales como industria naval, industria papelera,

construcción, etc.” del presente estudio.

La poca disposición para colaborar y compartir información de las empresas pone de manifiesto la dificultad de llevar a cabo un estudio de este tipo que garantice calidad científica.

8. OBJETIVO VI

ANÁLISIS DE LA ENCUESTA

El objetivo de este apartado consistió en evaluar el cuestionario que fue desarrollado en el marco del proyecto “MESOTELIOMA: Evaluación de la utilidad de un Marcador Tumoral en el seguimiento y estudio de la población expuesta al Amianto” (2013).

Para ello se recurrió al criterio de un experto, Antonio Agudo, doctor en medicina que comenzó a trabajar en la epidemiología del cáncer realizando estudios en cáncer de pulmón, mesotelioma y cáncer de cabeza y cuello, y que desde 1999 trabaja en el Instituto Catalán de Oncología (ICO). El motivo de que se recurriera a esta persona, además sus obvios conocimientos de la materia, fue porque la metodología empleada en el diseño de la encuesta se basó en su trabajo (3).

En nuestra encuesta las preguntas fueron basadas en las opiniones de los Médicos del Trabajo, expertos conocedores de la exposición a amianto en el ámbito laboral, variable que busca analizar la encuesta. Ellos mismos fueron quienes concluyeron la diversidad de situaciones de exposición al amianto en el pasado entre las diferentes empresas, como en la misma empresa, debido a las particularidades del trabajo, tarea, condiciones de trabajo, peligrosidad de la actividad desarrollada, etc. Por lo tanto cabe el riesgo de que esta encuesta sea específica para las empresas colaboradoras en el estudio y que no sea generalizable o transferible a otros contextos laborales.

En cuanto al diseño del estudio, a pesar de que en el estudio llevado a cabo desde ICO se clasificó la probabilidad e intensidad de la exposición laboral al amianto en cada participante, según el Dr. Aguado la encuesta era orientativa y la valoración final como sujeto expuesto al amianto la realizaba un grupo de expertos tras revisar las historias laborales detalladas de cada participante.

Sobre nuestra encuesta opinó que en el intento de perfeccionar y enriquecer la

puntuación del resultado facilitado por la encuesta mediante la asignación de diferente puntuación a cada pregunta según el nivel de riesgo y la frecuencia carecen de sentido. Recordar que en nuestra encuesta la puntuación asignada a cada tipo de pregunta va acorde con el nivel de riesgo que representan sus tareas (S<D<DE) igual que en caso de la frecuencia (N<E<R<O<F<D) y que combinando el riesgo de la tarea con su frecuencia se asigna al trabajador una puntuación no lineal, si no progresiva, que indica el nivel global de exposición.

Aunque sea un instrumento de recogida de información útil sobre las tareas desempeñadas a lo largo de la vida laboral, según él Dr. Agudo todo trabajador con historia médico-laboral de exposición a amianto será candidato a una vigilancia sanitaria específica, independientemente de la puntuación (según él innecesaria) obtenida en esta encuesta, porque aunque las dosis de exposición hayan sido bajas no existe un nivel de seguridad para la exposición al amianto. La correlación positiva ($p = 0,002$) obtenida entre la encuesta y el riesgo de exposición demuestran la utilidad de la encuesta para seleccionar los sujetos expuestos.

Aún así, el Dr. Agudo no duda de la factibilidad de su aplicación como herramienta de apoyo, por ser un método relativamente rápido y económico para aportar información que permita evaluar un sujeto como expuesto o no expuesto (sin tener en cuenta la puntuación) y orientar la toma de decisiones médicas, cuando resulte viable aplicar otras herramientas de evaluación disponibles.

8.1. CUESTIONARIO O BIOMARCADOR

Es evidente que la herramienta ideal sería aquel que realizase la valoración directa de la evaluación del riesgo. Mientras que las estimaciones de exposición realizadas mediante cuestionario estarán sujetas a diferentes tipos de error como lo serían la memoria de los participantes y la comprensión de las preguntas, en el caso de un biomarcador por ejemplo, las fuentes de error serían mínimas.

Además, una encuesta puede estar sujeta a sesgos de información, condicionando una sobre o subestimación de la exposición real. Existen varias situaciones que se pueden asociar con este sesgo. En la etapa de diseño del estudio se puede favorecer la introducción del sesgo cuando se decide recoger la información sobre la exposición después de que se han identificado los casos de mesotelioma y la presencia de la enfermedades relacionadas con el amianto modifica el reporte de la exposición (exagerándola o minimizándola). Algo similar sucedió en nuestro estudio, ya que tras la revisión de los datos obtenidos con la encuesta personal, las exposiciones teóricas no se correspondió con la realidad laboral de algunos trabajadores.

Ante este escenario, el uso de biomarcadores resultaría especialmente útil, aunque bien sabemos que su uso es aún de carácter limitado en el diagnóstico del mesotelioma.

9. CONCLUSIONES

1. Dado que el amianto es el factor etiológico principal de MPM , cohortes de vigilancia de los trabajadores del asbesto representan una población de estudio apropiado para la evaluación de los posibles factores de confusión de estos biomarcadores.
2. La consideración de la variación biológica de SMRP y Fibulin-3 en la interpretación de los resultados, mediante el valor de referencia del cambio (VRC), puede ser una herramienta eficaz para mejorar la selección de pacientes candidatos a una exploración más exhaustiva.
3. Sin embargo la utilización del VRC de YKL-40 no sería eficaz para la adecuada interpretación de los cambios debido a su alto VRC. De acuerdo a los coeficientes de variabilidad biológica y al II obtenidos, los valores de referencia poblacionales se consideran más útiles.
4. Aumentos en la concentración de SMRP por encima del VRC no muestran ninguna correlación con el riesgo de exposición. Los trabajadores más expuestos no muestran mayores incrementos que los menos expuestos.
5. La determinación en suero de SMRP, Fibulin-3 e YKL-40 tienen la capacidad selectiva para distinguir los sujetos expuestos de los no expuestos.
6. Los resultados del estudio presentan una aplicabilidad clínica limitada, por la falta de casos de MPM. Este hecho imposibilita conocer las características diagnósticas de las pruebas en relación con sus posibles aplicaciones clínicas.
7. Aunque el estudio de casos y controles siempre será una mejor opción, más simple y rápida de ejecutar y de menor costo que un estudio prospectivo,

quedaría por determinar en un estudio prospectivo, con una amplia cohorte de expuestos, cuál es la concentración de los biomarcadores que justificaría realizar alguna técnica que permitiera el diagnóstico precoz y definir qué papel puede tener la determinación de dichos biomarcadores en suero en el diagnóstico precoz del mesotelioma.

8. En la actualidad la poca disposición para colaborar y compartir información de las empresas pone de manifiesto la dificultad de llevar a cabo un estudio de este tipo que garantice calidad científica.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Becklake MR, Bagatin E, Neder J.A. Asbestos-related diseases of the lungs and pleura: uses, trends and management over the last century. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007; 11:356-69
2. Col legi d'aparelladors i Arquitectes Tècnics de Barcelona. Manual per a la Diagnosi i el Tractament de l'Amiant a la Construcció. Barcelona 1998.
3. Agudo A, Gonzalez CA, Bleda MJ, Ramirez J, Hernandez S, Lopez F, et al. Occupation and risk of malignant pleural mesothelioma: a case-control study in Spain. *Am J Ind Med.* 2000;37:159-68.
4. Peto J, Decarli A, La Vecchia C, Levi F, Negri E. . The European mesothelioma epidemic. *Br J Cancer.* 1999; 79:666-72.
5. Rodriguez Panadero F. Revisión y puesta al día en patología pleural. *Revista Española de Patología Torácica.* 2010;22(2):33-57.
6. Kettunen E, Nicholson AG, Nagy B, Wikman H, Seppänen JK, Stjernvall T, et al. . L1CAM, INP 10, P-cadherin, tPA and ITGB4 over-expression in malignant pleural mesotheliomas revealed by combined use of cDNA and tissue microarray. *Carcinogenesis.* 2005; 26:17-25
7. Wilson JMG, Jungner G. Principios y métodos del examen colectivo para identificar enfermedades. Cuadernos de Salud pública,nº34. Organización Munndial de la Salud. Ginebra, 1969.
8. Van Gelder T, Damhuis RA, Hoogsteden HC. Prognostic factors and survival in malignant pleural mesothelioma. *Eur Respir J* 1994; 7: 1035-1038
9. Curran D, Sahnoud T, Therasse P, Van Meerbeeck J, Postmus PE, Giaccone G. Prognostic factors in patients with pleural mesothelioma : the European Organization for Research and Treatment of Cancer experience. *J Clin Oncol* 1998; 16: 145-152
10. Rivera-Rivera S, Martinez Prieto M, Flores de la Torre CB. Historical perspective of the chemotherapy in malingnant pleural mesothelioma. Vol. 08. Núm. 01. Enero - Febrero 2009
11. VoGelzanG nJ, ruSThoVen JJ, SyManoWSki J, denhaM c, kaukel e, ruFFie P, et al. Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2636-44.
12. Green J, dunder y, dodd S, dickson r, Walley T. Pemetrexed disodium in combination with cisplatin *versus* other cytotoxic agents or supportive care for the treatment of malignant pleural mesothelio- ma. *Cochrane*

13. SuGarBaker dJ, FloreS rM, JakliTSch MT, richardS WG, STrauSS GM, corSon JM, et al. Resection margins, extrapleural nodal status, and cell type determine postoperative long-term survival in trimodality therapy of malignant pleural mesothelioma: results in 183 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 117: 54-65.
14. Su S. Mesothelioma: Path to Multimodality Treatment. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2009; 21: 125-31.
15. Weder W, oPiTz i, STahel r. Multimodality Strategies in Malignant Pleural Mesothelioma. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2009, 21: 172-76.
16. TilleMan T, richardS W, zelloS l, JohnSon B, JakliTSch M, Mueller J, et al. Extrapleural pneumonectomy followed by intracavitary intraoperative hyperthermic cisplatin with pharmacologic cytoprotection for treatment of malignant pleural mesothelioma: A phase II prospective study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009; 138: 405-11.
17. kruG l, PaSS h, ruSch V, kindler h, SuGar- Baker d, roSenzWeiG k, et al. Multicenter Phase II Trial of Neoadjuvant Pemetrexed Plus Cisplatin Followed by Extrapleural Pneumonectomy and Radiation for Malignant Pleural Mesothelioma. *J Clin Oncol* 2009; 27: 3007-13.
18. Creaney J, Francis RJ, Dick IM, et al. Serum soluble mesothelin concentrations in malignant pleural mesothelioma: relationship to tumour volume, clinical stage and changes in tumour burden. *Clin Cancer Res*. 2011; 17:1181-9.
19. Rodríguez Portal JA. Asbestos-related disease: screening and diagnosis. *Adv Clin Chem*. 2012; 57:163-85.
20. Pass HI, Levin SM, Harbut MR, et al. Fibulin-3 as a blood and effusion biomarker for pleural mesothelioma: *N Engl J Med* 2012;367:1417.
21. Agha MA, El-Habashy MM, El-Shazly RA (2014). Role of fibulin-3 in the diagnosis of malignant mesothelioma. *Egyptian J Chest Diseases Tuberculosis*, 63, 99-105.
22. Creaney J, Dick IM, Meniawy TM, et al. Comparison of fibulin-3 and mesothelin as markers in malignant mesothelioma. *Thorax*. 2014 Oct;69(10):895-902.
23. Corradi M, Goldoni M, Alinovi R, et al. YKL-40 and mesothelin in the blood of patients with malignant mesothelioma, lung cancer and asbestosis. *Anticancer Res*. 2013;33:5517-5524.
24. C. Alberti. From molecular imaging in preclinical/clinical oncology to theranostic applications in targeted tumor therapy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 16 (2012), pp. 1925-1933.

25. H. Zhang, M. Tian, E. Li, Y. Fujibayashi, L.H. Shen, D.J. Yang. Molecular imaging-guided theranostics and personalized medicine. *J Biomed Biotechnol*, 2012 (2012), pp. 747416.
26. S. Bidlingmaier, J. He, Y. Wang, F. An, J. Feng, D. Barbone. Identification of MCAM/CD146 as the target antigen of a human monoclonal antibody that recognizes both epithelioid and sarcomatoid types of mesothelioma. *Cancer Res*, 69 (2009), pp. 1570-1577.
27. Y. Hama, Y. Urano, Y. Koyama, M. Kamiya, M. Bernardo, R.S. Paik. A target cell-specific activatable fluorescence probe for in vivo molecular imaging of cancer based on a self-quenched Avidin-Rhodamine conjugate *Cancer Res*, 67 (2007), pp. 2791-2799.
28. V. Ntziachristos, C. Bremer, R. Weissleder. Fluorescence imaging with near-infrared light: New technological advances that enable in vivo molecular imaging. *Eur Radiol*, 13 (2003), pp. 195-208.
29. A.M. Morawski, P.M. Winter, K.C. Crowder, S.D. Caruthers, R.W. Fuhrhop, M.J. Scott. Targeted nanoparticles for quantitative imaging of sparse molecular epitopes with MRI. *Magn Reson Med*, 51 (2004), pp. 480-486.
30. T.K. Nayak, M. Bernardo, D.E. Milenic, P.L. Choyke, M.W. Brechbiel. Orthotopic pleural mesothelioma in mice: SPECT/CT and MR imaging with HER1- and HER2-targeted radiolabeled antibodies. *Radiology*, 26 (2013), pp. 173-182.
31. R.M. Ostroff, M.R. Mehan, A. Stewart, D. Ayers, E.N. Brody, S.A. Williams. Early detection of malignant pleural mesothelioma in asbestos-exposed individuals with a noninvasive proteomics-based surveillance tool. *PLoS One*, 7 (2012), pp. e46091.
32. F. Mundt, H.J. Johansson, J. Forshed, S. Arslan, M. Metintas, K. Dobra. Proteome screening of pleural effusions identifies galectin 1 as a diagnostic biomarker and highlights several prognostic biomarkers for malignant mesothelioma. *Mol Cell Proteomics*, 13 (2014), pp. 701-715.
33. J. Creaney, R.J. Francis, I.M. Dick, A.W. Musk, B.W. Robinson, M.J. Byrne. Identification of miRNA-103 in the cellular fraction of human peripheral blood as a potential biomarker for malignant mesothelioma—a serum soluble mesothelin concentrations in malignant pleural mesothelioma: Relationship to tumour volume, clinical stage and changes in tumour burden. *Clin Cancer Res*, 17 (2011), pp. 1181-1189.
34. Ordóñez NG. Application of mesothelin immunostaining in tumor diagnosis. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 1418-1428.
35. Robinson BWS, Creaney J, Lake R, Nowak A, Musk AW, de Klerk N et al. Mesothelin-family proteins and diagnosis of mesothelioma. *Lancet* 2003; 362: 1612-1616.

36. Scherpereel A, Grigoriu B, Conti M, Gey T, Gregoire M, Copin MC et al. Soluble mesothelin-related peptides in the diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 1155-1160.
37. Marini V, Michelazzi L, Cioe A, Fucile C, Spigno F, Robbiano L. Exposure to asbestos: correlation between blood levels of mesothelin and frequency of micronuclei in peripheral blood lymphocytes. *Mutat. Res.* 721(1), 114–117(2011).
38. Rodriguez Portal JA, Rodriguez BE, Rodriguez RD et al. Serum levels of soluble mesothelin-related peptides in malignant and nonmalignant asbestos-related pleural disease: relation with past asbestos exposure. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 18(2), 646–650 (2009).
39. Pass HI, Wali A, Tang N et al. Soluble mesothelin-related peptide level elevation in mesothelioma serum and pleural effusions. *Ann. Thorac. Surg.* 85(1), 265–272 (2008).
40. Park EK, Yates DH, Creaney J, Thomas PS, Robinson BW, Johnson AR. Association of biomarker levels with severity of asbestos-related diseases. *Saf. Health Work* 3(1), 17-21(2012).
41. Park EK, Sandrini A, Yates DH, Creaney J, Robinson BW, Thomas PS et al. Soluble mesothelin-related protein in an asbestos-exposed population: the dust diseases board cohort study. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178(8): 832-837.
42. V.W. Rusch, D. Giroux, C. Kennedy, E. Ruffini, A.K. Cangir, D. Rice. Initial analysis of the international association for the study of lung cancer mesothelioma database. *J Thorac Oncol*, 7 (2012), pp. 1631.
43. J.P. Van Meerbeeck, A. Scherpereel, V.F. Surmont, P. Baas. Malignant pleural mesothelioma: The standard of care and challenges for future management. *Crit Rev Oncol Hematol*, 78 (2011), pp. 92-111.
44. P.M. McCormack, F. Nagasaki, B.S. Hilaris, N. Martini. Surgical treatment of pleural mesothelioma. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 84 (1982), pp. 834-842.
45. Argraves WS, Greene LM, Cooley MA, Gallagher WM. Fibulins: physiological and disease perspectives. *EMBO Rep.* 4(12), 1127-1131 (2003).

46. Creaney J, Dick IM, Meniawy TM et al. Comparison of fibulin-3 and mesothelin as markers in malignant mesothelioma. *Thorax* 69(10), 895-902 (2014).
47. Pass HI, Levin SM, Harbut MR et al. Fibulin-3 as a blood and effusion biomarker for pleural mesothelioma. *N. Engl. J. Med.* 367(15), 1417-1427 (2012).
48. Agha MA, El-Habashy MM, El-Shazly RA (2014). Role of fibulin-3 in the diagnosis of malignant mesothelioma. *Egyptian J Chest Diseases Tuberculosis*, 63, 99-105.
49. Creaney J, Dick IM, Meniawy TM et al. Comparison of fibulin-3 and mesothelin as markers in malignant mesothelioma. *Thorax* 69(10), 895-902 (2014).
50. G.L. Chupp, C.G. Lee, N. Jarjour, Y.M. Shim, C.T. Holm, J.D. Dziura, J. Reed, A.J. Coyle, et al. A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. *N. Engl. J. Med.*, 357 (2007), pp. 2016–2027.
51. S. Letuve, A. Kozhich, N. Arouche, M. Grandsaigne, et al. YKL-40 is elevated in patients with chronic obstructive pulmonary disease and activates alveolar macrophages *J. Immunol.*, 181 (2008), pp. 5167–5173.
52. I.K. Choi, Y.H. Kim, J.S. Kim, J.H. Seo. High serum YKL-40 is a poor prognostic marker in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Acta Oncol.*, 49 (6) (2010 Aug), pp. 861–864.
53. I. Thöm, B. Andritzky, G. Schuch, I. Burkholder, L. Edler, J.S. Johansen, C. Bokemeyer, U. Schumacher, E. Laack. Elevated pretreatment serum concentration of YKL-40 – an independent prognostic biomarker for poor survival in patients with metastatic nonsmall cell lung cancer. *Cancer*, 116 (17) (2010 Sep 1), pp. 4114–4121.
54. A. Roslind, J.S. Johansen, I.J. Christensen, K. Kiss, E. Balslev, D.L. Nielsen, J. Bentzen, P.A. Price, E. Andersen. High serum levels of YKL-40 in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck are associated with short survival. *Int. J. Cancer*, 122 (4) (2008 Feb 15), pp. 857–863.
55. Corradi M, Goldoni M, Alinovi R, et al. YKL-40 and mesothelin in the blood of patients with malignant mesothelioma, lung cancer and asbestosis. *Anticancer Res.* 2013;33:5517-552.

56. Attia A, Rasmy A, Amin A, Alanazi M. Evaluation of pleural fluid YKL-40 as a marker of malignant pleural effusion. *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis* 03/2015.
57. Argimon Pallás J.M., Jiménez Villa J. *Métodos de Investigación Clínica y Epidemiológica*. 2ª ed. Madrid: Ediciones Harcourt, 2000.
58. Franko A, Dolzan V, Kovac V, Arneric N, Dodic-Fikfak M. Soluble mesothelin-related peptides levels in patients with malignant mesothelioma. *Dis Markers*. 2012;32:123–31.
59. Kovac V, Dodic-Fikfak M, Arneric N, Dolzan V, Franko A. Fibulin-3 as a biomarker of response to treatment in malignant mesothelioma. *Radiol Oncol*. 2015 Aug 21;49(3):279-85.
60. Pass HI, Levin SM, Harbut MR, et al. Fibulin-3 as a blood and effusion biomarker for pleural mesothelioma. *N Engl J Med*. 2012;367:1417–27.
61. Pass HI, Levin SM, Harbut MR, et al. Fibulin-3 as a blood and effusion biomarker for pleural mesothelioma. *N Engl J Med*. 2012;367:1417–27.
62. Weber DG, Taeger D, Pesch B, Kraus T, Bruning T, Johnen G. Soluble mesothelin-related peptides (SMRP)—High stability of a potential tumor marker for mesothelioma. *Cancer Biomark*. 2007;3(6):287.
63. Weber DG, Johnen G, Taeger D, et al. Assessment of confounding factors affecting the tumor markers SMRP, CA125, and CYFRA21-1 in serum. *Biomark Insights*. 2015:1-8.
64. Johansen JS, Hvolris J, Hansen M, et al. Serum YKL-40 levels in healthy children and adults. Comparison with serum and sinovial fluid levels of YKL-40 in patients with osteoarthritis of trauma of the knee joint. *Br J Rheumatol* 35:553-559,1996.
65. Rowe JW, Shock NW, De Fronzo RA. The influence of age on the renal response to water deprivation in man. *Nephron*, 17 (1976), pp. 270-8.
66. Baylis C, Corman B. The aging kidney: insights from experimental studies. *J Am Soc Nephrol*, 9 (1998), pp. 699-709).
67. Hillerdal G. Malignant mesothelioma 1982: review of 4710 published cases. *Br J Dis Chest*. 1983;77(4):321–43.
68. Frase CG, Harris EK. Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1989;27:409-37.

69. Fraser CG. Biological variation: from principles to practice. Whashington DC: AACCC Press; 2001.
70. Fraser CG. Biological variation: from principles to practice. Whashington DC: AACCC Press; 2001. Ricos C, Cava F, García-Lario JV, Hernández A, Iglesias N, Jiménez CV, et al. The reference change value a proposal to interpret laboratory reports in serial testing based on biological variation. *Scan J Clin Lab Invest* 2004;64:175-84.
71. Harris EK. Effects of intra and interindividual variation on the appropriate use of normal range. *Clin Chem* 1974; 20: 1535-42.
72. Kazakova M, Sarafian V. YKL-40 in health and disease:a challange for joint inflamation. *Biomed Rev* 2013,24:49-56.
73. Bojesen SE, Johansen JS, Nostegaard BG. Plasma YKL- 40 levels in healthy subjects from the general population. *Clin Chim Acta* 2011; doi: 10.1016/j.cca.2011.01.022.
74. Johansen JS, Lottenburger T, Nielsen HJ, Jensen JE, Svendsen MN, Kollerup G, et al. Weekly, and long-time variation in serum concentrations of YKL-40 in healthy subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 2603- 2608.
75. Gungen G, Ardic F, Findikoglu G, Rota S. The effect of mud pack therapy on serum YKL-40 and hsCRP levels in patients with knee osteoarthritis. *Rheumatol Int* 2009; doi 10.1007/s00296-010-1727-4.
76. Takahashi M, Naito K, Abe M, Sawada T, Nagano A. Relationship between radiographic grading of osteoarthritis and the biochemical markers for arthritis in knee osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2004; 6: 208-212.
77. Pass HI, Levin SM, Harbut MR, Melamed J, Chiriboga L, Donington J, Huflejt M, Carbone M, Chia D, Goodglick L, Goodman GE, Thornquist MD, Liu G, de Perrot M, Tsao MS, Goparaju C. Fibulin-3 as a blood and effusion biomarker for pleural mesothelioma. *N Engl J Med*. 2012 Oct 11;367(15):1417-27.
78. K. Hollevoet JB. Reitsma J. Creaney, et al. Serum mesothelin for diagnosing malignant pleural mesothelioma: an individual patient data meta-analysis. *J Clin Oncol*. 2012;30:1541-1549.
79. Fraser CG. Biological variation: from principles to practice Washington DC: AACCC Press; 2001.17.

80. Ricos C, Cava F, García-Lario JV, Hernández A, Iglesias N, Jiménez CV, et al. The reference change value a proposal to interpret laboratory reports in serial testing based on biological variation. *Scan J Clin Lab Invest.* 2004;64:175—84.
81. Mina A. A new quality control model using performance goals based on biological variation in External Quality Assurance Schemes. *Clin Chem Lab Med.* 2006;44:86–91.
82. Petersen PH, Fraser CG, Jorgensen L, Brandslund I, Stahl M, Gowans E, et al. Combination of analytical quality specifications based on biological within—and between—subject variation. *Ann Clin Biochem.* 2002;39:543–50.
83. Fraser CG, Harris EK. Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1989; 27: 409-37.
84. Sandra, Solari G; Manuela, Goycolea M; Luis, Villarroel D; Ilse, Urzúa F; Teresa, Beroíza W; Francisca, Ricci B; María E, Solovera R; José M, Clavero R. Determinación de péptidos solubles relacionados a mesotelina para la detección precoz del mesotelioma maligno / Soluble mesothelin-related protein for malignant pleural mesothelioma screening. *Rev. chil. enferm. respir.*; 28(3); 182-188; 2012-09.
85. Linch, M., Gennatas, S., Kazikin, S. et al, A serum mesothelin level is a prognostic indicator for patients with malignant mesothelioma in routine clinical practice. *BMC Cancer.* 2014;14:674.
86. Park EK, Thomas PS, Creaney J, Johnson AR, Robinson BW, Yates DH. Factors affecting soluble mesothelin related protein levels in an asbestos-exposed population. *Clin Chem Lab Med.* 2010;48:869-874.
87. Felten MK1, Khatab K, Knoll L, Schettgen T, Müller-Berndorff H, Kraus T. Changes of mesothelin and osteopontin levels over time in formerly asbestos-exposed power industry workers. *Int Arch Occup Environ Health.* 2014 Feb;87(2):195-204.
88. Creaney J, Olsen NJ, Brims F, et al. Serum mesothelin for early detection of asbestos-induced cancer malignant mesothelioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prec.* 2010;19:2238-2246.
89. Robinson BW, Creaney J, Lake R, et al. Mesothelin-family proteins and diagnosis of mesothelioma. *Lancet.* 2003;362:1612-6.

90. Creaney J, Olsen NJ, Brims F, et al. Serum mesothelin for early detection of asbestos-induced cancer malignant mesothelioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prec.* 2010;19:2238-2246.
91. Park EK, Thomas PS, Creaney J, Johnson AR, Robinson BW, Yates DH. Factors affecting soluble mesothelin related protein levels in an asbestos-exposed population. *Clin. Chem. Lab. Med.* 48(6), 869-874 (2010).
92. Park EK, Wilson D, Yates DH. A predictive equation to adjust for clinical variables in soluble mesothelin-related protein (SMRP) levels. *Clin. Chem. Lab. Med.* 50(12), 2199-2204 (2012).
93. Weber DG, Johnen G, Taeger D, Weber A, Gross IM, Pesch B et al. Assessment of confounding factors affecting the tumor markers SMRP, CA125, and CYFRA21-1 in Serum. *Biomarker Insights* 5, 1-8 (2010).
94. Creaney J, Christansen H, Lake R, Musk AB, deKlerk N, Robinson BW. Soluble mesothelin related protein in mesothelioma. *J Thorac Oncol* 2006;1:172-4.
95. Pass HI, Wali A, Tang N, Ivanova A, Ivanov S, Harbut M. Soluble Mesothelin Related Peptide Level Elevation in Mesothelioma Serum and Pleural Effusions. *Ann Thorac Surg* 2008; 85: 265-72.
96. Pass HI, Carbone M. Status of Screening for Malignant Pleural Mesothelioma. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2009; 21: 97-104.
97. Robinson B, Creaney J, Lake R, Nowak A, Musk A, De-Klerk N. Soluble mesothelin related protein A blood test for mesothelioma. *Lung Cancer* 2005; 49S1: S109-111.
98. Creaney J, Yeomand D, Demekler Y, Segal A, Musk A, Skates S. Comparison of osteopontin, megakaryocyte potentiating factor, and mesothelin proteins as markers in the serum of patients with malignant mesothelioma. *J Thorac Oncol* 2008; 3: 851-7.
99. Rodríguez J, Rodríguez E, Rodríguez D, Michavila A, Martínez Q, Roza D. Serum Levels of Soluble Mesothelin-Related Peptides in Malignant and Nonmalignant Asbestos-Related Pleural Disease: Relation with Past Asbestos Exposure. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18:645-50.
100. Creaney J, Yeomand D, Demekler Y, Segal A, Musk A, Skates S. Comparison of osteopontin, megakaryocyte potentiating factor, and mesothelin proteins as markers in the serum of patients with malignant mesothelioma. *J Thorac Oncol* 2008; 3: 851-7.
101. Ai Cui, Xiao-Guang Jin, Kan Zhai, Zhao-Hui Tong, Huan-Zhong Shi. Diagnostic values of soluble mesothelin-related peptides for malignant

pleural mesothelioma: updated meta-analysis. *BMJ Open* 2014;4:e004145.

102. Zweig MH1, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem.* 1993 Apr;39(4):561-77.
103. Rodríguez Portal JA1, Rodríguez Becerra E, Rodríguez Rodríguez D, Alfageme Michavila I, Quero Martínez A, Diego Roza C, León Jiménez A, Isidro Montes I, Cebollero Rivas P. Serum levels of soluble mesothelin-related peptides in malignant and nonmalignant asbestos-related pleural disease: relation with past asbestos exposure. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009 Feb;18(2):646-50.
104. Agha MA, El-Habashy MM, El-Shazly RA (2014). Role of fibulin-3 in the diagnosis of malignant mesothelioma. *Egyptian J Chest Diseases Tuberculosis*, 63, 99-105.
105. Corradi M1, Goldoni M, Alinovi R, Tiseo M, Ampollini L, Bonini S, Carbognani P, Casalini A, Mutti A. YKL-40 and mesothelin in the blood of patients with malignant mesothelioma, lung cancer and asbestosis. *Anticancer Res.* 2013 Dec;33(12):5517-24.
106. Metz CE. Basic principles of ROC analysis. *Semin Nucl Med.* 1978 Oct;8(4):283-98.