

# Prueba de Aliento Rápida tipo “Point-of-Care” (Punto de Atención) para Biomarcadores de Cáncer de Mama y Mamografías Anormales

Michael Phillips<sup>1,2\*</sup>, J. David Beatty<sup>3</sup>, Renee N. Cataneo<sup>1</sup>, Jan Huston<sup>4</sup>, Peter D. Kaplan<sup>1</sup>, Roy I. Lalisang<sup>5</sup>, Philippe Lambin<sup>6</sup>, Marc B. I. Lobbes<sup>7</sup>, Mayur Mundada<sup>1</sup>, Nadine Pappas<sup>8</sup>, Urvish Patel<sup>1</sup>

1 Laboratorio de Investigación del Aliento (Breath Research Laboratory), Menssana Research Inc., Newark, Nueva Jersey, Estados Unidos de América, 2 Departamento de Medicina, Colegio Médico de Nueva York (Department of Medicine, New York Medical College), Valhalla, New York, Estados Unidos de América, 3 Instituto Sueco del Cáncer (Swedish Cancer Institute), Seattle, Washington, Estados Unidos de América, 4 [Hospital] HackensackUMC Mountainside, Montclair, Nueva Jersey, Estados Unidos de América, 5 División de Oncología, Departamento de Medicina Interna, Escuela “GROW” de Oncología y Biología de Desarrollo (GROW School of Oncology and Developmental Biology), Centro Médico de la Universidad de Maastricht, Maastricht, Países Bajos, 6 Departamento de Radioterapia (MAASTRO), Escuela “GROW” de Oncología y Biología de Desarrollo (GROW School of Oncology and Developmental Biology), Centro Médico de la Universidad de Maastricht, Maastricht, Países Bajos, 7 Departamento de Radiología, Escuela “GROW” de Oncología y Biología de Desarrollo (GROW School of Oncology and Developmental Biology), Centro Médico de la Universidad de Maastricht, Maastricht, Países Bajos, 8 Saint Michael’s Medical Center, Newark, Nueva Jersey, Estados Unidos de América

## Resumen

**Antecedentes:** Estudios anteriores han reportado que compuestos volátiles orgánicos (VOCs) del aliento actúan como biomarcadores de cáncer de mama y mamografías anormales, aparentemente como resultado de un esfuerzo oxidativo incrementado e inducción de citocromo p450. Nosotros evaluamos una prueba de aliento tipo “point-of-care” de seis minutos para Biomarcadores VOC en mujeres cribadas en base a criterio de cáncer de mama en centros médicos de los Estados Unidos y Holanda.

**Métodos:** 244 mujeres fueron sometidas a una mamografía de cribado (93/37 normal/anormal) o biopsia de mama (con cáncer/sin cáncer 35/79). Se recolectaron y concentraron VOCs del aire y aliento mediante un sistema móvil tipo “point-of-care” para hacer análisis con cromatografía de gas y detección de onda acústica superficial. Los cromatogramas fueron segmentados en una serie temporal de gradientes alveolares (aliento menos aire del ambiente). Los gradientes alveolares segmentarios fueron clasificados como candidatos a biomarcadores utilizando el valor “estadístico-C” (área bajo la curva (AUC) de la curva ROC (curva Característica Operativa del Receptor). Se construyeron algoritmos predictivos multivariados utilizando biomarcadores significativos que fueron identificados con múltiples simulaciones usando el método Monte Carlo y sometidas a validación cruzada con un procedimiento LOO (“Dejando uno Fuera”).

**Resultados:** El desempeño de los algoritmos de biomarcador de aliento fue determinado en tres grupos: “con cáncer de mama” en la biopsia vs. mamografías de cribado normales (81.8% sensibilidad, 70.0% especificidad, exactitud 79% (73% en LOO) (Valor estadístico-C), valor predictivo negativo 99.9%); mamografías de cribado normales vs. anormales (86.5% sensibilidad, 66.7% especificidad, exactitud 83%, 62% en LOO); y “con cáncer” vs. “sin cáncer” en la biopsia de mama (75.8% sensibilidad, 74.0% especificidad, exactitud 78%, 67% en LOO).

**Conclusiones:** Un estudio piloto de prueba de aliento tipo “point-of-care” de seis minutos identificó con exactitud a las mujeres con cáncer de mama y con mamografías anormales. La prueba de aliento tiene el potencial de reducir la cantidad de mamografías no necesarias sin pérdida de sensibilidad de diagnóstico.

**Referencia:** Phillips M, Beatty JD, Cataneo RN, Huston J, Kaplan PD, et al. (2014) Prueba de Aliento tipo “Point-of-Care” (punto de atención) Rápida para Biomarcadores de Cáncer de Mama y Mamografías Anormales (Rapid Prueba de aliento tipo “Point-of-care” for Biomarkers of Breast Cancer and Abnormal ). PLoS ONE 9(3): e90226. doi:10.1371/journal.pone.0090226

**Editor:** Syed A. Aziz, Departamento de Salud del Canadá (Health Canada) y Universidad de Ottawa, Canadá

**Recibido el** 6 de Diciembre del 2013; **Aceptado el** 31 de Enero de 2014; **Publicado el** 5 de Marzo de 2014

**Derechos reservados:** © 2014 Phillips et al. Este artículo es de acceso abierto bajo los términos de la “Licencia de Atribución de Creative Commons”, la que autoriza uso, distribución, y reproducción sin restricciones por cualquier medio, en el entendido que el autor y fuente original serán citados.

**Financiamiento:** Este proyecto fue financiado parcialmente por los Institutos Nacionales de Salud (National Institutes of Health), subvención No. 1R43RR030689-01. En los Países Bajos, este proyecto fue financiado parcialmente por la fundación “Dutch Pink Ribbon” y por la fundación del ámbito de CTMM (proyecto “AIRFORCE”, subvención 030-103). Las entidades que otorgaron financiamiento no tienen ningún rol en el diseño, recolección y análisis de datos, decisión de publicar, o elaboración del manuscrito del estudio.

**Conflicto de Intereses:** Michael Phillips es Presidente y Director General de Menssana Research, Inc., que desarrolla y obtiene patentes de pruebas de aliento para biomarcadores de padecimientos. Renee N Cataneo, Peter D Kaplan, Mayur Mundada y Urvish Patel [quienes] son o fueron empleados de Menssana Research, Inc. Schmitt & Associates, Newark, NJ, analizaron los datos. Lo anterior no altera nuestra adhesión a las políticas de PLOS ONE en relación a la publicación de datos y materiales.

\* E-mail: mphilips@menssana-research.com

## Introducción

El Cáncer de mama es el tipo de cáncer más comúnmente diagnosticado en las mujeres, y es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres después del cáncer de pulmón [1]. El Instituto Nacional del Cáncer (NCI) estima que más de 232,000 mujeres en los EU serían diagnosticadas con cáncer de mama en el 2013 y cerca de 40,000 morirán de esta enfermedad [2]. Para reducir la cantidad de muertes por cáncer de mama, muchos países han establecido programas de mamografías para detectar y tratar el cáncer en una etapa temprana [3]. Sin embargo, la mamografía de cribado ha sido asociada con un riesgo incrementado de cáncer de mama inducido por radiación, así como diagnóstico excesivo y

tratamiento excesivo [4,5]. Muchas mujeres deciden no hacer la prueba aunque esté fácilmente disponible y la mamografía de cribado frecuentemente es sub-utilizada. Varios factores pueden influenciar esta decisión, incluyendo miedo de dolor y a la exposición a la radiación, así como razones étnicas, pobreza y nivel de educación [6–9].

Estas limitaciones de la mamografía de cribado han estimulado la búsqueda de nuevas herramientas para identificar cáncer de mama en etapa temprana sin incomodidades o riesgo [10]. Los miembros de nuestro grupo previamente reportaron una prueba de aliento para compuestos orgánicos volátiles (VOCs) usando cromatografía de gas (GC) y espectrometría de masa (MS) que identificaron biomarcadores sensibles y específicos de cáncer

de mama. Modelos multivariantes con tan solo cinco VOCs de aliento predijeron con exactitud la presencia o ausencia de cáncer de mama [11–13]. Otros investigadores también han reportado evidencia de Biomarcadores de Cáncer de Mama en VOCs de aliento siguiendo una variedad de enfoques diferentes, incluyendo GC MS [14–16], condensado de aliento exhalado [17], nariz electrónica [18–21], y perros entrenados para detectar sustancias [22,23].

En años recientes, el valor clínico de las pruebas de aliento ha crecido en reconocimiento para otras aplicaciones como por ejemplo las pruebas de aliento con urea para la detección de Infecciones de *Helicobacter pylori* y concentraciones de óxido nítrico en el aliento para monitoreo de la gravedad del asma bronquial [24]. Estudios clínicos también han demostrado Biomarcadores VOC en el aliento para otros padecimientos, incluyendo cáncer de pulmón [25,26], tuberculosis pulmonar [27,28], exposición a la radiación [29], y rechazo de trasplante de corazón [30].

El objetivo de este estudio fue probar la hipótesis de que una Prueba de Aliento tipo “Point-of-Care” (punto de atención) Rápida puede detectar Biomarcadores de Cáncer de Mama en el Aliento. Hicimos la prueba de esta hipótesis en un estudio clínico con varios centros médicos del sistema “BreathLink” Que recolecta, concentra y prueba VOCs de aliento en aproximadamente seis minutos. Previamente se reportó que el sistema “BreathLink” identificó biomarcadores en el aliento para tuberculosis pulmonar activa [31].

## Materiales y Métodos

### Sitios Clínicos

En el estudio participaron tres centros de tratamiento de cáncer de mama, a saber: El “Saint Michael’s Medical Center”, de Newark, NJ, El Centro Médico Sueco (Swedish Medical Center), de Seattle, WA, y el Centro Médico de la Universidad de Maastricht, de Maastricht, Países Bajos.

### Consentimiento explícito y aprobación de IRB

La Junta de Revisión Institucional (IRB) de todos los sitios colaboradores aprobaron la investigación. Todos los miembros de las mismas otorgaron su consentimiento informado firmado para la participación.

### Sujetos humanos

Se estudiaron dos grupos de sujetos.

**a. Mujeres saludables asistiendo a una mamografía de cribado.** Se incluyó a los sujetos que fueran mujeres, edad de 18 años o más, que entendieran el estudio, que estuvieran dispuestas a dar consentimiento informado firmado para participar, y que pudieran donar una muestra de aliento durante un período de 7 días antes de la mamografía de cribado. Se excluyó a los sujetos que tuvieran un historial de cáncer de mama, cáncer en cualquier otro sitio, biopsia de mama, mamografía anormal o masa palpable en la mama. La población de cribado en la Universidad de Maastricht con mamografía negativa incluyendo un subconjunto de mujeres con riesgo incrementado de desarrollar cáncer de mama a causa de positividad de BRCA 1 ó 2, o alta incidencia de cáncer de mama en la familia sin mutación conocida.

**b. Mujeres con una mamografía de cribado anormal referida para biopsia de mama.** Se incluyó a los sujetos de sexo femenino, de al menos 18 años de edad, que entendieran el estudio, que estuvieran dispuestas y pudieran dar consentimiento informado firmado para participar, y que fueron referidas para biopsia de mama por un mamograma de cribado anormal (BIRADS 3–5) o una masa palpable en la mama.

### Prueba de aliento tipo “Point-of-care”

El sistema BreathLink se describió previamente [31]. En resumen, los sujetos utilizaron un clip de nariz y respiraron normalmente por 2.0 minutos, inhalando aire del ambiente a través de una boquilla con válvula, y exhalando dentro de un depósito de aliento. Un filtro microbiológico evitó la contaminación del depósito (eficiencia >99.9% para bacterias y >99.8% para virus) (Marca Vital Signs, Totowa, NJ). La boquilla

y filtro fueron descartados después de un solo uso; presentaron poca resistencia a la exhalación, para que los sujetos pudieran donar muestras de aliento sin esfuerzo o incomodidad. Se bombearon los VOCs de aliento alveolar desde el depósito de aliento a través de una trampa absorbente en donde se capturaron y concentraron. Se recolectaron VOCs en un volumen similar de aire ambiental por separado y se concentraron de la misma manera. Los VOCs de aliento fueron analizados con un cromatógrafo de gases portátil (GC) conectado a un detector de onda acústica superficial (SAW). El analizador se calibró diariamente con un estándar externo, una mezcla de n-alcalinos C6 a C22 (Restek Corporation, Bellefonte, PA 16823, USA). Cada prueba de aliento comprendió recolección y análisis de muestras separadas de aire ambiental y de aliento. El tiempo desde el inicio de la recolección de aliento hasta la terminación del análisis GC fue seis minutos. Los archivos con datos cromatográficos anónimos y formatos electrónicos de reporte de casos se almacenaron localmente en el BreathLink, luego se encriptaron y transmitieron por internet al servidor en el Laboratorio de Investigación del Aliento de Menssana (Menssana Breath Research Laboratory) en Newark, NJ, USA, en donde fueron descifrados y almacenados para análisis.

### Análisis de datos

Los cromatogramas y resultados de mamografías y biopsias se transmitieron a Schmitt & Associates, Newark, NJ, quienes analizaron todos los datos de forma independiente y sin participación por parte de los patrocinadores del estudio. Los principios del método se describen en la referencia [32]. En resumen, cada cromatograma fue convertido en una serie de puntos de datos derivados de la señal de detector SAW (3013 escaneos/min) luego se determinó el gradiente alveolar (es decir, abundancia en el aliento alveolar menos abundancia en el aire ambiental) [31].

### Identificación de biomarcadores y construcción de algoritmo predictivo

Se identificaron los biomarcadores y se desarrollaron los algoritmos independientemente en tres grupos: mujeres con cáncer de mama en la biopsia en comparación con las mujeres con mamografías de cribado normales, mamografías de cribado normales vs. anormales (BIRADS 1–2 vs. BIRADS 3–6), y “con cáncer” vs. “sin cáncer” en la biopsia de mama. Los métodos se describieron previamente [32]. En resumen, los cromatogramas fueron permutados utilizando simulaciones Monte Carlo múltiples para identificar los segmentos pico cromatográficos que identificaron el padecimiento con exactitud mayor a la aleatoria. Los gradientes alveolares de todos los segmentos pico cromatográficos se compararon en grupos de control y con padecimiento y se clasificaron como biomarcadores candidatos de acuerdo a sus valores de estadístico-C, es decir, el AUC de la

**Tabla 1.** Características de los pacientes.

<b>Grupo de mamografía de cribado (n=130)</b>	
Normal (BIRADS 1–2)	93
Anormal (BIRADS 3–6)	37
<b>Grupo de biopsia de mama (n=114)</b>	
<b>Cáncer negativo</b>	<b>79</b>
<b>Cáncer positivo</b>	<b>35</b>
Carcinoma ductal invasivo	20
Carcinoma ductal in situ	8
Carcinoma lobular invasivo	5
Carcinoma sacromatoide	1
Lesión papilar atípica	1

doi:10.1371/journal.pone.0090226.t001

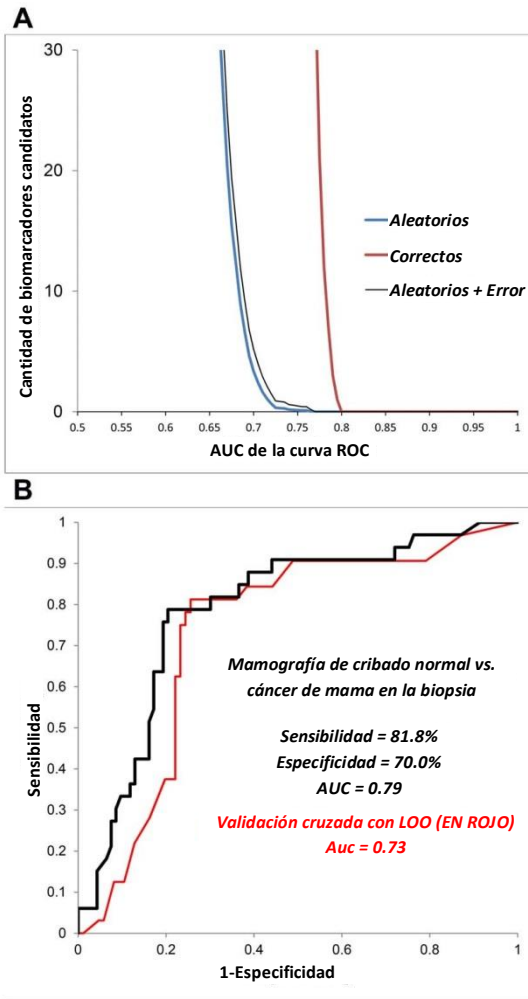


Figura 1. Resultado de prueba de aliento en mujeres saludables (mamografía de cribado normal) vs. mujeres con biopsia de mama positiva para identificación de cáncer con biomarcadores de aliento (cuadro superior): Se obtuvo una lista de candidatos a biomarcadores de aliento para el padecimiento al segmentar los cromatogramas en una serie temporal de gradientes alveolares, en donde el gradiente alveolar incluyó la respuesta del detector en el aliento menos la respuesta correspondiente en el aire ambiental. Se cuantificó la exactitud de diagnóstico de cada biomarcador candidato como el área bajo la curva (AUC) de su curva Característica Operativa del Receptor (curva ROC) asociada. Esta figura despliega la cantidad de candidatos a biomarcadores (eje-y) como función de su exactitud diagnosticada (eje-x). La curva "correcta" utilizó la asignación correcta de diagnóstico (mamografía normal o cáncer en la biopsia). La curva "aleatoria" utilizó múltiples simulaciones Monte Carlo incluyendo 40 asignaciones aleatorias de diagnóstico con la finalidad de determinar el comportamiento aleatorio de cada candidato a biomarcador. La separación horizontal entre las curvas "correcta" y "aleatoria" varía con la cantidad de información de diagnóstico en la señal de aliento. Cuando la cantidad en la curva "aleatoria" disminuye <1, su distancia vertical desde la curva "correcta" identifica el número excesivo de candidatos a biomarcadores que identifican al grupo de padecimiento con exactitud mayor a la aleatoria. La cantidad de biomarcadores aparentes con exactitud mayor a la aleatoria excedió 30, pero algunos segmentos estuvieron cercanamente adyacentes en una serie temporal, consistentes con aproximadamente 10 picos de biomarcador en el cromatograma. También se realizaron análisis similares en las mamografías de cribado normales vs. anormales y "con cáncer" vs. "sin cáncer" en la biopsia de mama para desarrollar algoritmos independientes. Exactitud de diagnóstico de la prueba de aliento (cuadro inferior): La curva ROC muestra la exactitud de la prueba de aliento para distinguir a mujeres saludables con mamografías de cribado normal de aquellas mujeres cuya biopsia de mama fue positiva para el cáncer. La prueba de aliento usó un algoritmo multivariable predictivo derivado de los biomarcadores con

exactitud mayor a la aleatoria que fueron identificados en las simulaciones Monte Carlo en el cuadro izquierdo. Los valores de Sensibilidad y especificidad se determinaron a partir del punto en la curva ROC en el que su suma fue máxima. La curva ROC en rojo muestra la validación cruzada de los resultados pronosticados. Se utilizó un método LOO ("dejar uno fuera") para estimar el error de predicción (método descrito en el texto).  
doi:10.1371/journal.pone.0090226.g001

curva Característica Operativa (curva ROC) [33]. La distribución estadística subyacente de cada segmento pico cromatográfico se determinó con múltiples simulaciones Monte Carlo permutando sujetos aleatoriamente entre los grupos con padecimiento y de control, y realizando 40 estimados del valor estadístico-C. Las diferencias entre los valores de estadístico-C obtenidos con diagnósticos correctos y las estadísticas obtenidas con permutaciones aleatorias de diagnósticos identificaron los segmentos pico cromatográficos que fueron biomarcadores aparentes, porque identificaron el grupo de padecimiento con exactitud mejor que la aparente [34,35]. Los segmentos pico cromatográficos identificados como biomarcadores de padecimiento se emplearon para construir un algoritmo predictivo multivariable con análisis digital ponderado (WDA) [36].

#### Validación cruzada de resultados pronosticados

Se utilizó un método de validación cruzada LOO ("dejar uno fuera") para proporcionar un estimado robusto y conservador del error de predicción [37]. Se retiró un sujeto a la vez del conjunto total de datos, y el conjunto restante se utilizó para derivar un algoritmo empleando múltiples simulaciones Monte Carlo y WDA como se describe anteriormente. El sujeto "dejado fuera" se usó para calcular el valor discriminante en base al algoritmo, los resultados de todos los sujetos fueron combinados en una curva ROC

## Resultados

### Sujetos humanos

244 sujetos cumplieron con los criterios de reclutamiento y suministraron cromatogramas de aliento técnicamente útiles. Sus características se muestran en la Tabla 1. No se reportaron efectos adversos de la prueba de aliento.

**Identificación de biomarcadores y construcción de algoritmos predictivos.** Después de la recolección de múltiples señales de un solo biomarcador generadas por escaneos de detector SAW adyacentes, se detectaron menos de diez biomarcadores significativos en cada grupo de comparación.

**Mujeres con cáncer de mama en la biopsia vs. mujeres con mamogramas de cribado normales (BIRADS 1–2 vs. BIRADS 3–6).** La Figura 1 muestra los resultados de las Simulaciones Monte Carlo en el cuadro superior, y el desempeño de los algoritmos de biomarcador de aliento en el panel intermedio: 81.8% sensibilidad,

70.0% especificidad, 79% exactitud (Valor Estadístico-C). La validación cruzada de los resultados pronosticados del cuadro inferior muestra la curva LOO ROC con AUC = 0.73.

**Mujeres con mamografías de cribado normal vs. anormal.** La Figura 2 (panel izquierdo) muestra la Curva ROC con sensibilidad = 86.5%, especificidad = 66.7%, y AUC = 0.83; El AUC de la Curva ROC LOO fue 0.62.

**Mujeres con cáncer vs. sin cáncer en la biopsia de mama.** La Figura 2 (panel derecho) muestra la Curva ROC con sensibilidad = 75.8%, especificidad = 74.0% y AUC = 0.78; El AUC de la Curva ROC LOO fue 0.67.

**Resultado esperado del cribado.** La Tabla 2 muestra el resultado esperado de cribar un millón de mujeres de los E.U. para cáncer de mama con la prueba de aliento. Estas predicciones usan las siguientes premisas: Sensibilidad de prueba = 81.8%, especificidad

= 70.0% (Figura 1) y predominio de 3.95 casos de cáncer de mama por cada 1000 mamografías de cribado [38].

## Discusión

Este estudio puso a prueba la hipótesis de que una prueba rápida de aliento tipo "Point-of-care" puede detectar biomarcadores de aliento de Cáncer de Mama. El mayor hallazgo del grupo de estudio fue que la prueba identificó a mujeres con cáncer de mama con una exactitud del 79%. La prueba de aliento también distinguió entre las mamografías normales y las mamografías anormales con una exactitud del 83% y entre las biopsias de mama con lectura positiva o negativa para cáncer con una exactitud del 78%.

La hipótesis fue confirmada por la consistencia de estos hallazgos y por reportes anteriores de pruebas de aliento hechas en laboratorio utilizando GC MS que identificaron biomarcadores de aliento de Cáncer de Mama y mamografías anormales [11–13]. La exactitud de las pruebas de aliento rápidas tipo "point-of-care" fue comparable a la mamografía de cribado con imágenes digitales o en película (78% y 74% de exactitud respectivamente) [39]. El punto fundamental de diferencia entre las pruebas es que la mamografía detecta una anatomía alterada, mientras que las pruebas de aliento detectan una bioquímica alterada.

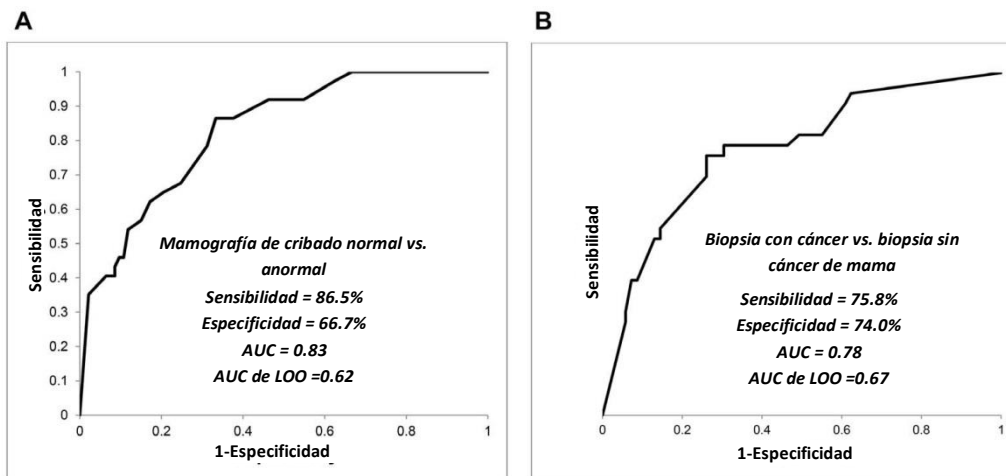
La hipótesis se apoya además en la base teórica en la biología. Los biomarcadores de Cáncer de Mama en el aliento se han relacionado con estrés oxidativo en el tejido del cáncer de mama, en donde un fenotipo activado en los fibroblastos del estroma causa una secreción incrementada de peróxido de hidrógeno, un poderoso oxidante [40]. El estrés oxidativo se acompaña por la producción incrementada de especies de oxígeno reactivo peroxidan los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas de las células, liberando alcalinos como por ejemplo los derivados del pentano y alcano, los cuales son exhalados en el aliento [15] [41,42]. Adicionalmente, la abundancia de los VOCs en el aliento puede modularse por medio de la inducción de oxidasa mixta de citocromo p450 polimórfica como por ejemplo las enzimas CYP2E1 [43]. El Cáncer de mama está acompañado por regulación ascendente de algunas enzimas de citocromo p450 incluyendo aromatasa, que incrementan la concentración de estradiol en el tejido y activa una gran cantidad de genes carcinogénicos a través del alfa-receptor de estrógeno en células epiteliales malignas [44]. Estas enzimas reguladas ascendentemente del citocromo p450 también pueden acelerar la degradación de los VOCs endógenos circulantes, causando cambios detectables en la composición del aliento. El efecto del tamaño o

la etapa del tumor no fue analizada en este reporte porque la cantidad total de casos de cáncer fue demasiado pequeña para permitir una estratificación estadísticamente significativa de los datos.

Nuestros reportes previos de biomarcadores de aliento de Cáncer de Mama identificaron VOCs candidatos con GC MS. Los Biomarcadores VOC principales incluyeron alcanos y derivados del alcano p.ej. tridecano, tetradecano y dodecano, 2,7,10- trimetil, Todos los cuales fueron consistentes con los productos corriente abajo de la peroxidación de lípidos inducida por el estrés oxidativo [13]. Los candidatos a biomarcadores también incluyeron varios derivados de benceno cuyo origen no se conoce. En este estudio se empleó una prueba rápida de aliento tipo "point-of-care" utilizando cromatografía de gases con un detector de ondas acústicas de superficie (GC SAW) el cual se reportó previamente haber identificado biomarcadores en el aliento para tuberculosis pulmonar [31]. La ventaja principal de GC SAW sobre GC MS es su aptitud para prueba de aliento tipo "Point-of-care" por su rapidez, robustez, facilidad de uso y menor costo. Sin embargo, el detector SAW responde únicamente a la masa de los VOCs en el aliento y a diferencia de MS, no proporciona información sobre su estructura química. Los estudios futuros se centrarán en la determinación de los índices Kovats (es decir, tiempos de retención cromatográficos relativos) de los biomarcadores de aliento VOC observados con GC SAW, para correlacionar los biomarcadores con los que se observaron utilizando GC MS.

Como se muestra en la Tabla 3, otros investigadores también han reportado biomarcadores de aliento VOC de Cáncer de Mama consistentes con los productos de estrés oxidativo p.ej. pentano. Cuando se han reportado otros Biomarcadores VOC de Cáncer de Mama en el aliento, estas diferencias pueden haber surgido en parte por el artefacto de análisis con 1D GC MS. La separación VOC del aliento con una nueva técnica, GC Bidimensional, resuelve diez veces más picos que 1D GC, es decir 2,000 VOCs en una muestra vs. 200 [45]. Es posible que muchos biomarcadores VOC en el aliento aparentemente "puros" que fueron observados usando 1D GC MS fueran realmente mezclas co-eluyentes de varios VOCs diferentes p.ej. el hexano de aliento observado con 1D GC MS se resolvió, por medio de GC Bidimensional, en una mezcla de siete VOCs diferentes que incluyeron hexano y otros seis VOCs. Por lo tanto, los estudios anteriores que utilizaron 1D GC MS pueden haber reportado equivocadamente la estructura química de aparentes Biomarcadores de Cáncer de Mama.

Los ensayos modernos de aliento con tecnologías altamente selectivas pueden detectar más de 2,000 VOCs diferentes en una sola muestra de



**Figura 2. Resultados de la prueba de aliento en mamografía de cribado y biopsia de mama.** La identificación de biomarcadores de aliento, la determinación de exactitud de diagnóstico de la prueba de aliento, y la validación cruzada LOO de resultados pronosticados se realizaron en la misma forma que en la descripción de la Figura 1. Los valores de Sensibilidad y especificidad se determinaron a partir del punto de la curva ROC en el cual su suma fue máxima. El cuadro izquierdo muestra la comparación entre mujeres con mamografía de cribado normal y anormal, y el cuadro de la derecha muestra la comparación de mujeres con cáncer y sin cáncer en la biopsia de mama.

Tabla 2. Resultado esperado de cribado de cáncer de mama por medio de la prueba de aliento.

		ESTÁTUS DE CÁNCER			Valor pre-prueba (%)	Valor post-prueba (%)	Factor de mejora
		Positivo	Negativo				
PRUEBA	Positiva	TP = 3,231	FP = 298,815	PPV	0.395	1.070	2.708
RESULTADO	Negativa	FN = 719	TN = 697,235	NPV	99.605	99.897	1.003
Total		3,950	996,050				

La tabla resume el resultado esperado de cribado de un millón de mujeres de los E.U. con una prueba de aliento, asumiendo sensibilidad de prueba = 81.8% y especificidad = 70.0% (Figura 1, cuadro intermedio), y prevalencia de cáncer de mama es 3.95 casos de cáncer por cada 1000 (en base a la tasa de detección de cáncer de la mamografía de cribado) [44]. TP = verdaderos positivos, FP = falsos positivos, FN = falsos negativos, y TN = verdaderos negativos. PPV y NPV son valor predictivo positivo y negativo respectivamente, cuando  $PPV = TP / (TP + FP)$ ,  $NPV = TN / (TN + FN)$ , y factor de enriquecimiento = valor posterior a la prueba/valor previo a la prueba. doi:10.1371/journal.pone.0090226.t002

aliento, proporcionando una poderosa nueva herramienta para el descubrimiento de biomarcadores [29,45]. Sin embargo, este beneficio ha estado acompañado de un riesgo estadísticamente incrementado de identificar equivocadamente biomarcadores espúreos entre un gran número de candidatos. Este problema ha generado metáforas pintorescas en la comunidad de investigadores del aliento: “Hallar las agujas en el pajar” puede dar como resultado “biomarcadores vudú” al “ver rostros en las nubes”. Para minimizar este problema, un algoritmo multivariable predictivo primero debe, ser derivado de un conjunto de entrenamiento, usando únicamente aquellos biomarcadores identificados con alta significancia estadística, y segundo, el algoritmo debe ser validado en un conjunto predictivo independiente. En este estudio piloto comparativamente pequeño, las múltiples simulaciones Monte Carlo identificaron un conjunto estadísticamente significativo de candidatas a biomarcadores que tuvieron validación cruzada con un método LOO (“dejar uno fuera”) repetitivo. Sin embargo, estos hallazgos requerirán validación en estudios futuros más extensos.

El mayor reto técnico para los programas de cribado de cáncer de mama es el bajo predominio del padecimiento en poblaciones en riesgo promedio, y el bajo resultado de verdaderos positivos. En un estudio de más de dos millones de mamografías de cribado, la tasa promedio de detección de cáncer para radiólogos individuales fue 3.95 casos de cáncer por 1000 exámenes [38] es decir, la probabilidad a priori de la pre-prueba de encontrar cáncer en una mamografía de cribado fue únicamente de 1 por cada 250 pruebas. Los resultados de este estudio sugieren que un resultado positivo en una prueba de aliento puede mejorar casi tres veces la probabilidad del resto de la población cribada contra el riesgo de tener cáncer de mama, mientras que un resultado negativo puede excluir con seguridad al 99.9% de las mujeres con el padecimiento. Esto puede

Reducir dramáticamente la exposición innecesaria a la radiación, porque la abrumadora mayoría de las mujeres cribadas no tiene cáncer (99.61%), pero se exponen a los riesgos e incomodidades de una mamografía para saber que su resultado es negativo. Una mamografía que tenga un resultado negativo para cáncer es un procedimiento innecesario, pero esto solamente se puede saber después del evento.

Los biomarcadores de aliento en este grupo de estudio identificó mamografías de cribado con 100% de sensibilidad y 33% especificidad (Figura 2). Si este hallazgo es confirmado en estudios de validación, una prueba de aliento potencialmente podría identificar a todas las mujeres que tendrán una mamografía de cribado anormal y excluirá con seguridad a un tercio de la población que tendrán un resultado normal y no requerirán más pruebas. Sin embargo, se requerirán mayores estudios para confirmar estos hallazgos en cantidades más grandes de sujetos.

Adicionalmente, los segmentos pico cromatográficos que fueron identificados como biomarcadores del padecimiento no contienen información acerca de la estructura química de los VOCs detectados, porque el detector SAW respondió únicamente a la masa de compuestos eluyentes. Otra meta de estudios futuros será determinar los valores del Índice Kovats de estos biomarcadores comparando sus tiempos de retención con los de estándares n-alcalinos conocidos, y comparándolos con los valores de Índice Kovats de VOCs cuyas estructuras han sido identificadas por medio de espectrometrías de masa.

Concluimos que una prueba rápida tipo “point-of-care” para biomarcadores en el aliento identificaron con exactitud a las mujeres con cáncer de mama y con mamografías anormales, e hizo distinción entre las biopsias de mama con lectura positiva o negativa para cáncer. Estos hallazgos

Tabla 3. Resumen de reportes previos por otros investigadores de biomarcadores de aliento de Cáncer de Mama.

Autor #1	Método de Ensayo	Resultado
Hietanen [15]	GC	Pentano incrementado en el cáncer de mama
Mangler [14]	GC MS	Patrón específico de 5 VOCs en el cáncer de mama: 3- metilhexano, deceno, cariofileno, naftaleno y tricloroetileno
Patterson [16]	GC MS	Patrones de agrupamiento en 383 VOCs de cáncer de mama clasificados con 77% exactitud; 72% sensibilidad, 64% especificidad 98%
Peno [20]	Arreglo de nanosensores v GC	Diferenciamiento entre el aliento ‘sano’ v ‘canceroso’ v diferentes tipos de cáncer
Stolarek [17]	Fluorimetría	Nivel incrementado de H2O2 en condensado de aliento exhalado en cáncer de mama
McCulloch [22]	Perros entrenados	Detectó cáncer de mama con sensibilidad del 88% v especificidad del 98%
Shuster [18]	Arreglo de nanosensores	Diferencias estadísticamente significativas entre condiciones de mama benignas y malignas
Xu [21]	Arreglo de nanosensores	Detectó cáncer de mama con cuatro VOCs: Heptanal, acetofenona, miristato de isopropilo y 2 - propanol.

Quando se emplearon técnicas de ensayo que emplearon VOCs separados con cromatografía de gas (GC) y los identificaron con espectrometría de masa (MS), varios biomarcadores de aliento VOC fueron consistentes con los productos de estrés oxidativo p.ej. Pentano, peróxido de hidrógeno y derivados de alcanos incluyendo heptanal y propanol. doi:10.1371/journal.pone.0090226.t003

de un estudio piloto comparativamente pequeño deben ser interpretados con precaución y requieren validación en estudios más extensos. Sin embargo, si estos hallazgos se confirman en estudios futuros, las pruebas de aliento se podrán utilizar como un procedimiento auxiliar a la mamografía con el potencial de reducir la cantidad de procedimientos innecesarios y reducir los costos de descubrir nuevos casos de cáncer de mama.

## Referencias

- Centros para el Control y la Prevención de Padecimientos: Cáncer en las Mujeres. Disponible: <http://www.cdc.gov/cancer/dcp/data/women.htm>.
- Instituto Nacional del Cáncer (NCI): Cáncer de mama. Disponible: <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/breast>.
- Nelson HD, Tyne K, Naik A, Bougatsos C, Chan B, et al. (2009) Cáncer de Mama: Actualización de la Revisión de Evidencia sistemática para la Fuerza de Tarea de Servicios Preventivos de los E.U.(Screening for Breast Cancer: Systematic Evidence Review Update for the US Preventive Services Task Force). AHRQ WebM&M. Reporte No.: 10-05142-EF-1.
- Jorgensen KJ (2013) Cribado por mamografía. Beneficios, lesiones, y elección informada. *Diario Médico de Dinamarca (Mammography screening. Benefits, harms, and informed choice. Danish medical journal)* 60(4): B4614.
- Jansen-van der Weide MC, Greuter MJ, Jansen L, Oosterwijk JC, Pijnappel RM, et al. (2010) Exposición a radiación en dosis baja y el riesgo de cáncer de mama en las mujeres con predisposición genética o familiar: un meta-análisis. *Radiología Europea (Exposure to low-dose radiation and the risk of breast cancer among women with a familial or genetic predisposition: a meta-analysis. European radiology)* 20(11): 2547–2556.
- Blanchard K, Colbert JA, Halpern EF, Hughes KS, Puri D, et al. (2004) Cribado por Mamografía: Patrones de uso e impacto estimado en la supervivencia del carcinoma de mama. *Cáncer (Mammographic screening: patterns of use and estimated impact on breast carcinoma survival. Cancer)* 101(3): 495–507.
- Considine NS, Magai C, Krivoshekova YS, Ryzewicz L, Neugut AI (2004) Conductas de miedo, ansiedad, preocupación ante el cribado de cáncer de mama: Una revisión crítica. *Cáncer. Epidemiología, biomarcadores y prevención: Una publicación de la Asociación Americana para la Investigación del Cáncer, patrocinado por la Sociedad Americana de Oncología Preventiva* 13(4): 501–510. (Fear, anxiety, worry, and cancer of mama screening behavior: a critical review. *Cancer epidemiology, biomarcadores & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*) 13(4): 501–510.
- Ackerson K, Preston SD (2009) Perspectiva de teoría de decisiones, en relación a porqué las mujeres deciden hacerse o no cribado de cáncer. Una revisión sistemática. *Diario de Enfermería Avanzada (A decision theory perspective on why women do or do not decide to have cancer screening: systematic review. Journal of advanced nursing)* 65(6): 1130–1140.
- Brett J, Bankhead C, Henderson B, Watson E, Austoker J (2005) El impacto psicológico de la mamografía de cribado. Una revisión sistemática. *Psicooncología. (The psychological impact of mammographic screening. A systematic review. Psycho-oncology)* 14(11): 917–938.
- Schmalfluss F, Kolominsky-Rabas PL (2013) Medicina personalizada para el cribado de padecimientos malignos: una revisión de métodos y aplicaciones. *Perspectivas de biomarcadores. (Personalized medicine in screening for malignant disease: a review of methods and applications. Biomarker insights)* 8: 9–14.
- Phillips M, Cataneo R, Dittkoff B, Fisher P, Greenberg J, et al. (2003) Marcadores volátiles de cáncer de mama en el aliento. *Diario de la Mama. (Volatile markers of breast cancer in the breath. The Breast Journal)* 9(3): 184–191.
- Phillips M, Cataneo RN, Dittkoff BA, Fisher P, Greenberg J, et al. (2006) Predicción de cáncer de mama usando biomarcadores volátiles en el aliento. *Investigación y tratamiento del Cáncer de mama. (Prediction of breast cancer using volatile biomarcadores in the breath. breast cancer research and treatment)* 99(1): 19–21.
- Phillips M, Cataneo RN, Saunders C, Hope P, Schmitt P, et al. (2010) Biomarcadores volátiles en el aliento de mujeres con cáncer de mama. *Diario de Investigación de la Mama. (Volatile biomarkers in the breath of women with breast cancer. Journal of breath research)* 4(2): p. 026003.
- Mangler M, Freitag C, Lanowska M, Staech O, Schneider A, et al. (2012) Compuestos orgánicos volátiles en aliento exhalado de pacientes con cáncer de mama en una clínica (Volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath of patients with breast cancer in a clinical setting). *Ginekologia polska* 83(10): 730–736.
- Hietanen E, Bartsch H, Berezat JC, Camus AM, Eremin O, et al. (1994) Estrés oxidativo y dieta en pacientes con cáncer de prostate, colon y mama. *Diario Europeo de Nutrición Clínica (Diet and oxidative stress in breast, colon and prostate cancer patients: a case-control study. European journal of clinical nutrition)* 48(8): 575–586.
- Patterson SG, Bayer CW, Gabram-Mendola SG, Hendry RJ, Lee KS, et al. (2011) Análisis de aliento con espectrometría de masa: ¿una nueva herramienta para detección de cáncer de mama? *Cirujano Americano (Breath analysis by mass spectrometry: a new tool for breast cancer*

## Contribuciones de Autores

Concepción y diseño de los experimentos: MP. Realización de los experimentos: JDB JH RIL PL MBIL NP. Contribuyeron con herramientas de análisis/materiales/reactivos: RNC PDK MM UP. Escritura del documento: MP. Revisión del manuscrito: MP JDB RNC JH PDK RIL PL.

- detection? *The American surgeon* 77(6): 747–751.
- Stolarek RA, Jakubik J, Jezierski A, Potargowicz E, Seklewska E, et al. (2010) Nivel Incrementado de H2O2 en condensado de aliento exhalado en pacientes de mama primario. *Diario de investigación de cancer y oncología clínica (Increased H2O2 level in exhaled breath condensate in primary breast cancer patients. Journal of cancer research and clinical oncology)* 136(6): 923–930.
  - Shuster G, Abdah-Bortnyak R, Billan S, Gallimidi Z, Reiss AH, et al. (2011) Clasificación de precursors de cancer a través de aliento exhalado. *Investigación y tratamiento de cancer de mama. (Classification of breast cancer precursors through exhaled breath. Breast cancer research and treatment)* 126(3): 791–796.
  - D'Amico A, Di Natale C, Falconi C, Martinelli E, Paolesse R, et al. (2012) Detección y clasificación de cánceres con nariz electronica. *Opinión expert en relación a diagnósticos medicos (Detection and identification of cancers by the electronic nose. Expert opinion on medical diagnostics)* 6(3): 175–185.
  - Peng G, Abdah-Bortnyak R, Billan S, Broza YY, Hakim M, et al. (2010) Detección de cánceres de pulmón, mama, colorectal, y de prostate de aliento exhalado usando un solo arreglo de nanosensores. *Diario británico del cancer. (Detection of lung, breast, colorectal, and prostate cancers from exhaled breath using a single array of nanosensors. British journal of cancer)* 103(4): 542–551.
  - Xu Y, Lee H, Hu Y, Huang J, Kim S, et al. (2013) Detección e identificación de biomarcadores de compuestos orgánicos volátiles utilizando un solo arreglo de nanoalambres en un chip. *Diario de nanotecnología biomedical. (Detection and identification of breast cancer volatile organic compounds biomarkers using highly-sensitive single nanowire array on a chip. Journal of biomedical nanotechnology)* 9(7):1164–1172.
  - McCulloch M, Jezierski T, Broffman M, Hubbard A, Turner K, et al. (2006) Exactitud de diagnostic de detección con canes de olores en cánceres de mama y pulmón en etapas tempranas y tardías. *(Diagnostic accuracy of canine scent detection in early- and late-stage lung and breast cancers. Integrative cancer therapies)* 5(1): 30–39.
  - Gordon RT, Gonczy C, Kroener J, Myers LJ, Schatz CB, et al. (2008) Utilización de canes para la detección de cáncer en los humanos. *Diario de medicina alternativa y complementaria. (The use of canines in the detection of human cancers. Journal of alternative and complementary medicine)* 14(1): 61–67.
  - Ludviksdottir D, Diamant Z, Alving K, Bjermer L, Malinowski A (2012) Aspectos clínicos del uso de NO exhalado en diagnostic y gestión del asma (Clinical aspects of using exhaled NO in asthma diagnosis and management. *The clinical respiratory journal)* 6(4): 193–207.
  - Phillips M, Altorki N, Austin JH, Cameron RB, Cataneo RN, et al. (2007) Predicción de cancer de pulmón utilizando biomarcadores volátiles en el aliento. *Biomarcador de Cáncer. (Prediction of lung cancer using volatile biomarkers in breath. Cancer Biomark)* 3(2): 95–109.
  - Amann A, Corradi M, Mazzone P, Mutti A (2011) Biomarcadores de cancer de Pulmón en aliento exhalado. *Experto en diagnósticos moleculares. (Lung cancer biomarkers in exhaled breath. Expert review of molecular diagnostics)* 11(2): 207–217.
  - Phillips M, Cataneo RN, Condos R, Greenberg J, La Bombardi V, et al. (2007) Biomarcadores volátiles de tuberculosis pulmonary en el aliento. *Tuberculosis. (Volatile biomarkers of pulmonary tuberculosis in the breath. Tuberculosis (Edinb))* 87(1): 44–52.
  - Syhe M, Manning L, Phuanukoonnon S, Harino P, Chambers ST (2009) La esencia de tuberculosis por Micobacterias-parte II. *Tuberculosis. (The scent of Mycobacterium tuberculosis—part II breath. Tuberculosis)* 89(4): 263–266.
  - Phillips M, Byrnes R, Cataneo RN, Chaturvedi A, Kaplan PD, et al. (2013) Detección de biomarcadores volátiles de radiación terapéutica en el aliento (Detection of volatile biomarkers of therapeutic radiation in breath. *Journal of breath research)* 7(3): 036002.
  - Phillips M, Boehmer JP, Cataneo RN, Cheema T, Eisen HJ, et al. (2004) Predicción de rechazo de trasplante de corazón con una prueba de aliento para marcadores de estrés oxidativo. *Diario americano de cardiología (Prediction of heart transplant rejection with a breath test for markers of oxidative stress. The American journal of cardiology)* 94(12): 1593–1594.
  - Phillips M, Basa-Dalay V, Blais J, Bothamley G, Chaturvedi A, et al. (2012) Prueba del aliento tipo “Point-of-care” (punto de atención) para biomarcadores de tuberculosis pulmonary activa. (Point-of-care breath test for biomarkers of active pulmonary tuberculosis). *Tuberculosis (Edinburgh)* 92: 314–320.
  - Phillips M, Basa-Dalay V, Bothamley G, Cataneo RN, Lam PK, et al. (2010) Biomarcadores de aliento de tuberculosis pulmonary activa. *(. Tuberculosis)* 90(2): 145–151.
  - Cook NR (2008) Evaluación estadística de modelos de pronósticos vs. modelos de diagnósticos: más allá de la curva ROC. (Statistical evaluation of prognostic versus diagnostic models: beyond the ROC curve). *Clin Chem* 54(1): 17–23.
  - Yang J, Zhu J, Zou YY (2006) Un procedimiento estadístico robusto para descubrir biomarcadores utilizando datos de expresión genómica de microarreglos. (A robust statistical procedure to discover expression biomarkers



- using microarray genomic expression data). *J Zhejiang Univ Sci B* 7(8): 603–607.
35. Huang J, Ma S, Song X (2006) Método ROC binormal regularizado para la clasificación de padecimiento utilizando datos de micro-arreglos (Regularized binormal ROC method in disease classification using microarray data). *BMC Bioinformatics* 7: 253.
  36. Phillips M, Altorki N, Austin JH, Cameron RB, Cataneo RN, et al. (2008) Detección de cáncer de pulmón utilizando análisis digital ponderado de biomarcadores de aliento (Detection of lung cancer using weighted digital analysis of breath biomarkers). *Clin Chim Acta* 393(2): 76–84.
  37. Jiang W, Simon R (2007) Comparación de métodos de revisión cruzada y un enfoque ajustado de revisión cruzada para estimar el error de pronóstico en clasificación de micro-arreglos (A comparison of bootstrap methods and an adjusted bootstrap approach for estimating the prediction error in microarray classification). *Statistics in medicine* 26(29): 5320–5334.
  38. Jiang Y, Miglioretti DL, Metz CE, Schmidt RA (2007) Tasa de detección de cáncer de mama: Diseño de pruebas de imagen para demostrar mejoras. *Radiología* (Breast cancer detection rate: designing imaging trials to demonstrate improvements. *Radiology*) 243(2): 360–367.
  39. Pisano ED, Acharyya S, Baum JK, Gatsonis C, Hendrick E, et al. (2005) Desempeño de diagnóstico de mamografía digital vs. mamografía en filme para cribado de cáncer de mama. *Diario de Medicina de Nueva Inglaterra* (Diagnostic performance of digital versus film mammography for breast-cancer screening. *The New England journal of medicine*) 353(17): 1773–1783.
  40. Jezierska-Drutel A, Neumann CA, Rosenzweig SA (2013) Rol de estrés oxidativo y el microambiente en el desarrollo y avance del cáncer de mama. *Avances en investigación del cáncer* (Role of oxidative stress and the microenvironment in breast cancer development and progression. *Advances in cancer research*) 119: 107–125.
  41. Kneepkens CM, Lepage G, Roy CC (1994) El potencial de prueba de aliento de hidrocarburos como medida de peroxidación de lípidos. *Medicina y biología de radicales libres*. (The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation. *Free radical biology & medicine*) 17(2): 127–160.
  42. Phillips M, Cataneo RN, Greenberg J, Gunawardena R, Naidu A, et al. (2000) Efecto de la edad en el perfil de alcano metilado del aliento, muestrario de aparentes nuevos marcadores de estrés oxidativos. *Diario del laboratorio y medicina clínica* (Effect of age on the breath methylated alkane contour, a display of apparent new markers of oxidative stress. *The Journal of laboratory and clinical medicine*) 136(3): 243–249.
  43. Mathews JM, Raymer JH, Etheridge AS, Velez GR, Bucher JR (1997) ¿Los químicos orgánicos volátiles orgánicos medidos en el aliento reflejan y mantienen los niveles de CYP2E1 in vivo? *Toxicología y farmacología aplicada* (Do endogenous volatile organic chemicals measured in breath reflect and maintain CYP2E1 levels in vivo? *Toxicology and applied pharmacology*) 146(2): 255–260.
  44. Bulun S, Chen D, Lin Z, Lu M, Zhao H, et al. (2009) Reglamentación de expresión de aromatasa en el tejido de cáncer de mama. *Anales de la Academia de Ciencias de Nueva York*. (Regulation of aromatase expression in breast cancer tissue. *Annals of the New York Academy of Sciences*) 1155(1): 121–131.
  45. Phillips M, Cataneo RN, Chaturvedi A, Kaplan PD, Libardoni M, et al. (2013) Detección de Volatilome Humano Extendido con Espectrometría de Masa TOF /Cromatografía de Gas Bidimensional. (Detection of an Extended Human Volatome with Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry). *PloS one* 8(9): e75274.