

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 876**

51 Int. Cl.:

G06T 17/00	(2006.01)
G01N 27/64	(2006.01)
A61B 5/00	(2006.01)
G01N 33/50	(2006.01)
G01N 33/483	(2006.01)
G01N 33/574	(2006.01)
G01N 33/84	(2006.01)
A61N 5/10	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.07.2016 PCT/AU2016/050603**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2017 WO17004684**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2016 E 16820580 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 3320521**

54 Título: **Indicador terapéutico atómico**

30 Prioridad:

09.07.2015 AU 2015902706

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

08.09.2020

73 Titular/es:

**ATOMIC ONCOLOGY PTY LTD (100.0%)
19 Bungan Head Road
Newport Beach, New South Wales 2106, AU**

72 Inventor/es:

MIKLOS, GEORGE L. GABOR

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 781 876 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Indicador terapéutico atómico

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la generación de un indicador terapéutico atómico (ATI, por sus siglas en inglés) para una muestra de prueba por la cuantificación de manganeso; en vóxeles de una región 3D de la muestra, en el que la región 3D se define topográficamente por las coordenadas X'xY'xZ. El ATI se usa para evaluar la radio-sensibilidad, es decir, sensibilidad o resistencia al tratamiento de radiación, de un cáncer, es decir, un tumor/neoplasia. En una realización preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento para generar el ATI, evaluar la radio-sensibilidad de un tumor/neoplasia basándose en el ATI y, basándose en la evaluación, tratar o bien no tratar el tumor con radiación.

10 La presente invención también se refiere a un procedimiento para determinar si un cáncer es probable que vuelva a producirse después del tratamiento con radiación que comprende cuantificar el nivel de manganeso en vóxeles de una región 3D de una muestra de prueba del cáncer y determinar la frecuencia de regiones metalómicas altas (HMR, por sus siglas en inglés) en el cáncer, en el que una alta frecuencia de HMR es indicativa que el cáncer es probable que vuelva a producirse y una baja frecuencia de HMR es indicativa que el cáncer es improbable que vuelva a producirse; y procedimientos asociados de tratamiento.

15 Se describe además un procedimiento para determinar la radio-sensibilidad de un melanoma, el procedimiento que comprende determinar el nivel de melanina en una muestra de prueba del melanoma, en el que cuanto menor es el nivel de melanina más sensible es el melanoma a la radiación y cuanto mayor es el nivel de melanina más resistente es el melanoma a la radiación; y procedimientos asociados de tratamiento.

Antecedentes de la invención

20 Cualquier análisis de la técnica anterior a lo largo de toda la memoria descriptiva no debe considerarse de ninguna manera como una admisión tal que la técnica anterior se conoce ampliamente o forma parte del conocimiento general común en el campo.

25 Más del 60 % de los pacientes en los EE.UU. recibirá tratamiento con radiación durante una enfermedad y estos 600.000 o más individuos harán más de 20 millones de visitas de radioterapia, con cada paciente que recibe, en promedio, 30 tratamientos de radioterapia de haces externos con propósito curativo. Los pacientes de cáncer de mama, pulmón y de próstata representan más del 50 % de todos los pacientes que reciben radioterapia (American Society for Radiation Oncology, ASTRO, 2012).

30 La decisión clínica de tratar "pacientes de cáncer" con radiación, o evitar el uso de esta modalidad terapéutica, actualmente está basada en una mezcla de práctica subjetiva, empírica e histórica, comúnmente encapsulada dentro de "técnica" médica. Las decisiones de tratamiento y gestión inicialmente implican la idoneidad de los pacientes para cirugía definitiva, su edad, extensión de reserva cardiopulmonar, comorbilidades definidas, el grado patológico del tumor y la fase del trastorno como se determina por varias realizaciones de formación de imágenes tales como MRI, fMRI, CT, ultrasonido, rayos X, PET y combinaciones de los mismos. Existe una entrada cuantitativa mínima en términos de las propiedades del propio tumor, interpretando los patólogos cómo "se ven" las células tumorales en términos de su desviación morfológica de células normales, las diferencias que son evidentes en la arquitectura del tumor de aquella de tejidos normales y la extensión de la división celular dentro de los campos microscópicos.

35 Más específicamente, la evaluación de si se sospecha que un individuo tenga un tumor o un cáncer que requiera tratamiento actualmente depende de la examinación patológica de una muestra de tejido, muestra de órgano o de sangre. Los resultados de la patología únicamente determinan los eventos clínicos continuos que son parte de la cinta transportadora actual de la técnica médica. En los Estados Unidos de América (EE.UU.), más del 60 % de pacientes de cáncer recibe alguna forma de tratamiento con radiación, habitualmente en combinación con cirugía y terapias sistémicas que comprenden fármacos seleccionados y más recientemente en combinación con inmunoterapias. La decisión crítica sobre si un paciente debe, o no debe, recibir radiación, depende primero y antes que todo del informe realizado por un patólogo (Davidson y Rimm; JAMA; 313; 1109-1110; 2015. Elmore y col., JAMA; 313; 1122-1132. 2015). Este informe es la base actual sobre la cual se realiza una determinación de la gestión del paciente, que actualmente se lleva a cabo en un entorno multidisciplinario que implica oncólogos de radiación, oncólogos médicos y cirujanos. Sin embargo, esta decisión críticamente importante actualmente yace en una diagnosis patológica basándose en primer lugar en el análisis subjetivo también descrito anteriormente, con respecto a la morfología celular y la arquitectura del tejido y secciones de tejido embebidas en parafina fijadas con formalina y teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) (véase la Figura 1, a manera de ejemplo).

40 La concordancia entre patólogos de la interpretación de diagnóstico es variable y depende del tipo de tumor en investigación. En el caso de hiperplasia atípica de la mama, la concordancia es solo un 48 % (Elmore y col., JAMA, 313; 1122-1132. 2015). En términos de tumores de tiroides, por ejemplo, es muy difícil discriminar entre el tejido normal y el tejido "canceroso", excepto con tumores de fase muy tardía. La subjetividad de la interpretación de la patología da por resultado tratamiento excesivo en aquellos pacientes que consiguen poco beneficio de la radioterapia, pero

- 5 padecen sus daños bien conocidos y da como resultado bajo tratamiento de aquellos pacientes que podrían beneficiarse de la radiación, pero no la reciben. Para evitar cuestiones legales, los facultativos deben pecar por cautelosos y la radiación se da a muchos pacientes en la ausencia de cualquier evidencia cuantitativa de beneficio, en la creencia que después de la cirugía, por ejemplo, la radiación minimizará los efectos de cualquier célula cancerosa residual que se haya quedado atrás en los márgenes que circundan el tumor extirpado. Para aquellos pacientes cuyos tumores y nichos estromales asociados tienen algún grado de radio-resistencia, la radioterapia es inútil, puesto que, si se aniquilan algunas células sensibles a la radiación, las poblaciones de células estromales y el tumor sobrevivientes se han seleccionado para aún más radio-resistencia.
- 10 Los facultativos médicos en general dependen de los recursos de soporte de decisión clínica basado en evidencia tal como <http://www.uptodate.com>. Este recurso proporciona un sumario clínico actual de las técnicas de radioterapia en el control de cáncer en múltiples niveles, incluyendo tipos de radiación tales como radioterapia con haces externos, braquiterapia, radioterapia intraoperatoria y terapia de radionúclido orientada.
- 15 El Coverage and Analysis Group en los Centers for Medicare and Medicaid (la agencia federal dentro del departamento de servicios de salud y sociales de EE.UU.) solicitó un informe de evaluación sobre el cáncer de próstata que se proporcionó por Ip y col., 2010, en el Tufts Evidence-based Practice Center bajo el contrato con la Agency for Healthcare Research and Quality (RHQ), Rockville, Maryland, EE.UU. (Contrato n.º 2902007 10055 I). Este informe abordó la evidencia para las salidas clínicas y bioquímicas de diferentes radioterapias, tales como radioterapia de cuerpos estereotácticos, radioterapia de haz externo fraccionado y braquiterapia, en pacientes con cáncer de próstata localizado (enfermedad T1 y T2). Las terapias con radiación de haces externos (EBRT, por sus siglas en inglés) incluyen radioterapia modulada en intensidad, radiación conformacional, radiación de cuerpos estereotácticos, CyberKnife y radiación de haz de protones, mientras que la braquiterapia incluye implantación permanente de "semillas" radiactivas isotópicas así como semillas de radioactividad temporaria de altas dosis.
- 20 El tipo de radiación administrada a un paciente también se evaluó, a base de protones o fotones y si la radiación se distribuyó mediante un acelerador lineal, rayos gamma (de una fuente de Cobalto 60), o mediante semillas radiactivas que comprenden ¹²⁵Yodo, ¹³¹Cesio o ¹⁰³Paladio, para braquiterapia de baja tasa de dosis (LDRBT, por sus siglas en inglés); o ¹⁹²Iridio (para braquiterapia de alta tasa de dosis (HDRBT, por sus siglas en inglés)). La evaluación también incluyó los parámetros que afectaron las salidas de pacientes que incluyen dosis radiactivas, eventos adversos, algoritmos de planeación de tratamiento y el número de fracciones distribuidas.
- 25 El sistema de clasificación usado por Ip y col., para evaluar los diversos ensayos clínicos en términos de la resistencia de evidencia que emerge de cualquier ensayo, era un subjetivo de tres niveles: alto, moderado e insuficiente.
- 30 En términos de los beneficios frente a daños de diferentes radioterapias, los resultados fueron como se indica más adelante.
- En términos de la comparación de los beneficios frente a daños de radioterapias, frente a ningún tratamiento con radiación, la resistencia de la evidencia se encontró que es de categoría 3, *insuficiente*.
- 35 La fuerza de la evidencia se encontró que es *insuficiente* para la supervivencia del paciente, cuando se comparó la braquiterapia de baja tasa de dosis con la radioterapia haces externos.
- La fuerza de la evidencia se encontró que es *insuficiente* para el control bioquímico, cuando se comparó la braquiterapia con la radioterapia de haces externos y cuando se comparó la braquiterapia de alta tasa de dosis con la braquiterapia de baja tasa de dosis.
- 40 La fuerza de la evidencia se encontró que es *insuficiente* para toxicidades genitourinarias y gastrointestinales, cuando se comparó la braquiterapia de baja tasa de dosis con la radioterapia de haces externos.
- La fuerza de la evidencia se encontró que es *insuficiente* para diversas terapias de combinación, LDRBT más EBRT.
- 45 La fuerza de la evidencia se encontró que es *insuficiente* para diferentes estudios dentro de la radioterapia de cuerpos estereotácticos (SBRT) y paraguas EBRT, es decir, toxicidades rectales y de vejiga, libertad de fallo bioquímico y toxicidades genitourinaria o gastrointestinal.
- La fuerza de evidencia se encontró que es *insuficiente* para braquiterapia de baja tasa de dosis en términos de comparaciones de semillas radiactivas, ¹²⁵Yodo y ¹⁰³Paladio.
- 50 La fuerza de la evidencia se encontró que es *insuficiente* para la contribución de edad, raza, grupo étnico, comorbilidades, defectos adversos relacionados al tratamiento y progresión de la enfermedad al riesgo de valor basal de un paciente como un contribuyente al resultado de la radioterapia.
- El informe detallado de IP y col., 2010, concluyó que en uno de los dos tipos de tumores extensivamente estudiados (de próstata localizado y de mama localizado), la evidencia para los beneficios de la radioterapia en comparación con ningún tratamiento para hombres con "cáncer" de próstata T1 o T2 no reveló ningún indicador cuantitativo para tratamiento con radiación de pacientes. Adicionalmente, hubo una heterogeneidad sustancial dentro y entre estudios,

siendo inconsistentes muchos de los descubrimientos en esta gran evaluación.

El informe de Ip y col., indica que el riesgo subyacente de la progresión de la enfermedad al estado metastásico varía ampliamente entre los pacientes. La incapacidad de determinar objetivamente el riesgo de la progresión significa que los pacientes considerados que están en “bajo” riesgo se les aconseja someterse a braquiterapia, mientras que aquellos considerados que están en riesgo “intermedio” se les tiende a dar braquiterapia de haces externos.

Daly y col., PLoS ONE; 5(9): e12570 se refiere a la “gestión del estrés oxidativo” e informa que Mn^{2+} solo no protegió a las enzimas de la inactivación por radiación ionizante.

El documento WO2015/047226 se dirige a un procedimiento de desarrollo de “firmas de sensibilidad de radiación” basadas en la detección de la expresión de una pluralidad de genes. El procedimiento es solamente aplicable a pacientes de cáncer de mama localizado en que el tumor de mama se ha retirado antes de la radiación y la medición final es la reaparición del tumor local.

Por consiguiente, existe una necesidad urgente de identificar aquellos pacientes que tienen un parámetro biológico que favorece una modalidad de tratamiento en comparación con otra, por ejemplo, características de tumor que son favorables para el tratamiento con radiación, es decir, aquellos cuyos tumores son sensibles a la radiación frente a aquellos pacientes cuyos tumores son más resistentes a la radiación y por consiguiente, debe ser tratamiento con radiación escatimada que es probable que sea dañino e inútil.

Existe una necesidad adicional para identificar parámetros biológicos que puedan ser útiles al distinguir características de células tumorales anormales en sí y las características del estroma y la distribución tridimensional (3D) en la cual las células tumorales están embebidas. Por ejemplo, un tumor que tiene células anormales uniformemente dispersadas dentro de un componente estromal, es muy diferente a un tumor en que las células anormales se separan en gran parte de las células estromales. En el caso del cáncer de próstata, ambas de estas situaciones se presentan dentro de diferentes focos de células anormales dentro de la glándula misma y también dentro de las metástasis al hueso. Ningún procedimiento actual de formación de imágenes externas (procedimientos de formación de imágenes MRI, CT o ^{18}F FDG) puede identificar de manera fiable estas diferentes áreas, o sus diferentes características.

Hasta la fecha, no hay datos disponibles con relación al uso de la radioterapia para un determinado tumor de un paciente particular: los datos actuales no tienen bases cuantitativas sólidas.

Permanece la necesidad de ensayos que proporcionen indicadores cuantitativos que permitan la identificación de un parámetro biológico en una muestra, por ejemplo, radio-sensibilidad o radio-intensidad/radio-resistencia cuando se toma una decisión adecuada con respecto al tratamiento de pacientes tal como si o no tratar “pacientes de cáncer” con radiación, o evitar el uso de radiación.

Es un objeto de la presente invención superar o mejorar al menos una de las desventajas de los tratamientos de la técnica anterior y/o proporcionar una alternativa útil.

Sumario de la invención

El inventor de la presente invención ha descubierto de manera sorprendente que el nivel de manganeso en un cáncer puede usarse como un indicador de radio-sensibilidad del cáncer. En particular, cuanto más alto es el nivel de manganeso en un cáncer más resistente es el cáncer a la radiación; y cuanto más bajo es el nivel de manganeso en el cáncer, más sensible es el cáncer a la radiación. La radio-sensibilidad de un cáncer puede determinarse mejor usando una combinación de análisis 3D y 2D.

La invención se refiere a las realizaciones como se describe en las reivindicaciones.

La invención se refiere a los siguientes artículos:

Artículo 1: Un procedimiento para determinar la radio-sensibilidad de un cáncer, comprendiendo el procedimiento cuantificar el nivel de manganeso en una muestra de prueba del cáncer, en el que cuanto más bajo es el nivel de manganeso en la muestra de prueba, más sensible es el cáncer a la radiación y cuanto más alto es el nivel de manganeso en la muestra de prueba más resistente es el cáncer a la radiación.

Artículo 2: El procedimiento del artículo 1, que comprende generar un indicador terapéutico atómico (ATI) de una muestra de prueba;

en el que el procedimiento para generar el ATI comprende cuantificar el nivel de manganeso en vóxeles en una región 3D de la muestra de prueba, comprendiendo el procedimiento:

(a) seleccionar una región 2D de dicha muestra de prueba, en el que la región 2D se define topográficamente por un sistema de coordenadas $X':Y'$ en el que X' es la longitud de la región 2D e Y' es la amplitud de la región 2D, en el que la región 3D corresponde a dicha región 2D y tiene una altura seleccionada representada por Z , en el que la región 3D está dividida en vóxeles de un volumen predefinido, estando definido el volumen de cada vóxel por $XxYxZ$ en el que X es la longitud del vóxel, Y es la amplitud del vóxel y Z es la altura del vóxel;

- (b) cuantificar el nivel de manganeso en cada vóxel; y
 - (c) calcular la tendencia central del nivel de manganeso en vóxeles seleccionados; en el que la tendencia central del nivel de manganeso es la mediana, la media aritmética o el modo del nivel de manganeso en los vóxeles cuantificados en (b) y en el que la tendencia central del nivel de manganeso en los vóxeles seleccionados define el ATI;
- 5 en el que cuanto más bajo es el ATI más sensible es el cáncer a la radiación y cuanto más alto es el ATI más resistente es el cáncer a la radiación.

10 Artículo 3: Uso del procedimiento de acuerdo con el artículo 1 o el artículo 2 en una muestra de prueba de un sujeto con cáncer para determinar un tratamiento para el sujeto, en el que si el cáncer se determina que es sensible a la radiación, la radioterapia ha de incluirse en el tratamiento y, en el que si el cáncer se determina que es resistente a la radiación, la radioterapia no ha de incluirse en el tratamiento.

15 Artículo 4: Un procedimiento para determinar la probabilidad de volver a producirse de un cáncer después del tratamiento con radiación que comprende:

- (a) cuantificar el nivel de manganeso en una región 3D de una muestra de prueba del cáncer seleccionando una región 2D de dicha muestra de prueba, en el que la región 2D se define topográficamente por un sistema de coordenadas X':Y' en el que X' es la longitud de la región 2D e Y' es la amplitud de la región 2D, en el que la región 3D corresponde a dicha región 2D y tiene una altura seleccionada representada por Z, en el que la región 3D está dividida en tres o más vóxeles de un volumen predefinido, estando definido el volumen de cada vóxel por $XxYxZ$ en el que X es la longitud del vóxel, Y es la amplitud del vóxel y Z es la altura del vóxel, y cuantificar el nivel de manganeso en cada vóxel;
 - (b) identificar en la región 2D que corresponde a las coordenadas X e Y del vóxel, regiones metalómicas altas (HMR), siendo regiones del cáncer en las que el nivel del manganeso es más alto que en las áreas circundantes según lo permiten los umbrales estadísticos que son múltiplos de una tendencia central o cualquier aproximación entre números enteros, en las que la tendencia central es la mediana, la media aritmética o el modo del nivel de manganeso cuantificado en los vóxeles en (a);
- 20 en el que cuanto más alta es la frecuencia de las HMR más alta es la probabilidad de que el cáncer vuelva a producirse y cuanto más baja es la frecuencia de las HMR más baja es la probabilidad de que el cáncer vuelva a producirse.

30 Se proporciona un procedimiento para generar un indicador terapéutico atómico (ATI) de una muestra de prueba biológica que comprende cuantificar el nivel de manganeso en vóxeles en una región 3D de la muestra de prueba, en el que el procedimiento comprende:

- (a) seleccionar una región 2D de dicha muestra de prueba, en el que la región 2D se define topográficamente por un sistema de coordenadas X':Y' en el que X' es la longitud de la región 2D e Y' es la amplitud de la región 2D, en el que la región 3D corresponde a la región 2D y tiene una altura seleccionada representada por Z, en el que la región 3D se divide en vóxeles de un volumen predefinido, estando definido el volumen de cada vóxel por $XxYxZ$ en el que X es la longitud del vóxel, Y es la amplitud del vóxel y Z es la altura del vóxel;
- (b) cuantificar el nivel de manganeso en cada vóxel; y
- (c) calcular el nivel de tendencia central de manganeso en vóxeles seleccionados;

en el que el nivel de tendencia central de manganeso en los vóxeles seleccionados define el ATI.

40 En otro aspecto la presente invención proporciona un procedimiento para determinar la radio-sensibilidad de un cáncer, comprendiendo el procedimiento generar un ATI de una muestra de prueba de acuerdo con la invención, en el que cuanto más bajo es el ATI más sensible es el cáncer a la radiación y cuanto más alto es el ATI más resistente es el cáncer a la radiación.

45 En una realización, el ATI se compara con un umbral de ATI predeterminado en el que la radio-sensibilidad del cáncer se determina evaluando si el ATI está por encima o por debajo del umbral de ATI, y

- en el que si el ATI está por debajo del umbral de ATI se determina que el cáncer es sensible a la radiación; y
- en el que si el ATI está por encima del umbral de ATI se determina que el cáncer es resistente a la radiación.

En otra realización, el ATI se compara a dos umbrales de ATI predeterminados en los que la radio-sensibilidad del cáncer se determina al evaluar si el ATI está por encima o por debajo de los dos umbrales, y

- en el que si el ATI está por debajo del umbral de ATI inferior se determina que el cáncer es sensible a la radiación;
- en el que si el ATI está por encima del segundo umbral de ATI se determina que el cáncer es resistente a la radiación; y
- en el que si el ATI está entre los dos umbrales de ATI se determina que el cáncer es parcialmente sensible a la radiación.

55 Preferentemente, la cuantificación del nivel de manganeso en los vóxeles de la muestra de prueba se calibra usando

una patrón de referencia, en la que el patrón de referencia comprende uno o más vóxeles de referencia y en la que cada vóxel de referencia comprende una cantidad conocida de manganeso.

Además de la cantidad conocida de manganeso, el patrón de referencia puede comprender cualquier material adicional que permita que la cantidad de manganeso en el patrón de referencia se compare con la cantidad o nivel de manganeso en la muestra de prueba. Preferentemente, el patrón de referencia es una muestra biológica que comprende una cantidad conocida de manganeso endógeno o exógeno. La muestra biológica puede comprender tejido humano o animal.

Preferentemente, el patrón de referencia comprende tejido de un animal (incluyendo, por ejemplo, especies mamíferas o aviares) a las cuales se añade una cantidad conocida de manganeso. El experto en la materia entenderá que los patrones de referencia de ajuste matricial en cantidades de manganeso definidas de forma precisa son útiles para el cálculo de unos recuentos calibrados por segundo factor de corrección para mitigar la variabilidad de señal día a día. En una realización, el tejido patrón de referencia deriva de pechuga de pollo.

En una realización, el nivel de manganeso cuantificado en una región 3D de una o más muestra o muestras control se cuantifica concurrentemente, o de manera secuencial en cualquier orden, cuando la muestra de prueba se está cuantificando, o lado a lado con la muestra de prueba.

En una realización, la muestra control se añade a la muestra de prueba para el análisis.

Preferentemente, el nivel de tendencia central es la mediana, media aritmética o moda.

Se entenderá por el experto en la materia que la muestra de prueba puede estar teñida o no teñida. Preferentemente, los vóxeles seleccionados con vóxeles en los cuales se detectan las células cancerosas. Más preferentemente, las células cancerosas se detectan por inspección visual de la región 2D de la muestra de prueba teñida con una tinción que distingue las células cancerosas de otras células. Cuando las células cancerosas se detectan por inspección visual de la región 2D de la muestra de prueba teñida con una tinción que distingue las células cancerosas de otras células, preferentemente la tinción es hematoxilina y eosina (H&E). En una realización, las células cancerosas se detectan por la unión de un anticuerpo, preferentemente, un anticuerpo marcado con metal, a las células cancerosas.

En el contexto de la presente invención, la longitud del vóxel, X, está en cualquier intervalo medible y preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1 micrómetro a aproximadamente 200 micrómetros. En algunas realizaciones, X se selecciona de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 micrómetros y cualquier valor entre los mismos y preferentemente X es aproximadamente 35 micrómetros.

En el contexto de la presente invención, la amplitud del vóxel, Y, está en cualquier intervalo medible y preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1 micrómetro a aproximadamente 200 micrómetros. En algunas realizaciones y se selecciona de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 micrómetros y cualquier valor entre los mismos y preferentemente Y es aproximadamente 35 micrómetros.

En el contexto de la presente invención, Z está en cualquier intervalo medible y preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1 micrómetro a aproximadamente 20 micrómetros. Preferentemente, Z se selecciona de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 micrómetros y cualquier valor entre los mismos, preferentemente Z es aproximadamente 1, o aproximadamente 2, o aproximadamente 3, o aproximadamente 4, o aproximadamente 5 micrómetros.

En una realización preferida, X, Y y Z se seleccionan respectivamente en intervalos de aproximadamente 1 a aproximadamente 200 micrómetros, 1 a 200 micrómetros y 1 a 20 micrómetros y cualquier valor entre los mismos en cada intervalo. Preferentemente X Y y Z son 35 micrómetros, 35 micrómetros y 5 micrómetros respectivamente.

En una realización de la invención, el volumen predefinido de cada vóxel está en el intervalo de aproximadamente 1 micrómetro cúbico a aproximadamente 8×10^5 micrómetros cúbicos, o aproximadamente 1 micrómetro cubico a aproximadamente 10000 micrómetros cúbicos, o aproximadamente 2000 micrómetros cúbicos a aproximadamente 8000 micrómetros cúbicos. En una realización preferida, el volumen predefinido es aproximadamente 6125 micrómetros cúbicos.

El nivel de manganeso en los vóxeles puede determinarse usando cualquier técnica de análisis elemental. Preferentemente, la técnica de análisis elemental es ablación con láser-plasma inductivamente acoplado-espectrometría de masas (LA-ICP-EM), ablación con láser-tiempo de vuelo-espectrometría de masas (LA-TOF-EM), plasma inductivamente acoplado-espectroscopia de emisión óptica (ICP-OES), plasma de microondas-espectroscopia de emisión atómica (MP-AES), espectroscopia de descomposición inducida por láser (LIBS), espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS), o estructura de borde cercano de absorción de rayos X (XANES), espectroscopia de absorción atómica (AA), o fluorescencia de rayos X (XRF).

Los datos obtenidos pueden analizarse usando tecnología de detección asistida por computadora. Por ejemplo, una sección de cinco micrómetros puede someterse a ablación con láser al barrer el láser a través del portaobjetos lateralmente, un surco de ablación en un tiempo desde la parte superior hasta el fondo. De manera alternativa, una

sección de cinco micrómetros puede someterse a ablación con láser al barrer el láser a través del portaobjetos desde la parte superior hasta el fondo, un surco de ablación en un tiempo de manera lateral. Por ejemplo, un ATI de acuerdo con la invención puede generarse por ablación con láser de al menos un surco a través de la muestra de prueba y/o el control o controles, en el que el surco de ablación comprende al menos un vóxel. En otro ejemplo, el procedimiento de la invención comprende más de un surco de ablación y varios vóxeles.

Preferentemente, la muestra de prueba se selecciona de una célula, una población de células, uno o más organismo u organismos celulares individuales, una muestra de tejido, o una parte del mismo, una muestra de órgano o parte del mismo, una o más células obtenidas/derivadas de un organismo procariota o eucariota, una población de células y sus componentes estromales no celulares asociados, una célula neoplásica o población de células neoplásicas, una muestra de tejido de cualquier órgano o tejido de un sujeto, un tumor, una masa sólida o una población "líquida" de células, células de cualquier cáncer del sistema hematopoyético incluyendo células leucémicas, los derivados celulares circulantes de los tumores sólidos y una célula o población de células que ha metastatizado.

En otro aspecto, se describe un procedimiento para tratar cáncer en un sujeto que comprende realizar el procedimiento de la invención en la muestra de prueba del sujeto y que incluye radioterapia en el tratamiento de dicho cáncer en el sujeto si se determina que el cáncer es sensible a radiación.

En otro aspecto, se describe un procedimiento para tratar cáncer en un sujeto que comprende realizar el procedimiento de la invención en una muestra de prueba del sujeto y que no incluye radioterapia en el tratamiento de dicho cáncer en el sujeto si se determina que el cáncer es resistente a la radiación.

Preferentemente, el sujeto comprende un sujeto mamífero o humano normal, un sujeto mamífero o humano normal en necesidad de un tratamiento o profilaxis, un sujeto diagnosticado con un cáncer, un sujeto sospechoso de tener un cáncer/neoplasia, un sujeto que experimenta tratamiento y/o profilaxis para cualquier trastorno incluyendo cualquier cáncer, un sujeto asintomático que ha experimentado una prueba o barrido indicativo de una condición subyacente, un sujeto sintomático que ha experimentado una prueba o barrido indicativo de una condición subyacente, un sujeto que experimenta tratamiento clínico que incluye terapia de cáncer, o intervención clínica en la forma de fármacos, quimioterapia, inmunoterapia, cirugía, radiación o dispositivos terapéuticos, o un sujeto que aún no experimenta ningún tratamiento clínico.

Preferentemente, la muestra control comprende o deriva de una célula, una población de células, uno o más organismo u organismos unicelulares, una muestra de tejido, o parte del mismo, una muestra de órgano parte del mismo, una o más células obtenidas/derivadas de un organismo procariota o eucariota, una población de células y sus componentes estromales no celulares asociados, una célula neoplásica o población de células neoplásicas, una muestra de tejido de cualquier órgano o tejido de un sujeto, un tumor en el que el tumor por ejemplo, es una masa sólida o una población "líquida" de células, cualquier cáncer del sistema hematopoyético incluyendo células leucémicas, los derivados celulares circulantes de tumores sólidos, o una célula o población de células que ha metastatizado.

En una realización, la muestra control y/o la muestra de prueba comprende o deriva de una célula, una población de células una muestra de tejido de un tumor/neoplasia de cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de los testículos incluyendo seminoma, linfoma que incluye linfoma de células B, cáncer de pulmón de células microcíticas, cáncer del cerebro incluyendo glioblastoma multiforme, mesotelioma, o melanoma.

En otro aspecto, se describe un procedimiento para determinar la probabilidad de que vuelva a producirse un cáncer después del tratamiento con radiación que comprende:

(a) cuantificar el nivel de manganeso en una región 3D de una muestra de prueba del cáncer al seleccionar una región 2D de la muestra de prueba, en la que la región 2D se define topográficamente por un sistema de coordenadas $X': Y'$ en la que X' es la longitud de la región 2D e Y' es la amplitud de la región 2D, en la que la región 3D corresponde a la región 2D y tiene una altura seleccionada representada por Z , en la que la región 3D se divide en tres o más vóxeles de un volumen predefinido, definiéndose el volumen de cada vóxel por $XxYxZ$, donde X es la longitud del vóxel y es la amplitud del vóxel y Z es la altura del vóxel y la cuantificación del nivel de manganeso en cada vóxel;

(b) identificar en la región 2D que corresponde a las coordenadas X e Y del vóxel, regiones metalómicas altas (HMR), que son regiones en las cuales el nivel de manganeso es más alto que las áreas circundantes como se permite por los umbrales estadísticos que son múltiplos de una tendencia central o cualquier aproximación entre números enteros;

en el que cuanto más alta es la frecuencia de HMR mayor es la probabilidad de que vuelva a producirse el cáncer y cuanto más baja es la frecuencia de HMR menor es la probabilidad de que vuelva a producirse el cáncer.

Preferentemente, las HMR también se identifican en la región 2D de la muestra de prueba teñida con una tinción que distingue las células cancerosas de los componentes estromales y preferentemente la tinción es tinción con hematoxilina y eosina (H&E).

En el contexto de la presente invención, la radio-sensibilidad es una medida de sensibilidad/resistencia al tratamiento

con radiación.

5 En un ejemplo, la muestra de prueba se determina que es sensible a tratamiento con radiación si el ATI de la muestra de prueba está por debajo de un valor umbral predeterminado obtenido con la muestra control que se sabe que es sensible a la radiación. En otro ejemplo, la muestra de prueba se determina que es resistente al tratamiento con radiación si el ATI de la muestra de prueba está por encima de un valor umbral predeterminado obtenido con la muestra control que se sabe que es resistente a la radiación.

En una realización de la invención, las muestras de prueba con un ATI en o por debajo de un límite umbral inferior se determina que son sensibles al tratamiento con radiación y las muestras de prueba en o por encima de un límite umbral superior se determina que son resistentes a la radiación.

10 El volumen de los vóxeles que comprenden el patrón de referencia o la muestra control puede ser el mismo o diferente al volumen de los vóxeles de la muestra de prueba.

15 La presente invención proporciona además un procedimiento de acuerdo con la invención en el presente documento, en el que un ATI se genera al cuantificar el nivel de manganeso en más de una región 3D de la muestra de prueba y calcular el nivel de tendencia central de manganeso a través de todas las regiones 3D para generar de esta manera un ATI adicional.

La presente invención proporciona además un procedimiento de acuerdo con la invención en el presente documento, en el que un ATI se genera al cuantificar el nivel de manganeso en más de una muestra de prueba, al calcular el nivel de tendencia central de manganeso a través de las muestras de prueba para generar de esta manera un ATI adicional.

20 La presente invención proporciona además un procedimiento de acuerdo con la invención en el presente documento, en el que el nivel de manganeso cuantificado en una región 3D de la muestra control se cuantifica concurrentemente, o de manera secuencial en cualquier orden, cuando la muestra de prueba se está cuantificando, o lado a lado con la muestra de prueba.

También se contempla que la muestra control pueda añadirse a la muestra de prueba para análisis.

25 El indicador terapéutico atómico (ATI) puede expresarse en cualquier unidad. Por ejemplo, puede expresarse en recuentos calibrados/segundo (CC/S), o una unidad de concentración proporcional equivalente, tales como microgramos/gramo, miligramos/kilogramo, partes por millón, microgramos/vóxel, miligramos/vóxel, moles o moles/vóxel.

30 Hasta la presente invención, no se percató que el ATI de una muestra sensible a la radiación, por ejemplo, célula/tejido, célula neoplásica/tumor, puede distinguirse del ATI de una muestra que es resistente a la radiación, por ejemplo, célula/tejido, célula neoplásica/tumor. Esta distinción cuantitativa permite la determinación de la radio-sensibilidad (es decir, una determinación de sensibilidad a la radiación y/o resistencia a la radiación) para una célula seleccionada determinada, muestra de tejido o parte del mismo, célula neoplásica, o muestra de tumor o parte del mismo. Será evidente para una persona experta en la materia que el término "célula" incluye célula neoplásica y la expresión "muestra de tejido o parte del mismo", incluye una muestra de tumor o parte del mismo. El término "neoplásica" como se usa en el presente documento, incluye cualquier cambio en una célula que contribuye a potencial para dar lugar a un crecimiento anormal de células, ya sea cancerosa o precancerosa.

35 El término "tumor" como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a, una recolección de una o más células neoplásicas y/o su componente estromal asociado en ese nicho. Por ejemplo, en el caso de cáncer de próstata metastásico al hueso, un tratamiento con radiación usado antes de la presente invención, es el uso de ²²³Radio que tiene su diana preferida, hidroxapatita (Ca₅(PO₄)₃OH), un componente principal de hueso. El ²²³Radio eficientemente "regresa" al hueso. Cuando las células cancerosas de próstata, de mama, o cualquier otra célula de cáncer metastatiza al hueso, las células cancerosas llegan a entremezclarse con hidroxapatita. La emisión de partícula alfa de corto alcance destruye osteoblastos, pero no afecta directamente las células cancerosas en sí mismas. Por lo tanto, en este caso, la supresión de factores producidos por el estroma (osteoblastos), que normalmente permite que las células cancerosas de próstata crezcan en este nicho, se interrumpe y las células cancerosas no crecen tampoco y se aumenta la supervivencia del paciente. En consecuencia, un experto en la materia entenderá que los diferentes nichos estromales soportan las células cancerosas a una extensión diferente y aquellos nichos en sí pueden variar también en su contenido metalómico, todo el camino desde muy alto hasta muy bajo y también pueden ser radio-sensibles o radio-resistentes. De esta manera cuando se aplica radiación a un "tumor", existen cuatro posibilidades tipo condición de límite. Si tanto las células estromales como de cáncer son radio-resistentes, después la radiación para el "tumor" no es eficaz y el tumor puede experimentar crecimiento adicional. Si tanto las células estromales como de cáncer son radio-sensibles, después se detiene el crecimiento de un tumor. Si las células estromales son radio-sensibles y las células cancerosas son radio-resistentes, las células estromales se aniquilan efectivamente por radiación y también se detiene el crecimiento de las células tumorales, debido a que ahora no tienen ningún soporte metabólico/de factor de su estroma y de esta manera el tumor no crece. Si las células estromales son radio-resistentes y las células cancerosas son radio-sensibles, se detiene el crecimiento de tumor. Por consiguiente, la persona experta en la materia entenderá que el término "tumor o parte del mismo" incluye células tumorales y/o células estromales asociadas en su diversidad completa (vasos sanguíneos, infiltración y células inmunitarias residentes, fibroblastos, pericitos y

exosomas infiltrantes).

La determinación del nivel de manganeso en una región 3D seleccionada de acuerdo con cualquier aspecto, realización o ejemplo descrito en el presente documento incluye, pero no se limita a, realizar una medición directa en la muestra de prueba, patrón de referencia y/o muestra control, por ejemplo, la célula, muestra de tejido o parte del mismo, célula neoplásica, muestra de tumor o parte del mismo. En un ejemplo, la muestra de prueba y/o la muestra control se puede procesar directamente en su entorno natural, por ejemplo, por barrido directo y cuantificación de los niveles de manganeso en una región 3D seleccionada de la muestra de prueba y/o muestra control de acuerdo con procedimientos conocidos. En otro ejemplo, la muestra de prueba y/o muestra control que comprende o deriva de, por ejemplo, una célula, muestra de tejido o parte del mismo, célula neoplásica, muestra de tumor o parte del mismo se prepara para examinación microscópica o para análisis automatizado por barrido automático de acuerdo con los procedimientos conocidos. La célula, muestra de tejido o parte del mismo, célula neoplásica, muestra de tumor o parte del mismo puede congelarse instantáneamente, o puede fijarse con formalina y puede embeberse parafina, o una o más células se depositan como una monocapa o casi monocapa en un portaobjetos microscópico, por ejemplo, mediante un sistema tipo SurePath. La muestra de tejido/tumor o parte del mismo, también puede tratarse por lo cual se obtiene una célula o población de células del mismo y se deposita como una monocapa o casi monocapa en un portaobjetos para microscopio, por ejemplo, mediante un sistema tipo SurePath. Las secciones de la célula, muestra de tejido o parte del mismo, célula neoplásica, muestra de tumor o parte del mismo después se tratan de acuerdo con procedimientos conocidos para preparar la sección para examinación microscópica o para análisis automatizado mediante barrido automático. Opcionalmente, una o más secciones o secciones se tiñen con tinción H&E y/o anticuerpos específicos para visualizar aspectos morfológicos de interés. En un ejemplo, una o más secciones secuenciales se fijan sin teñir y se usan directamente para la determinación del nivel de manganeso de acuerdo con la invención. En otro ejemplo, una o más sección o secciones se preparan secuencialmente, por ejemplo, se hacen coincidir y al menos una se tiñe con tinción H&E y/o anticuerpos específicos para visualizar aspectos morfológicos de interés y las secciones teñidas se preparan junto a secciones no teñidas, por ejemplo, se preparan secciones secuenciales, en las que al menos una puede teñirse como se describe en el presente documento y al menos una está sin teñir. La sección teñida primero puede visualizarse después puede usarse directamente para la determinación del nivel de manganeso de acuerdo con la invención, o la sección teñida se prepara de acuerdo procedimientos convencionales en la técnica y se visualiza por un patólogo para determinar aspectos morfológicos y una sección no teñida que coincida, por ejemplo, sección secuencial, se elige y se usa para la determinación del nivel de manganeso de acuerdo con la invención.

El nivel de manganeso de acuerdo con la invención se determina por cualquier procedimiento conocido en la técnica que permite que la región 3D seleccionada se defina topográficamente por un sistema de coordenadas X':Y':Z y se divide en vóxeles de volumen predeterminado. Por ejemplo, el nivel de manganeso se mide en un vóxel de un nivel predefinido y el mismo o diferente volumen pre-definido puede usarse para el patrón de referencia o la muestra control.

Una persona experta en la materia entenderá que el ATI puede obtenerse para varios surcos de ablación que comprenden más de un vóxel. Por ejemplo, el número de surcos de ablación puede ser cualquier número que es concebible para procesarse e incluye, pero no se limita a, aproximadamente 1 a 100 surcos de ablación. En un ejemplo, el número de surcos de ablación es al menos 3. La longitud del surco de ablación también puede variar y comprende cualquier número de vóxeles de acuerdo con la invención.

Un experto en la materia apreciará que el número de vóxeles variará basándose en el tamaño de vóxel. Por ejemplo, la longitud de surco puede ser cualquier longitud que permita la instrumentación usada. En un ejemplo, la longitud de surco puede estar entre 0,5 y 1,0 cm. En otro ejemplo, la longitud de surco es aproximadamente 5,0 cm, o aproximadamente 5,35 cm de longitud. Por ejemplo, un surco individual en el que cada vóxel es aproximadamente 35 (longitud)x35(amplitud)x5(altura) con un volumen de 6125 micrómetros cúbicos y producirá aproximadamente 1500 vóxeles de análisis con base en una longitud de surco de 5,35 cm. También se contempla que, de acuerdo con la invención, una o más áreas de una muestra se extirpan para generar un ATI de acuerdo con cualquier aspecto, realización o ejemplo en el presente documento. Por ejemplo, un experto en la materia apreciará que un área de un 1 mm por 1 mm se usa típicamente por patólogos para medir la tasa mitótica en un portaobjetos y esta área también se puede extirpar de acuerdo con la invención. En este ejemplo, esta área corresponde a un área de aproximadamente 30 vóxeles por 30 vóxeles en los que cada vóxel es aproximadamente 35 (longitud)x35(amplitud)x5(altura) con un volumen de 6125 micrómetros cúbicos. Se contempla adicionalmente que la definición de un área mínima para el análisis dependerá de la sensibilidad del procedimiento de detección. Por ejemplo, el tamaño del área puede variar de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 etc., vóxeles contiguos, a un número entero que es el tamaño de muestra elegido para el análisis de ese tumor particular. Una persona experta en la materia apreciará que el área de tamaño de acuerdo con la invención está en cualquier intervalo medible usando la tecnología existente.

También se entiende que la determinación del nivel de manganeso de acuerdo con la invención puede corregirse para el fondo. Por ejemplo, en el caso de espectrometría de masas con ablación de láser, puede usarse una región sin la muestra de prueba y/o muestra control para corrección de fondo. Por ejemplo, una muestra de prueba y/o muestra control en un portaobjetos puede someterse a ablación con láser directamente y el fondo en un área del portaobjetos sin la muestra de prueba y/o muestra control se usa para la corrección de fondo.

En una o más realizaciones se establece la corrección de fondo a un nivel que permite que se revelen las regiones de contenido metalómico particularmente alto. Estas regiones se conocen como regiones metalómicas altas (HMR).

Una persona experta en la materia apreciará que el vóxel de la muestra de prueba, patrón de referencia y/o muestra control de acuerdo con la invención está en cualquier intervalo medible usando la tecnología pertinente. Por ejemplo, X está en cualquier intervalo medible y, como se indica anteriormente, está preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1 micrómetro a aproximadamente 200 micrómetros y cualquier valor entre los mismos. En un ejemplo, X se selecciona de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 micrómetros y cualquier valor entre los mismos. Preferentemente, X es aproximadamente 35 micrómetros. Por ejemplo Y está en cualquier intervalo medible y preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1 micrómetro a aproximadamente 200 micrómetros y cualquier valor entre los mismos. En un ejemplo Y se selecciona de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 micrómetros y cualquier valor entre los mismos. Preferentemente Y es aproximadamente 35 micrómetros. Por ejemplo, Z está en cualquier intervalo medible y preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1 micrómetro a aproximadamente 200 micrómetros y cualquier valor entre los mismos. En un ejemplo, Z se selecciona de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 micrómetros y cualquier valor entre los mismos. Preferentemente, Z es aproximadamente 1, o aproximadamente 2, o aproximadamente 3, o aproximadamente 4, o aproximadamente 5, o aproximadamente 6, o aproximadamente 7, o aproximadamente 8, o aproximadamente 9, o aproximadamente 10 micrómetros. Una persona experta en la materia apreciará que las coordenadas X' e Y' definen el área 2D selecciona de la muestra de muestra y Z representa el espesor de la muestra de prueba. En consecuencia, como se indica anteriormente, el vóxel de acuerdo con la invención, por ejemplo, XxYxZ, incluye, pero no se limita a, un intervalo seleccionado de aproximadamente 1 a 200 : 1 a 200 : 1 a 20 micrómetros cúbicos y cualquier valor entre los mismos. Por ejemplo, el valor X es aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199 o 200 micrómetros o cualquier aproximación entre números enteros. Por ejemplo, el valor Y es aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199 o 200 micrómetros o cualquier aproximación entre números enteros. Por ejemplo, el valor Z es aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 micrómetros o cualquier aproximación entre números enteros. En consecuencia, cualquiera de cada valor X listado puede combinarse con cualquiera de cada valor Y listado, que después puede combinarse con cualquiera de cada valor Z listado. También se entenderá que X, Y y Z pueden no ser iguales en longitud. De manera alternativa, X y Y y Z pueden ser iguales en longitud. En otro ejemplo, X e Y son iguales en longitud y Z no es igual a X e Y. En otro ejemplo, X y Z son iguales en longitud e Y no es igual a X y Z. preferentemente, X e Y son iguales en longitud. Por ejemplo, el vóxel es aproximadamente 1x1x1, o aproximadamente 5x5x1, o aproximadamente 10x10x1, o aproximadamente 15x15x1, o aproximadamente 20x20x1, o aproximadamente 25x25x1, o aproximadamente 30x30x1 o aproximadamente 35x35x1 o aproximadamente 40x40x1 o aproximadamente 45x45x1 o aproximadamente 50x50x1 o aproximadamente 55x55x1 o aproximadamente 60x60x1 o aproximadamente 65x65x1 o aproximadamente 70x70x1, o aproximadamente 1x1x2, o aproximadamente 5x5x2, o aproximadamente 10x10x2, o aproximadamente 15x15x2, o aproximadamente 20x20x2, o aproximadamente 25x25x2, o aproximadamente 30x30x2 o aproximadamente 35x35x2 o aproximadamente 40x40x2 o aproximadamente 45x45x2 o aproximadamente 50x50x2 o aproximadamente 55x55x2 o aproximadamente 60x60x2 o aproximadamente 65x65x2 o aproximadamente 70x70x2, o aproximadamente 1x1x3, o aproximadamente 5x5x3, o aproximadamente 10x10x3, o aproximadamente 15x15x3, o aproximadamente 20x20x3, o aproximadamente 25x25x3, o aproximadamente 30x30x3 o aproximadamente 35x35x3 o aproximadamente 40x40x3 o aproximadamente 45x45x3 o aproximadamente 50x50x3 o aproximadamente 55x55x3 o aproximadamente 60x60x3 o aproximadamente 65x65x3 o aproximadamente 70x70x3, o aproximadamente 1x1x4, o aproximadamente 5x5x4, o aproximadamente 10x10x4, o aproximadamente 15x15x4, o aproximadamente 20x20x4, o aproximadamente 25x25x4, o aproximadamente 30x30x4 o aproximadamente 35x35x4 o aproximadamente 40x40x4 o aproximadamente 45x45x4 o aproximadamente 50x50x4 o aproximadamente 55x55x4 o aproximadamente 60x60x4 o aproximadamente 65x65x4 o aproximadamente 70x70x4, o aproximadamente 1x1x5, o aproximadamente 5x5x5, o aproximadamente 10x10x5, o aproximadamente 15x15x5, o aproximadamente 20x20x5, o aproximadamente 25x25x5, o aproximadamente 30x30x5 o aproximadamente 35x35x5 o aproximadamente 40x40x5 o aproximadamente 45x45x5 o aproximadamente 50x50x5 o aproximadamente 55x55x5 o aproximadamente 60x60x5 o aproximadamente 65x65x5 o aproximadamente 70x70x5, o aproximadamente 1x1x6, o aproximadamente 5x5x6, o aproximadamente 10x10x6, o aproximadamente 15x15x6, o aproximadamente 20x20x6, o aproximadamente 25x25x6, o aproximadamente 30x30x6 o aproximadamente 35x35x6 o aproximadamente 40x40x6 o aproximadamente 45x45x6 o aproximadamente 50x50x6 o aproximadamente 55x55x6

o aproximadamente 60x60x6 o aproximadamente 65x65x6 o aproximadamente 70x70x6, o aproximadamente 1x1x7, o aproximadamente 5x5x7, o aproximadamente 10x10x7, o aproximadamente 15x15x7, o aproximadamente 20x20x7, o aproximadamente 25x25x7, o aproximadamente 30x30x7 o aproximadamente 35x35x7 o aproximadamente 40x40x7 o aproximadamente 45x45x7 o aproximadamente 50x50x7 o aproximadamente 55x55x7 o aproximadamente 60x60x7 o aproximadamente 65x65x7 o aproximadamente 70x70x7, o aproximadamente 1x1x8, o aproximadamente 5x5x8, o aproximadamente 10x10x8, o aproximadamente 15x15x8, o aproximadamente 20x20x8, o aproximadamente 25x25x8, o aproximadamente 30x30x8 o aproximadamente 35x35x8 o aproximadamente 40x40x8 o aproximadamente 45x45x8 o aproximadamente 50x50x8 o aproximadamente 55x55x8 o aproximadamente 60x60x8 o aproximadamente 65x65x8 o aproximadamente 70x70x8 o aproximadamente 1x1x9, o aproximadamente 5x5x9, o aproximadamente 10x10x9, o aproximadamente 15x15x9, o aproximadamente 20x20x9, o aproximadamente 25x25x9, o aproximadamente 30x30x9 o aproximadamente 35x35x9 o aproximadamente 40x40x9 o aproximadamente 45x45x9 o aproximadamente 50x50x9 o aproximadamente 55x55x9 o aproximadamente 60x60x9 o aproximadamente 65x65x9 o aproximadamente 70x70x9, o aproximadamente 1x1x10, o aproximadamente 5x5x10, o aproximadamente 10x10x10, o aproximadamente 15x15x10, o aproximadamente 20x20x10, o aproximadamente 25x25x10, o aproximadamente 30x30x10 o aproximadamente 35x35x10 o aproximadamente 40x40x10 o aproximadamente 45x45x10 o aproximadamente 50x50x10 o aproximadamente 55x55x10 o aproximadamente 60x60x10 o aproximadamente 65x65x10 o aproximadamente 70x70x10 micrómetros cúbicos. Preferentemente, el vóxel es 35x35x5 micrómetros cúbicos.

Una persona experta en la materia también apreciará que el vóxel o vóxeles del patrón de referencia y la muestra o muestras control pueden ser de cualquier dimensión. Como se indica anteriormente, el patrón o patrones de referencia y la muestra o muestras control pueden ser del mismo volumen que la muestra de prueba o pueden ser de un volumen diferente y el experto en la materia entenderá que los cálculos que comparan la prueba, el patrón o patrones de referencia y la muestra o muestras control deben permitir cualquier variación en el volumen entre la prueba, los patrones de referencia y las muestras control. En consecuencia, como se describe en el presente documento, el vóxel predefinido incluye, pero no se limita a, un intervalo de aproximadamente 1 micrómetro cúbico a aproximadamente 8×10^5 micrómetros cúbicos. Por ejemplo, el vóxel predefinido está en el intervalo de aproximadamente 1 micrómetro cúbico a 10000 micrómetros cúbicos, o aproximadamente 10000 a 100000 micrómetros cúbicos, o aproximadamente 100000 a 800000 micrómetros cúbicos. En un ejemplo, el vóxel predefinido es aproximadamente 1 micrómetro cúbico a 10000 micrómetros cúbicos, o aproximadamente 2000 micrómetros cúbicos a aproximadamente 8000 micrómetros cúbicos. En otro ejemplo, el vóxel es aproximadamente 6125 micrómetros cúbicos.

El mapeo bidimensional (2D) entre la topografía patológica y la topografía atómica, revela la abundancia relativa de manganeso.

El procedimiento de acuerdo con cualquier aspecto, realización o ejemplo de la invención incluye opcionalmente una etapa para obtener o derivar la muestra de prueba de un sujeto. Por ejemplo, la muestra se obtiene de un "sujeto", "participante", o "paciente" denominado en el presente documento "sujeto". La muestra puede ser de un tejido u órgano del sujeto. El sujeto como se describe de acuerdo con cualquier aspecto, realización y/o ejemplo de la invención incluye, pero no se limita a, cualquier sujeto humano o mamífero normal o cualquier sujeto humano o mamífero en necesidad de cualquier tratamiento o profilaxis como se describe de acuerdo con la invención. El sujeto incluye un sujeto diagnosticado con un cáncer, o cualquier forma de cáncer o neoplasia descrita de acuerdo con la invención, o sospechoso de tener un cáncer, o cualquier forma de cáncer o neoplasia descrita de acuerdo con la invención. También se entenderá por una persona experta en la materia que el sujeto puede estar experimentando tratamiento y/o profilaxis para cualquier trastorno que incluye cualquier cáncer. El sujeto puede ser asintomático, pero ha experimentado una prueba o barrido indicativo de una condición subyacente, o también puede ser sintomático. El sujeto incluye aquellos que experimentan tratamiento clínico incluyendo terapia de cáncer, o intervención clínica en forma de fármacos, quimioterapia, inmunoterapia, cirugía, radiación o dispositivos terapéuticos, o aquellos que no están experimentando ningún tratamiento clínico. Los sujetos mamíferos incluyen, pero no se limitan a, simios, gorilas, chimpancés, especies en peligro de extinción, animales de ganado, por ejemplo, vacas, cerdos, caballos y animales de compañía, por ejemplo, perros y gatos.

La muestra control de acuerdo con la invención puede ser cualquier muestra adecuada y preferentemente es una muestra biológica. Por ejemplo, la muestra control puede comprender o puede derivar de una célula, una población de células, uno o más organismo u organismos unicelulares, una muestra de tejido o parte del mismo, una muestra de órgano o parte del mismo, una o más células obtenidas/derivadas de un organismo procariota o eucariota, una población de células y sus componentes estromales no celulares asociados, una célula neoplásica o población de células neoplásicas, una muestra de tejido de cualquier órgano o tejido de un sujeto, un tumor en el que el tumor, por ejemplo, es una masa sólida o una población "líquida" de células, por ejemplo, cualquier cáncer de los sistemas hematopoyéticos incluyendo células leucémicas, o los derivados celulares circulantes de tumores sólidos, o derivados de células tal como exosomas, incluyendo, pero no limitado a, una célula o población de células que ha metastatizado. Preferentemente, la muestra control comprende o deriva de una célula, una población de células, una muestra de tejido "normal", una muestra de tejido de un tumor/neoplasia de cánceres de las pruebas (por ejemplo, seminoma), linfoma (por ejemplo, linfomas de células B), cánceres de pulmón de células microcíticas, cánceres del cerebro (por ejemplo, glioblastoma multiforme/astrocitoma), mesoteliomas, melanomas y cánceres de mama y próstata.

En otro aspecto, se describe un procedimiento de identificación de un cáncer que es probable que vuelva a producirse

después del tratamiento con radiación que comprende:

- 5 (a) cuantificar el nivel de manganeso en una región 3D de una muestra de prueba del tumor al seleccionar una región 2D de la muestra de prueba, en la que la región 2D se define topográficamente por un sistema de coordenadas X':Y', en la que la región 3D corresponde a la región 2D y tiene una altura seleccionada representada por Z, en la que la región 3D se divide en tres o más vóxeles de un volumen predefinido, el volumen de cada vóxel que se define por XxYxZ;
- (b) medir el nivel de tendencia central de manganeso en cada vóxel;
- 10 (c) identificar en la región 2D que corresponde a las coordenadas X e Y del vóxel, regiones metalómicas altas (HMR), que son regiones en las cuales el nivel de manganeso es mayor que en las áreas circundantes como se permite por los umbrales estadísticos que son múltiples de una tendencia central o cualquier aproximación entre números enteros;

en la que cuando la frecuencia de HMR es alta es indicativo de la probabilidad que vuelva a producirse del cáncer después del tratamiento con radiación y en la que cuando la frecuencia de HMR es baja, es indicativo de la probabilidad de que no vuelva a producirse el cáncer después de la radiación.

- 15 En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de acuerdo con la invención, en el que las HMR también se identifican en la región 2D correspondiente de la muestra de prueba teñida con una tinción que distingue las células cancerosas de otras, preferentemente tinción con hematoxilina y eosina (H&E).

En un aspecto adicional, se describe un procedimiento para determinar la radio-sensibilidad de un tumor, comprendiendo el procedimiento determinar el nivel de melanina en una muestra de prueba del tumor, en el que cuanto más bajo es el nivel de melanina, más sensible es el tumor a la radiación y cuanto más alto es el nivel de melanina más resistente es el tumor a la radiación.

20

El procedimiento o uso de acuerdo con cualquier aspecto, realización o ejemplo de la invención incluye opcionalmente una etapa para obtener o derivar la muestra control de un sujeto. Por ejemplo, la muestra control se obtiene de un tejido u órgano de un "sujeto", "participante", o "paciente" conocido en el presente documento como "sujeto". El sujeto como se describe de acuerdo con cualquier aspecto, realización y/o ejemplo de la invención incluye, pero no se limita a, cualquier sujeto humano o mamífero normal o cualquier sujeto humano o mamífero en necesidad de cualquier tratamiento o profilaxis como se describe de acuerdo con la invención. El sujeto incluye un sujeto diagnosticado con un cáncer, o cualquier forma de cáncer o neoplasia/tumor descrito de acuerdo con la invención, o sospechoso de tener un cáncer, o cualquier forma de cáncer o neoplasia/tumor descrito de acuerdo con la invención. También se entenderá por una persona experta en la materia que el sujeto puede estar experimentando tratamiento y/o profilaxis para cualquier trastorno incluyendo cualquier cáncer. El sujeto puede ser asintomático, pero ha experimentado una prueba o barrido indicativo de una condición subyacente, o también puede ser sintomático. El sujeto incluye aquellos que experimentan tratamiento clínico incluyendo terapia de cáncer, o intervención clínica en forma de fármacos, quimioterapia, inmunoterapia, cirugía, radiación o dispositivos terapéuticos, o aquellos que no están experimentando ningún tratamiento clínico. Los sujetos mamíferos incluyen, pero no se limitan a, simios, gorilas, chimpancés, especies en peligro de extinción, animales de ganado, por ejemplo, vacas, cerdos, caballos y animales de compañía, por ejemplo, perros y gatos. La muestra control también puede obtenerse de otras especies incluyendo, pero no limitado a, especies aviares tales como pollo, pato o ganso.

25

30

35

Se entenderá por la persona experta en la materia que todos los tipos de radiación se contemplan en cualquier aspecto, realización o ejemplo descrito en el presente documento, por ejemplo, rayos beta, rayos alfa, rayos gamma, a base de protones o fotones. Cualquier tipo de radiación que ioniza el agua independientemente de cualquier otro efecto primario. Por ejemplo, ¹³¹Yodo para irradiar internamente los tumores raros de la glándula tiroidea, o braquiterapia mediante siembras insertadas para cáncer de próstata usando ¹⁰³Paladio o ¹²⁵Yodo radioactivo, todos conducen a radiólisis de agua mediante rayos X de baja energía, o dicloruro de ²²³Radio para metástasis para lesiones de hueso que irradian mediante partículas alfa. De manera similar, la braquiterapia de alta dosis que comprende la inserción temporal de agujas que contienen ¹⁹²Iridio, funciona mediante exactamente el mismo mecanismo. Sin desear unirse a ninguna teoría particular, mientras que el enfoque en la técnica ha estado en la reparación de ADN, se piensa que el daño de proteínas puede ser la cuestión y los problemas de ADN pueden ser secundarios. Diversos iones dañinos provocan los principales problemas celulares mediante daño a las proteínas.

40

45

Las medidas comunes de tendencia central son la mediana, media aritmética y moda. Cualquier otra medida de tendencia central conocida en la técnica también puede usarse, incluyendo, pero no limitado a media geométrica, mediana-media, media k-veces winsorizada, media recortada k-veces y media ponderada y los datos también pueden transformarse antes de calcular una tendencia central.

50

Hasta la presente invención, la importancia clínica de manganeso no se ha reconocido y el manganeso no se ha cuantificado a fin de determinar la radio-sensibilidad/radio-resistencia de una muestra de prueba a fin de tomar decisiones clínicas con respecto al tratamiento con radiación.

55

Se entenderá que "sensibilidad a la radiación" o "sensible a la radiación" como se usa en el presente documento

significa que las células se aniquilan o bien se incapacitan de tal manera que no se dividen adicionalmente cuando se exponen a radiación. “Resistente a la radiación” o “resistente a radiación” como se usa en el presente documento significa que una o más células permanecen viables después del tratamiento con radiación y aún es/son capaces de dividirse permitiendo la supervivencia del tumor y las células estromales para repoblar el sitio irradiado - esto sería indicativo que, si se trata con radiación, el tumor primario, o sus derivados metastásicos en el sujeto, es probable que permanezcan capaces de crecer y/o metástasis adicional.

Se entenderá que el nivel de manganeso en la muestra de prueba puede compararse con el nivel de manganeso en uno o más patrón o patrones de referencia para calcular el ATI de acuerdo con la invención.

El ATI umbral para su uso de acuerdo con la invención será evidente para la persona experta en la materia que selecciona la muestra de prueba, el patrón o patrones de referencia y/o controles para análisis. Se entenderá que el umbral o umbrales de ATI pueden estar basados en niveles conocidos o derivados de CC/S para radio-sensibilidad derivada de una muestra o muestras control en los que la muestra o muestras control comprenden células del mismo tipo de cáncer que aquel de la muestra de prueba. Por ejemplo, como se muestra como ejemplo en el presente documento, un umbral de radio-sensibilidad puede establecerse en recuentos calibrados 2K por segundo (CC/S) para ^{55}Mn , que se aplica a un vóxel de 35x35x5 micrómetros cúbicos. El mismo umbral numérico puede establecerse en 8K CC/S con base en un vóxel de 70x70x5 micrómetros cúbicos. El umbral también puede establecerse, por ejemplo, en 1 desviación estándar por encima del valor de tendencia central (preferentemente la media o mediana) obtenida por las muestras de control sensibles a la radiación, o 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9 o 4,0 desviaciones estándar, o cualquier aproximación entre números enteros. Un umbral también puede establecerse por determinación empírica de diferentes tipos de tumor. Como se muestra por ejemplo en el presente documento, el uso de melanoma como un ejemplo, el umbral puede establecerse en un factor de 1,0x, 1,1x, 1,2x, 1,3x, 1,4x, 1,5x, 1,6x, 1,7x, 1,8x, 1,9x, 2,0x, 2,1x, 2,2x, 2,3x, 2,4x o 2,5x por encima del valor de tendencia central (preferentemente la mediana o media), o cualquier aproximación entre números enteros. Una persona experta en la materia apreciará que el valor, en la mayoría de los casos, incluirá permitir los valores “de fondo” en una muestra determinada. Por ejemplo, cualquier ATI de muestra de prueba que cae por debajo del umbral de ATI predeterminado establecido por referencia al ATI del control sensible a la radiación, se considera que es una indicación que la fuente de la muestra de prueba es sensible a radiación; y cualquier ATI de muestra de prueba que cae por encima del umbral de ATI predeterminado establecido por referencia al ATI del control resistente a la radiación, se considera que es una indicación que la fuente de la muestra de prueba es resistente a la radiación.

Como un ejemplo adicional, un umbral de ATI predeterminado que puede usarse para medir la radio-sensibilidad es 2k CC/S, puesto que el 87 % de los valores en la Figura 11 para los tres tipos de tumor radio-sensibles (seminoma, linfoma y pulmón de células microcíticas) cae por debajo de 2K. Para los dos tipos de tumor que se acuerdan clínicamente que son radio-resistentes, es decir, mesotelioma y cerebro, el 86 % de los valores en la Figura 11 cae por encima de 2K CC/S. Sin embargo, el experto en la materia entenderá que un umbral de 2K, mientras que es apropiado en algunas circunstancias, puede no serlo en otras puesto que existirá variación entre los pacientes dependiendo de otros factores, tal como su fondo genético. Por consiguiente, puede establecerse un umbral radio-sensible, en algunas circunstancias, en 3K. La realidad clínica aceptada en oncología es que habitualmente hay dos umbrales para cualquier resultado determinado. Por debajo del primer umbral hay un resultado seguro, por encima del segundo umbral hay un resultado seguro diferente y entre los dos umbrales hay una “zona intermedia” que es clínicamente heterogénea y donde se varía el resultado. En el caso de los datos en la Figura 11, uno podría establecer los dos umbrales en 3K y 4K, con la zona intermedia que es 3K-4K. Estos umbrales llegarán a ser claros conforme más datos radioterapéuticos y metalómicos llegan a estar disponibles.

Estará claro para el experto en la materia que la invención también puede usarse para identificar vóxeles dentro de las regiones 3D de la invención que tienen niveles particularmente altos de metales, incluyendo manganeso. Por ejemplo, también se contempla que al establecer el umbral para un vóxel para que aparezca como positivo para el manganeso en un nivel relativamente alto, pueden identificarse regiones de alto contenido metalómico. Como se usa en el presente documento, cuando se refiere a un metal específico en una región metalómica alta (HMR), la HMR se designa, por ejemplo, $\text{HMR}^{(55}\text{Mn)}$, $\text{HMR}^{(66}\text{Zn)}$, $\text{HMR}^{(56}\text{Fe)}$ y $\text{HMR}^{(63}\text{Cu)}$ respectivamente, refiriéndose $\text{HMR}^{(\text{M})}$ al caso genérico de cualquier metal. Se entenderá por el experto en la materia que la HMR para cualquier metal ($\text{HMR}^{(\text{M})}$) contendrá de manera mínima dos vóxeles adyacentes para completar el criterio de la contigüidad de vóxeles. El tamaño de $\text{HMR}^{(\text{M})}$ puede variar de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 etc. vóxeles contiguos, a un número entero que es el tamaño de muestra elegido para análisis de ese tumor particular.

Una persona experta en la materia apreciará que el tamaño de $\text{HMR}^{(\text{M})}$ de acuerdo con la invención está en cualquier intervalo medible usando tecnología existente. Se apreciará que el número máximo que puede analizarse si se carga un portaobjetos convencional a los bordes con material de tumor dependerá del tamaño de vóxel elegido. Por ejemplo, el tamaño de $\text{HMR}^{(\text{M})}$ puede variar de 2 vóxeles a aproximadamente 800000 vóxeles y cualquier valor entre los mismos basándose en un tamaño de 35 x 35 (longitud por amplitud) micrómetros cuadrados. A modo de ilustración solamente, 8x8 vóxeles (35 x 35 micrómetros cuadrados en 2D) empíricamente elegidos revelaron eficientemente regiones de alto contenido metalómico, como se muestra en los ejemplos. Un entorno que contiene HMR mínimo de 8x8 vóxeles se limita en tanto las direcciones X' como Y'. Por consiguiente, las HMR encima de X8 x Y8 vóxeles

pueden aumentar individualmente por números enteros en las direcciones en 2D X' e Y', produciendo HMR de X[8+1] x Y[8] : X[8] x Y[8+1] : X[8+1] x Y[8+1] : X[8+2] x Y[8] : X[8+2] x Y[8+1] : X[8+2] x Y[8+2] : X[8+1] x Y[8+2] : X[8] x Y[8+2] hasta X[8+n] x Y[8+n] en que n es un número entero que puede variar de 1 a miles, pero preferentemente de 1 a 22, cuando se muestrea una muestra de 30 x 30 vóxeles (en 2D que representa 1 mm²). Se apreciará que el umbral puede establecerse menor que un mínimo de 8 vóxeles. El valor de 8 se ha usado aquí debido a que es una herramienta de búsqueda eficiente empíricamente derivada para HMR.

Una persona experta en la materia apreciará también que una HMR puede aplicarse a células cancerosas en un tumor, o a una región de material celular y no celular, en general conocido como estroma asociado, que a su vez puede existir en un estado "activado" debido a su interacción con las células cancerosas vecinas.

La cantidad de terapia radiación y/o anti-cáncer administrada realmente de acuerdo con la invención típicamente se determinará por un facultativo a la luz de las circunstancias pertinentes, incluyendo la afección a tratarse, en vista de otras opciones tal como quimioterapia e inmunoterapias, la edad, peso y respuesta del paciente individual, la severidad de la condición/síntomas del paciente y similares. La radioterapia incluye, pero no se limita a, radioterapia de cuerpos estereotácticos, braquiterapia y radioterapia de haces externos fraccionados, las terapias con radiación de haces externos (EBRT) incluyen radioterapia modulada en intensidad, radiación conformacional, radiación de cuerpos estereotácticos, radiación de haces de protones, GammaKnife y CyberKnife y la braquiterapia incluye implantación permanente de "semillas" isotópicas radiactivas así como semillas de radioactividad de alta dosis temporal. El tipo de radiación distribuida a un paciente, puede ser a base de fotones o protones y se puede distribuir mediante un acelerador lineal, rayos gamma (de cualquier fuente), mediante siembras radiactivas que comprenden ¹²⁵Yodo, ¹³¹Cesio y ¹³³Cesio o ¹⁰³Paladio, para LDRBT, o ¹⁹²Iridio (para braquiterapia de alta tasa de dosis (HDRBT)), o microesferas de resina de ⁹⁰Itrio o ³²P conjugado a micropartículas de silicio. La radiación también puede distribuirse mediante otras entidades expuestas más adelante (Chellan y Sadler, 2015, Phil. Trans. R. Soc, A.373: 20140182) – por ejemplo, ⁹Be unido a proteína como un estimulante neoantígeno de la respuesta inmunitaria para inmunoterapias combinadas con radiación; ⁸⁹Estroncio para metástasis óseas osteoblásticas; ²²³Radio para tratamiento de metástasis óseas y cáncer de próstata resistente a castración; ⁴⁷Escandio y ⁴⁴Escandio como radionúclidos terapéuticos; ⁵⁹Níquel unido a la superficie del MHC y péptidos para activar la respuesta inmunitaria de células T; ⁹⁰Itrio transformado como diana para receptores de somatostatina para tratamiento de cáncer; ⁹⁶Molibdeno como molibdato como un antioxidante conservante de lípidos y el tratamiento de cáncer de mama y esofágico; administración de ¹⁰¹Rutenio a células cancerosas mediante transferrina sérica; ¹⁰⁵Rodio para metástasis óseas; ¹⁰³Paladio como braquiterapia para cáncer de próstata y melanoma coroideo; ¹⁷⁸Hafnio como nanoesferas para captación eficiente por células tumorales y su mejora de efectos de radiación para sarcomas de tejidos blandos y cáncer de cabeza y cuello; ¹⁸⁴Tungsteno como polioxotungstos como agentes anticancerígenos; ¹⁸⁸Renio y ¹⁸⁶Renio para cáncer de pulmón de células microcíticas y cáncer de próstata; ¹⁹⁰Osmio como imitador de super-óxido y complejos de órgano-osmio-areno como fármacos anticancerígenos; ¹⁹⁵Platino en quimioterapia de cáncer; ¹⁵³Samario para osteosarcoma y cáncer de mama metastásico a huesos; ¹⁶⁶Holmio para terapia de radiación interna; poliaminofosfonatos marcados con ¹⁷⁷Lutetio para metástasis óseas; péptidos marcados con ¹⁷⁷Lutetio y anticuerpos para cáncer de pulmón de células microcíticas; ²²⁵Actinio para cáncer mielóide y su producto de degradación ²¹³Bismuto; ²⁸Sílice que contiene ftalocianina como un fotosensibilizador para aniquilar células cancerosas; ²¹²Plomo que genera ²¹²Bi para radioinmunoterapia en combinación con trastuzumab para unión a HER2 y distribución de la radiación tras la internalización de diferentes tipos de células cancerosas; ³²P como fosfofol para tratar diferentes cánceres; ⁷⁵Arsénico como AS₂O₃ para leucemia promielocítica, carcinoma hepatocelular irextirpable y cáncer de pulmón de células no microcíticas; lintuzumab marcado con ²¹³Bismuto para radioterapia dirigida de leucemia mielóide aguda; ⁷⁹Selenio para quimioprotección de cáncer de próstata; ¹²⁷Yodo y ¹³¹Yodo para cáncer de tiroides; y ²¹¹Astatina para eliminación de células tumorales en el cerebro y en cáncer de ovario recurrente. En otro ejemplo, la sustancia incluye un radio-sensibilizador, tales como, pero no limitado a boro (¹⁰B), Rosa de bengala, 2-desoxi-D-glucosa, o adiciones inmunoterapéuticas que se combinan con radiación (Sharabi y col., Oncology [Williston Park] 2015, 29(5), pii:211304; Formenti, J Natl Cancer Inst 105, 256-265, 2013).

En el contexto de la presente invención, las letras X', Y' y Z' en el término "X'xY'xZ'" se refieren a las dimensiones de una "región 3D" de la muestra y "XxYxZ" se refiere a la longitud por amplitud por altura de la región 3D que proporciona un volumen de la región 3D.

En el contexto de la presente invención, las letras X Y y Z en el término "XxYxZ" se refieren a las dimensiones de un vóxel dentro de una "región 3D" de la muestra y "XxYxZ" se refiere a la longitud por amplitud por altura del vóxel que proporciona un volumen del vóxel.

Por consiguiente, en el contexto de la presente invención, donde aparecen los términos tal como "35x35x5", se refieren a longitud por amplitud por altura y proporcionan una medida de volumen; considerando que cuando aparecen los términos "35x35" se refieren a longitud por amplitud y proporcionan un área (2D).

En otro aspecto, se describe un procedimiento para determinar la radio-sensibilidad de un melanoma, el procedimiento que comprende determinar el nivel de melanina en una muestra de prueba del melanoma, en el que cuanto más bajo es el nivel de melanina en la muestra de prueba más sensible es el melanoma a la radiación y cuanto más alto es el nivel de melanina en la muestra de prueba más resistente es el melanoma a la radiación.

En otro aspecto, se describe un procedimiento para determinar la radio-sensibilidad de un melanoma, el procedimiento que comprende comparar el nivel de melanina en una muestra de prueba del melanoma a un umbral de melanina predeterminado en el que la radio-sensibilidad del melanoma se determina al evaluar si el nivel de melanina en la muestra de prueba está por encima o por debajo del umbral de melanina,

5 en el que si el nivel de melanina en la muestra de prueba está por debajo del umbral de melanina, se determina que el melanoma es sensible a la radiación; y

en el que si el nivel de melanina en la muestra de prueba está por encima del umbral de melanina, se determina que el melanoma es resistente a la radiación.

10 En una o más realizaciones, el nivel de melanina en la muestra de prueba se compara a dos umbrales de melanina predeterminados en los que la radio-sensibilidad del melanoma se determina al evaluar si el nivel de melanina en la muestra de prueba está por encima o por debajo de los dos umbrales, y

en los que si la melanina en la muestra de prueba está por debajo del umbral de melanina inferior el melanoma se determina que es sensible a radiación;

15 en los que si la melanina en la muestra de prueba está por encima del umbral de melanina superior el melanoma se determina que es resistente a radiación; y

en los que si la melanina en la muestra de prueba está entre los dos umbrales de melanina, el melanoma se determina que es parcialmente sensible a radiación.

20 Está dentro de la competencia del experto en la materia establecer el umbral de melanina predeterminado. Los vóxeles que contienen concentraciones de melanina en una sección primero pueden determinarse usando anticuerpos de melanina marcados con metal a la sección que se extirpa mediante cualquier forma de análisis elemental (tal como LA-ICP-EM), mientras que se miden de manera simultánea los niveles de ⁵⁵Mn en los mismos vóxeles. Los vóxeles que contiene un nivel de melanina que excede un nivel umbral del mismo anticuerpo marcado con metal aplicado a una muestra de melanoma amelanótico, son informativos. El porcentaje de los vóxeles melanóticos dentro de una muestra de prueba, junto con una mediana ponderada de aquellos vóxeles proporciona un índice de radio-protección.

25 El experto en la materia observará que los umbrales para melanina pueden establecerse de la misma manera general como para el ATI en términos de una tendencia central, preferentemente la mediana o media, en unidades apropiadas. Debe observarse que ⁵⁵Mn puede medirse de manera simultánea en los mismos vóxeles que aquellos analizados para melanina.

30 Por ejemplo, el umbral puede establecerse en la media o mediana de niveles de melanina en melaninas de una cohorte que ha respondido de manera diferente al tratamiento con radiación (es decir, algunos eran sensibles y algunos resistentes). De manera alternativa, se pueden establecer dos umbrales en cuyo caso, como un ejemplo, pueden establecerse en una o en dos desviaciones estándar de la media de niveles de melanina en un conjunto de melanomas que ha respondido de manera diferente al tratamiento con radiación, por ejemplo, una cohorte en la cual existe un número igual de melanomas sensibles a la radiación y resistentes a la radiación.

35 En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar melanoma en un sujeto que comprende realizar el procedimiento de la invención en una muestra de prueba del sujeto y que incluye radioterapia en el tratamiento del melanoma en el sujeto si el melanoma se determina que es sensible a radiación.

40 En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar melanoma en un sujeto que comprende, realizar el procedimiento de la invención en una muestra de prueba del sujeto y que no incluye radioterapia en el tratamiento del melanoma en el sujeto si el melanoma se determina que es resistente a la radiación.

Salvo que el contexto requiera claramente lo contrario, de principio a fin de la descripción y las reivindicaciones, las palabras "comprende", "que comprende" y similares se van a interpretar en un sentido inclusivo a diferencia de un sentido exclusivo o exhaustivo; es decir, en el sentido de "que incluye, pero no limitado a".

45 A lo largo de toda esta memoria descriptiva, salvo que se indique específicamente lo contrario o el contexto requiera lo contrario, la referencia a una etapa individual, composición de materia, grupo de etapas o grupo de composiciones de materia debe tomarse que abarca uno y una pluralidad (es decir, uno o más) de estas etapas, composiciones de materia, grupos de etapas o grupo de composiciones de materia.

50 Cada aspecto, realización y/o ejemplo de la invención descrita en el presente documento se va a aplicar cambiando lo que haya que cambiar a cada uno y todos los aspectos, realizaciones y/o ejemplos salvo que se indique específicamente lo contrario.

Aquellos expertos en la materia apreciarán que la invención descrita en el presente documento es susceptible a variaciones y modificaciones diferentes de aquellas descritas específicamente. Ha de entenderse que la invención incluye todas estas variaciones y modificaciones. La invención también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos referidos o indicados en esta memoria descriptiva, de manera individual o colectiva y

cualquiera y todas las combinaciones o cualquiera de dos o más de las etapas o características.

La presente invención no se va a limitar en alcance por las realizaciones específicas descritas en el presente documento, que se proponen para el fin de ejemplificación solamente. Los procedimientos, composiciones y productos funcionalmente equivalentes están claramente dentro del alcance de la invención, como se describe en el presente documento.

Se reconocerá por el experto en la materia que los procedimientos de la presente invención no son de ninguna manera de rutina o convencionales en un contenido terapéutico clínico. Actualmente no existe la precisión que proporciona la presente invención. La distinción de tipos de tumor (en particular los ocho tipos de tumor ejemplificados) basándose en, por ejemplo, LA-ICP-EM es completamente nueva; los resultados son inesperados y podrían no haberse predicho a partir de la técnica anterior.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Imagen fotográfica de una sección de tejido marcado con H&E, convencional de 5 micrómetros, de un bloque embebido en parafina fijado con formalina (FFPE, por sus siglas en inglés) de un melanoma maligno en fase Ib del cuello de un varón de 48 años, con los criterios de clasificación TNM de T2aN0M, donde T2 representa la invasión en la muscularis propia; N0 representa ninguna metástasis de ganglio linfático y M0 representa ninguna metástasis distante. Cabe observar que el lado a la derecha superior de esta sección consiste en células tumorales amelanóticas pálidas, mientras que las regiones más oscuras en el lado a la izquierda y la parte inferior de la Figura están compuestas por células que contienen melanina de tinción más oscura y con parches aún más grandes de melanina, tanto intra- como extracelulares, como puntos negros en la parte inferior de la imagen.

Figura 2: Ilustración de tres entidades diferentes de unión a base de manganeso. Debe observarse que un solo $^{55}\text{Mn}^{2+}$ no une las tres entidades de una vez (esta Figura es para fines ilustrativos solamente – tomada de Slade y Radman, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75, 133-191, 2011).

Figura 3: A. Imagen fotográfica de una sección de tejido de 5 micrómetros teñida con H&E de un bloque de una corteza humana normal de una mujer humana de 50 años que muestra las características del tejido cortical normal. Es ilustrativa de una posición de una ablación de tres surcos (tomada de la ablación más grande de tejido de múltiples surcos) que se llevó a cabo en una sección sin teñir adyacente del mismo bloque, pero en un portaobjetos diferente. El área teñida con H&E mostrada en la Figura corresponde al área sin teñir equivalente analizada por LA-ICP-EM en un portaobjetos diferente. B. La señal calibrada de cada uno de los tres metales ^{55}Mn , ^{66}Zn y ^{56}Fe se muestra para cada vóxel en tres surcos contiguos de ablación de una sección de tejido que extirpó 70 vóxeles por surco. C. Representación gráfica de los valores numéricos naturales (de la Figura 3B), en la que cada surco considera de 70 vóxeles de recuentos calibrados por segundo para los tres metales ^{55}Mn , ^{66}Zn y ^{56}Fe en vóxeles adyacentes en cada una de las tres filas de ablación.

Figura 4: A. Imagen fotográfica de una sección de tejido de 5 micrómetros teñida con H&E de un bloque de una mujer humana de 19 años con un neoplasia cerebral como glioblastoma multiforme. El área teñida con H&E mostrada en la Figura corresponde al área no teñida equivalente analizada por LA-ICP-EM en un portaobjetos diferente. B. La señal calibrada de cada uno de los tres metales ^{55}Mn , ^{66}Zn y ^{56}Fe se muestra para cada vóxel en tres surcos contiguos de ablación de una sección de tejido que sometió a ablación 68 vóxeles por surco. C. La representación gráfica de los valores numéricos naturales (de la Figura 4B) de recuentos calibrados por segundo para los tres metales ^{55}Mn , ^{66}Zn y ^{56}Fe en vóxeles adyacentes en cada una de las tres hileras de ablación de la mujer humana con glioblastoma multiforme. El eje Y muestra recuentos calibrados por segundo (CC/S) de ese ion metálico, mientras que el eje X muestra el número de vóxeles de los tres surcos de ablación.

Figura 5: A. Imagen fotográfica de una sección de tejido de 5 micrómetros teñida con H&E de una región diferente del mismo bloque de la mujer humana de 19 años con glioblastoma multiforme mostrada en la Figura 4. B. La señal calibrada de cada uno de los tres metales ^{55}Mn , ^{66}Zn y ^{56}Fe se muestra para cada vóxel de tres Surcos contiguos de ablación de una sección de tejido que extirpó 69 vóxeles por surco. C. Representación gráfica de los valores numéricos naturales (de la Figura 5B) de recuentos calibrados por segundo para los tres metales, ^{55}Mn , ^{66}Zn y ^{56}Fe en vóxeles adyacentes en cada una de las tres hileras de ablación de la mujer humana con glioblastoma multiforme. El eje Y muestra recuentos calibrados por segundo (CC/S) de ese ion metálico, mientras que el eje X muestra el número de vóxeles de los tres surcos de ablación.

Figura 6: A. Imagen fotográfica de una sección de tejido de 5 micrómetros teñida con H&E de un varón humano de 60 años con mesotelioma maligno. B. La señal calibrada de cada uno de los cuatro metales ^{55}Mn , ^{66}Zn , ^{56}Fe y ^{63}Cu se muestra para cada vóxel de tres Surcos contiguos de ablación de una sección de tejido que extirpó 67 vóxeles por surco. C. Representación gráfica de los valores numéricos naturales (de la Figura 6B) de recuentos calibrados por segundo para los cuatro metales, ^{55}Mn , ^{66}Zn , ^{56}Fe y ^{63}Cu en vóxeles adyacentes en cada una de las tres hileras de ablación del varón humano de 60 años con mesotelioma maligno. El eje Y muestra recuentos calibrados por segundo (CC/S) de ese ion metálico, mientras que el eje X muestra el número de vóxeles de los tres surcos de ablación.

Figura 7: A. Imagen fotográfica de una sección de tejido de 5 micrómetros teñida con H&E de un varón de 50 años con melanoma maligno del esófago. B. La señal calibrada de los tres metales ^{55}Mn , ^{66}Zn y ^{56}Fe se muestra para cada

vóxel de las tres Surcos contiguos de ablación de una sección de tejido que sometió a ablación 68 vóxeles por surco. C. Representación gráfica de los valores numéricos naturales (de la Figura 7B) de recuentos calibrados por segundo para los tres metales, ^{55}Mn , ^{66}Zn y ^{56}Fe en vóxeles adyacentes en cada una de las tres hileras de ablación del varón humano de 50 años con melanoma maligno del esófago. El eje Y muestra recuentos calibrados por segundo (CC/S) de ese ion metálico, mientras que el eje X muestra el número de vóxeles de los tres surcos de ablación.

Figura 8: A. Imagen fotográfica de una sección de tejido de 5 micrómetros teñida con H&E de un varón de 57 años con linfoma difuso de células B. B. La señal calibrada de cada uno de los tres metales ^{55}Mn , ^{66}Zn y ^{56}Fe se muestra para cada vóxel de tres surcos contiguos de ablación de una sección de tejido que sometió a ablación 79 vóxeles por surco. C. Representación gráfica de los valores numéricos naturales (de la Figura 8B) de recuentos calibrados por segundo para los tres metales, ^{55}Mn , ^{66}Zn y ^{56}Fe en vóxeles adyacentes en cada una de las tres hileras de ablación del varón de 57 años con linfoma difuso de células B en los testículos. El eje Y muestra recuentos calibrados por segundo (CC/S) de ese ion metálico, mientras que el eje X muestra el número de vóxeles de los tres surcos de ablación.

Figura 9: A. Imagen fotográfica de una sección de tejido de 5 micrómetros teñida con H&E representativa de un varón de 38 años con un carcinoma maligno no diferenciado de células microcíticas del pulmón. B. La señal calibrada de los tres metales ^{55}Mn , ^{66}Zn y ^{56}Fe se muestra para cada vóxel de los tres surcos contiguos de ablación de una sección de tejido que sometió a ablación 65 vóxeles por surco. C. Representación gráfica de los valores numéricos naturales (de la Figura 9B) de recuentos calibrados por segundo para los tres metales, ^{55}Mn , ^{66}Zn y ^{56}Fe en vóxeles adyacentes en cada una de las tres hileras de ablación del varón de 38 años con un carcinoma maligno no diferenciado de células pequeñas del pulmón. El eje Y muestra recuentos calibrados por segundo (CC/S) de ese ion metálico, mientras que el eje X muestra el número de vóxeles de los tres surcos de ablación.

Figura 10: Imagen fotográfica de una sección de tejido de 5 micrómetros teñida con H&E representativa de un varón de 52 años con seminoma. B. La señal calibrada de cada uno de los tres metales ^{55}Mn , ^{66}Zn y ^{56}Fe se muestra para cada vóxel de las tres Surcos contiguos de ablación de una sección de tejido que sometió a ablación 79 vóxeles por surco. Figura 10C. Representación gráfica de los valores numéricos naturales (de la Figura 10B) de recuentos calibrados por segundo para los tres metales, ^{55}Mn , ^{66}Zn y ^{56}Fe en vóxeles adyacentes en cada una de las tres hileras de ablación del varón de 52 años con seminoma. El eje Y muestra cuentas las calibradas por segundo (CC/S) de ese ion metálico, mientras que el eje X muestra el número de vóxeles de los tres surcos de ablación.

Figura 11: Representación gráfica de los contenidos medianos totales de manganeso (expresados como recuentos calibrados por segundo, CC/S de ^{55}Mn), en tumores de pacientes con seminoma (55), linfoma (10), carcinoma de células pequeñas del pulmón (20), melanoma (64), cerebro (glioblastoma y astrocitoma) (25) y mesotelioma (10). Cada cuadrado representa un paciente individual excepto en los melanomas, donde dos de los 64 pacientes tuvieron dos linajes principales dentro de sus tumores y cada linaje se representó de manera separada en el histograma con un cuadrado.

Figura 12: Representación bidimensional de surcos de ablación con láser a través de la parte superior de la sección de tejido mostrada en la Figura 1 de uno de los pacientes de melanoma cuyo tumor tuvo dos linajes principales dentro del mismo. Escala; lado a la derecha, (gris oscuro), 0-15000; medio, (blancuzco), 15000-45000; lado a la izquierda, (gris pálido), 45000-150000 recuentos calibrados por segundo.

Figura 13: Representación gráfica de un análisis de los cuatro metales, mostrando los paneles (a), (b), (c) y (d) ^{55}Mn , ^{66}Zn , ^{56}Fe y ^{63}Cu respectivamente del tumor mostrado en la Figura 1.

Figura 14: Imagen fotográfica de una sección de tejido teñida con H&E de un melanoma del dedo índice izquierdo de un varón de 58 años: etapa IV, T4N0M1 (sección superior). Representación bidimensional de surcos de ablación a través del tumor (sección inferior). Escala; gris pálido (valor principal colectivo ^{55}Mn del tumor) 0-2000 CC/S; áreas planas blancuzcas, en general denominadas en el presente documento regiones metalómicas altas (HMR), que en este ejemplo particular corresponden a >6500 recuentos calibrados por segundo.

Figura 15: A. Imagen fotográfica de una sección de tejido teñida con H&E de 5 micrómetros convencional de un bloque embebido en parafina fijado con formalina de un melanoma en el dedo índice izquierdo de varón de 54 años analizado en la Figura 14 que ilustra el tejido y morfología celular. B. Se midió el contenido metalómico de la muestra mostrada en A. La Parte B es una representación bidimensional de niveles de ^{55}Mn en vóxeles individuales de esta sección después de LA-ICP-EM. Dos agrupaciones de vóxeles contiguos de alto contenido de ^{55}Mn , denotaron HMR (^{55}Mn) y se muestra como áreas negras, llegan a ser visibles después de la inspección visual de los datos de la matriz de vóxeles. C. Representación bidimensional de niveles de ^{55}Mn en dos vóxeles individuales de la sección de A y B se analizaron adicionalmente al aplicar un umbral de 2x al valor mediano por vóxel del área total (más el valor de fondo de máquina). Los cuadrados negros muestran aquellos vóxeles que están por encima de este umbral particular (2x mediana). D. La representación bidimensional de los niveles de ^{55}Mn en cada vóxel individual de la sección de A y B se analizó adicionalmente al aplicar un umbral del valor central por vóxel del área total, más la desviación estándar (Desv. Est.), de los valores de vóxel de toda el área, más el valor de fondo de máquina. Los cuadrados negros muestran aquellos vóxeles que están por encima de este umbral particular (media + Desv. Est.).

Figura 16: Panel superior. Imagen fotográfica de la misma sección de tejido teñido con H&E de 5 micrómetros convencional del tumor del paciente de melanoma del panel A de la Figura 15. Panel intermedio. La representación bidimensional de la misma matriz de vóxeles de los valores de ^{55}Mn mostrados en el panel C de la Figura 15 que muestran las dos agrupaciones de vóxeles contiguos que constituyen los HMR (^{55}Mn). Panel inferior. Valores de vóxeles de ^{66}Zn en vóxeles idénticos a aquellos mostrados en el panel intermedio y que usan el mismo criterio de umbral (2x mediana) para ^{66}Zn como para ^{55}Mn .

Figura 17: Representación bidimensional de la distribución y emergencia de HMR (^{55}Mn) en matrices de vóxeles generadas mediante LA-ICP-EM usando diferentes criterios de umbral. Las cuatro secciones de lado izquierdo (T1, T2, T3 y T4) muestran datos de ablación con láser de un área de 31x31 vóxeles de una sección de tejido de 5 micrómetros no teñida estándar de un carcinoma no diferenciado de células pequeñas del pulmón de una paciente mujer de 51 años. Las cuatro secciones de lado derecho (T1, T2, T3 y T4) muestran datos de la ablación con láser de un área de 31x31 vóxeles de un paciente de melanoma de 54 años descrito en las figuras 14 a 16. Los valores umbrales de ^{55}Mn aplicados a los datos de matriz de vóxeles son; T1, 0,5x mediana; T2, 1x mediana; T3, 1,5x mediana y T4, 2x mediana. Los vóxeles oscuros en cada sección son aquellos en los cuales los valores de ^{55}Mn exceden el umbral para esa sección. Los vóxeles individuales no contiguos por encima del umbral se designan singletes, mientras que dos vóxeles contiguos se designan dobletes.

Figura 18: representación bidimensional de la distribución y ninguna emergencia de HMR (^{66}Zn) en matrices de vóxeles generadas mediante LA-ICP-EM para las mismas muestras de los dos pacientes de la Figura 17. Los cuatro paneles del lado derecho (T1, T2, T3 y T4) muestran datos de la ablación con láser de la misma área de 31x31 vóxeles como en la Figura 17 que se analiza simultáneamente para ^{66}Zn , ^{56}Fe y ^{63}Cu . Los datos para ^{66}Zn se muestran. Los cuatro paneles del lado izquierdo (T1, T2, T3 y T4) muestran datos de la ablación con láser de la misma área de 31x31 vóxeles que en la Figura 17. Los valores umbrales de ^{66}Zn aplicados a los datos de matriz de vóxeles son como se usan anteriormente; T1, 0,5x mediana; T2, 1x mediana; T3, 1,5x mediana y T4, 2x mediana. Los vóxeles oscuros en cada sección son aquellos en los cuales los valores de ^{66}Zn exceden el umbral para esa sección.

Figura 19: Histogramas que muestran contenidos de ^{55}Mn de mediana expresados como recuentos calibrados por segundo (CC/S) para ^{55}Mn en muestras sometidas a ablación con láser de tumores de 20 pacientes con carcinomas de células microcíticas del pulmón. Cada cuadrado gris representa el valor mediano calculado de un área total de aproximadamente 1800 vóxeles del tumor de un paciente individual que se muestreo. El histograma superior ilustra 14 pacientes con tumores sin HMR(^{55}Mn). El histograma inferior muestra tumores con HMR(^{55}Mn) de seis pacientes denominados t1 a t6 que se determinaron en el umbral T4 estándar de 2x mediana. Los cuadrados negros son los valores centrales de las HMR(^{55}Mn) encontradas en el tumor de cada uno de los pacientes t1 a t6 determinados usando el umbral t4 estándar de 2x mediana. Los valores de HMR(^{55}Mn) se unen mediante una línea punteada al valor de ^{55}Mn central colectivos de ese tumor para cada uno de los pacientes t1 a t6. Los rangos en el histograma son 200 unidades de CC/S.

Figura 20: Representación esquemática del tamaño, forma y contenido de una muestra seleccionada de las configuraciones contiguas de vóxel en una vista de tumor 2D simulado. Los vóxeles que contienen células cancerosas por encima de un umbral designado se muestran en negro. El panel A ilustra la posición de las ocho posibles configuraciones de vóxeles cuando solo se examinan dobletes de vóxel. Los paneles B y E ilustran una de las muchas posibles configuraciones contiguas de vóxel que satisfacen el criterio de una HMR($^{\text{AM}}$) 8x8 por encima de umbral, donde $^{\text{AM}}$ representa cualquier metal. El panel C ilustra una configuración de vóxel que es solo 7x7 vóxeles que caería por debajo de un umbral mínimo de 8x8. Los paneles D y F ilustran configuraciones de vóxel que serían características de los vasos o conductos linfáticos. El panel G ilustra una configuración de vóxel que es característica de los movimientos de "archivo único" de células cancerosas, o de "intermitencia" significativo de máquina. El panel H es característico de múltiples configuraciones de vóxel vistas en algunos melanomas donde los vóxeles por encima del umbral pueden ser debido a ya sea células con altos niveles de cualquier metal, o gránulos de melanina que se unen a cualquier metal.

Figura 21: Histograma que muestra los contenidos de ^{55}Mn de mediana expresados como recuentos calibrados por segundo (CC/S) de ^{55}Mn en muestras sometidas a ablación con láser de un área total de aproximadamente 1800 vóxeles de tumores de 10 pacientes con linfoma difusa de células B. cada cuadrado gris representa el valor central calculado del tumor de un paciente individual. Los rangos en el histograma son 200 unidades de CC/S.

Figura 22: Histograma de contenidos de ^{55}Mn de mediana expresados como recuentos calibrados por segundo (CC/S) de ^{55}Mn en muestras sometidas a ablación con láser de tumores de 55 pacientes con seminoma clásico. Cada cuadrado gris representa el valor central calculado de un área total de aproximadamente 1800 vóxeles del tumor de un paciente individual. El histograma superior ilustra los 51 seminomas sin HMR(^{55}Mn). El histograma inferior muestra tumores con HMR(^{55}Mn) de cuatro pacientes denominados S4 a S7 que se determinaron en el umbral T4 convencional de 2x mediana. Los cuadrados negros son los valores centrales de las HMR(^{55}Mn) encontradas en el tumor de cada uno de los pacientes S4 a S7. Los valores de HMR(^{55}Mn) se unen mediante una línea punteada al valor de ^{55}Mn central colectivos del tumor de cada uno de los pacientes S4 a S7. Los rangos en el histograma son 200 unidades de CC/S. Los pacientes denominados S1, S2 y S3 son valores atípicos con altos valores de mediana, a pesar de que sus tumores no contienen HMR(^{55}Mn) bajo el umbral convencional.

Figura 23: Un histograma de contenidos de ^{55}Mn de mediana expresados como recuentos calibrados por segundo (CC/S) de ^{55}Mn en muestras sometidas a ablación con láser de tumores de 10 pacientes con mesotelioma. Cada cuadrado gris representa el valor de mediana calculado de un área total de aproximadamente 1800 vóxeles del tumor de un paciente individual. El histograma superior ilustra 9 tumores sin HMR(^{55}Mn). El histograma inferior muestra un tumor con una HMR(^{55}Mn) individual determinada en el umbral T4 convencional de 2x mediana. El cuadrado negro es el valor central de la HMR(^{55}Mn) encontrada en el tumor de un paciente de mesotelioma. El valor de HMR(^{55}Mn) se une mediante una línea punteada al valor de ^{55}Mn de mediana colectivo de ese tumor. Los rangos en el histograma son 200 unidades de CC/S.

Figura 24: Histogramas que muestran contenidos de ^{55}Mn de mediana expresados como recuentos calibrados por segundo (CC/S) de ^{55}Mn en muestras sometidas a ablación con láser de tumores de 25 pacientes con ya sea glioblastoma multiforme o astrocitomas del cerebro. Cada cuadrado gris representa el valor de mediana calculado de un área total de aproximadamente 1800 vóxeles del tumor de un paciente individual. El histograma superior ilustra 24 tumores sin HMR(^{55}Mn). El histograma inferior muestra un tumor con una HMR(^{55}Mn) individual determinada en el umbral T4 convencional de 2x mediana. El cuadrado negro es el valor central de la HMR(^{55}Mn) encontrada en ese tumor. El valor de HMR(^{55}Mn) se une mediante una línea punteada al valor de ^{55}Mn de mediana colectivo de ese tumor. Los rangos en el histograma son 200 unidades de CC/S.

Figura 25: Histogramas que muestran contenidos de ^{55}Mn de mediana expresados como recuentos calibrados por segundo (CC/S) de ^{55}Mn en muestras sometidas a ablación con láser de tumores de 64 pacientes con melanoma. Cada cuadrado gris representa el valor central calculado de un área total de aproximadamente 1800 vóxeles del tumor de un paciente individual, excepto en el caso de los dos pacientes de melanoma cada uno con dos linajes importantes dentro del mismo tumor, donde el área muestreada es menor que 900 vóxeles por linaje. El histograma superior ilustra los tumores sin HMR(^{55}Mn). El histograma inferior muestra los tumores con HMR(^{55}Mn) determinadas en el umbral T4 convencional de 2x mediana. Los cuadrados negros son los valores de mediana de las HMR(^{55}Mn) encontradas en los tumores. Los valores de HMR(^{55}Mn) se une mediante una línea punteada al valor de ^{55}Mn central colectivo de ese tumor. Algunos tumores tienen múltiples HMR(^{55}Mn) y estos se muestran en la misma línea punteada para ese tumor. Los rangos en el histograma son 200 unidades de CC/S. Cabe observar que escala se ha comprimido puesto que muchos valores de CC/S exceden los valores de 10000.

Figura 26: Diagrama esquemático de la estructura polimérica compleja de melanina que se une a los metales usados para análisis en esta aplicación.

Figura 27: Los paneles A y B son imágenes fotográficas de una sección de tejido teñido con H&E de 5 micrómetros convencional de un bloque embebido en parafina fijado con formalina de un melanoma maligno de la pared torácica de una mujer de 45 años que ilustra el tejido y morfología celular. C. Niveles de ^{66}Zn en vóxeles individuales de esta sección con vóxeles contiguos de alto contenido de ^{66}Zn mostrados como áreas negras. D. Niveles ^{63}Cu en vóxeles individuales de esta sección con vóxeles contiguos de alto contenido de ^{63}Cu mostrados como áreas negras. Figura E. Niveles de ^{56}Fe en vóxeles individuales en esta sección con vóxeles contiguos de alto contenido de ^{56}Fe mostrados como áreas negras. F. Niveles ^{55}Mn en vóxeles individuales de esta sección con vóxeles contiguos de alto contenido de ^{55}Mn mostrados como áreas negras.

Figura 28: Histogramas que muestran contenidos de ^{55}Mn de mediana expresados como recuentos calibrados por segundo (CC/S) de ^{55}Mn en muestras sometidas a ablación con láser de un área total de aproximadamente 1800 vóxeles de los tumores de 64 pacientes con el melanoma. Como se describe anteriormente, dos de los 64 pacientes cada uno tuvo dos linajes importantes dentro de sus tumores y cada linaje se representa por separado en el histograma con un cuadrado. Las muestras de melanoma se han agrupado en aquellas que derivan del sitio primario (histograma superior), aquellas que derivan de los ganglios linfáticos, (histograma intermedio) y aquellas que derivan de un sitio distante (histograma inferior).

Figura 29: A. Imagen fotográfica de una sección de tejido teñido con H&E de 5 micrómetros convencional de un bloque embebido en parafina fijado con formalina de un carcinoma de células pequeñas del pulmón de un varón de 54 años que ilustra el tejido y morfología celular de áreas de las células cancerosas de tinción oscura y las regiones estromales de tinción más clara. B. Imagen de relieve 2D de la misma sección con niveles de ^{66}Zn por encima de un umbral seleccionado mostrado en blanco/gris y los componentes estromales por debajo de este umbral mostrados en negro.

Figura 30: A. Imagen fotográfica de una sección de tejido teñida con H&E de 5 micrómetros convencional de un bloque embebido en parafina fijado con formalina de un melanoma maligno del recto de un varón de 66 años que ilustra el tejido y morfología celular de áreas de las células cancerosas de tinción oscura, incluso concentraciones de melanina de tinción aún más oscura y las regiones estromales de tinción más clara. B. Imagen en relieve 2D de la misma sección con niveles de ^{66}Zn por encima de un umbral seleccionado, mostrado en blanco/gris y los componentes estromales por debajo de este umbral mostrados en negro.

Figura 31: Histogramas de contenidos de ^{55}Mn de mediana expresados como recuentos calibrados por segundo (CC/S) de ^{55}Mn en muestras sometidas a ablación con láser de tumores de 15 pacientes con cáncer de mama. Cada cuadrado gris representa el valor de mediana calculado de un área total de aproximadamente 1800 vóxeles del tumor de un paciente individual. El histograma superior ilustra 4 tumores sin HMR(^{55}Mn). El histograma inferior muestra 11

tumores sin HMR (^{55}Mn) determinadas en el umbral T4 convencional de 2x mediana. Los cuadrados negros son los valores de mediana de las HMR (^{55}Mn) encontrados en el tumor de cada uno de los 11 pacientes. Los valores de HMR (^{55}Mn) se unen mediante una línea punteada al valor de ^{55}Mn de mediana colectivos de ese tumor. Algunos tumores tienen múltiples HMR (^{55}Mn) y estos se muestran en la misma línea punteada para ese tumor. Los rangos en el histograma son 200 unidades de CC/S.

Figura 32: A. Imagen fotográfica de una sección de tejido teñido con H&E de 5 micrómetros convencional de un bloque embebido en parafina fijado con formalina de carcinoma bien diferenciado de la mama tomada de una mujer de 39 años que ilustra el tejido y morfología celular. B. Imagen en relieve 2D de niveles de ^{55}Mn en vóxeles individuales de esta sección después de LA-IPC-MS. Múltiples agrupaciones de vóxeles continuos de alto contenido de ^{55}Mn se muestran como áreas negras.

Figura 33: representación bidimensional de distribución y emergencia de HMR (^{55}Mn), pero ninguna emergencia de HMR (^{66}Zn) en matrices de vóxeles generadas mediante LA-ICP-EM usando diferentes criterios de umbral de la mujer de 39 años en la Figura 32. Los cuatro paneles del lado izquierdo (T1, T2, T3 y T4) son datos de ^{55}Mn de ablación de láser de un área 31 x 31 vóxeles de carcinoma de la mama en los diferentes umbrales convencionales (T1, 0,5x mediana; T2 1x mediana, T3 1,5x mediana y T4, 2x mediana). Los cuatro paneles del lado derecho (T1, T2, T3 y T4) son datos de ^{66}Zn de ablación con láser del área idéntica de 31x31 vóxeles y los mismos criterios de umbral. Los vóxeles oscuros en cada sección son aquellos en los cuales los valores de ^{55}Mn o ^{66}Zn excedieron el umbral para esa sección.

Figura 34: Análisis de la variación en la distribución de los valores de vóxel ^{55}Mn y ^{66}Zn en la muestra de cáncer de mama en la mujer de 39 años cuyos datos 2D se presentaron en la Figura 33. El panel A muestra el sesgo del lado derecho de los vóxeles de ^{55}Mn , con la frecuencia de vóxeles en un rango particular en el eje Y y los valores de vóxel en el eje X. El panel B ilustra la distribución simétrica cercana de los valores de vóxel de ^{66}Zn de la misma muestra.

Figura 35: A. Imagen fotográfica de una sección de tejido teñida con H&E de 5 micrómetros convencional de 1 bloque embebido en parafina fijado con formalina de un carcinoma ductal invasivo de la mama de una mujer de 48 años que ilustra el tejido heterogéneo y morfología celular. B. Descripción de las características morfológicas principales de la imagen anterior, que muestra células cancerosas en conductos linfáticos (C1 a C5), conductos normales (N) circundados por adipocitos asociados y una concentración de células inmunitarias, (inmunes), junto con otros componentes estromales.

Figura 36: Los dos paneles superiores son imágenes fotográficas de una sección de tejido teñido con H&E de 5 micrómetros convencional de un bloque embebido en parafina fijado con formalina de un carcinoma ductal invasivo de la mama de una mujer de 48 años de la Figura 35, que ilustra el tejido heterogéneo y la morfología celular. Cuatro paneles inferiores. Imágenes en relieve 2D de la distribución diferencial de los cuatro metales ^{55}Mn , ^{66}Zn , ^{55}Fe y ^{63}Cu en las áreas que contiene adipocitos y en algunas partes de las regiones estromales.

Figura 37: A. Ilustración de los datos clínicos del paciente X con adenocarcinoma de la próstata y un PSA de 8,1 que muestra las anomalías en diferentes regiones de la próstata mostrando 7 de 12 regiones que cambios de poco significado y cinco regiones con "cáncer" como se define por las puntuaciones de Gleason no mayores que 7 (panel superior). B. Resumen de diagnósticos (parte A hasta parte L) de la extensión de la implicación de las doce biopsias de aguja núcleo del paciente X.

Figura 38: Histogramas de contenidos de ^{55}Mn de mediana expresados como recuentos calibrados por segundo (CC/S) de ^{55}Mn en muestras sometidas a ablación con láser de tumores de 10 pacientes con cáncer de próstata. Cada cuadrado gris representa el valor central calculado de un área total de aproximadamente 1800 vóxeles del tumor de un único paciente. Ningún HMR(^{55}Mn) estaba presente bajo las condiciones de umbral convencional de 2x mediana aplicadas en el presente documento.

Figura 39 Imágenes de resonancia magnética del cerebro del paciente Y, un varón de 70 años. A. Presencia de un contraste que potencia la lesión en el lóbulo parietal izquierdo paramedial del cerebro (con flechas) antes del tratamiento con fármacos y radiación. B. MRI de la misma región del cerebro después del tratamiento con fármacos inmunoterapéuticos y radiación. C. Imagen fotográfica de una sección de tejido teñida con H&E de 5 micrómetros convencional de un bloque embebido en parafina fijado con formalina de un melanoma primario del mismo paciente extirpado años antes de los barridos cerebrales. D y E. Ilustraciones de potencia más alta de las regiones de interés analizadas por LA-ICP-EM.

Figura 40: los surcos de señal calibrada (con flecha →) de ^{55}Mn de cinco áreas separadas de células cancerosas del melanoma primario del paciente Y. Hubo seis Surcos contiguos de ablación de vóxeles convencionales de 35 micrómetros x 35 micrómetros en cada área elegida, con longitudes de surcos 19, 19 13, 19 y 19 vóxeles, respectivamente. Los valores numéricos naturales de los recuentos calibrados por segundo para ^{55}Mn se muestran para cada uno de los vóxeles adyacentes en cada una de las seis hileras de ablación.

Figura 41: Panel superior. Paciente Z con un carcinoma escamoso de la región oral antes del tratamiento con radiación. Panel inferior. Paciente Z seis meses después del tratamiento con radiación.

Figura 42: Diagrama de flujo para pacientes de melanoma cuyo tumor o tumores sólidos se analizan por LA-IPC-MS. Las rutas opcionales que proporcionan evidencia para un facultativo con respecto a aconsejar tratamiento con radiación para el paciente, o abstenerse del uso de esta realización, son con base en la homogeneidad o heterogeneidad del ATI. Los puntos clave de decisión se refieren a si los valores de vóxel de ^{55}Mn caen por encima o por debajo de ciertos umbrales designados y el grado de melanización del tumor, en términos de unión de metales.

Figura 43: Diagrama de flujo para los pacientes no de melanoma cuyos tumores sólidos se analizan por LA-ICP-EM. Las rutas opcionales que proporcionan evidencia para un facultativo con respecto a si aconsejar tratamiento con radiación el paciente, o abstenerse del uso de esta realización, son con base en la homogeneidad o heterogeneidad del ATI. Los puntos clave de decisión se refieren a si los valores de vóxel de ^{55}Mn caen por encima o por debajo de ciertos umbrales designados

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

En el trabajo que conduce a la presente invención, el inventor observó que las características espaciales 2D de muchos tumores, en particular, melanoma, varían en gran medida, por ejemplo, como se muestra en la Figura 1 para propósitos comparativos. La Figura 1 muestra una sección de tejido teñida con H&E, de 5 micrómetros convencional de un bloque embebido en parafina fijado con formalina (FFPE) de un melanoma maligno de fase Ib del cuello de un varón de 48 años, con los criterios de clasificación de TNM de T2aN0M0, donde T2 representa la invasión de muscularis propia; N0 representa ninguna metástasis de ganglio linfático y M0 representa ninguna metástasis distante. Cabe observar que el lado derecho superior de esta sección consiste en células tumorales amelanóticas, mientras que las regiones más oscuras en el lado izquierdo y fondo de la Figura se componen de células que contienen melanina de tinción oscura y con parches a un más grandes de melanina, tanto intra- como extracelulares, como puntos negros en la parte inferior de la imagen. Como se describe anteriormente en el presente documento, la diagnosis patológica de estos tumores, que se usa para determinar realizaciones de tratamiento y en las cuales se toma la decisión de si o no se usará radiación, es el análisis subjetivo de estas portaobjetos teñidas con H&E. Mientras que la diagnosis patológica también se ayuda por el sondeo de estas secciones de tejido con un panel de anticuerpos que varía de un tipo de tumor al siguiente tipo, estos resultados también son subjetivos y están lejos de ser cuantitativos. Hasta la presente invención, no había prueba cuantitativa disponible, o una prueba que prediga la sensibilidad o resistencia a la radiación, que ayude al oncólogo a tomar una decisión en sí o no usar radiación como parte de un régimen de tratamiento.

En particular, la Lancet Oncology Commission recientemente presentó nuevas evidencias sobre las cuestiones comprendidas en la expansión del acceso global a la radioterapia (Atun et al, Lancet Oncology 2015, 16, 1153-1186). La misma resaltó la radioterapia como un componente fundamental del control y tratamiento eficaz de cáncer y que en general se usa de manera sub-óptima. Los editores de *Lancet* señalaron que la radioterapia es más escalable que otras realizaciones de tratamiento y se coloca únicamente para distribuir cuidado paliativo y curativo efectivo (Cobun & Collingridge, *Lancet Oncology*, 2015, 16, 1143). Sin embargo, existen dos obstáculos continuos para adaptar la radioterapia a las necesidades del paciente individual.

- Primero y no hasta la presente invención, no ha habido ninguna “prueba cuantitativa” que mida el grado al cual responderá un tumor determinado, en un paciente determinado, a un régimen determinado de radioterapia.
- Segundo, no ha habido ninguna “prueba cuantitativa” que mida el grado al cual cualquier tumor es probable que vuelva a producirse después de la radioterapia.

Hasta la presente invención, las decisiones clínicas eran con base en la técnica médica, no las medidas cuantitativas para determinar la sensibilidad a la radiación.

Sin limitarse por una ninguna teoría particular, el inventor promueve la siguiente explicación para el descubrimiento inesperado que el ATI puede usarse para predecir la sensibilidad a la radiación:

- la radiación ionizante, tales como rayos gamma y rayos x conducen a la radiólisis de agua que conduce a la formación del mismo tipo de entidades químicas en todas las células, sean aquellas células bacterianas, algas, hongos, invertebrados, o los cientos de tipos de células en un cuerpo humano, o tipos de células anormales que surgen como resultado de perturbaciones que conducen a células cancerosas.

La radiólisis genera universalmente los mismos tipos de moléculas reactivas, siendo tres claves:

- el radical hidroxilo OH^{\bullet} , el radical superóxido $\text{O}_2^{\bullet -}$ y peróxido de hidrogeno (H_2O_2) (Daly, M; *Nature Reviews Microbiology*, 7, 237-245,2009).

En células de mamífero sanas normales que no se han irradiado, también se forman las tres mismas moléculas como parte de los procesos respiratorios mitocondriales normales que se presentan mediante la cadena de transporte de electrones mitocondriales. Si el oxígeno recibe menos que su complemento completo de electrones el resultado es la formación de $\text{O}_2^{\bullet -}$ y H_2O_2 . Si el H_2O_2 no se trata de manera inmediata, cualquier átomo de hierro Fe^{2+} extraviado se hará reaccionar con el mismo y generará el radical hidroxilo OH^{\bullet} altamente peligroso

En células de mamífero, el radical superóxido $\text{O}_2^{\bullet -}$ se maneja por sistemas mitocondriales, citosólicos y de enzimas

extracelulares, es decir, superóxido de manganeso dismutasa MnSOD ubicada en la mitocondria, superóxido de cobre-cinc CuZnSOD en el citosol y superóxido dismutasa extracelular ecSOD predominantemente anclado a células endoteliales.

El H_2O_2 se depura por tanto catalasas como glutatión peroxidasa para producir agua y oxígeno molecular.

- 5 El radical hidroxilo OH^\bullet altamente peligroso no se trata por procesos enzimológicos. Un ejemplo de las consecuencias del alto nivel de metabolismo oxidativo está en el cerebro mamífero, donde hace a las células cerebrales muy vulnerables a la peroxidación lipídica de OH^\bullet .

10 El inventor razonó que los elementos químicos y niveles de elementos contribuyen a la radio-sensibilidad, por ejemplo, manganeso. El inventor observó que mientras que una exposición completa de cuerpo de 10 Gray (Gy) es letal para la mayoría de vertebrados, algunas bacterias tal como *D. radiodurans* sobreviven a la dosis en exceso de 17000 Gy. Un mecanismo contribuyente por el cual el mismo puede conseguir esto es que acumula 150 veces más manganeso y 3 veces menos hierro (Fe) que las especies bacterianas sensibles a la radiación (Daly, M; *Nature Reviews Microbiology*, 7, 237-245, 2009. Las especies bacterianas con las relaciones más altas de manganeso a hierro son las más radio-resistentes, considerando que aquellas que las relaciones de Mn/Fe más bajas son hipersensibles. Las bases mecanicistas de la radio-sensibilidad revelan que la acumulación de manganeso protege las proteínas con complejos de hierro-azufre (Fe-S) de radicales superóxido tal como ($O_2^{\bullet -}$) formados durante la irradiación. Esta protección por el manganeso impide la liberación de iones ferrosos (Fe^{2+}) de las proteínas que contienen hierro-azufre, impidiendo de esta manera las interacciones altamente dañinas de Fe^{2+} con peróxido de hidrógeno. Si Fe^{2+} logra reaccionar con H_2O_2 , el resultado es un radical hidroxilo OH^\bullet que es peligroso y oxidará casi cada tipo de molécula biológica.

15 En contraste al peróxido de hidrógeno, $O_2^{\bullet -}$ no cruza fácilmente membranas y por lo tanto se acumula en compartimientos celulares. Por consiguiente, cualquier sistema celular que pueda proteger efectivamente proteínas que contienen Fe-S de la exposición al $O_2^{\bullet -}$ así como que reduce al mínimo la cantidad de Fe^{2+} disponible para la reacción de Fenton reducirá al mínimo el daño después de la irradiación y potenciará la radio-resistencia. El inventor razonó que los datos bacterianos indican que el ion de manganeso es un metal protector y aun en altas concentraciones es en gran medida inocuo a una célula bacteriana y probablemente se tolera bien por muchos tipos de células de organismos multi-celulares. Por el contrario, cualquier sistema bacteriano que sea bajo en manganeso y alto en hierro libre es probable que sea menos capaz de proteger proteínas y lípidos del daño y la reacción de Fenton garantizará que el OH^\bullet dañino disminuirá su nivel que conduce al daño de proteínas y lípidos y la muerte de la célula, por lo tanto, la radio-sensibilidad celular. Una situación similar pertenecerá a las eucariotas.

20 La disponibilidad intracelular del hierro libre se sabe que tiene una función clave en el daño irreversible de proteínas mediante la carbonilación de proteínas. En levadura, los niveles de carbonilación se aumentan cuando la levadura carece de una proteína particular de almacenamiento de hierro, el homólogo del cual es la proteína frataxina localizada en la mitocondria humana. La introducción de la ferritina humana en esta cepa de levadura defectuosa restaura parcialmente la capacidad de almacenamiento de hierro de esta levadura, disminuye los niveles de hierro libre y contrarresta los niveles elevados de carbonilación. Por lo tanto, es probable que las proteínas de almacenamiento de hierro sean elementos importantes al impedir el daño celular después de la radiación ionizante.

25 Se observa que, aunque el radical superóxido $O_2^{\bullet -}$ está altamente cargado, no reacciona con ADN. En su lugar, se hace reaccionar con dianas seleccionadas, siendo estas cualquier grupo expuesto de hierro-azufre (Fe-S) de ciertas proteínas.

30 En resumen, OH^\bullet es extremadamente dañino para todos los componentes celulares, pero el daño colateral que provoca se restringe a unos pocos Angstroms de su sitio de formación debido a su corta vida. H_2O_2 en contraste, puede difundirse de principio a fin de la célula y se hace reaccionar con Fe^{2+} , produciendo una de las más poderosas reacciones oxidantes conocidas. Esta reacción produce más OH^\bullet . Los datos bacterianos revelan que la sensibilidad a la radiación ionizante es una variable biológica continua, que tiene múltiples entradas: de concentración de manganeso celular y de la enzimología asociada que elimina radicales, secuestra hierro libre, reduce el peróxido de hidrógeno y reduce al mínimo y re-fabrica proteínas.

35 Los sistemas *in vitro* han demostrado que la superóxido manganeso dismutasa humana convierte el radical superóxido $O_2^{\bullet -}$ a H_2O_2 y O_2 . En varios sistemas celulares *in vitro* humanos, los niveles de proteínas de MnSOD humanos y actividad se han correlacionado con una resistencia aumentada a la radiación ionizante. De manera similar, la disminución del nivel de proteína de MnSOD y la actividad en sistemas celulares da como resultado radio-resistencia disminuida.

40 Por consiguiente, en circunstancias experimentales cuidadosamente controladas, donde el antecedente genético de las células experimentales y de control se mantiene constante y solo está disponible ya sea el gen introducido, su producto antisentido, o un vector vacío, la proteína de MnSOD mitocondrialmente localizada ayuda a proteger células de los efectos de la radiación ionizante.

45 Solamente existen tres superóxido dismutasas en células humanas que manejan el radical superóxido $O_2^{\bullet -}$ y estas superóxido dismutasas tienen todas diferentes ubicaciones celulares. La superóxido manganeso dismutasa MnSOD

se ubica en la mitocondria, superóxido de cobre-cinc CuZnSOD se encuentra en el citosol y el núcleo, mientras que la superóxido dismutasa extracelular ecSOD está anclada predominantemente a las células endoteliales. Las tres superóxido dismutasas tratan con $O_2^{\cdot-}$ en estas tres ubicaciones diferentes.

- 5 Mientras que se ha enfocado mucha atención en las superóxido dismutasas, la bioquímica y la química básica de los elementos químicos, tales como Mn y Cu, su ubicación y uso dentro de una célula está mucho más extendido que la especificidad de las superóxido dismutasas, por ejemplo, Mn existe en una formación compleja (Daly y col., PLoS ONE, 5, e12570, 2010; Slade y Radman, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 75, 133-191, 2011).

- 10 La Figura 2 ilustra tres entidades diferentes de unión a manganeso. El manganeso forma complejos con ortofosfato y elimina $O_2^{\cdot-}$. El manganeso también forma complejos con péptidos o aminoácidos libres para eliminar y descomponer peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo (OH^{\cdot}) y $O_2^{\cdot-}$. Los nucleósidos, aminoácidos libres y metabolitos orgánicos diversos eliminan los radicales hidroxilo (Slade y Radman, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 75, 133-191, 2011).

Los metales inorgánicos, tal como, hierro, cobre, cinc y manganeso se piensan más comúnmente como cofactores catalíticos para proteínas.

- 15 Independientemente de la sugerencia anterior que los metales tienen una función en la radio-resistencia, hasta la presente invención, el manganeso no se ha cuantificado en un contexto canceroso 2D de un tumor en comparación al normal, por lo cual la radio-sensibilidad/radio-resistencia se determina y se usa posteriormente para tomar decisiones en primer lugar con respecto al tratamiento con radiación y en segundo lugar, para predecir la probabilidad de que vuelva a producirse del tumor después del tratamiento con radiación.

- 20 Todo el hardware y software para llevar a cabo la invención está actualmente disponible de manera tanto comercial como clínica. Será evidente para un experto en la materia que pueden ser útiles variaciones tecnológicas, la preparación de las secciones de tejido, células o poblaciones de células para análisis de acuerdo con la invención se puede realizar de acuerdo con cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, las secciones de tejido no teñidas, secciones congeladas no teñidas, o células depositadas como una monocapa mediante un sistema SurePath se preparan de acuerdo con la técnica y, por ejemplo, como se describe en el presente documento. Cualquier sistema disponible en la técnica puede usarse, por ejemplo, el sistema SurePath produce una monocapa de células en un portaobjetos en un área circular compacta y el material preparado de esta manera sería adecuado para la metodología de LA-ICP-EM. Cualquier procedimiento conocido en la técnica puede usarse para preparar la muestra de prueba y/o la muestra control de la invención siempre que la integridad 2D no se haya perdido. Un número de surcos de ablación se puede hacer, por ejemplo, mediante ablación con láser-tiempo de vuelo-espectrometría de masas (LA-ICP-EM), ablación con láser-tiempo de vuelo-espectrometría de masas (LA-TOF-MS), plasma inductivamente acoplado-espectroscopia de emisión óptica (ICP-OES), plasma de microondas-espectroscopia de emisión atómica (MP-AES), espectroscopia de descomposición inducida por láser (LIBS), espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS), estructura de borde cercano de absorción de rayos X (XANES), espectroscopia de absorción atómica (AA) o fluorescencia de rayos X (XRF).
- 35

Si los valores dentro de un surco individual o múltiples surcos de ablación caen ya sea por encima, o por debajo, de un umbral designado, no hay necesidad de una examinación por un patólogo. Por el contrario, para cualquier surco que se marque por el software de computadora, después el portaobjetos teñido acompañante se examina por un patólogo.

- 40 De manera alternativa, un portaobjetos primero se examina por un patólogo, quien dirigirá donde se deben hacer los surcos preferidos de ablación.

- Se debe observar que un surco individual de ablación (de ancho menor que 110 micrómetros) sometería a ablación un surco de 1 cm de tejido tumoral en aproximadamente 70 segundos. Con respecto a esto, múltiples surcos a través de una muestra tumoral, o múltiples áreas dispersadas dentro del tumor, localizadas y designadas por un patólogo para análisis de ablación posterior, se deben ejecutar en minutos con la tecnología actual.
- 45

- La espectrometría de masas con plasma inductivamente acoplado de ablación con láser (LA-ICP-EM), se introdujo originalmente por Gray, Analyst, 110, 551-556. 1985, que emplea un láser de rubí. Esto se sustituyó posteriormente por Nd:YAG de estado sólido y láseres a base de excímeros. El uso del anterior se describe en Hare, D, y col., Analyst 134, 450-453. 2009 (Tabla 1 de Hare y col., para los parámetros operacionales). Con respecto a los láseres de excímeros, el haz se genera por una mezcla de gas que es una combinación de los gases nobles (argón, criptón o xenón) con un gas reactivo, tales como cloro o flúor. Bajo alta presión y estimulación eléctrica, una pseudo-molécula, (XeCl, KrF o ArF), denominada exciplex, se crea dando lugar a la luz de láser en el ultravioleta.
- 50

- Un sistema popular a base de excímeros en el contexto del LA-ICP-EM, es el Agilent 7700 ICP-MS acoplado a un excímero New Wave que genera una longitud de onda de 193 nanómetros, usándose el primer láser por Gunther y col., J. Anal. At. Spectrom. 12, 939-944, 1977. El análisis elemental de los iones libres se realiza en un LA-ICP-EM, por ejemplo, usando un instrumento ICP-MS serie Agilent Technologies 7700 que está interconectado con una unidad de ablación con láser New Wave Research Excimer 193. Además, el instrumento ICP-MS se ajusta con una célula de
- 55

reacción/colisión de octopolo. Otros instrumentos de ICP-MS también están disponibles incluyendo iCAP^{MR} Q ICP-MS de Thermofisher, Serie de Nexion de Perkin Elmer, Shimadzu ICP-MS 2030, e ICP-TOF-MS de ToFwerk. En lugar de un sistema ICP-MS, el ATI también puede determinarse con técnicas de espectroscopia de emisión atómica tal como plasma inductivamente acoplado-espectroscopia de emisión óptica (ICP-OES), plasma de microondas-espectroscopia de emisión atómica, o espectroscopia de descomposición inducida por láser (LIBS), o espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS), o estructura de borde cercano de absorción de rayos X (XANES), espectroscopia de absorción atómica (AA) o fluorescencia de rayos X (XRF).

El argón (Ar) líquido de alta pureza se usa como el gas vehículo y la fuente de plasma, mientras que el hidrógeno (H₂) de ultra alta pureza (99,999 %) se usa como el gas de reacción. El sistema de LA-ICP-EM se ajusta en una base diaria y tanto para el modo convencional como el modo de reacción usando elementos traza de NIST 612 en vidrio para máxima sensibilidad y para garantizar la baja formación de óxido. La baja producción de óxido se asegura al medir una relación de masa a carga (m/z) de 248/232 (que representa ²³²Th¹⁶O⁺/²³²Th⁺) y es consistentemente menor que 0,3 %. El instrumento se afina bien para el análisis de tejido usando patrones de tejido correspondidos en matriz.

Los parámetros de funcionamiento típicos para el sistema de LA-ICP-EM se dan a continuación y para claridad, se muestran de manera separada para el 7700 IPC-MS y para el láser.

Parámetros de ICP-MS

La potencia de radio frecuencia es 1250,0 vatios; la velocidad de flujo de gas de enfriamiento es 15,0 litros/minuto; la velocidad de flujo de gas portador es 1,2 litros por minuto, la profundidad de muestra es 4 milímetros; la polarización de cuadrupolo es -3,0 voltios; la polarización de octopolo es -6,0 voltios; el tiempo de permanencia es 62 milisegundos por m/z; el lente de extracción 1 es 5,0 voltios; el lente de extracción 2 es -100,0 voltios y el gas de colusión de hidrógeno es 3,1 milímetros por segundo.

Parámetros del láser de excimeros New Wave 193

Longitud de onda 193 nanómetros; frecuencia de repetición 40 hercios; densidad de potencia de láser 0,3 a 0,5 Julios por centímetro cuadrado; diámetro del punto 354 micrómetros; separación de líneas 35 micrómetros; relación de masa/carga monitorizada (m/z), 55 (Mn), 56 (Fe), 63 (Cu) y 66 (Zn). La velocidad de barrido es 140 micrómetros por segundo (cuatro veces 35 micrómetros).

En resumen, un portaobjetos de microscopio de vidrio con una sección no teñida de un tejido particular se coloca en una cámara de ablación y un haz de láser de alta potencia (de diámetro variable) se enfoca en la sección y algo del material biológico se vaporiza como resultado de la transferencia de energía del haz de láser. La materia particulada resultante se mueve por un gas vehículo, que es habitualmente argón, helio, o argón más helio (en el sistema usado para una realización de esta invención es argón), en el plasma inductivamente acoplado que, a una temperatura que excede 7000 grados Celsius, pero por debajo de 10000 grados Celsius, atomiza e ioniza la materia particulada a sus elementos constituyentes. El uso de células de colisión/reacción (Tanner y col., Spectrochim. Acta. Part B, 57, 1361-1452, 2002) reduce al mínimo las interferencias espectrales y "retira" iones poliatómicos tal como especies de oxígeno:argón (¹⁶O⁴⁰Ar⁺) que de otra manera aparecerían como una señal 56 y se atribuirían incorrectamente a ⁵⁶Fe. En la célula de reacción dinámica, los iones poliatómicos interferentes se convierten en una especie diferente a un m/z mayor y ya no interfieren con el ion diana. Después de la emergencia de la célula de colisión, los iones se enfocan en un filtro de masas de cuadrupolo donde se separan por sus relaciones m/z y se detectan y cuantifican.

En lugar de un sistema de cuadrupolo, los sistemas de ICP-MS pueden incorporar un espectrómetro de masas de campo de sensor de enfoque doble, o un analizador de tiempo de vuelo (TOF). Un ICP-TOF-MS tiene una capacidad de adquisición de rendimiento muy alta de 30000 espectros de masa completa por segundo (Resano y col., Mass Spectrom. Rev. 29,-55-78, 2010).

Para generar un mapa elemental 2D del material en un portaobjetos de microscopio, el láser se barre a través de una muestra de lado a lado, un surco a la vez de la parte superior al fondo, donde el surco tiene un ancho elegido. La imagen resultante se visualiza como píxeles adyacentes, pero puesto que el material sometido a ablación tiene profundidad, cada píxel representa un volumen de tejido, un vóxel.

Será evidente para el experto en la materia que la presente invención proporciona las siguientes ventajas:

a) mínima preparación de muestras para evitar los artefactos introducidos;

b) la capacidad de extraer de manera simultánea y rápida datos multi-elementales;

c) la deconvolución de información 2D sobre la estructura del tumor en términos de sus células tumorales, células estromales, vasculatura anormal, células inmunitarias en tránsito y material no celular tal como paquetes de colágeno, todos los cuales forman un medio de interacción que constituye el tumor y que incide en su posición entre el límite inferior de sensibilidad a la radiación y el límite superior de resistencia a la radiación;

d) traduce directamente al uso de, o evasión de, una realización terapéutica, es decir, radiación ionizante para

cualquier tipo de tejido u órgano. Cuando se usa terapia de radiación, la invención determina la probabilidad de que vuelva a producirse del tumor.

e) no es específico para el tipo particular de tumor. Es aplicable para cualquier tumor, localizado o metastásico, benigno o maligno. Como tal, es un pan-diagnóstico. Por ejemplo, una prueba de antígeno específico de próstata mide una entidad circulante individual en la corriente sanguínea que puede ser indicativa de la presencia de un tumor benigno o maligno, o simplemente hiperplasia prostática benigna, o ejercicio extenuante. Como tal no sugiere el tipo de intervención terapéutica que se requiere. También es específico para varones. En contraste, la presente invención no se restringe por especificidad de género o tipo de tumor y por lo tanto no hay necesidad de desarrollar fármacos o anticuerpos específicos para un tipo de tumor particular, tal como Tarceva para cáncer de pulmón de células no microcíticas.

f) radiación, que puede ser haz externo o “siembras” implantadas, se distribuye a una región anatómica localizada, a diferencia de los fármacos de pequeño peso molecular, productos quimioterapéuticos o productos biológicos a base de anticuerpos que se distribuyen mediante el sistema vascular, que se difunden a todos los tejidos, e invariablemente tienen efectos errados en tejidos normales y provocan diversos niveles de toxicidad, tal como vemurafenib en melanoma, que induce queratoacantomas.

g) la presente invención es directa. No tiene etapas intermedias en cuanto a múltiples etapas de preparación para una muestra. El ensayo no se confunde por desviaciones potenciales inherentes en procedimientos que dependen de la amplificación de señal en procesos tal como PCR, donde las enzimas usadas comúnmente en estos procedimientos pueden introducir polarización sistemática a través de tasas diferenciales de amplificación de diferentes secuencias. No hay hibridación de anticuerpos para secciones de tejido con sus diversas especificidades de hibridación y medida de señales de amplificación. La presente invención mide lo que es una muestra sin las distorsiones que se presentan como resultado del procesamiento multietapa.

h) hay un intervalo dinámico lineal de siete órdenes cuyas medidas pueden realizarse. Tanto el intervalo como la linealidad son cruciales puesto que permiten una medición fiel de abundancia elemental en una población de células sin introducir errores potenciales por los procedimientos de técnicas anteriores que requieren conversión o amplificación de entidades.

La presente invención es en particular adecuada para la detección de estados de trastornos, estados de diferenciación de células madre y poblaciones de células derivadas, detección o medición de efectos de medicación en estado celular y cualquier otra situación donde sea útil una indicación precisa del estado celular.

EJEMPLO 1

Preparación de patrones de tejido

Se llevaron a cabo experimentos de normalización y calibración usando secciones de 30 μm de espesor de patrones de tejido correspondidos en matriz. Estos patrones se prepararon a partir de tejido de pechuga de pollo al que se ha retirado cualquier material conectivo o graso y se homogeneizaron parcialmente usando un homogeneizador de tejido OmniTech TH ajustado con una sonda de policarbonato (Kelly Scientific, North Sydney, New South Wales, Australia) y posteriormente se enriqueció con soluciones estándar de Ca, Mn, Fe, Co, Cu y Zn. Las soluciones se prepararon usando sales metálicas de nitrato, cloruro, o sulfatos solubles de alta pureza (mínimo 99,995 %) (Sigma-Aldrich, Castle Hill, New South Wales, Australia) disueltas en HNO_3 al 1 % y (Choice Analytical, Thornleigh, New South Wales, Australia) y diluida a concentraciones de aproximadamente 100000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y 10000 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Las alícuotas de la pechuga de pollo después se enriquecieron con diversas concentraciones de cada uno de los elementos y se homogeneizaron a baja velocidad durante 5 minutos. Las seis alícuotas de aproximadamente 250 mg de cada patrón de tejido homogeneizado se digirieron en $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ grado línea base estrella de mar 5:1 (Choice Analytical) en un digestor de microondas de envase cerrado Milestone MLS 1200 (Kelly Scientific) y se analizaron usando ICP-MS de solución para confirmar la concentración y homogeneidad de cada elemento en los patrones de tejido. El tejido enriquecido se congeló y se seccionó en secciones de 30 μm y se colocó en portaobjetos de microscopio de vidrio para análisis. Esta metodología puede aplicarse simplemente a secciones cortadas en 5 micrómetros, una pequeña parte de la cual se añade a cada portaobjetos de tumor.

Análisis de calibración y fondo

Los patrones de tejido correspondidos en matriz preparados se usaron para construir las curvas de calibración para la normalización de sensibilidad de analitos bajo condiciones descritas más adelante para ejecutar el LA-ICP-EM. Los datos durante un periodo de 10 segundos antes de la ablación del tejido se recolectaron para obtener una señal de fondo para cada m/z del espacio de gas. Esta metodología se utilizó para permitir una comparación entre diferentes ejecuciones de diferentes tumores. Por ejemplo, se consiguió un 2K de recuentos calibrados/segundo.

Umbral o umbrales de sensibilidad

Una manera alternativa de establecer umbrales para estos descritos anteriormente como desviaciones estándar con relación a medias y medianas de un control sensible a la radiación, o como valores empíricamente determinados de

5 cualquier tipo de tumor, es establecer un umbral de sensibilidad al repartir, por ejemplo, las muestras testiculares en el histograma superior de la Figura 11, tal que el umbral se defina como un porcentaje de este histograma. Por ejemplo, los seminomas de la Figura 11 derivan de 55 pacientes y 41/55 de estos pacientes constituyen 75 % del histograma que cae por debajo de este umbral de 75 % y todos estos pacientes son sensibles a la radiación. A continuación, 47/55
 5 pacientes constituyen 85 % del histograma y serán sensibles a la radiación. Finalmente, 52/55 pacientes constituyen casi 95 % del histograma, pero algunos de estos pacientes atípicos es probable que tengan algún grado de resistencia a la radiación. Estas cifras de porcentajes que representan una proporción del histograma son otra manera de expresar el umbral variable que se puede elegir para la radio-sensibilidad.

EJEMPLO 2

10 En un ejemplo, una sección de tejido cerebral normal en un portaobjetos de microscopio como se describe en el presente documento se sometió a ablación con láser y sus contenidos metalómicos se analizaron por el sistema de LA-ICP-EM.

15 La Figura 3A muestra una sección de tejido de 5 micrómetros teñida con H&E representativa de un bloque de una corteza humana normal de una mujer humana de 50 años que muestra las características del tejido cortical normal. Esta Figura ilustra la posición de una ablación de tres surcos (tomada de la ablación más grande de tejido de múltiples surcos) que se llevó a cabo en una sección no teñida adyacente del mismo bloque, pero en un portaobjetos diferente. El área teñida con H&E mostrada en la Figura 3A corresponde al área no teñida equivalente analizada por LA-ICP-EM en el portaobjetos diferente. La sección de tejido de 5 micrómetros no teñida se cortó del mismo bloque, se sometió a ablación con láser y se analizó usando el sistema de LA-ICP-EM de Agilent technologies 7700, con parámetros
 20 operacionales detallados descritos anteriormente. Las secciones de tejido no teñidas en general se usan a fin de evitar la introducción de cualquier elemento químico que se presente en las tinciones, soluciones con tinciones o que se lixivian de los recipientes durante el procesamiento. Las secciones teñidas también pueden usarse.

25 Para generar un mapa elemental del material no teñido en el portaobjetos separado de microscopio, el láser se barrió a través del portaobjetos de manera lateral, un surco de ablación a la vez de la parte superior al fondo. En general, esto produce hasta cientos de surcos horizontales dependiendo del tamaño de la muestra de tejido, con cada surco que es de 35 micrómetros de ancho. La resolución lateral es una función del tiempo de integración del espectrómetro de masas de cuadrupolo y se eligió en estos conjuntos de datos para dar una resolución de 35 micrómetros. Se generó una imagen completa, que consiste en una unidad básica de un píxel de 35 micrómetros por 35 micrómetros. Puesto que la sección de tejido es de 5 micrómetros de espesor, cada píxel representa un volumen de tejido de 35 X 35 X 5, es decir, un vóxel de 6125 micrómetros cúbicos. Una ejecución de ablación de 50 surcos horizontales, en la cual cada surco de ablación consiste de, digamos, 70 vóxeles, generó una imagen 2D que consiste en 3500 vóxeles.

30 Se determinó la señal calibrada de cada uno de los tres metales ⁵⁵Mn, ⁶⁶Zn y ⁵⁶Fe. Los resultados se muestran para cada vóxel de tres Surcos contiguos de ablación de una sección de tejido que extirpó 70 vóxeles por surco (Figura 3B). Los valores centrales sustraídos de fondo por vóxel para estos metales, expresados como recuentos calibrados por segundo, son 3409, 6651 y 441317, respectivamente. Las mediciones de ⁶³Cu no estaban disponibles por razones técnicas.

35 Estos datos brutos se presentan en forma gráfica en la Figura 3C, donde cada surco consistió de 70 vóxeles. La Figura 3C muestra las gráficas de los valores numéricos naturales de recuentos calibrados por segundo CC/S para los tres metales ⁵⁵Mn, ⁶⁶Zn y ⁵⁶Fe en vóxeles adyacentes en cada una de las tres hileras de ablación. La sección de tejido de 5 micrómetros no teñida se cortó del mismo bloque, se sometió a ablación con láser y se analizó usando el sistema de LA-ICP-EM de Agilent technologies 7700 con parámetros operacionales detallados descritos más adelante.

40 Conforme el láser se barre a través de la sección de tejido no teñida en el portaobjetos, los valores para cada uno de los metales cambian de niveles de fondo a aquellos característicos de la muestra de tejido y después regresan a los valores de fondo nuevamente. La variación en los valores en general sigue a los cambios morfológicos y variaciones en las arquitecturas tumorales vista en las secciones de tejido teñido.

45 En este ejemplo, los valores de manganeso de iones libres brutos en la gráfica superior, revelan que hay un enriquecimiento en el vóxel 55 en la hilera dos de ablación, mientras que ninguno de los ocho vóxeles contiguos al mismo muestra esta gran polarización de la mediana (como se ve a partir de los datos de la Figura 3B). Estos grandes enriquecimientos individuales para un vóxel individual son debidos al "intermitencia" de máquina y estos enriquecimientos casi siempre son más de tres desviaciones estándar del valor central. Mientras que se muestra aquí para los propósitos ilustrativos de la presentación de datos naturales, se removerán antes de los análisis estadísticos puesto que representan "ruido" de máquina. Son lo suficientemente infrecuentes que aún si permanecieran como parte del análisis de datos, tendrían un efecto minúsculo en los resultados importantes tal como valores centrales.

Ejemplo 3

55 Muestras neoplásicas con sensibilidades y resistencias a radiación de contraste

Como se analiza anteriormente, la Lancet Oncology Commission resaltó la radioterapia como un componente fundamental del control y tratamiento eficaz de cáncer y que en general se usa de manera sub-óptima (Atun y col.,

Lancet Oncology 2015, 16, 1153-1186). Hasta la presente invención, la norma clínicamente aceptada es que algunos tipos de tumores tal como glioblastoma, mesotelioma y melanoma son resistentes en gran medida a la radiación, mientras que la mayoría de linfomas, tumores de células microcíticas del pulmón y tumores de los testículos, tal como seminomas clásicos, son sensibles a la radiación. Otros tipos importantes de tumores tal como cánceres de la mama y próstata en general se piensa que son de radio-sensibilidad “intermedia”, pero “intermedia” depende del contexto y es difícil de determinar. La realidad clínica se refiere a qué porcentaje de los cánceres primarios puede erradicarse solo con radioterapia y la dosis que se requiere, así como el porcentaje de susceptibilidad de varias lecciones metastásicas a radioterapia ablativa. Por consiguiente, las grandes masas de seminoma y linfoma se erradican fácilmente con radioterapia mientras que los sarcomas y carcinomas pancreáticos se erradican rara vez, a pesar de la dosis. Además, la radioterapia se considera “curativa” para algunos cánceres de próstata de riesgo “bajo/intermedio” y algunas metástasis de cáncer de próstata al hueso y de esta manera los cánceres de próstata podrían clasificarse sin duda como muy radio-sensibles.

Dada la variación clínica anterior, se han elegido seis tipos de tumor para evaluar el ATI, puesto que los primeros tres proporcionan la bibliografía para la resistencia a la radiación y los segundos tres proporcionan la bibliografía para la sensibilidad a la radiación. Se reconoce clínicamente, sin embargo, que aun dentro de estos seis tipos de tumor, hay una minoría que no responde al tratamiento con radiación en la manera esperada. Esto es debido a los problemas con procedimientos usados antes de la presente invención, por ejemplo, baja potencia de resolución de material patológico teñido con H&E y el desacuerdo considerable entre patólogos de la taxonomía dentro de cualquier tipo de tumor. Aun con la adicción de la tinción de anticuerpo de las secciones de tejido teñido con hematoxilina y eosina (H&E) e incrustada en parafina fijada con formalina, la interpretación de la variación dentro de un tipo de tumor sigue siendo subjetiva y la concordancia entre patólogos es variable (Elmore y col., JAMA, 313, 1122-1132. 2015).

El melanoma ilustra los desafíos de personalización de radioterapias. Se ha considerado históricamente que es intrínsecamente radio-resistente, una percepción que se origina de los estudios de cultivos celulares tempranos y los análisis de curvas de supervivencia. Esta creencia se ha evaluado recientemente con base en los datos de cuatro décadas del uso clínico de radioterapia en pacientes de melanoma (Mahadevan y col., Oncology, 29, (10): 743-751, 2015). La nueva interpretación es que la radio-sensibilidad de melanoma es diversa. Se resume de manera precisa por Burmeister; “he estado trabajando en el melanoma durante más de 25 años y aún me sorprende como en algunos pacientes el trastorno solo se desvanece y en otros solo se ríe de ti y mata al paciente dentro de unas pocas semanas o meses... existe una variación increíble en el comportamiento de este trastorno en pacientes individuales”.

Como revelan los datos atómicos presentados en el presente documento, ahora hay, por primera vez, (i) una base cuantitativa de la cual los pacientes de melanoma, (así como otros tipos de tumores) son candidatos adecuados para radioterapia, (ii) una base cuantitativa para determinar en qué pacientes es probable que un cáncer vuelva a producirse después de la radioterapia y (iii) una base medible para la variación de tumores. También se debe observar que esta heterogeneidad no se confina al melanoma. Los pacientes de cáncer de mama y próstata y sus tumores también son heterogéneos en múltiples niveles, una que es su respuesta al tratamiento con radiación.

1. Tumores resistentes a la radiación

En otro Ejemplo, los valores metalómicos de neoplasias que se concederán que están en el extremo resistente a la radiación del espectro clínico se analizaron. Por ejemplo, una neoplasia cerebral mortal, glioblastoma multiforme, que se considera que está en el extremo resistente a la radiación del espectro clínico, se analizó como se describe en Ejemplo 2. Este ejemplo ilustra cómo los valores metalómicos de un neoplasia cerebral difieren de aquellos de tejido cerebral normal, cuando tanto las muestras normales como neoplásicas están presentes en la misma lamina y se evalúan en el mismo sistema de LA-ICP-EM bajo las mismas condiciones de corrida experimental.

La Figura 4A muestra la sección de tejido de 5 micrómetros teñida con H&E representativa de un bloque de una mujer de 19 años con un neoplasia cerebral clasificado como glioblastoma multiforme. El área teñida con H&E mostrada en la Figura corresponde al área no teñida equivalente analizada por LA-ICP-EM en un portaobjetos diferente.

La señal calibrada de cada uno de los tres metales ^{55}Mn , ^{66}Zn y ^{56}Fe se determinó y se muestra para cada vóxel de las tres Surcos contiguos de ablación de una sección de tejido que sometió a ablación 68 vóxeles por surco (Figura 4B). Los valores centrales sustraídos de fondo por vóxel para estos metales, expresados como recuentos calibrados por segundo, se encontró que son 3198, 5066 y 219905, respectivamente. Una gráfica de los valores numéricos naturales de los recuentos calibrados por segundo para los tres metales, ^{55}Mn , ^{66}Zn y ^{56}Fe en vóxeles adyacentes en cada una de las tres hileras de ablación de la mujer humana con glioblastoma multiforme se preparó y se muestra en la Figura 4C.

Para obtener una medida de la variación entre diferentes secciones tomadas del mismo bloque del mismo sujeto humano con glioblastoma multiforme, se analizaron dos áreas no teñidas en la misma lámina por LA-ICP-EM en la misma ejecución de máquina. Los resultados se muestran en las Figuras 5A, 5B y 5C.

La Figura 5A muestra una sección de tejido de 5 micrómetros teñida con H&E representativa de una región diferente del mismo bloque de la mujer humana de 19 años con glioblastoma multiforme mostrado en la Figura 4.

La señal calibrada de cada uno de los tres metales ^{55}Mn , ^{66}Zn y ^{56}Fe se determinó para cada vóxel de tres Surcos

5 contiguos de ablación de una sección de tejido que extirpó 69 vóxeles por surco (Figura 5B). Los valores centrales sustraídos de fondo por vóxel para estos metales, expresados como recuentos calibrados por segundo, se encontró que son 2980, 4155 y 190127 respectivamente. Una gráfica de valores numéricos naturales de recuentos calibrados por segundo para los tres metales, ^{55}Mn , ^{66}Zn y ^{56}Fe en vóxeles adyacentes en cada una de las tres hileras de ablación de la mujer humana con glioblastoma multiforme se preparó y se muestra en la Figura 5C.

Estos resultados demostraron que la variación en los recuentos calibrados por segundo centrales sustraídas de fondo en la misma ejecución de máquina de LA-ICP-EM, para diferentes secciones de tejido tomadas del mismo bloque del mismo individuo es excelente. Para ^{55}Mn los valores de CC/S eran 3198 y 2980; para ^{66}Zn los valores de CC/S eran 5066 y 4155 y para ^{56}Fe los valores de CC/S eran 219905 y 190127, respectivamente.

10 El siguiente ejemplo es de una neoplasia diferente, que también se considera que está en el extremo resistente a la radiación del espectro clínico. Este ejemplo es una neoplasia de origen mesotelial y viene de un varón de 60 años con mesotelioma maligno de la cavidad abdominal y sus características se ilustran en las figuras 6A, 6B y 6C.

La Figura 6A muestra una sección de tejido de 5 micrómetros teñida con H&E representativa de un varón humano de 60 años con mesotelioma maligno.

15 La señal calibrada de cada uno de los cuatro metales ^{55}Mn , ^{66}Zn , ^{56}Fe y ^{63}Cu se determinó para cada vóxel de tres Surcos contiguos de ablación de una sección de tejido que sometió a ablación 67 vóxeles por surco (Figura 6B). Los valores centrales sustraída de fondo por vóxel para estos metales, expresados como recuentos calibrados por segundo son 4522, 8805, 112772 y 1097, respectivamente. Una representación gráfica de los valores numéricos naturales de recuentos calibrados por segundo para los cuatro metales, ^{55}Mn , ^{66}Zn , ^{56}Fe y ^{63}Cu en vóxeles adyacentes en cada una de las tres hileras de ablación del varón humano de 60 años con mesotelioma maligno se determinó y se muestra en la Figura 6C.

Un ejemplo adicional de una neoplasia diferente, que también se considera que está en el extremo resistente a la radiación del espectro clínico, viene de un varón de 50 años con el melanoma maligno del esófago (etapa IIa, T3N0M0). Las características metalómicas se ilustran en las figuras 7A, 7B y 7C.

25 La Figura 7A muestra una sección de tejido de 5 micrómetros teñida con H&E representativa de un varón de 50 años con melanoma maligno del esófago.

30 La señal calibrada de cada uno de los tres metales ^{55}Mn , ^{66}Zn y ^{56}Fe se determinó para cada vóxel de las tres Surcos contiguos de ablación de una sección de tejido que extirpo 68 vóxeles por surco (Figura 7B). Los valores centrales sustraídos de fondo por vóxel para estos metales, expresados como recuentos calibrados por segundo son 10565, 6961 y 121495, respectivamente. Una representación gráfica de los valores numéricos naturales de los recuentos calibrados por segundo para los tres metales, ^{55}Mn , ^{66}Zn y ^{56}Fe en vóxeles adyacentes en cada una de las tres hileras de ablación del varón humano de 50 años con melanoma maligno del esófago se determinó como se muestra en la Figura 7C.

35 Cabe observar que existe mucha más variación en el contenido metalómico entre vóxeles en algunos melanomas que en tejidos normales y en otras neoplasias. Uno de los contribuyentes principales para este incremento en la variación es la presencia de in-homogeneidades intracelulares y extracelulares en la distribución de melanina, una entidad que tiene capacidad de almacenamiento para diferentes elementos químicos, en particular metales. Esta in-homogeneidad morfológica es claramente visible en la primera Figura presentada en esta solicitud, que es parte de una sección teñida con H&E de un melanoma maligno de etapa Ib del cuello de un varón de 48 años (Figura 1). Dentro del mismo tumor, había un linaje amelanótico y un área diferente altamente melanizada. Las características metalómicas de este tumor se describen adicionalmente en el presente documento (véase el Ejemplo 5).

2. Tumores sensibles a la radiación

45 Ahora se describirán las características de los tres diferentes tipos de neoplasias que se considera que están en el extremo sensible a la radiación del espectro clínico. Son linfomas difusos de células B, cánceres de células pequeñas del pulmón y seminomas de los testículos.

Linfomas: el primer ejemplo de una neoplasia considerado que está en el extremo sensible a la radiación del espectro clínico, viene de un varón de 57 años con linfoma difuso de células B en los testículos. Sus características metalómicas se ilustran en las Figuras 8A, 8B y 8C.

50 La Figura 8A muestra una sección de tejido de 5 micrómetros teñida con H&E representativa de un varón de 57 años con linfoma difuso de células B.

55 La señal calibrada de cada uno de los tres metales ^{55}Mn , ^{66}Zn y ^{56}Fe se determinó para cada vóxel de las tres Surcos contiguos de ablación de una sección de tejido que sometió a ablación 79 vóxeles por surco (Figura 8B). Los valores centrales sustraídos de fondo por vóxel para estos metales, expresados como recuentos calibrados por segundo son 776, 18892 y 247923, respectivamente. Una representación gráfica de los valores numéricos naturales de los recuentos calibrados por segundo para los tres metales, ^{55}Mn , ^{66}Zn y ^{56}Fe , en vóxeles adyacentes en cada una de las

tres hileras de ablación del varón de 57 años con linfoma difuso de células B en los testículos se preparó y se muestra en la Figura 8C. El eje Y muestra recuentos calibrados por segundo (CC/S) de ese ion metálico, mientras que el eje X muestra el número de vóxeles de los tres surcos de ablación.

5 Carcinoma maligno: el segundo ejemplo de un neoplasia considerado que está en el extremo sensible a la radiación del espectro clínico, viene de un varón de 38 años con un carcinoma maligno no diferenciado de células pequeñas del pulmón (etapa IIIb, T4N1M0). Sus características metalómicas se ilustran en las Figuras 9A, 9B y 9C.

La Figura 9A muestra una sección de tejido de 5 micrómetros teñida con H&E representativa de un varón de 38 años con un carcinoma maligno no diferenciado de células microcíticas del pulmón.

10 La señal calibrada de cada uno de los tres metales ^{55}Mn , ^{66}Zn y ^{56}Fe se determinó para cada vóxel de las tres Surcos contiguos de ablación de una sección de tejido que sometió a ablación 65 vóxeles por surco (Figura 9B). Los valores centrales sustraídos de fondo por vóxel para estos metales, expresados como recuentos calibrados por segundo son 1749, 4836 y 88317 respectivamente. Una representación gráfica de los valores numéricos naturales de los recuentos calibrados por segundo para los tres metales, ^{55}Mn , ^{66}Zn y ^{56}Fe , en vóxeles adyacentes en cada una de las tres hileras de ablación del varón de 38 años con un carcinoma maligno no diferenciado de células pequeñas del pulmón se preparó y se muestra en la Figura 9C.

15 Seminoma: el tercer ejemplo de una neoplasia considerado que está en el extremo sensible a la radiación del espectro clínico, viene de un varón de 52 años con seminoma. Sus características metalómicas se ilustran en las Figuras 10A, 10B y 10C.

20 La Figura 10A muestra una sección de tejido de 5 micrómetros teñida con H&E representativa de un varón de 52 años con seminoma.

25 La señal calibrada de cada uno de los tres metales, ^{55}Mn , ^{66}Zn y ^{56}Fe , se determinó para cada vóxel de los tres surcos continuos de ablación de una sección de tejido que sometió a ablación 79 vóxeles por surco (Figura 10B). Los valores centrales sustraídos de fondo por vóxel para estos metales, expresados como recuentos calibrados por segundo son 1565, 13528 y 52115 respectivamente. Una representación gráfica de los valores numéricos naturales de los recuentos calibrados por segundo para los tres metales, ^{55}Mn , ^{66}Zn y ^{56}Fe , en vóxeles adyacentes en cada una de las tres hileras de ablación del varón de 52 años con seminoma se preparó y se muestra en la Figura 10C.

30 *In toto*, los ejemplos anteriores demuestran las características metalómicas de tres tipos de neoplasia que están en el extremo resistente a la radiación del espectro clínico, (glioblastoma, mesotelioma y melanoma) y tres tipos de neoplasias que están en el extremo sensible a la radiación del espectro clínico (linfomas de células B, cánceres de células pequeñas del pulmón y seminomas de los testículos).

EJEMPLO 4

Aplicación del procedimiento del LA-ICP-EM a cortes de pacientes

35 Mientras que los ejemplos anteriores son ilustrativos de las características metalómicas de individuos únicos en cada categoría de pacientes de cáncer, el análisis de 55 individuos con seminoma, 10 con linfoma, 20 con cáncer de pulmón de células microcíticas, 64 con melanoma, 25 con glioblastoma multiforme o astrocitoma y 10 con mesotelioma, reveló una dicotomía con respecto a su contenido total de manganeso y los resultados clínicos conocidos de estos tipos de cánceres de radioterapia, se determinó y se muestra en la Figura 11. Los contenidos totales de iones libres de manganeso centrales (expresados como recuentos calibrados por segundo, CC/S de ^{55}Mn), en tumores con pacientes con cáncer de los testículos (seminoma), linfoma, carcinoma de células pequeñas del pulmón, mesotelioma, cerebro (glioblastoma multiforme y astrocitoma) y melanoma, se determinaron y se muestran. Cada cuadrado representa un paciente individual, excepto en el caso donde dos melanomas donde dos de los 64 pacientes cada uno tuvo dos linajes importantes dentro de sus tumores y cada linaje se representó de manera separada en el histograma con un cuadrado.

45 La situación clínica aceptada es que aproximadamente el 85 % de los seminomas, linfomas y carcinomas de células microcíticas del pulmón son sensibles a la radiación, lo que da como resultado una gran reducción y algunas veces eliminación completa de tumores y esperanza de vida creciente. Consistente con estos valores y como se determina en el presente documento, el 89 % de los individuos con seminoma, el 80 % de aquellos con carcinoma de células microcíticas de pulmón y el 90 % de aquellos con linfoma, se descubrió que tienen contenidos totales de manganeso de tumor que caen por debajo de 2000 CC/S. Con respecto a esto, esta es la primera demostración de la correlación de estos tumores radio-sensibles que tienen valores que caen por debajo de un umbral de 2000 CC/S.

50 En contraste a lo anterior, los tres tipos de tumores que se considera que son resistentes en gran medida a la radiación (mesoteliomas, glioblastoma multiforme, astrocitomas y melanomas) y que tienen una proporción que son diferencialmente sensibles a la misma, presentan un resultado diferente. No solo es la varianza dentro de cada uno de estos tres tipos de tumor aumentado en gran medida, sino el 90 % de los mesoteliomas, el 85 % del glioblastoma multiforme, los astrocitomas y el 59 % de los melanomas, caen por encima del valor de manganeso de 2000 CC/S.

55 Dada la dicotomía anterior, el contenido metalómico, por ejemplo, el contenido de manganeso de los tumores llega a

5 ser un indicador crítico para radioterapia que simplemente no se ha reconocido anteriormente en términos de cuidado clínico práctico hasta la presente invención. En estos ejemplos que usan un píxel de 35 micrómetros, los individuos que tienen tumores con un bajo contenido total de manganeso (por ejemplo, por debajo de 2000 CC/S) es altamente probable que se beneficien de la radioterapia, considerando que aquellos con un contenido de manganeso (por ejemplo, significativamente por encima de 2000 CC/S) es probable que se beneficien al evitar la radioterapia. Conforme se aumenta el tamaño de píxel, el CC/S aumentará y por lo tanto se contempla un umbral más alto. Puesto que el intervalo de valores permanece bien dentro de la linealidad, no hay cuestiones estadísticas que sean problemáticas.

10 Dado que la mayoría de pacientes de cáncer reciben radioterapia basándose en la técnica médica, en lugar de los datos cuantitativos pertinentes para características de tumores, estos datos soportan el uso de datos cuantitativos que usan, por ejemplo, LA-ICP-EM para practicidad clínica. La técnica médica se refiere a qué porcentaje de los cánceres primarios se puede erradicar con radioterapia sola y la dosis que se requiere para hacer eso, así como el porcentaje de susceptibilidad de varias lesiones metastásicas para radioterapia ablativa. Como un enfoque basado en la población no se aplica al tumor o tumores de un paciente específico y no es “medicina personalizada”.

15 Análisis estadístico

La prueba no paramétrica Kolmogorov-Smirnov (K-S) de dos muestras compara las distribuciones acumulativas de dos conjuntos de datos. La hipótesis nula es que ambos conjuntos de datos se muestrearon de poblaciones con la misma distribución.

20 De los datos anteriores, una comparación de la distribución de valores para cáncer testicular (seminoma) frente a linfoma produjo un valor D de 0,2182, que tiene un valor P no significativo asociado de 0,762; el seminoma y linfoma no eran significativamente diferentes y se muestrearon de poblaciones con la misma distribución.

25 Una comparación de la distribución de valores para cáncer testicular (seminoma) frente a pulmón de células microcíticas produjo un valor D de 0,3182, que tiene un valor P no significativo asociado de 0,081; el seminoma y el pulmón de células microcíticas no eran significativamente diferentes y se muestrearon de poblaciones con la misma distribución.

Una comparación de la distribución de valores para pulmón de células microcíticas frente a linfoma produjo un valor D de 0,3000, que tiene un valor P no significativo asociado de 0,507; el pulmón de células microcíticas y el linfoma no eran significativamente diferentes y se muestrean de poblaciones con la misma distribución.

30 Conclusión: los datos de seminoma, linfoma y pulmón de células microcíticas representaron una agrupación unitaria estadísticamente válida.

Una comparación de la distribución de valores para cánceres cerebrales (glioblastoma y astrocitomas) frente a mesoteliomas produjo un valor D de 0,3250, que tiene un valor P no significativo asociado de 0,371; los cánceres cerebrales y los mesoteliomas no eran significativamente diferentes y se muestrearon de poblaciones con la misma distribución.

35 Una comparación de la distribución de valores para cánceres cerebrales (glioblastomas y astrocitomas) frente a melanomas produjo un valor D de 0,2226, que tiene un valor P no significativo asociado de 0,277; los cánceres cerebrales y los melanomas no eran significativamente diferentes y se muestrearon de poblaciones con la misma distribución.

40 Una comparación de la distribución de valores para melanomas frente a mesoteliomas produjo un valor D de 0,4303, que tiene un valor P no significativo asociado de 0,056; los melanomas y mesoteliomas no eran significativamente diferentes y se muestrearon de poblaciones con la misma distribución.

Conclusión: los cánceres cerebrales, mesoteliomas y melanomas son una agrupación unitaria estadísticamente válida.

Comparación entre grupos

45 Una comparación de la distribución de valores para cáncer testicular (seminoma) frente a cánceres cerebrales produjo un valor D de 0,7712, que tiene un valor P significativo asociado de 0,000; el seminoma y cáncer cerebral eran significativamente diferentes y se muestrearon de poblaciones con diferentes distribuciones.

Una comparación de la distribución de valores para cáncer testicular (seminoma) frente a mesotelioma produjo un valor D de 0,8455, que tiene un valor P significativo asociado de 0,000; el seminoma y mesotelioma eran significativamente diferentes y se muestrearon de poblaciones con diferentes distribuciones.

50 Una comparación de la distribución de valores para cáncer testicular (seminoma) frente a melanoma produjo un valor D de 0,6879, que tiene un valor P significativo asociado de 0,000; el seminoma y melanoma son significativamente diferentes y se muestrean de poblaciones con diferentes distribuciones.

Una comparación de la distribución de valores para linfoma frente a cánceres cerebrales produce un valor D de 0,7750,

que tiene un valor P significativo asociado de 0,000; el linfoma y cáncer cerebral eran significativamente diferentes y se muestrearon de poblaciones con diferentes distribuciones.

5 Una comparación de la distribución de valores para linfoma frente a mesotelioma produce un valor D de 0,9000, que tiene un valor P significativo asociado de 0,000; el linfoma y mesotelioma eran significativamente diferentes y se muestrearon de poblaciones con diferentes distribuciones.

Una comparación de la distribución de valores para linfoma frente a melanoma produjo un valor D de 0,6727, que tiene un valor P significativo asociado de 0,000; el linfoma y melanoma son significativamente diferentes y se muestrean de poblaciones con diferentes distribuciones.

10 Una comparación de la distribución de valores para pulmón de células microcíticas frente a cánceres cerebrales produjo un valor D de 0,7333, que tiene un valor P significativo asociado de 0,000; el linfoma y cáncer cerebral eran significativamente diferentes y se muestrearon de poblaciones con diferentes distribuciones.

Una comparación de la distribución de valores para pulmón de células microcíticas frente a mesotelioma produjo un valor D de 0,9000, que tiene un valor P significativo asociado de 0,000; el linfoma y mesotelioma eran significativamente diferentes y se muestrearon de poblaciones con diferentes distribuciones.

15 Una comparación de la distribución de valores para pulmón de células microcíticas frente a melanoma produjo un valor D de 0,6273, que tiene un valor P significativo asociado de 0,000; el linfoma y melanoma eran significativamente diferentes y se muestrearon de poblaciones con diferentes distribuciones.

20 Conclusión: se descubrió que los seminomas, linfomas y cáncer de pulmón de células microcíticas son una agrupación unitaria que es estadísticamente distinta de la agrupación unitaria de cánceres cerebrales, mesoteliomas y melanomas.

Mientras que el análisis estadístico indica linfoma, pulmón de células microcíticas, cerebro y mesotelioma como que se extraen de una distribución normal, este no es el caso para los melanomas y los seminomas, ninguno de los cuales se ajusta a una distribución normal ni a una distribución normal de registro.

25 Un análisis estadístico que usa la prueba de Kolmogorov-Smirnov indica que la distribución de valores de melanoma representados en la Figura 11 ninguno se ajusta a una distribución normal, ni a una distribución normal de registro. Como se muestra en ejemplos posteriores, los melanomas exhiben una heterogeneidad que se aumenta por depósitos intra- y extracelulares de melanina, un conjunto heterogéneo de polímeros que se une a múltiples metales y por la presencia de regiones metalómicas altas (HMR), distribuidos dentro de muchos melanomas. Estas HMR son una fuente de variación atómica oculta que se ha descubierto por primera vez debido a la tecnología descrita en esta aplicación. Estas regiones son indetectables por examinación patológica convencional.

30 Es probable que los seminomas en la Figura 11 consistan de dos poblaciones, una con una varianza pequeña que conforma el colectivo de los individuos y una que es más diversa y se extiende de 2K a 4K CC/S. Es probable que la mayor parte de los seminomas en la Figura 11 corresponda al grupo clínico que tiene una excelente respuesta a la radiación, considerando que el subgrupo restante es relativamente más radio-resistente. Este descubrimiento es consistente con los datos clínicos (a continuación). También se debe observar que los seminomas representados en la Figura 11 son un grupo unitario, es decir, seminomas "clásicos" en un contexto patológico. A pesar de esta homogeneidad morfológica que aparece hacia afuera, el análisis metalómico ha revelado una heterogeneidad subyacente que se oculta de los análisis convencionales.

1. Cánceres de los testículos

40 Para tumores de los testículos, la división importante es relativamente simple con tumores testiculares de células germinales (GCT) que caen en dos grandes categorías, seminoma y no seminoma. Para pacientes que se presentan con "cáncer" testicular, aproximadamente el 50 % se diagnostican con seminoma. De estos, aproximadamente el 85 % presentan trastorno de fase I con el resto que es fase clínica IIA y IIB. (La distinción entre la fase IIA y la fase IIB, es que los ganglios linfáticos son ≤ 2 centímetros en la primera y 2 a 5 centímetros en la última).

45 El tratamiento post-operatorio con radiación para seminoma testicular ha sido el pilar de la terapia adyuvante durante más de medio siglo. Los seminomas son uno de los tipos de tumores más sensibles a la radiación, donde un ensayo clínico de seminoma testicular de fase I revela que las dosis de tratamiento de 20 Gray, dadas como 10 fracciones durante 2 semanas, es suficiente para conducir a casi el 98 % de tasas de cura en 5 años (Jones y col., Journal of clinical Oncology, 23, 1200-1208, 2005; Medical Research Council Trial TE18/European Organisation for the Research and Treatment of Cancer Trial 30942 (ISRCTN18525328)). Esta radiación se compara a 60 Gy (y hasta 90 Gy), para gliomas de alto grado, tal como glioblastoma multiforme, donde la supervivencia general se aumenta solo por meses.

50 La radio-sensibilidad extrema del seminoma de etapa temprana se describe bien, con reducciones de dosis que se toman tan bajas como 13 Gy para neoplasia intraepitelial testicular, que es un precursor de una forma más invasiva de cáncer (Sedlmayer y col., Int J Radiat. Oncol. Biol. Phys. 50, 909-913, 2001; Classen y col., Br J Can. 88, 828-831, 2003). El European Germ Cell Consensus Group resumió su posición en 2008, con 20 Gy en dosis individuales de 2

55

Gy cada una que es la radioterapia recomendada (Krege y col., Eur. Urol. 53, 478-496, 2008). Los autores señalan que para el seminoma testicular de fase II, una dosis total de 30 Gy para la fase IIA y una dosis total de 36 Gy para la fase IIB "parece razonable". La declaración que estas dos dosis "parecen razonables" resalta la inexactitud de la técnica anterior (Krege y col., Eur. Urol. 53, 497-513, 2008), también se debe observar que, aunque 36 Gy es la dosis recomendada, se ha señalado anteriormente para la fase II por Classen y col., J Clin Oncol 21, 1101-1106, 2003), que existe un potencial para la reducción de dosis. Se debe observar también que la supervivencia libre de recaída para la fase IIA es 95 % y para la fase IIB es el 89 %. La supervivencia general está cerca del 100 %.

Las recomendaciones Americanas para las seminomas de fase I y fase II están en línea con las recomendaciones Europeas descritas anteriormente. Hasta 2015, Mead y col., evaluaron la evidencia de un número de ensayos clínicos Mead y col., Journal of the National Cancer Institute, 103, 241-249, 2011) y las recomendaciones para el seminoma de fase I son como anteriormente. Para los seminomas de fase IIA, la radioterapia de baja dosis para los ganglios linfáticos paraaórticos y la pelvis ipsilateral superior se recomienda con una dosis total de 25 a 35 Gy en áreas de adenopatía ordinaria.

La sensibilidad exquisita de tumores de línea germinal se pone en perspectiva, al comparar la radio-sensibilidad de cánceres testiculares con aquella de cánceres cerebrales.

2. Cánceres del cerebro

Existe una variación considerable en la práctica clínica para la gestión y tratamiento de gliomas adultos, que en Australia y Nueva Zelanda se presentan con las siguientes frecuencias; 4 % astrocitoma grado I; 10 % astrocitoma grado II; 22 % astrocitoma grado III; 52 % glioblastoma multiforme grado IV; y con oligodendrogliomas y oligoastrocitomas que conforman el resto (Cáncer Council Australia/Australian Cancer Network/Clinical Oncological Society of Australia, ISBN 978-0-9775060-8-8; 2009). De interés para esta invención es glioblastoma multiforme, el más avanzado de estos gliomas, puesto que se considera por radiólogos que es más resistente a la radiación. Además, la comparación de glioblastomas con astrocitomas de fase III es reveladora en términos de sus metalómicos, frente a las comparaciones clínicas (véase a continuación). El tratamiento convencional radioterapéutico para astrocitomas de alto grado es 60 Gy en fracciones de 2 Gy (algunas veces con un aumento de 10 Gy), pero no existen datos en los cuales la dosis óptima se ha determinado para glioblastoma de grado IV tales como glioblastoma multiforme. Para gliomas de grado III muchos radiólogos usan 59,4 Gy con un procedimiento de fraccionamiento de 1,8 Gy, en la "espera" que la reducción del 10 % por fracción de 2,0 Gy a 1,8 Gy en el caso de gliomas de grado III pueda provocar menos daño de tejido.

Dos ensayos clínicos de fase III tienen en cuenta estos datos; el Radiation Therapy Oncology Group (RTOG7401) y el Eastern Cooperative Oncology group (ECOG1374) (Nelson y col., NCI Monogr. 6, 279-284, 1988 and Chang y col., Cáncer, 52, 997-1007, 1983). No hay diferencias de supervivencia entre grupos de tratamiento (radiación; radiación más aumento de radiación; radiación más BCNU, radiación más CCNU) y poca diferencia entre glioblastoma y astrocitoma anaplásico. Es importante en el contexto de diferencias menores en el resultado de supervivencia entre glioblastoma y astrocitoma anaplásico, que los datos metalómicos para estas categorías son heterogéneos, sus distribuciones se superponen y no son significativamente diferentes entre sí cuando se prueban usando la prueba de Kolmogorov-Smirnov ($P=0,581$).

La cuestión general con la radioterapia al cerebro completo es la presentación de múltiples complicaciones tal como problemas neurocognitivos, leucoencefalopatías y endocrinopatías. Mientras que algunas de estas se han mejorado con radioterapia de campo incluido (IFRT), la frecuencia de recaída no se ha alterado, ni el porcentaje de los pacientes con fallos multilocales.

Existe claramente una necesidad de personalizar mejor las terapias para los pacientes, por ejemplo, radioterapia para aquellos pacientes que están en el extremo sensible a la radiación del espectro, mientras que no se afecta a aquellos que es probable que sean resistentes a la radiación. La actual terapia uniforme, por ejemplo, radioterapia, es obsoleta, dado el nuevo conocimiento proporcionado por la fecha de esta aplicación que incluye los datos metalómicos.

3. Cánceres de membranas serosas; mesoteliomas

Los mesoteliomas se considera que son resistentes a la radiación y los protocolos de tratamiento son del orden de una dosis de 54 Gy distribuidos en fracciones de 1,8 Gy.

La situación clínica con mesoteliomas es poco diferente de aquella que confrontan los facultativos con otros tipos de tumores. Al examinar primero de manera quirúrgica los tumores extirpables, existe una trimodalidad clásica: un procedimiento quirúrgico definitivo, radioterapia y quimioterapia sistémica. En el caso de mesoteliomas, la función de la cirugía definitiva es controversial y se desconoce si la recepción de un tumor produce una mejora en la supervivencia para ese paciente particular y los ensayos clínicos no prospectivos toman en cuenta esta materia. También hay ensayos clínicos de fase III aleatorizados adecuadamente potenciados que toman en cuenta la integración de la radioterapia y la quimioterapia antes y/o después de la cirugía, el más cercano que es un ensayo de fase II que usa una radioterapia hemitorácica de 54 Gy después de la neumonectomía extrapleural, Rusch y col., J Thorac Cardiovasc Surg 122, 788-795, 2001).

4. Cáncer de pulmón de células microcíticas

Los radiólogos y facultativos consideran que el cáncer de pulmón de células microcíticas es un tumor radio-sensible con buenas tasas de respuesta a la radioterapia. La European Society of Medical Oncology (ESMO) ha documentado su agrupación por etapas y clasificación modificada de metástasis de nodo tumoral y ha liberado sus directrices para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento (Fruh y col., *Annals of Oncology*, 24, (complemento 6), vi105, 2013; Tabla 3). El mejor resultado de supervivencia general con intención curativa es de una dosis total de 45 Gy, con fracciones diarias de 1,5 Gy, junto con quimioterapia (Turrisi y col., *N Engl J Med*, 340, 265-271, 1999).

5. Linfomas

El Cancer Council Australia y la Australian Cancer Network, han expuesto las directrices de práctica clínica para la diagnosis y gestión de linfoma, (ISBN: 0-9775060-0-2; 2005). Para el linfoma folicular de bajo grado de fase clínica I-III recomienda la radioterapia de campo implicado de 30-36 Gy. Para linfoma adulto no Hodgkiniano, US National Cancer Institute recomienda dosis entre 25 Gy y 50 Gy. Para los linfomas difusos de células B descritos en el presente documento, la National Comprehensive Cancer Network (NCCN.org; 2015) recomienda 30-36 Gy después de la quimioterapia, 45-55 Gy como tratamiento primario para refractarios a quimioterapia, o no candidatos para quimioterapia y 30-40 Gy para recuperación pre- o post-trasplante de células madre. En el espectro variado que comprende el linfoma no Hodgkiniano, algunos pacientes tienen tumores que permanecen indolentes durante largos periodos de tiempo, otros evolucionan rápidamente y requieren tratamiento inmediato. Como se puede ver de lo anterior en términos de radioterapia, es en gran medida una situación uniforme.

6. Melanomas

Los melanomas se han considerado en general que son un tumor radio-resistente, pero los datos son contradictorios, con mucha de la evidencia que deriva de líneas celulares que han demostrado un amplio espectro de radio-sensibilidad. Las directrices de práctica clínica para la gestión de melanoma en Australia y Nueva Zelanda se han expuesto en detalle por el Cancer Council Australia/Australian Cancer Network/Ministry of Health New Zealand. Para Australia véase ISBN 978-0-9775060-7-1 y para Nueva Zelanda véase ISBN (electrónico) 978-1-877509-05-6. Los datos clínicos se han revisado por Wazer y col., *UptoDate*, 2015 y son demasiado conflictivos. Los ensayos clínicos revisados por Wazer y col., los condujeron a concluir que el melanoma es un tumor radio-sensible, “pero la dosis óptima y la fracción óptima permanecen inciertos”. En términos de trastorno metastásico, existen diferencias sustanciales en la radio-sensibilidad entre metástasis viscerales, de ganglio linfático, cutáneas o metástasis al hueso o cerebro (debe observarse que los datos de ensayos clínicos contradictorios hacen un mejor sentido científico en términos de datos metalómicos, donde existe un amplio intervalo de valores de manganeso entre pacientes y como se revela en la Figura 1, grandes diferencias dentro de un tumor individual). Dependiendo del sitio de melanoma, las dosis han variado de 32 Gy hasta 100 Gy. Finalmente, mientras que la radioterapia es útil en cuidado paliativo en las configuraciones de metástasis de hueso, de cerebro y de vísceras, no está claro si las fracciones de grandes dosis mejoran la paliación.

EJEMPLO 5

Melanina e in-homogeneidades morfológicas e insensibilidad/sensibilidad a la radiación

Como se describe anteriormente, la distribución de melanina, que tiene capacidad de almacenamiento para diferentes elementos químicos, en particular metales, puede ser un contribuyente principal a las variaciones vistas con los melanomas. La Figura 1 es una imagen de un melanoma teñido con H&E que muestra esta no homogeneidad morfológica, que es claramente visible como dos linajes distintos dentro del mismo; un linaje es de color claro y en gran medida amelanótico y el otro es de tinción oscura y contiene tanto melanina intra-celular como extracelular. Además, las células de la región amelanótica son más uniformes en términos de sus tamaños nucleares y morfologías, que las células en las regiones fuertemente melanizadas, un descubrimiento que incide en el ATI. Cuanto menor es la varianza de una población de células en cualquiera de múltiples características, más restringida estará su respuesta a cualquier perturbógeno. Se midió el contenido metalómico de la parte superior de la misma sección de tejido como se representa en la Figura 1. Una representación bidimensional de los surcos de ablación tomadas a través del melanoma se muestra en la Figura 12. Estos datos ilustran la variación en el nivel de manganeso en diferentes partes del mismo tumor y hace énfasis en la importancia de la caracterización de un paisaje 2D a fin de tomar decisiones informadas en si un paciente se debe tratar con radiación, o no. Los valores centrales corregidos de fondo para manganeso en estas áreas visualmente seleccionadas son 31939 cuantas calibradas por segundos y 3045 recuentos calibrados por segundo.

La conformación 2D proporciona un estimado, dentro de un tumor, de la proporción de un área muestreada que existe por encima de un umbral designado. En la muestra anterior, esto se puede definir, por ejemplo, con respecto a qué proporción de la conformación cae por debajo del 10° percentil, el 20° percentil, el 30° percentil, el 40° percentil y el 50° percentil, etc., y, por consiguiente, se consigue la cuantificación. Por consiguiente, por ejemplo, si 90 % del área muestreada es muy baja en manganeso, después el tumor como un todo es probable que sea susceptible a la radiación. Por otra parte, existe un punto pequeño en la irradiación de un tumor en el cual 90 % del área es alta en manganeso, tal que la radiación dejará la mayoría del tumor intacto. Cabe observar que estos percentiles no se pueden

derivar de una muestra de un tumor que se ha “reducido” para trabajo molecular.

El mismo tumor de la Figura 1 se analizó adicionalmente y el contenido de los cuatro metales, ^{55}Mn , ^{66}Zn , ^{56}Fe y ^{63}Cu , se determinó y se muestra en la Figura 13. La dicotomía, como se ve morfológicamente, es visible a partir de estos resultados. Puesto que la ablación viaja del lado izquierdo con valores muy altos, al lado derecho con valores demasiado bajos, el punto de inflexión se presenta alrededor del vóxel 34.

Por otra parte, los melanomas con morfología uniforme pueden aun mostrar contenido metalómico muy diferente. Por ejemplo, la Figura 14 muestra una sección de tejido teñida con H&E de un melanoma del dedo índice izquierdo de un varón 50 años: etapa IV, T4N0M1. Este melanoma particular tiene una morfología uniforme y la patología parecería nada especial para un patólogo experto (Figura 14, sección superior). El contenido metalómico se midió en este melanoma y se muestra en la Figura 14, sección inferior. El contenido metalómico 2D subyacente es muy diferente. De hecho, existen dos grandes concentraciones de células con niveles muy altos de manganeso.

El valor de ^{55}Mn mediano para el colectivo de esta muestra tumoral se determinó que es 817 recuentos calibrados por segundo corregidas de fondo, lo cual coloca este tumor en el extremo muy sensible del espectro de radio-sensibilidad. Por otra parte, la más grande de las dos áreas planas blancuzcas, es decir, la HMR, se encontró que tiene un valor que excede 6500 recuentos calibrados por segundo, colocándolo en el extremo radio-resistente del espectro.

Estas dos regiones son evidentes a partir de la inspección visual de una matriz de vóxeles. Sin embargo, un análisis riguroso de umbrales es necesario para un análisis a fondo de estas dos regiones de HMR y este análisis se ilustra en las Figuras 15 y 16. Como se usa en el presente documento, cuando se refiere a un metal específico en una región metalómica alta (HMR), la HMR se designa como, por ejemplo, $\text{HMR}^{(55}\text{Mn)}$, $\text{HMR}^{(66}\text{Zn)}$, $\text{HMR}^{(56}\text{Fe)}$ y $\text{HMR}^{(63}\text{Cu)}$ respectivamente, con $\text{HMR}^{(M)}$ que se refiere al caso genérico de cualquier metal.

El panel A de La Figura 15 muestra la naturaleza morfológica uniforme de un área tumoral de 22 x 60 vóxeles (muestreada de un área de aproximadamente 1800 vóxeles) como se visualiza por la patología de H&E convencional. El panel B muestra las dos regiones de $\text{HMR}^{(55}\text{Mn)}$ como se encuentra por inspección visual de los números en cada vóxel. El panel C muestra las HMR que emergen de esta conformación 2D de 22 x 60 vóxeles cuando una usa como un umbral el valor central por vóxel del área total más la polarización estándar (Desv. Est.), de los vóxeles del área total (mediana + Desv. Est.). Un procedimiento diferente de umbral también descubre de manera robusta las mismas dos regiones en esta conformación 2D de 22 x 60 vóxeles (Panel D), este segundo procedimiento usa dos veces la mediana de los valores de vóxel del área total (2x mediana).

Como se ve por la distribución de vóxeles agrupados que aparecen por encima del umbral en los paneles C y D (cuadrados negros en un fondo de cuadrados grises), el resultado de usar (media más Desv. Est.), frente a (2x mediana), es casi idéntico en términos de hallar las $\text{HMR}^{(55}\text{Mn)}$. El análisis de los seis tipos de tumores revela que el procedimiento de 2x mediana puede ser más consistente que el procedimiento de mediana más Desv. Est., al detectar $\text{HMR}^{(55}\text{Mn)}$, $\text{HMR}^{(66}\text{Zn)}$, $\text{HMR}^{(56}\text{Fe)}$ y $\text{HMR}^{(63}\text{Cu)}$. Mientras que será evidente para el experto en la materia que cualquier procedimiento puede usarse de acuerdo con la invención, a manera de ejemplo no limitante, la metodología de 2x mediana se ha usado en análisis posteriores mostrados en el presente documento.

Un descubrimiento importante adicional con relación a la distribución de $\text{HMR}^{(55}\text{Mn)}$ y $\text{HMR}^{(66}\text{Zn)}$ en la misma conformación atómica, se ilustra en la Figura 16. La sección superior muestra la conformación de tumor de H&E idéntico de la Figura 15, la sección intermedia muestra las dos áreas de $\text{HMR}^{(55}\text{Mn)}$ detectadas y la sección inferior revela la distribución de cinc en los vóxeles idénticos aquellos de la matriz de vóxeles en el panel B. En contraste a las dos $\text{HMR}^{(55}\text{Mn)}$, solo una pequeña región de $\text{HMR}^{(66}\text{Zn)}$ emerge por encima del 2x mediana del umbral de cinc. Los valores de cinc, hierro y cobre en general permanecen en aquellos del área tumoral colectiva en regiones de $\text{HMR}^{(55}\text{Mn)}$. Esta generalización no alberga regiones ricas en melanina de tumores de melanoma, donde los cuatro metales se encuentran conjuntamente en altas concentraciones en concierto con gránulos de melanina.

Se reconoce por el experto en la materia que existen varios procedimientos estadísticos y matemáticos para llegar a los umbrales que son útiles al revelar regiones de interés metalómico en tumores de mayor uso para la toma de decisiones clínicas para la radioterapia.

La Figura 17 proporciona un ejemplo del grado al cual se presenten las $\text{HMR}^{(55}\text{Mn)}$ en diferentes tipos de tumor, tal como las sensibles a la radiación frente a las resistentes a la radiación. Esta comparación es de una paciente mujer de 51 años con un carcinoma no diferenciado de células microcíticas del pulmón, (fase I, T1N0M0) con el paciente 54 años que tuvo un melanoma del dedo índice izquierdo (fase IV, T4N0M1). La región usada en el presente documento para propósitos ilustrativos corresponde a una muestra de aproximadamente 1 mm por 1 mm de cada uno de los dos tumores, (31 por 31 vóxeles por un total de 961 vóxeles). Los ocho paneles de la Figura 17 revelan áreas de concentraciones de ^{55}Mn que usan cuatro diferentes umbrales, (i) T1, por encima de un umbral de 0,5x el valor de mediana, (ii) T2, por encima de un umbral de 1,0x el valor de mediana, (iii) T3, por encima de un umbral de 1,5x el valor de mediana y (iv) T4, por encima de un umbral de 2,0x el valor de mediana.

En el caso del carcinoma de células pequeñas del pulmón, los vóxeles que permanecen por encima del umbral más alto de 2x el valor central, T4, en general son unos no contiguos (singletes) que se dispersan a todo lo largo de la muestra. Existen muy pocas concentraciones contiguas o adyacentes de vóxeles de $\text{HMR}^{(55}\text{Mn)}$ en esta muestra de

tumor sensible a la radiación. En contraste, los cuatro panales de lado derecho del paciente de melanoma revelan la emergencia de vóxeles contiguos de HMR(⁵⁵Mn) que son fácilmente discernibles en el T3, 1,5x el valor de mediana y estas HMR(⁵⁵Mn) permanecen aún en el nivel T4 más riguroso de 2x el valor de mediana.

- 5 Los datos de la Figura 18 muestran, a manera de ejemplo no limitante, que cuando se aplican los mismos criterios de umbral a los vóxeles idénticos de estos dos tumores, pero ahora simultáneamente ensayados para HMR(⁶⁶Zn), ningún área de HMR(⁶⁶Zn) se encuentra en los umbrales de T1, T2, T3 y T4 en el carcinoma de células pequeñas de esta paciente particular y solo una concentración menor de vóxeles contiguos de Zn es evidente en el tumor del paciente de melanoma. La distribución de los valores de vóxeles de ⁶⁶Zn permanece relativamente constante en ambos de estos dos tumores, mientras que las HMR(⁵⁵Mn) predominan en el melanoma, como se muestra en la Figura 17.
- 10 La comparación de dos tipos de tumor, uno sensible a la radiación y el otro resistente a la radiación se resalta adicionalmente a manera de ejemplo no limitante, en las siguientes siete figuras (Figuras 19 a 25). Estas ilustran los datos de los 184 pacientes cuyos tumores son de ejemplo de los dos extremos espectrales de la sensibilidad a la radiación; pulmón de células microcíticas, linfoma y testículos en el extremo radio-sensible del espectro y mesotelioma, tumores del cerebro y melanoma en el extremo radio-resistente del espectro.
- 15 A manera de ejemplo no limitante, se proporciona a continuación una vista general de las regiones tumorales con altas concentraciones metalómicas y sus implicaciones clínicas.

- La Figura 19 muestra los datos de vóxel de ⁵⁵Mn de cada uno los veinte pacientes con carcinoma de células pequeñas del pulmón cuando se muestreo un área tumoral de aproximadamente 1800 vóxeles. El valor de ⁵⁵Mn central de la mayor parte del tumor de cada paciente se representa por un cuadrado y se coloca en rangos de 200 cuentas consolidadas por segundo sobre un intervalo de cero CC/S a 7000 CC/S. Todos los veinte pacientes tienen tumores donde los valores de ⁵⁵Mn colectivos caen por debajo de 3000 CC/S (cuadrados grises). Catorce de los veinte pacientes, mostrados por los cuadrados grises por encima de la línea superior, no tienen HMR(⁵⁵Mn) cuando se usa un umbral T4 de 2x mediana. En contraste, los tumores de seis pacientes, T1 a T6, contienen HMR(⁵⁵Mn) individuales (cuadrados negros conectados a los cuadrados grises por una línea punteada). En un ejemplo específico, la mayor parte del tumor del paciente T6 tiene un valor de ⁵⁵Mn central que cae en el rango de 2400 a 2600, (cuadrado gris), pero este tumor también contiene una HMR(⁵⁵Mn) cuyo valor cae en el rango de 6400 a 6600 (cuadrado negro). El número de los vóxeles contiguos de umbral anterior de las seis HMR(⁵⁵Mn) en las muestras de pacientes t1 a t6 es 4,9 %, 3,1 %, 2,1 %, 12,3 %, 12,6 % y 5,2 % respectivamente de las áreas tumorales muestreadas. En tres de estos pacientes, t2, t5 y t6, los niveles de ⁵⁵Mn de sus HMR(⁵⁵Mn) exceden 4000 CC/S. Es probable que estas regiones contengan células que exhiben un grado de radio-resistencia.
- 20
- 25
- 30

- A manera de ejemplo no limitante, un tamaño mínimo de 8x8 vóxeles reveló eficientemente regiones de alto contenido metalómico. Una persona experta en la materia apreciará que, por debajo de este tamaño y dependiendo de la sensibilidad del instrumento usado, se recogen HMR cada vez más pequeñas hasta que finalmente se vuelven indistinguibles de un fondo aleatoriamente generado de singletes, como se ve en los carcinomas de pulmón de células microcíticas de la Figura 17. Un paisaje que contiene HMR de 8x8 se une en tanto las direcciones X' e Y'. Se contempla que las HMR por encima de X8 e Y8 vóxeles pueden aumentar individualmente por números enteros en las direcciones X' e Y', produciendo HMR de X[8+1] x Y[8] : X[8] x Y[8+1] : X[8+1] x Y[8+1] : X[8+2] x Y[8] : X[8+2] x Y[8+1] : X[8+2] x Y[8+2] : X[8+1] x Y[8+2] : X[8] x Y [8+2] hasta X[8+n] x Y[8+n] donde n es un número entero que puede variar de 1 a miles. Preferentemente, este número entero varía de 1 a 100, más preferentemente de 1 a 22, donde una muestra de 30 x 30 vóxeles (1 mm² se muestrea). Una persona experta en la materia entenderá que no hay impedimento para establecer un umbral por debajo de un mínimo de 8 vóxeles. El valor de 8 se ha usado aquí debido a que deriva empíricamente y sirve como un ejemplo de una herramienta eficiente de búsqueda para HMR.
- 35
- 40

Tamaños de HMR

- Un descriptor importante de cualquier HMR es su tamaño, forma y contenido. Se analizaron los tumores de los seis tipos de un total de 184 pacientes. Una persona experta en la materia apreciará que los HMR pueden ser variables en tamaño, forma y contenido y que la definición de un área mínima dependerá de la fluctuación de máquina y en algunos casos un vóxel individual puede representar un "enriquecimiento" electrónico de baja frecuencia, raro en los datos. Además, la "intermitencia" de máquina puede producir ocasionalmente dos o tres valores altos consecutivos en la dirección X o Y, pero es fácilmente reconocible por el software apropiado de filtración de imágenes.
- 45
- 50 En vista de lo anterior, una HMR para cualquier metal [HMR(^AM), donde ^AM = cualquier metal] puede contener dos vóxeles adyacentes para completar el criterio de la contigüidad de vóxeles. El Panel A de la Figura 20 muestra las 8 formas teóricas diferentes en las cuales dos vóxeles adyacentes (un doblete), se puede configurar de un vóxel único de referencia (con asterisco). El tamaño de HMR(^AM) puede variar de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc., vóxeles contiguos, a un número entero que es el tamaño de muestra elegido para el análisis de ese tumor particular. Una persona experta en la materia apreciará que el tamaño de HMR(^AM) de acuerdo con la invención está en cualquier intervalo medible usando la tecnología existente. Por ejemplo. El tamaño de HMR(^AM) puede variar de dos vóxeles a aproximadamente 800000 vóxeles y cualquier valor entre los mismos (este que es el número máximo de píxeles de 35 x 35 micrómetros que se puede analizar si un portaobjetos convencional se carga a los bordes con material tumoral). Una persona experta en la materia también apreciará que una HMR puede aplicarse a células cancerosas en un tumor, o a una
- 55

región de material celular o no celular, en general conocido como estroma asociado, que a su vez puede existir en un estado "activado" debido a su interacción con las células cancerosas vecinas.

Para una aplicación clínica, un tamaño de muestra individual típicamente es un área de un mm^2 , como tal un tamaño tiene un precedente en el análisis patológico de rutina. Por consiguiente, cuando los patólogos examinan una sección tumoral para tasa mitótica, por ejemplo, en melanoma, típicamente han usado el número de mitosis por campo de alta potencia, o por diez campo de alta potencia (Burton y col., 2012, Am.J Surg. 204, 969-974). A manera de ejemplo no limitante, con respecto a las HMR^(AM), una muestra de 1 mm^2 convenientemente se aproxima a 1000 vóxeles, en esta aplicación. Múltiples muestras de 1 mm^2 pueden someterse a ablación con láser de una sección de tejido individual en un portaobjetos de vidrio. Múltiples muestras de 1 mm^2 pueden someterse a ablación con láser de múltiples secciones del mismo bloque tumoral. Múltiples muestras de 1 mm^2 pueden someterse a ablación con láser de múltiples bloques que representan diferentes muestras del mismo tumor, o sus derivados metastásicos. El tamaño de HMR^(AM) acumulativo determinado de múltiples pruebas puede variar de 4 vóxeles (2 dobletes) a muchos millones para un único tumor. Se entenderá que el límite superior se limita por la funcionalidad del tiempo requerido para el análisis y el costo de cuidado de salud.

15 Formas de HMR

A modo de ejemplo no limitante, dentro de un tamaño de muestra de 1 mm^2 , o ~ 1000 vóxeles del tipo $35 \times 35 \times 5$ micrómetros, pueden existir un número grande de formas de HMR^(AM) que se ajusten a la condición de la contigüidad de vóxeles. Como se describe en el presente documento por primera vez, una forma común es esa mostrada por el ejemplo en los datos de paciente de melanoma de las Figuras 14 y 15 y que se representa estilísticamente en los paneles B y C de la Figura 20. Los patrones tal como aquellos representados en los paneles D, E, F, G y H se manifiestan así mismos en diferentes tipos de tumores. Por ejemplo, el panel D es uno en el cual las células epiteliales cancerosas forran un conducto o vaso linfático, tal como en el cáncer de mama o próstata. Los paneles E y G serían representativos del movimiento clásico de "fila india" de las células que siguen un motivo estructural en un tumor tal como un paquete de colágeno, o un tracto nervioso principal en glioblastomas o astrocitomas, o el patrón de fila individual visto en secciones de cáncer de mama. El panel F ilustra el caso en el cual las células cancerosas se contendrían dentro de un vaso linfático o sanguíneo, tal como en carcinoma ductal In Situ (DCIS) en cáncer de mama. El panel H es representativo de la distribución de células y depósitos de melanina en algunos tumores melanóticos.

Se entiende que se puede usar cualquier procedimiento conocido estadístico y matemático para analizar los patrones e in-homogeneidades en matrices y el software asociado. Estos procedimientos pueden revelar condiciones de vóxeles de muchas formas y tamaños, que después pueden encuadrarse en la conformación patológica subyacente.

30 Huellas dactilares de HMR^(AM) y su valor en la radio-sensibilidad

En una muestra de 1000 vóxeles que usa un umbral de 2x mediana, las HMR^(AM) (cuadrados negros en la Figura 20), los paneles B, C, D, E, F y G representan 4 %, 3,7 %, 2,4 %, 1,5 %, 3,7 % y 0,9 % de la muestra.

Como se muestra en la Figura 19, se contempla que si los pacientes con tumores t2, t5 y t6 se tratan con radioterapia en una base paliativa o bien de intención de tratar, la mayor parte de las células cancerosas (con valores <800, <1800 y <2600) se aniquilarían o bien se dañarían lo suficientemente como para ser incapaces de experimentar división celular adicional. En contraste, la mayoría de las células de las HMR^(55Mn) de estos tumores (con valores >4000, >4200 y >6400) sobreviviría y, a su tiempo, generaría una nueva forma del tumor, dando lugar al descubrimiento clínico familiar de que vuelva a producirse el tumor.

40 Datos de HMR de linfomas, tumores de los testículos, mesoteliomas, el cerebro y melanomas

La Figura 21 muestra los datos de los 10 pacientes con linfomas difusos de células B cuando un área tumoral de aproximadamente 1800 vóxeles se muestreó para contenido de ⁵⁵Mn por la tecnología de ablación con láser. Ninguno de los tumores tuvo HMR^(55Mn) cuando se utilizó un umbral de 2x mediana, como se muestra por la ausencia de cuadrados negros. Además, todos los valores de ⁵⁵Mn centrales caen por debajo de 3200 CC/S. La expectativa es que, si los tumores de estos 10 pacientes se trataran con radioterapia en una base paliativa o de intención de tratar, la mayor parte de las células se aniquilaría o bien se dañarían lo suficientemente como para ser incapaz de experimentar división celular adicional. Se acepta de una práctica clínica diaria en esta área que las grandes masas de linfoma se erradican fácilmente con radioterapia.

La Figura 22 muestra los datos de los 55 pacientes con tumores de los testículos cuando se muestrea un área tumoral de aproximadamente 1800 vóxeles. Estos 55 tumores todos son seminomas clásicos y forman un grupo unitario con base en los criterios patológicos. Los oncólogos de radiación y los oncólogos médicos los consideran que son muy sensibles a la radiación, puesto que las grandes masas de seminoma se erradican fácilmente con radioterapia. Cincuenta y uno de estos seminomas no tiene HMR^(55Mn) cuando se usa un umbral de 2x mediana, como se muestra por los 51 cuadrados grises por encima de la línea superior. En contraste, cuatro pacientes, S4, S5, S6 y S7, tienen HMR^(55Mn) individuales (cuadrados negros) con relación a sus valores colectivos (cuadrados grises). Los tamaños de estas cuatro HMR^(55Mn) variaron del 1,8 al 6,3 % del área muestreada. En dos de estos pacientes, S6 y S7, el valor de CC/S de la HMR^(55Mn) excede 5000 CC/S y es probable que estas regiones contengan células que son resistentes a la radiación. Estos datos soportan la probabilidad cuando estos 2 pacientes se traten con radioterapia en una base

de intención de tratar o base paliativa, la mayor parte de las células se aniquila o se daña lo suficientemente como para ser incapaz de experimentar división celular adicional, mientras que las células de las HMR(⁵⁵Mn) sobreviven y con el tiempo generan una nueva forma del tumor.

5 Finalmente, como se encontró del análisis estadístico más temprano de estos seminomas, no son un grupo unitario. Bien puede ser que los tumores de los tres pacientes de seminoma, S1, S2 y S3, que pueblan la extremidad derecha extrema de la distribución superior y cuyos valores de ⁵⁵Mn central colectivos estén entre 3000 y 4000, tengan un grado de radio-resistencia. Los datos de estos tres valores atípicos (y de los pacientes S4, S5, S6 y S7, cuyos tumores albergan HMR(⁵⁵Mn)), son consistentes con los datos clínicos que revelan que una pequeña proporción de los seminomas exhibe signos de resistencia a la radiación.

10 La Figura 23 muestra los datos de los 10 pacientes con mesotelioma cuando un área tumoral de aproximadamente 1800 vóxeles se muestra (con mesotelioma considerado que es una entidad resistente a la radiación). Nueve de los pacientes no tiene HMR(⁵⁵Mn) cuando se usa un umbral de 2x mediana, como se muestra por los cuadrados grises por encima de la línea superior. El único paciente con el valor de vóxel de CC/S de mediana más bajo tiene una HMR(⁵⁵Mn) individual cuyo CC/S excede 5000 (cuadrado negro) y el tamaño del cual era el 3,2 % de área muestreada.
15 De manera importante, la mayoría de los valores de ⁵⁵Mn de mesotelioma exceden aquellos de los tres tipos de tumores sensibles.

La Figura 24 revela los descubrimientos de los 25 pacientes con tumores del cerebro (glioblastomas y astrocitomas) cuando se muestreó un área tumoral de aproximadamente 1800 vóxeles (con tumores del cerebro considerados que son mayormente resistentes a la radiación). Veinticuatro de los pacientes no tiene HMR(⁵⁵Mn) cuando se usa un
20 umbral de 2x mediana, como se muestra por los cuadrados grises por encima de la línea superior. Un paciente con un valor de ⁵⁵Mn central baja tiene una HMR(⁵⁵Mn) individual cuyo CC/S excede 6000 y el tamaño del cual era el 3,6 % del área muestreada. Mientras que la mayoría de los valores de cerebro de ⁵⁵Mn excede aquellos de los tres tipos de tumores sensibles, estos datos indican que algunos glioblastomas y astrocitomas responderán al tratamiento con radiación, puesto que ocho de estos pacientes tiene valores de ⁵⁵Mn central por debajo de 3000 CC/S.

25 La Figura 25 muestra los datos de los 64 pacientes de melanoma, cuando se muestreó un área tumoral de aproximadamente 1800 vóxeles, con melanoma considerado históricamente que es un tumor resistente a la radiación. Los melanomas revelan heterogeneidad extensiva con relación a los otros cinco tipos de tumor, con 29 pacientes que tienen tumores sin HMR(⁵⁵Mn) y 35 pacientes que tienen tumores con HMR(⁵⁵Mn). Diferente de los cinco tipos de tumores anteriores donde HMR(⁵⁵Mn) han existido como entidades individuales dentro de la muestra de tumor, la
30 mitad de los melanomas tiene múltiples HMR dentro del mismo tumor. Los tamaños de las HMR(⁵⁵Mn) varían del 1,6 al 21,8 % del área muestreada. Debido al rigor usado en el presente documento para el umbral (2x mediana), el número de HMR(⁵⁵Mn) por muestra es realmente un estimado mínimo. La Figura 25 también revela que para casi 30 % de los tumores, el valor central de la mayor parte de un tumor cae por debajo de un umbral de CC/S de 2K (cuadrados grises) y para dos tercios de los tumores, el valor central de la mayoría de los vóxeles cae por debajo de
35 un umbral de CC/S de 4K (cuadrados grises).

En retrospectiva, estos datos atómicos indican que muchos melanomas tienen áreas de radio-sensibilidad. En términos de trastorno metastásico, hay diferencias sustanciales en la radio-sensibilidad entre metástasis cutánea, de ganglio linfático, viscerales o metástasis al hueso o cerebro. La opinión ampliamente sostenida de los melanomas que son resistentes a la radiación está basándose en los datos contradictorios, en particular evidentes por el descubrimiento
40 que algunos melanomas se desvanecen después del tratamiento con radiación, mientras que otros pueden matar rápidamente al paciente a pesar del tratamiento con radiación. Los datos metalómicos presentados en el presente documento, muestran por primera vez, cómo los datos tradicionalmente contradictorios pueden resolverse parcialmente por el descubrimiento de las HMR(⁵⁵Mn) anteriormente desconocidas en los tumores de melanoma.

La Figura 25 también muestra que el 88 % de las HMR(⁵⁵Mn) de melanoma excede un valor de CC/S de 4000, (cuadrados negros) y casi la mitad de las HMR(⁵⁵Mn) excede los valores de 10000 y algunos están cerca de 100000. Estos datos novedosos indican que muchos melanomas pueden de hecho ser de manera inicial sensibles a la radiación, pero puesto que la mayoría alberga HMM que contienen niveles sustanciales de manganeso, estas poblaciones celulares es probable que sobrevivirían al tratamiento con radiación y el tumor se regeneraría de los restos resistentes a la radiación. El resultado clínico es que el paciente regresa después de la radioterapia volviendo a producirse el cáncer, que ahora es más resistente que el tumor inicial. Segundo, muchos de los melanomas contienen grandes cantidades de melanina extra- e intra-celular y como muestran los datos, nuevamente por primera vez en secciones de tejido analizadas por ablación con láser, las melaninas pueden contribuir a la resistencia a la radiación por los procesos bioquímicos resaltados más adelante.

Las melaninas son polímeros heterogéneos de estructura 3D incierta que forman complejos multicapa que consisten en láminas solapadas de anillos de dihidroxiindol y benzotiazina y diversos grupos químicos no identificados (Zecca y col., Trends in Neurosciences, 26; 578-580, 2003). En el caso de neuromelanina, existe una gran clase de lípidos poliinsaturados. Las neuromelaninas actúan como sumideros para cualquier metal incluyendo cromo, cobalto, mercurio, plomo y cadmio y significativamente para esta aplicación, también contienen isótopos de Mn, Zn, Fe y Cu (Figura 26). Las melaninas se pueden liberar de manera extracelular y, debido a sus características químicas, pueden sobrevivir en el medio extracelular durante largos periodos de tiempo. Las melaninas tienen propiedades radio-
60

protectoras, demostradas por los hongos melanizados que viven en las paredes del reactor nuclear en Chernóbil y en el agua de enfriamiento de los reactores nucleares actualmente operacionales. Las melaninas dispersan rayos X y actúan como una protección para la radiación. A pesar de la literatura masiva sobre las propiedades de las melaninas aisladas, el primer intento sistemático de explicar sus propiedades radio-protectoras solo se realizó en 2007 (Dadachova y col., *Pigment Cell Melanoma Res.* 21; 192-199, 2007). Hasta la presente invención, la explicación física de las capacidades radio-protectoras de la melanina al nivel de material de cáncer patológico y su pertinencia predictiva al tratamiento del paciente con radioterapia no se ha realizado. Adicionalmente, la mayoría de estudios químicos y estructurales a la fecha han sido con base en melaninas aisladas, no en sus propiedades moleculares *in situ* y no ha habido un análisis 2D de secciones de tejido de los tumores como se describe en el presente documento. Esto se resalta por la examinación de las concentraciones de melanina en un melanoma de una mujer de 45 años con un melanoma maligno de la pared torácica (fase II, T4N0M0) (Figura 27A-27F).

Para la claridad de la presentación y para la comparación de las concentraciones de diferentes entidades, las Figuras 27A y 27B son duplicados de la misma sección teñida con H&E. La distribución de melanina con esta sección es lo suficientemente alta de modo que no ha sido necesario que la tinción por los anticuerpos específicos de melanina la revele. La distribución de los cuatro metales, ^{66}Zn , ^{63}Cu , ^{56}Fe y ^{55}Mn , se muestra en los cuatro paneles a continuación y se puede comparar visualmente a la distribución de melanina.

El panel C muestra la distribución 2D de ^{66}Zn , la concentración más alta de la cual (en negro) co-localiza con los principales surcos de melanina. Los valores colectivos para ^{66}Zn en las áreas ligeramente teñidas son de 3000 a 18000 CC/S, mientras que los niveles de ^{66}Zn dentro de los surcos de melanina son 18000 a 45000.

El panel D muestra la distribución 2D de ^{63}Cu (en negro) que nuevamente sigue de cerca la distribución de melanina. Los valores colectivos para ^{63}Cu en las áreas ligeramente teñidas son de 200 a 1000 CC/S, mientras que los niveles de ^{63}Cu dentro de los surcos de melanina son de 1000 a 4000.

El panel E muestra la alta concentración de ^{56}Fe (en negro) que sigue cercanamente la distribución de melanina. Los valores colectivos para ^{56}Fe en las áreas ligeramente teñidas son de 20000 a 80000 CC/S, mientras que los niveles de ^{56}Fe dentro de los surcos de melanina son de 80000 a 100000.

El panel F revela la concentración de ^{55}Mn que sigue de cerca los surcos de melanina. Los valores colectivos para ^{55}Mn en las áreas ligeramente teñidas son de 1000 a 2500 CC/S, mientras que los niveles de ^{55}Mn dentro de los surcos de melanina son de 2500 a 10000. Como mostró el ejemplo anterior de la Figura 12, las HMR(^{55}Mn) que consisten en regiones fuertemente melanizadas, pueden alcanzar niveles de ^{55}Mn de 100000. La melanina por consiguiente es un depósito para altos niveles de metales que, si se liberan, es probable que sean un factor significativo en la radio-resistencia, para nuestro conocimiento, esta es la primera demostración de concentraciones de ^{55}Mn *in situ* en melanina en una descripción de sección de tejido 2D de tejido canceroso y las primeras predicciones cuantitativas que siguen de esta co-localización de metales y melanina para el tratamiento de paciente en la radioterapia. Los melanomas tienen una protección doble a la radiación. La primera es la acumulación de ^{55}Mn en células. La segunda es la producción de grandes cantidades de melanina, que no solo actúan como un capacitor de almacenamiento para ^{55}Mn , sino también probablemente proporcionan alguna protección estructural de la radiación ionizante.

Los tamaños y formas de los surcos de vóxel ricos en melanina en la Figura 27 pueden compararse con los tamaños y formas de algunos posibles agregados de vóxel como se resalta en la Figura 20 (en particular en el panel H de la Figura 20).

Los melanomas son instructivos en un sentido clínico adicional, puesto que los datos presentados en la Figura 25 pueden subdividirse en muestras de melanoma que son de tumores primarios, o bien unas que son de sitios metastásicos. Estos datos se muestran en la Figura 28. Una comparación de la distribución de valores de CC/S de mediana para los diferentes pacientes con melanomas primarios y metastásicos produjeron un valor D de 0,1889 que tiene un valor P no significativo asociado de 557. Por consiguiente, en términos de los valores de ^{55}Mn centrales derivados de un melanoma, los melanomas primarios y metastásicos son consistentes con que se muestrean de poblaciones con la misma distribución.

Una comparación estadística de la distribución de los valores de ^{55}Mn de los tumores primarios y en específico de los tumores metastásicos que ya se han dispersado a los ganglios linfáticos, produjo un valor D de 0,2222 que tiene un valor P no significativo asociado de 0,442. Por consiguiente, los valores de ^{55}Mn centrales de los tumores primarios y aquellos que se han muestreado de los ganglios linfáticos, son consistentes con que se muestran de poblaciones con la misma distribución.

Una examinación de la distribución de tumores con HMR(^{55}Mn) y aquellos sin HMR(^{55}Mn) para determinar si la frecuencia de HMR(^{55}Mn) difiere entre los tumores primarios y metastásicos revela que no lo hacen, (produciendo un valor P no significativo de 0,457). Por consiguiente, en términos de la distribución de los valores de ^{55}Mn centrales, los tumores primarios y metastásicos son indistinguibles. Este descubrimiento se soporta porque no hay un conjunto bioquímico *a priori* de los procesos que favorecerían la acumulación de ^{55}Mn de diferencial entre el tumor primario y sus derivados metastásicos en los ganglios linfáticos.

Mientras que los niveles de ^{55}Mn y su distribución dentro de un área 2D en el tejido tumoral se ejemplifican, otro metal,

cinc, también puede ser útil a manera de ejemplo no limitante, como un discriminador en el enfoque en las regiones óptimas para el análisis de ^{55}Mn . Muchas regiones de un tumor contienen células cancerosas entremezcladas con diferentes linajes celulares, así como componentes celulares normales y no celulares. El medio tumoral puede contener fibroblastos, componentes de matriz extracelular, empaques de colágeno, capilares, linfáticos y células de soporte tal como pericitos y células de músculo liso, macrófagos, osteoblastos, osteoclastos y componentes tales como hidroxiapatita en nichos de hueso. Si en el primer caso son las poblaciones de células cancerosas que se eligen que se van a cuantificar para un ATI, el cinc puede usarse para diferenciar entre células que son cancerosas y células que no lo son. Por lo tanto, el cinc puede proporcionar un filtro para garantizar que solo los vóxeles que contienen células cancerosas más pertinentes se utilicen para determinar los valores de ^{55}Mn y sus distribuciones (Cabe observar que el cinc no hace diferencia entre las células radio-sensibles y radio-resistentes). Los valores de vóxel de cinc permiten una evasión inicial de regiones que puede conducir mal al identificar $\text{HMR}^{(55}\text{Mn)}$. Esto se ilustra en las figuras 29 y 30.

El panel A de la Figura 29 ilustra una sección teñida con H&E de un varón de 54 años con un carcinoma no diferenciado de células microcíticas del pulmón (fase IIIa; T2N2M0). Las regiones ligeramente teñidas de material en gran medida no canceroso y no celular son evidentes de la vista de H&E. Esta región ligeramente teñida tiene valores bajos de vóxel de ^{66}Zn con relación a las células cancerosas que son de tinción oscura. Cuando se aplica un umbral apropiado a los datos de ^{66}Zn , la imagen resultante en el panel B de la Figura 29 es una aproximación excelente a las regiones diferentes vistas en la imagen de H&E por encima de la misma. Esto significa que el análisis de los valores de ^{55}Mn en esta muestra tumoral es con base más aproximadamente solo en aquellos vóxeles de ^{66}Zn mostrados en el panel B, sin una distribución de vóxeles de las regiones no cancerosas. Esto no se refiere a minimizar el significado clínico de los componentes estromales, sirve simplemente para compartimentalizar el análisis de datos. Este pre-examen de una conformación de sección de tejido que usa ^{66}Zn , será en particular útil en tumores tal como aquellos de mama y próstata, donde el material no canceroso está mucho más entremezclado íntimamente con los vóxeles que contienen células cancerosas. Lo recíproco de lo anterior es que el cinc también puede ser útil al determinar qué partes de un tumor pueden producir mejor el ATI de una población estromal.

Un ejemplo similar es evidente en la Figura 30, en cuyo panel A ilustra una sección teñida con H&E de un varón de 66 años con un melanoma maligno del recto (fase IIB; T4M0N0). Las regiones de células no cancerosas nuevamente son evidentes, en particular en la porción inferior del panel a las 6 en punto. Cuando se aplica un umbral apropiado a los datos de ^{66}Zn , la imagen resultante en el panel B refleja en espejo los componentes celulares diferentes vistos en la imagen de H&E por encima del mismo. Este pre-examen con ^{66}Zn nuevamente muestra que el análisis posterior de los valores de ^{55}Mn se pueden determinar más exactamente usando solo aquellos vóxeles de ^{66}Zn mostrados en el panel B, sin "contaminación" de los vóxeles de las regiones no cancerosas/estromales.

Se apreciará por aquellos expertos en la materia que otros elementos atómicos y sus isótopos asociados, además de ^{66}Zn , puedan proporcionar la misma función útil para diferenciar entre componentes cancerosos, normales, activados y no celulares del estroma, en particular, en diferentes tejidos.

EJEMPLO 6

Cánceres de la mama

Los datos presentados en el presente documento demuestran por primera vez que existe una correlación entre los niveles de ^{55}Mn y los dos extremos espectrales de los tumores que se refieren a la sensibilidad a la radiación y resistencia a la radiación. Los datos presentados en el presente documento también proporcionan un entendimiento en la existencia previamente desconocida de las HMR que se ocultan de la examinación patológica convencional y que tiene una función importante en la resistencia a la radiación y una indicación que un tumor puede volver a producirse después del tratamiento con radiación. Además, los datos proporcionan también una base para las contribuciones metalómicas que derivan de las interacciones entre los componentes estromales y las poblaciones de células cancerosas.

A modo de ejemplo no limitante, los tumores que se clasificaron de manera general siendo de sensibilidad a la radiación "intermedia", por ejemplo, mama y próstata, se analizaron también de acuerdo con la invención.

El mismo enfoque cuantitativo de ablación con láser-plasma inductivamente acoplado-espectrometría de masas se ha aplicado a 15 tumores de la mama y se utilizó para los seis tipos de tumor descritos en el presente documento. Una vista general de estos datos se presenta en la Figura 31. La examinación de los valores de ^{55}Mn colectivos de estos tumores de mama (cuadrados grises), indica los valores entre 1000 y 4400 CC/S. En este nivel de inspección, son de hecho intermedios entre los valores sensibles encontrados en los seminomas, linfomas y pulmón de células microcíticas y los más altos valores de ^{55}Mn de los glioblastomas, mesoteliomas y melanomas. Sin embargo, más del 70 % de estos cánceres de mama tiene $\text{HMR}^{(55}\text{Mn)}$ y sus valores se extienden de 4000 a 16000 CC/S (cuadrados negros en el panel inferior). Además, algunos tumores tienen $\text{HMR}^{(55}\text{Mn)}$ dobles y triples usando el umbral de detección de 8x8 riguroso. Hasta la presente invención, no se dio cuenta que los datos atómicos son consistentes con la observación clínica que "los cánceres de mama son muy heterogéneos".

En un contexto personalizado de medicina, la técnica médica actual para describir cánceres de mama como

heterogéneas no es útil al decidir qué pacientes se beneficiarán de la radioterapia y qué pacientes deben evitar los efectos dañinos del tratamiento con radiación. La realidad clínica es que, en la ausencia de una métrica predictiva útil y en la presencia de patología uniforme de H&E, la mayoría de pacientes de cáncer de mama se irradia después de la extirpación quirúrgica del tumor, por ejemplo, en los EE.UU., de tal manera que todas las realizaciones posibles de tratamiento se haya visto que vayan a aplicarse. Los márgenes de extirpación para los tumores de la mama pueden ser grandes, tal que se aumenta la probabilidad de remover quirúrgicamente cualquier célula cancerosa residual que pueda estar en la periferia de un tumor. Mientras que el tratamiento con radiación aumenta adicionalmente la probabilidad de destruir células que han escapado a la extirpación, los daños de la radiación pueden evitarse en aquellos casos donde los datos atómicos indican muy altos niveles de ^{55}Mn . En estos casos de alto ^{55}Mn , el tratamiento con radiación en una situación de intento de tratar es inútil en gran medida.

La sección superior de la Figura 32 ilustra un carcinoma ductal invasivo bien diferenciado de la mama (etapa IIIa, T3N1M0) de una mujer de 39 años. La sección de H&E es insustancial y uniforme por inspección patológica. En contraste, los datos atómicos vistos en la sección inferior revelan la heterogeneidad oculta de las HMR(^{55}Mn) (grandes áreas negras) y sus implicaciones clínicas importantes. Esta sección de mama se ha examinado como un área de aproximadamente 1 mm^2 , para mantenerla en línea con el tamaño de muestra estándar típicamente usado en la medición de la tasa mitótica.

La Figura 33 muestra el análisis de un área de aproximadamente 1 mm^2 de 31×31 vóxeles que se analizó simultáneamente para los dos elementos atómicos ^{55}Mn y ^{66}Zn usando los umbrales estándar aplicados anteriormente (T1, 0,5x mediana; T2, 1x mediana; T3, 1,5x mediana y T4, 2x mediana). Dos HMR(^{55}Mn) llegan a ser evidentes en el análisis de Mn usando el umbral T4, mientras que los vóxeles idénticos para ^{66}Zn permanecen en sus niveles tumorales colectivos. Sus niveles de ^{55}Mn que son la característica crítica de estas HMR. Una HMR(^{55}Mn) potencial que tiene un tamaño por debajo del umbral 8×8 , es visible por encima de los otros dos en los paneles T3 y T4.

En análisis adicional de esta área de aproximadamente 1 mm^2 demuestra la utilidad en el análisis de las HMR en comparación con análisis colectivos de muestras patológicas aparentemente homogéneas que "agrupan" datos. El análisis de todos los 961 vóxeles en esta muestra en forma de histograma se muestra en la Figura 34 para los valores de ^{55}Mn y ^{66}Zn . En el panel superior, la heterogeneidad en altos niveles de ^{55}Mn en vóxeles se ve como los picos y el frotis de los valores que están en exceso de valores de 5000 CC/S y que alcanzan un valor alrededor de 15000. Esta heterogeneidad puede examinarse de una manera estadística rigurosa, por ejemplo, por un análisis de contenidos de vóxel usando el coeficiente de sesgo no paramétrico de Bowley (NPSS) (Bowley, 1901, Elements of Statistics, P S King and Son, publishers, Westminster, Londres, RU). A modo de ejemplo no limitante, esto se aplicó a los datos de ^{55}Mn y el valor de NPSS, [media menos mediana]/[St.Dev] y se encontró que es 0,25, considerando que para los datos de ^{66}Zn mucho más simétricos se encontró que es 0,02, que representa una gran diferencia. Estará claro para una persona experta en la materia que existe una multitud de enfoques estadísticos para medir la heterogeneidad, que pueden usarse con la oblicuidad mostrada en el presente documento.

El análisis de área adicional reveló una distribución de los altos valores de ^{55}Mn que consiste en vóxeles dispersados uniformemente de principio a fin de la muestra, o su existencia como agregados. Finalmente, en comparación a la heterogeneidad vista en los niveles de ^{55}Mn , el panel inferior muestra que los vóxeles idénticos de Zn eran más uniformes en sus valores. Esto se correlaciona con la falta de picos o un frotis a la derecha del pico principal la sección inferior.

Células cancerosas en vasos/"conductos" linfáticos en el proceso de metástasis

En contraste al ejemplo de la homogeneidad morfológica de la patología vista en el carcinoma invasivo descrito anteriormente, el panel superior de la Figura 35 ilustra la heterogeneidad morfológica de un carcinoma ductal invasivo de la mama (fase IIa, T2N0M0) de una mujer de 48 años como se visualiza por H&E. Es una muestra afirmativa de la perspectiva del ATI, puesto que esta sección contiene, (i) un área de los lóbulos normales de mama a las 3 en punto (denominado N), con adipocitos asociados, (ii) cinco áreas denominadas C1 a C5 en las cuales las células cancerosas (denominadas C), son visibles dentro de vasos linfáticos y por lo tanto en el proceso de metastatización y (iii) un área de las células inmunitarias concentradas (denotadas inmune), junto con un componente estromal, que incluye adipocitos dispersados de principio a fin del lado derecho e intermedio de la muestra.

Los valores de ^{55}Mn de los vasos linfáticos normales, designados N, en la porción normal de la mama, produjeron valores de CC/S de 3204, 3104 y 3155. Los vasos linfáticos que contienen células cancerosas son informativos. El vaso linfático C1 produce un valor de 2904, C2 y C3 producen 2804 y C4 produce 2771. Por lo tanto, los contenidos de ^{55}Mn de estas células metastásicas en tránsito son un poco diferentes de sus células progenitoras que constituyen un conducto normal de la mama. En contraste, las células en tránsito en el vaso linfático 5 tienen una CC/S de mediana de 8612 y se predice que son radio-resistentes. Este ejemplo ilustra la micro-heterogeneidad atómica que se presenta en una pequeña muestra individual de la mama. Esta micro-heterogeneidad no puede extraerse de la patología de las células cancerosas en C1 a C5 que están en el proceso de metástasis, puesto que en el nivel microscópico parecen indistinguibles.

Los datos metalómicos revelan que los cuatro metales, ^{55}Mn , ^{66}Zn , ^{63}Cu y ^{55}Fe resuelven fácilmente las áreas que consisten en adipocitos a diferencia de las regiones celulares y acelulares vistas en las secciones teñidas con H&E

(Figura 36). Los contenidos metalómicos de adipocitos se diluyen por la gran concentración de lípidos en estas células.

La cuestión de heterogeneidad, vista tan claramente en esta sección de cáncer de mama en tanto los niveles morfológicos como metalómicos, también es penetrante en otros tipos de cáncer, aún en grandes regiones diferentes dentro del mismo órgano.

5 Existen varias cuestiones importantes que se toman en cuenta por los profesionales médicos con respecto al
tratamiento de un paciente con cáncer, incluyendo, pero no limitado a, la edad del paciente; la condición de salud
actual del paciente; comorbilidades; las ubicaciones del tumor o tumores (primario o metastásico); ya sea cirugía,
10 quimioterapia, tratamiento con fármacos, inmunoterapia o radiación es una opción si el tratamiento se hace como
intención de curar, o paliativo. Esta lista ejemplifica la red de decisiones clínicas que se debe navegar para producir
las mejores opciones. El nodo de decisión central después de que se han completado los barridos y las pruebas
15 sanguíneas, es la patología de los tumores. Todas las otras decisiones siguen de la información obtenida en este
nodo, puesto que una inferencia se hace con respecto a si el tumor es probable que sea benigno o es probable que
progrese. Excepto en el caso de la medición de la tasa mitótica, hasta la presente invención, la inferencia actualmente
no es con base en los datos cuantitativos, sino en la experiencia general con un tipo de tumor particular. Para tumores
20 que son relativamente poco comunes, existen habitualmente pocos ensayos clínicos que proporcionan orientación
sobre qué etapa terapéutica es la mejor opción. Aún para tipos de tumores comunes, tal como aquellos de la mama,
próstata, cerebro, piel y ovario, las deficiencias en la multitud de pruebas clínicas que existen pueden dar lugar a
controversias continuas. El mayor problema es que los datos recolectados en este nodo de decisión patológica pivotal
de un tipo de tumor particular no son de calidad cuantitativa requerida y hasta esta aplicación, no son generalizables
para todos los tipos de tumores.

El “valor” clínico de la información patológica crucial (es decir, un indicador para si debe implementarse una opción
terapéutica principal tal como radiación), descansa en gran medida en la interpretación subjetiva de metodologías de
25 tinción, en combinación con información de anticuerpos, o varias formas de hibridaciones *in situ*, que se complementan
adicionalmente por nuevas tecnologías genómicas y proteómicas. Como se refuerza por los ejemplos adicionales a
continuación, los datos atómicos proporcionan una nueva medida de cuantificación que hasta ahora ha carecido en
este tratamiento con radiación/de patología clave, del nodo de decisión. El indicador terapéutico atómico de cualquier
tipo de tumor proporciona por primera vez, una base cuantitativa de qué pacientes son candidatos adecuados para
radioterapia y en que pacientes es probable que vuelva a producirse un tumor después de la radioterapia.

EJEMPLO 7

30 Cáncer de la próstata

La Figura 37 muestra un ejemplo clínico de la heterogeneidad en estado patológico en diferentes partes de un tejido
u órgano, en este caso la glándula prostática. Se ilustra por un informe final de biopsia de próstata de EE.UU. (con
todo el permiso de la descripción de los pacientes). El paciente (más adelante en el presente documento denominado
35 paciente X), tiene adenocarcinoma de la próstata con un nivel de PSA de 8,1 ng/ml. El informe de biopsia documenta
las anomalías en diferentes regiones de la próstata con 7 de cada 12 regiones que muestran cambios de poco
significado y cinco regiones con “cáncer” como se define por los puntajes de Gleason no mayores que 7 (panel
superior). El resumen diagnóstico de la extensión de la implicación de cada una de las doce biopsias de núcleo también
se muestra (panel inferior; parte A a la parte L). Antes de la presente invención, este paciente se evaluaría para
40 tratamiento con radiación sin ninguna medida cuantitativa que demuestre que este tratamiento se justificaría. Este
paciente experimentó tratamiento con radiación con base en la preferencia personal después de análisis con su
facultativo de atención primaria, la otra opción ofrecida a él que es prostatectomía radical. De acuerdo con la presente
invención, la distribución química de los elementos dentro de cada una de estas regiones se mide, por ejemplo, los
niveles de ⁵⁵Mn, distribuciones 2D y HMR(^AM), se determina por ablación con láser. Los resultados se analizan usando
45 los procedimientos estadísticos disponibles y la teoría estadística, incluyendo calcular una medida de la tendencia
central, donde las medidas comunes de la tendencia central son la mediana, media aritmética y moda. También puede
usarse cualquier otra medida de la tendencia central conocida en la técnica, incluyendo, pero no limitado a media
geométrica, mediana-media, media winsorizada K-veces, media recortada K-veces y media ponderada y los datos
también se pueden transformar antes del cálculo de una tendencia central. Por ejemplo, los datos también se prueban
50 usando coeficientes no paramétricos, incluyendo la prueba de Kolmogorov-Smirnov, que implica no hacer
suposiciones sobre la distribución de los datos. Otros procedimientos estadísticos incluyen una combinación de
Bayesiano y coeficientes más estándar, claramente expuestos por Lee y coautores en Demystify Statistical
Significance-Time to Move on from the P value to Bayesian Analysis, (Lee, J Journal of the National Cancer Institute,
103, 2-3 2010) and Berry, Carlin, Lee & Muller. Bayesian Adaptive Methods for Clinical Trials. Chapman and Hall/ CRC
Biostatistics series. ISBN 9781439825488. 2010; Nuzzo, Nature, 506, 150-152. 2014).

55 Otras metodologías estadísticas incluyen aquellas expuestas en: Talfray y col., British Medical Journal, 316, 989-991,
1998; Sterne & Smith, British Medical Journal, 322, 226-231, 2001; Bland & Altman, British Medical Journal, 328, 1073,
2004. En un escenario clínico, otros procedimientos incluyen: Rubinstein y col., Journal of the National Cancer Institute,
99, 1422-1423, 2007; Krzywinski & Altman, Nature Methods, 10, 1041-1042, 2013).

Al finalizar el análisis estadístico, se toma una decisión sobre la radio-sensibilidad o radio-resistencia de las diferentes

regiones del tumor y el tratamiento más apropiado. Por ejemplo, un tumor que se considera que es radio-sensible en el nivel colectivos y se irradia en sus HMR(⁵⁵Mn) cargadas de células cancerosas (si las hay). Para un tumor que es radio-resistente, o tiene grandes HMR(⁵⁵Mn), no se recomienda el tratamiento con radiación. El tratamiento con radiación selectiva también se recomienda para áreas específicas de un tumor que es radio-sensible. Por ejemplo, se recomienda cualquier tratamiento con radiación que toma como diana de manera selectiva un área específica de un tumor. Estos tratamientos de radiación selectiva que están disponibles y se conocen en la técnica se contemplan. Una persona en la técnica es capaz de determinar que se justifica el tratamiento selectivo.

El mismo enfoque cuantitativo de LA-ICP-EM se ha aplicado a 10 tumores de la próstata como se usa para los siete tipos de tumores anteriores descritos hasta ahora. Una vista general de estos datos se presenta en la Figura 38.

- 10 Conclusión: ningún tumor tuvo altas HMR(⁵⁵Mn) y sus valores de vóxel en general están en el extremo bajo del espectro de ATI (es decir, bajo intervalo de CC/S) y, por lo tanto, a partir de esta muestra, se espera que los tumores sean mayormente sensibles a la radiación.

EJEMPLO 8

Melanoma primario de la piel metastásico al cerebro

- 15 Las Figuras 39 y 40 revelan los datos clínicos detallados y su comparación a los datos atómicos cuantitativos de un paciente de 70 años (más adelante en el presente documento denominado paciente Y), que primero presentó un melanoma primario y posteriormente se diagnosticó con un tumor cerebral. El paciente se trató con radiación de cerebro completo, diversos fármacos, inmunoterapia (prembrolizumab) y finalmente experimentó una craneotomía estereotáctica. Este ejemplo ilustra el nivel de detalle clínico que se requiere para hacer coincidir los datos atómicos, así como la línea base clínica implicada al colocar un ATI en la práctica médica de rutina. El paciente ha proporcionado permiso completo de la divulgación.

- 20 El paciente Y inicialmente se diagnosticó con un melanoma primario de la espalda superior, con ganglios linfáticos centinela claros, así como varios carcinomas de células basales y carcinomas de células escamosas. Varios años después, después de un ataque, los barridos de MRI revelaron una neoplasia cerebral del lóbulo parietal izquierdo (Figura 39, panel A, con flechas). Después del tratamiento con radiación, los barridos de MRI revelaron la presencia de material residual en el sitio de tumor, con sus ambigüedades asociadas de interpretación (Figura 39, panel B).

- 25 El informe detallado de patología mencionó que las secciones de la piel del melanoma primario mostraron un melanoma nodular ulcerado con las células tumorales que son positivas a MelanA y negativas para 34Be12, que es consistente con melanoma (Figura 39, panel C). El espesor de Breslow era de 3,8 milímetros; el nivel de Clark 4; ulceración, 3 milímetros; porcentaje de ancho de tumor invasivo dérmico, aproximadamente 50 %, mitosis dérmica 9 por mm² (que se considera que es una alta tasa mitótica); tipos de células dominantes, naevoide y epiteloide; invasión intravascular y linfática no se vio y la elastosis actínica/solar fue leve.

- 30 El área melanótica se escindió ampliamente de la espalda derecha superior y se llevaron a cabo escisiones de cuatro nodos centinela. Las secciones se trataron con S100, HMB45 y MelanA para confirmar la lesión siendo un melanoma primario.

- 35 Mientras que la elipse primaria reveló melanoma, ningún tumor adicionalmente era evidente en la escisión más amplia. La epidermis adyacente reveló cambios reactivos. Los ganglios linfáticos de centinela 1, 2, 3 y 4 no revelaron evidencia de malignidad adicional con base en la tinción con H&E e inmunoperoxidasas, mientras que el estado de nodo 3 no se reportó. Después de la escisión, el paciente se declaró "libre de cáncer" y después de 6 meses no mostró signos de melanoma recurrente.

- 40 Tres años después el paciente colapsó, pero se recuperó, aún exhibió signos de incoordinación de la pierna izquierda cuando caminaba. Episodios similares del movimiento involuntario de la pierna se repitieron hasta 20 veces por día e inicialmente estaban acompañados por una sensación extraña en el lado izquierdo de la cabeza. Un MRI cerebral reveló un contraste de 14 mm que potencia la lesión en el lóbulo parietal izquierdo paramédico alrededor de la circunvolución frontal ascendente (Figura 39). Un radiólogo dio una diagnosis diferencial de un glioma de grado bajo, pero era posible que el paciente tuviera un melanoma 3 años anteriormente, que la lesión craneal podría en su lugar ser un melanoma recurrente. Esta ambigüedad se refleja por las limitaciones de MRI. El radiólogo concluyó que "la naturaleza de esta región es incierta. Es probable que represente una neoplasia del cerebro que es de bajo grado en particular puesto que no hay efecto de masa o edema asociado con la lesión. Los descubrimientos en el barrido ponderado de difusión de la baja señal en el mapa de ADC (coeficiente de difusión aparente) hacen probable que sea una región de bajo grado tal como un ganglioglioma, pero también consideran un DNET (tumor disemбриoplástico neuroepitelial) o xantocitoma pleomórfico sin ningún componente quístico. Un pequeño oligodendroglioma sigue siendo una posibilidad".

- 45 Se recomendó que la neurocirugía no se realizara en el momento, con la radiocirugía estereotáctica siendo la opción apropiada. Dado que el paciente se ha diagnosticado con un melanoma primario, era posible que la lesión cerebral fuese un melanoma metastásico al cerebro. El paciente experimentó radioterapia para el supuesto melanoma metastásico con la dosis total de radiación distribuida que es 25 Gy y también empezó un curso de régimen

inmunoterapéutico de pembrolizumab 2 meses después de la radioterapia. Un mes adicional después un MRI reveló que la metástasis frontal de línea media había disminuido en diámetro de 16 mm a 11 mm. Al pie de la letra, el tumor tuvo componentes resistentes y sensibles. El tumor se llegó a definir mejor con un margen de mejora más delgado y con un centro más discretamente hipointenso. La mayoría de esta reducción en el tamaño de tumor es debido a la radiación y no al pembrolizumab de fármaco inmunoterapéutico puesto que la regresión del tumor después de un mes de este tratamiento con fármaco promedia solo 6 %, (Hamid y col., 2013, New England Journal of Medicine, 369, 134-144). Este tumor del paciente redujo de los diámetros de 16 mm:16 mm a 11 mm:11 mm:11 mm. Esta es una reducción de $(5+5+5) / (16+16+16)$, 31 %, de las cuales 6 % se pueden atribuir al fármaco y 25 % a la radiación. Esto significa que 80 % (25/31) de la regresión inicial del tumor era debido a la radiación. Un barrido adicional de MRI 3 meses después reveló un sonrojo de la mejora de contraste periférico en la materia blanca adyacente al foco de infección del tumor, que sugiere el proceso de tumor desde la última examinación. El tumor aún estaba en el diámetro más largo de 11 mm dos meses después. Un MRI aún posterior reveló el progreso marcado alrededor del tumor que ahora midió 23 mm en el diámetro más largo (Figura 39B), sin embargo, no era posible decir si era la radio-necrosis o el tumor progresivo. El paciente también empezó el tratamiento con Avastin y se decidió proceder a la craneotomía. Antes de la craneotomía, se observó un tumor hiperintenso centralmente necrótico, aproximadamente 18 x 33 mm transaxial y 33 mm oblicuo superior, características de acuerdo con un tumor de alto grado. El paciente experimentó una craneotomía estereotáctica para retirar esta lesión frontal izquierda.

La histopatología del tumor cerebral extirpado reveló dos piezas de tejido blando friable rasgado tostado y marrón que miden 15 mm x 10 mm x 5 mm y 9 mm x 6 mm x 5 mm. Había muy pocas y dispersadas células desvitalizadas de "melanoma" con núcleos borrosos y ninguna evidencia inequívoca de malignancia viable residual en este material. El material era negativo para los marcadores melanA y HMB45 de melanoma y no se vio pigmento definido. En la ausencia de la confirmación de marcador, hay evidencia insuficiente para declarar de manera inequívoca que era un melanoma metastásico o una lesión cerebral independiente, aunque el patólogo se inclinó hacia un melanoma.

Análisis atómico de la biopsia de tumor primario

Puesto que no hubo biopsias de la lesión cerebral antes de la radiación, la única evidencia disponible para la identidad de tumor y la radio-sensibilidad resulta del tumor primario (Figura 39, paneles C, D y E). Se obtuvo una sección de tejido de 5 micrómetros no teñida convencional (con todas las cuestiones legales y de consentimiento del paciente cumplidos) y toda el área de la Figura 39 panel C se sometió a ablación con láser y después se examinó para la presencia de nidos de las células cancerosas entre la heterogeneidad estromal normal que es visible en la mayoría del panel C.

Los datos numéricos obtenidos de la ablación con láser se muestran en la Figura 40 donde se analizaron cinco regiones diferentes del tumor primario. El valor de ^{55}Mn central de los cinco surcos después de la substracción de fondo era 3747 CC/S (ATI) colocando el tumor primario en un intervalo intermedio de radio-sensibilidad. Los datos clínicos son compatibles con este valor puesto que el tumor se sometió a ablación con radiación.

Como se indica anteriormente, el paciente también se trató con un régimen inmunoterapéutico de pembrolizumab que toma como diana PD-1, puesto que es una combinación de todos estos factores que ha contribuido al resultado final. Sin embargo, como se señala anteriormente, el 80 % de la reducción en el tamaño inicial del tumor puede atribuirse al tratamiento con radiación.

EJEMPLO 9

Estado tumoral después de la irradiación de un tumor visible

Existe una fuente de tumores que son favorables para un enfoque más cuantitativo en términos de ATI y estos son tumores "externamente visibles" cuyo estado, progreso y condición después del tratamiento con radiación pueden medirse más fácilmente que los tumores "internos". El paciente Z es un ejemplo de este caso (Figura 41). Por razones de privacidad, este caso solo sirve como una ilustración del resultado directamente medible e inequívoco de radiación de un tumor externamente visible y resalta la diferencia entre las ambigüedades experimentadas con las cuestiones de tumor interno experimentadas con la lesión cerebral del paciente Y.

El paciente Z se trató con radiación para un carcinoma de células escamosas, (Figura 41 panel superior), que después del tratamiento con radiación se resolvió casi completamente en seis meses (panel inferior). Si hubiera estado disponible una biopsia para el análisis atómico, habría sido útil una comparación de la respuesta clínica y el ATI.

A diferencia de otros diagnósticos que proporcionan información en si un paciente tiene un tipo particular de tumor, pero no proporcionan la siguiente etapa terapéutico adaptado específicamente para ese paciente, el ATI es aplicable para todos los tipos de tumor. ATI es pan-diagnostico. No se restringe en la manera de una prueba de PSA, por ejemplo, donde se tiene que obtener un valor por encima de 4 ng/ml, la siguiente cuestión es: ¿Qué es la intervención terapéutica? Es prostatectomía radical, radiación (haz externo, braquiterapia, o haz de protones), espera en observación, crioterapia, o terapia de privación de andrógenos, diferente del ATI, la prueba de PSA misma no proporciona el indicador terapéutico.

En el caso de cánceres de la mama, aun si se lleva a cabo la completa extirpación de un tumor con amplios márgenes,

- seguida de quimioterapia, el tratamiento con radiación, terapia con hormonas y tratamiento con fármacos con Herceptin y/o Avastin e/o inhibidores de verificación inmunitaria y/o agonistas inmunitarios y/o vacunas, ¿cuál es la probabilidad de que tumor el tumor vuelva a producirse si no hay información de la fuente primaria con respecto a su radio-sensibilidad? Si la biopsia de tumor de mama tubo un ATI de sub-umbral, por ejemplo, después la probabilidad de que vuelva a producirse después de la radiación sería mucho menor que si el ATI de la biopsia estuviese por encima del umbral y si el tumor tuviese una o múltiples HMR(⁵⁵Mn), de las cuales las células pueden ya haber migrado. Si las células tumorales ya se han dispersado a los ganglios linfáticos cercanos de la mama, después las mediciones del ATI (alta o baja) en estos nodos proporcionarán a un médico clínico con una indicación de si se requiere una monitorización más vigilante del paciente.
- De manera similar en la mutación de BRAF^{V600E} en melanoma y en muchas pruebas genómicas, la presencia de una mutación “activadora” dirigible se infiere de una muestra celular o de ácidos nucleicos circulantes en la vasculatura. Esto no tiene el alto valor de una visualización 2D de la conformación tumoral, puesto que lo anterior son un grupo mezclado de entidades. Esto es un diferenciador crítico entre el uso de un ATI y una muestra mezclada, donde en la última, es posible decir si un derivado de alta lectura del resultado de un grupo pequeño de células cancerosas o células estromales activadas, o bien la mayoría de células en la muestra contribuyen a la lectura. Las implicaciones clínicas para el tratamiento son muy diferentes. Un tratamiento de melanoma tratado con vemurafenib, por ejemplo, que tiene un número pequeño de células en el tumor que produce la proteína alterada, apenas se beneficiará del tratamiento, considerando que el fármaco será mucho más eficaz en un paciente de melanoma donde un gran número de células en el tumor están produciendo un producto de proteína defectuosa. Esta distinción es difícil de hacer salvo que esté disponible una conformación 2D.

EJEMPLO 10

Mediciones usando sinergizadores/sensibilizadores a la radiación

¹⁰Boro

- La radio-sensibilidad de un tumor se determina al medir ⁵⁵Mn y sus señales calibradas de acuerdo con la invención y la radio-sensibilidad puede estar influenciada por la adición de un sensibilizador. En este caso, el éxito de la terapia de captura de neutrones de boro dependerá tanto de la señal calibrada total de ⁵⁵Mn como de aquella del sensibilizador. Al adicionar un sensibilizador tal como p-boronofenilalanina a una población de células tumorales que es alta en manganeso, puede no ser tan útil como adicionarlo a una población de células que es baja en manganeso. En este ejemplo, el ATI para un tumor se determina usando LA-ICP-EM, antes de usar la terapia de captura de neutrones de boro.

- Una muestra tumoral se toma de un paciente que se ha infundido previamente de manera intravenosa con un sensibilizador aprobado por FDA, por ejemplo, un derivado de ¹⁰Boro, tal como p-boronofenilalanina, o la infusión intravenosa de liposomas que contienen derivados de boro como se describe anteriormente (Heber y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111, 16077-16081. 2014), o nanopartículas de boro como se describe anteriormente (Petersen y col., *Anticancer Research*, 28, 571-576, 2008). La muestra tumoral después se examina para la distribución 2D de ¹⁰Boro para determinar si sus niveles y su distribución serán beneficiosos en términos de radiación. De manera simultánea, o de manera separada, la distribución y nivel de Mn se determina. Las cantidades relativas de ⁵⁵Mn y ¹⁰B determinan los tumores adecuados de pacientes para radiación.

- Se describe brevemente la terapia de captura de neutrones de boro (BNCT). Se conoce que varias entidades externas hacen los tumores más sensibles a la radiación, por ejemplo, boro, ¹⁰B. Un neutrón térmico se captura por el núcleo de ¹⁰B y la reacción de fisión resultante produce ⁷Litio como un retroceso, una partícula alfa, un rayo gamma débil (fotón gamma de 0,5 MeV) y 2,4 MeV de energía cinética. El ion de ⁷Li y la partícula alfa se clasifican como radiación de transferencia de alta energía lineal y son altamente destructivos.

- En estudios en ratones, la inyección subcutánea de células pre-incubadas con nanopartículas de boro en ratones, que se irradiaron después con radiación de neutrones, condujo a una mayor supervivencia, puesto que el crecimiento de tumores se retrasó (presumiblemente debido a que los tumores con boro se hicieron más sensibles a la irradiación de neutrones) (Petersen y col., *Anticancer Research*, 28, 571-576, 2008). Un ensayo clínico para el tratamiento de tumores de cabeza y cuello se ha iniciado por la (ClinicalTrials.gov identificador; NCT00114790). Además, un ensayo clínico de fase I/II en pacientes Argentinos (con múltiples metástasis subcutáneas de melanoma), que se han tratado con radiación de neutrones y de p-boronofenilalanina producen una tasa de respuesta de casi un 70 % (Menendez P Appl. Rad. Isot. 67, (7-8 Suppl.) S50-S53). 2009). También se ha usado la terapia de captura de neutrones de boro para el cáncer de pulmón de células no microcíticas (Farias y col., *Phys. Med.* 30,888-897. 2014).

2 desoxi-D-glucosa, 2-DG

- Otros radio-sensibilizadores útiles incluyen, por ejemplo, aquellos como se resumen en Shenoy & Singh, *Cancer Investigation* 10, 533-551, 1992. Estos incluyen 2-desoxi-D-glucosa, 2-DG, que es un análogo cercano de glucosa, pero sin el grupo hidroxilo en la posición 2.

2-DG se toma con avidez por aquellas células tumorales que preferentemente usan glucosa como combustible

disponible, pero tras la fosforilación por hexoquinasa, 2-DG no se metaboliza adicionalmente. Por consiguiente, al competir con la captación de glucosa y los pasos posteriores, 2-DG provoca tensión metabólica y vuelve a las células más sensibles a la radiación. En líneas celulares expuestas a la radiación ionizante y tratadas simultáneamente con 2-DG, el daño de radiación se aumentó en algunas y se observó la heterogeneidad usual entre las líneas celulares (Dawarkanath y col., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 50, 1051-1061, 2001). Se piensa que la radio-sensibilización de algunas poblaciones de células tumorales se presenta mediante perturbaciones en el metabolismo de tiorina (Lin y col., Cancer Research, 63, 3413-3417, 2003).

En los ensayos clínicos de fase I/II temprana en pacientes con tumores cerebrales avanzados, la toxicidad y factibilidad de usar 2-DG en combinación con una radioterapia de gran fracción, 5 Gy, (2-DG más RT) se encontró que es bien tolerado (Mohanti, B, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys, 35, 103-11, 1996).

El tratamiento de pacientes de glioblastoma multiforme con dos dosis orales crecientes de 2-DG y radiación reveló que hasta 250 miligramos/kilogramo de peso corporal se toleraron bien sin ningún daño significativo al cerebro normal. Además, algunos de los 60 pacientes en esta cohorte revelaron supervivencias mediadas que excedieron aquellas de los pacientes que solo recibieron radioterapia (Singh y col., Strahlentherapie und Onkologie, 8, 507-514, 2005). Un resumen del tratamiento de paciente y los resultados se encuentra en Dwarakanath, J. Cancer Research and Therapeutics, 5, 21-26, 2009).

Finalmente, en ratones desnudos con tumores pancreáticos heterotrópicos, el tratamiento con 2-DG más la radiación dio como resultado la inhibición del crecimiento tumoral y la supervivencia aumentada, en comparación con los controles (Coleman y col., Free Radical Biology and Medicine, 44, 322-331, 2008).

La prueba de un tumor para ⁵⁵Mn (y cualquier otro dato metalómico pertinente), antes de la radiación, por consiguiente, es otra aplicación práctica de la tecnología de la invención a los radio-sensibilizadores, no solo 2-DG.

Inmunoterapias

La radiación y las respuestas inmunitarias antitumorales que siguen, forman un sistema interactivo con una presentación aumentada de antígenos en las superficies de células cancerosas y la liberación de un hospedador de proteínas y péptidos (y metales unidos a proteínas y péptidos), que tiene influencia sobre las respuestas de las células presentadoras de antígeno. Por consiguiente, los tumores primarios que se han irradiado (o crecimientos metastásicos distantes dentro del mismo individuo que no se han irradiado), pueden llegar a sensibilizarse al ataque por diversas células inmunitarias. Las bases mecánicas para esta sensibilidad aumentada se debaten activamente, pero permanecen sin resolver, (Sharabi y col., 2015, Oncology [Williston Park] 2015, 29(5), pii:211304; Formenti, J Natl Cancer Inst. 105, 256-265, 2013). Los melanomas que son altamente resistentes a la radiación tienen altos niveles de melanina (que almacenan un hospedador de metales). En el contexto de la presente invención, también se aborda la efectividad de las inmunoterapias. Sin limitarse por ninguna teoría particular, las propiedades metabólicas extensivas y muy diferentes de las células cancerosas resistentes a la radiación, frente a las sensibles, no será probable que se traten igualmente por el sistema inmunitario, ya sea antes o después del tratamiento con radiación. Por consiguiente, la radiación concomitante con la inmunoterapia, radiación que precede a la inmunoterapia, o inmunoterapia que precede a la radiación, producirá poblaciones muy diferentes de células dentro de un tumor debido a la selección diferencial. En este ejemplo, un tumor primero se caracteriza por su ATI de acuerdo con el procedimiento de cualquier aspecto, realización o ejemplo en el presente documento y después se aplica una inmunoterapia útil. La efectividad de la inmunoterapia y/o cuándo administrar el tratamiento con radiación, por ejemplo, antes, durante, o después de la inmunoterapia se contempla al realizar el procedimiento de la invención de acuerdo con cualquier aspecto, realización, o ejemplo en el presente documento. Se piensa que diferentes tipos de inmunoterapia interactúan de manera diferente con el mismo tipo de radiación. Por ejemplo, Sipuleucel-T para cáncer de próstata resistente a la castración (una vacuna de células dendríticas diseñada para inducir inmunidad contra fosfatasa ácida prostática), ipilimumab (anti-CTLA4) para melanoma metastásico no extirpable, pembrolizumab y nivolumab (anti-PD-1) para melanoma, nivolumab para melanoma y cáncer de pulmón no de células pequeñas escamoso avanzado y tremelimumab y lirimumab, es probable que produzcan diferentes respuestas a la radiación que las inmunoterapias que implican células T de receptor antígeno quimérico (CAR-inmunoterapias a base de T). La inmunoterapia de bloqueo de punto de control en combinación con la distribución de radiación estereotáctica está en marcha para el tratamiento de glioblastoma, pero el glioblastoma se está tratando como una entidad unitaria. En consecuencia, cualquier glioblastoma se caracteriza de acuerdo con el procedimiento de cualquier aspecto, realización o ejemplo en el presente documento y se proporciona una evaluación para los pacientes que respondieron mejor a las inmunoterapias.

Rosa de bengala y melanoma

La rosa de bengala (4,5,6,7-tetracloro-2',4',5',7-tetrayodo-fluoresceína) es un producto químico industrial patentado en 1882 que vuelve rojos los hilos y la comida. Cuando se aplica intralesionalmente a melanomas cutáneos, puede haber encogimiento significativo de algún tumor o tumores (Thompson y col., Melanoma Research, 18, 405-411, 2008; Thompson y col., Ann. Surg. Oncol. 22, 2135-2142, 2015). Mientras que las lesiones de piel tratadas disminuyeron en volumen después del tratamiento intralesional de rosa de bengala, algunos de los tumores no tratados distantes en el mismo paciente también se encogieron, indicando que la respuesta inmunitaria probablemente se implicó. La adición de radioterapia (RT) al tratamiento de rosa de bengala (RB) puede potenciar adicionalmente la ablación de tumor,

como se muestra para los tres pacientes que experimentaron ambas realizaciones terapéuticas RB más RT (Foote y col., Melanoma Research, 2010, 20, 48-51, 2010). Cabe observar, sin embargo, que el tratamiento con radiación de estos pacientes no era con base en ningún conocimiento *a priori* de la radio-sensibilidad o radio-resistencia de sus múltiples tumores, puesto que la radio-sensibilidad no era medible antes de esta aplicación. De hecho, se observó que

5 “no hay aún ningún consenso sobre la dosis óptima y el fraccionamiento en el melanoma” (Foote y col., Melanoma Research, 20, 48-51, 2010).

La rosa de bengala se puede considerar como un agente que tiene múltiples modos de acción: un sensibilizador de células a la radiación, un sensibilizador mediante aumento del sistema inmunitario, un agente “aniquilador de células aditivas”, o un sinergizador. No es posible diferenciar entre estos puesto que se desconoce el mecanismo molecular de estos interactuantes y el arreglo especial de las células cancerosas y estromales que ha tomado hasta RB permanece desconocido. Por consiguiente, se deja al facultativo con la tarea difícil de la gestión de los pacientes de melanoma, en particular aquellos con regiones metastásicas regionales, tal como locales, satelitales y de recurrencia en tránsito. Las directrices de tratamiento actuales incluyen predominantemente escisión quirúrgica, ablación local, quimioterapia intralesional y fármacos dirigidos a diana tal como vemurafenib. Todos estos son desafiantes “debido a la heterogeneidad del trastorno y la proliferación frecuente y persistente de las lesiones” (Thompson y col., 2015, Ann. Surg. Oncol. 22, 2135-2142, 2015).

10 La rosa de bengala se puede considerar como un agente que tiene múltiples modos de acción: un sensibilizador de células a la radiación, un sensibilizador mediante aumento del sistema inmunitario, un agente “aniquilador de células aditivas”, o un sinergizador. No es posible diferenciar entre estos puesto que se desconoce el mecanismo molecular de estos interactuantes y el arreglo especial de las células cancerosas y estromales que ha tomado hasta RB permanece desconocido. Por consiguiente, se deja al facultativo con la tarea difícil de la gestión de los pacientes de melanoma, en particular aquellos con regiones metastásicas regionales, tal como locales, satelitales y de recurrencia en tránsito. Las directrices de tratamiento actuales incluyen predominantemente escisión quirúrgica, ablación local, quimioterapia intralesional y fármacos dirigidos a diana tal como vemurafenib. Todos estos son desafiantes “debido a la heterogeneidad del trastorno y la proliferación frecuente y persistente de las lesiones” (Thompson y col., 2015, Ann. Surg. Oncol. 22, 2135-2142, 2015).

La pertinencia de la aplicación actual a la rosa de bengala y las opciones de tratamiento terapéutico es que la molécula de rosa de bengala contiene cuatro átomos de yodo que se miden fácilmente en secciones de tejido por LA-ICP-EM. Por consiguiente, una sección de cualquier tumor que se ha inyectado intralesionalmente por rosa de bengala puede analizarse simultáneamente en cada vóxel para yodo, ⁵⁵Mn o cualquier otro átomo, antes de y después del tratamiento con radiación, para determinar qué poblaciones de células son susceptibles a la radiación. De esta manera, una persona puede dirigir de manera precisa las lesiones susceptibles. No hay datos aún para determinar la efectividad clínica relativa de RB seguida por la radiación, o radiación seguida por RB. Lo que está claro es que cualquier tumor que sea accesible a inyección intralesional de RB, puede analizarse por los procedimientos de la presente solicitud para proporcionar datos cuantitativos sobre opciones radioterapéuticas.

20 La pertinencia de la aplicación actual a la rosa de bengala y las opciones de tratamiento terapéutico es que la molécula de rosa de bengala contiene cuatro átomos de yodo que se miden fácilmente en secciones de tejido por LA-ICP-EM. Por consiguiente, una sección de cualquier tumor que se ha inyectado intralesionalmente por rosa de bengala puede analizarse simultáneamente en cada vóxel para yodo, ⁵⁵Mn o cualquier otro átomo, antes de y después del tratamiento con radiación, para determinar qué poblaciones de células son susceptibles a la radiación. De esta manera, una persona puede dirigir de manera precisa las lesiones susceptibles. No hay datos aún para determinar la efectividad clínica relativa de RB seguida por la radiación, o radiación seguida por RB. Lo que está claro es que cualquier tumor que sea accesible a inyección intralesional de RB, puede analizarse por los procedimientos de la presente solicitud para proporcionar datos cuantitativos sobre opciones radioterapéuticas.

A modo de ejemplos no limitantes, la inyección de RB en la próstata mediante un planteamiento con múltiples agujas de núcleo y análisis simultáneo de ablación con láser de yodo y ⁵⁵Mn de secciones de tejido, proporcionará información sobre qué tipos de células de poblaciones normales, cancerosas y estromales preferentemente retienen RB. Estas distribuciones espaciales potenciarán la toma de decisiones con respecto a la radioterapia.

30 De manera similar, el depósito intralesional de RB en regiones tumorales de mama permitirá el análisis simultáneo de ablación con láser de yodo y ⁵⁵Mn de secciones de tejido y proporcionará información sobre qué tipos de células de poblaciones normales, cancerosas y estromales preferentemente retiene RB (como se representa para ⁵⁵Mn, ⁶⁶Zn, ⁵⁶Fe y ⁶³Cu en las Figuras 35 y 36 en la presente solicitud). Estas distribuciones especiales potenciarán la toma de decisiones con respecto a la radioterapia.

35 EJEMPLO 11

Implementación clínica del indicador terapéutico atómico

El análisis de los datos de ocho tipos diferentes de tumor ha revelado varios descubrimientos que colocan los aspectos clínicos y tecnológicos del ATI en perspectiva. No de manera inesperada, los melanomas son diferentes a todos los demás tumores epiteliales, puesto que ningún otro tipo de tumor sintetiza la melanina (salvo que sea una activación fortuita de todas las rutas que culminan en la producción de melanina en un tipo de célula no relacionada, o el resultado de la fusión celular entre células inmunitarias y células de melanoma). Además, los melanomas derivan de los derivados embriológicos iniciales de las células de la cresta neural, que son células migratorias que pueblan y forman diferentes estructuras embrionarias. Excepto por la naturaleza migratoria inicial de las células germinales, las células de la cresta neural son el otro único tipo de células transitorias que migran sobre largas distancias. Como se describe en el presente documento para diversos tumores melanóticos, las melaninas se co-localizan con las altas concentraciones de ⁵⁵Mn, ⁶⁶Zn, ⁵⁶Fe y ⁶³Cu. De estas, ⁵⁵Mn es más probable que proporcione protección a la radiación por su capacidad de unir O₂^{*}, H₂O₂ y el radical hidroxilo altamente peligroso OH^{*} cuando ⁵⁵Mn se une a diversas entidades químicas (Figura 2). Además, las altas concentraciones de melanina de principio a fin de un tumor pueden proporcionar un grado de protección física de la radiación que no está disponible para ningún otro tipo de tumor. Los únicos melanomas que pueden colocarse de manera razonable con todos los otros tipos de tumor, son aquellos melanomas que a través de la activación de las etapas que conducen a la producción de melanina, son completamente amelanóticas. Es notable con respecto a esto que los melanomas que se han examinado en el presente documento y que tienen concentraciones inequívocamente bajas de gránulos de pigmento de melanina por examinación microscópica visual (que no es cuantitativa), tienen bajos valores de CC/S de ⁵⁵Mn (valores centrales de vóxel de 1939, 1239, 817, 1439, 1278, 939, 1617 y 1678 CC/S). Todos estos caen por debajo del umbral de ATI 2K ilustrado en la Figura 11. Si este descubrimiento se confirma posteriormente de manera cuantitativa, después la condición amelanótica, en la ausencia de las HMR, puede ser indicativa de un bajo ATI de ⁵⁵Mn y sensibilidad a la radiación.

55 En un contexto clínico, un *modus operandi* para la aplicación de ATI a biopsias tumorales son los diagramas de flujo mostrados en las Figuras 42 y 43. En la primera, los melanomas de fácil acceso pueden retirarse por cirugía con

amplia escisión como se ejemplifica por el paciente Y. el análisis de los contenidos de vóxeles del coeficiente de sesgo no paramétrico de Bowley (NPSS, por sus siglas en inglés) (Bowley, 1901, Elements of Statistics, P S King and Son, publishers, Westminster, Londres, RU), proporcionaría la primera indicación de homogeneidad o la carencia de la misma. Segundo, las condiciones para la homogeneidad serían que, (i) los valores de NPSS para ^{55}Mn , ^{66}Zn , ^{56}Fe y ^{63}Cu serían todos bajos, (ii) que la muestra no tuviese HMR(^{55}Mn) en la célula cancerosa o bien compartimientos estromales y (iii) sin melanización abierta. Si la muestra se encuentra que es homogénea, su ATI estaría por encima o por debajo de un umbral elegido de importancia clínica. Puesto que el tumor primario se ha extirpado, estos datos sobre la homogeneidad y por encima y por debajo de los umbrales, proporcionarían información sobre las características probables de cualquier célula que se hubiese metastatizado antes, tales como la metástasis craneal en el paciente Y. El análisis de los ganglios linfáticos extirpados de un paciente que ha experimentado la retirada del melanoma primario, se analizaría de la misma manera como anteriormente. Un ATI proporcionaría orientación sobre si iniciar la radiación si un derivado metastático del tumor primario surge en un momento posterior. Si una biopsia de un sitio metastático está disponible, después el diagrama de flujo de la Figura 42 comienza de nuevo.

Las secciones del lado derecho de la Figura 42 ilustran la situación cuando una biopsia regresa una muestra que es heterogénea en términos de características de vóxel y cuando el tumor se extirpa. La heterogeneidad derivará de varios factores contribuyentes, (i) heterogeneidad dentro de la conformación principal, (ii) la presencia, tamaño y contenido de HMR(^{55}Mn) tanto en la célula cancerosa como compartimientos estromales y (iii) la presencia de gránulos de melanina y la extensión de las concentraciones intracelulares de melanina. La evaluación de todas las HMR(^{55}Mn), indicará la probabilidad de que vuelva a producirse un tumor distante (si cualquier célula ha metastatizado pronto antes de la extirpación del tumor primario).

El diagrama de flujo de la Figura 42 también se aplica a cualquier biopsia que se toma de sitios que no son susceptibles a la escisión por cirugía y donde necesita comprobarse por la determinación de un ATI, si la radiación es una opción útil en lo que respecta a la intención de tratar por radiación.

Para todos los demás tipos de tumor además de melanomas, el diagrama de flujo de la Figura 43 conducirá a un punto de decisión clínica en si usar radiación, o prescindir de la misma. La biopsia revelará homogeneidad o bien heterogeneidad (siendo la última un área gris inevitable en un sentido clínico). El tumor será extirpable o no y la radiación se usará si el ATI derivado de la ausencia de HMR (^{55}Mn) está por debajo del umbral. Si el tumor es heterogéneo y extirpable el ATI será un indicador de qué esperar si surgen las metástasis distantes en el último momento en la vida del paciente. Si el tumor no es extirpable, después la decisión de irradiar o no se toma basándose en los valores umbrales.

Se entenderá por la persona experta en la materia que varios otros factores no relacionados con el ATI se considerarán tanto por el facultativo tratante como el paciente. Estos incluirán, pero no se limitan a, la edad del paciente, la condición de salud actual del paciente, comorbilidades, las ubicaciones de los tumores (primario o metastático) y cualquier afección hereditaria que hace a un paciente sensible a la radiación. En el caso de lesiones cerebrales, algunos tumores serán más resistentes a la radiación que otros tipos de tumores, debido a que las células cancerosas usan un mecanismo novedoso de interconexión a través de microtubos, que permite que las células cancerosas dañadas se reparen por las otras dentro del tumor (Osswal y col., Nature, 528, 93-98, 2015).

EJEMPLO 12

Implementación clínica del indicador terapéutico atómico en combinación con otras entidades

El fundamento clave de esta aplicación es que impulsos enfocados de energía láser de alta irradiación aplicados a través de una sección de tejido y el análisis del material vaporizado mediante espectrometría de masas, proporcionan un mapa atómico espacial 2D que es de importancia terapéutica inmediata con respecto al tratamiento con radiación de pacientes de cáncer mediante un ATI. Este mapa de ATI/H&E es el fundamento en el cual se pueden superponer otros mapas diferentes. Una persona experta en la materia reconocerá que una elección juiciosa de las entidades biológicas que proporcionan información de múltiples capas/superpuesta, aumentará adicionalmente el impacto clínico de un ATI, una situación que no estaba disponible antes de esta aplicación. Se demuestra a continuación cómo integrar mapas adicionales que emplean anticuerpos marcados con metal usando análisis elemental, es decir, la ablación con láser-plasma inductivamente acoplado-espectrometría de masas (LA-ICP-EM) o ablación con láser-tiempo de vuelo-espectrometría de masas (LA-TOF-MS), o espectroscopia de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado (ICP-OES), o plasma de microondas-espectroscopia de emisión atómica (MP-AES), o espectroscopia de descomposición inducida por láser (LIBS), o espectrometría de masa de iones secundarios (SIMS), o estructura de borde cercano de absorción de rayos x (XANES), espectroscopia de absorción atómica (AA) o fluorescencia de rayos x (XRF), puede aumentar la potencia del proceso de toma de decisiones clínicas.

Mapas adicionales

La expresión génica puede medirse en las secciones de tejido mediante "transcriptómica espacial" usando cebadores oligo (dT) de transcripción inversa de matrices y nucleótidos fluorescentemente marcados (Stahl y col., Science, 353, 78-82, 2016). Esto proporciona un mapa espacial de expresión génica con relación al mapa H&E de la sección de tejido, pero viene a costa de ser trabajo intensivo, que comprende construcción de bibliotecas, etapas de amplificación,

pérdida de intensidad de fluorescencia con el tiempo, artefactos de tinción y auto-fluorescencia, así como deconvolución de grandes conjuntos de datos de entidades de significado clínico desconocido. Hasta donde se sabe, ningún mapa de expresión génica espacial anterior de las secciones de tejido ha informado sobre la cuestión clínica de si la radiación es una opción de tratamiento preferida para un paciente.

5 Lo que no ha estado disponible, hasta la presente aplicación, es un mapa 2D clínicamente útil generado de una medición simultánea de un ATI junto con parámetros biológicos especialmente seleccionados en el nivel celular o de proteína. Estos parámetros necesitan tener una presunta implicación en radioterapia y necesitan poder implementarse inmediatamente con las tecnologías actuales moleculares y patológicas. Se proporcionan a continuación varias ejemplificaciones de estos mapas.

10 Muchos tumores se reivindican que contienen “células madre cancerosas” (CSC, por sus siglas en inglés) (Clevers, Nature Medicine, 17, 313-319, 2011), que son prácticamente resistentes a la radiación (Ogawa et al, 2013, Anticancer Research, 33, 747-754). Esta radio-resistencia de CSC se piensa que se debe a varios factores incluyendo sus capacidades superiores de reparación de ADN y su protección intensificada a especies de oxígeno reactivo. Se piensa que estas CSC se renuevan así mismas, se dividen lentamente y son capaces de reconstituir un tumor. Si este es de hecho el caso, después sería ventajoso clínicamente construir y superponer un mapa de “propiedades de células madre cancerosas”, en el mapa de ATI/H&E. Esto puede realizarse usando anticuerpos marcados con metal.

La tecnología actual en las secciones de tejido embebido en parafina fijado con formalina en general emplea anticuerpos para los antígenos de interés, pero para multiplexar varios marcadores tumorales de proteínas, por decir 4 o 5, que se pueden co-localizar en la misma sección de tejido, es casi imposible usar la inmunohistoquímica actual. El uso de un anticuerpo primario que es específico de antígeno, se sigue por una etapa de amplificación que implica un anticuerpo secundario marcado con enzima. El factor tiempo de teñir 5 secciones de tejido secuenciales, procesadas en diferentes momentos y diferentes condiciones de tinción, no es propicio a un rendimiento rápido y preciso, ni a la interpretación. Sin embargo, la aplicación de marcación de anticuerpos usando metales (en especial lantánidos y sus isótopos fácilmente distinguidos), significa que diferentes anticuerpos, cada uno etiquetado con un isótopo diferente, puede aplicarse a la misma sección de tejido que después se examina directamente mediante LA-ICP-EM, (Giesen et al, 2011, Anal. Chem. 03, 8177-8183). Aquí no hay ambigüedad con procedimientos de tinción co-localizados, cuestiones de fluorescencia o cuantificación. Esta metodología se ha aplicado en un contexto diagnóstico para el marcaje de anticuerpos primarios, anti-Her2, anti-CK-7 y anti-MUC 1 usando los lantánidos holmio, tulio y terbio y su ubicación subsiguiente en las secciones de tejido de cáncer de mama examinadas mediante LA-ICP-EM, (Giesen y col., 2011, Anal. Chem. 83, 8177-8183). También se ha aplicado para marcar directamente hidroxilasa de anti-tirosina (TH) con iterbio-173, Paul y col., 2015, Chemical Science, DOI: 10. 1039/c5sc02231b, 2015).

Los datos anteriores demuestran que múltiples anticuerpos marcados con lantánido analizados mediante análisis elemental pueden reportar sobre la distribución espacial de antígenos en la misma sección de tejido y proporcionan información clínica de uso de tratamiento de pacientes a base de fármacos. En el contexto de información radioterapéutica, sin embargo, el requerimiento es diferente. Se mide un ATI y entidades de significado radioterapéutico en la misma sección de tejido, o en secciones secuenciales seriales (por ejemplo, en la sección de cáncer de mama ejemplificada en la Figura 35, donde hay células cancerosas en vasos linfáticos y donde aquellas células de metastatización tienen diferentes niveles de ⁵⁵Mn). Esto puede implementarse como sigue.

Se sabe que los 15 lantánidos; lantano, cerio, praseodimio, neodimio, prometeo, samario, europio, gadolinio, terbio, disprosio, holmio, erbio, tulio, yterbio y lutecio, junto con escandio e itrio, tienen múltiples isótopos que se distinguen fácilmente por LA-ICP-EM. Por lo tanto, en lugar de 17 elementos, uno tiene una paleta mínima de alrededor de 32 marcas de las cuales elegir para marcar anticuerpos de elección. En el contexto de esta aplicación, el siguiente paso es seleccionar aquellos antígenos que son marcadores para “troncalidad”, reparación de ADN, ROS, división celular y metilasas y desmetilasas involucradas en el silenciamiento de supresores tumorales en células cancerosas y todas las cuales afectan a la pertinencia radioterapéutica.

En un contexto no limitante, las primeras etapas comprenden:

(i) seleccionar proteínas comprendidas en redes de “troncalidad” que son pertinentes para agresividad tumoral/potencial metastásico, tal como CD44, (mama, hígado y páncreas), CD133 (cerebro, colorrectal, pulmón, hígado), EpCAM, (colorrectal y pancreáticos) como se expone por Clevers (Nature Medicine, 17, 313-319, 2011), así como proteínas que se toman como diana por fármacos dirigidos a las células madre cancerosas tal como NOTCH, DLL4, FAK, STAT3 y NANOG (Kaiser, Science, 347, 226-229, 2015).

(ii) seleccionar proteínas implicadas en la reparación de ADN, tal como BRCA1, BRCA2 y ATM, como se revisa por Wood y col. (2001, Science 291, 1284-1289 y actualizaciones posteriores).

(iii) seleccionar proteínas implicadas en redes metabólicas de especies de oxígeno reactivo que tienen una función importante en el nicho tumoral, tal como factores inducibles de hipoxia, HIF (Simon y Keith, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 9 285-296, 2006), anhidrasa carbónica IX y catalasa.

(iv) seleccionar proteínas implicadas en redes de división celular tal como Ki-67 (Inwald y col., Breast Cancer Res Tret. 139, 539-552, 2013).

(v) seleccionar proteínas tal como la desmetilasa de ADN de ET1 y TET3 (Forloni y col., Cell Reports, 16, 1-15, 2016) y metilasas de ADN tal como la DNMT1, DNMT3 y DNMT3b que silencian o activan las regiones genómicas y tienen influencia en el potencial oncogénico de células dentro de tumores.

5 La segunda etapa comprende usar anticuerpos primarios para estos productos de proteína y después marcar los anticuerpos primarios o bien secundarios con un lantánido adecuado e hibridar estos anticuerpos a secciones de tejido.

10 La tercera etapa comprende la aplicación de análisis elemental de esta sección rica en anticuerpos. Esto proporciona una lectura simultánea de metales endógenos que sean usados en esta aplicación, Mn, Zn, Fe y Cu, para generar un ATI y ubicar HMR, más una lectura espacial de los diversos lantánidos que resaltan las posiciones en el mapa de ATI/H&E de las proteínas pertinentes a las cuales se unen los lantánidos. Esto es cartografía rápida multiplexada de importancia clínica. Cuando se aplica a una sección de tejido tal como aquella de la Figura 35, permitirá una comprensión más completa de las características de las poblaciones de células en vasos linfáticos y capilares de la mama (y cualquier otro tumor), la heterogeneidad dentro de los tumores primarios y secundarios y en el caso de las biopsias de aguja de núcleo de la próstata, una vista expansiva que excede con creces aquella de los conocimientos patológicos actuales.

15 Esta extensión lógica de información de múltiples capas superpuesta en el mapa de ATI/H&E, proporciona una nueva taxonomía patológica, no vista anteriormente, que produce información clínicamente pertinente, rápida, cuantitativa de las secciones de tejido iguales o seriales que pueden evaluarse en un contexto radioterapéutico.

Ventajas de la presente invención

20 La naturaleza cartográfica 2D de la presente invención tiene varios atributos significativos que son pertinentes para tratamiento radioterapéutico clínico que puede llevar a cabo en comparación con la alternativa no cartográfica de homogeneizar un tumor y medir la cantidad de manganeso por unidad de masa de tejido.

- Primero, todos los tumores son heterogéneos en términos de la cantidad y tipo de material estromal, tal que la cantidad relativa de las células tumorales al material estromal, que solo es visible y medible con referencia a un mapa 2D, tendrá influencia en el ATI central.

25 • Segundo, aun cuando una región 2D consiste en casi todas las células cancerosas, pueden ser muy diferente en términos de sus niveles de Mn. La Figura 1 ilustra esto perfectamente, donde un tercio más o menos de la sección consiste en células tumorales amelanóticas con valores de CC/S centrales alrededor de 3000 y el resto de la sección consiste en áreas donde los niveles de Mn varían entre 15000-45000 CC/S y después las HMR(⁵⁵Mn) y que varían entre 45000-150000 CC/S. Si uno ha homogeneizado esta sección, el ATI central excedería con creces 30 10000 CC/C. Lo que se habría perdido en un sentido clínico, es que el tratamiento con radiación de este paciente habría aniquilado el tercio del tumor que tiene un bajo ATI y por consiguiente la carga tumoral se habría reducido, con el beneficio clínico para el paciente.

35 • Aun más importante, la homogeneización de una sección, o de una muestra tumoral, pierde uno de los aspectos importantes de la invención: HMR(⁵⁵Mn) que son predictivos de que vuelva a producirse el tumor. La mayoría de HMR representa menos del 10 % de una sección, tal que la homogeneización pierde esa información de la presencia de una MHR(⁵⁵Mn), puesto que el ATI central apenas se mueve.

40 En el ejemplo de cáncer de mama, Figura 35, con su mezcla de conductos normales de mama, un área de células inmunitarias, adipocitos y células estromales, las células clínicamente pertinentes que son más dañinas son aquellas que ya solo están en un vaso linfático C5. Están en el proceso de metástasis y tienen una mediana de 8.612 CC/S. Si toda la sección se homogeneizara, esta información clínicamente pertinente se perdería completamente, puesto que la mediana homogeneizada ahora es aproximadamente 1.669 CC/S, un valor bajo que está influenciado por la proporción de la población de adipocitos, el estroma y los valores relativamente bajos en los conductos normales.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para determinar la radio-sensibilidad de un cáncer, comprendiendo el procedimiento cuantificar el nivel de manganeso en una muestra de prueba del cáncer, en el que cuanto más bajo es el nivel de manganeso en la muestra de prueba, más sensible es el cáncer a la radiación y cuanto más alto es el nivel de manganeso en la muestra de prueba más resistente es el cáncer a la radiación.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende generar un indicador terapéutico atómico (ATI) de una muestra de prueba;
en el que el procedimiento para generar el ATI comprende cuantificar el nivel de manganeso en vóxeles en una región 3D de la muestra de prueba, comprendiendo el procedimiento:
- 10 (a) seleccionar una región 2D de dicha muestra de prueba, en el que la región 2D se define topográficamente por un sistema de coordenadas X':Y' en el que X' es la longitud de la región 2D e Y' es la amplitud de la región 2D, en el que la región 3D corresponde a dicha región 2D y tiene una altura seleccionada representada por Z, en el que la región 3D está dividida en vóxeles de un volumen predefinido, estando definido el volumen de cada vóxel por XxYxZ en el que X es la longitud del vóxel, Y es la amplitud del vóxel y Z es la altura del vóxel;
- 15 (b) cuantificar el nivel de manganeso en cada vóxel; y
(c) calcular la tendencia central del nivel de manganeso en vóxeles seleccionados; en el que la tendencia central del nivel de manganeso es la mediana, la media aritmética o el modo del nivel de manganeso en los vóxeles cuantificados en (b) y en el que la tendencia central del nivel de manganeso en los vóxeles seleccionados define el ATI;
- 20 en el que cuanto más bajo es el ATI más sensible es el cáncer a la radiación y cuanto más alto es el ATI más resistente es el cáncer a la radiación.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la cuantificación del nivel de manganeso en los vóxeles de la muestra de prueba se calibra usando un patrón de referencia, en el que el patrón de referencia comprende uno o más vóxeles de referencia y en el que cada vóxel de referencia comprende una cantidad conocida de manganeso.
- 25 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el patrón de referencia es una muestra biológica que comprende una cantidad conocida de manganeso endógeno o exógeno.
5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que el nivel de manganeso cuantificado en una o más muestra o muestras de control se cuantifica concurrentemente, o de manera secuencial en cualquier orden, cuando la muestra de prueba se cuantifica, o lado a lado con la muestra de prueba.
- 30 6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que el ATI se compara con un umbral ATI predeterminado en el que la radio-sensibilidad del cáncer se determina evaluando si el ATI está por encima o por debajo del umbral ATI y
en el que si el ATI está por debajo del umbral ATI se determina que el cáncer es sensible a la radiación; y
en el que si el ATI está por encima del umbral ATI se determina que el cáncer es resistente a la radiación.
- 35 7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que el ATI se compara con dos umbrales ATI predeterminados en el que la radio-sensibilidad del cáncer se determina al evaluar si el ATI está por encima o por debajo de los dos umbrales, y
en el que si el ATI está por debajo del umbral ATI inferior se determina que el cáncer es sensible a la radiación;
en el que si el ATI ésta por encima del segundo umbral ATI se determina que el cáncer es resistente a la radiación; y
en el que si el ATI ésta entre los dos umbrales ATI se determina que el cáncer es parcialmente sensible a la radiación
- 40 8. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que los vóxeles seleccionados son vóxeles en los cuales se detectan las células cancerosas y en el que las células cancerosas se detectan por inspección visual de la región 2D de la muestra de prueba teñida con una tinción que distingue células cancerosas de otras células y preferentemente la tinción es tinción con hematoxilina y eosina (H&E).
- 45 9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la muestra de prueba es una muestra de tejido de cualquier órgano o tejido de un sujeto, un tumor, una masa sólida o una población "líquida" de células, células de cualquier cáncer del sistema hematopoyético incluyendo células leucémicas, los derivados celulares circulantes de tumores sólidos y una célula o población de células que ha metastatizado.
- 50 10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que la muestra control comprende o deriva de una célula, una población de células, una muestra de tejido "normal", una muestra de tejido de un tumor/neoplasia de cánceres de los testículos, linfoma, cánceres de pulmón de células microcíticas, cánceres del cerebro, mesoteliomas, melanomas y cánceres de la mama y próstata.
- 55 11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la muestra de prueba comprende o deriva de una célula, una población de células o una muestra de tejido de un tumor/neoplasia de cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de los testículos, linfoma, cáncer de pulmón de células microcíticas, cáncer del cerebro, mesotelioma o melanoma.

12. Uso del procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en una muestra de prueba de un sujeto con cáncer para determinar un tratamiento para el sujeto, en el que si se determina que el cáncer es sensible a la radiación, la radioterapia ha de incluirse en el tratamiento y, en el que si se determina que el cáncer es resistente a la radiación, la radioterapia no ha de incluirse en el tratamiento.
- 5 13. Un procedimiento para determinar la probabilidad de volver a producirse un cáncer después del tratamiento con radiación que comprende:
- (a) cuantificar el nivel de manganeso en una región 3D de una muestra de prueba del cáncer seleccionando una región 2D de dicha muestra de prueba, en el que la región 2D se define topográficamente por un sistema de coordenadas X':Y' en el que X' es la longitud de la región 2D e Y' es la amplitud de la región 2D, en el que la región 3D
 10 corresponde a dicha región 2D y tiene una altura seleccionada representada por Z, en el que la región 3D está dividida en tres o más vóxeles de un volumen predefinido, estando definido el volumen de cada vóxel por XxYxZ en el que X es la longitud del vóxel, Y es la amplitud del vóxel y Z es la altura del vóxel, y cuantificar el nivel de manganeso en cada vóxel;
- (b) identificar en la región 2D que corresponde a las coordenadas X e Y del vóxel, regiones metalómicas altas (HMR),
 15 siendo regiones del cáncer en las que el nivel del manganeso es más alto que en las áreas circundantes según lo permiten los umbrales estadísticos que son múltiplos de una tendencia central o cualquier aproximación entre números enteros, en las que la tendencia central es la mediana, la media aritmética o el modo del nivel de manganeso cuantificado en los vóxeles en (a);
- 20 en el que cuanto más alta es la frecuencia de las HMR más alta es la probabilidad de que el cáncer vuelva a producirse y cuanto más baja es la frecuencia de las HMR más baja es la probabilidad de que el cáncer vuelva a producirse.
14. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que las HMR también se identifican en la región 2D de la muestra de prueba teñida con una tinción que distingue las células cancerosas de los componentes estromales y preferentemente en el que la tinción es tinción con hematoxilina y eosina (H&E).

Figura 1

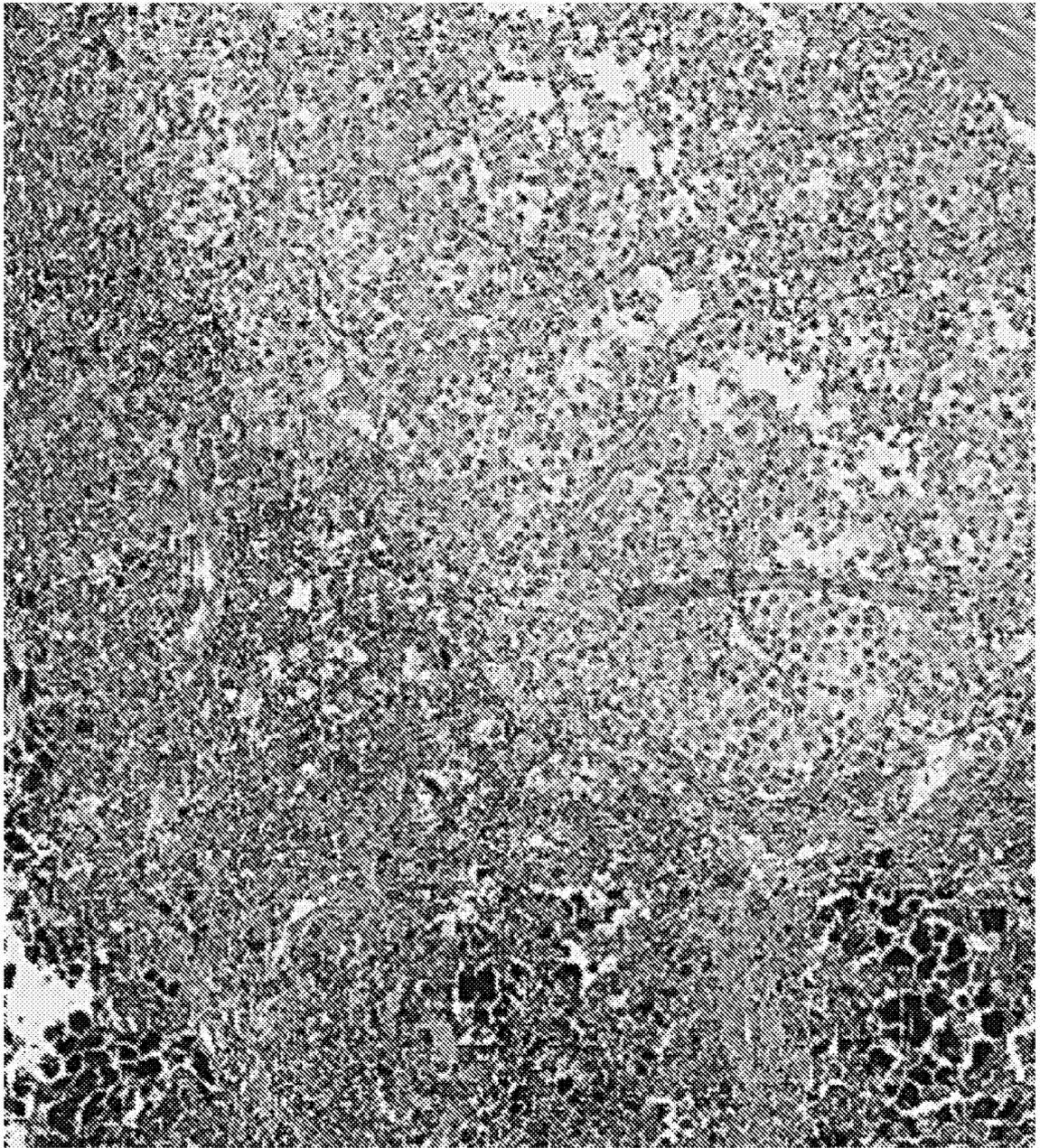


Figura 2

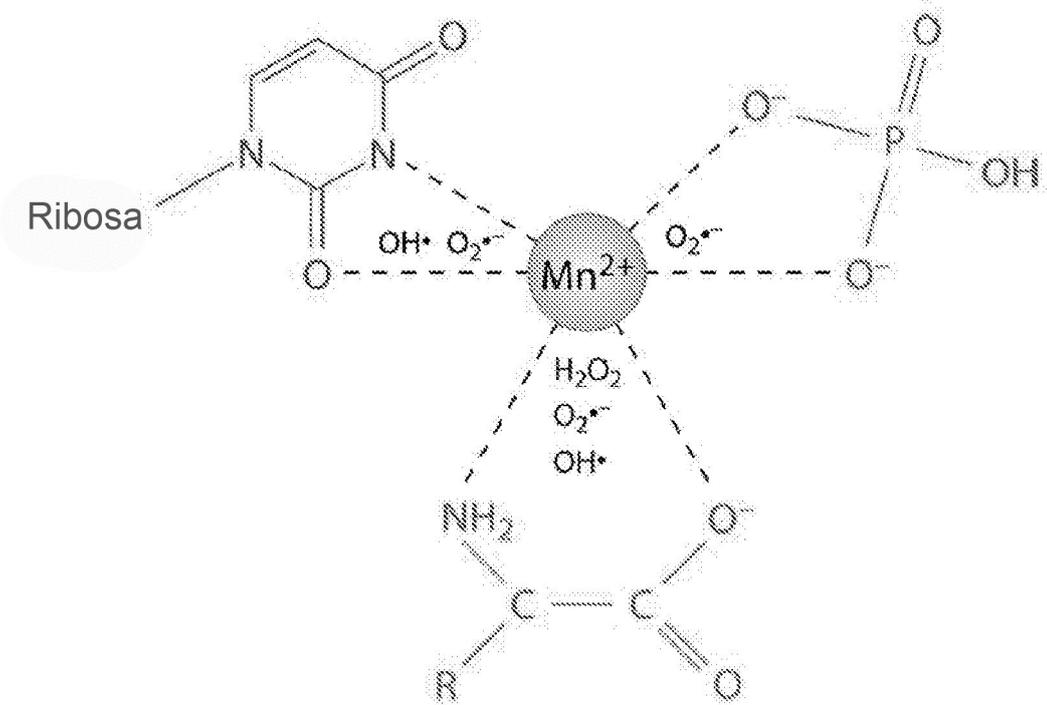


Figura 3C

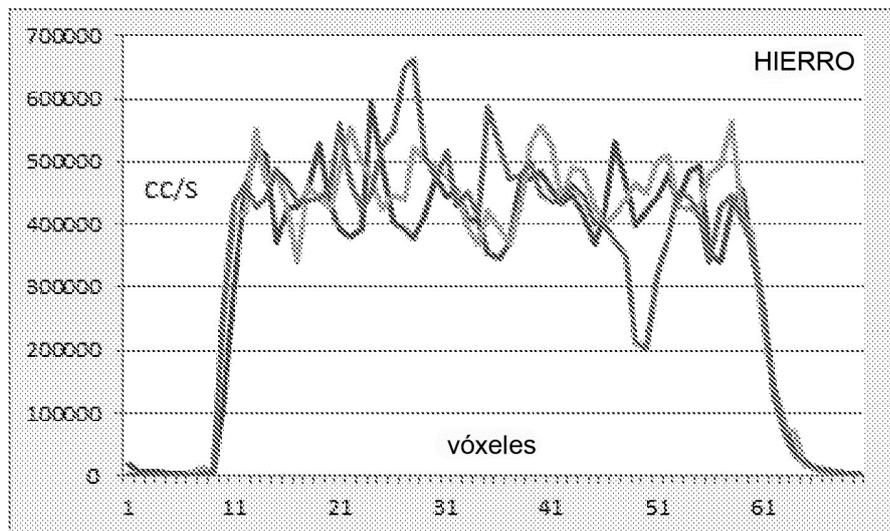
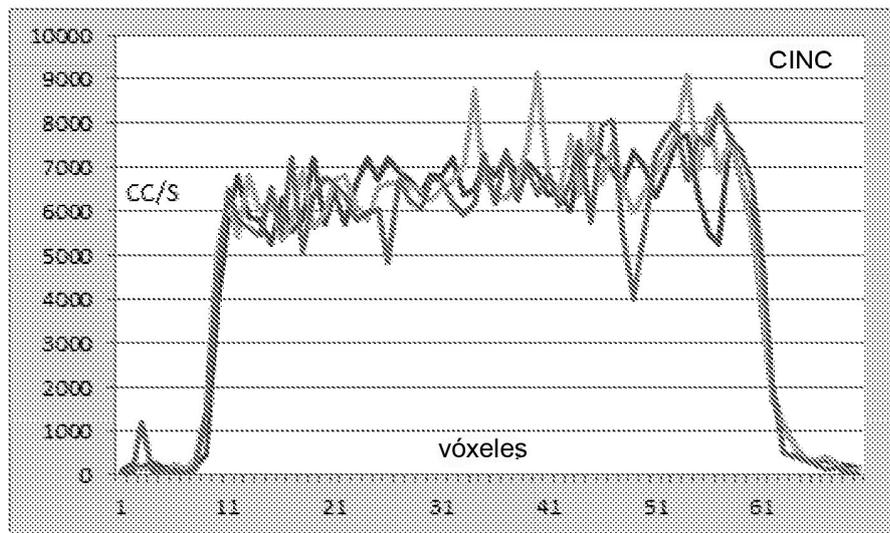
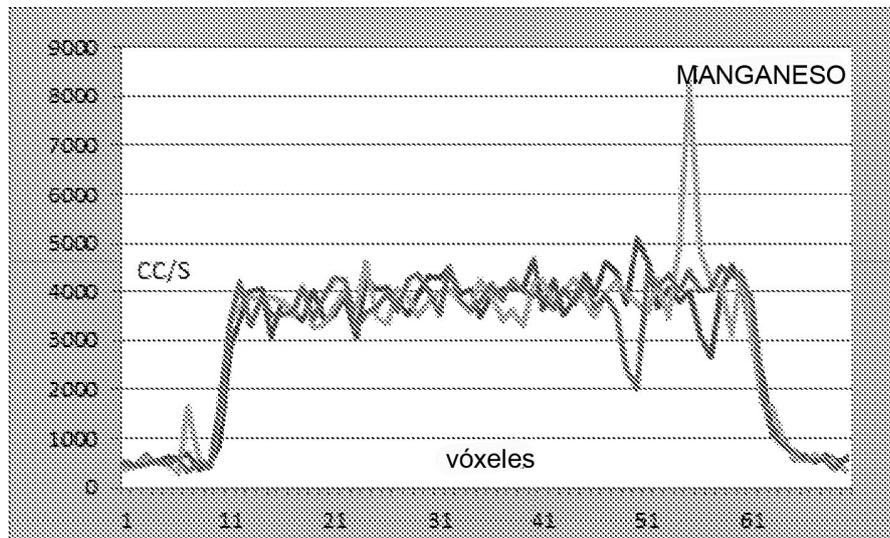


Figura 4A

surco de ablación n
surco de ablación n+1
surco de ablación n+2



vóxel 1

vóxel 63

Figura 4B
mujer de 19 años glioblastoma A7

	v1	v2	v3	v4	v5	v6	v7	v8	v9	v10	v11	v12	v13	v14	v15	v16	v17	v18	v19	v20	v21	v22	v23	v24	v25	v26	v27	v28	v29	v30	v31	v32	v33	v34
Min. ablacion track n	797	746	474	369	393	367	659	467	507	435	535	536	531	625	1665	1766	3124	3510	3134	3332	3723	4517	3868	3116	3162	3042	3272	3938	3065	4204	4254	4234	3716	
Min. ablacion track n+1	774	776	599	599	444	345	544	361	517	478	789	365	600	6278	2406	3470	3265	3531	3670	3327	2241	1833	3444	3040	4068	1973	2310	3442	4144	3247	3033	3933	3161	2937
Min. ablacion track n+2	698	698	644	344	374	361	317	1446	374	511	216	538	512	1578	206	1146	1624	1743	1630	1743	1430	1743	1630	1678	1678	1678	1678	1678	1678	1678	1678	1678	1678	1678
Zn. ablacion track n	509	282	264	221	663	193	248	138	14	166	68	110	718	1311	2938	3647	5053	5274	4642	3420	3783	4783	4857	3996	3011	1444	6221	5276	5431	3653	6068	5984	5232	5053
Zn. ablacion track n+1	135	642	280	207	179	83	118	97	110	124	124	152	255	444	6215	4721	5384	4859	4687	3377	5246	5149	5218	6083	4130	5148	1584	3248	5161	3248	5161	4014	3633	
Zn. ablacion track n+2	489	442	676	304	497	152	414	124	179	138	37	156	653	3796	2930	3248	4031	3632	7911	4735	3023	4514	3730	5177	1798	4962	3468	5412	3716	3240	3634	3634	3634	3634
Fe. ablacion track n	11429	6320	4894	3128	2224	1532	1192	2277	894	574	681	723	298	721	12740	21632	21632	18192	20762	20196	21401	19432	17167	18700	21787	22204	24548	18428	23175	213073	247059	210428	187648	
Fe. ablacion track n+1	12280	8044	5809	3149	2021	1787	1213	745	1213	553	638	723	660	7432	139877	208704	244474	258952	212879	244666	21203	265205	256096	260656	223555	21772	206429	221230	207926	204506	147580	167118	206687	
Fe. ablacion track n+2	15261	13473	11533	5767	4894	3000	2745	2426	8342	766	745	979	1134	134860	203978	211030	227831	180476	254832	240899	256324	274954	219719	215804	225464	210557	211933	202538	177728	180397	238465	252952	217826	188507
Min. ablacion track n	3065	4138	4386	3334	3833	3810	3385	3483	3443	3783	4783	3897	3912	4243	3538	4804	3888	3984	4272	4634	3783	3423	3340	3402	2485	1974	2415	3837	398	707	1231	474	348	
Min. ablacion track n+1	2946	3338	3796	3495	3533	3415	4044	3388	3406	4177	4366	2293	4335	3425	3844	3402	4278	3088	3460	3295	4443	3443	4285	3953	2833	1343	2334	2138	537	776	467	533	381	422
Min. ablacion track n+2	2618	3145	4082	4096	3044	3049	3701	4177	3429	3379	3953	4363	4208	4977	4538	3864	4308	3951	4628	2439	3783	3641	3406	4142	4914	1603	3943	3594	3116	653	393	357	398	728
Zn. ablacion track n	5833	6061	5771	5605	5148	5467	5122	4763	4481	3577	4819	4183	4976	5198	5743	3218	3053	3246	3136	3053	4783	4684	3817	4180	3741	4694	4324	2374	745	433	511	414	345	166
Zn. ablacion track n+1	5422	5702	6495	5937	5729	6102	4708	5187	4708	5280	3717	5116	5908	4942	5018	4659	3916	4669	4611	4128	4328	3864	4818	3810	3844	3299	4330	1532	713	745	262	414	235	262
Zn. ablacion track n+2	4183	4673	4224	3544	3136	3467	3274	4017	3461	3907	4986	4983	4887	3467	3964	4936	4970	5001	3189	3287	6710	4446	4293	4242	4141	3907	3134	1518	3201	621	483	396	331	290
Fe. ablacion track n	188271	235828	253501	224990	218892	231729	235860	228111	233546	217761	211354	161655	201549	209095	267254	230973	225261	247189	274587	258695	216342	213524	180776	202839	181077	220752	196241	128992	53604	22843	14771	11471	6384	4234
Fe. ablacion track n+1	191435	226561	213675	219181	205289	266217	26810	224495	228692	245766	158931	201118	232030	207934	230771	202129	191643	189560	194221	226884	223850	276307	231770	207912	163302	158566	216449	114135	50874	23077	18179	9121	6490	3681
Fe. ablacion track n+2	153184	157108	217848	191144	239343	247382	277715	268483	223441	192267	201227	247705	300498	379543	253134	253501	236484	265388	234956	222301	215137	313038	228391	241394	192930	200324	177599	96617	40190	15963	11769	12515	11791	7746

Figura 4C

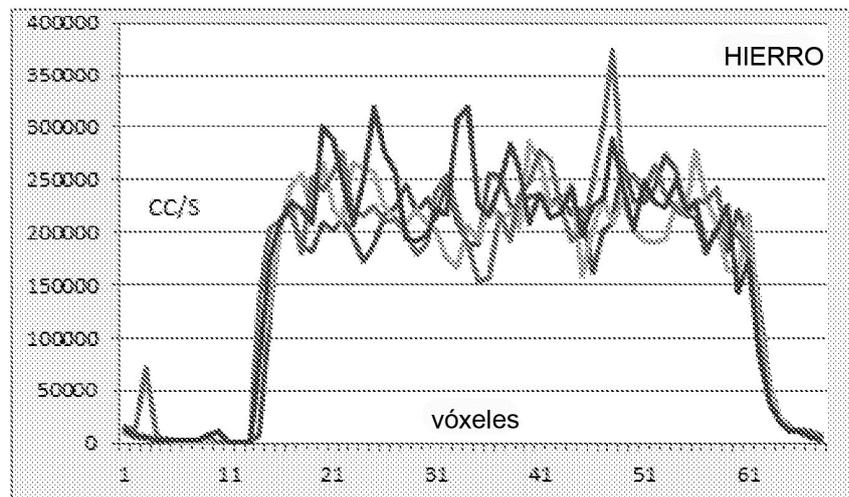
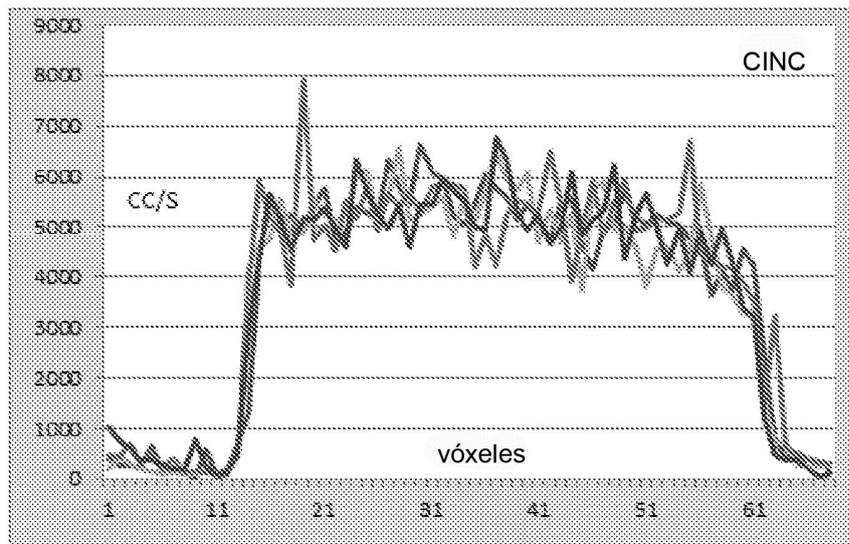
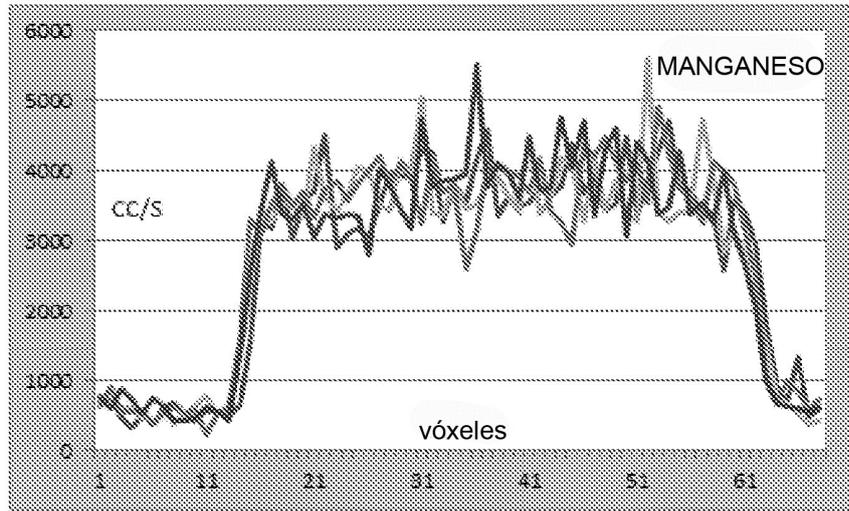


Figura 5A



surco de ablación n
surco de ablación n+1
surco de ablación n+2

vóxel 69

vóxel 1

Figura 5B

mujer de 50 años glioblastoma A8

	v1	v2	v3	v4	v5	v6	v7	v8	v9	v10	v11	v12	v13	v14	v15	v16	v17	v18	v19	v20	v21	v22	v23	v24	v25	v26	v27	v28	v29	v30	v31	v32	v33	v34	v35
Mn_ablaciontrack.n	344	381	463	526	609	478	481	485	503	584	626	495	465	612	478	505	2133	3320	3309	384	384	345	384	344	344	343	378	1932	458	387	388	342	429	1384	
Mn_ablaciontrack.n1	473	473	483	480	517	14	417	485	480	430	534	400	400	400	400	400	136	1463	1463	1463	1463	1463	1463	1463	1463	1463	1463	1463	1463	1463	1463	1463	1463	1463	
Mn_ablaciontrack.n2	3263	746	397	440	476	207	485	381	381	395	430	400	395	351	351	351	63	323	320	323	343	343	324	324	324	324	343	343	343	343	343	343	343	343	
Zn_ablaciontrack.n	317	221	138	138	276	221	235	828	110	414	46	49	124	110	81	207	482	479	4086	4300	456	352	4224	4686	4686	4431	4431	4338	4668	3741	4696	4446	4380	4380	
Zn_ablaciontrack.n1	945	34	248	248	81	186	132	304	9	99	124	110	81	207	124	136	3397	4431	4780	4713	4804	4542	4708	4237	4237	4237	3803	149	4385	4903	4341	4438	4473	4140	
Zn_ablaciontrack.n2	4023	426	304	3325	314	248	207	235	124	136	1104	124	124	124	124	175	23	2706	4418	4283	485	4380	3900	4307	4618	4618	4053	4708	4440	4763	4042	4236	4447	4588	
Fe_ablaciontrack.n	22596	9577	6489	5236	3107	2766	1851	1277	1289	1066	1060	851	511	787	468	1110	12927	146217	139553	178114	198218	197853	231404	236443	236443	194436	242437	15048	204902	210772	171825	101772	250504	189238	
Fe_ablaciontrack.n1	38285	1311	7661	3500	4639	1787	2702	1277	1489	1006	787	511	1310	511	1213	8278	141288	278317	188786	187412	189551	247403	259967	177234	280772	256085	167536	233808	179524	228613	171117	184405	192685	232006	
Fe_ablaciontrack.n2	37781	25974	13106	7125	8853	3810	4788	20841	2319	1128	553	1128	296	681	574	660	62388	248312	234224	208385	192352	178801	218563	289452	209459	232629	108794	201936	193446	219998	228228	196409	183135	188928	
Mn_ablaciontrack.n	3278	3483	1734	4735	4768	3278	3883	3388	3442	3107	3233	1913	3278	3446	363	3102	3425	3103	2873	534	3157	2746	3203	3254	3769	3823	3308	852	3157	1938	1133	1143	809	633	
Mn_ablaciontrack.n1	4109	8234	3211	3997	4700	4090	3389	2975	2661	2781	3024	511	412	1347	376	847	4159	1574	1897	145	3048	3188	355	483	4341	376	787	127	2789	1718	1102	1139	844		
Mn_ablaciontrack.n2	3353	3602	3725	3483	4080	3534	3956	3881	4222	4123	3402	3472	3470	3452	3403	2386	3348	376	16806	3733	3932	4272	3208	4056	4096	6386	376	2832	3678	3103	3533	3228	3048		
Zn_ablaciontrack.n	4084	12622	5205	4936	1817	4998	4508	4056	5334	3418	4468	3675	3675	3675	3675	3675	3675	3675	3675	3675	3675	3675	3675	3675	3675	3675	3675	3675	3675	3675	3675	3675	3675	3675	
Zn_ablaciontrack.n1	3644	4165	4056	3163	3011	4086	3978	4290	3175	3175	3727	3727	4473	3727	3727	4183	4976	3976	3513	3513	3743	3753	4252	4252	4442	3743	4086	3134	1739	1739	1739	1739	1739		
Zn_ablaciontrack.n2	4748	4942	2603	4846	4246	332	4443	4369	4708	4708	3265	4293	3879	3937	3937	4652	4652	4252	3538	4100	3852	1347	4800	4680	3723	4673	4652	2535	3566	3265	1422	911	373		
Fe_ablaciontrack.n	200732	163200	211054	191471	163607	170258	201807	186467	175233	172941	167662	191386	192846	181313	201141	206511	100626	194393	175027	171289	131969	71998	50511	26317	16746	9662	124	3458	3458	3458	3458	3458	3458	3458	
Fe_ablaciontrack.n1	222668	190648	156379	174344	186338	165645	188142	218837	162470	149860	162668	183654	226497	167447	203204	218170	243871	210242	171031	179123	199400	189302	187390	194119	196198	186679	166690	12159	168434	91530	35478	37903	24100	14409	
Fe_ablaciontrack.n2	206885	198734	164787	166739	154440	186939	164830	206816	113761	104709	186882	167447	207676	212320	207235	230467	187947	212879	178887	209785	231770	192288	195811	197681	187380	197638	158738	115612	61079	31096	18732				

Figura 5C

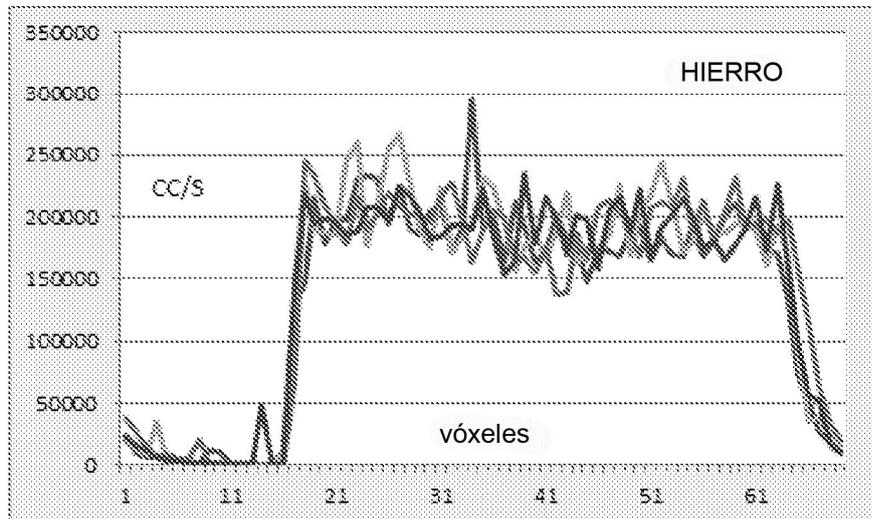
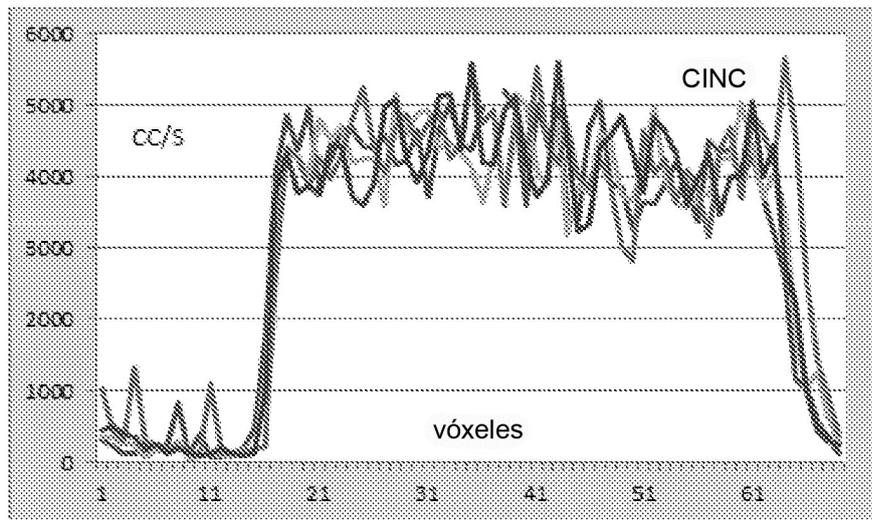
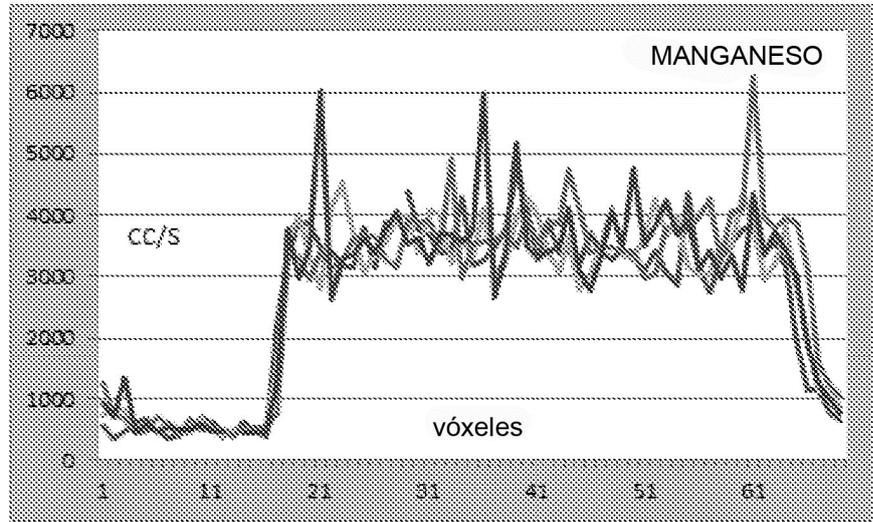


Figura 6A



vóxel 1

vóxel 67

Figura 6B

varón de 60 años con mesotelioma B3

	v1	v2	v3	v4	v5	v6	v7	v8	v9	v10	v11	v12	v13	v14	v15	v16	v17	v18	v19	v20	v21	v22	v23	v24	v25	v26	v27	v28	v29	v30	v31	v32	v33	v34	
Mn - ablation track n	897	821	875	871	895	894	866	865	865	865	865	865	865	865	865	865	865	865	865	865	865	865	865	865	865	865	865	865	865	865	865	865	865	865	
Mn - ablation track n+1	796	796	817	817	817	817	817	817	817	817	817	817	817	817	817	817	817	817	817	817	817	817	817	817	817	817	817	817	817	817	817	817	817	817	
Mn - ablation track n+2	683	683	683	683	683	683	683	683	683	683	683	683	683	683	683	683	683	683	683	683	683	683	683	683	683	683	683	683	683	683	683	683	683	683	
Zn - ablation track n	546	546	546	546	546	546	546	546	546	546	546	546	546	546	546	546	546	546	546	546	546	546	546	546	546	546	546	546	546	546	546	546	546	546	
Zn - ablation track n+1	337	337	337	337	337	337	337	337	337	337	337	337	337	337	337	337	337	337	337	337	337	337	337	337	337	337	337	337	337	337	337	337	337	337	337
Zn - ablation track n+2	186	186	186	186	186	186	186	186	186	186	186	186	186	186	186	186	186	186	186	186	186	186	186	186	186	186	186	186	186	186	186	186	186	186	186
Fe - ablation track n	871	869	789	659	544	403	238	136	636	230	480	877	1005	1076	882	1629	1729	1829	1829	1829	1829	1829	1829	1829	1829	1829	1829	1829	1829	1829	1829	1829	1829	1829	
Fe - ablation track n+1	1071	869	762	653	369	744	653	563	1398	1780	1152	846	1112	1128	968	1375	1375	1375	1375	1375	1375	1375	1375	1375	1375	1375	1375	1375	1375	1375	1375	1375	1375	1375	
Fe - ablation track n+2	1216	2769	744	835	544	1198	363	517	690	1343	710	56	1015	1038	1131	1038	973	973	973	973	973	973	973	973	973	973	973	973	973	973	973	973	973	973	
Co - ablation track n	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Co - ablation track n+1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Co - ablation track n+2	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14
Mn - ablation track n	2248	2248	2248	2248	2248	2248	2248	2248	2248	2248	2248	2248	2248	2248	2248	2248	2248	2248	2248	2248	2248	2248	2248	2248	2248	2248	2248	2248	2248	2248	2248	2248	2248	2248	2248
Mn - ablation track n+1	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891
Mn - ablation track n+2	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891	4891
Zn - ablation track n	3275	3275	3275	3275	3275	3275	3275	3275	3275	3275	3275	3275	3275	3275	3275	3275	3275	3275	3275	3275	3275	3275	3275	3275	3275	3275	3275	3275	3275	3275	3275	3275	3275	3275	3275
Zn - ablation track n+1	12863	12863	12863	12863	12863	12863	12863	12863	12863	12863	12863	12863	12863	12863	12863	12863	12863	12863	12863	12863	12863	12863	12863	12863	12863	12863	12863	12863	12863	12863	12863	12863	12863	12863	12863
Zn - ablation track n+2	9823	9823	9823	9823	9823	9823	9823	9823	9823	9823	9823	9823	9823	9823	9823	9823	9823	9823	9823	9823	9823	9823	9823	9823	9823	9823	9823	9823	9823	9823	9823	9823	9823	9823	9823
Fe - ablation track n	135	135	135	135	135	135	135	135	135	135	135	135	135	135	135	135	135	135	135	135	135	135	135	135	135	135	135	135	135	135	135	135	135	135	135
Fe - ablation track n+1	12458	12458	12458	12458	12458	12458	12458	12458	12458	12458	12458	12458	12458	12458	12458	12458	12458	12458	12458	12458	12458	12458	12458	12458	12458	12458	12458	12458	12458	12458	12458	12458	12458	12458	12458
Fe - ablation track n+2	133147	133147	133147	133147	133147	133147	133147	133147	133147	133147	133147	133147	133147	133147	133147	133147	133147	133147	133147	133147	133147	133147	133147	133147	133147	133147	133147	133147	133147	133147	133147	133147	133147	133147	133147
Co - ablation track n	1103	1103	1103	1103	1103	1103	1103	1103	1103	1103	1103	1103	1103	1103	1103	1103	1103	1103	1103	1103	1103	1103	1103	1103	1103	1103	1103	1103	1103	1103	1103	1103	1103	1103	1103
Co - ablation track n+1	814	814	814	814	814	814	814	814	814	814	814	814	814	814	814	814	814	814	814	814	814	814	814	814	814	814	814	814	814	814	814	814	814	814	814
Co - ablation track n+2	993	993	993	993	993	993	993	993	993	993	993	993	993	993	993	993	993	993	993	993	993	993	993	993	993	993	993	993	993	993	993	993	993	993	993

Figura 6C

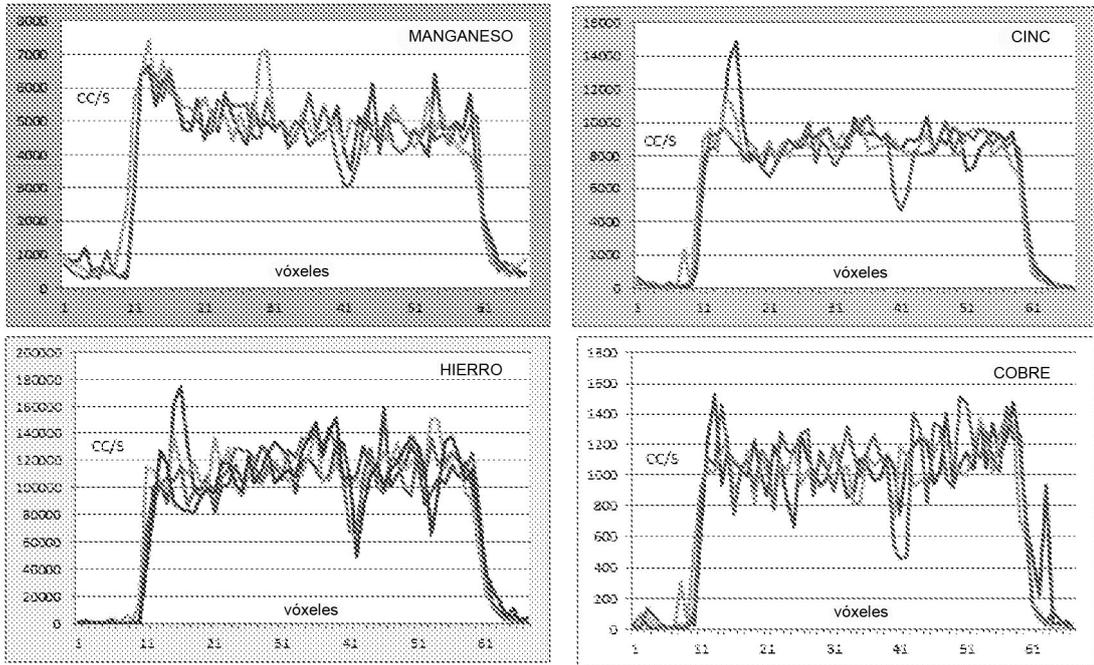


Figura 7A



surco de ablación n
surco de ablación n+1
surco de ablación n+2

vóxel 1

vóxel 53

Figura 7B

carón de 50 años melanoma A1

	v1	v2	v3	v4	v5	v6	v7	v8	v9	v10	v11	v12	v13	v14	v15	v16	v17	v18	v19	v20	v21	v22	v23	v24	v25	v26	v27	v28	v29	v30	v31	v32	v33	v34
Min	365	367	436	756	445	678	465	2208	14726	14726	9369	7675	14338	16741	14726	24336	18720	18640	10657	10636	16274	18611	23158	11661	18387	13113	11337	11306	10470	8359	4244	3185	3166	18583
Max	900	373	957	378	622	311	622	9348	18674	12894	9585	11246	16010	13672	13850	22304	19473	13930	8586	7448	9941	21879	19749	19707	7279	8157	12343	7248	15238	6044	9102	11528	9302	
Min	466	388	900	467	467	427	622	1311	14816	11897	10365	8746	10063	11444	11763	25664	2847	9636	11660	11070	6679	9836	22726	27489	13352	7602	11253	21466	11715	13273	7991	1131	10926	5901
Max	160	146	140	260	270	30	647	6707	6667	4707	3771	11884	8887	10743	10444	19843	10433	7407	5901	17784	13106	14446	17884	17804	9489	16001	5701	7701	3140	1770	4701	9407	6701	
Min	240	2020	4220	160	100	120	1441	44844	9022	4441	5001	8102	9623	8382	6301	10443	6144	3561	5881	10663	16686	42205	11361	7722	4601	9162	5301	8452	5201	3420	7862	3641	7044	
Max	240	180	60	110	180	60	300	6361	5882	6181	4381	6011	6641	6642	10803	5921	3621	7401	7421	3361	3361	11704	10027	11123	6201	7401	11763	9962	10803	6501	5401	7361	3420	1160
Min	360	180	280	310	300	160	460	45798	120258	117790	75854	55462	163743	148597	131449	168826	175642	140044	132328	89886	154517	156231	172231	182751	153818	226623	130494	18478	120850	122702	41566	60738	126501	179579
Max	280	40	220	160	200	120	461	103440	153323	93769	80953	88179	169860	127713	168226	179075	204635	111190	99283	82341	143401	113734	151458	107066	111713	61688	99233	138616	138011	133072	50007	91661	118078	91759
Min	360	280	180	310	320	200	240	37317	152198	108634	76215	83114	59835	91894	191659	138733	115904	144799	113899	91820	138866	178873	159222	104931	67484	138713	182429	118363	105560	67305	107710	88859	45276	
Min	8789	8868	874	3223	8302	13083	10393	6273	7148	5286	8181	11861	11869	13784	13423	14736	9813	3157	2547	3337	4734	3711	528	878	1885	911	154	711	244	318	327	587	433	474
Max	11779	20312	1387	8286	9595	8635	16638	17264	17263	13846	11023	10114	8613	9446	11993	2404	13862	10047	1515	5401	3314	2534	1085	713	453	877	478	480	789	447	540	489	366	431
Min	4489	3718	3198	4166	3614	17849	10661	15096	11395	15736	10497	8746	9917	6468	9913	20741	2091	7146	5801	6691	874	1744	900	667	154	164	616	616	611	54	54	57	37	
Max	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368
Min	116039	117636	8710	41827	133867	156755	126124	90700	66300	63301	123626	167669	132648	155536	102403	103615	39726	13025	5501	2640	2580	1440	1040	700	700	11528	360	300	200	200	200	200	200	
Max	112467	157173	17721	122898	112581	168389	202228	190204	100875	138666	93178	17143	139113	98962	109440	61194	86251	43170	26679	11346	1840	1380	1080	700	500	300	400	400	400	400	400	400	400	
Min	14686	37037	17929	66688	118382	128574	134108	174471	163815	133811	107026	74429	79388	72418	117416	96710	74588	64631	77701	72119	44633	21332	5621	4461	1120	1040	300	800	400	310	200	220	220	210

Figura 7C

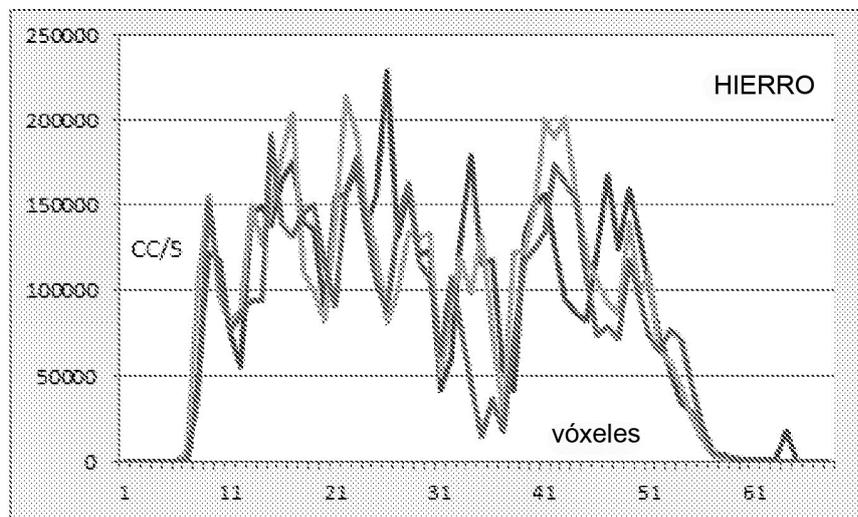
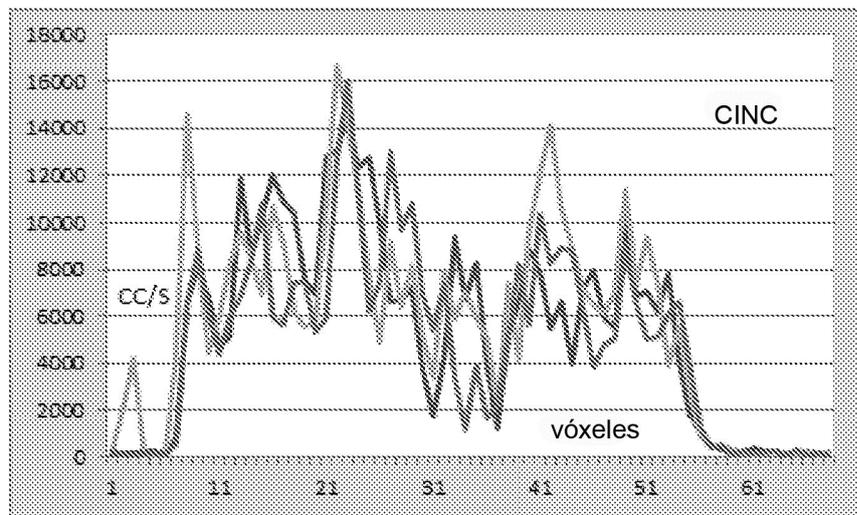
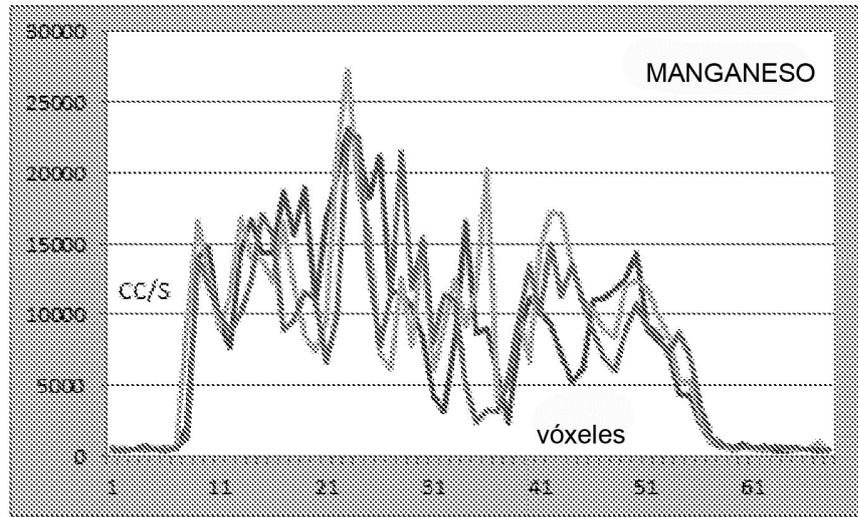


Figura 8A

surco de ablación n
 surco de ablación n+1
 surco de ablación n+2



vóxel 1

vóxel 79

Figura 8B

varón de 57 años linfoma H5

	v1	v2	v3	v4	v5	v6	v7	v8	v9	v10	v11	v12	v13	v14	v15	v16	v17	v18	v19	v20	v21	v22	v23	v24	v25	v26	v27	v28	v29	v30	v31	v32	v33	v34	v35	v36	v37	v38	v39	v40		
Mh	ablation track n	186	178	239	1244	475	861	619	721	861	866	802	871	811	815	2448	1475	1897	1867	2594	1674	2117	553	1693	1694	1694	1694	1694	1694	1694	1694	1694	1694	1694	1694	1694	1694	1694	1694	1694		
Mh	ablation track n+1	1076	1076	876	776	796	802	877	814	864	860	868	864	864	864	864	864	864	864	864	864	864	864	864	864	864	864	864	864	864	864	864	864	864	864	864	864	864	864	864	864	
Mh	ablation track n+2	807	1046	776	861	786	786	815	897	807	846	809	805	806	816	816	816	816	816	816	816	816	816	816	816	816	816	816	816	816	816	816	816	816	816	816	816	816	816	816	816	
Zn	ablation track n	18	128	128	75	147	166	91	18	357	679	37	55	37	157	1574	1438	1070	1155	2230	2556	3722	2346	2268	10755	20573	20803	17679	1779	1877	1865	1840	1842	1872	1846	1846	1846	1846	1846	1846	1846	
Zn	ablation track n+1	108	37	75	81	71	71	128	110	110	105	88	81	57	1378	1070	1452	1829	1829	1829	1829	1829	1829	1829	1829	1829	1829	1829	1829	1829	1829	1829	1829	1829	1829	1829	1829	1829	1829	1829		
Zn	ablation track n+2	158	31	55	51	122	158	214	200	210	168	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110		
Fe	ablation track n	597	1151	151	189	208	151	245	321	812	248	132	52	151	251	251	7825	17589	8323	16945	341025	36980	31897	27808	24184	23029	24874	28850	28850	28850	28850	28850	28850	28850	28850	28850	28850	28850	28850	28850	28850	
Fe	ablation track n+1	96	358	1401	1758	1076	1090	180	321	830	264	170	151	264	132	8722	8207	11524	36865	36865	36865	36865	36865	36865	36865	36865	36865	36865	36865	36865	36865	36865	36865	36865	36865	36865	36865	36865	36865	36865	36865	36865
Fe	ablation track n+2	1151	1076	434	189	728	75	132	547	189	321	189	132	151	7619	21426	16433	36865	33024	30519	24626	23805	23805	23805	23805	23805	23805	23805	23805	23805	23805	23805	23805	23805	23805	23805	23805	23805	23805	23805	23805	
Mh	ablation track n	1479	152	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	1362	
Mh	ablation track n+1	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325		
Mh	ablation track n+2	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325	1325		
Zn	ablation track n	1854	2218	2413	2207	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076	
Zn	ablation track n+1	2184	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754	1754		
Zn	ablation track n+2	1152	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144	1144		
Fe	ablation track n	29479	24656	30585	24380	24484	28751	26020	26190	22671	21092	27249	281476	22224	21815	11881	21969	110319	22844	15000	16991	10602	5309	11136	6132	3246	1530	1328	774	472	377	245	283	415	189	358	208	113	170			
Fe	ablation track n+1	29360	241497	28384	238509	214716	217442	212345	422651	281793	331155	273714	261507	244133	221383	258564	17787	17999	145533	76378	36339	16276	8663	2776	1774	1793	849	795	371	371	415	189	133	283	75	306	151					
Fe	ablation track n+2	29380	243521	247309	288339	322529	278423	231117	334139	310578	316286	295208	341601	266887	299127	406332	220517	102470	15871	130151	204463	130807	22857	55883	27247	11833	5265	2212	1120	1170	377	246	151	264	7039	812	94	170				

Figura 8C

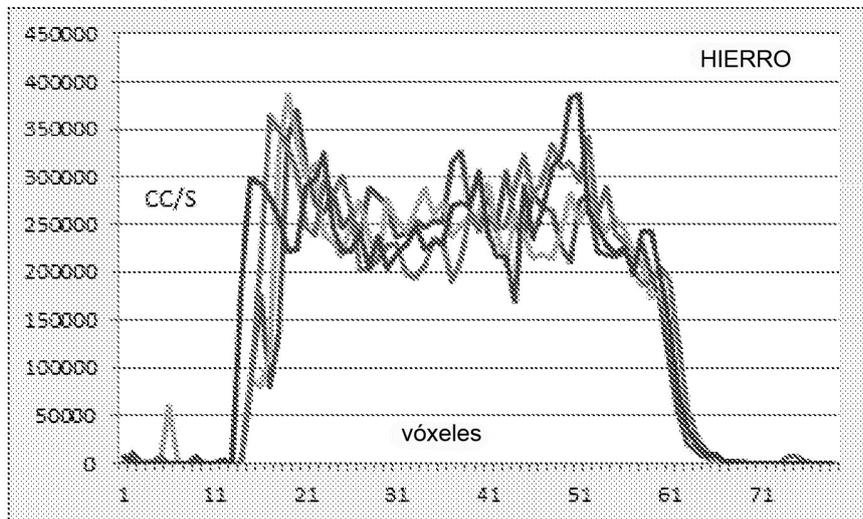
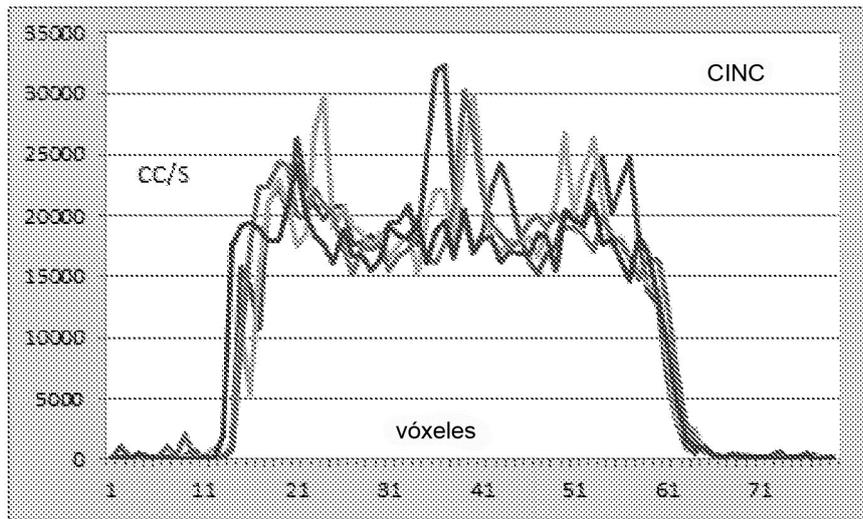
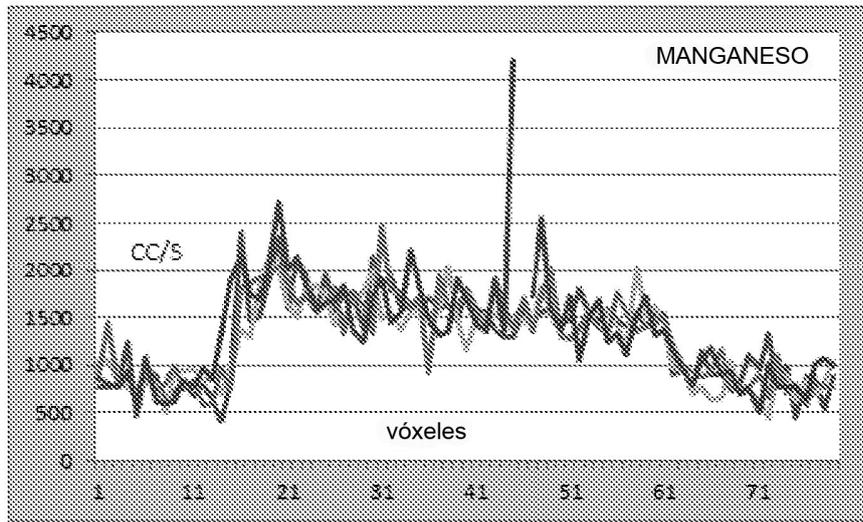
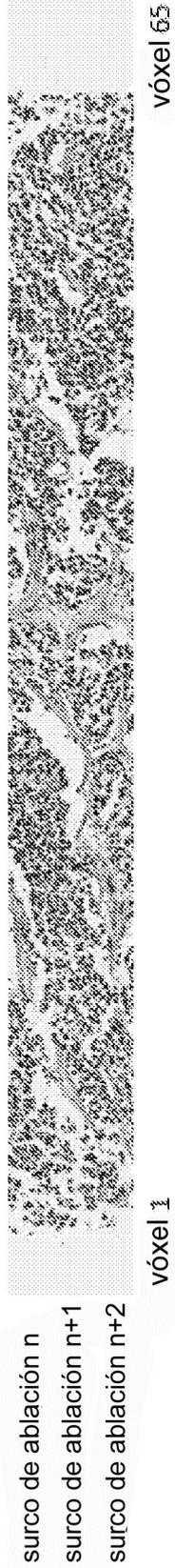


Figura 9A



vóxel 1

vóxel 55

Figura 9B
varón de 38 años pulmón de células microcíticas A9

	v1	v2	v3	v4	v5	v6	v7	v8	v9	v10	v11	v12	v13	v14	v15	v16	v17	v18	v19	v20	v21	v22	v23	v24	v25	v26	v27	v28	v29	v30	v31	v32	v33
Min. ablatontrack n	2335	767	1794	307	577	806	359	891	611	481	726	3024	2363	1017	3166	2920	1453	3062	1705	3166	2363	1017	3166	2920	1453	3062	1705	3166	2920	1453	3062	1705	3166
Mn. ablatontrack n+1	745	624	657	616	676	579	510	598	664	531	1076	3011	664	1173	3056	2549	2309	2313	2484	1289	2171	2536	1567	1647	1611	1076	1647	1611	1076	1647	1611	1076	
Mn. ablatontrack n+2	930	819	333	373	767	811	398	404	422	569	677	572	815	1302	2323	2386	2876	2315	2592	1743	1443	1756	1813	1860	2122	2582	234	3160	2393	2719	2901	2634	
Min. ablatontrack n	1029	678	830	126	165	129	110	35	129	37	37	30	368	938	1561	9928	11600	1102	516	3927	3193	4097	4000	4697	3197	3497	3197	3497	3197	3497	3197	3497	
Mn. ablatontrack n+1	485	381	372	73	147	18	37	92	55	0	1676	459	564	493	3744	5249	4762	1193	3991	3909	3836	3212	5469	3542	3028	3211	3083	3211	3083	3211	3083	3211	
Mn. ablatontrack n+2	642	4900	185	230	123	91	9	188	147	71	92	499	3725	4735	4384	3212	4952	3995	4391	2897	2349	3089	4463	4402	4219	4926	3893	5986	3193	4028	4863	4166	
Fe. ablatontrack n	6964	4076	1585	1264	1132	1566	2227	1283	1057	1000	1057	717	44301	116174	227765	182240	186625	37757	208013	124704	105361	97571	67906	115111	109577	78683	108047	138714	110819	85566	92905	103321	
Mn. ablatontrack n+1	2978	2466	1998	1859	1360	1346	1447	2513	2276	2129	2313	3347	2328	1793	1806	2079	2354	2342	2120	2376	2311	1743	2029	2198	1308	729	689	663	937	572	946	715	
Mn. ablatontrack n+2	2135	4936	1660	206	2718	1760	1899	2172	2360	2579	2311	2366	2333	2671	2363	1866	2076	2133	1325	2361	2311	2311	1357	1309	767	861	563	594	702	793	986	837	
Zn. ablatontrack n	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966
Min. ablatontrack n	2827	2356	2732	2583	2586	3977	3661	2067	1793	2081	2682	3375	2336	1538	3077	3113	3513	3218	1979	3259	3316	3060	3062	2499	3016	2697	747	380	663	910	958	631	
Mn. ablatontrack n+1	2978	2466	1998	1859	1360	1346	1447	2513	2276	2129	2313	3347	2328	1793	1806	2079	2354	2342	2120	2376	2311	1743	2029	2198	1308	729	689	663	937	572	946	715	
Mn. ablatontrack n+2	2135	4936	1660	206	2718	1760	1899	2172	2360	2579	2311	2366	2333	2671	2363	1866	2076	2133	1325	2361	2311	2311	1357	1309	767	861	563	594	702	793	986	837	
Zn. ablatontrack n	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966
Min. ablatontrack n	5175	4645	5795	3725	3727	5883	4481	3303	4433	5065	5304	6111	5175	1996	6246	6825	4698	1866	1285	6497	4873	6570	5261	3905	5698	514	312	183	110	166	110	477	
Mn. ablatontrack n+1	4485	4441	4909	3223	2366	3393	4570	5176	4936	4980	5380	5467	5338	4643	4856	4958	4771	3937	2986	4489	4696	4903	1658	2309	806	257	183	165	110	53	73	73	
Mn. ablatontrack n+2	3790	4936	1799	6936	3634	4735	5100	6395	4469	4469	5169	4881	4933	5365	4912	3321	3015	3801	5304	6331	3945	2185	1323	1303	669	3938	367	110	166	110	477	477	
Fe. ablatontrack n	105447	73227	96547	71939	53950	69022	81414	36297	63199	91653	86286	93113	80068	82343	89965	77689	88950	70101	49199	72956	100626	96688	111406	91767	38606	15837	6548	3904	1810	1076	774	1000	
Mn. ablatontrack n+1	86931	74212	63113	66913	59900	96414	107421	109112	92125	78723	90866	88144	71493	72735	70405	64912	81793	63402	62867	72299	87481	66667	104744	91463	38911	18345	3717	9512	1359	962	1208	1208	
Fe. ablatontrack n+2	69435	73368	75198	72451	74743	102714	157948	1112186	109207	81281	75965	71693	84807	84352	66427	55143	45455	46614	66408	104631	100099	57717	11972	23668	13798	8255	7417	3000	2623	2283	1245	1585	

Figura 9C

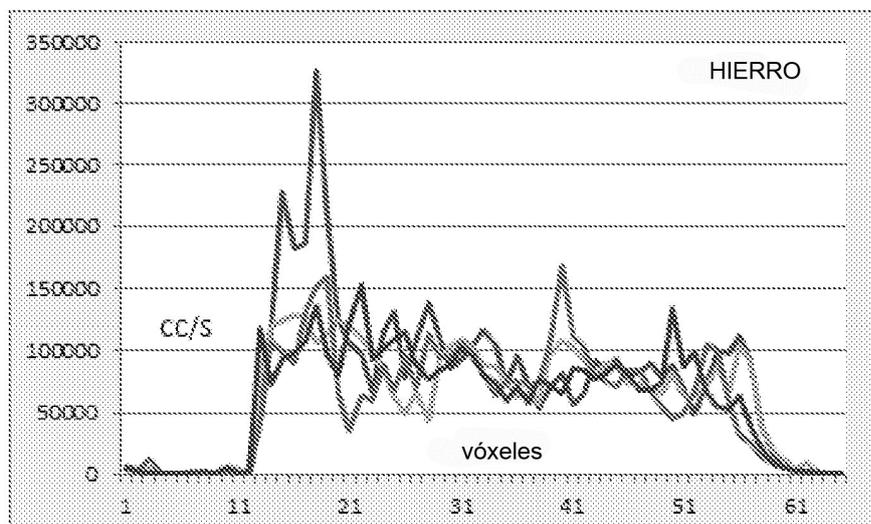
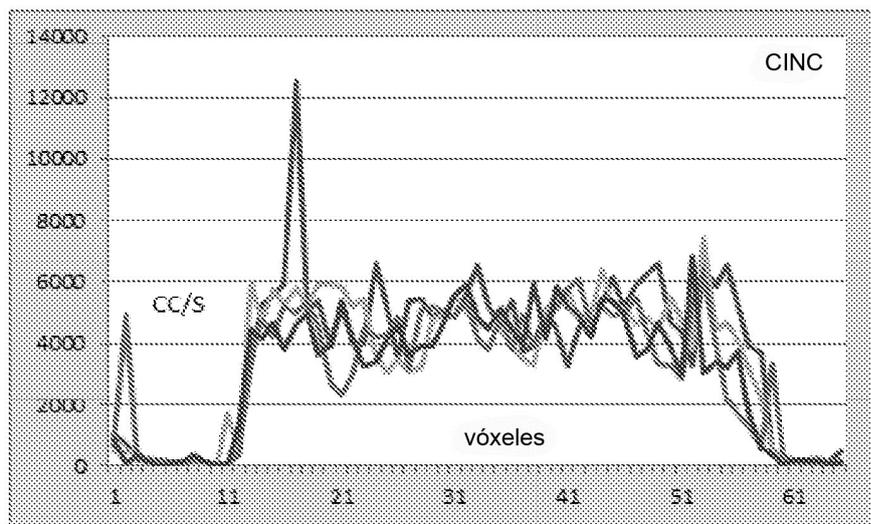
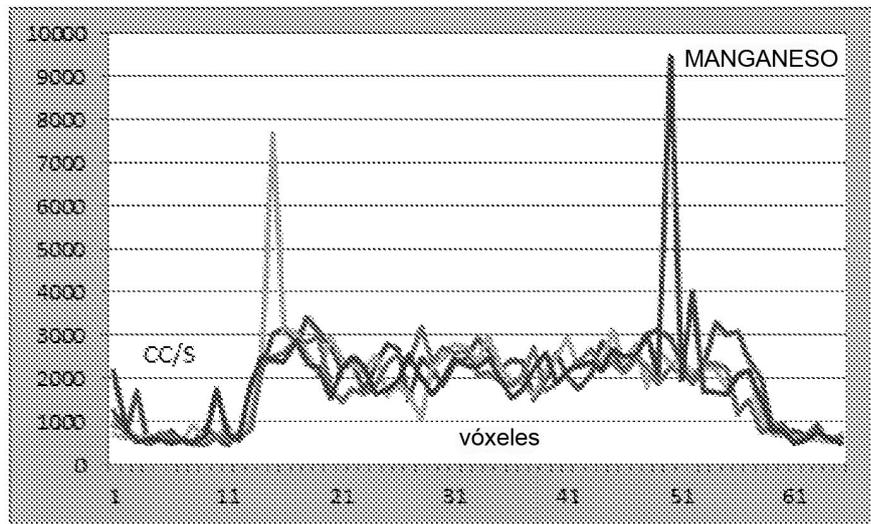
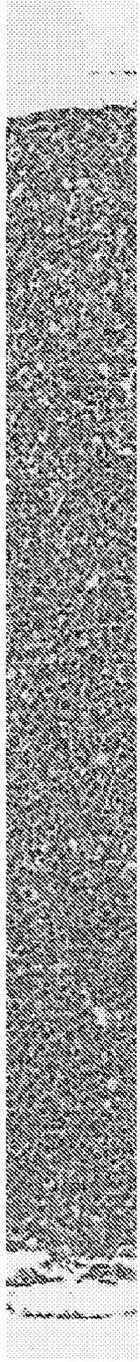


Figura 10A



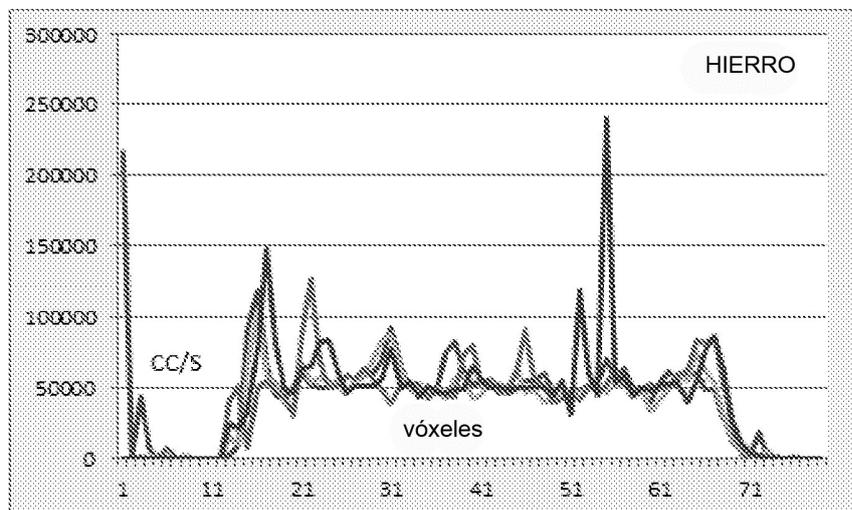
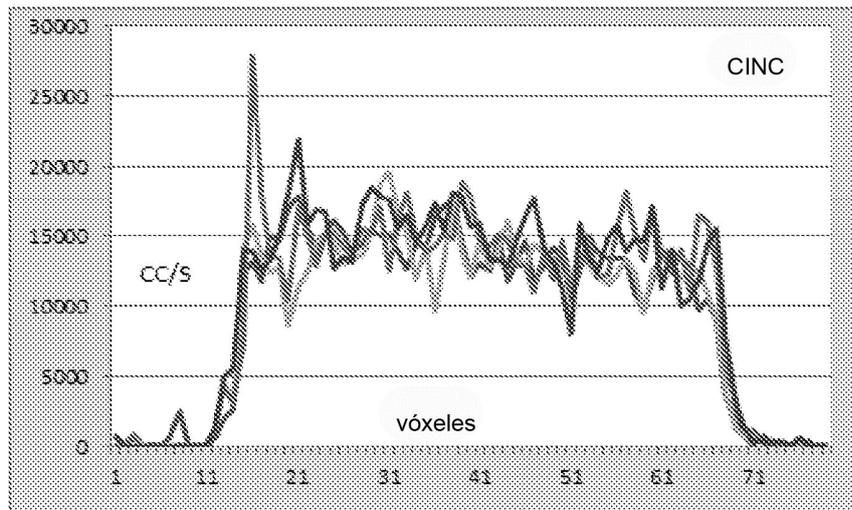
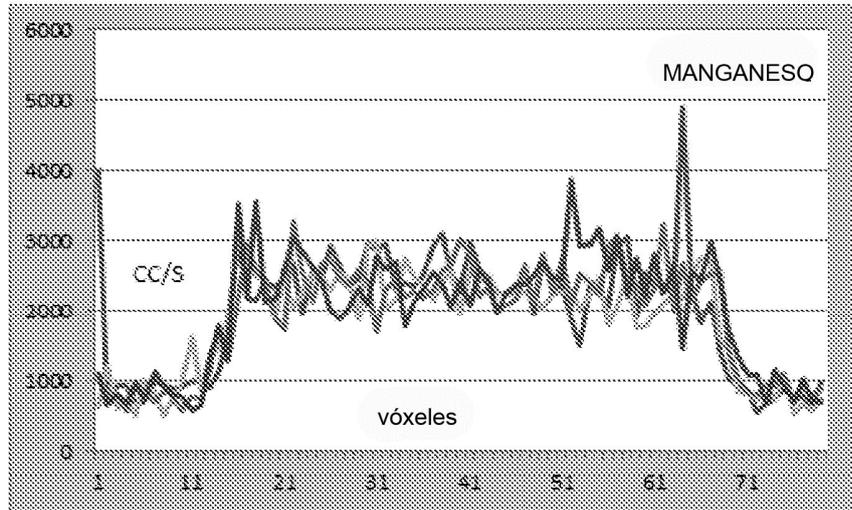
vóxel 59

Figura 10B

varón de 52 años seminoma G5

	v1	v2	v3	v4	v5	v6	v7	v8	v9	v10	v11	v12	v13	v14	v15	v16	v17	v18	v19	v20	v21	v22	v23	v24	v25	v26	v27	v28	v29	v30	v31	v32	v33	v34	v35	v36	v37	v38	v39	v40			
Mn	abstionline.n	21708	415	4471	6020	151	151	132	245	453	170	208	57	275	5974	8562	11878	6897	4556	4289	4983	6094	5266	5079	4949	5254	47971	51307	62128	5951	69666	9222	6384	5223	5174	42184	50655	7468	85665	63170	52186		
Fe	abstionline.n1	302	623	302	642	2340	1319	113	2217	245	415	263	311	15082	10202	62653	10491	58645	35664	35666	33001	67653	54641	57335	53336	54207	46779	54726	7422	70263	63632	87822	6280	64444	46152	50165	42442	56884	58417	46390			
Fe	abstionline.n2	170	283	208	151	283	828	132	94	208	208	216	283	41407	52039	7738	50525	55790	46211	43009	30611	89398	117098	80757	49730	51131	58892	56846	63946	56543	48728	39722	52895	53583	51225	44452	47116	45385	44225	73701	78922		
Mn	abstionline.n	3777	3627	3162	3376	633	571	585	7645	1416	7645	3266	1089	1498	2426	714	7665	714	1086	3541	788	754	753	618	3941	1091	3117	1005	1693	860	855	85	884	745	863	551	863	551	863	551	863		
Mn	abstionline.n1	5410	2993	4098	4208	2282	5314	1246	1356	2024	2024	4025	2024	1246	1402	4025	2024	1356	1402	4025	1246	1356	2024	1246	1356	2024	1356	2024	1246	1356	2024	1246	1356	2024	1356	2024	1246	1356	2024	1356	2024		
Mn	abstionline.n2	2814	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	2998	
Zn	abstionline.n	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	15533	
Fe	abstionline.n1	55920	55572	49655	46377	69747	55370	54613	60330	47620	4412	68660	50959	53883	69898	56800	64895	49395	46495	40523	51136	60393	60889	60393	60889	60393	60889	60393	60889	60393	60889	60393	60889	60393	60889	60393	60889	60393	60889	60393	60889	60393	60889
Fe	abstionline.n2	53610	56827	46397	47128	61358	91217	57073	51547	40480	42655	46968	41118	51053	46174	53900	63340	53212	50487	50336	52342	48988	51026	59474	62507	83480	81453	86779	53193	25676	10494	4567	1915	1151	736	340	245	396	226	226	321		

Figura 10C



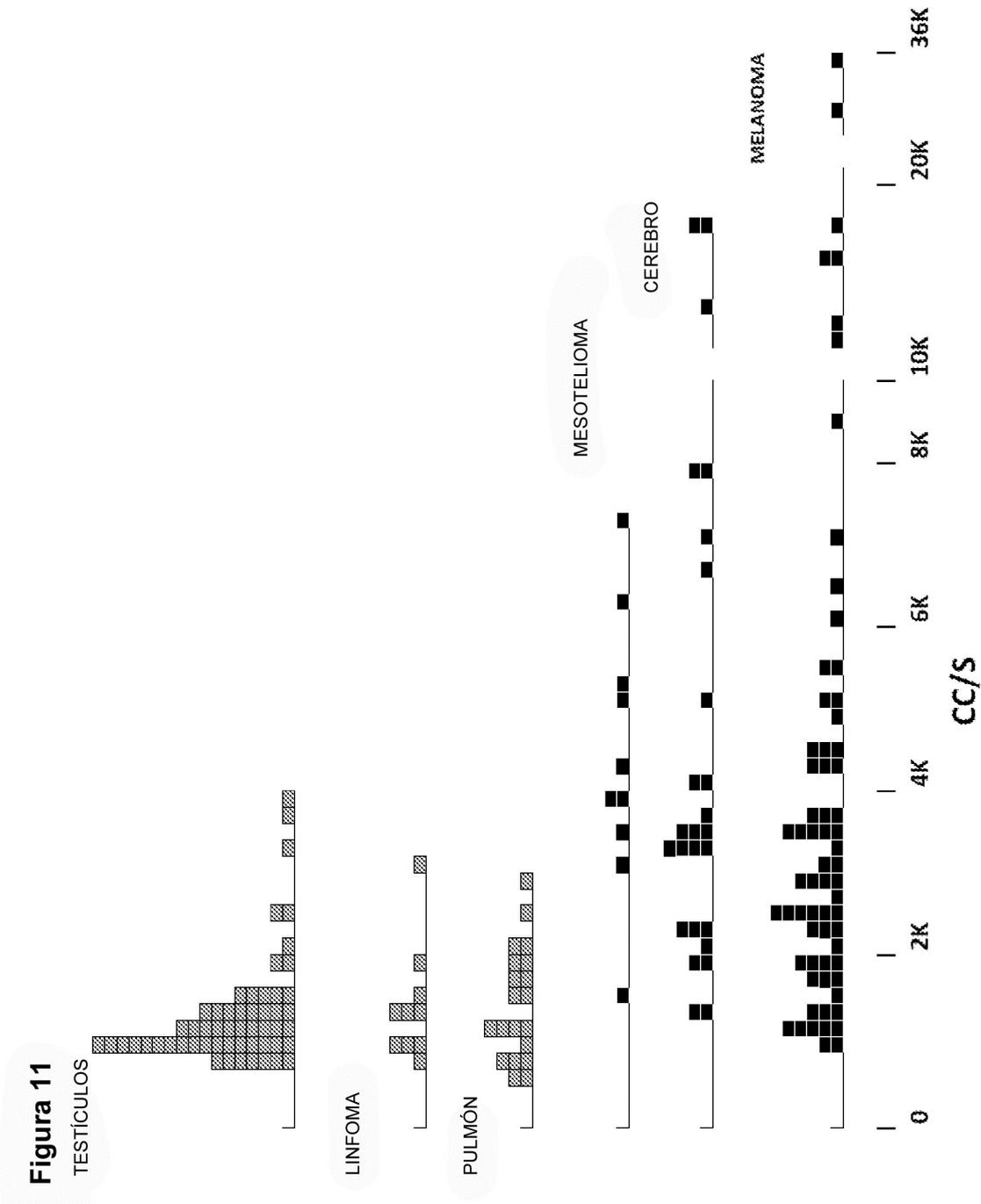
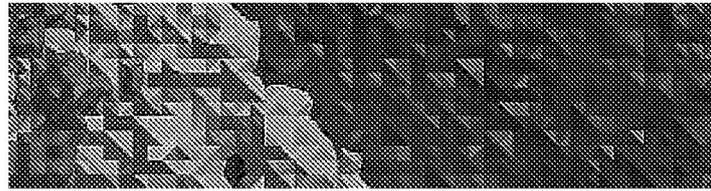


Figura 12



- 135000-150000
- 120000-135000
- 105000-120000
- 90000-105000
- 75000-90000
- 60000-75000
- 45000-60000
- 30000-45000
- 15000-30000
- 0-15000

Figura 13

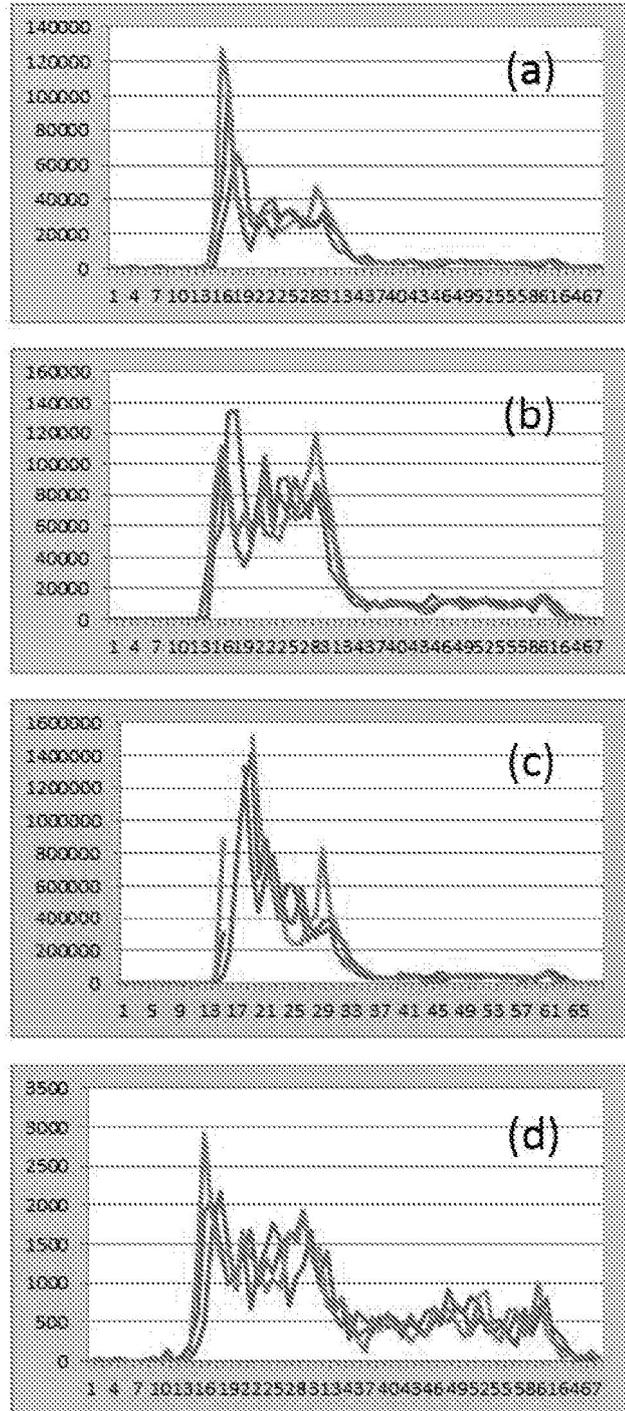


Figura 14

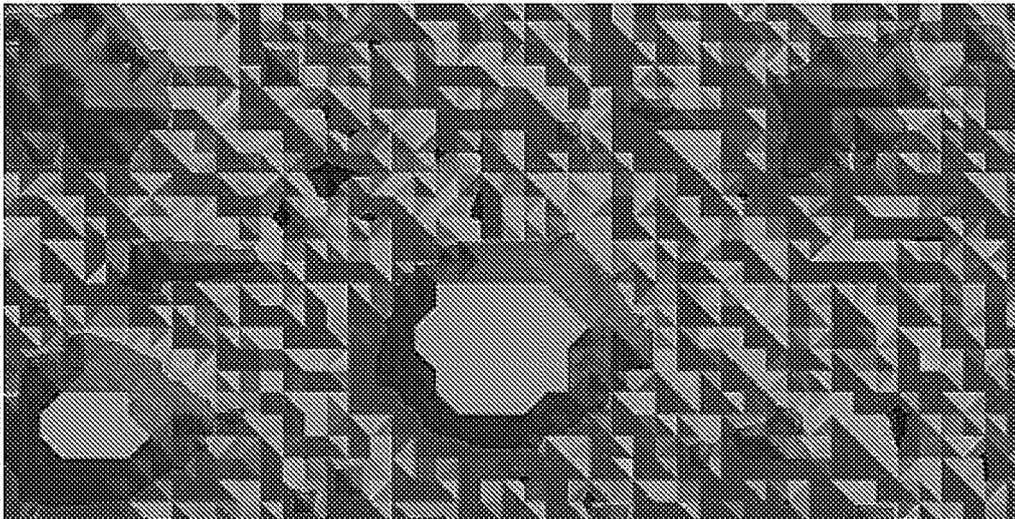
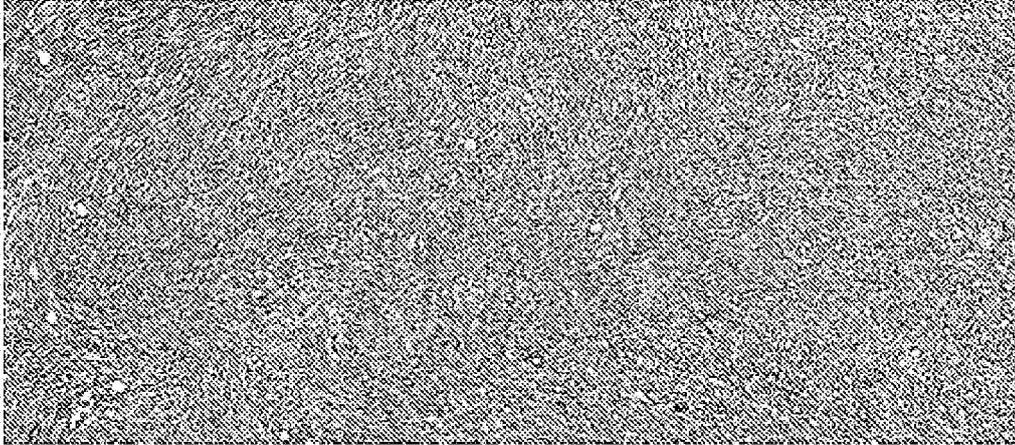
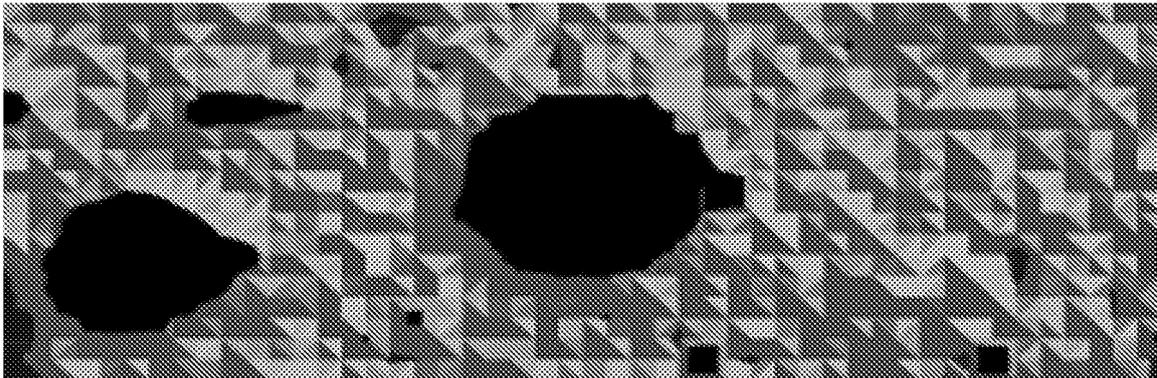


Figura 15

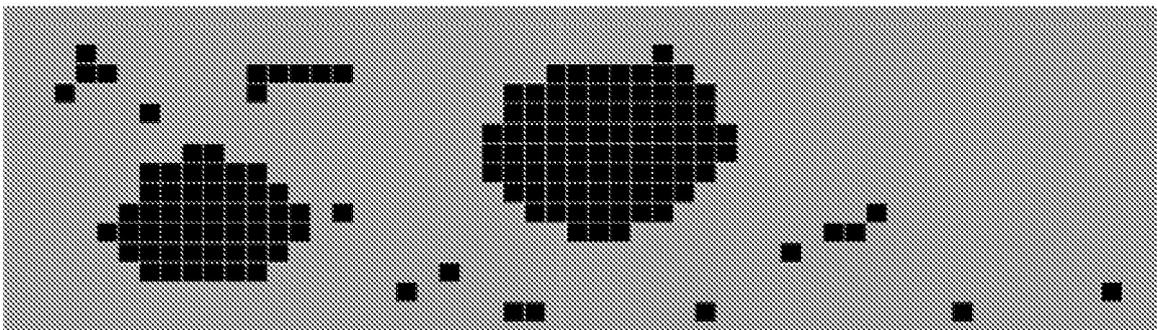
A



B



C



D

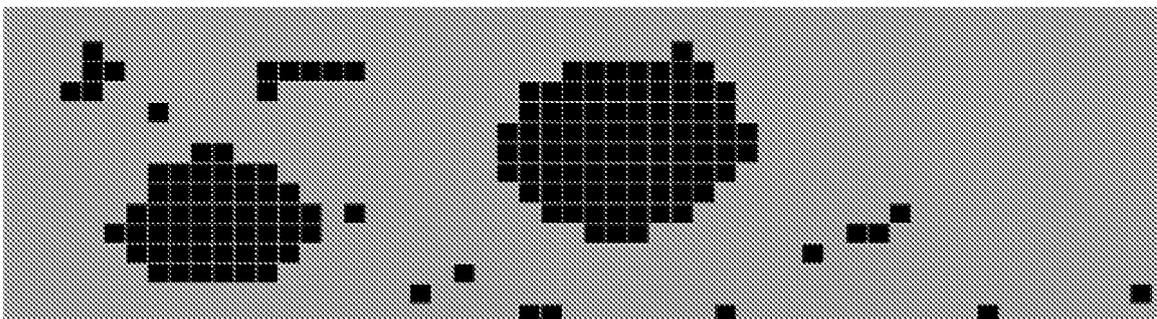
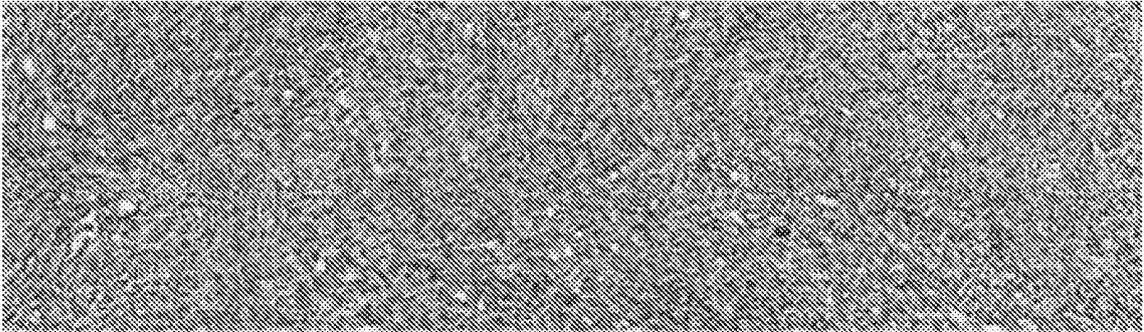
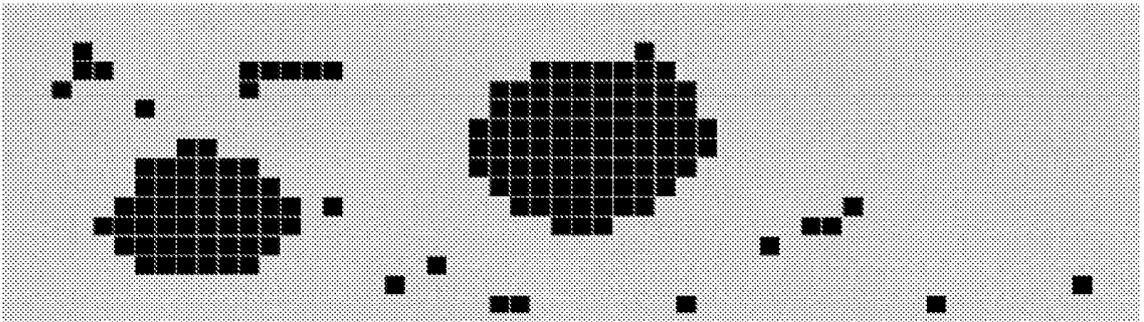


Figura 16

H&E



Mn



Zn

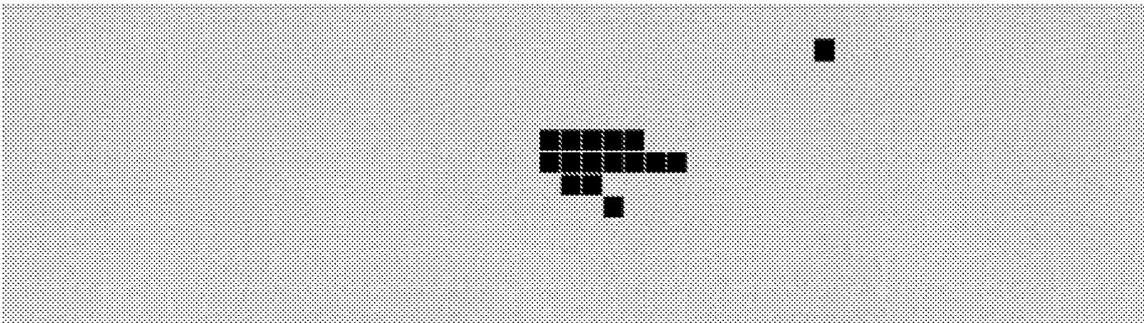
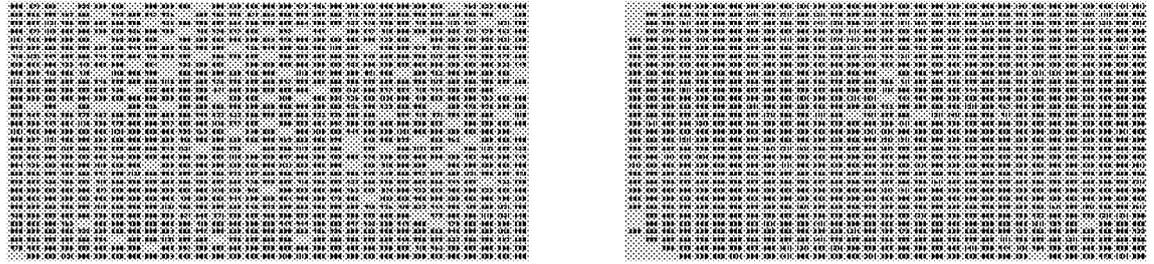
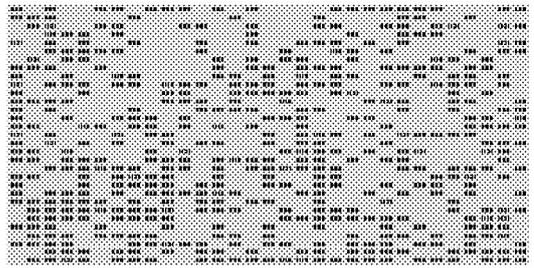


Figura 17

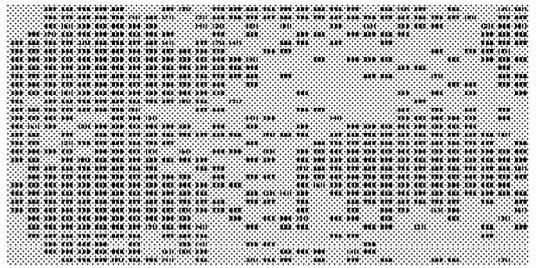
T1 Mnpulmón células microcíticas T1 Mn melanoma



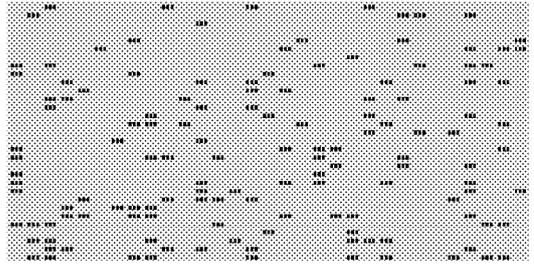
T2



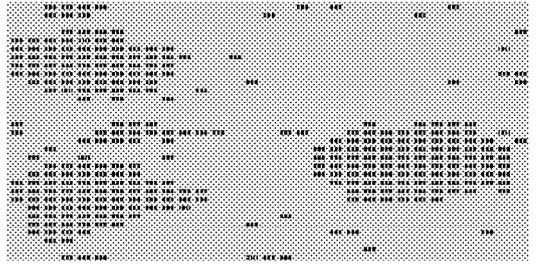
T2



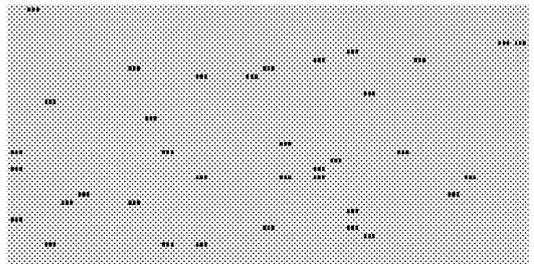
T3



T3



T4



T4

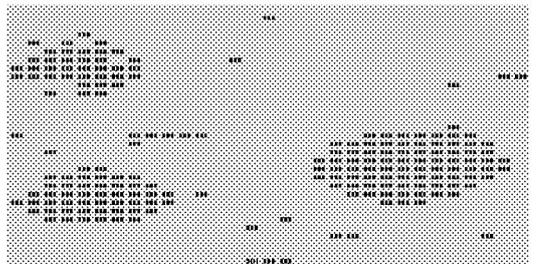
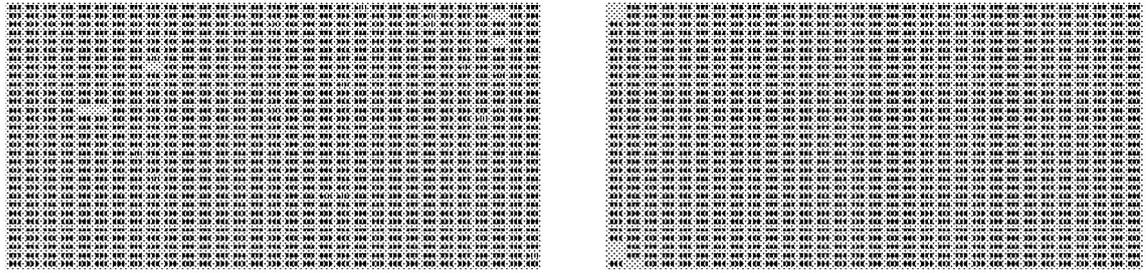
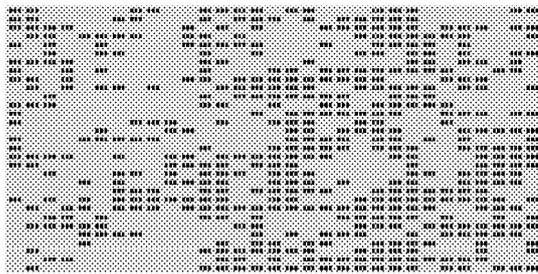


Figura 18

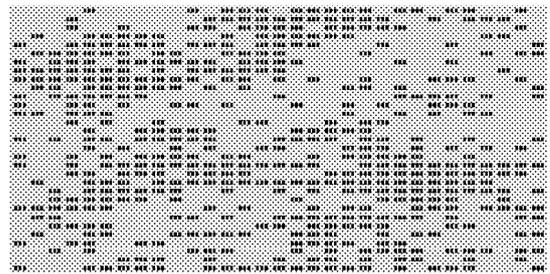
T1 Zn pulmón células microcíticas T1 Zn melanoma



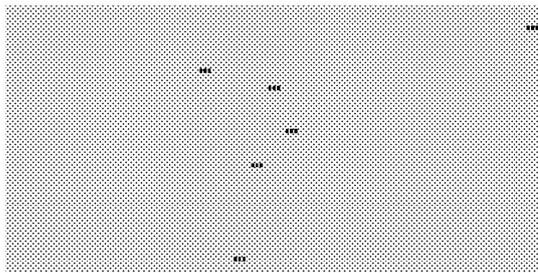
T2



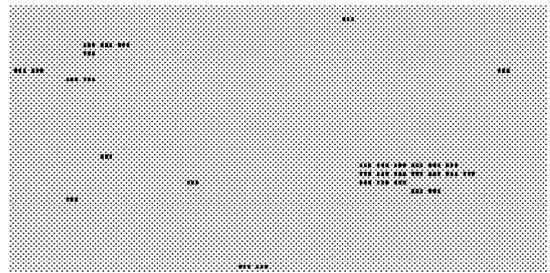
T2



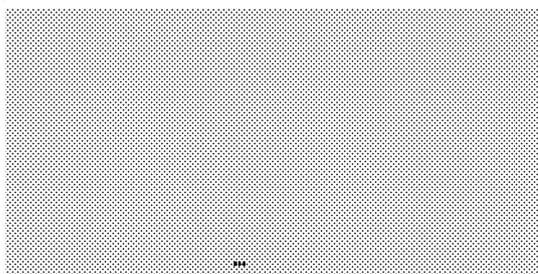
T3



T3



T4



T4

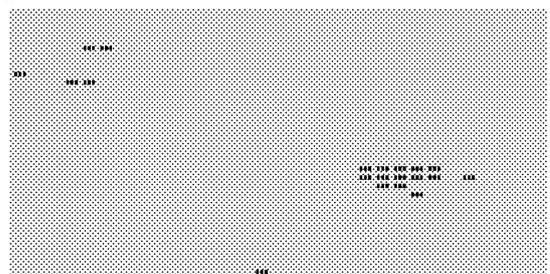


Figura 19

pulmón células microcíticas tumores sin HMR

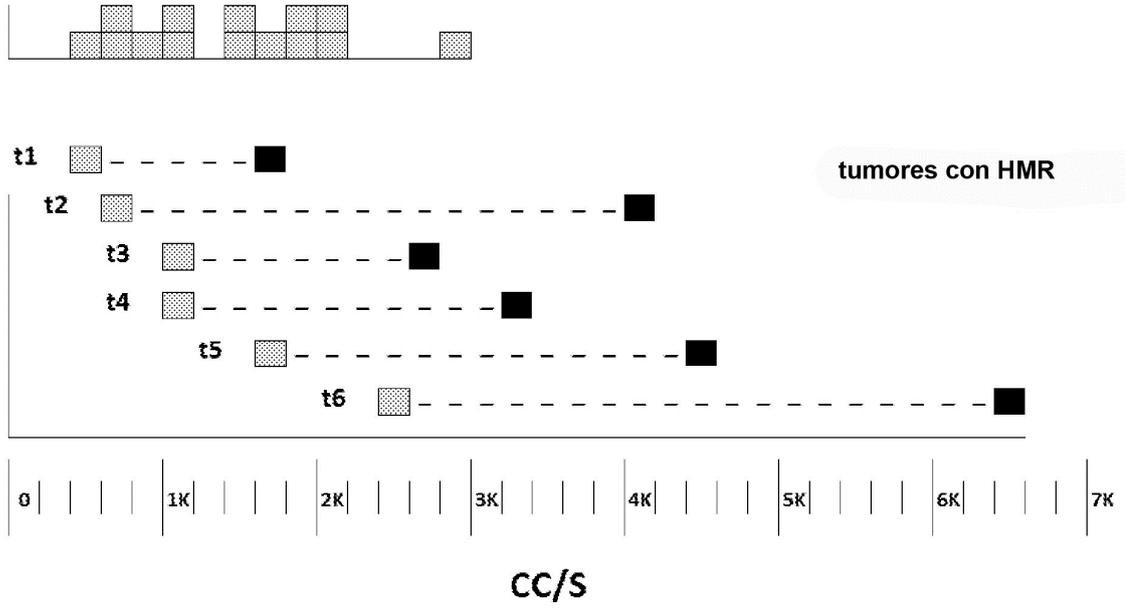
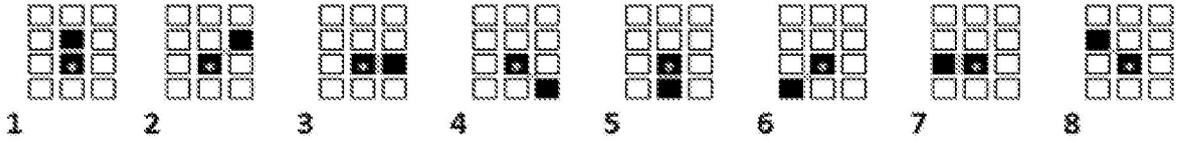
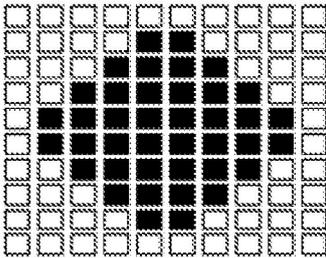


Figura 20

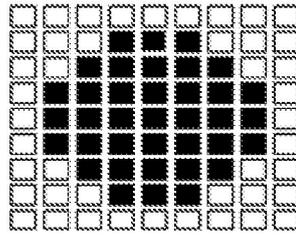
A



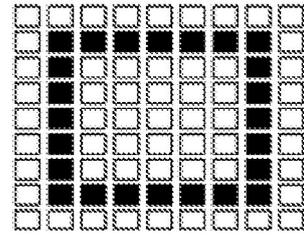
B



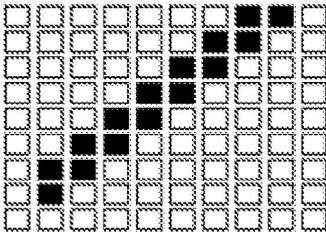
C



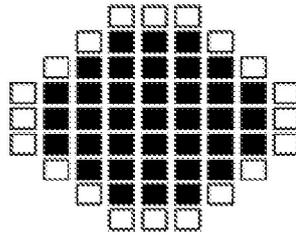
D



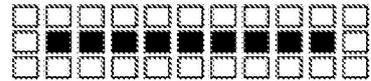
E



F



G



H

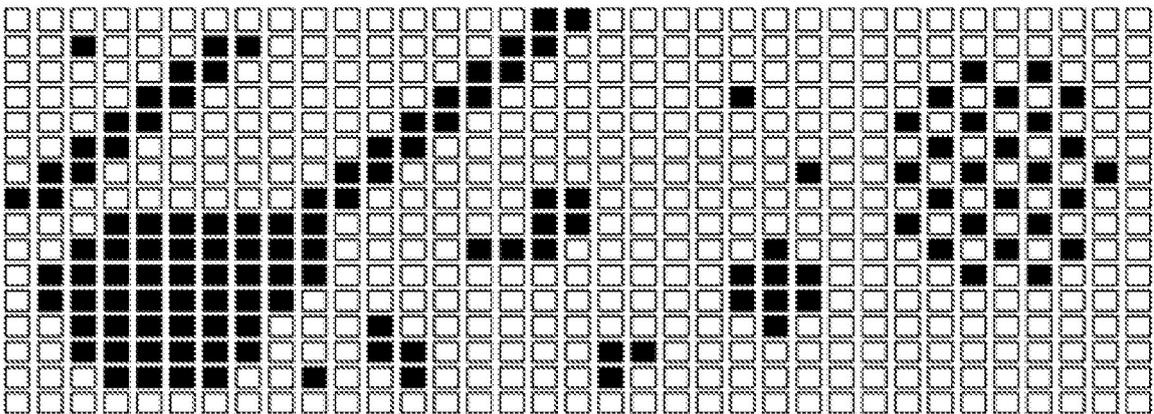


Figura 21

LINFOMA

sin tumores con HMR

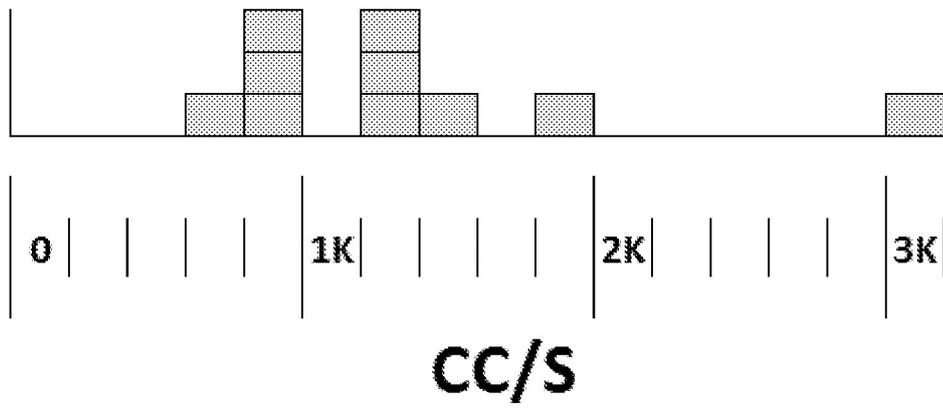


Figura 22
TESTÍCULOS

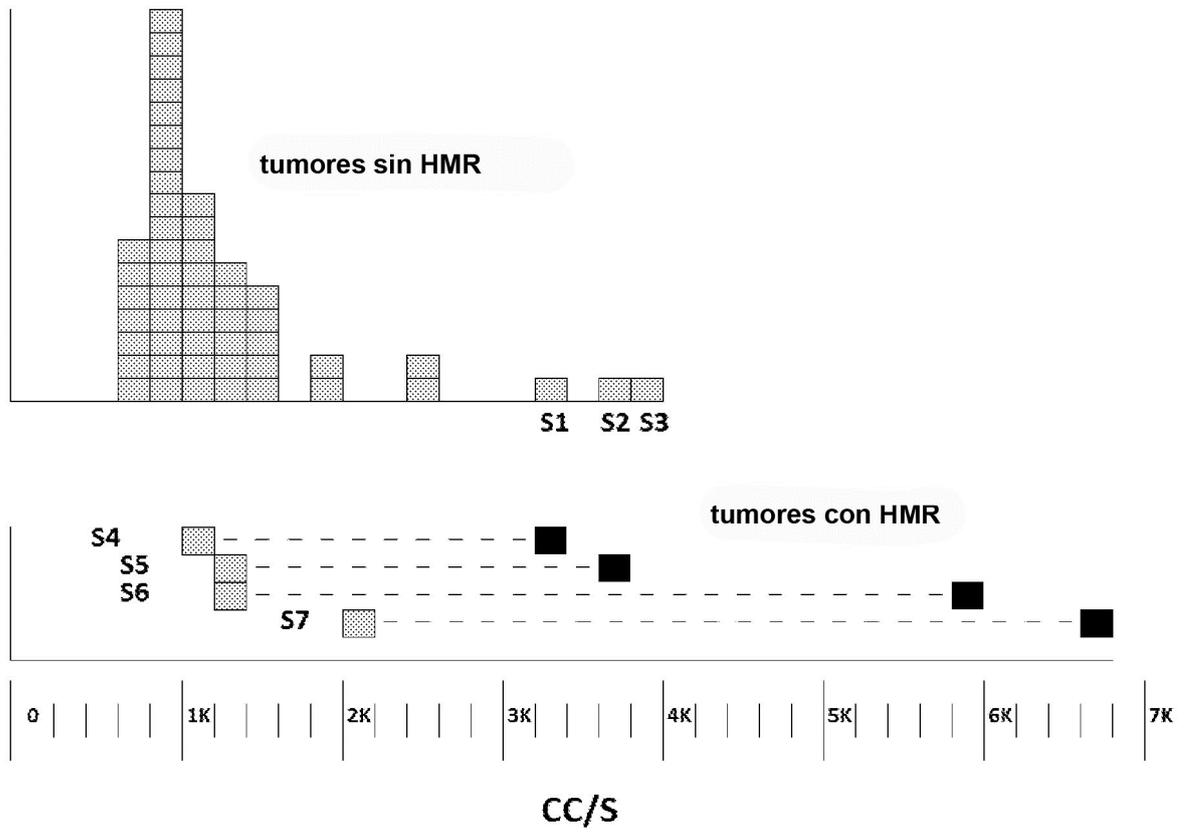


Figura 23
MESOTELIOMA

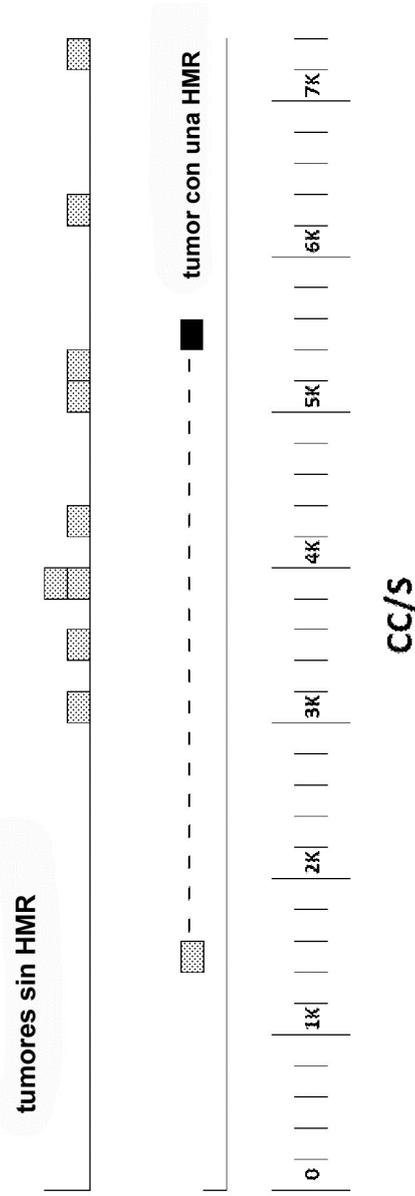


Figura 24
GLIOBLASTOMA/ASTROCITOMA

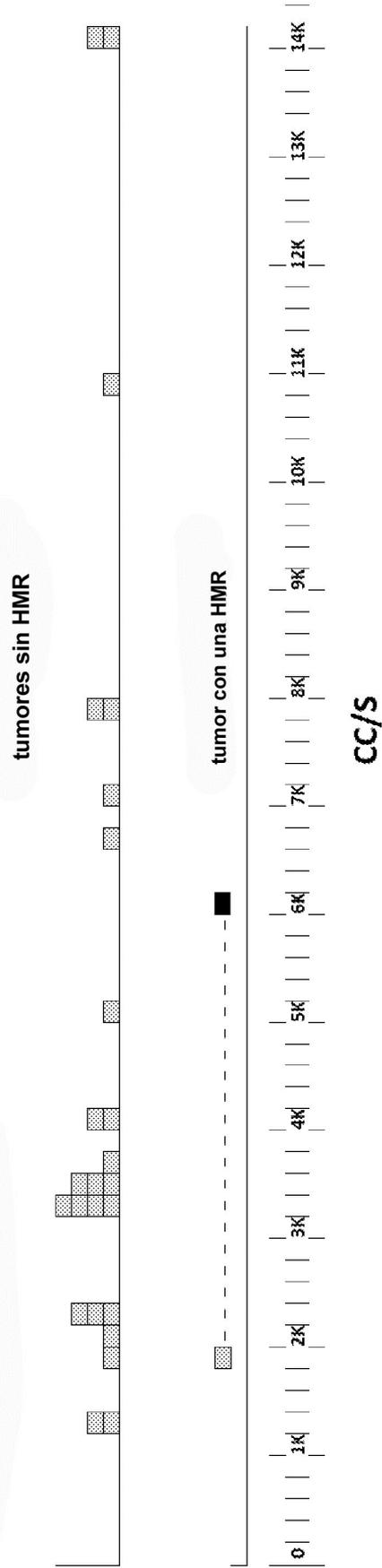


Figura 25

MELANOMA

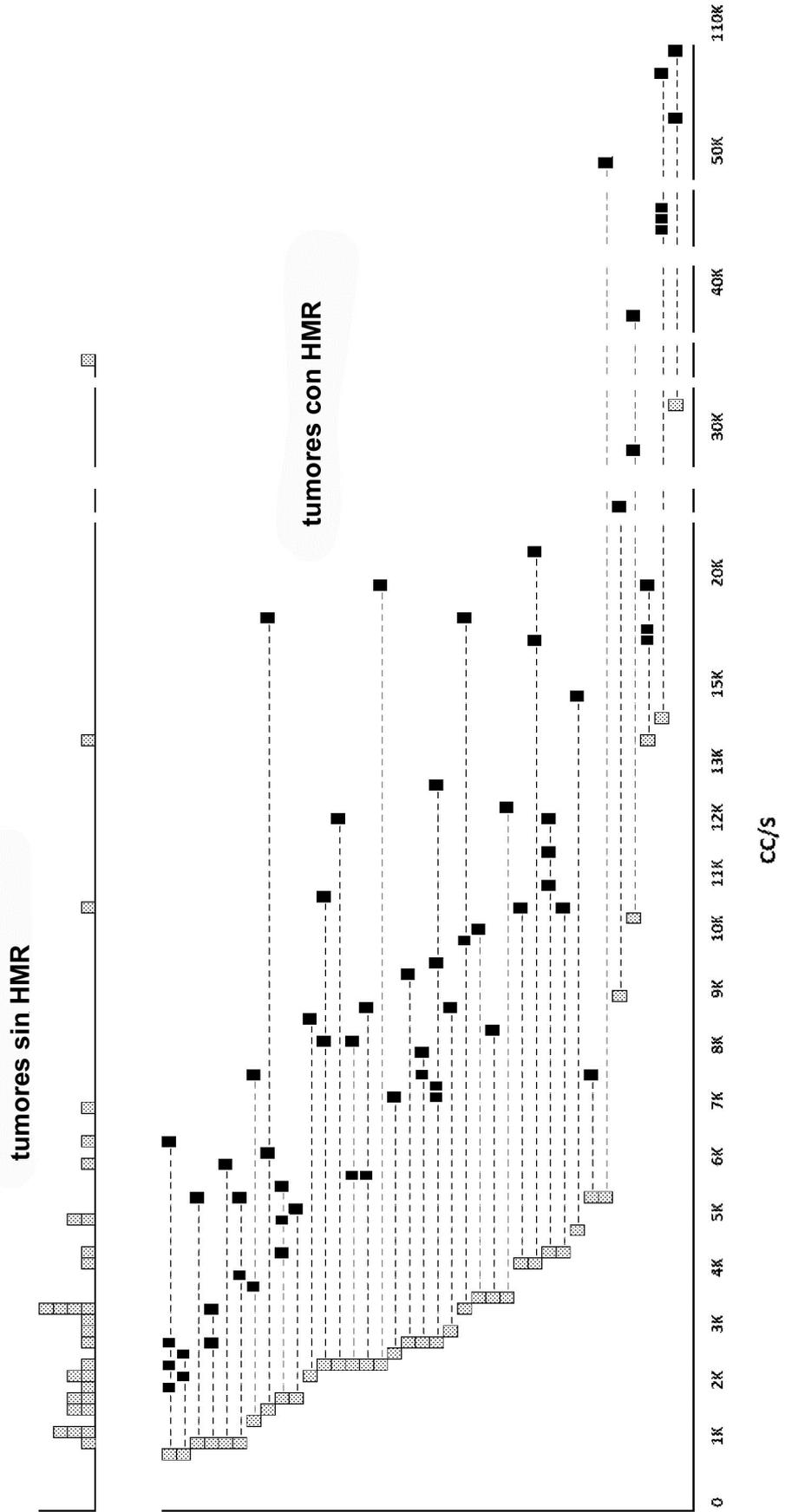


Figura 26

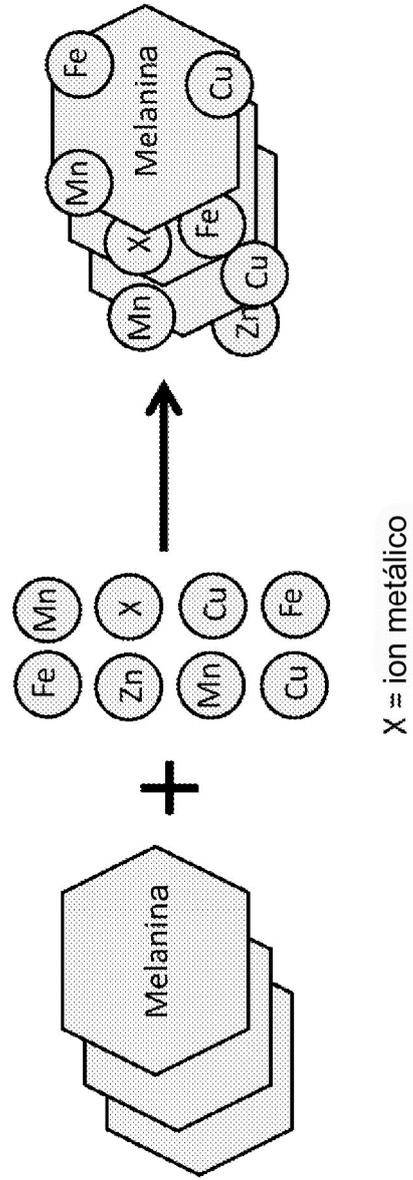


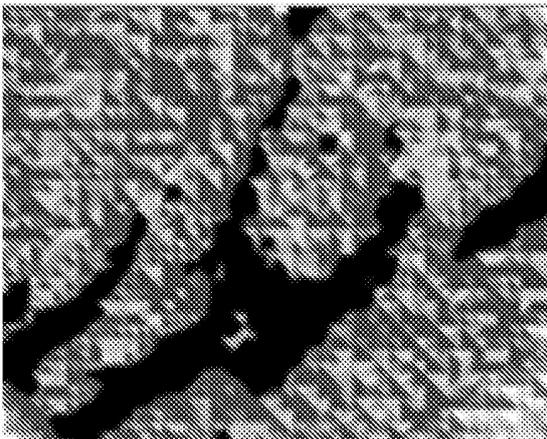
Figura 27



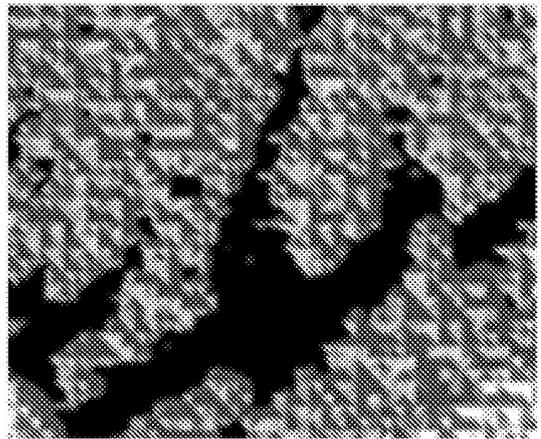
A



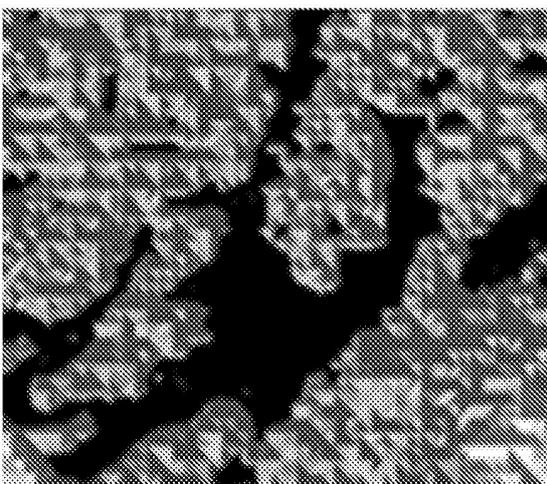
B



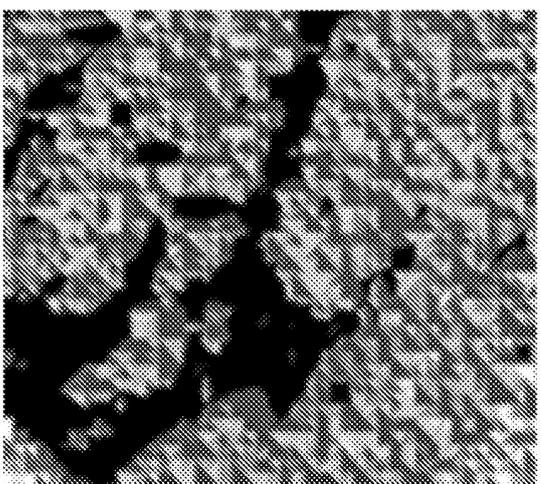
C



D



E



F

Figura 28

MELANOMA

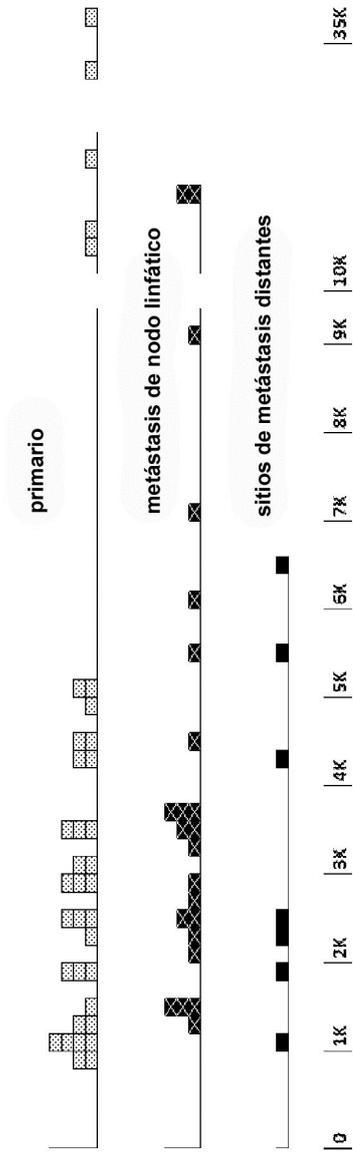
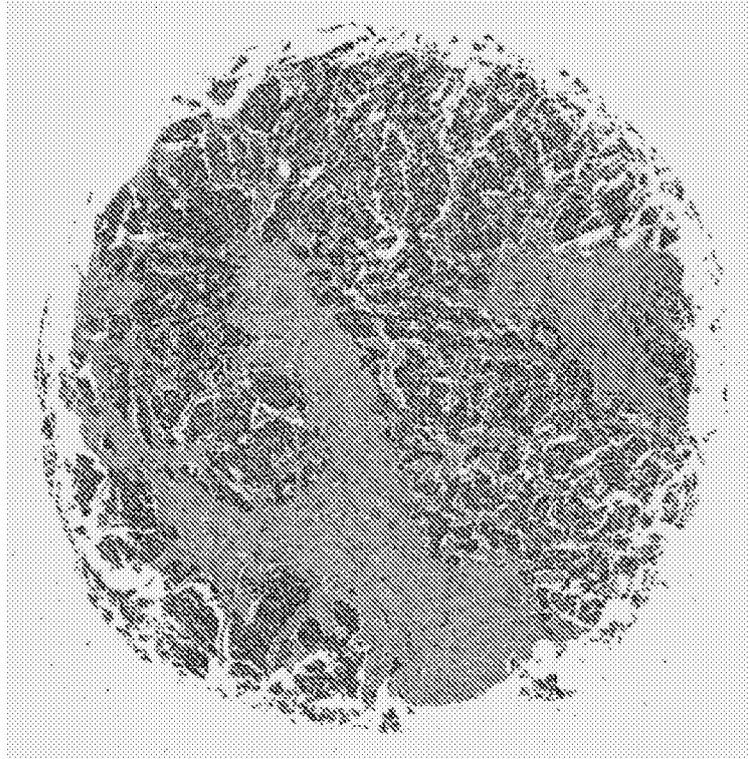


Figura 29

A



B

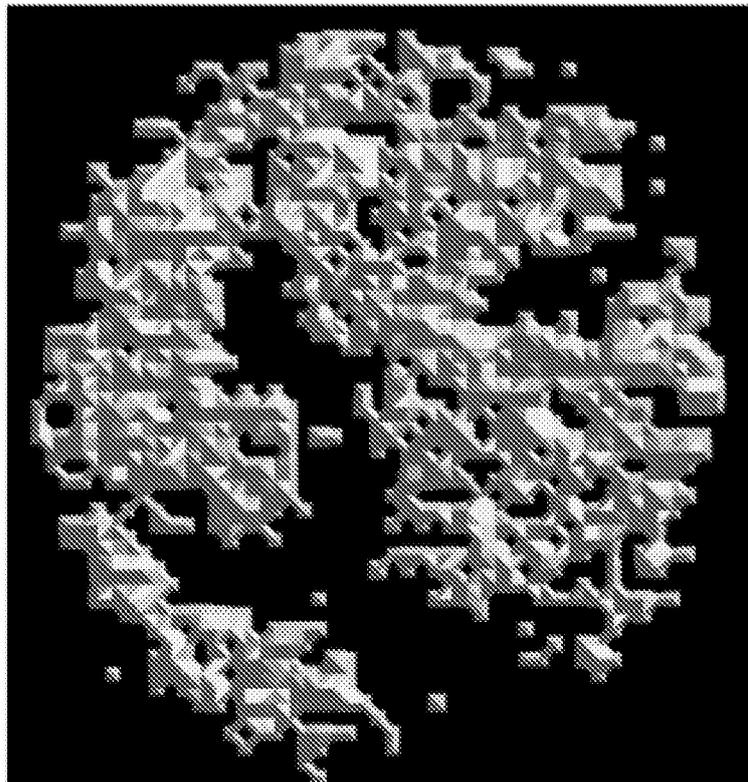


Figura 30

A



B

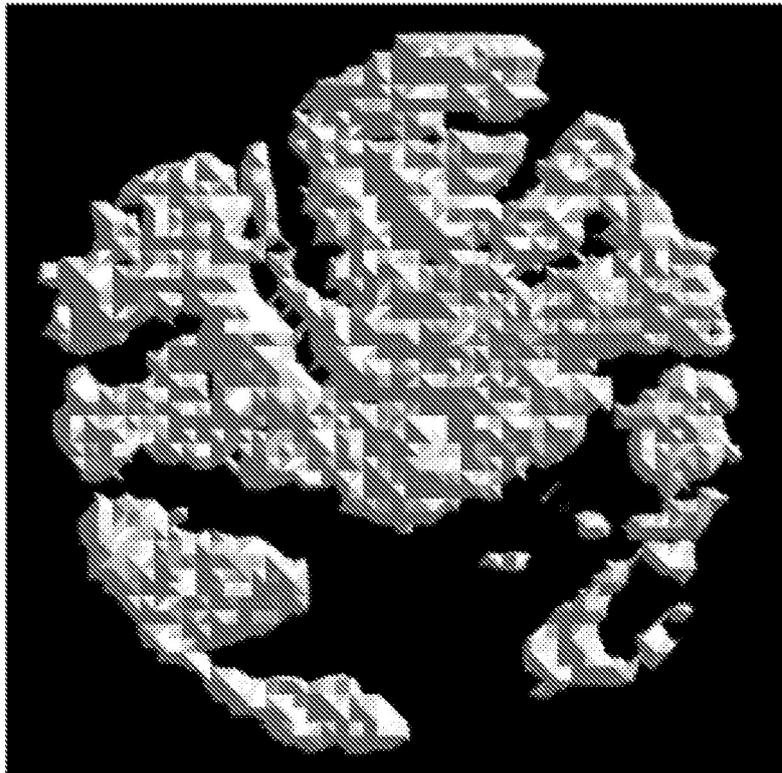


Figura 31
MAMA

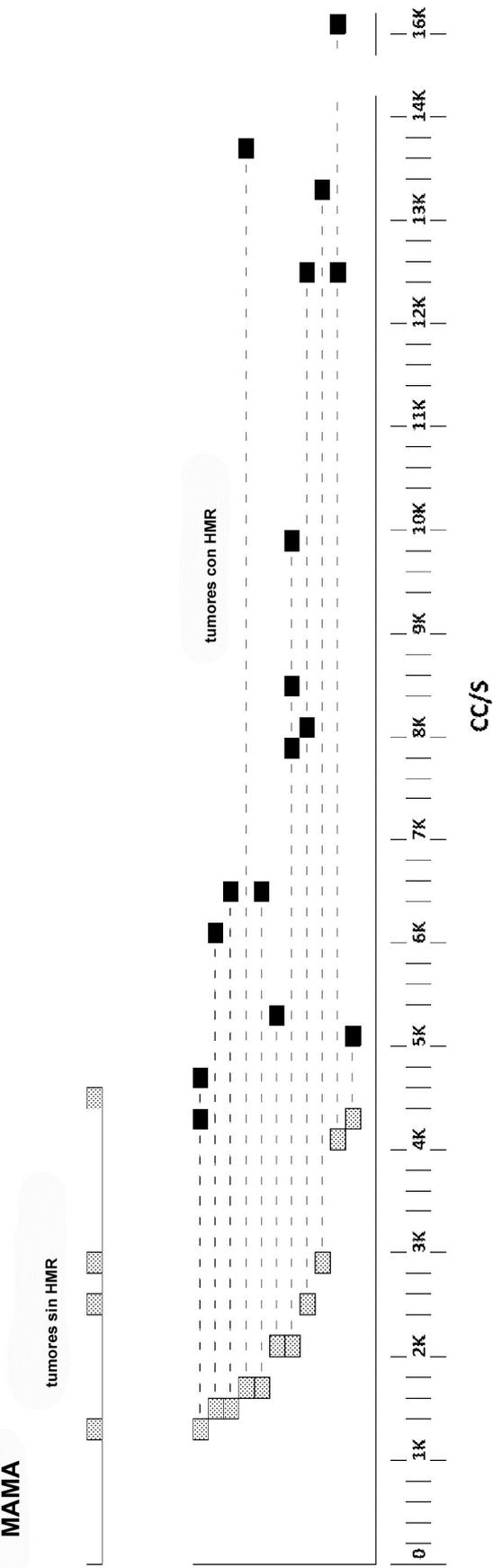


Figura 32

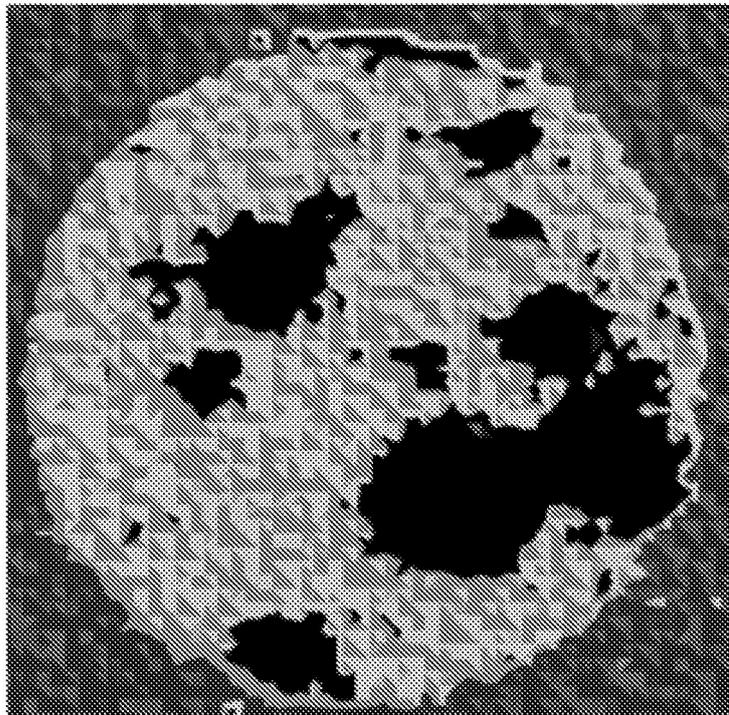
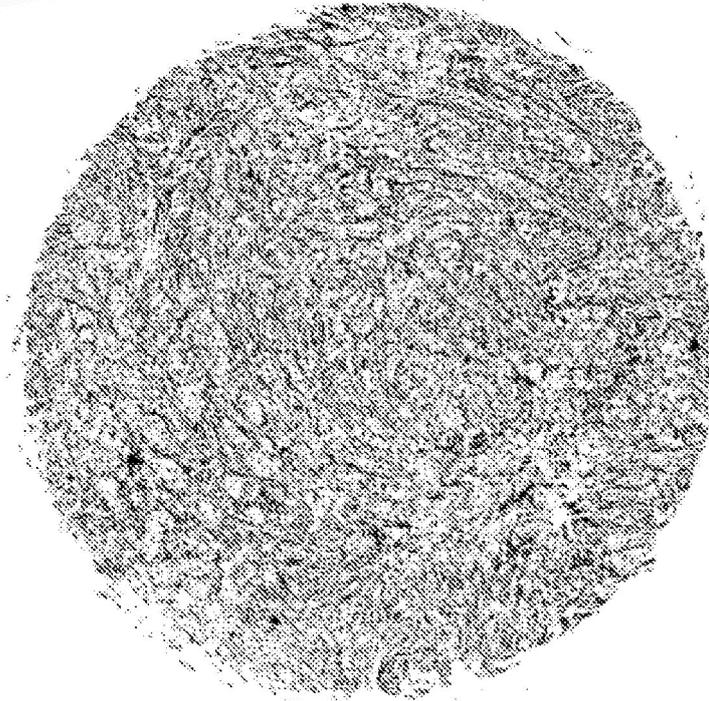
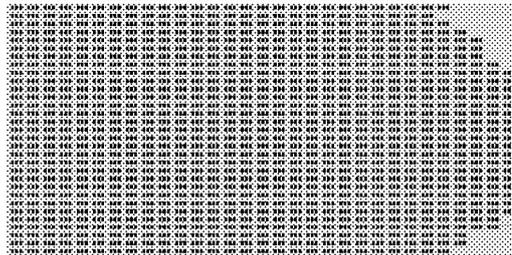


Figura 33

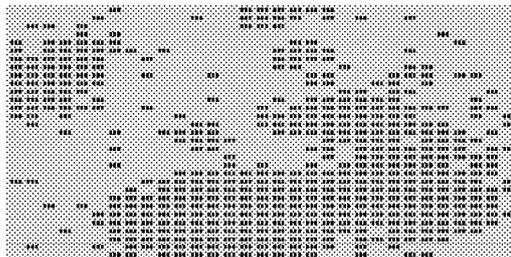
T1 Mn mama



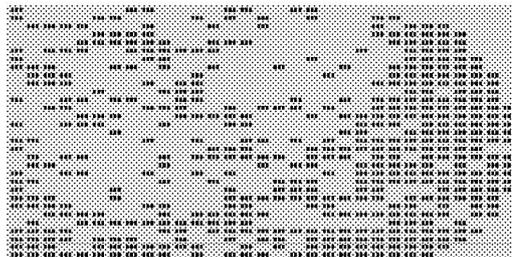
T1 Zn mama



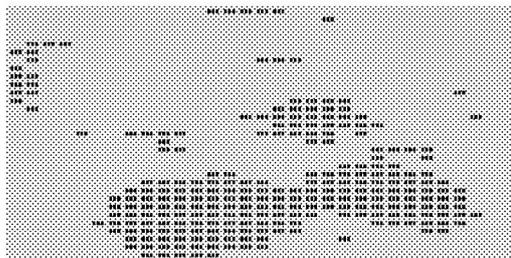
T2



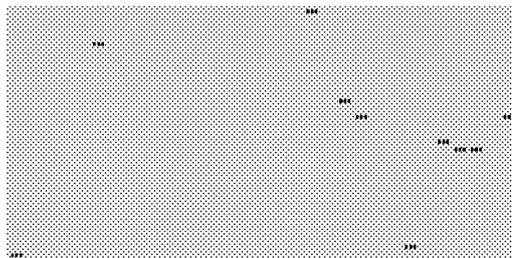
T2



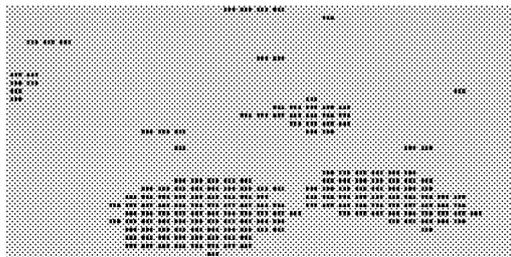
T3



T3



T4



T4

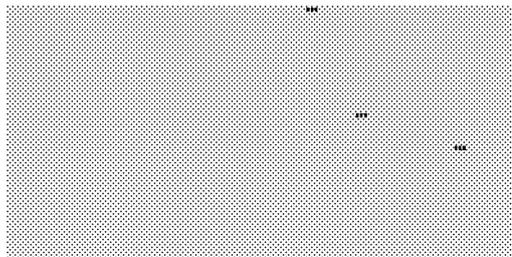


Figura 34

mama

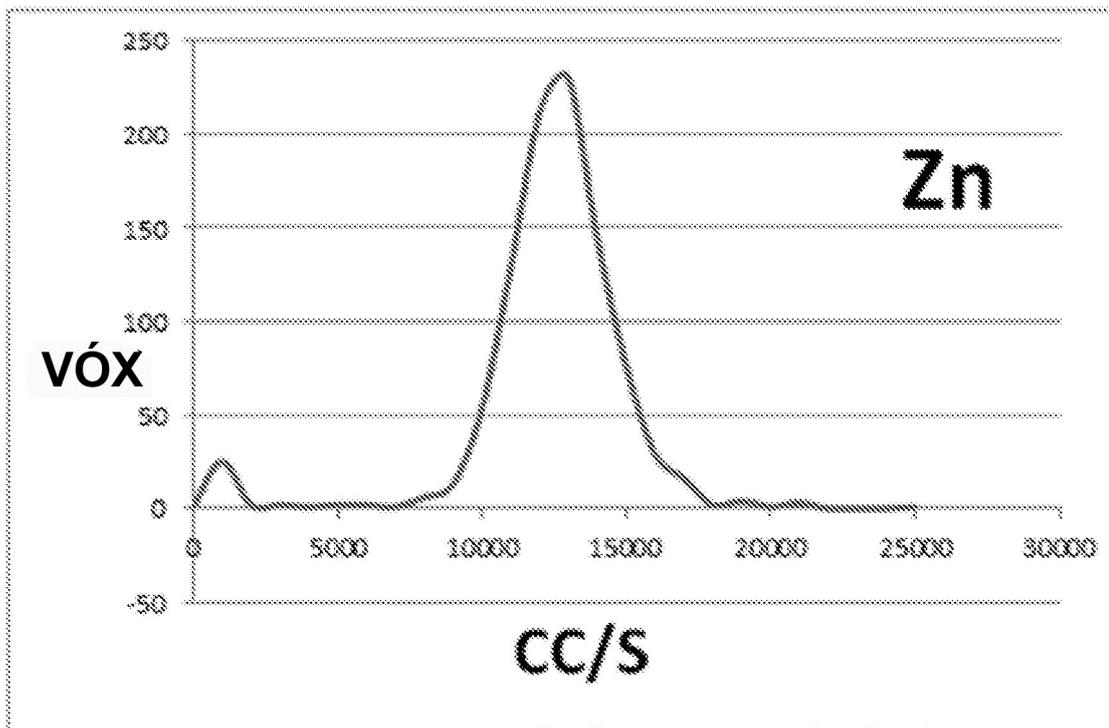
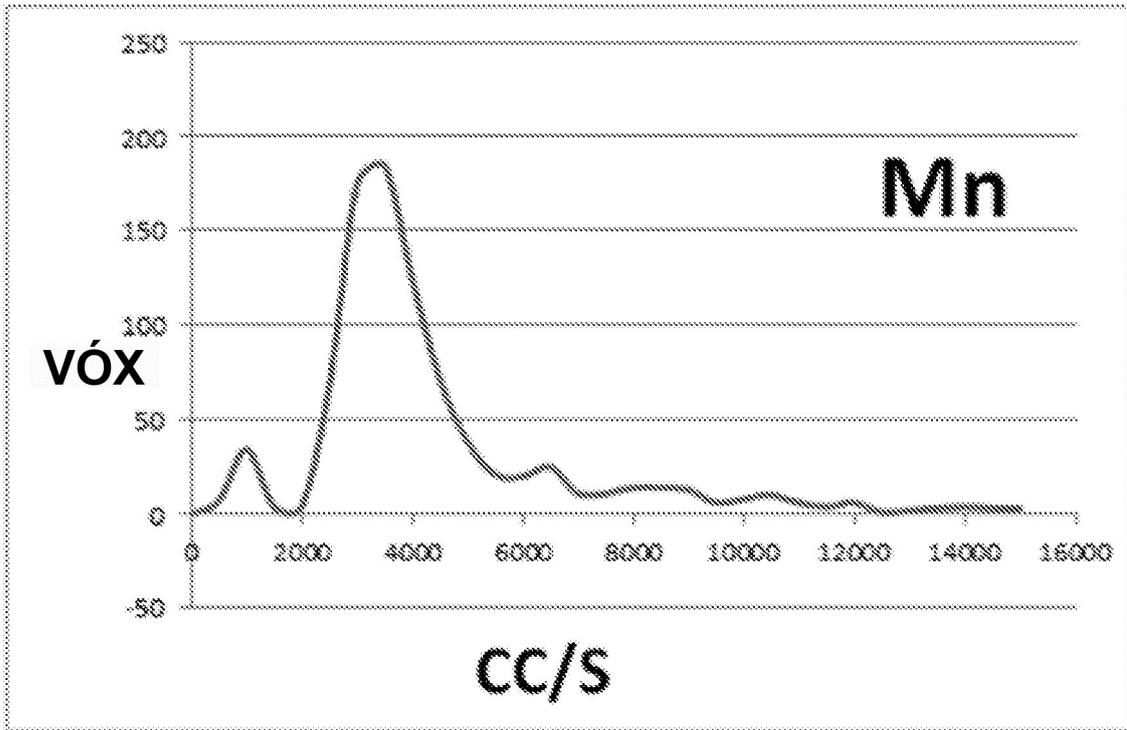


Figura 35

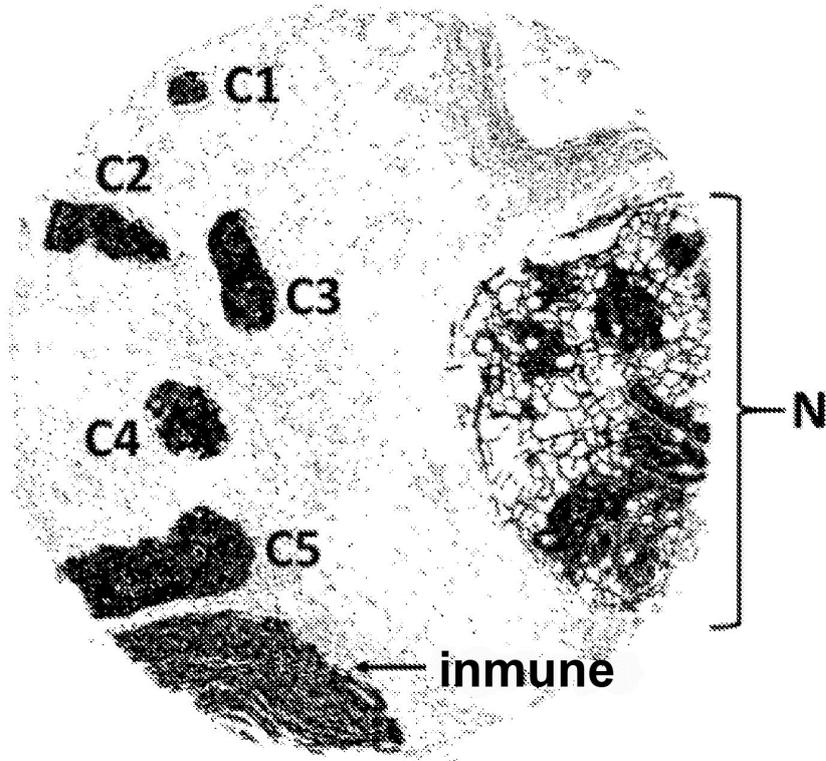
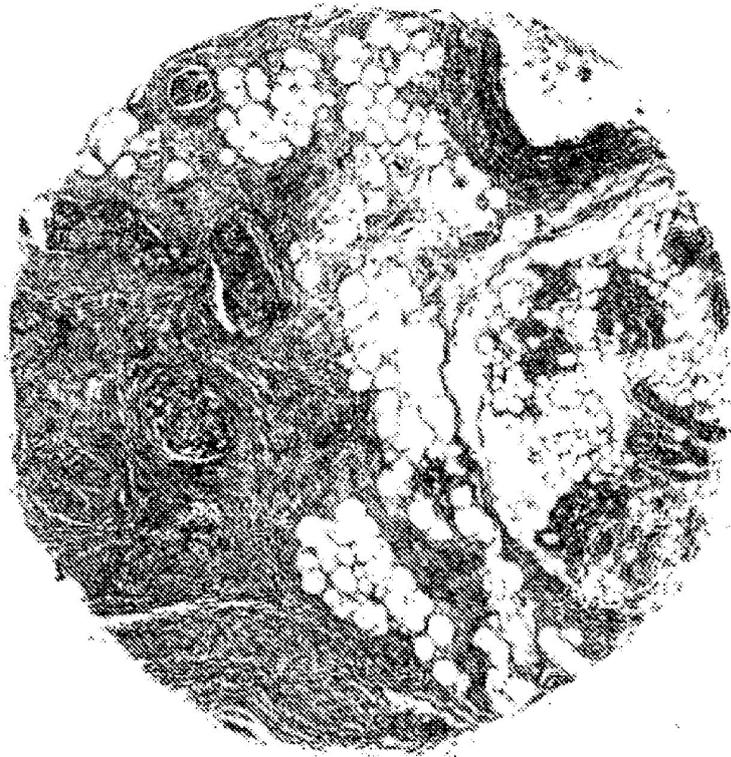
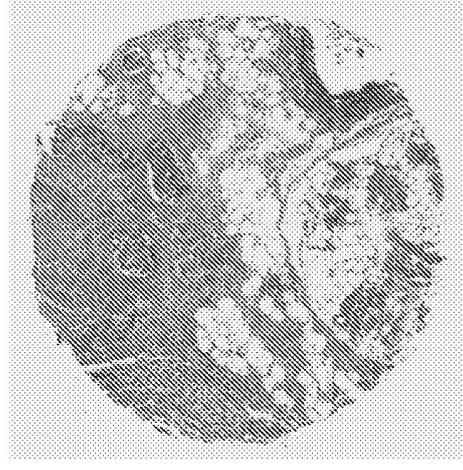
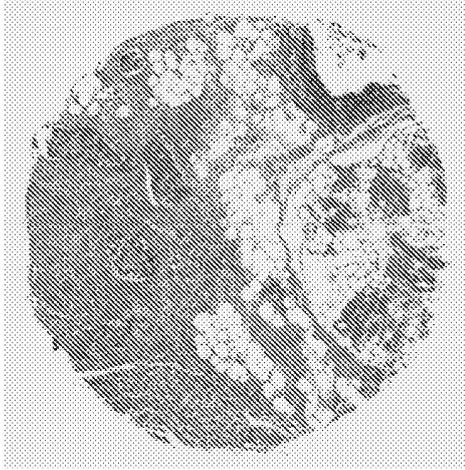


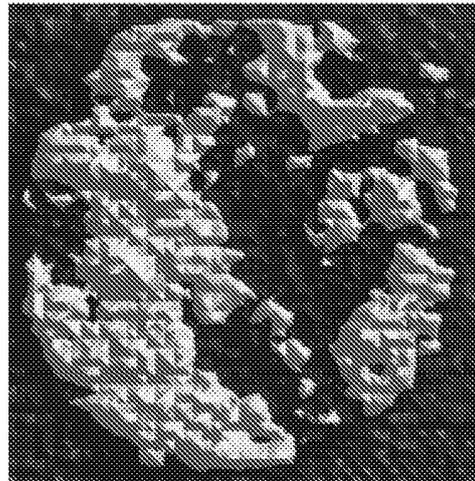
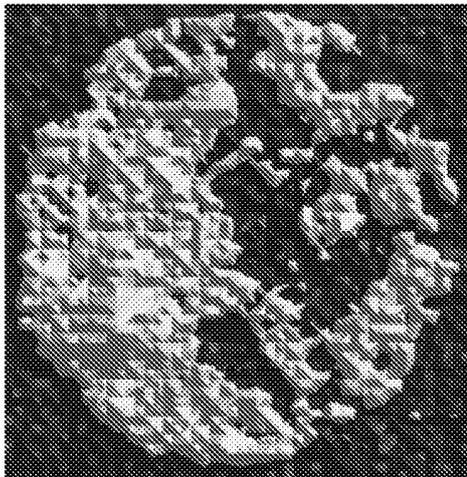
Figura 36

H&E



Mn

Zn



Cu

Fe

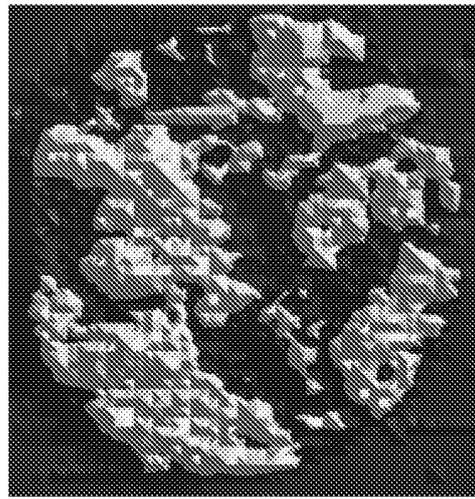
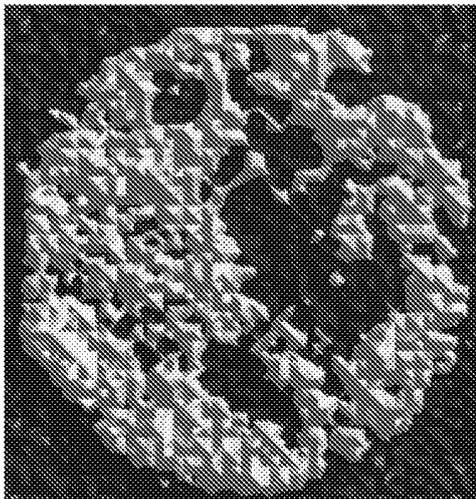
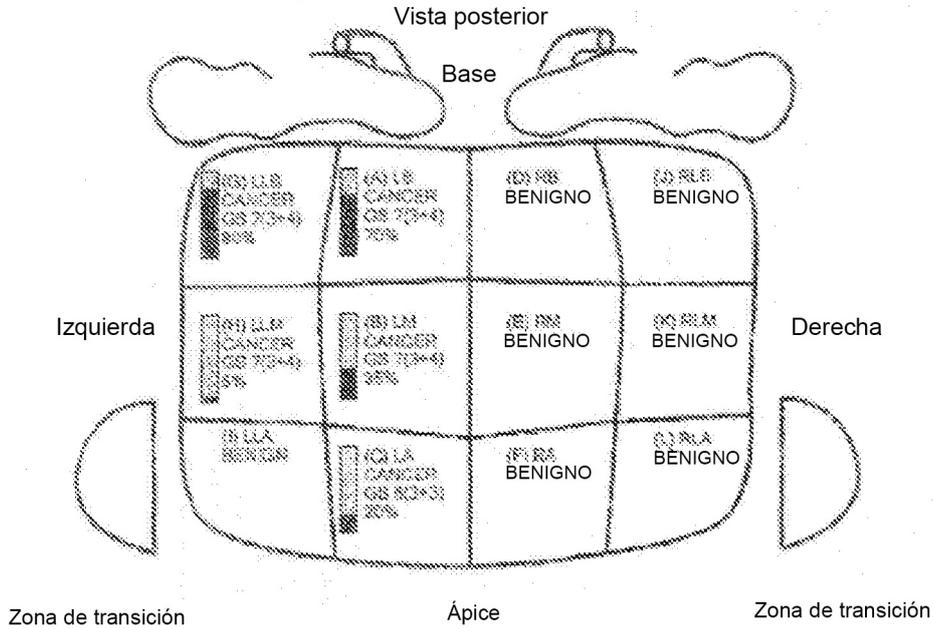


Figura 37

A



B

Resumen de diagnóstico

PARTE A: Base izquierda
Adenocarcinoma prostático, Puntuación Gleason 7(3+4) que comprende el 70 % del tejido de núcleo de aguja. (ICD-9:185.00).

PARTE B: Media izquierda
Adenocarcinoma prostático, Puntuación Gleason 7(3+4) que comprende el 35 % del tejido de núcleo de aguja. (ICD-9:185.00).

PARTE C: Ápice izquierda
Adenocarcinoma prostático, Puntuación Gleason 6(3+3) que comprende el 20 % del tejido de núcleo de aguja. (ICD-9:185.00).

PARTE D: Base derecha
Tejido prostático benigno.

PARTE E: Media derecha
Tejido prostático benigno.

PARTE F: Ápice derecha
Tejido prostático benigno.

PARTE G: Base Lat I
Adenocarcinoma prostático, Puntuación Gleason 7(3+4) que comprende el 80 % del tejido de núcleo de aguja. (ICD-9:185.00).

PARTE H: Medio Lat I
Adenocarcinoma prostático, Puntuación Gleason N/D que comprende el 0 % del tejido de núcleo de aguja. (ICD-9:185.00).

PARTE I: Ápice Lat I
Tejido prostático benigno.

PARTE J: Base Lat D
Tejido prostático benigno.

PARTE K: Medio Lat D
Tejido prostático benigno.

PARTE L: Ápice Lat D
Tejido prostático benigno.

Figura 38

PRÓSTATA

sin tumores con HMR

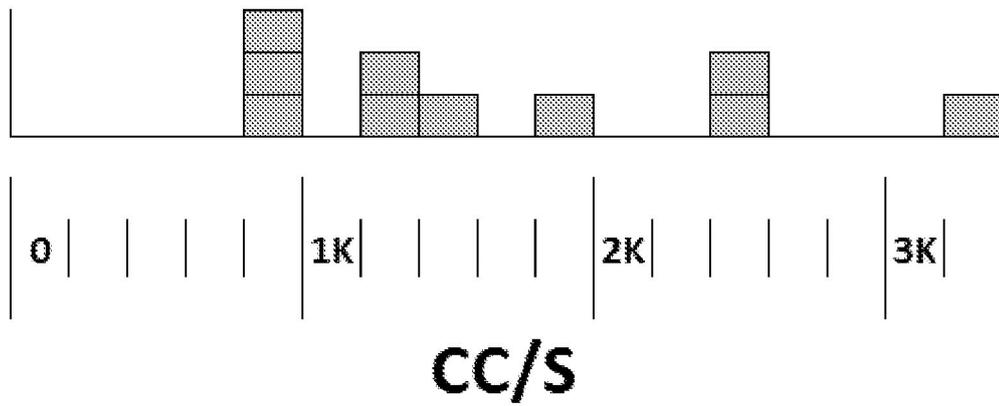
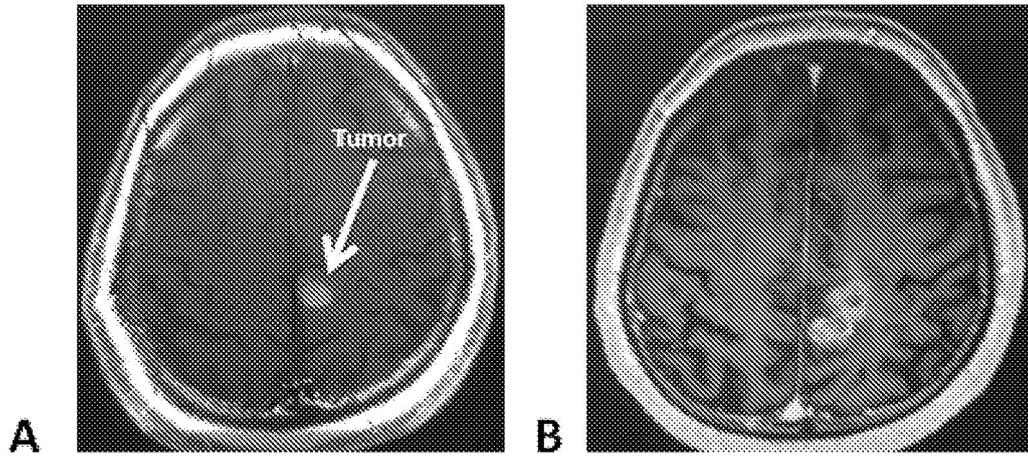


Figura 39

lesiones cerebrales



melanoma primario

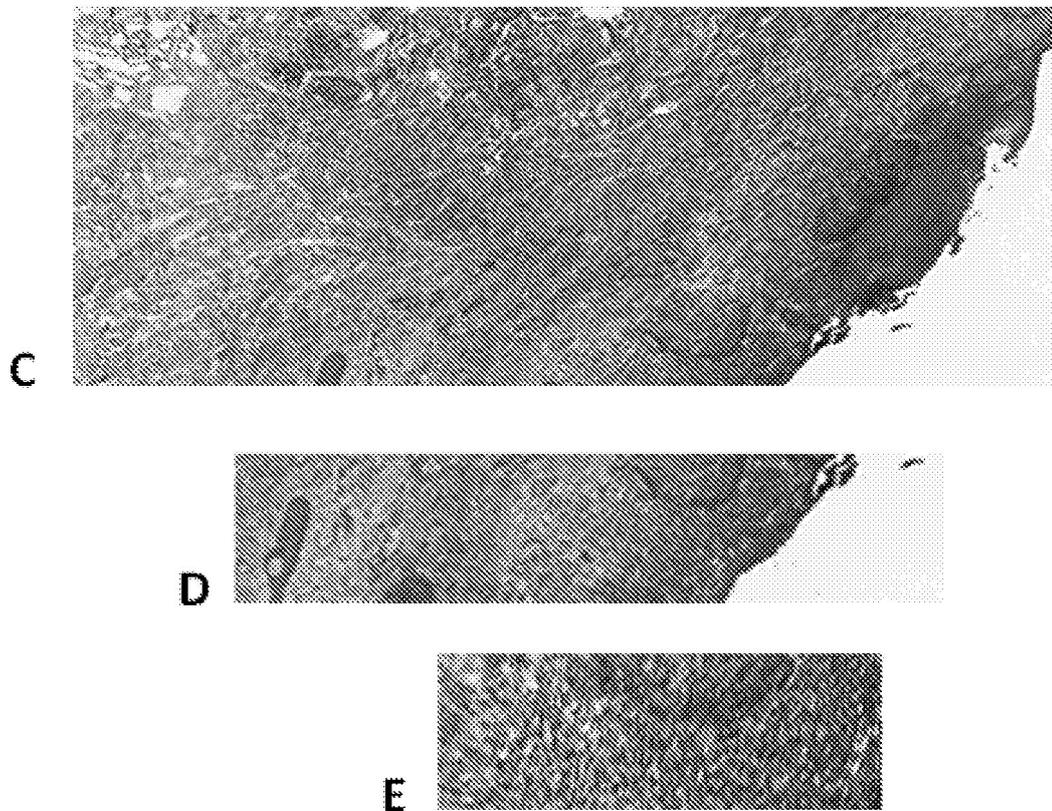


Figura 40

VÓXELES

	v101	v102	v103	v104	v105	v106	v107	v108	v109	v110	v111	v112	v113	v114	v115	v116	v117	v118	v119
→ 111	4389	4094	5003	4324	3680	3749	3519	2944	3579	4054	4030	4689	4531	4209	3933	3680	4554	4188	3864
→ 112	3956	4324	4301	4945	3818	4347	4003	4347	3703	4531	5152	3519	5106	3857	4186	3404	4623	4632	4577
→ 113	3910	3703	4415	4738	3841	3841	3381	3082	4253	4784	4370	5704	3887	4148	3795	4025	4163	4232	4646
→ 114	4393	4255	2714	3887	3450	2921	4416	4347	3187	4715	3979	5195	4094	5727	3975	4278	5451	4895	4370
→ 115	4508	4071	2944	4163	4554	3864	4094	4232	4554	3867	3726	3512	4577	4738	3864	3857	4439	4991	5231
→ 116	2829	3795	3703	3634	4232	3510	4830	3772	4209	3772	5864	4232	4148	4025	4807	5356	4163	4807	4163

	v99	v100	v101	v102	v103	v104	v105	v106	v107	v108	v109	v110	v111	v112	v113	v114	v115	v116	v117
→ 121	3795	4048	4186	3588	4461	4170	5244	3933	4738	4163	3979	4347	4876	4738	3087	4025	4568	5106	5750
→ 122	3128	4393	3795	5267	5428	4899	4278	4623	3588	3795	4048	3236	3864	4439	4922	3289	4830	5106	4807
→ 123	4324	4568	3197	4784	3956	4324	4761	4435	4071	3979	5404	3936	4531	4761	3496	4255	4554	4719	5920
→ 124	5683	3933	3496	4652	4117	4830	4002	4324	4738	4117	4646	4209	4853	4623	3910	4830	5198	4554	5704
→ 125	4186	5106	5474	4485	4824	4148	4025	4462	4623	5221	3841	4163	4830	4048	5382	4255	4186	4807	4531
→ 126	4324	3749	4433	5290	4370	4485	4807	4071	4663	4163	4876	4761	5534	4807	4922	5356	4922	4531	6072

	v101	v102	v103	v104	v105	v106	v107	v108	v109	v110	v111	v112	v113
→ 131	3795	5750	5637	4324	1748	4594	4830	4830	5474	5152	4945	3132	4663
→ 132	4324	3703	4415	4623	4784	3933	4830	4876	5267	5290	5474	4370	5244
→ 133	3864	4416	5474	4784	4435	4278	4715	5474	4991	5637	4899	5474	4899
→ 134	4276	4600	4761	4623	4945	4830	4232	4715	4991	5566	5658	5382	3864
→ 135	5267	4876	5428	5589	5624	7738	6210	5355	4807	5750	5474	4689	4278
→ 136	4646	5106	6187	5175	4278	4715	5129	4324	5704	5868	5290	4898	4630

	v85	v86	v87	v88	v89	v90	v91	v92	v93	v94	v95	v96	v97	v98	v99	v100	v101	v102	v103
→ 141	5359	5221	5290	4715	5244	3795	3979	5566	4255	4652	5681	5031	4830	5681	5428	5267	5497	5014	5198
→ 142	5796	5060	4784	5175	4209	4209	3178	3611	4500	4876	5888	5530	5428	5382	4577	4830	5888	6923	5842
→ 143	4347	4255	5198	3772	4462	4646	4393	4485	3496	5613	4991	3106	6095	4761	5106	5175	4462	4738	4623
→ 144	4945	4876	5267	5658	4646	4186	5106	5244	4663	4830	4899	5045	5642	4945	5355	4784	4663	4715	4163
→ 145	4309	3810	5727	5980	4646	4853	5566	3856	4485	5750	5083	5302	7084	5359	5543	4853	4054	3864	3887
→ 146	3841	4094	5911	3704	5287	3513	3175	4899	4922	4738	5290	5624	5658	4377	4899	4784	4278	5175	5152

	v85	v86	v87	v88	v89	v90	v91	v92	v93	v94	v95	v96	v97	v98	v99	v100	v101	v102	v103
→ 151	4324	4232	4001	3611	4876	4646	5267	4255	5198	4232	4439	4761	4532	4002	5315	4163	4393	4048	5566
→ 152	4830	4334	4922	5175	5727	4761	5106	4462	4600	4646	4761	4689	5543	5359	4738	6634	5336	4232	4485
→ 153	3979	4876	4545	4209	4600	4522	4738	5037	4071	5819	5244	5750	4922	5337	6900	6394	7613	4991	4784
→ 154	3910	4577	4646	4715	5037	4117	4209	4554	5796	4577	4600	4899	4784	4293	3542	4393	4646	5175	4435
→ 155	5520	4600	4462	5060	4646	4462	4922	4991	4853	4163	4922	4991	3404	4623	4163	4761	4094	3634	3542
→ 156	5727	4568	4922	5336	4482	3910	4071	4784	5083	5428	5290	4485	3510	4324	4899	4623	4439	4600	3335

Figura 41



Figura 42

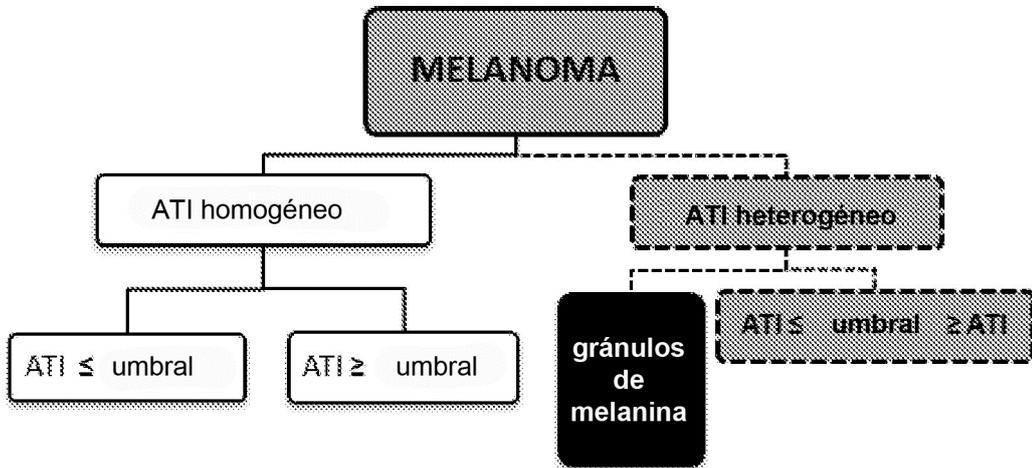


Figura 43

