

# Universidad de Huelva

Departamento de Biología Ambiental y Salud Pública



## Estudio de los perfiles metabólicos en muestras de suero para el diagnóstico del cáncer de pulmón

Memoria para optar al grado de doctora  
presentada por:

**Eva Vázquez Gandullo**

Fecha de lectura: 27 de julio de 2016

Bajo la dirección de los doctores:

Antonio Pereira Vega

José Luis Gómez Ariza

Tamara García Barrera

**Huelva, 2016**





## TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE LOS PERFILES METABOLÓMICOS EN  
MUESTRAS DE SUERO PARA EL DIAGNÓSTICO DEL  
CÁNCER DE PULMÓN

Eva Vázquez Gandullo

Huelva, Junio de 2016

## TESIS DOCTORAL



UNIVERSIDAD DE HUELVA.

Programa Oficial de Doctorado: Ciencias de la Salud – Biología Ambiental y Salud Pública.

Departamento de Ciencias de la Salud.

“ESTUDIO DE LOS PATRONES METABOLÓMICOS EN MUESTRAS DE SUERO PARA EL DIAGNÓSTICO DE CÁNCER DE PULMÓN”

Tesis presentada por Eva Vázquez Gandullo para optar al grado de Doctor por la Universidad de Huelva.

Directores:

Dr. Antonio Pereira Vega.

Prof. Dr. José Luis Gómez Ariza.

Prof. Dra. Tamara García Barrera.

Huelva, Junio de 2016

# PRESENTACIÓN

---

Dr. D. Antonio Pereira Vega, Facultativo Especialista Adjunto de Neumología y Jefe de Estudios y Presidente de la Comisión de Docencia del Hospital Juan Ramón Jiménez de Huelva.

Dr. D. José Luís Gómez Ariza, Catedrático de la Universidad de Huelva.

Dra. Dña. Tamara García Barrera, Catedrático de la Universidad de Huelva.

CERTIFICAN QUE:

El trabajo que lleva por título “Estudio de los patrones metabólicos en muestras de suero para el diagnóstico de cáncer de pulmón” ha sido realizado por la Licenciada en Medicina Dña. Eva Vázquez Gandullo, para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Huelva, bajo nuestra dirección.

Dicho trabajo reúne las condiciones necesarias de rigor científico para ser juzgado por el Tribunal correspondiente en la Universidad de Huelva.

Y para que así conste, se expide en Huelva, Junio de 2016.

Fdo. Dr. Antonio Pereira Vega.

Fdo. Dr. José Luis Gómez Ariza.

Fdo. Dra. Tamara García Barrera



*A todos los que me habéis  
apoyado en este proyecto,  
sin vosotros  
no hubiese sido posible*



# AGRADECIMIENTOS

---

Una vez finalizado este proyecto, llega el momento de expresar mi más profunda y sincera gratitud hacia todas aquellas personas que han estado presentes durante esta etapa, haciendo posible cumplir un sueño. Tras estos años de esfuerzo y dedicación, son muchos los sentimientos que me afloran y no es fácil poder resumirlos en unas breves líneas.

No hubiera podido realizar este trabajo sin la ayuda y dedicación de mis directores de tesis. Al Dr. Antonio Pereira, no sólo por ser un maestro, sino también por su apoyo permanente, por su capacidad para transmitirme su entusiasmo por la investigación y por la confianza depositada en mí. Es un ejemplo, como persona y profesional. Al Dr. José Luís Gómez Ariza y a la Dra. Tamara García Barrera, por su capacidad de trabajo y disposición. Sin vosotros este proyecto que tanto me ha ilusionado desde el inicio, no habría tenido lugar. Gracias y mil gracias.

A todo el Servicio de Neumología del Hospital Juan Ramón Jiménez, Drs. José Antonio Maldonado, Jesús Grávalos, Javier Fernández de Córdoba, Rut Ayerbe, y a todos los demás, no solo por la contribución a este proyecto, sino también por ayudarme a crecer como neumóloga, y como persona. Igualmente, especial mención para los doctores Francisco Gil, José Manuel Bravo, Michael Alwakil, Antonio José Ruiz y Ricardo Aguilar, para siempre mis “resis” y que tantos momentos buenos he vivido con ellos, y estoy segura que seguiré viviendo. Sin todos vosotros nada de esto habría sido posible. Espero que siempre estéis en mi camino.

También me gustaría agradecer al resto de los integrantes del estudio, a los que han participado en un momento dado, y a los que continúan en la actualidad: Rocío Castilla,

Raúl González, Macarena González, y más tarde Belén Callejón, por ser tan pacientes conmigo y hacer más fácil el complicado mundo de la metabolómica. Al Dr. José Luís Sánchez con su forma de hacer que las cosas complicadas parezcan más sencillas. Al personal de enfermería de la Unidad de Endoscopia Respiratoria y Hospital de Día del Hospital Juan Ramón Jiménez y al Servicio de Laboratorio, especialmente al Dr. Ignacio Vázquez Rico.

Al Servicio de Neumología del Hospital Punta de Europa, que me han acompañado en este último tramo del trabajo, y han contribuido más de lo que piensan. A los doctores Antonio García Hidalgo, Inma Ugarte, Marta Arzola, Rocío Jimeno y Ana Badillo, gracias por vuestro apoyo.

Y a la parte más importante de mi vida, los que me habéis hecho ser quien soy, por quererme tanto y estar siempre a mi lado, a mis padres, ejemplo de superación y capacidad de dar sin pedir nada a cambio. Me faltan vidas para agradecer todo lo que me habéis dado. A mi hermano Hilario, la persona más buena que conozco, y mi hermana Noemí, gracias por tu alegría, haces que todo sea muy fácil. A mis sobrinitos Ariadna, Candela y Thiago, sois el motor. Por vuestro apoyo incondicional y vuestra fuerza. Al resto de mi familia por su apoyo y confianza y a mis amigos, que tanto me han apoyado.

Por supuesto, a todos los pacientes, a los que han contribuido en este proyecto y a también a aquellos que no han participado. Este trabajo se ha hecho por y para vosotros. No merecéis menos.

# AYUDAS AL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

---

Esta tesis se ha realizado con los datos procedentes del proyecto de investigación financiado por SEPAR y Neumosur:

- **Beca Neumosur 2012. Detección de diferencias en el patrón metabólico de pacientes con/sin cáncer de pulmón en sangre, orina y lavado broncoalveolar.**

Investigador principal: Antonio Pereira Vega. Convocatoria autonómica (Andalucía y Extremadura). C.C.A.A. Dedicación compartida. Código 8/2012.

- **Beca SEPAR 2012. Potenciales biomarcadores en muestras biológicas (sangre, orina y lavado broncoalveolar) para el diagnóstico "precoz" de cáncer de pulmón haciendo uso de herramientas metabólicas.**

Investigador principal: Antonio Pereira Vega. Convocatoria nacional. Código 124/2012.



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

---

<b>PRESENTACIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>7</b>
<b>AYUDAS AL GRUPO DE INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>9</b>
<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b> .....	<b>11</b>
<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>14</b>
<b>PALABRAS CLAVES</b> .....	<b>16</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>17</b>
<b>1. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>23</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>26</b>
<b>2.1. EL CÁNCER DE PULMÓN</b> .....	<b>27</b>
2.1.1. EPIDEMIOLOGÍA.....	27
2.1.2. FACTORES DE RIESGO .....	30
2.1.3. MÉTODOS DE CRIBADO ACTUALES.....	39
2.1.4. BIOMARCADORES EN EL CÁNCER DE PULMÓN.....	46
<b>2.2. APLICACIÓN DE LA METABOLÓMICA AL ESTUDIO DEL CÁNCER DE PULMÓN.</b> 53	
2.2.1. INTRODUCCIÓN A LA METABOLÓMICA.....	53
2.2.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS EN METABOLÓMICA Y MUESTRAS OBJETO DE ESTUDIO. ....	56
2.2.3. ANTECEDENTES.....	63
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>76</b>
GENERAL.....	77
ESPECÍFICOS.....	77
<b>4. METODOLOGÍA Y POBLACIÓN</b> .....	<b>81</b>
<b>4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO</b> .....	<b>82</b>
<b>4.2. POBLACIÓN ESTUDIADA</b> .....	<b>83</b>
<b>4.3. SELECCIÓN DE PACIENTES</b> .....	<b>83</b>
4.3.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN .....	84
4.3.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN .....	84
<b>4.4. METODOLOGÍA DEL ESTUDIO</b> .....	<b>85</b>
4.4.1. DISOLVENTES Y MUESTRAS .....	86
4.4.2. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SUERO .....	87
4.4.3. INSTRUMENTACIÓN .....	87
4.4.4. MEDICIÓN DEL GRADO DE HEMÓLISIS .....	89

4.4.5. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA CARGA TABÁQUICA EN LOS PERFILES METABOLÓMICOS DE PACIENTES CON CP Y CS .....	90
<b>4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>90</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>94</b>
<b>5.1. PERFILES METABOLÓMICO EN MUESTRAS DE SUERO.....</b>	<b>96</b>
5.1.1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS .....	96
5.1.2. PERFILES METABOLÓMICOS EN MUESTRAS DE SUERO .....	97
5.1.3. NORMALIZACIÓN Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIANTE. CLASIFICACIÓN ESTADÍSTICA DE CASOS Y CONTROLES.....	99
5.1.4. IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS CAUSANTES DE LA DIFERENCIACIÓN.....	99
5.1.5. PATRONES METABOLÓMICOS EN DIFERENTES TIPOS HISTOLÓGICOS DE CP .....	103
<b>5.2. INFLUENCIA DE LA HEMÓLISIS EN LOS PERFILES METABOLÓMICOS DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN .....</b>	<b>104</b>
5.2.1. VALORACIÓN GLOBAL DE LA INFLUENCIA DE LA HEMÓLISIS EN LOS PATRONES METABOLÓMICOS .....	109
<b>5.3. PERFILES METABOLÓMICOS EN MUESTRAS DE SUERO NO HEMOLIZADAS ..</b>	<b>110</b>
5.3.1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS .....	110
5.3.1.1. <i>Tipos histológicos de cáncer de pulmón en la población estudiada .....</i>	<i>112</i>
5.3.1.2. <i>Estadios de cáncer de pulmón en la población estudiada .....</i>	<i>113</i>
5.3.1.3. <i>Antecedentes neoplásicos previos en la población estudiada .....</i>	<i>113</i>
5.3.1.4. <i>Hábito tabáquico en la población estudiada .....</i>	<i>114</i>
5.3.2. PERFILES METABOLÓMICOS EN MUESTRAS DE SUERO SIN HEMÓLISIS .....	114
5.3.3. DISCUSIÓN SOBRE ALTERACIÓN DE RUTAS METABÓLICAS CAUSADAS POR EL CÁNCER DE PULMÓN.....	127
<b>5.4. INFLUENCIA DE LA CARGA TABÁQUICA EN LOS PERFILES METABOLÓMICOS DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN Y CONTROLES SANOS.....</b>	<b>133</b>
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>141</b>
<b>6.1. REPERCUSIÓN DE LA HEMÓLISIS EN EL ESTUDIO METABOLÓMICO EN MUESTRAS DE SUERO DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN .....</b>	<b>141</b>
6.1.1. TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA.....	142
6.1.2. TIPO DE MUESTRA UTILIZADA PARA EL ESTUDIO: SUERO O PLASMA .....	143
6.1.3. IDONEIDAD DE LOS TUBOS DE RECOGIDA .....	143
6.1.4. TIEMPO DE PERMANENCIA DE LAS MUESTRAS A TEMPERATURA AMBIENTE ANTES DE SU CONGELACIÓN.....	145
6.1.5. TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS .....	146
6.1.6. NÚMERO DE CICLOS CONGELACIÓN/DESCONGELACIÓN .....	146
<b>6.2. PERFILES METABOLÓMICOS EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN Y SUJETOS SANOS EN MUESTRAS SIN HEMÓLISIS.....</b>	<b>147</b>
6.2.1. PATRONES METABOLÓMICOS .....	147
6.2.2. PATRONES METABOLÓMICOS EN DIFERENTES TIPOS HISTOLÓGICOS .....	154
<b>6.3. INFLUENCIA DE LA CARGA TABÁQUICA EN LOS PERFILES METABOLÓMICOS DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN .....</b>	<b>155</b>

6.3.1. INFLUENCIA DE LA CARGA TABÁQUICA EN LOS PERFILES METABOLÓMICOS EN DIFERENTES MUESTRAS BIOLÓGICAS. ESTADO DE LA CUESTIÓN.....	156
6.3.2. RELEVANCIA DE ESTOS HALLAZGOS EN EL CAMPO DE LA METABOLÓMICA EN EL CÁNCER DE PULMÓN .....	160
<b>6.4. PERSPECTIVAS DE FUTURO Y NUEVAS LINEAS DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>161</b>
6.4.1. PATOLOGÍAS A NIVEL RESPIRATORIO RELACIONADAS CON CP. ....	161
6.4.2. PERSPECTIVAS DE FUTURO Y NUEVAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN ABIERTAS .....	164
<b>DISCUSIÓN SOBRE METODOLOGÍA.....</b>	<b>167</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>170</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>1704</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>193</b>
ANEXO-1. HOJA INFORMATIVA DE PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO: ESTUDIO DE LOS PATRONES METABOLÓMICOS EN MUESTRAS DE SANGRE DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN Y SIN CÁNCER DE PULMÓN .....	194
ANEXO-2. CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	196
ANEXO-3. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS. ....	197
ANEXO-4. COMUNICACIONES A CONGRESOS INTERNACIONALES. ....	198
ANEXO-5. COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES. ....	201
<i>A. Comunicaciones a congresos Regionales .....</i>	<i>201</i>
<i>B. Comunicaciones a congresos Nacionales. ....</i>	<i>206</i>
ANEXO-6. PUBLICACIONES EN REVISTAS. ....	210
<b>ADEMUM .....</b>	<b>212</b>

# ÍNDICE DE ABREVIATURAS

---

5-FU: 5-fluoracilo

AFB: *Autofluorescence bronchoscopy*

AUC: área bajo la curva ROC

BAL: Lavado Broncoalveolar

BM: Biomarcadores

CAR: Carnitina

CE: Control Enfermo

CEA: Antígeno Carcinoembrionario

CP: Cáncer de Pulmón

CPCP: Cáncer de Pulmón de Células Pequeñas

CPNCP: Cáncer de Pulmón no Células Pequeñas

CS: Control Sano

CT: Carga Tabáquica

DCS: *Differential Scanning Calorimetry*

DI-ESI-QqQ-TOF-MS: infusión directa a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo tiempo de vuelo con fuente de electropray.

DIMS: *Direct-infusion mass spectrometry*

DM: Diabetes Mellitus

DPD: Dihidropirimidina deshidrogenasa

EBUS: *Endobronquial Ultrasonography*

EC: Electroforesis capilar

ECS: Sistema de endocitoscopia

FDA: *Food and Droug Administration*

GCCB: Grupo Cooperativo de Carcinoma Broncogénico

GC-MS: cromatografía de gases con detector de masas

GOLD: Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease

GWAS: *Genome-wide Association Study*

HIF-1: Factor de hipoxia inducible

HLM: *Human Metabolome Library*

HMB: *High-magnification bronchovideoscopy*

HMDB: *Human Metabolome DataBase*

H-MNR: *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*

hnRNP: *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*

HPLC: *High Purity Liquid Chromatography*

HRMAS: Resonancia magnética espectroscópica de alta resolución

HTA: Hipertensión arterial

IDH1: Isocitrato Deshidrogenasa 1

IH: Índice Hemolítico

LC-MS: cromatografía líquida con detector de masas

LCP: Lisofosfatidilcolina

LDCT: *Low Dose Computed Tomography* (tomografía computarizada a bajas dosis)

LPL: Lisofosfolípido

LRS: *Laser Raman Spectroscopy*

LunX: *lung-specific X protein*

MT: Metabolitos

NBI: *Narrow-band imaging*

NLST: *National Lung Screening Trial*

NNAL: 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl) - 1-butanol

NNK: 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone

NNN: N'-nitrososornicotine

NNO: Nicotine-N-oxide

NPS: Nódulo pulmonar solitario

NSE: *Neuro-specific enolase*

OCT: *Optical Coherence Tomography*

PAH: *Polycyclic aromatic Hydrocarbon phenanthrene*

PC: Fosfocolina

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PET: Tomografía por emisión de positrones

PheT: r-1,t-2,3,c-4-tetrahydroxy-1,2,3,4-tetrahydrophenanthrene

PL: Fosfolípidos

QqTOF: Espectrometría de masa de alta resolución de cuádruplo tiempo de vuelo

QT: Quimioterapia

RMN: resonancia magnética nuclear

ROC: Receiver Operating Characteristic

ROMs: Metabolitos Reactivos del Oxígeno

RP-HPLC: cromatografía líquida de alta resolución utilizando diferentes mecanismos de separación como la fase reversa.

RPLP: Cromatografía líquida de fase inversa de alta resolución

RT: Radioterapia

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa Retrotranscriptasa

RX: radiografía de tórax

SEPAR: Sociedad Española de Patología del Aparato Respiratorio

SMBD: *Serum Metabolome DataBase*

TAG: Triglicéridos

TBDR: Tomografía computarizada a bajas dosis de radiación

TC: Tomografía axial computarizada

UPLC-MS: Cromatografía líquida de alta resolución-Espectrometría de masa

UPLCO/Q-TOFMS: *Ultra performance liquid Chromatography Coupled/Quadrupole Time-of-flight*

UPLCO: *Ultra performance liquid Chromatography*

VOCs: Compuestos orgánicos volátiles

WLB: *White-light bronchoscopy*

# PALABRAS CLAVES

---

- Cáncer de pulmón;
- Metabolómica;
- Biomarcadores;
- Espectrometría de masas; suero.

# RESUMEN

---

El cáncer es una de las enfermedades de mayor relevancia en el mundo por su incidencia, prevalencia y mortalidad. De todos los tipos de tumores, el cáncer de pulmón (CP) representa el 15-20% de todas las neoplasias, por lo que se ha convertido en un problema sanitario de gran magnitud. Es una de las 10 causas más comunes de muerte por neoplasia en nuestro medio (1), siendo la primera causa de muerte por tumores en hombres y la tercera en mujeres (2). El número de casos de cáncer de pulmón y muertes relacionadas con él han ido aumentando de forma proporcional, debido principalmente al incremento de las tasas de tabaquismo, ya que según datos aportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el consumo de tabaco es el factor de riesgo que por sí solo provoca un mayor número de casos. Desafortunadamente, un 75% de los pacientes con este tipo de patología son diagnosticados en un estadio avanzado por la ausencia de síntomas en el inicio de la enfermedad, lo que ensombrece el pronóstico en gran medida (3), mientras que en aquellos en los que se alcanza el diagnóstico en estadios iniciales, el pronóstico mejora de forma sustancial. Por tanto, la prevención basada en el diagnóstico precoz y disminución de los factores de riesgo que predispongan al CP son a día de hoy la estrategia más útil para reducir la mortalidad por esta patología.

En cuanto a los métodos de cribaje actuales, la publicación de la *National Lung Screening Trial* (NLST) en la que demuestra el descenso en la mortalidad en pacientes de alto riesgo para padecer cáncer de pulmón sometidos a cribado con Tomografía computarizada (TC) con dosis bajas de radiación (con una reducción del riesgo relativo del 20%) (4), ha abierto una importante vía para el diagnóstico precoz de esta enfermedad.

En la actualidad se están diseñando diversos protocolos enfocados a valorar los diferentes factores que intervienen en el uso de esta técnica de forma rutinaria (5), (6).

Una alternativa al uso de técnicas de imagen, es el estudio de los cambios metabólicos que se producen en el organismo con la aparición de procesos oncológicos. Ello conduce a la identificación de biomarcadores útiles en la detección precoz de determinados procesos, e incluso el seguimiento posterior tras inicio de una terapia dirigida. No obstante, los resultados obtenidos hasta la fecha no son concluyentes y, por tanto, no permiten de forma segura la detección precoz del CP (7).

En el presente estudio, se ha optimizado y aplicado un procedimiento metabolómico basado en la infusión directa de extractos obtenidos a partir de la muestra en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo tiempo de vuelo con fuente de electrospray (DI-ESI-QqQ-TOF-MS). El procedimiento se basa en el análisis de muestras de suero sanguíneo de pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón y sujetos sanos (CS), con objeto de clasificar en base a sus patrones metabolómicos los dos grupos de estudio. En un segundo paso, se determinan los metabolitos causantes de esta discriminación, que pueden usarse como posibles biomarcadores en el cáncer de pulmón. Para ello se ha realizado un estudio observacional prospectivo, con la inclusión de 60 muestras de suero (30 de pacientes con CP y 30 de sujetos sanos) basado en las técnicas metabolómicas descritas previamente y posterior análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), con el fin de clasificar los grupos a estudio y encontrar las variables (metabolitos) que determinen dicha clasificación.

En los resultados obtenidos inicialmente se detectaron sesgos provocados por el alto índice de hemólisis de algunas muestras, el cual actúa como factor perturbador de

los resultados, reduciéndose la capacidad de discriminación entre grupos con el aumento de las concentraciones de hemoglobina.

Por ello se ha realizado un nuevo análisis con muestras con índice hemolítico inferior a 20 g/dl, incluyendo en este estudio 15 muestras en el grupo de CP, 16 en CS, y 15 de pacientes con enfermedades respiratorias diferentes a cáncer. Los resultados obtenidos mostraron una clara diferenciación entre los tres grupos a estudio, consiguiendo también la identificación de los siguientes metabolitos: con niveles sobreexpresados en muestras de pacientes con CP con respecto a CS, los fosfolípidos, componentes fundamentales de las membranas celulares; la glutamina y treonina, implicados en el metabolismo energético celular; y con niveles disminuidos, L-ornitina y urea, ambos con papel fundamental en el Ciclo de la Urea; lisofosfolípidos, implicados en un número creciente de trastornos tales como la inflamación, enfermedades autoinmunes, dolor neuropático, la aterosclerosis, el cáncer y la obesidad (8); y por último los triacilglicéridos, macromoléculas lipídicas encargadas del almacenamiento de los ácidos grasos para su posterior utilización como fuente de energía mediante una serie de reacciones conocidas como  $\beta$ -oxidación. Todos estos metabolitos han sido relacionados con vías metabólicas conocidas en la patología del cáncer.

Por otro lado, se ha realizado un estudio para valorar la influencia de la carga tabáquica en los perfiles metabólicos de pacientes con cáncer de pulmón, en comparación con sujetos sanos. Se han detectado diferencias en los metabolitos presentes en los dos grupos, acentuándose en pacientes con una carga tabáquica elevada, lo que sugiere la influencia de este parámetro en la aparición de los procesos metabólicos relacionados con el CP.

Estos resultados confirman la validez de técnicas metabolómicas de alta resolución para la detección de metabolitos relacionados con el cáncer de pulmón, los cuales pueden ser potenciales biomarcadores para el diagnóstico precoz de esta enfermedad.

# 1 JUSTIFICACIÓN





# 1. JUSTIFICACIÓN

---

El cáncer de pulmón es una de las 10 causas más comunes de muerte por neoplasia en nuestra sociedad (1), siendo la primera causa de muerte por tumores en hombres y la tercera en mujeres (2). Este hecho ligado al aumento de su incidencia y mortalidad en los últimos años (9), acentúan la magnitud de esta patología. Una de las principales causas de la alta mortalidad atribuida a esta enfermedad es su diagnóstico en estadios avanzados, lo que limita las opciones quirúrgicas, ofreciendo sólo como alternativa la quimioterapia y/o radioterapia con una menor supervivencia a medio-corto plazo.

Para minimizar el impacto del cáncer de pulmón y mejorar la supervivencia, es importante la detección de aquellos factores de riesgo que contribuyan a su desarrollo, principalmente el tabaco (10), así como el desarrollo de estrategias dirigidas a un diagnóstico precoz de la enfermedad. En este sentido el estudio mediante técnicas de imagen con TC a bajas dosis (4) o el desarrollo de técnicas endoscópicas (11), son vías con resultados prometedores. También se ha aplicado este enfoque a la detección de biomarcadores en cáncer de pulmón, con escasa sensibilidad y especificidad de todos los encontrados hasta el momento (12),(13).

Por tanto, el desarrollo de nuevos procedimientos para la detección precoz de esta patología haciendo uso de las nuevas herramientas analíticas que las metodologías ómicas nos ofrecen para ello, es de gran interés. En este sentido la metabolómica constituye un buen recurso ya que, a diferencia de otras ómicas más establecidas, como la genómica o la proteómica, representa el nivel de la cascada funcional que mejor refleja el estado fisiológico, siendo no sólo el más sensible a cualquier cambio, sea interno o externo, sino que constituye la expresión última de éstos, en tanto que los metabolitos

son los auténticos agentes activos reguladores de la homeostasis. En el presente trabajo se ha optimizado y aplicado un estudio metabólico en muestras de suero de pacientes con cáncer de pulmón y sujetos sanos con el fin de identificar aquellos metabolitos diferenciadores entre ambos grupos, e identificar posibles biomarcadores precoces de esta enfermedad.

# 2 INTRODUCCIÓN



## 2. INTRODUCCIÓN

---

<b>2.1. EL CÁNCER DE PULMÓN .....</b>	<b>27</b>
2.1.1. EPIDEMIOLOGÍA.....	27
2.1.2. FACTORES DE RIESGO .....	30
2.1.3. MÉTODOS DE CRIBAJE ACTUALES. ....	39
2.1.4. BIOMARCADORES EN EL CÁNCER DE PULMÓN.....	46
<b>2.2. APLICACIÓN DE LA METABOLÓMICA AL ESTUDIO DEL CÁNCER DE PULMÓN. 53</b>	
2.2.1. INTRODUCCIÓN A LA METABOLÓMICA .....	53
2.2.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS EN METABOLÓMICA Y MUESTRAS OBJETO DE ESTUDIO. ....	56
2.2.3. ANTECEDENTES. ....	63

## 2.1. EL CÁNCER DE PULMÓN

### 2.1.1. Epidemiología

El cáncer es una de las enfermedades de mayor relevancia en el mundo por su incidencia, prevalencia y mortalidad. En el 2012 presentó una incidencia de 14,1 millones de enfermos (figura 1) y fue la causa de 8,2 millones de defunciones según la *International Agency for Research on Cancer* y la *World Health Organization* (WHO). Se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones en 2012 a 22 en las próximas dos décadas.

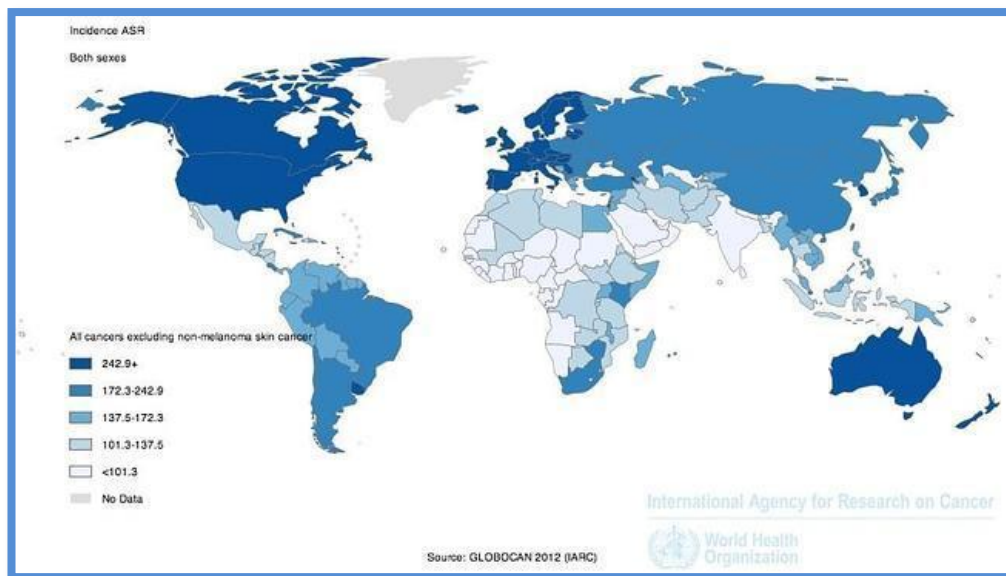
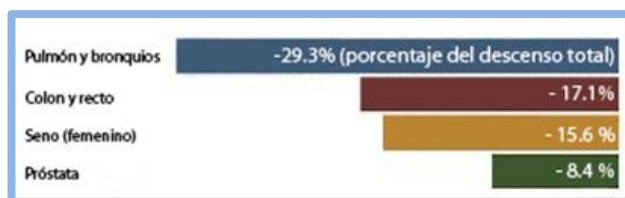


Figura 1. Mapa de incidencia mundial del cáncer.

De todos los tipos de cáncer, el cáncer de pulmón (CP) representa el 15-20% de todas las neoplasias, por lo que se ha convertido en un problema sanitario de gran magnitud. Es una de las 10 causas más comunes de muerte por neoplasia en nuestro medio (1), siendo la primera causa de muerte por tumores en hombres y la tercera en mujeres (20.755 hombres y 3.452 mujeres en 2010, según datos del INE) (2). Su incidencia global y su mortalidad han aumentado drásticamente en los últimos 30 años, así, durante el 2006, el cáncer de pulmón constituía aproximadamente el 12% de los nuevos casos de

cáncer en Europa, produciendo el 19,7% de las muertes relacionadas con éste (9). Este aumento en la incidencia, junto con el hecho de que la supervivencia a 5 años es menor del 15%, acentúa la problemática vinculada a esta enfermedad. En el año 2013, la Sociedad Americana del Cáncer informó que el número de casos diagnosticados de CP ascendió a 230.000, y el número de muertes atribuidos a esta enfermedad en torno a las 150.000 (14), con una mortalidad al año del diagnóstico cercana al 60%; un 75% a los dos años y un 94% a los 5 años. Se estima, que en ese país los gastos en sanidad atribuidos al proceso de CP ascienden a un 2% del global (15). Según una revisión reciente, el CP ocasionó a nivel mundial 1.527.000 fallecimientos en 2010 (1), lo que representa un incremento en más de un millón de muertes con respecto al registro de 2008 (16).

El número de casos de cáncer de pulmón y muertes relacionadas con él han ido aumentando de forma proporcional debido principalmente al incremento de las tasas de tabaquismo, ya que según datos aportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el tabaquismo es el factor de riesgo que por sí solo provoca un mayor número de casos. A nivel mundial causa aproximadamente un 22% de las muertes por cáncer, de las cuales el 71% están relacionadas con el cáncer de pulmón (10). Esta tendencia, parece que va en retroceso en países del mundo occidental, incluido España, de forma que se está registrando una disminución de las tasas específicas de mortalidad por CP en hombres (figura 2). En cuanto a las mujeres, la tendencia es justo a la inversa, con un aumento significativo del hábito tabáquico, sobre todo en países en vías de desarrollo (17). A pesar de esto, el CP continúa siendo la primera causa de muerte por tumores en hombres y la tercera en mujeres en España (18).



**Figura 2. Descenso en la mortalidad por diferentes tipos de cáncer, entre ellos el CP en los últimos años (19).**

En nuestro país, la proporción de CP en mujeres con respecto al total de casos está aumentando de forma rápida (20),(21). En el registro del Grupo Cooperativo de Carcinoma Broncogénico (GCCB) de SEPAR (Sociedad Española de Patología del Aparato Respiratorio), de los años 1993-1997 había un 7% de mujeres diagnosticadas de CP (22). En un estudio publicado a finales del 2013 por este mismo grupo (2), el porcentaje asciende hasta un 16,2%, atribuible principalmente al aumento en el consumo de tabaco en este sector de la población. A pesar de esto, el porcentaje de no fumadoras entre las mujeres con CP es muy elevado (46,1%), y muy superior al de los hombres (4,1%). Si se tiene en cuenta la tendencia en el consumo de tabaco en España (32,5% de fumadores entre los hombres y 22,2% entre las mujeres, según la encuesta Nacional de Salud de 2009), especialmente en lo que respecta al aumento de mujeres fumadoras, es previsible que continúe aumentando la incidencia de CP en los próximos años.

En cuanto a las estirpes histológicas en el CP, el adenocarcinoma es la variedad más frecuente en la mayoría de países y su frecuencia parece aumentar en las cohortes más jóvenes (23),(24). En España quizás en relación con la menor proporción de mujeres con CP en comparación a otros países (probablemente en relación a la incorporación más tardía al hábito tabáquico de éstas), el carcinoma epidermoide ha sido considerado hasta no hace mucho el más frecuente. Sin embargo, tras los datos aportados por Sánchez de Cos et al. (2) recientemente, existe un predominio del adenocarcinoma en el conjunto de todos los pacientes (influenciado sin duda por la creciente proporción de mujeres con

CP). En los resultados de este estudio se observa que entre los varones aún predomina el carcinoma epidermoide, pero cuando se examina el escaso grupo de no fumadores, el adenocarcinoma alcanza la mayoría, con el 51,2%.

Desafortunadamente, un 75% de los pacientes con este tipo de patología son diagnosticados en un estadio avanzado por la ausencia de síntomas en el inicio de la enfermedad, lo que ensombrece el pronóstico en gran medida (3), mientras que en aquellos en los que se alcanza el diagnóstico en estadios iniciales, el pronóstico mejora de forma sustancial. A pesar de los recientes avances terapéuticos en este campo, las tasas de supervivencia a los cinco años no alcanzan el 16%, y sólo un 5% en estadios avanzados (25). Por tanto, la prevención basada en el diagnóstico precoz y disminución de los factores de riesgo que predispongan al CP son a día de hoy la estrategia más útil para reducir la mortalidad por esta patología, por la relación directa entre tamaño del tumor y supervivencia en cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPNCP). Los datos en cuanto a cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) son más limitados, pero igualmente indican que el diagnóstico en estadios iniciales mejora el pronóstico (26).

### 2.1.2. Factores de riesgo

Los factores de riesgo asociados al cáncer de pulmón son los siguientes:

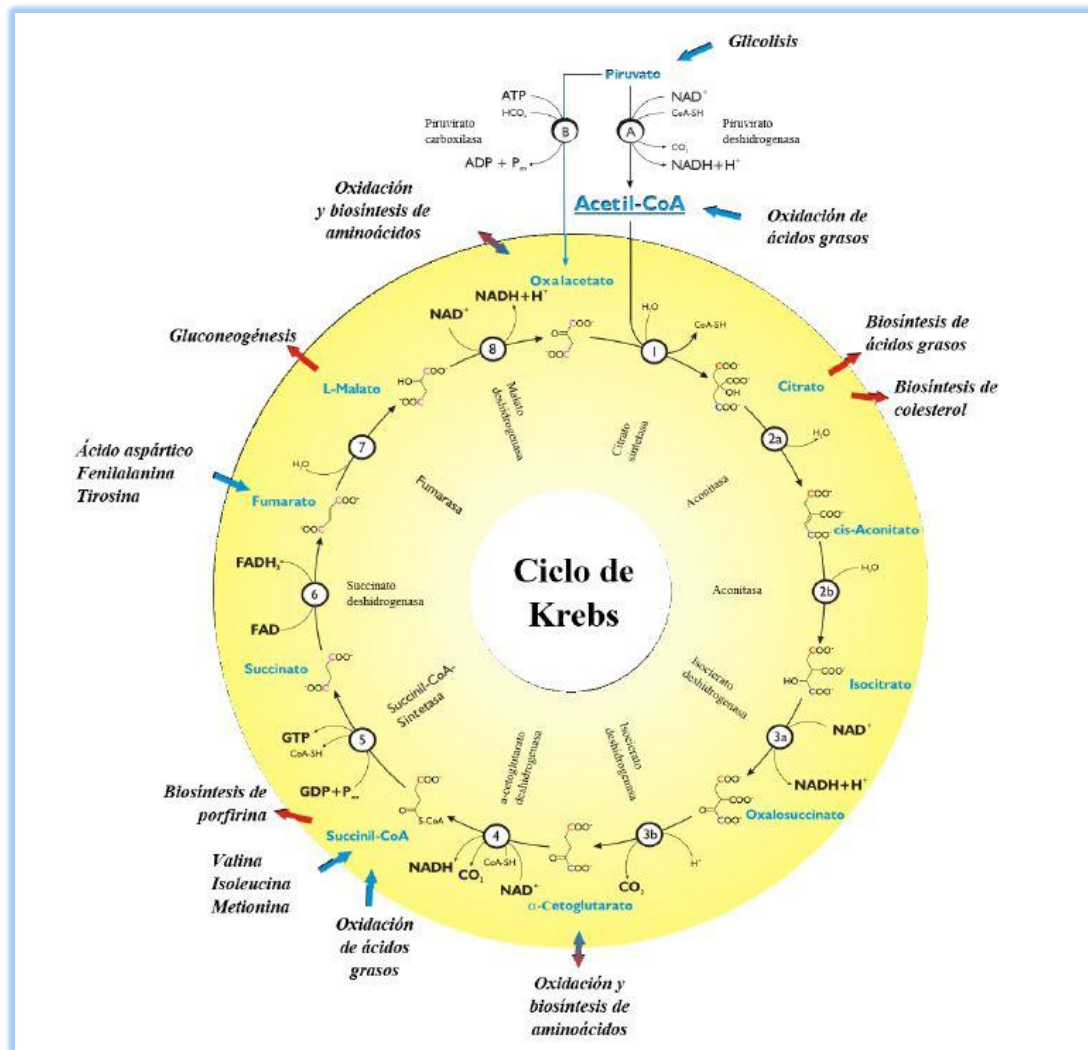
- **Factores genéticos y fisiopatológicos del cáncer.** En base al conocimiento de que todos los tumores, entre ellos el CP, son causados por anomalías en la secuencia o expresión del ADN, se han realizado múltiples estudios en este campo con el fin de anticipar el comportamiento futuro y la prevención de diferentes neoplasias. El carácter hereditario del CP ha sido claramente establecida en numerosos estudios, Czene et al. (27) estiman que se encuentra en torno al 8%. Yang et al. (28) continúan

esta línea desarrollando los llamados GWAS (*Genome-wide Association Study*), que utilizan un mapeo del genoma humano con técnicas de halotipado y genotipado. Ello permite establecer una estrecha relación entre determinadas regiones de cromosomas con el consumo de cigarrillos y la aparición de CP, y por otra parte, con la susceptibilidad genética propia de cada individuo de padecer CP. También permite relacionar la presencia de patologías respiratorias crónicas como la EPOC (Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica) con el desarrollo de CP (28).

Ya sea de forma esporádica o hereditaria, la mayoría de los tipos de cáncer derivan en última instancia de aquellas células individuales que han sido objeto de una reprogramación bioquímica irreversible. Los fenotipos adquiridos por los clones de células transformadas desarrollan unas características específicas que hacen que las vías intrínsecas encargadas del control de crecimiento celular se puedan ver alteradas o inhibidas. Para que esto ocurra, las necesidades energéticas aumentan en gran medida, acelerando la síntesis de ATP para todos los procesos relacionados con el crecimiento y la invasión por parte del tumor.

La complejidad de la respuesta del sistema se incrementa por la distribución no homogénea de las alteraciones a nivel celular en el propio tumor. Las células situadas en el centro de la masa tumoral en condiciones de anoxia presentan una conducta diferente a aquellas que están en la periferia, de forma que su comportamiento, aeróbico o anaeróbico va a depender de su ubicación. Dentro de un tumor, la población celular mixta de células hipóxicas y normóxicas intercambian metabolitos entre sí estableciendo una red de vías complementarias (29). Es muy importante el estudio detallado del ciclo de Krebs y sus componentes metabólicos y enzimáticos con

el fin de encontrar la forma de frenar los procesos de obtención de energía en el cáncer. En la figura 3 aparece representado el ciclo de Krebs y las vías metabólicas implicadas en éste, así como los sustratos necesarios para la obtención de energía.



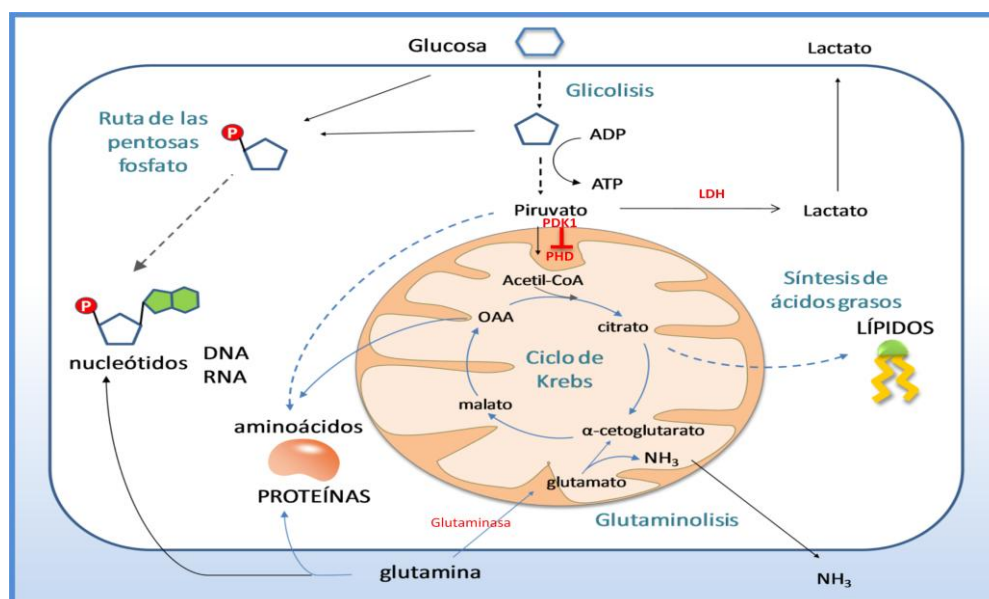
**Figura 3: Representación del ciclo de Krebs y las diferentes vías metabólicas involucradas en el mismo.**

Ya en 1942, Warburg, atendiendo a esto, se dedicó al estudio las vías energéticas asociadas a los procesos cancerosos. Debido a la elevada tasa de proliferación celular presente en el cáncer, es necesaria la activación de diferentes vías, las cuales no están activas en situaciones normales. Warburg (30) establece que las células cancerosas tienden a fermentar la glucosa a lactato a pesar de la presencia de oxígeno, es decir, no

realizan la fosforilación oxidativa mitocondrial como cabría esperar. Una de las explicaciones más probables es que las células cancerosas usan la forma menos eficiente de producción de ATP para la proliferación celular y evitan que la tasa de ATP/ADP sea alta y bloquee la producción de Acetyl CoA. Sabiendo que las dos principales fuentes de carbono y nitrógeno de las células son la glucosa y la glutamina, el llamado “Efecto Warburg” (31) establece que el 90% de la glucosa y el 60% de la glutamina fermenta a lactato en los procesos tumorales. Muchos oncogenes, entre los que se pueden citar el c-MYC y el Ras, han sido identificados como promotores de enzimas implicadas en diferentes vías metabólicas, y reguladores de la glucólisis en la fosforilación mitocondrial (32). En estas dos vías también participan inhibidores de la histona deacetilasa (HDACIs), butirato de sodio y trichostatin. En un estudio realizado en 2011, se demuestra el cambio en el metabolismo de la energía originado por la activación de los sistemas mitocondriales y el metabolismo oxidativo en células tumorales de pulmón (H460) (33).

A pesar del gran incremento de la glucólisis en muchas células cancerosas, este proceso por sí solo no es suficiente para proporcionar los precursores necesarios para el metabolismo anabólico, los cuales deben ser suministrados por procesos metabólicos adicionales. Varios de los metabolitos intermediarios del ciclo de Krebs, citrato, oxalacetato, y  $\alpha$ -cetoglutarato son precursores en la biosíntesis de ácidos grasos, ácidos nucleicos, proteínas (34), y en último lugar para los requerimientos energéticos celulares. Como algunos de estos metabolitos (por ejemplo, oxalacetato y  $\alpha$ -cetoglutarato) se mantienen en concentraciones celulares bajas, deben ser repuestos a través de las llamadas reacciones anapleróticas, lo que permite el mantenimiento constante de las reacciones que se producen en el ciclo de Krebs. Las dos principales vías anapleróticas

implican carboxilación de piruvato y glutaminólisis (35). Un aumento de la glucólisis conlleva un incremento de la formación de piruvato que será transformado en lactato por la acción de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), o introducido en el citosol mitocondrial para la síntesis de acetil-CoA por la acción de la piruvato deshidrogenasa (PDH). En ambientes hipóxicos, y con la mediación de oncogenes como el Ras o HER2, que permiten la sobre-regulación de la piruvato-deshidrogenasa-Kinasa-1 (PDK-1), se inactiva la acción de la PDH evitando de este modo la conversión de piruvato a acetil-CoA y fomentando su paso a lactato (32). Por otro lado, en la glutaminólisis, el paso de la glutamina a glutamato (sustrato para el ciclo de Krebs) por la acción de la glutaminasa juega un papel importante en el crecimiento tumoral en diferentes tipos de cáncer, favorecida también por la acción de determinados oncogenes (36). En la figura 4 aparece de forma simplificada las dos vías de mayor relevancia implicadas en la producción de energía en los procesos tumorales. Se observa de forma gráfica como la glucosa y la glutamina son transportadas a través de la membrana celular.



**Figura 4: Vía metabólica de la glucosa y glutamina en las células cancerosas.**

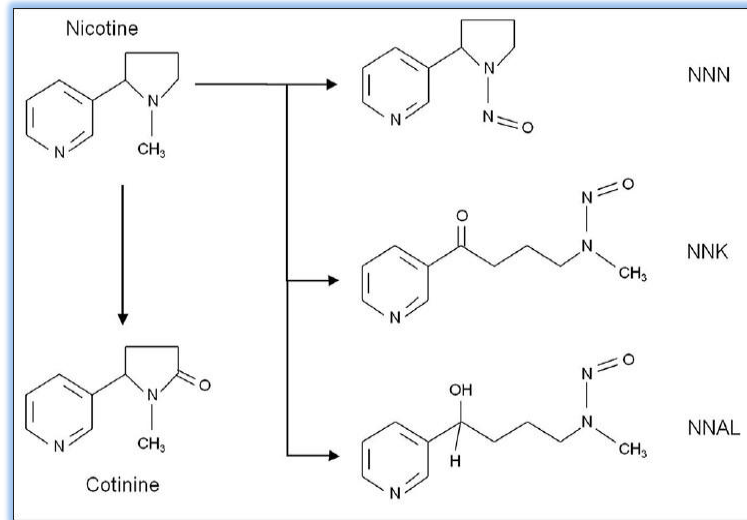
La detección de metabolitos alterados en relación con algunas de las vías implicadas en el proceso del cáncer de pulmón es lo que cabría esperar inicialmente en nuestro estudio, y en un futuro detectar cuál de ellos es útil como biomarcador precoz del CP.

■ **Factores ambientales.** Entre los factores ambientales que predisponen al desarrollo de CP cabe destacar el hábito tabáquico, al que se atribuye del 85 al 90% de todos los casos (37). Existe información ampliamente detallada en la literatura a cerca del tabaco como factor de riesgo para la aparición de CP (38), considerándose el consumo de éste como la principal causa evitable de cáncer. De los más de 7.000 compuestos en el humo del cigarrillo, al menos 60 son carcinógenos conocidos (39). Muchos aspectos del consumo de tabaco influyen en el riesgo de cáncer de pulmón: duración del hábito, intensidad, profundidad de la inhalación o tipo de tabaco consumido (40). Sabemos que la duración del hábito tiene mayor influencia que la intensidad (41); así pues, una persona que haya fumado un paquete diario durante 20 años tendrá menos riesgo de padecer CP que una persona que haya fumado medio paquete durante 40 años, habiendo fumado ambos 20 paquetes-año. Además de aumentar la predisposición a padecer diversos tipos de tumores, entre ellos el CP, varios estudios han demostrado que el tabaco disminuye la supervivencia, la calidad de vida, perjudica la cicatrización de heridas, aumenta la recurrencia y disminuye la supervivencia en pacientes con cánceres en los que existe una relación bien establecida con el tabaco (42). También se relaciona el tabaco con el diagnóstico de procesos cancerosos en estadios más avanzados y a edades más jóvenes, con una disminución en el cumplimiento terapéutico, disminución de la calidad de vida y mayor riesgo de desarrollar un segundo proceso oncológico (43),(44).

- ✓ El 80% - 90% de todos los CP se pueden relacionar con el consumo de cigarrillos.
- ✓ Sólo el 10% - 15% de los fumadores desarrollan cáncer de pulmón.
- ✓ El 10% -15% de todos los CP, se presenta entre los no fumadores (48).

Comparando fumadores y no fumadores, los primeros presentan 23 veces más probabilidades de desarrollar patología cancerígena que los no fumadores: el porcentaje de muertes atribuidas al hábito tabáquico en pacientes con CP es del 90% para varones y 80% para mujeres (45). En un estudio publicado en 2007 por Bayant y Cerfolio a cerca de las características y supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPNCP) en fumadores con respecto a no fumadores, observaron que en estadios iniciales (I y II) el pronóstico es peor en fumadores que en no fumadores (46).

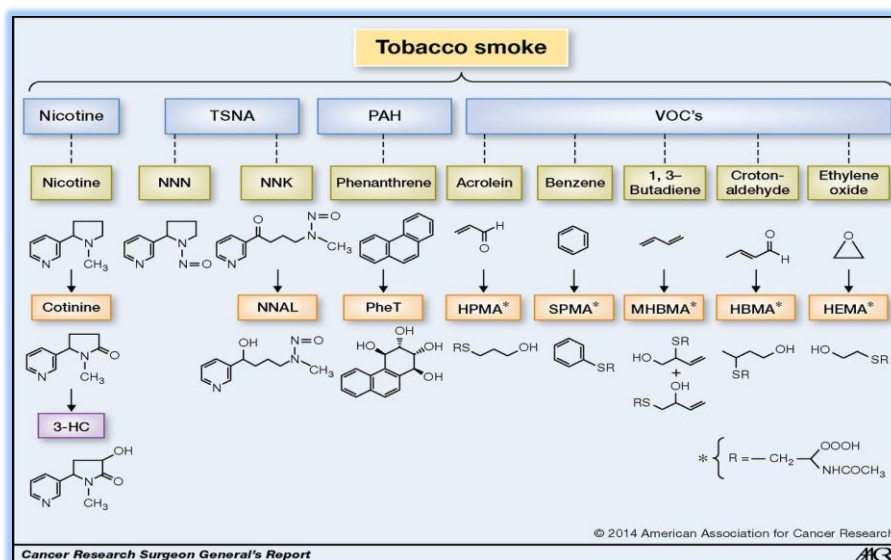
Todo lo anterior lo sustentan las bases fisiopatológicas ya conocidas y relacionadas con el tabaco. Una vez se inicia el metabolismo de la nicotina, se producen varias vías de conversión química que originan diferentes productos intermedios, algunos de los cuales presentan un importante papel en la carcinogénesis (entendiendo esta como la acumulación progresiva de alteraciones genéticas y epigenéticas que ocasionan, en consecuencia alteraciones morfológicas, pre-invasivas e incluso invasivas). En el siguiente esquema se observan metabolitos de la nicotina que se relacionan con la producción de tumores (figura 5).



**Figura 5: Nicotina y metabolitos asociados con la producción de tumores.**  
**NNAL: 4(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol, NNK: 4 - (methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, NNN: N'-nitrosonornicotine, NNO: Nicotine-N-oxide.**

Los efectos de la nicotina se producen a través de la activación de receptores nicotínicos y beta adrenérgicos (causada principalmente por el 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone –NNK-) que conducen a la activación de diferentes vías que favorecen el incremento de la de angiogénesis y producción de factores de crecimiento tumoral, migración, proliferación e invasión de células tumorales entre otros efectos. La nicotina y sus metabolitos pueden promover la progresión del tumor a través de la modulación de señales oncogénicas en los tejidos tanto cancerosos como no cancerosos (47). Un ejemplo de ello es su acción sobre la actividad del citocromo P450-isoenzima 1A1, que aumenta varias veces en el cáncer de pulmón debido al consumo de tabaco (48), e incluso se ha relacionado con el paso del *Polycyclic aromatic Hydrocarbon phenanthrene* (PAH) a metabolitos activos, lo que podría participar en la carcinogénesis directamente (49). En la actualidad se está potenciando la búsqueda de biomarcadores (BM) en diferentes muestras biológicas que puedan relacionarse con el CP en pacientes expuestos a los efectos de la nicotina, como veremos más adelante.

Además de lo anterior, el tabaco es una fuente de oxidantes exógena que conduce cuando el hábito es continuado, a una inflamación crónica de la vía aérea con acumulación y activación de leucocitos, que conllevan un aumento de los niveles de Metabolitos Reactivos del Oxígeno (ROMs) y de óxido nítrico. Un balance negativo entre los mecanismos antioxidantes encargados de la protección del tejido pulmonar (un ejemplo de ello, la sobreexpresión de la enzima superóxido dismutasa) y los ROMs puede conducir a un aumento del estrés oxidativo en el tejido pulmonar. Medir los ROMs puede resultar complicado debido a su corta vida media.



**Figura 6: Componentes del tabaco y sus metabolitos (51). HBMA, 4-hydroxybut-2-yl mercapturic acid; 3-HC, trans-3'-hydroxycotinine; HEMA, 2-hydroxyethyl mercapturic acid; HPMA, 3-hydroxypropyl mercapturic acid; MHBMA, monohydroxybutyl mercapturic acid; SPMA, S-phenyl mercapturic acid; TSNA, tobacco-specific nitrosamines; VOC, volatile organic compounds.**

En el estudio de Okur et al. (50), usando el método de quimioluminiscencia han conseguido determinar la concentración de algunos ROMs que podrían tener un papel en la carcinogénesis. Hacen referencia a que un aumento en tumores de la concentración de lucigenina conduce al incremento de radicales superóxido, aumentando la isquemia tisular. Por otro lado, el luminol, relacionado con la presencia

de inflamación, aumenta también significativamente en los tejidos cancerosos en comparación con tejido pulmonar sano. El mayor aumento de la concentración de lucigenina en comparación con luminol demuestra que la isquemia tisular podría ser más importante que la inflamación para el desarrollo de CP. En la figura 6 se representan los diferentes componentes del tabaco y sus metabolitos, considerados como posibles BM en procesos cancerosos (51). Más adelante trataremos sobre este punto de forma más detallada.

### **2.1.3. Métodos de cribado actuales.**

Con el objeto de minimizar al máximo el impacto del CP en nuestra sociedad, además de evitar todos aquellos agentes que puedan contribuir o potenciar su aparición (en particular el tabaco), se vienen realizando en los últimos cincuenta años diversos intentos de cribado de esta patología para conseguir un diagnóstico precoz, y por tanto mejorar la supervivencia. A día de hoy la única terapia potencialmente curativa en CP es la resección quirúrgica en un estadio temprano de la enfermedad, de ahí la importancia de un diagnóstico precoz. Las técnicas diagnósticas más utilizadas para el CP se comentan a continuación:

- **Técnicas de imagen.** Algunos de estos intentos se han basado en la radiografía de tórax (RX), la tomografía computarizada (TC), la endoscopia de fluorescencia y la TC en espiral de baja dosis de radiación (siglas en inglés LDCT). No fue hasta la publicación por parte del *National Lung Screening Trial* (NLST), en la que mediante el uso del TC a baja dosis de radiación como método de cribado, observaron una reducción de la mortalidad. Se comentan a continuación las técnicas de imagen utilizadas con el fin de cribado del CP:

- **Radiografía de tórax:** EL primer ensayo realizado para *screening* de CP con RX fue realizado en el Reino Unido y publicado en 1968. El estudio superaba los 25.000 pacientes. Los resultados en cuanto a reducción de mortalidad por CP no fueron significativos (7). Posteriormente el *Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial* (52), tras un estudio en el que realizan un cribado con radiografía de tórax (4 rondas anuales), y comparan con un grupo control en el que no se realiza cribado, tampoco observaron reducción de la mortalidad por cáncer de pulmón en el grupo sometido a control por RX.
- **Tomografía computarizada (TC):** En 1999 la *Early Lung Cancer Action* propuso un modelo de diagnóstico precoz basado en el cribado mediante LDCT, que generó en su momento interés y controversia por la diferencia poco clara entre el riesgo y el beneficio, aunque si hay que destacar que la sensibilidad era considerablemente mayor a la obtenida con radiografía de tórax simple (4),(53). En un estudio de seguimiento por LDCT, con más de 3.600 individuos fumadores de alto riesgo, el 2,2% fueron diagnosticados de CP primario en los 3 primeros años del estudio. Sin embargo el 40,6% de los participantes tenían un nódulo pulmonar solitario (NPS) detectado por TC o PET, sin llegar finalmente al diagnóstico de CP en todos ellos. Posteriormente, y en base a este hallazgo, el NLST hizo público un informe inicial en el que se lograba una reducción de la mortalidad del 20% con el uso de LDCT como método de *screening*. Sin embargo, en sujetos con TC positivo para nódulo pulmonar, el 96,4% constituían falsos positivos (4). Estos resultados han sido los primeros en mostrar una mayor supervivencia de los pacientes cribados con LDCT frente a la radiografía de tórax (4), (52). Partiendo de estos datos, el *American College of*

*Chest Physicians* y la Sociedad Americana de Oncología Clínica ha creado una guía de práctica clínica para el cáncer de pulmón en la que incluye la LDCT como método de cribado (tabla 1) (54). En la última revisión Cochrane publicada a cerca del cribaje del CP (55) hacen una exhaustiva recopilación de los avances en los últimos años, incluyendo nueve ensayos con un total de 453.965 sujetos, entre fumadores, no fumadores y ex fumadores. En primer lugar, se observó que no hay reducción en el diagnóstico anual de casos de CP en aquellos pacientes sometidos a estudio con radiografía de tórax (RX). Sin embargo en un cribado con RX utilizando diferentes frecuencias de equipos de rayos X, y variaciones en el número de estudios realizados, se comprobó la existencia de un aumento relativo del 11% para CP en comparación con aquellos a los que se realizaba el cribado con menor frecuencia. Se detectó así mismo una menor mortalidad por CP en la combinación de RX y citología de esputo en comparación con RX solo, pero estos resultados no alcanzaron la significación estadística. Comparando el cribado anual TC de baja dosis con una evaluación anual de la radiografía de tórax, el riesgo relativo de muerte por cáncer de pulmón se redujo significativamente en el grupo de TC de baja dosis. A pesar de estos resultados, los autores de esta extensa revisión concluyen que no existe evidencia en cuanto al uso de RX o citología de esputo para la detección del cáncer de pulmón, mientras que el uso actual de LDCT como método de cribado se asocia con una reducción de la mortalidad en pacientes fumadores. Estos datos son insuficientes para establecer a día de hoy una relación coste beneficio (56),(57), y se continúan planteando estrategias globales y fases para desarrollo de programas de cribado, propuestas por el

*American Collage of Chest Physicians/American Thoracic Society*, que incluyen la fase de planificación, implementación y mantenimiento (5). En base a este protocolo, han sido valorado los costes personales e infraestructura necesaria, aunque sin enunciar de forma clara el coste global del procedimiento (6).

**Tabla 1. Recomendaciones del *American College of Chest Physicians* y el *American Society of Clinical Oncology* sobre el papel del LDCT en el cribado del CP (54).**

Recomendación 1	Recomendación 2
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Más de dos cribados anuales con radiografía de tórax en fumadores y ex fumadores desde hace 15 años o menos.</li> <li>■ Edad entre 55 y 74 años que hayan fumado 30 paquetes-año o más.</li> </ul> <p>(grado de recomendación: 2B)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ El cribado con LDCT no debe realizarse en aquellos individuos con un consumo acumulado de tabaco de menos de 30 paquetes-año.</li> <li>■ No realizar en menores de 55 años o mayores de 74 años,</li> <li>■ No para ex fumadores de más de 15 años o individuos con comorbilidades graves que impidan un tratamiento potencialmente curativo.</li> </ul> <p>(grado de recomendación: 2C)</p>

En España, el estudio P-IELCAP (58) liderado por el equipo de la Clínica Universidad de Navarra, ha presentado los resultado del programa de cribado de cáncer de pulmón a nivel nacional con el uso de TBDR (TC a bajas dosis de radiación, en inglés LDCT). El estudio cuenta con un total de 2.989 sujetos, entre los que se detectaron 53 pacientes con CP, de ellos un 55% con diagnóstico definitivo de adenocarcinoma (más de un tercio de ellos presentaron un componente *in situ*), seguidos por un 22% de carcinoma epidermoide. El 82% se encontraban en una fase precoz de la enfermedad (estadio I y II) y el 7% en un estadio IV. A pesar de las limitaciones contempladas en este estudio (corresponde a un ensayo de cribado

monocéntrico y la adherencia en sucesivas rondas fue sólo de un 56%), los resultados obtenidos fueron comparables a los del resto de Europa.

El grupo de Ruano-Ravina (59), al igual que otros autores como Bach (54), cuestionan algunos aspectos respecto a la validez de estos métodos y su generalización a toda la población. Plantean interrogantes en torno a si el cribado del CP ha demostrado una reducción de la estadificación tras una primera ronda en aquellos casos sometidos a pruebas de imagen (RX y LDCT). En esta línea el NLST detecta un ligero aumento en los estadios IA y IB en la segunda y tercera ronda, y un ligero descenso en los estadios III y IV en la tercera ronda si se compara con la ronda inicial (4). Estos resultados son superponibles a los de otros grupos como el de Wilson (60), que no encuentran el descenso esperado en la estadificación de los pacientes que acuden a rondas de cribado consecutivas. Esta observación es compatible con la hipótesis de Bach de un modelo bipartito para el cáncer de pulmón, en el que algunos tumores pulmonares crecen rápidamente y son muy agresivos, mientras que otros crecen a un ritmo más lento (61). Por otro lado Ruano-Ravina et al. (59) así como el grupo de Brodersen (62), evalúan en sus respectivas publicaciones otros componentes diferentes a los mencionados en el proceso de cribado del CP no menos importantes, como la repercusión de los falsos positivos en los pacientes; si el cribado con LDCT aumenta el riesgo de CP por radiación; y el impacto económico. Todos y cada uno de estos planteamientos ponen de manifiesto muchas limitaciones en cuanto al cribado (un valor predictivo positivo extremadamente bajo; exposición a tratamientos innecesarios y nocivos dado el elevado número de falsos positivos que pueden causar incluso la muerte, y por supuesto, las muertes evitadas deberían contraponerse con los efectos de la radiación, más la ansiedad, las cirugías innecesarias y los costes

directos e indirectos). Como conclusión, los autores de estas revisiones no recomiendan el cribado del CP con LDCT por el escaso beneficio existente a día de hoy siendo mayor el número de perjudicados que beneficiados en la actualidad (59). Recientemente se ha publicado un estudio en el Reino Unido que evalúa la efectividad del cribado con TC a bajas dosis de radiación en una población seleccionada, así como el coste-efectividad de esta intervención. Los resultados de este trabajo ponen de manifiesto, una vez más, que es posible detectar el cáncer de pulmón en una etapa temprana, con la posibilidad de un tratamiento potencialmente curativo en más de 80% de los casos. El análisis económico sugiere que la intervención sería rentable, aunque esto debe ser confirmado con datos sobre reducción de la mortalidad (63).

■ **Técnicas endoscópicas.** A nivel macroscópico se han realizado en el ámbito de la investigación avances recientes que permiten a los broncoscopistas la evaluación de la vía aérea con técnicas de imagen de alta resolución que hacen posible, en casos determinados (sobre todo en grandes fumadores) la detección de metaplasia o displasia escamosa que puede llevar a la aparición de carcinoma *in situ* e incluso, progresar a un cáncer invasivo. La detección precoz y tratamiento de estas lesiones es de vital importancia. Algunas de las técnicas desarrolladas son las siguientes:

- EBUS (*Endobronchial Ultrasonography*): es una técnica que combina la fibrobroncoscopia tradicional con la ecografía (el broncoscopio flexible presenta un transductor ecográfico convexo en su punta), de forma que permite obtener imágenes ecográficas de las estructuras que se encuentran en contacto con la pared bronquial, especialmente ganglios linfáticos

mediastínicos, y realizar punción dirigida con la obtención de material para diagnóstico.

- ECS; *Olympus Medical System Corp*: sistema de endocitoscopia. Técnica de imagen endoscópica a tiempo real que permite el diagnóstico *in vivo* de patrones celulares con crecimiento anómalo (64).
- AFB (*Autofluorescence bronchoscopy*): aumenta la sensibilidad para la detección de lesiones pre-invasivas en la vía aérea central mediante el uso de una luz basada en autofluorescencia.
- WLB (*White-Light Bronchoscopy*): sensible para la detección de lesiones a nivel de la mucosa, aunque con menor sensibilidad que el anterior.
- OCT (*Optical Coherence Tomography*): es un método de imagen óptica que utiliza propiedades de las ondas de luz en lugar de ondas de sonido (65), poniendo de manifiesto lesiones en la mucosa bronquial que se muestran como irregularidades a nivel subepitelial.
- LRS (*Laser Raman Spectroscopy*): basada en el uso del “efecto Raman”, que consiste en captar huellas moleculares específicas que podrían aportar información bioquímica a cerca de alteraciones tisulares. Un estudio piloto reciente ha mostrado que el análisis con LRS junto con broncoscopia de autofluorescencia reduce el número de falsos positivos y aumenta la sensibilidad y especificidad (65).
- HMB (*High-Magnification Bronchovideoscopy*): sistema diseñado para mejorar la visión directa con luz blanca y detectar lesiones en la mucosa.

- **NBI** (*Narrow-Band Imaging*): tecnología óptica basada en el uso de diferentes ondas del luz entre verde y azul que permite la visualización de estructuras microvasculares a nivel de la mucosa y submucosa gracias a una absorción característica de la hemoglobina a esta longitud de onda específica.

La innovación que introducen estas técnicas unida a los cambios que se producen en un tejido por la invasión de células neoplásicas (mayor actividad metabólica e hipervascularización entre otros) hacen que el uso individual y en algunos casos combinado, de estas herramientas pueda llegar a ser de gran utilidad para el diagnóstico de lesiones pre-invasivas o invasivas en estadios tempranos de la enfermedad (11).

#### **2.1.4. Biomarcadores en el cáncer de pulmón.**

Una alternativa al uso de técnicas de imagen es el estudio de los cambios metabólicos que se producen en el organismo con la aparición de procesos oncológicos. Ello puede conducir al establecimiento de biomarcadores metabólicos que marquen la incidencia de estas patologías y de su estadiaje. La búsqueda de biomarcadores asociados a patologías en diferentes fluidos biológicos y tejidos es en la actualidad una de las líneas de trabajo de mayor interés en medicina, tanto para su uso como marcadores de cribado, como para valoración pronóstica y de eficiencia de las medidas terapéuticas.

Existen más de 2.000 fármacos aprobados para el tratamiento del cáncer por la *Food and Droug Administration* (FDA), pero no llegan a 30 los biomarcadores (BM) usados para el diagnóstico, seguimiento y pronóstico. Solo un limitado número de BM poco desarrollados que incluyen CA-125, CEA, TPA, KLKB1 y NSE entre otros (tabla 2) son considerados en estos momentos (66),(67).

Tabla 2. Biomarcadores en sangre (67).

GRUPO	NOMBRE	FRECUENCIA	ESPECIFICACIÓN	MUESTRA	REFERENCIA
Oncogén sobre expresado	Bcl-2	10-25% CPNCP	Integrante de membrana celular: inhibe apoptosis	Esputo, Tejido celular y BAL	(70)
Proteínas relacionadas con la respuesta inmune o inflamatoria	CEA	CPNCP (AdenoCA)	Proteína oncofetal	Suero	(71)
	Cyfra 21.1	23–70% CPNCP	Detección del fragmento 19 de citoqueratina	Suero	(72),(73)
	CA-125	CPNCP	Producto del gen MUC16	Suero	(74)
	Pro-GRP	47–86% CPCP	Neuropéptido con actividad hormonal	Suero	(75)
	NSE	74% CPCP	Enzima glicolítica	Suero	(76),(77)
Otros sobre expresados	KLKB1	87% en AdenoCA	Glicoproteína que interviene en la coagulación. El fragmento 17kDa es una proteína específica encontrada en CP	suero	(78)
	hnRNP A2/B1	-	Proteína de 31kDa	Esputo, tejido y BAL	(79)
	c-erbB-2	30 –40% CPNCP	Receptor EGF: diana terapéutica de inhibidores de tirosin kinasa	Tejido tumoral y suero	(80),(81)

CPNCP: Cáncer de pulmón de células no pequeñas. CPCP: Cáncer de pulmón de Células pequeñas. AdenoCA: Adenocarcinoma. BAL: Lavado broncoalveolar. CA-125: Antígeno cáncer 125. CEA: Antígeno carcinoembrionario. Cyfra 21.1: fragmento 19 de citoqueratina. hnRNP: Partícula de ribonucleoproteína heterogénea. KLKB1: calcreina plasmática. NSE: enolasa neuro específica. Pro-GRP: péptido liberador de progastrina.

Sin embargo, la sensibilidad de estos marcadores en suero no es demasiado alta: CEA (antígeno carcinoembrionario), perteneciente a la familia de las glicoproteínas de membrana celular e importante marcador tumoral en determinados tipos de tumores, que muestra expresión y funciones variables en tejido sano y tumoral (68), presenta una sensibilidad cercana al 33% en para adenocarcinoma; CYFRA 21.1 (fragmento de citoqueratina 19), citoqueratina perteneciente a una familia de proteínas del

citoesqueletico, liberado al citosol debido a la lisis celular o necrosis tumoral, presenta una sensibilidad del 72% en carcinoma epidermoide; En cuanto al NSE (Neuronal-Specific Enolase), forma neuronal de al enolasa intracitoplasmática glucolítica, presente en células del tejido cerebral, células neuroendocrinas y de tumores neuroendocrinos incluyendo el CPCP. Para éste último la sensibilidad puede alcanzar hasta el 90% (12),(13), (69).

El estudio de Bigbee et al. (15), sobre el uso conjunto de biomarcadores séricos conocidos en procesos cancerosos (Cyfra 21.1, Prolactina, Amyloide A, y otros), y la realización de LCDT, demuestra que se pueden mejorar los resultados en la detección precoz del cáncer de pulmón y la interpretación de nódulos pulmonares indeterminados detectados en las pruebas de imagen. Este estudio marca una diferencia clara con respecto a lo publicado hasta el momento ya que plantea el uso conjunto de estos dos métodos de cribado como pruebas complementarias. Sobre esta base se ha retomado la idea de información global mediante el uso de las metodologías ómicas, y en particular la metabolómica.

■ **Marcadores epigenéticos.** Las alteraciones en las vías moleculares que conducen al cáncer de pulmón, (incluyendo las modificaciones epigenéticas), pueden proporcionar biomarcadores para ayudar a abordar esta importante necesidad clínica insatisfecha. Los cambios epigenéticos, que se definen como los cambios heredables en la expresión génica que no alteran la secuencia primaria del ADN, y entre los que encontramos la metilación del ADN genómico (principalmente en los dinucleótidos CpG) o las modificaciones post translacionales de las histonas, son uno de los distintivos del cáncer y se presentan con frecuencia en todos los tipos de neoplasias. Estas modificaciones

representan una rica fuente de biomarcadores que pueden aplicarse a la práctica clínica. En este sentido se describen los últimos avances en el descubrimiento de biomarcadores epigenéticos en el cáncer de pulmón, específicamente aquellos que resultan en la metilación del ADN en dinucleótidos CpG (82). El grupo de Sozzi (83) ha realizado un estudio basado en la medición de ADN circulante mediante PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) y técnicas de imagen mediante LDCT en pacientes fumadores de más de 50 años, comprobando que los niveles de ADN circulante aumentan en aquellos pacientes con CP de mayor agresividad. Otros autores afirman que el aumento de ADN circulante no es específico del cáncer de pulmón (84).

Según Xiang et al. (85), el CP en etapas tempranas estudiado mediante DCS (*Differential Scanning Calorimetry*), puede tener características térmicas a nivel de las proteínas plasmáticas que confieren un perfil que podría ser útil como BM para su diagnóstico.

- **MicroARN exosomal.** Ratajczak et al. (86) mostraron que la transferencia horizontal de exosomas asociados a ARNm puede desempeñar un papel clave en la transducción de señales que conduce a la proliferación celular. Rabinowits et al. (87) diseñó un estudio de casos y controles con 27 pacientes en diferentes etapas con diagnóstico de adenocarcinoma de pulmón, y 9 controles sanos y evaluaron la concentración de los exosomas y microARN. La concentración media de microARN era 2,3 veces mayor en el grupo de adenocarcinoma de pulmón en comparación con el grupo de control. El estudio concluye que este podría ser un marcador útil para el diagnóstico precoz del CP. En esta misma línea, para el estudio de microARNs se han venido realizando múltiples estudios

con el fin de encontrar una herramienta diagnóstica que permita el uso del mismo en el algoritmo para la detección precoz del CP. El sistema miRview® mide la expresión del miRNA (microARNs) hsa-miR-205 usando técnicas de RT-PCR cuantitativa que permitiría el diagnóstico diferencial entre CP epidermoide y no epidermoide con una sensibilidad mayor del 96% y una especificidad del 90 al 100%. Esta técnica cuantifica la cantidad de ADN o ARN de un determinado gen, así como los miARNs, que son ARNs no codificantes de una longitud entre 21 y 25 nucleótidos que tienen la capacidad de regular la expresión de otros genes mediante diversos procesos. A su vez, también están implicados en la diferenciación tisular durante el desarrollo normal de la tumorigénesis (88),(89),(90).

- **Dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD).** Además de las funciones descritas para el microARN, Hirota et al. (91) postula que se puede ayudar a prever la respuesta a ciertas terapias establecidas en la actualidad para el cáncer de pulmón. Según este autor, la expresión del gen de la DPD se correlaciona en los tumores con una mayor sensibilidad a 5-fluoracilo (5-FU), quimioterápico usado en CP.
- **Sensor nanopore.** Es una técnica cuantitativa muy sensible para la detección y análisis de macromoléculas. La detección de microARN mediante la utilización de estas técnicas moleculares altamente sensibles, como la espectroscopia de fluorescencia y nanopartículas mostró gran potencial para el diagnóstico clínico en la detección temprana del cáncer y la vigilancia de respuesta al tratamiento (92).

- **Isocitrato Deshidrogenasa 1 (IDH1).** En un estudio publicado en 2012 se comprobó que la IDH1 está presente en niveles elevados en tejidos tumorales en comparación con tejidos normales (93). Esto sugiere que los niveles plasmáticos de esta proteína podrían ser útiles como BM diagnósticos en pacientes con CPNCP. Las hipótesis formuladas son, por un lado que IDH1 podría ser secretada extracelularmente bajo circunstancias excepcionales, o liberada en la sangre por células dañadas o muertas. En un estudio posterior se comparó la eficacia diagnóstica de esta proteína con marcadores séricos previamente estudiados (CEA, Ca-125 y CYFRA 21.1), concluyendo que el IDH1 podría ser usada como un BM plasmático para el diagnóstico de CPNCP, particularmente en adenocarcinoma con relativa alta sensibilidad y especificidad.
- **Telomerasa.** Los niveles de actividad de la telomerasa se incrementan de forma gradual desde etapas tempranas de la tumorigénesis siendo detectables incluso antes que las manifestaciones clínicas del cáncer, lo que sugiere que podría ser un BM útil para su detección precoz (94). Miyazu et al. (95), evaluó la expresión de la telomerasa en el epitelio bronquial normal en 206 individuos con alto riesgo de desarrollar CP. Se observaron 15 lesiones en 12 pacientes. De estas 15 lesiones, en 11 de ellas la expresión de la telomerasa fue negativa, y no desarrollaron cáncer, mientras que en las cuatro restantes, en las que si fue significativa la expresión, la lesión progresó a CP.

Existen otros BM séricos como el LungX (lung-specific X protein), gen específico pulmonar identificado en 2001 (96). Mitas et al. (97), observaron que el LungX mRNA

estaba sobreexpresado en 14 de 24 (58%) muestra sanguíneas de pacientes con CPNCP; CYFRA 21.1, como se ha mencionado anteriormente, es una molécula ampliamente estudiada, que se sobreexpresa según un estudio realizado por Sarwar en 1994, en el 86% de los casos de cáncer, especialmente en CP (98). Unos niveles elevados de bilirrubina cuantificada en suero por análisis de rutina parece estar asociada, según algunos autores (99), (100), con bajo riesgo de enfermedades respiratorias y cáncer de pulmón, debido principalmente a sus propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias. Posteriormente, sucesivos estudios han relacionado sus niveles en sangre con el riesgo de desarrollar CP en pacientes fumadores y no fumadores, estableciendo que con niveles bajos de este biomarcador, el riesgo de presentar CP aumenta (101). Esta idea sigue en desarrollo con resultados prometedores.

Existen estudios enfocados a la revaloración de tratamientos oncológicos realizados en los últimos años en el ámbito genético y que han aportado grandes avances en cuanto al tratamiento de los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas en estadio avanzado. Un ejemplo de ello es el uso de inhibidores de la tirosin quinasa en aquellos pacientes portadores de mutaciones del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), presente en el 10-15% de pacientes con CPNCP. Esta subpoblación de pacientes presenta características clínicas y de respuesta al tratamiento diferente a los que no presentan dichas mutaciones. De igual forma los pacientes con reordenamientos del gen de la quinasa del linfoma anaplásico (ALK), pueden recibir un tratamiento específico (102). Estos avances suponen mayor calidad de vida y supervivencia libre de progresión que con la quimioterapia convencional (103).

Aunque en general los resultados son muy alentadores no se puede afirmar la validez de ninguno de los BM mencionados para la detección precoz del CP (7).

## **2.2. APLICACIÓN DE LA METABOLÓMICA AL ESTUDIO DEL CÁNCER DE PULMÓN.**

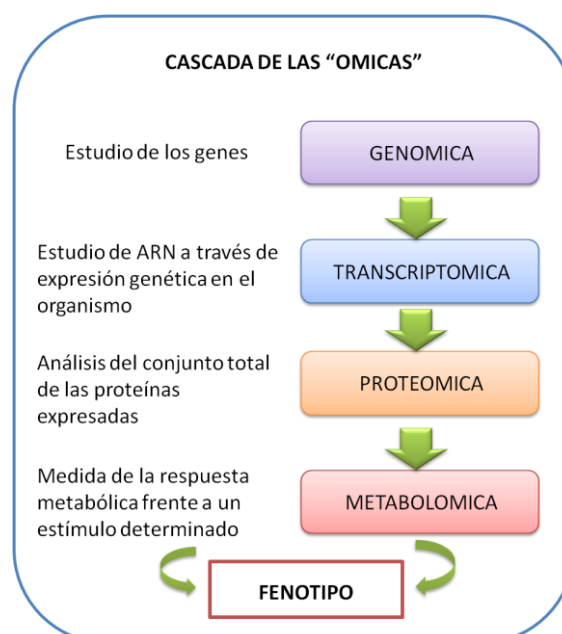
### **2.2.1. Introducción a la metabolómica**

Como un paso más en la búsqueda de un biomarcador útil para el cribado del cáncer de pulmón se han venido potenciando las llamadas *metodologías ómicas*, entre las que se encuentra la metabolómica.

Nicholson et al. (104) en 1999 definen el término de “metabonómica”, diferenciándolo de metabolómica. Entienden metabonómica como la medida cuantitativa de la respuesta metabólica dinámica multiparamétrica de los sistemas vivos a un estímulo patofisiológico o a una modificación genética, mientras que la metabolómica se define como la medida de todos los metabolitos en una muestra biológica. La figura 7 muestra la cascada de ómicas: la transcriptómica y la genómica permiten la secuenciación eficiente de genomas completos. El estudio de polimorfismos es de gran importancia en toxicología y puede explicar susceptibilidades, pero las alteraciones en los genes no siempre producen efectos adversos en la salud. Por otro lado, las modificaciones post-translacionales, como la fosforilación y glicosilación de proteínas, determinan su función y muchos factores ambientales o multigénicos (como la edad, enfermedad, etc.) no pueden explicarse con la genómica; La proteómica permite la identificación de importantes funciones de las proteínas en la homeostais celular y en su análisis cuantitativo, presentando a las proteínas como importantes biomarcadores, no obstante, es preciso conocer que existe una gran cantidad de proteínas y modificadores post-

transduccionales, haciendo que no todas pueden ser identificadas en una muestra. Finalmente, la metabolómica, permite obtener una visión representativa del sistema biológico estudiado, proporcionando la medida de cientos de metabolitos en cultivos celulares *in vitro*, en tejidos *in vivo* e incluso en muestras no invasivas como la orina o la sangre.

La metabolómica aporta tres enfoques complementarios: (I) la obtención de perfiles metabolómicos o “*metabolic profiling*”, mediante el análisis cuantitativo de un conjunto de metabolitos en una vía bioquímica concreta, lo que permite la construcción de bases de datos útiles que podrán ser integradas con otros mapas o vías ya conocidas en bases de datos globales; (II) las huellas metabolómicas o “*metabolomic fingerprinting*”, que cambian en respuesta a una enfermedad, alteraciones ambientales o genómicas, con el objetivo final de identificar metabolitos discriminantes entre individuos afectados por una enfermedad frente a controles sanos (105),(106); y (III) la exometabolómica o “*metabolite footprinting*”, que se encarga del estudio de metabolitos en fluidos extracelulares (107).



**Figura 7: Cascada de las “Ómicas”.**

Además de lo anteriormente expuesto, en metabolómica existen dos procedimientos: dirigido (*targeted*) y no dirigido (*untargeted* o global). El procedimiento dirigido se utiliza para determinar las abundancias relativas y concentraciones de metabolitos concretos, por lo que la información de la estructura exacta de estos metabolitos debe conocerse *a priori*. La principal desventaja es que este procedimiento depende de la disponibilidad del patrón puro del metabolito en cuestión y no permite la identificación de nuevos metabolitos. Por el contrario el procedimiento global no dirigido, utilizado en esta Tesis, permite el estudio de todos los metabolitos en una muestra biológica y hace posible obtener diferencias en la presencia o cantidad relativa de todos los picos cromatográficos o espectroscópicos. La desventaja de esta aproximación es que no pueden identificarse todos los metabolitos implicados (108).

El metaboloma puede usarse para la monitorización de la respuesta del organismo ante una alteración del estatus de salud (109). En base a esto, son muchos los estudios publicados sobre metabolómica en diferentes estirpes tumorales, como el carcinoma hepatocelular (110), cáncer de mama (111) o cáncer de páncreas (112) entre otros.

Los niveles de metabolitos dentro de un mismo individuo varían con el tiempo, esta variabilidad individual unido a la variabilidad metodológica reducen la eficacia a la hora de asociar patrones metabolómicos a enfermedades determinadas (113). Por otro lado, los resultados están unidos a diferencias de género, hábitos o dieta. En relación a las diferencias establecidas por el género, un estudio realizado con resonancia magnética nuclear sobre muestras de orina y plasma en sujetos sanos, demuestra que las mujeres sintetizan relativamente más lipoproteínas y lípidos insaturados que los hombres (114). En esta línea pero comparando suero de pacientes con CP y controles sanos, Guo et al.

(115) encontraron patrones metabólicos que difieren en esta enfermedad entre hombres y mujeres. Además describen la relación entre estadios de CP y metabolitos encontrados. En cuanto a las variaciones en función de la dieta, en un estudio realizado por Stella et al. (116), observaron que tras administrar dietas diferentes (dieta vegetariana, dieta con alto contenido en carne y dieta con bajo contenido en carne) a una población sana sus perfiles metabólicos variaban. De igual forma, Spitale et al. (117) y Mondul et al. (118), observaron que los perfiles metabólicos de sujetos fumadores y no fumadores se modificaban tras administrar de forma exógena determinadas sustancias. En el análisis encontraron que el grupo con aporte nutricional basado en antioxidantes, vitaminas y ácidos grasos  $\omega$ 3, presentaron cambios a nivel de ácidos grasos de cadena larga, oleato y palmítico, y que estos niveles estaban disminuidos en pacientes fumadores. Sin embargo, en aquellos que recibieron aporte de  $\beta$  - carotenos, encontraron un aumento de la acción de CYP1A2 y CYP2E1 y desregulación del metabolismo glucídico. Todo lo anterior pone de manifiesto la complejidad a la hora del estudio del metaboloma humano por su constante variabilidad, influenciado de forma directa tanto por factores internos como externos.

### **2.2.2. Técnicas analíticas en metabolómica y muestras objeto de estudio.**

#### **1) Técnicas analizadas en metabolómica.**

En los últimos 10 años se han venido realizando múltiples estudios en el campo de la metabolómica, con el desarrollo de diferentes técnicas como: la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de alta resolución; cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la de ultra resolución (UPLC) acoplada a detectores, fundamentalmente de masas (HPLC-MS), como el cuadrupolo tiempo de vuelo, y utilizando diferentes mecanismos de separación

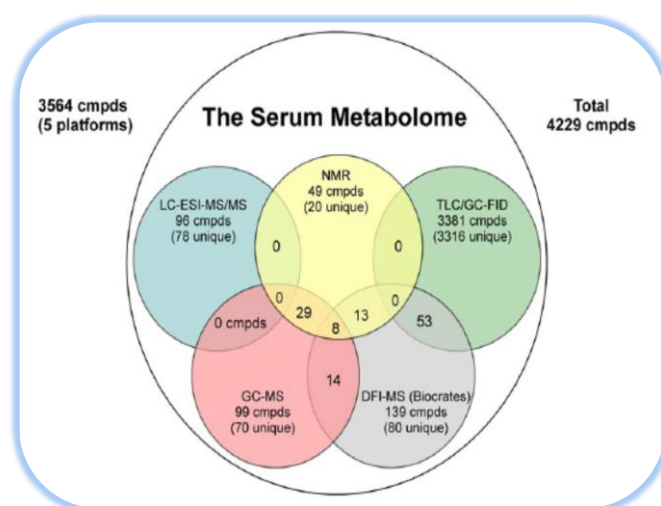
como la fase reversa (RP-HPLC); y la modalidad de MS en tándem (MS/MS) para la elucidación estructural. Asimismo, también se ha utilizado ampliamente la cromatografía de gases con detector de masas (GC-MS) (119), y la electroforesis capilar (EC) (120).

Una variante instrumental con grandes posibilidades en análisis metabolómico es el empleo de la infusión directa de la muestra (DI) a un espectrómetro de masas de alta resolución como el híbrido QqTOF (121), (122), el de transformada de Fourier (123), o más recientemente el Orbitrap (124). La DIMS presenta algunas ventajas en metabolómica como la elevada capacidad de análisis en poco tiempo y la detección de un mayor número de metabolitos que al utilizar técnicas de separación como etapa previa a la MS, ya que no existe exclusión de compuestos habitualmente asociada a estas técnicas. No obstante, la supresión iónica en DIMS generalmente representa una importante desventaja ya que impide la detección de metabolitos que se encuentran a baja concentración o que no son eficientemente ionizados en presencia de otros, sin embargo, este inconveniente se supera utilizando espectrómetros de masa de alta resolución como el Q-TOF-MS o el Orbitrap. Como ventaja evidente, la DIMS constituye una buena alternativa para el diagnóstico rápido de las muestras en pocos segundos.

El uso de estas técnicas ha variado a lo largo de los años, poniéndose de manifiesto ciertas limitaciones al utilizarse por separado para el estudio del metaboloma humano. En un estudio publicado en 2009 en el *Journal of Proteome Research*, tras el análisis mediante GC-MS como único método de análisis metabolómico, se recomienda el uso de varias técnicas para conseguir una información más genérica, dada la complejidad y variabilidad del metaboloma (125).

En la determinación de metabolitos en suero sanguíneo, Psychogios et al. (119) publicaron en 2011 "*The human serum metabolome*", que considera el uso de varias

técnicas metabolómicas, entre las mencionadas anteriormente, para determinar el espectro de metabolitos en suero. Los resultados muestran claras diferencias en el número y tipo de compuestos detectados con cada una de las técnicas, aunque la intención real del estudio estaba enfocada a explorar los límites y beneficios del uso de cada uno de los métodos existentes, y sobre todo para caracterizar el metaboloma en el suero humano. De hecho, este estudio sugiere que la caracterización exhaustiva de los metabolitos existentes en el suero requiere múltiples plataformas instrumentales y métodos que un solo sistema no puede ofrecer. En la figura 8 se observa la composición metabolómica que se obtiene en función de la técnica utilizada lo que hace aconsejable la integración de plataformas para incrementar la cobertura metabólica resultante.



**Figura 8: Diagrama que muestra la capacidad discriminante en detección de metabolitos en suero por diferentes técnicas metabolómicas: RMN, GC-MS, LC/GC-FID, LC-ESI-MS/MS y MS/MS (119).**

Este trabajo se puede considerar como uno de los primeros enfocados al estudio tanto cualitativo como cuantitativo del metaboloma humano, y sirve como base de datos (*Serum Human Metabolome Database*) para estudios futuros. Previo a éste, Lawton y su equipo compararon el perfil metabolómico en sangre de sujetos sanos mediante

espectrometría de masa, combinado GC-MS y LC-MS. El interés de este estudio radica en el amplio número muestral (269 individuos). Ante el gran número de metabolitos identificados y las diferencias encontradas en relación a la edad, el sexo y la raza, concluyen que estos factores pueden suponer importantes factores de confusión en este tipo de estudios (126).

Partiendo de los resultados expuestos en el trabajo de Psychogios, y compartiendo un enfoque análogo, en un trabajo posterior se comprueba que ninguna técnica analítica por sí sola cubre todo el espectro del metaboloma humano, siendo necesarias estrategias múltiples para ampliar la cobertura de los resultados (127). Para ello es preciso emplear técnicas como la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (MS) acopladas a técnicas de separación tales como la cromatografía de gases (GC), electroforesis capilar (EC) y cromatografía líquida (LC), herramientas con alta sensibilidad que amplían considerablemente el espectro global de metabolitos para una muestra biológica.

## **2) Muestras objeto de estudio.**

Es necesario en primer lugar, disponer de un número poblacional adecuado para reducir al máximo la influencia de las variables biológicas. Sampson et al. (113) evaluaron la viabilidad e implicaciones de la metabolómica para el estudio de diferentes patologías, concluyendo que actualmente es factible el uso de estas técnicas en estudios de biomedicina, pero sería necesario el aumento de la muestra poblacional para aumentar la sensibilidad y evitar o minimizar los sesgos por diferentes factores como la edad, el sexo, la dieta o el Índice de Masa Corporal (IMC) entre otros.

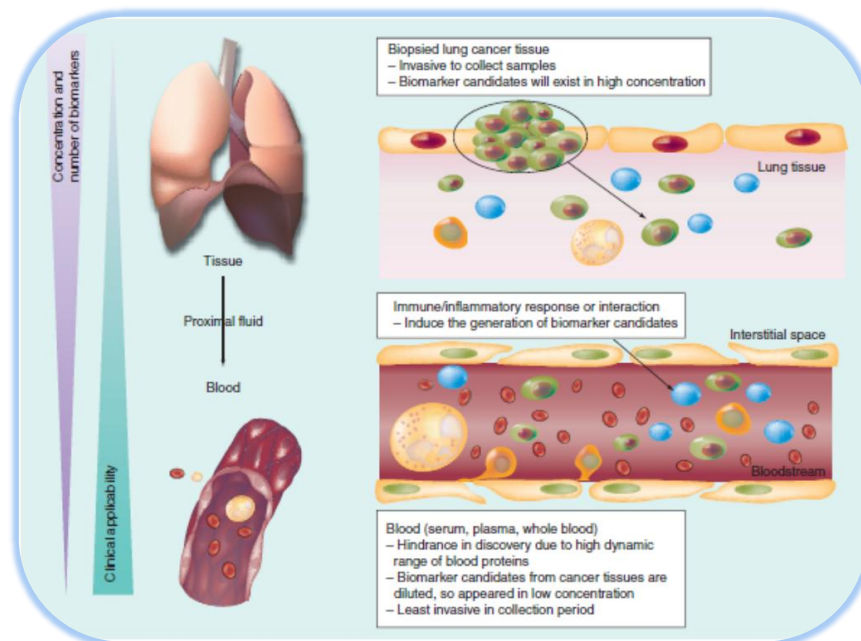
Dentro del tipo de muestra biológica elegida, existen preferencias por aquellas de fácil obtención y que no requieran de técnicas invasivas para su obtención. En este sentido se han llevado a cabo estudios metabolómicos en muestras de orina (128),(129),(130),(131),(32),(133) lavado broncoalveolar (15),(33), aire exhalado, VOCs (compuestos orgánicos volátiles) en aire exhalado (34),(35), tejido pulmonar (36) y en sangre (17),(105),(138),(139),(37),(38), tanto en plasma como en suero (25).

- La muestra biológica más ampliamente estudiada con el fin de encontrar posibles biomarcadores en CP desde 1930 ha sido el **esputo**; sin embargo, a pesar de su alta especificidad (98% aproximadamente, variando en función de la localización de la lesión: central o periférica), su baja sensibilidad indica que el esputo no es un biofluido adecuado para nuestro fin. Este hecho parece estar cambiando según resultados publicados recientemente donde, en muestras de esputo y con el uso de diferentes técnicas moleculares, detectan marcadores de hipermetilación del ADN, miARNs y proteínas relacionadas con el tumor que podrían corresponder con marcadores de cáncer de pulmón, aunque con insuficiente validez para su aplicación en la práctica clínica en la actualidad (143).

- Otra muestra biológica ampliamente estudiada hasta el momento ha sido la **sangre** (tanto a nivel de plasma como de suero). En el estudio publicado por Cho & Sung en 2009 para *Express Review Proteomics*, expresan la diferencia en el contenido y tipo de metabolitos que se espera obtener en cada tipo de muestra. En muestras sanguíneas existe un alto contenido proteico, y a la vez una baja cantidad de proteínas directamente relacionadas con el proceso canceroso (ya que éstas se concentran en su mayoría en el lecho tumoral). Esto podría dificultar el procesado y la obtención de

metabolitos. Un ejemplo de ello, en el cáncer de ovario el CA-125 (marcador sérico relacionado con éste tipo de tumor) se encuentra en mayor concentración en el líquido ascítico que en suero sanguíneo (67). Algunos de los biomarcadores encontrados en relación con CP han sido el CEA (Antígeno Carcinoembrionario), el CA.-125, el fragmento 19 de citoqueratina (CYFRA 21-1), pero en ningún caso se pueden considerar específicos de neoplasias pulmonares, ya que están presentes en otros tumores como el cáncer de ovario o colorrectal. En una publicación de 2011, Wedge et al. (142) realizaron un estudio comparando la efectividad para la obtención de metabolitos en pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas en muestras de suero con respecto a plasma, en base a la idea que expresan algunos autores de que existe mayor predisposición a la degradación de proteínas en el suero, lo que generaría un gran número de péptidos que podrían dificultar la tarea de extracción de la información necesaria. El estudio concluye que la distribución de péptidos en ambos tipos de muestras en cada sujeto es similar, con algunas diferencias en la distribución específica. Hori y su equipo (13), van un paso más allá al comparar los perfiles metabólicos obtenidos tras el análisis en muestras de suero y tejido pulmonar en paciente con cáncer de pulmón con respecto a los marcadores séricos usados con anterioridad, encontrando por ejemplo que la sensibilidad del ácido 2-hidroxiiisovalérico era mayor que el CEA para el adenocarcinoma. Igualmente Chen et al. (144) comparan la sensibilidad y especificidad de CEA y Cyfra 21.1 con los metabolitos obtenidos en su estudio sobre muestras de suero de pacientes con cáncer de pulmón y sujetos sanos, encontrando una superioridad para diagnóstico y como factor pronóstico de la esfingosina y el glicerofosfo-Naraquidonil-etanolamina, sobre los anteriores.

En muestras de **tejido pulmonar** de pacientes con CP también se han realizado determinaciones de perfiles metabolómicos (145), (137), (146). Este sería, según Cho and Sun (67) el medio ideal para la detección de los mismos, al encontrarse a este nivel mayor concentración de metabolitos (figura 9).



**Figura 9: Las muestras de tejido pulmonar representan directamente el microambiente del cáncer. Sin embargo, una biopsia pulmonar implica un procedimiento invasivo y de alto riesgo. En sangre, sin embargo, la cantidad de proteínas es alta mientras que la de biomarcadores es escasa (67).**

En cuanto al modo de procesamiento de muestras histológicas, Bronw et al. (137) han publicado un trabajo acerca de la forma de preservación correcta de las muestras tisulares de pacientes con cáncer de pulmón para la posterior determinación de metabolitos. Comprobaron que partiendo de una conservación inicial con metanol, tanto el estudio histológico como el bioquímico eran factibles. Además sugieren que en esta línea, con una cohorte mayor, se pueden determinar datos del grado y severidad de la enfermedad por los perfiles metabólicos obtenidos. También en relación al estudio de perfiles metabolómicos a nivel celular (cultivo celular), en los

últimos años se han venido desarrollando métodos para su análisis sin demasiados resultados (147).

■ El **Lavado broncoalveolar** (BAL), también se ha estudiado como posible fuente de información acerca de diferentes procesos a nivel pulmonar. Según la teoría de Cho y Sun (67), éste, junto con el tejido pulmonar serían la fuente de información más adecuada a nivel del metaboloma. Existen diferentes publicaciones acerca del uso de la metabolómica en el BAL en procesos infecciosos (neumonías asociadas a ventilación mecánica) (148), en fibrosis quística (149), Síndrome de Distrés respiratorio (150), (134) y en otros daños pulmonares agudos. Sin embargo, en relación a procesos tumorales, las reseñas bibliográficas son escasas, y en campos diferentes a la metabolómica (151).

### **2.2.3. Antecedentes.**

Como se ha comentado previamente, el metaboloma se define como el conjunto de componentes de bajo peso molecular (< 1500 Da) que intervienen en el metabolismo celular. Estos componentes se conocen como metabolitos, y son considerados el producto último del genoma y por tanto, el reflejo más fiel de los diferentes estados de los sistemas biológicos. La identificación y cuantificación de los componentes de todo el metaboloma, los llamados perfiles metabolómicos, podrían ser aplicados para definir los cambios metabólicos relacionados con el genoma y ayudar en el proceso diagnóstico de diferentes patologías, entre ellas el cáncer de pulmón, como pretendemos en nuestro estudio.

El uso de la metabolómica como herramienta de estudio en el ámbito de la salud no sólo ha sido enfocada al diagnóstico de determinadas enfermedades (entre ellas el CP),

sino también para conocer la respuesta del organismo tras una acción terapéutica (103), (152).

En el campo del diagnóstico del CP existen múltiples publicaciones, que mediante el uso de técnicas metabolómicas en diferentes muestras biológicas parecen obtener resultados esperanzadores. Entre ellas cabe destacar en primer lugar, el trabajo realizado por Hori et al. (13), que compararon los perfiles metabolómicos en suero y tejido pulmonar de 33 pacientes con CP (12 adenocarcinoma; 11 epidermoide y 10 CPCP) en diferentes estadios, con los de 29 sujetos sanos, usando para la detección de los mismos técnicas de cromatografía de gas/espectrometría de masas. Hori y col. obtiene un total de 58 metabolitos en suero y 71 en tejido, de los cuales, 23 y 48 respectivamente cambiaron de forma significativa en pacientes con CP comparado con sujetos sanos. Todos estos metabolitos fueron relacionados con rutas metabólicas conocidas en procesos neoplásicos (tabla 3).

**Tabla 3: metabolitos encontrados en pacientes con cáncer de pulmón, y según estadio precoz o avanzado (13).**

Metabolites	Lung cancer Early stage		Lung cancer Advanced stage		Lung cancer All	
	<i>p</i> value	Fold induction	<i>p</i> value	Fold induction	<i>p</i> value	Fold induction
1 lactic acid	<0.001	1.42	<0.0001	1.56	<0.0001	1.51
2 2-hydroxyisobutyric acid	0.0012	1.29	<0.0001	1.39	<0.0001	1.35
3 glycolic acid	0.846	0.98	0.471	0.94	0.506	0.95
4 L-alanine	0.225	1.13	0.794	1.07	0.320	1.08
5 L-glycine	0.645	1.08	0.013	1.40	0.052	1.29
6 glyoxylic acid	0.164	1.27	0.620	1.15	0.187	1.19
7 oxalic acid	0.254	1.18	0.755	1.02	0.595	1.07

*Estudio de los perfiles metabolómicos en muestras de suero para el diagnóstico del cáncer de pulmón*

<b>8</b>	2-hydroxybutyric acid	0.909	1.00	0.534	0.95	0.609	0.96
<b>9</b>	sarcosine	0.866	1.02	0.0001	1.24	0.0027	1.17
<b>10</b>	3-hydroxypropionic acid	0.377	1.11	0.795	1.06	0.374	1.08
<b>11</b>	pyruvic acid	0.274	1.10	0.463	1.08	0.184	1.08
<b>12</b>	3-hydroxybutyric acid	0.0038	2.41	0.104	2.09	0.0029	2.20
<b>13</b>	3-hydroxyisobutyric acid	0.165	1.24	0.375	1.18	0.103	1.20
<b>14</b>	2-hydroxyisovaleric acid	0.114	1.40	0.019	1.62	0.0091	1.47
<b>15</b>	α-amino butyric acid	0.145	1.22	0.794	1.04	0.358	1.10
<b>16</b>	malonic acid	0.069	1.27	0.014	1.22	0.0036	1.31
<b>17</b>	L-valine	0.581	1.06	0.807	1.04	0.553	1.05
<b>18</b>	urea	0.366	0.98	0.916	1.00	0.546	0.99
<b>19</b>	benzoic acid	0.012	1.21	<0.0001	1.48	<0.0001	1.39
<b>20</b>	octanoic acid	0.039	1.23	<0.0001	1.74	<0.0001	1.58
<b>21</b>	ethylmalonic acid	0.951	1.00	0.881	0.99	0.882	0.99
<b>22</b>	L-leucine	0.672	1.05	0.934	1.03	0.715	1.04
<b>23</b>	glycerol	0.092	0.74	0.208	0.79	0.031	0.77
<b>24</b>	phosphoric acid	0.068	0.86	0.106	0.87	0.013	0.87
<b>25</b>	L-isoleucine	0.024	1.28	0.071	1.25	0.0042	1.26
<b>26</b>	maleic acid	0.157	1.20	0.770	1.09	0.205	1.13
<b>27</b>	L-proline	0.0042	1.41	0.101	1.35	0.0015	1.34
<b>28</b>	succinic acid	0.081	0.88	0.595	0.94	0.134	0.92
<b>29</b>	glyceric acid	0.0025	0.57	<0.0001	0.42	<0.0001	0.47
<b>30</b>	fumaric acid	<0.0001	1.61	<0.0001	1.84	<0.0001	1.76
<b>31</b>	L-serine	0.328	0.91	0.248	0.89	0.132	0.90
<b>32</b>	L-threonine	0.248	1.16	0.052	1.27	0.040 <sup>a</sup>	1.24
<b>33</b>	decanoic acid	0.250	0.88	0.240	1.08	0.954	1.01

<b>34</b>	malic acid	0.0036	1.35	0.033	1.43	0.0002	1.40
<b>35</b>	isovalerylglycine	0.715	1.03	0.146	1.09	0.223	1.07
<b>36</b>	2-hexenedioic acid	0.975	1.01	0.0008	1.16	0.022	1.11
<b>37</b>	aspartic acid	0.0032	0.58	0.051	0.68	0.0003 <sup>a</sup>	0.65
<b>38</b>	L-methionine	0.212	1.24	0.677	1.13	0.209	1.17
<b>39</b>	5-oxoproline	0.114	0.89	0.0062	0.83	0.0019	0.85
<b>40</b>	4-hydroxyproline	0.056	1.68	0.414	1.31	0.029	1.43
<b>41</b>	7-hydroxyoctanoic acid	0.372	1.07	0.471	0.98	0.946	1.01
<b>42</b>	2-propyl-glutaric acid	0.097	1.09	0.024	1.16	0.018	1.13
<b>43</b>	L-glutamic acid	0.371	0.83	0.031	0.67	0.026	0.72
<b>44</b>	L-phenylalanine	0.704	1.06	0.085	0.86	0.366	0.93
<b>45</b>	lauric acid	0.0089	0.64	0.507	0.83	0.035	0.77
<b>46</b>	aconitic acid	0.082	1.49	0.471	1.02	0.327	1.17
<b>47</b>	isocitric acid	0.369	1.02	0.458	0.97	0.903	1.02
<b>48</b>	citric acid	0.481	1.09	0.437	0.97	0.976	1.01
<b>49</b>	glucuronic lactone	0.412	1.09	0.835	1.05	0.511	1.06
<b>50</b>	myristic acid	0.179	0.86	0.343	0.89	0.086	0.88
<b>51</b>	glucuronic lactone	0.101	1.29	0.691	1.14	0.150	1.19
<b>52</b>	4-hydroxyphenyllactic acid	0.099	0.73	0.042	1.48	0.402	1.23
<b>53</b>	indol-3-acetic acid	0.434	1.12	0.015	0.80	0.301	0.91
<b>54</b>	palmitoleic acid	0.304	1.33	0.384	1.35	0.229	1.34
<b>55</b>	palmitic acid	0.214	0.90	0.161	0.88	0.070	0.89
<b>56</b>	uric acid	0.0007	2.84	0.180	2.08	0.0007	2.33
<b>57</b>	margaric acid	0.373	0.95	0.923	0.99	0.494	0.97
<b>58</b>	stearic acid	0.119	0.93	0.490	1.02	0.539	0.99

Además de lo mencionado anteriormente, también distinguen los patrones metabolómicos expresados según estadio de la enfermedad y tipo histológico, de forma que en los resultados presentados, el adenocarcinoma se relaciona el ácido glicina-2-hidroxiclávico, la metionina y la fenilalanina con una mayor sensibilidad para este tipo de tumor en comparación con otros marcadores séricos conocidos, como el Antígeno Carcinoembrionario (CEA). Hori et al. han sido de los primeros en establecer una relación en los perfiles metabolómicos de pacientes con CP, estadio de la enfermedad y el tipo histológico. Posteriormente otros autores tratarán este tema.

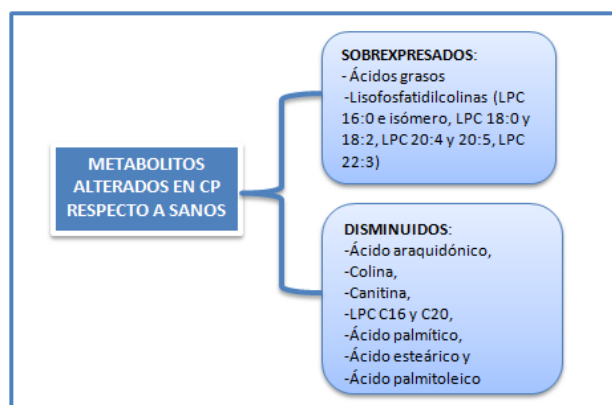
En relación a los distintos tipos histológicos, Jordan et al. (105) realizaron un estudio comparativo de los perfiles metabolómicos en muestras de suero y tejido pulmonar de pacientes con adenocarcinoma y carcinoma epidermoide de pulmón. Para ello usaron técnicas de espectrometría de masas basadas en análisis con resonancia magnética espectroscópica de alta resolución (HRMAS). A pesar de las limitaciones técnicas del bajo número de muestras, así como no contemplar los factores de confusión posibles, consiguieron diferencias significativas en los grupos de estudio al comparar sus perfiles metabolómicos. Posteriormente Wen et al. (153) realizaron un estudio enfocado a la búsqueda de perfiles metabolómicos en muestras de plasma de pacientes con adenocarcinoma de pulmón en estadios precoces específicamente. Mediante el uso de técnicas metabolómicas basadas en GC-MS y LC-MS obtuvieron perfiles metabolómicos diferentes en pacientes con adenocarcinoma y sujetos sanos (tabla 4). Detectaron a su vez alteraciones en el metabolismo de fosfolípidos, ácidos grasos y aminoácidos. También en este sentido Maeda et al. (154), con el uso de técnicas de LC-MS diferenciaron perfiles metabolómicos (alteraciones en el metabolismo de aminoácidos) en plasma de pacientes con CPNCP en comparación con sanos, y por tanto con potencial diagnóstico para este

tipo de tumores. Dong et al. (155), mediante técnicas de UPLC/Q-TOF-MS (*Ultra-performance Liquid chromatography Coupled/Quadrupole Time-of-flight Mass Spectrometry*) identificaron cinco lisofosfatidilcolinas (lysoPC 16:0, isómero de lysoPC 16.0, lysoPC 18:0, lyso 18:1 y lysoPC 18:2) como posibles biomarcadores en pacientes con CP.

**Tabla 4: metabolitos encontrados en pacientes con Adenocarcinoma estadio I (153).**

	METABOLISMO ALTERADO	METABOLITOS ALTERADOS
ADENOCARCINOMA DE PULMÓN ESTADIO I	FOSFOLÍPIDOS	Fosfolípidos de membrana: PC(34:4), PE(34:2),PE(36:1), PE(36:2), PE(36:4), PE(38:4), PE(38:6), PE(40:4), PE(40:5), PS(38:4); y Ceramidas(42 : 0).
	AMINOÁCIDOS	Alanina, Glutamina, Glicina, Desoxicólico ácido conjugado de glicina, Treonina, 5-hidroxitriptófano, L-arginina, prolina, y N (6) -methyllysine
	ÁCIDOS GRASOS	Ácido palmítico, Ácido linoleico y Ácido oleico
	OTROS	3-hidroxiбутírico, Ácido piperólico, Ácido úrico, Ácido 3,4,5-trimetoxicinámico, N-Palmitoleoyl etanolamida, Bilirrubina, Ubiquinona, Ubiquinol.

Li et al. (141), realizaron un estudio metabolómico en muestras de suero de pacientes con CP y sujetos sanos, usando UPLC/Q-TOF-MS. Detectaron 27 metabolitos diferentes, en ambos modos de análisis (positivo y negativo) que difieren entre los dos grupos de estudio (figura 10).



**Figura 10: Metabolitos alterados en pacientes con CP respecto a sanos (141).**

Es interesante mencionar que este grupo, realizó en su estudio una validación de los resultados obtenidos. Para ello, con muestras de suero de 9 pacientes con CP y 9 sujetos sanos, obtuvieron niveles disminuidos de colina y el ácido linoleico en CP con respecto a sanos, considerando la combinación de estos metabolitos como potenciales biomarcadores (141). En esta línea, Castro et al. (156) encontraron que el ácido linoleico plaquetario podría ser un biomarcador con mayor sensibilidad a los ya existentes (ácido siálico y citokeratinas) para el cáncer de pulmón de células no pequeñas.

En cuanto al estudio de los perfiles metabolómicos en los diferentes estadios del cáncer de pulmón, además de Hori (13), Puchades-Carrasco et al. (157) realizan un estudio con H-MNR, dirigido a la identificación de biomarcadores metabólicos asociados con el inicio y progresión de la enfermedad en pacientes con CPNCP. Detectan una disminución de lactato y metanol y un aumento de glutamina, colina y treonina en pacientes con CP con respecto a sujetos sanos, todos estos resultados estadísticamente significativos.

Por otro lado, existen múltiples trabajos que mediante el estudio del metaboloma evalúan la efectividad de una acción terapéutica, como es el caso de un estudio realizado en pacientes con CP para la valoración de los efectos de la radioterapia en cada sujeto. En él, mediante el empleo de cromatografía HILIC (*Analysis of Highly Polar Metabolites by Ultrapformance*) y técnicas de masas de alta resolución (Q-TOF-MS), detectan 19 iones que difieren entre pacientes con CP y sujetos sanos. Los niveles de estos iones decrecen tras tratamiento radioterápico (158). En el estudio publicado por Brunelli et al. (159), aplicando también técnicas metabolómicas han conseguido responder al interrogante presentado en cuanto a si las diferentes mutaciones del gen KRAS en el codón-12 afectan

el metabolismo celular, con posibles implicaciones en la respuesta a los tratamientos actuales del cáncer. Otros estudios han sido enfocados específicamente para el estudio de efectos, resistencias o respuesta a determinados agentes quimioterápicos, como el erlotinib (160).

Además de muestras sanguíneas, las técnicas metabolómicas también han sido aplicadas a otros fluidos de mayor o menor facilidad en su obtención, como la orina, el BAL, el aliento para estudio de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs), y el sudor.

- **Orina.** En el estudio publicado por Wu et al. (131), encuentran diferencias significativas en los niveles de carnitina y acil-carnitina en pacientes con CPNCP con respecto a sanos. Carrola et al. (128) mediante técnicas metabolómicas basadas en RMN, encuentran las siguientes diferencias en metabolitos: hipurato y trigonelina (niveles reducidos en pacientes con CP) y beta-hidroxiisovalerato,  $\alpha$ -hidroxiisobutirato, N-acetilglutamina y la creatinina (niveles elevados en CP). Además de discriminar estos metabolitos, describen el papel de posibles factores de confusión como son el género o la edad, sin encontrar una influencia relevante, aunque sería preciso ampliar el estudio y valorar otros factores de confusión como la dieta. Por otro lado, el ácido hipúrico es propuesto como potencial biomarcador por Yant et al. (130). En su estudio detectan 11 metabolitos entre los que se encuentran la carnitina, taurina y ácido hipúrico. También en muestras de orina, y mediante técnicas de microextracción en fase sólida, se han obtenido compuestos orgánicos volátiles, que difieren en sanos y pacientes con CP. En el estudio presentado por Hanai et al. en 2012 (161), expresan la mayor sensibilidad y especificidad de estos compuestos y detectan la 2-pentanona como compuesto

útil en la diferenciación entre adenocarcinoma y carcinoma epidermoide. También detectan un aumento del tetrahidrofurano y el 2- metilpiracina, relacionados con el hábito tabáquico.

- **Lavado broncoalveolar (BAL).** También ha sido estudiado para la detección de posibles biomarcadores de CP. Es el caso del trabajo presentado por Uribarri en 2014 (162), mediante el uso de espectrometría de masas, detectan proteínas implicadas con este proceso canceroso. Algunas de ellas son: AMBP, APOA1, CO4A, CRP, GSTP1, HPT, PRDX2, PUR6, SAMP y STMN1. El campo de la metabolómica en CP aún no ha sido explorado en su totalidad, en parte por las dificultades metodológicas encontradas a la hora de su análisis metabolómico. En nuestro grupo, en un análisis paralelo al presentado en este estudio, estamos trabajando en la extracción de metabolitos en lavado broncoalveolar de pacientes con CP para compararlo con un grupo control compuesto por sujetos con enfermedades pulmonares diferentes al cáncer.
- **VOCs en aliento.** Los VOCs son solo una pequeña fracción del total de los compuestos químicos presentes en el aliento humano en concentraciones muy reducidas (en rango de nmol a pmol). El origen de estas sustancias puede ser endógeno o exógeno. Ya en 1971, Pauling et al. (163) describen la presencia de un gran número de VOCs usando para ello el microanálisis del aliento por cromatografía de gas (GC). Los mecanismos biológicos basan en la hipótesis de que tanto los alcanos como los alcanos metilados están presentes en el aire exhalado como marcadores de estrés oxidativo, producto de las reacciones entre lípidos y especies reactivas del oxígeno (ROS). La producción está normalmente regulada por mecanismos celulares que protegen a la célula. Cuando estas

defensas son insuficientes, los ROS causan daño a nivel de proteínas, ácidos grasos poliinsaturados y el ADN (en este último caso estableciendo las bases de la carcinogénesis) (164). A día de hoy los VOCs encontrados en aliento de pacientes con CP incluyen aldehidos, alcanos y alcanos metilados con cadenas de carbonos C2-C11, pero la influencia de factores endógenos y exógenos (como el tabaco, con el que se han relacionado los siguientes metabolitos: benceno, etilbenceno, isómeros del xileno, acetonitrilo, 2-metilfurano, 2,5-dimetilfurano, furano, 1,3-ciclohexadieno, 2-metil-1-buteno y pentadieno) (165), hacen imposible la obtención de un marcador fiable para diagnóstico precoz de CP mediante el análisis de VOCs (147). Recientemente, mediante la determinación de compuestos volátiles en aire exhalado por técnicas de desorción térmica por cromatografía de gases/espectrometría de masas, se ha puesto de manifiesto que el ácido nonanoico es el único que presenta diferencias estadísticamente significativas en pacientes con cáncer de pulmón con respecto a EPOC y sujetos sanos, y es independiente del género, edad y tabaquismo, considerando por tanto el ácido nonanoico como un marcador tumoral (166). Hay que tener en cuenta a la hora de su estudio que la hipoxia juega un importante papel en su desarrollo por alteraciones de los llamados factores de hipoxia inducible, dentro de los cuales se encuentra el HIF-1 como marcador de hipoxia endógena, y que una sobreexpresión del mismo regula la producción de factores de crecimiento celular y altera el metabolismo energético celular. Recientemente se ha observado que la hipoxia induce autofagia e incremento de la peroxidación lipídica (167), lo que podría explicar la presencia de alquenos y alcanos metilados en el aire exhalado de pacientes con CP.

- Sudor.** Recientemente han sido publicados los resultados de un estudio piloto realizado en Córdoba por Jurado et al. (168), en el que mediante el estudio de muestras de sudor de pacientes con CP y sujetos sin CP (subdividido en dos grupos según su carga tabáquica) con la aplicación de técnicas metabólicas basadas en LC-MS/MS, encuentran diferencias significativas entre los tres grupos a estudio. A pesar del pequeño tamaño muestral y población poco representativa (muy acotada a un área geográfica), el tratarse de una muestra de fácil obtención, sin perjuicio para el paciente y que además, el sudor no constituye una vía habitual para eliminación de fármacos (como antitusígenos y antiinflamatorios), hace que este estudio abra una prometedora vía para el diagnóstico precoz del CP, a la espera de nuevos resultados.

En la tabla 5 se exponen algunos de los trabajos más relevantes en el campo de la metabolómica y dirigidos al diagnóstico precoz del CP.

**Tabla 5. Estudios metabólicos en cáncer de pulmón.**

Autor, año	N (CP/CS)	Tipo de muestra	Técnica metabólica	MTs encontrados
Hori, 2011 (13)	33/29	Suero y Tej. pulmonar	GC-MS	58/71
Wen, 2013 (169)	31/28	Plasma	GC-MS y LC-MS	31
Niu, 2012 (129)	19/15	Suero y orina	GC-MS	57/38
Maeda, 2010 (154)	141/423	Plasma	LC-MS	6
Dong, 2011 (155)	102/34	Plasma	UPLC/Q-TOF-MS	5
Li, 2014 (141)	23/23	Suero	UPLC/Q-TOF-MS	27
Guo, 2012 (115)	52/49	Suero	FTICR MS	141
Puchades-Carrasco, 2016 (157)	40/13	Suero	H-NMR MS	18
Chen, 2015 (144)	30/30	Suero	UPLC/Q-TOF-MS	10

N (CP/CS): número de sujetos con CP/CS que integran el estudio; MTs: metabolitos. FTICR MS: Espectrometría de masas de resonancia ion-ciclotrón con transformada de Fourier. H-NMR MS: Espectrometría de masas de resonancia magnética nuclear spectroscópica. UPLC/Q-TOF-MS: Ultra performance liquid Chromatography Coupled/Quadrupole Time-of-flight.



# 3 OBJETIVOS



## 3. OBJETIVOS

---

GENERAL .....	77
ESPECÍFICOS .....	77

## **General**

El objetivo fundamental de este trabajo es optimizar y aplicar un procedimiento metabolómico basado en la infusión directa de la muestra a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo tiempo de vuelo con fuente de electrospray (DI-ESI-QqQ-TOF-MS) para el estudio de suero sanguíneo de pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón y sujetos sanos. El objetivo último es diferenciar en base a sus patrones metabolómicos los dos grupos de estudio y en un segundo paso, determinar cuáles son los metabolitos causantes de esta discriminación, que podrían usarse como posibles BM del CP.

## **Específicos**

1.- Optimizar y aplicar técnicas metabolómicas de última generación a muestras de suero de pacientes de CP para determinar su perfil metabólico.

2.- Determinar aquellos factores que pueden influir en el resultado, especialmente los derivados de la recogida y preparación de la muestra (como la hemólisis), con objeto de establecer una metodología adecuada para este tipo de muestras.

3.- Establecer las diferencias existentes entre pacientes con CP y sujetos sanos en función de su perfil metabolómico.

4.- Correlacionar los perfiles metabolómicos de pacientes con CP y las rutas metabólicas relacionadas con los procesos neoplásicos.

5.- Analizar los perfiles metabolómicos de pacientes con CP y establecer diferencias según estadio y tipo histológico.

6.- Determinar la influencia de factores externos potencialmente cancerígenos, como el tabaco en los perfiles metabólicos de pacientes con CP y sujetos sanos. Discriminar aquellos metabolitos causantes de esta diferenciación.



# 4 METODOLOGÍA



## 4. METODOLOGÍA Y POBLACIÓN

---

<b>4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO</b> .....	<b>82</b>
<b>4.2. POBLACIÓN ESTUDIADA</b> .....	<b>83</b>
<b>4.3. SELECCIÓN DE PACIENTES</b> .....	<b>83</b>
4.3.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN .....	84
4.3.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN .....	84
<b>4.4. METODOLOGÍA DEL ESTUDIO</b> .....	<b>85</b>
4.4.1. DISOLVENTES Y MUESTRAS .....	86
4.4.2. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SUERO .....	87
4.4.3. INSTRUMENTACIÓN .....	87
4.4.4. MEDICIÓN DEL GRADO DE HEMÓLISIS .....	89
4.4.5. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA CARGA TABÁQUICA EN LOS PERFILES METABOLÓMICOS DE PACIENTES CON CP Y CS .....	90
<b>4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	<b>90</b>

## 4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se lleva a cabo un estudio observacional prospectivo, con el trabajo conjunto del Servicio de Neumología del Hospital Juan Ramón Jiménez y el Grupo de Análisis Medioambiental y Bioanálisis de la Universidad de Huelva, adscrito al Centro de Salud y Medio Ambiente (CYSMA). Para ello, se utilizan muestras de suero de pacientes con cáncer de pulmón y sujetos sanos. El periodo de evaluación y recogida de muestras comprendió desde julio de 2011 a julio de 2013, con periodo de análisis de muestras hasta diciembre de 2014.

Durante el estudio piloto, con 60 muestras de suero analizadas (30 de pacientes con CP y 30 de sujetos sanos), se detectaron posibles factores de confusión que podrían influir de forma directa en los resultados, como la hemólisis, que fueron detectado y estudiados para lograr su eliminación.

Una vez establecida la relación entre la presencia de hemólisis en las muestras analizadas y la menor capacidad discriminante del estudio por influencia de la misma en los resultados, se decidió ser muy selectivo en las condiciones de la muestra elegida para el análisis final de los resultados de esta tesis. Por ello, se seleccionaron finalmente para responder al objetivo general una muestra de 15 CP, 15 CE (pacientes con otras patologías respiratorias diferentes a cáncer) y 16 CS, muestras todas ellas con un Índice de Hemólisis < 20 g/dl.

Por otra parte, al mismo tiempo que el estudio general que se presenta, realizamos el análisis en un subgrupo seleccionado de la población (12 pacientes con CP y 9 sujetos sanos), con el fin de evaluar la influencia de la carga tabáquica en los perfiles

metabólicos de pacientes con CP en comparación con sujetos sanos, para determinar cuáles son los metabolitos causantes de esa discriminación.

## **4.2. POBLACIÓN ESTUDIADA**

La población diana del estudio fueron pacientes con enfermedad neoplásica de origen pulmonar diagnosticados mediante técnicas convencionales (fibrobroncoscopia y análisis anatómico-patológico de las muestras obtenidas) en el Servicio de Neumología del Hospital Juan Ramón Jiménez, que cubre el Área Sanitaria de Huelva ciudad. El otro grupo está formado por sujetos sanos (sin patología pulmonar conocida ni historia oncológica previa), evaluados en el citado hospital por otras causas. En total, se incluyeron en el estudio inicial 30 pacientes con diagnóstico de CP y 30 controles sanos.

## **4.3. SELECCIÓN DE PACIENTES**

Los pacientes candidatos a participar en este estudio fueron reclutados según el siguiente protocolo: por un lado los casos de CP, seleccionados en el momento de realización de pruebas específicas para el diagnóstico de patología neoplásica a nivel pulmonar (fibrobroncoscopia) en la Unidad de Endoscopias Respiratoria del Hospital Juan Ramón Jiménez mediante muestreo no probabilístico, con una muestra consecutiva de casos (pacientes a los que se le realiza fibrobroncoscopia por sospecha de CP durante los 24 meses de selección de casos). Por otro lado, y también mediante un muestreo no probabilístico, se seleccionaron sujetos sanos desde el punto de vista respiratorio y sin patología neoplásica conocida, en la Unidad de Hospital de día del Hospital Juan Ramón Jiménez, en el momento en el que asistían a dicha unidad para realización de cirugía

mínimamente invasiva por diferentes causas. A todos los participantes en el estudio se les aplicaron los criterios que se comentan a continuación.

#### 4.3.1. Criterios de inclusión

Grupo de pacientes con cáncer de pulmón: Pacientes con diagnóstico definitivo de CP de cualquier tipo histológico y estadio de la enfermedad. Los casos se seleccionaron con independencia del hábito tabáquico, sin establecer limitaciones por la edad, salvo pacientes menores de 20 años.

Grupo de controles sanos: Sujetos libres de enfermedad pulmonar conocida, sin sintomatología respiratoria evidente y ausencia de patología neoplásica de cualquier estirpe y localización. No se utiliza como criterio excluyente el hábito tabáquico de los controles seleccionados. Todos los sujetos deben superar los 20 años de edad.

#### 4.3.2. Criterios de exclusión

Grupo de pacientes con cáncer de pulmón: Se considera la ausencia de diagnóstico definitivo (tipo histológico de CP), negativa del paciente a participar en el estudio, o sujetos menores de 20 años de edad.

Grupo de controles sanos: En el caso de los controles sanos, se excluyen pacientes con cualquier tipo de enfermedad pulmonar, existencia de neoplasia de cualquier estirpe y localización en el momento actual o en el pasado. Sujetos menores de 20 años de edad.

Los pacientes candidatos que cumplieron los criterios de inclusión fueron informados verbalmente y por escrito de las características y objetivos del estudio,

obteniéndose en todos los casos un Consentimiento Informado por escrito, el cual fue especialmente diseñado para este trabajo (Anexos 1 y 2).

#### **4.4. METODOLOGÍA DEL ESTUDIO**

Una vez seleccionado el paciente candidato al estudio y obtenido el correspondiente consentimiento informado por escrito, se aplicó el siguiente protocolo de actuación:

- **Análisis de la historia clínica** del paciente con recogida de datos clínicos relativos a factores de riesgo y complicaciones asociadas. Despistaje de criterios de exclusión.
  
- **Anamnesis completa** que incluyó:
  - Identificación del paciente, número de historia clínica y fecha de nacimiento.
  - Antecedentes personales. Se recogieron datos de alergias, **consumo de tabaco (y carga tabáquica)**, alcohol, fármacos y drogas, enfermedades conocidas, intervenciones quirúrgicas e **historia de enfermedad neoplásica previa**.
  - Profesión o actividad laboral (datos de exposición a productos químicos o ambientales).
  - Tratamiento habitual.
  
- **Exploración física:** Peso, Talla, IMC, Auscultación cardíaca y pulmonar.

- **Extracción de sangre y procesamiento de muestras.** Se procedió en todos los casos a extracción de sangre, tras un ayuno mínimo de 8 horas, para realización del estudio, como se detalla a continuación.

#### 4.4.1. Disolventes y muestras

Todos los disolventes usados fueron de grado HPLC (*High Purity Liquid Chromatography*). El metanol y cloroformo fueron adquiridos de Aldrich (Steinheim, Alemania), mientras que el etanol, diclorometano y ácido fórmico fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania). El agua se purificó con un sistema modelo Gradient Milli-Q (Millipore, Watford, UK).

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción venosa de la región antero-cubital después de 8 horas de ayuno (13), y fueron recogidas en tubos BD Vacutainer SST II con gel separador y sistema de vacío *Advance*. La técnica y pasos específicos en la recogida para evitar procesos de hemólisis, se muestran en el Anexo 3. Las muestras se mantuvieron durante 30 minutos a 4°C y protegidas de la luz para permitir la retracción del coágulo (170). Después de la centrifugación (a 4.000 rpm durante 10 minutos a 4°C) las muestras de suero (171) se dividieron en alícuotas de 1 ml, en tubos Eppendorf y se congelaron a -80 °C hasta su análisis.

Las muestras de suero recogidas en el estudio pertenecían a 30 pacientes reclutados (25 hombres y 5 mujeres, con edad media de  $63 \pm 10$  años) en la sala de Endoscopia Respiratoria del Hospital Juan Ramón Jiménez, con sospecha de cáncer de pulmón, y con confirmación histológica posterior. Por otro lado fueron incluidos en el estudio 30 controles sanos, sin antecedentes neoplásicos ni patología pulmonar conocida. Todos los participantes del estudio firmaron el consentimiento informado.

#### **4.4.2. Tratamiento de las muestras de suero**

Las muestras de suero se extrajeron en dos etapas, siguiendo una modificación del procedimiento de Bruce (172): (a) 100 µl de suero se mezclaron con 400 µl de una mezcla de 1:1 metanol/etanol en un tubo Eppendorf y se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente, seguido por centrifugación a 4.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a otro tubo Eppendorf y el precipitado se mantuvo para su posterior tratamiento. A continuación, el sobrenadante se secó bajo corriente de nitrógeno y el residuo resultante se reconstituyó con 80 µl de metanol y 20 µl de agua. Este extracto se agitó brevemente y se centrifugó de nuevo (4.000 rpm, a 4°C durante 10 minutos) y el sobrenadante recogido se añadió al extracto anterior para su análisis; (b) el precipitado aislado en (a) se extrajo con una mezcla de 400 µl de 1:1 cloroformo:metanol y se agitó (5 min), seguido de centrifugación a 10.000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos. Finalmente, el sobrenadante resultante se sometió a una corriente de nitrógeno, y se reconstituyó posteriormente con 100 µl de 60:40 diclorometano:metanol, con centrifugación final a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C para eliminar trazas de partículas en suspensión.

Para el análisis por espectrometría de masas por electrospray, se añadió ácido fórmico al 0,1% a los extractos para el modo de ionización positivo. En el caso de la ionización negativa no es necesario la adición de cualquier reactivo.

#### **4.4.3. Instrumentación**

Todos Los experimentos se realizaron en un sistema híbrido QSTAR XL (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA) utilizando una fuente de ionización electrospray (ESI). El extracto acidificado se introdujo directamente en el espectrómetro de masas a un flujo de

0,5  $\mu\text{l min}^{-1}$ , empleando para ello una bomba de infusión integrada y una jeringa de 1.000  $\mu\text{l}$  (Hamilton Company, USA). Los espectros de masas se determinaron en ambos modos de ionización, positivo y negativo, siendo el tiempo total de análisis 0.2 minutos y el rango  $m/z$  de 50 a 1.100 uma (unidad de masa atómica).

Las condiciones de trabajo fueron optimizadas para obtener la mayor sensibilidad y reproducibilidad en los resultados. El voltaje de ionización (*Ion Spray voltage, IS*) se ajustó a 3.300 V, con unos flujos de gas de cortina y de nebulización de 1.13 y 1.56  $\text{L min}^{-1}$ , respectivamente. La temperatura de la fuente se ajustó a 60°C, con potenciales de trabajo de 60 V (*Declustering Potential, DP*) y 250 V (*Focusing Potential, FP*).

Para el análisis en modo negativo solo se modificaron algunos parámetros respecto al método anterior: IS = -4.000 V, DP = -100 V, FP = -250 V.

Para llevar a cabo los experimentos MS/MS, que permitan la identificación de metabolitos desconocidos, se utilizó como energía de colisión general 20 V para compuestos ligeros ( $m/z < 250$ ) y a 40 V para metabolitos de mayor masa molecular (aunque el valor fue optimizado para cada uno de los compuestos estudiados). Finalmente, el gas de colisión (CAD) empleado fue nitrógeno.

Tras los resultados del análisis inicial de las 60 muestras incluidas en el estudio, se obtuvieron los perfiles metabolómicos correspondientes a cada grupo. Observamos que estos perfiles conseguían una diferenciación clara entre los dos grupos, pero sin conocer realmente el grado de discriminación alcanzado dado que parte de las muestras incluidas presentaban hemólisis en diferentes grados. Con el fin de continuar con nuestro estudio, abrimos nuevas ramas: en la primera de ellas con todas las muestras incluidas en un inicio (60, entre CP y CS), enfocada al análisis de la influencia de la hemólisis en los perfiles

metabolómicos, mediante el uso de técnicas dirigidas. Paralelamente, tras suprimir aquellas muestras con un índice hemolítico (IH) > 20 mg/dl, reevaluamos los perfiles metabolómicos e incluimos un nuevo grupo de pacientes con enfermedad pulmonar diferente a la neoplásica. En una tercera rama de este estudio realizamos una comparación entre sujetos con CP e historia de tabaquismo con respecto a sujetos sanos no fumadores, con el fin de valorar la influencia de la carga tabáquica en los perfiles metabolómicos de la población a estudio. A continuación detallamos las características de los tres subgrupos a estudio.

Se procedió nuevamente al tratamiento de estas muestras de suero con igual metodología a la expresada en el apartado 4.4.2 y 4.4.3 para la obtención de los perfiles metabolómicos y posterior identificación de aquellos metabolitos responsables de la diferenciación entre grupos.

#### **4.4.4. Medición del grado de hemólisis**

El test para la medida del Índice Hemolítico (IH) se basa en el cálculo de las mediciones de la absorbancia en muestras diluidas a diversos pares de longitudes de onda bicromáticas a fin de obtener una representación semicuantitativa de los niveles de hemólisis presentes en las muestras de suero y plasma.

Previamente a la medida, se diluye una alícuota de cada muestra en una solución fisiológica (cloruro de sodio al 0.9 %) a fin de medir la absorbancia a 570 nm (longitud de onda primaria) y 600 nm (longitud de onda secundaria). A partir de estos valores de absorbancia, se calcula el valor del índice sérico utilizando una serie de factores, como la dilución de la muestra, corrección de interferencias, efectos de la turbidez y bilirrubinemia (173).

#### 4.4.5. Estudio de la influencia de la carga tabáquica en los perfiles metabolómicos de pacientes con CP y CS

En esta ocasión fueron incluidas en el estudio las muestras de suero de 12 pacientes (9 hombres y 3 mujeres, con edad media de  $62 \pm 2$  años) con sospecha de cáncer de pulmón, y con confirmación histológica posterior. Entre estos 12 pacientes se incluyen: 6 casos de adenocarcinoma, 4 epidermoide, 1 carcinoma de células grandes y 1 carcinoma de células pequeñas. Para el análisis dividimos a los pacientes con CP en dos grupos según su carga tabáquica (CT): Carga tabáquica moderada ( $CT < 35$  paquetes/año), entre los que se incluyen 4 adenocarcinomas, 1 carcinoma epidermoide y 1 carcinoma de células grandes; y Carga tabáquica elevada ( $CT > 70$  paquetes/año), 2 adenocarcinoma, 3 epidermoide, 1 carcinoma de células pequeñas. Además se utilizaron las muestras de suero de 9 controles sanos, ninguno de ellos fumadores, y sin enfermedad pulmonar conocida.

El proceso metodológico utilizado es análogo al empleado en el estudio general en cuanto a disolventes, tratamiento de las muestras de suero e instrumentación, para la obtención de los perfiles metabolómicos y metabolitos implicados en este subgrupo poblacional.

### 4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el Software Markerview™ (*Applied Biosystems*) para transformar y filtrar las señales del espectrómetro de masas, con el fin de eliminar el ruido y transformar los valores  $m/z$  e intensidades de los picos en matrices de datos de dos dimensiones. Estos datos se procesaron con el software SIMCA-P™ (versión 11.5, publicado por Umetrics AB, Umea, Suecia), para llevar a cabo un análisis estadístico multivariante, como el de

componentes principales (PCA) y el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), con el fin de clasificar los grupos en estudio y encontrar las variables (metabolitos) que determinan dicha clasificación.



# 5 RESULTADOS



## 5. RESULTADOS

---

<b>5.1. PERFILES METABOLÓMICO EN MUESTRAS DE SUERO.....</b>	<b>96</b>
5.1.1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS .....	96
5.1.2. PERFILES METABOLÓMICOS EN MUESTRAS DE SUERO .....	97
5.1.3. NORMALIZACIÓN Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIANTE. CLASIFICACIÓN ESTADÍSTICA DE CASOS Y CONTROLES.....	99
5.1.4. IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS CAUSANTES DE LA DIFERENCIACIÓN .....	99
5.1.5. PATRONES METABOLÓMICOS EN DIFERENTES TIPOS HISTOLÓGICOS DE CP .....	103
<b>5.2. INFLUENCIA DE LA HEMÓLISIS EN LOS PERFILES METABOLÓMICOS DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN .....</b>	<b>104</b>
5.2.1. VALORACIÓN GLOBAL DE LA INFLUENCIA DE LA HEMÓLISIS EN LOS PATRONES METABOLÓMICOS.....	109
<b>5.3. PERFILES METABOLÓMICOS EN MUESTRAS DE SUERO NO HEMOLIZADAS ..</b>	<b>110</b>
5.3.1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS .....	110
5.3.1.1. <i>Tipos histológicos de cáncer de pulmón en la población estudiada....</i>	<i>112</i>
5.3.1.2. <i>Estadios de cáncer de pulmón en la población estudiada.....</i>	<i>113</i>
5.3.1.3. <i>Antecedentes neoplásicos previos en la población estudiada.....</i>	<i>113</i>
5.3.1.4. <i>Hábito tabáquico en la población estudiada.....</i>	<i>114</i>
5.3.2. PERFILES METABOLÓMICOS EN MUESTRAS DE SUERO SIN HEMÓLISIS .....	114
5.3.3. DISCUSIÓN SOBRE ALTERACIÓN DE RUTAS METABÓLICAS CAUSADAS POR EL CÁNCER DE PULMÓN.....	127
<b>5.4. INFLUENCIA DE LA CARGA TABÁQUICA EN LOS PERFILES METABOLÓMICOS DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN Y CONTROLES SANOS.....</b>	<b>133</b>

Como se ha comentado anteriormente, de la población incluida al inicio en el estudio, formada por 30 pacientes con CP y 30 sujetos sanos, si bien se obtuvieron resultados, estos no respondieron a las expectativas de nuestro estudio por la presencia de hemólisis en algunas de las muestras incluidas. A continuación se muestran los resultados de todas las determinaciones realizadas, de forma evolutiva y teniendo en cuenta las variaciones sujetas a hallazgos durante el estudio.

- Estudio inicial de los perfiles metabolómicos de 30 CP y 30 CS.
- Estudio dirigido a la influencia de la hemólisis en los resultados tras el análisis metabolómico inicial.
- Tras descartar aquellas muestras con un índice de hemólisis > de 20 mg/dl, formamos dos nuevos grupos, uno en el que se incluyen pacientes con CP y otro con sujetos sanos, a estos dos grupos unimos uno nuevo con pacientes con enfermedades respiratorias diferentes a la neoplásica. Entre estos 3 grupos realizamos el análisis metabolómico comparativo.
- Y por último, comparamos un subgrupo de pacientes con CP e historia de tabaquismo con otro de sujetos sanos nunca fumadores, con el fin de valorar la influencia de la carga tabáquica en los perfiles metabolómicos de la población a estudio.

A continuación se detallan las características y resultados del estudio inicial y de todas las variantes del estudio finalmente diseñadas:

## 5.1. PERFILES METABOLÓMICO EN MUESTRAS DE SUERO

### 5.1.1. Características demográficas y clínicas

En la tabla 6 pueden observarse las características principales de la población a estudio: tipo histológico del CP; estadio de la enfermedad; enfermedades no neoplásicas conocidas en el momento del estudio e historial de tabaquismo; además de sexo y edad. De los 30 pacientes con CP el 83.3% (n=25) eran hombres, mientras que en el grupo control, el 56.6% eran mujeres. La edad media de los sujetos incluidos fue de  $63,31 \pm 2$  años para el grupo CP, el 90% (n=27) con edad superior a los 50 años. En el grupo control, la edad media fue de  $53 \pm 2$  años. Más del 30% fueron diagnosticados finalmente de adenocarcinoma. La proporción de sujetos con historia de tabaquismo en el grupo de cáncer de pulmón fue muy superior a la observada en el grupo control: 96.6% y 56.6% respectivamente. Hay que destacar que la comorbilidad más prevalente entre los incluidos en el estudio fue la HTA, presente en el 60% de los pacientes con CP.

**Tabla 6: características epidemiológicas de los sujetos integrantes en el estudio inicial.**

	Cáncer de pulmón	Control sano
<b>Sexo (H/M)</b>	25/5	13/17
<b>Edad media</b>	$63 \pm 10$	$53 \pm 12$
<b>Comorbilidad</b>	HTA (60%), DM (23.3%), EPOC (13.3%)	HTA (36.6%), DM (20%)
<b>Tabaquismo</b>		
- Fumador	10 (9H/1M)	3 (1H/2M)
- Ex fumador	19 (16H/3M)	14 (9H/5M)
- Nunca fumador	1 (0H/1M)	13 (3H/10M)
<b>Histología</b>		
- Adenocarcinoma	10 (9H/1M)	-

- Epidermoide	8 (6H/2M)	-
- CP células grandes	6 (4H/2M)	-
- CPCP	3 (3H/0M)	-
- Tumor Carcinoide	3 (3H/0M)	-
<b>Estadios CP</b>		
- I (a y b)	5	-
- II (a y b)	5	-
- III (a y b)	11	-
- IV	9	-

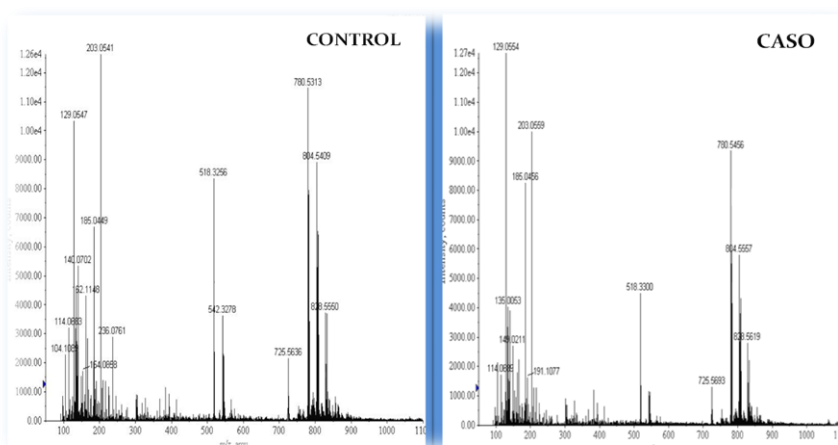
HTA: Hipertensión Arterial, DM: Diabetes Mellitus, EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, H: Hombre, M: Mujer, CP: Cáncer de Pulmón, CPCP: Cáncer de Pulmón de Células Pequeñas.

### 5.1.2. Perfiles metabolómicos en muestras de suero

Las muestras de suero (conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del análisis) se analizaron mediante espectrometría de masas de alta resolución, que permite un análisis semicuantitativo de las diversas moléculas (metabolitos) presentes, en función de su relación  $m/z$ . Los espectros de masas resultantes proporcionan por tanto, el perfil metabolómico necesario para evaluar la población en estudio.

La espectrometría de masas, como ya se ha comentado, es una técnica de análisis cualitativo para la determinación de estructuras orgánicas: está basada en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo con su masa y su carga. Un espectro de masas, será en consecuencia, una información bidimensional que representa un parámetro relacionado con la abundancia de los diferentes tipos de iones en función de la relación masa/carga ( $m/z$ ) de cada uno de ellos.

Los perfiles metabolómicos obtenidos muestran claras diferencias entre los grupos estudiados CP y CS en modo positivo (figura 11). A pesar del carácter semicuantitativo de los espectros, se observan tres clústers de picos espectrales claramente definidos: *Clúster a*, que integra señales de metabolitos con  $m/z$  de baja masa molecular ( $m/z$  100-250); *Clúster b*, con señales de masa molecular media ( $m/z$  450-600); y *Clúster c*, metabolitos de masa molecular en el rango 700 a 900  $m/z$ . Este perfil espectral se mantiene en las muestras de casos y controles, aunque muestran tendencias diferentes. En este sentido, la intensidad de los picos correspondientes a CP presentan, en los *Clusters a* y *b* una disminución de intensidad significativa respecto a los controles, lo que indica una reducción de la presencia de estos metabolitos en el cáncer de pulmón y por tanto una inhibición de los mismos por la patología. Por otro lado, los picos del *Clúster a* muestran intensidades análogas pero con una tendencia diferente, con mayor intensidad en los picos de mayor  $m/z$  de los controles y una situación inversa en los picos de menos  $m/z$ , lo que indica también un cambio de la expresión metabólica como consecuencia de la patología oncológica, que se verá con más detalle en los apartados que siguen.



**Figura 11. Espectro de masa-tipo de un sujeto del grupo control y otro del grupo de CP obtenido mediante infusión directa a un QqTOF. Extractos polares.**

### 5.1.3. Normalización y análisis estadístico multivariante. Clasificación estadística de casos y controles.

Los resultados obtenidos en los diversos espectros de masas se sometieron a normalización estadística y análisis multivariante mediante análisis discriminante con mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). Este tratamiento se aplicó a espectros obtenidos en modo de ionización positiva y negativa, tanto en los casos de CP como en los controles sanos (CS). La figura 12 presenta el gráfico *Score Plot* resultante tras el análisis estadístico, en el que se observa una clara discriminación entre los pacientes con cáncer de pulmón (puntos negros) y los controles sanos (puntos rojos), donde cada señal corresponde con un sujeto determinado, y la posición en la gráfica es fruto de su perfil metabolómico concreto.

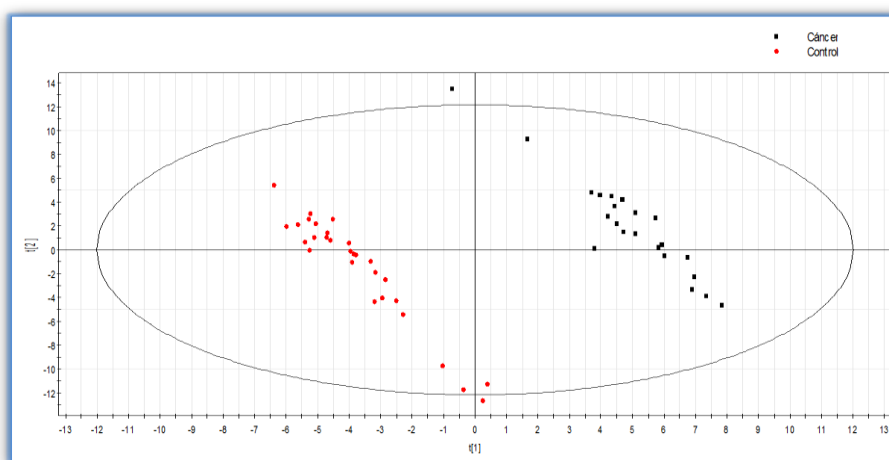


Figura 12. Gráfico Score Plots de cáncer de pulmón y controles sanos utilizando como descriptores los picos  $m/z$  de los espectros de MS.

### 5.1.4. Identificación de los metabolitos causantes de la diferenciación

La espectrometría de masas es una herramienta muy poderosa tanto si se utiliza para la detectar compuestos conocidos como para identificar otros desconocidos. La identificación generalmente consiste en utilizar el espectro de masas como una “huella

química”, comparando los espectros obtenidos con los de espectros de compuestos patrón.

Habitualmente se encuentran dos tipos de bibliotecas en las que comparar la información obtenida: unas de tipo general (más de 150.000 espectros) y otras más pequeñas pero específicas (cientos a miles de espectros), de uso en un campo de trabajo concreto. En nuestro caso, existen múltiples bases de datos útiles, como “*Human Metabolome DataBase*” o HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) y “*Serum Metabolome DataBase*” o SMDB: <http://www.serummetabolome.ca>) y METLIN (<http://metlin.scripps.edu/>) entre otras. La primera de ellas detalla una lista completa con la identidad y la carga endógena de metabolitos que pueden ser detectados en el suero humano. Actualmente la SMDB contiene información sobre 4.229 metabolitos detectables y 9.225 en los que la concentración, rangos o valores están asociados a diferentes condiciones y trastornos (119). METLIN es una base de datos de metabolómica que contienen más de 64.000 metabolitos. Es un sistema de gestión de datos diseñado para ayudar a la identificación de metabolitos, con acceso público, y permanentemente actualizada. Aporta información sobre su masa, fórmula química y estructura. Cada metabolito está convenientemente ligado a otros recursos externos, como el de la Enciclopedia de Kyoto de genes y genomas (KEGG: <http://www.kegg.com>), para mayor referencia y consulta (130).

Además de las mencionadas, existen otras bases de datos útiles como “*The Human Metabolome Library*” (HML), Pubchem (<http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), o Mass Bank (<http://www.massbank.jp>).

En nuestro trabajo, tras la clasificación de las muestras en CP y CS (Figura 12), es posible determinar los picos  $m/z$  que más influyen en la clasificación de estas muestras.

Posteriormente, éstas se analizan nuevamente aplicando el modo MS/MS a los picos m/z en cuestión para fragmentarlos, elucidar su estructura e identificar el metabolito en cuestión, complementando el proceso con ayuda de las librerías de espectros mencionadas:

- Con niveles *sobre expresados*: Carnitina y derivados (butiril-carnitina y oleil-carnitina), que reflejan alteraciones en el metabolismo energético celular. Existe evidencia de la contribución de los ácidos grasos a la adaptación metabólica de las células cancerosas (174). La carnitina transporta ácidos grasos de cadena larga desde el citosol a la matriz mitocondrial para la beta oxidación. El sistema carnitina en pacientes con cáncer incluye además de la carnitina, ésteres de carnitina y un gran número de enzimas específicas, aparentemente expresadas tanto en tejido tumoral como en tejido no tumoral de pacientes con cáncer de pulmón (175). Niveles bajos de carnitina y acil-carnitina fueron también observados en el desarrollo de caquexia en pacientes con CP (176), (131). Fenilalanina, aminoácido esencial cuya vía metabólica principal es la transformación en tirosina, precursora de hormonas tiroideas, catecolaminas y melanina. Al degradarse la tirosina, se obtiene como producto final la formación de fumarato y acetoacetato. Teniendo en cuenta esto, tanto la fenilalanina como la tirosina pueden ser considerados al mismo tiempo aminoácidos glucogénicos y cetogénicos (es decir, involucrados en el metabolismo energético). Y por último, la Dopamina, relacionado con la regulación de la función inmune.

- Con niveles *disminuidos* con respecto a sanos: los fosfolípidos (fosfatidilcolina y fosfatidilinositol), probablemente como consecuencia de alteraciones lipídicas de las membranas celulares y las lisofosfatidilcolinas, componente fundamental de las membranas celulares y con función pro inflamatoria, se encuentran alterados en pacientes con CP, lo que sugiere alteraciones en el metabolismo de los fosfolípidos. Las anormalidades en el metabolismo lipídico, corresponden con una de las alteraciones metabólicas más comunes en el cáncer (177). Muchas células cancerosas mantienen la síntesis de lípidos endógenos activa, ya que necesitan una gran cantidad de lípidos para el crecimiento, la proliferación y la invasión (178), (115). Lisofosfatidilcolina puede ser convertida en fosfatidilcolina por la lisofosfatidilcolina aciltransferasa en el surfactante pulmonar, con la función de disminuir la tensión superficial a nivel pulmonar. En un trabajo publicado por Dong et al. (155) detectan el descenso en los niveles de cinco lisofosfatidilcolinas en pacientes con CP, aunque no alcanzan a determinar la relación entre esta enfermedad y sus resultados. Otros autores, en un estudio sobre muestras de suero obtienen una disminución de los niveles de LPC en pacientes con CP de pulmón con respecto a sanos, lo que relacionan con el aumento de la angiogénesis y progresión que tiene lugar en los procesos tumorales (141). En nuestro estudio, los niveles de LPC se encuentran disminuidos, en consonancia con lo expuesto en estudios previos, en los que se relaciona el descenso de esta lipoproteína con el mayor consumo para proliferación celular.

Los resultados expuestos corresponden al estudio inicial, de pacientes con cáncer de pulmón y sujetos sanos, sin excluir las muestras con hemólisis, por lo que los

resultados obtenidos, si bien permiten una clara discriminación entre pacientes con CP y CS, y en todos los casos los metabolitos obtenidos se pueden relacionar con rutas previamente conocidas en procesos cancerosos, no pueden ser considerados *a priori* como válidos.

### 5.1.5. Patrones metabolómicos en diferentes tipos histológicos de CP

El análisis discriminante se ha aplicado también a la clasificación estadística de los distintos tipos histológicos de CP. Los resultados se muestran en la figura 13. Se observa una clara discriminación entre los tipos histológicos, lo que indica diferencias entre el perfil metabolómico que se genera en estos tipos histológicos, lo que podría permitir en un estudio más amplio la identificación metabolómica de la estirpe tumoral.

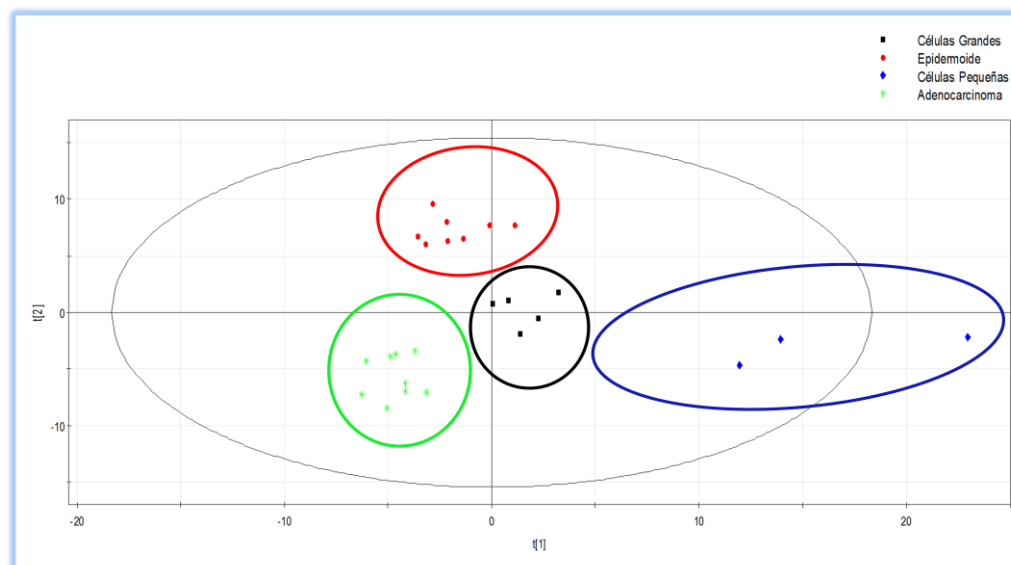


Figura 13. Gráfico de scores de los diferentes tipos histológicos.

Esta posibilidad ya fue valorada por Hori et al. en 2011 (8), estableciendo diferencias entre el perfil metabolómico del adenocarcinoma, carcinoma epidermoide y CPCP en muestras de tejido pulmonar y suero sanguíneo. Hay que mencionar las

diferencias metodológicas entre nuestro estudio y el presentado por el equipo de Hori, que influyen de forma directa en los resultados.

## **5.2. INFLUENCIA DE LA HEMÓLISIS EN LOS PERFILES METABOLÓMICOS DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN**

Los procedimientos de obtención y análisis de las muestras biológicas condicionan los resultados y conclusiones de los estudios metabolómicos. Dada la escasa estandarización existente en este campo hasta el momento, son frecuentes “artefactos” causados durante la conservación, tratamiento y extracción de la muestra, que pueden inducir errores aleatorios que afectan seriamente a los resultados. Debido a ello, es fundamental la aplicación de una adecuada metodología pre-analítica y analítica para evitar los citados problemas, los cuales pueden dar lugar a errores y falsear los resultados (170), (179).

El pre-tratamiento de las muestras almacenadas para su análisis posterior suele estar bastante estandarizado (180) y no es causa de error habitual, sin embargo, la fase pre-analítica está poco estandarizada. Aunque recientemente se han publicado diversos protocolos al respecto (172), (180), (181), no parece que puedan solucionar completamente este déficit. Esta fase pre-analítica, según diversos autores (182), (183), (184) puede ser causa del 60 al 80% de los errores analíticos. Yin et al. (170) comentan que al estudiar muestras de sangre de sujetos sanos con distintos grados de hemólisis, dicha hemólisis provoca numerosos cambios en el perfil metabolómico.

En nuestro estudio, inicialmente y sin considerar el grado de hemólisis hemos analizado el perfil metabolómico en el suero de 60 sujetos, 30 con cáncer de pulmón y 30 controles sanos, encontrando una clara diferencia entre los perfiles metabolómicos de

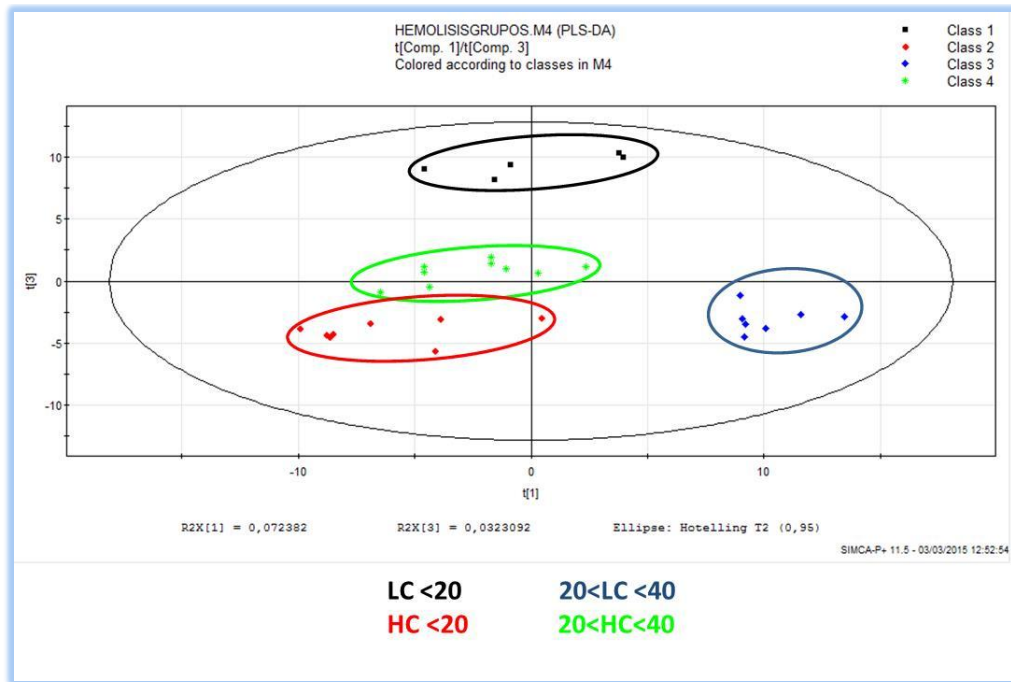
ambos grupos. Posteriormente, analizamos los resultados considerando el grado de hemólisis, y separando las muestras en cuatro grupos según su índice hemolítico:  $IH < 20$  g/dl de Hb;  $20 < IH < 40$  g/dl;  $40 < IH < 80$  g/dl; y  $IH > 80$  g/dl (tabla 7).

Se realizaron comparaciones estadísticas de los espectros de masas correspondientes a cada muestra mediante análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), de los grupos con distinto índice hemolítico para evaluar la influencia de la hemólisis en las muestras de suero de pacientes con cáncer de pulmón y de sujetos sanos. Asimismo, se realizó una comparación entre CP y CS con índices hemolíticos semejantes, y dentro de un mismo grupo con diferente grado de hemólisis, para ver la influencia de la misma en los análisis.

**Tabla 7: Índice hemolítico de las muestras de suero incluidas en el estudio.**

IDE	DIAGNÓSTICO	IHEMO	GRUPO	IDE	DIAGNÓSTICO	IHEMO	GRUPO
1	CÁNCER	1	IH<20 g/dl	186	CONTROL SANO	37	20<IH<40 g/dl
104	CÁNCER	9	IH<20 g/dl	2	CÁNCER	38	20<IH<40 g/dl
131	CONTROL SANO	9	IH<20 g/dl	38	CÁNCER	40	20<IH<40 g/dl
152	CONTROL SANO	9	IH<20 g/dl	141	CÁNCER	40	20<IH<40 g/dl
138	CÁNCER	10	IH<20 g/dl	167	CONTROL SANO	42	40<IH<80 g/dl
147	CONTROL SANO	12	IH<20 g/dl	34	CÁNCER	44	40<IH<80 g/dl
4	CÁNCER	14	IH<20 g/dl	35	CÁNCER	48	40<IH<80 g/dl
108	CONTROL SANO	14	IH<20 g/dl	12	CÁNCER	51	40<IH<80 g/dl
13	CÁNCER	16	IH<20 g/dl	111	CONTROL SANO	57	40<IH<80 g/dl
107	CONTROL SANO	16	IH<20 g/dl	163	CONTROL SANO	57	40<IH<80 g/dl
119	CONTROL SANO	17	IH<20 g/dl	72	CÁNCER	67	40<IH<80 g/dl
133	CÁNCER	18	IH<20 g/dl	46	CÁNCER	75	40<IH<80 g/dl
165	CONTROL SANO	18	IH<20 g/dl	143	CÁNCER	82	40<IH<80 g/dl
154	CONTROL SANO	19	IH<20 g/dl	171	CONTROL SANO	88	IH>80 g/dl
129	CÁNCER	20	IH<20 g/dl	168	CONTROL SANO	130	IH>80 g/dl
148	CONTROL SANO	20	IH<20 g/dl	39	CÁNCER	142	IH>80 g/dl
127	CONTROL SANO	21	20<IH<40 g/dl	151	CONTROL SANO	149	IH>80 g/dl
153	CONTROL SANO	22	20<IH<40 g/dl	120	CÁNCER	172	IH>80 g/dl
57	CÁNCER	24	20<IH<40 g/dl	16	CÁNCER	188	IH>80 g/dl
132	CÁNCER	24	20<IH<40 g/dl	74	CÁNCER	200	IH>80 g/dl
128	CONTROL SANO	26	20<IH<40 g/dl	170	CONTROL SANO	213	IH>80 g/dl
150	CONTROL SANO	28	20<IH<40 g/dl	40	CÁNCER	363	IH>80 g/dl
122	CONTROL SANO	29	20<IH<40 g/dl	99	CÁNCER	368	IH>80 g/dl
149	CONTROL SANO	29	20<IH<40 g/dl	30	CÁNCER	408	IH>80 g/dl
58	CÁNCER	30	20<IH<40 g/dl	172	CONTROL SANO	436	IH>80 g/dl
164	CONTROL SANO	32	20<IH<40 g/dl	15	CÁNCER	463	IH>80 g/dl
55	CÁNCER	33	20<IH<40 g/dl	54	CÁNCER	586	IH>80 g/dl
112	CONTROL SANO	36	20<IH<40 g/dl				

En la figura 14 se muestra la representación gráfica mediante diagrama PLS-DA de los resultados correspondientes de las muestras analizadas en modo positivo.



**Figura 14. Representación de scores (PLS-DA) de muestras con distinto índice de hemólisis: puntos negros, CP (LC) con  $IH < 20$  g/dl; puntos azules CP con  $20 < IH < 40$  g/dl; rojo CS (HC) con  $IH < 20$  g/dl; verde CS con  $20 < IH < 40$  g/dl.**

Si comparamos CP y CS con el mismo índice hemolítico: CP, CS  $IH < 20$  g/dl y CP, CS  $20 < IH < 40$  g/dl (negro vs rojo y azul vs verde, respectivamente), podemos ver como en ambos casos, se separan los grupos, indicando que existen metabolitos que causan esta discriminación. Sin embargo, cuando discriminamos entre un mismo grupo con diferente índice hemolítico (negro vs azul, y rojo vs verde) también se observa una separación entre los mismos grupos con diferentes índices de hemólisis (aunque menos significativa en los grupos control). Lo que indica que los componentes hemolíticos pueden afectar al perfil metabolómico de los pacientes, por lo que la hemólisis supondría una interferencia en el análisis metabolómico induciendo posibles errores en la clasificación de grupos CP y CS, así como en identificación de los metabolitos alterados que permiten la discriminación entre grupos.

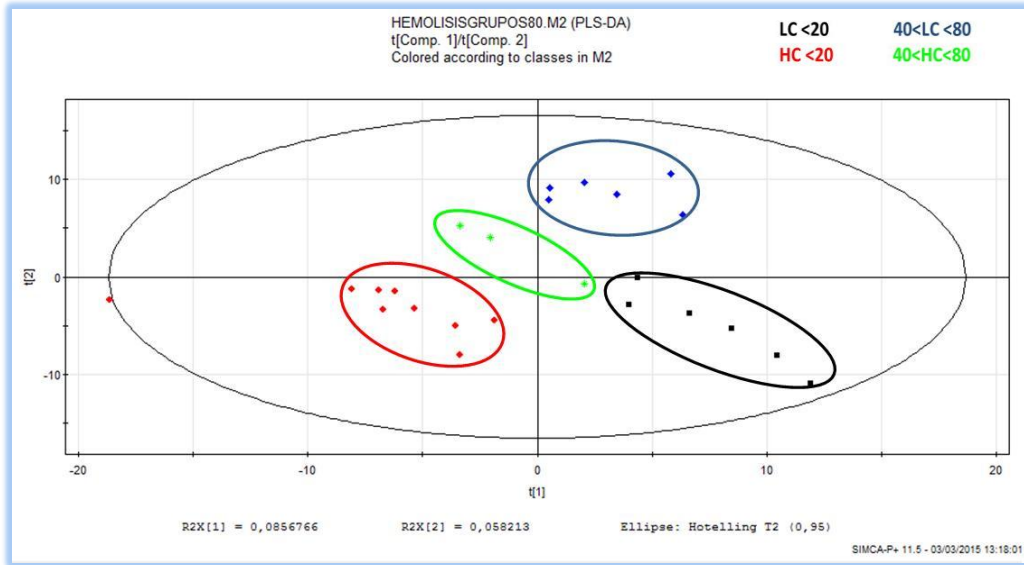


Figura 15. Representación de scores (PLS-DA) de muestras con distinto índice de hemólisis: puntos negros, CP (LC) con  $IH < 20$  g/dl; puntos azules CP con  $40 < IH < 80$  g/dl; rojo CS (HC) con  $IH < 20$  g/dl; verde CS con  $40 < IH < 80$  g/dl.

A medida que aumenta el grado de hemólisis en las muestras, observamos que la separación entre los diferentes grupos, CP y CS con mismo índice hemolítico (azul vs verde) presenta una menor discriminación (figuras 15 y 16).

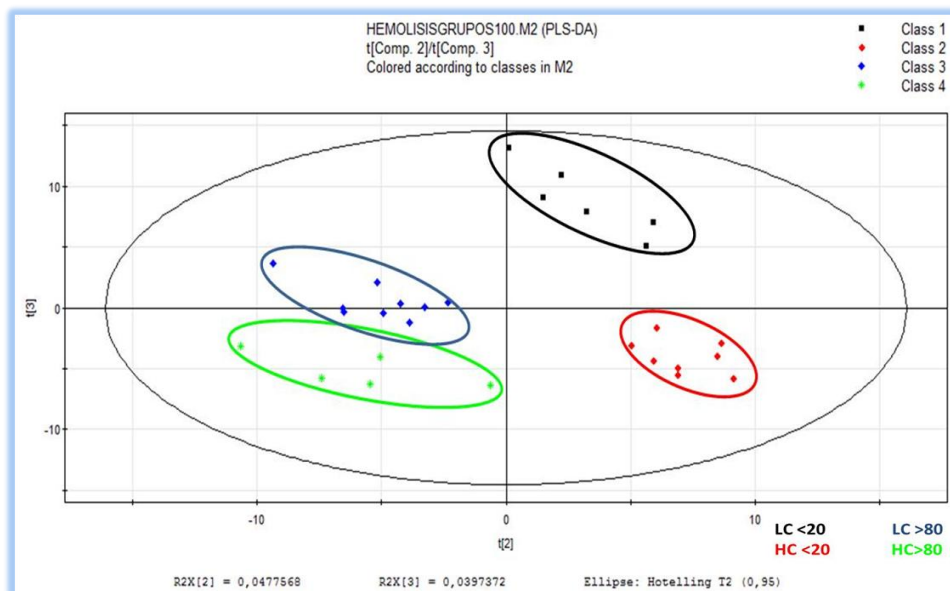
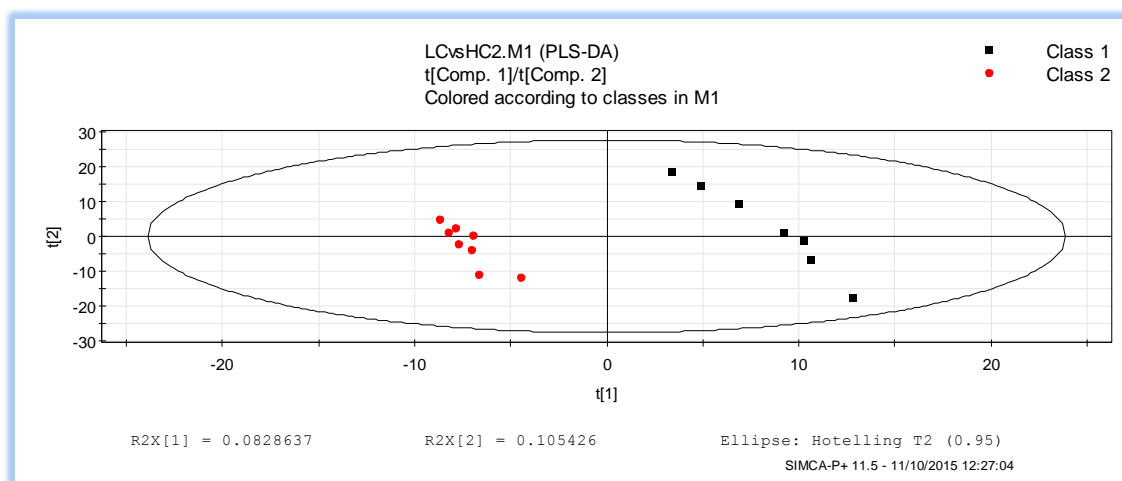


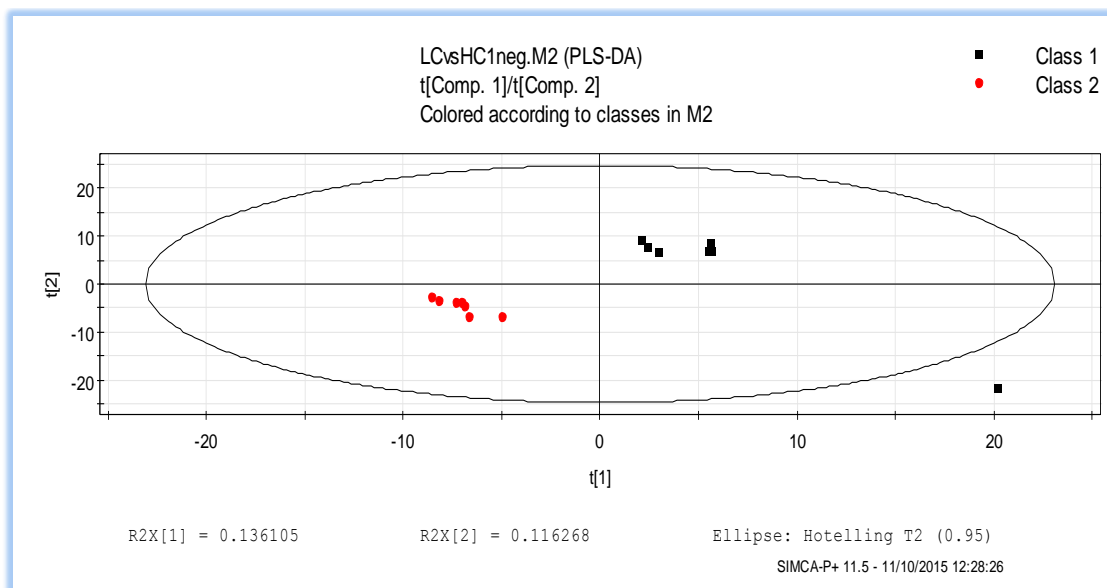
Figura 16. Representación de scores (PLS-DA) de muestras de con distinto índice de hemólisis: puntos negros, CP (LC) con  $IH < 20$  g/dl; puntos azules CP con  $IH > 80$  g/dl; rojo CS (HC) con  $IH < 20$  g/dl; verde CS con  $IH > 80$  g/dl.

Ya que el metabolito clave en la hemólisis es la hemoglobina, cuando representamos el grupo CP vs CS con índices de hemólisis > 20 mg/dl, se observa en los espectros de masas una clara alteración en la intensidad del pico correspondiente a la hemoglobina con m/z 616.4. Por tanto, la hemólisis influye en los perfiles metabólicos del suero, no sólo porque se observa separación de un mismo grupo con diferente grado hemolítico (negro vs azul y rojo vs verde), sino porque a medida que aumenta el grado de hemólisis en las muestras el PLS-DA no es capaz de discriminar entre CP y CS. Por lo que es totalmente necesario evitar la hemólisis en los estudios metabólicos.

Una vez establecida esta influencia, se ha realizado un estudio piloto para comprobar los metabolitos alterados en el grupo de CP frente a CS, utilizando muestras con índice hemolítico menor de 20 (figura 17, ionización en modo positivo y figura 18, ionización en modo negativo). Observamos que la diferenciación entre grupos es clara.



**Fig. 17. Representación de scores (PLS-DA) de muestras de CP (puntos rojos) y CS (puntos negros) con índice de hemólisis <20mg/dl. A partir de espectros de masas con modo de ionización positivo.**



**Figura 18. Representación de scores (PLS-DA) de muestras de CP (puntos rojos) y CS (puntos negros) con índice de hemólisis <20mg/dl. A partir de espectros de masas con modo de ionización negativo.**

### 5.2.1. Valoración global de la influencia de la hemólisis en los patrones metabolómicos

Partiendo de los resultados anteriormente comentados, destacamos los siguientes puntos:

- Por una parte, encontramos una clara diferencia entre los perfiles metabolómicos de los sujetos sanos y los pacientes con cáncer de pulmón al estudiar la muestra global (sin separar por el grado de hemólisis). Hay que destacar que el grado de hemólisis entre ambos grupos fue similar, y con distribución homogénea entre ellos.
- Al separar por el índice de hemólisis, en las muestras no hemolizadas o ligeramente hemolizadas también se diferenciaron claramente los perfiles metabolómicos entre sanos y pacientes con CP; sin embargo, las muestras claramente hemolizadas (> 80 mg/dl) no permitieron dicha diferenciación entre sanos y pacientes con CP. En este sentido, al igual que opinan otros autores (180),

(185), se deberían invalidar para los estudios metabolómicos las muestras con una hemólisis evidente.

- Otro aspecto es la posible influencia de la hemólisis no solo en los perfiles metabolómicos sino también en los metabolitos causantes de las diferencias entre ellos. En nuestra muestra global se establecieron unos posibles metabolitos candidatos a biomarcadores, algunos de ellos posiblemente influenciados por la hemólisis, por lo que tendrán que ser confirmados en nuevos estudios con suficiente número de muestras libres de hemólisis.
- Por último, parece que la hemólisis puede influir en diversos metabolitos más que en la capacidad de discriminar perfiles metabolómicos entre sanos y pacientes con CP.

En resumen, y en función de los resultados obtenidos tras el análisis metabolómico de las muestras incluidas en el estudio y evaluación de la influencia de la hemólisis, con los resultados obtenidos podemos concluir que la hemólisis es un factor perturbador en estudios metabolómicos relacionados con el cáncer de pulmón, y que la capacidad de discriminación entre ambos grupos a estudio (CP y CS) disminuye con el aumento de las concentraciones de hemoglobina.

### **5.3. PERFILES METABOLÓMICOS EN MUESTRAS DE SUERO NO HEMOLIZADAS**

#### **5.3.1. Características demográficas y clínicas**

Considerando la influencia que la hemólisis tiene en los resultados de estudios metabolómicos anteriores, se ha vuelto a repetir la experiencia descrita en el Apartado

5.1.3, pero seleccionando muestras con índice de hemólisis inferior a 20 g/dl, que como se ha visto en el Apartado 5.2. permiten una buena clasificación de las muestras.

En todos los casos el índice de hemólisis es inferior a 20 g/dl y se consideraron tres grupos: pacientes con cáncer de pulmón (CP), pacientes con enfermedad pulmonar no cáncer, denominados en nuestro estudio controles enfermos (CE), y controles sanos (CS).

Los sujetos incluidos finalmente en el estudio fueron los siguientes: 15 pacientes con CP, con una edad media de  $67 \pm 13$  años y predominio del sexo masculino (12 hombres y 3 mujeres). Al igual que en los grupos inicialmente incluidos en el estudio, de 30 CP y 30 CS, la comorbilidad más prevalente fue la HTA, seguida de la Diabetes Mellitus y la EPOC para los tres grupos. En el apartado de hábito tabáquico, en su mayoría eran ex fumadores. En cuanto a las estirpes histológicas, como se muestra en la tabla 8, las más repetidas fueron el cáncer de pulmón de células grandes y el epidermoide. En el grupo de CE o control enfermo, compuesto también por 15 sujetos, de las patologías respiratorias no neoplásicas presentes en el momento de inclusión en el estudio las que mayor prevalencia presentaron fueron las llamadas enfermedades pulmonares intersticiales difusas, con un 40%, seguida de la Sarcoidosis con un 13.3% y otras como infección tuberculosa, neumonía o bronquiectasias, con menor representación. En el grupo CS, compuesto por 16 sujetos, al contrario que en los grupos anteriormente descritos, la predominancia en cuanto a sexo varía, el resto de características aparecen expuestas en la tabla 8.

**Tabla 8: características epidemiológicas del subgrupo de pacientes con muestras no hemolizadas.**

	<b>Cáncer de pulmón (n=15)</b>	<b>Control enfermo (n=15)</b>	<b>Control sano (n=16)</b>
<b>Sexo (H/M)</b>	12/3	10/5	7/9
<b>Edad media</b>	67 ± 15	52 ± 10	54 ± 19
<b>Comorbilidad</b>	HTA (73%), DM (13.3%), EPOC (20%)	HTA (13%), EPOC (6.6%)	HTA (37.5%), DM (25%)
<b>Tabaquismo</b>			
- Fumador	2 (2H/0M)	2 (2H/0M)	1 (1H/0M)
- Ex fumador	12 (10H/2M)	11 (8H/3M)	9 (5H/4M)
- Nunca fumador	1 (0H/1M)	2 (0H/2M)	6 (1H/5M)
<b>Histología</b>			
- Adenocarcinoma	2 (1H/1M)		-
- Epidermoide	4 (3H/1M)		-
-CP cls. grandes	5 (4H/1M)		-
- CPCP	2 (2H/0M)		-
-Tumor Carcinoide	2 (2H/0M)		-
<b>Estadios CP</b>			
- I (a y b)	4		-
- II (a y b)	1		-
- III (a y b)	2		-
- IV	8		-

HTA: Hipertensión Arterial, DM: Diabetes Mellitus, EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, H: Hombre, M: Mujer, CP: Cáncer de Pulmón, Cls: Células, CPCP: Cáncer de Pulmón de Células Pequeñas.

### 5.3.1.1. Tipos histológicos de cáncer de pulmón en la población estudiada

Entre los distintos tipos histológicos, encontramos un 33.3% para cáncer de pulmón de células grandes, 26.6% epidermoide, 13.3% Cáncer de Pulmón de células pequeñas y otro 13.3% entre carcinoide y adenocarcinoma, distribución que se muestra en la figura 19.

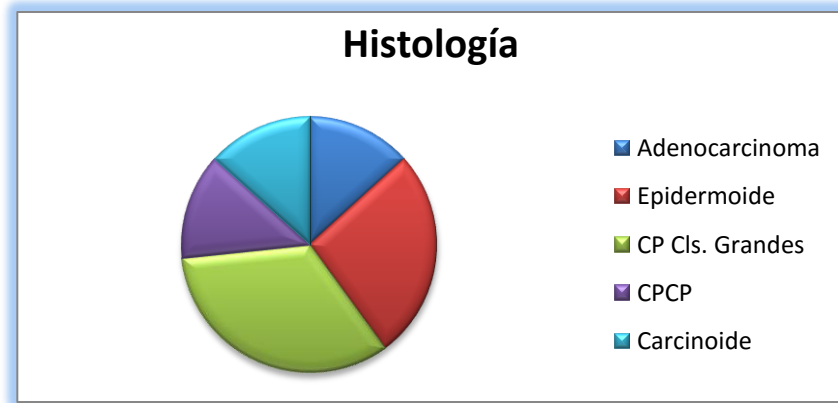


Figura 19. Diferentes tipos histológicos en la población estudiada

### 5.3.1.2. Estadios de cáncer de pulmón en la población estudiada

Se revisó el estadio de la enfermedad en el que se encontraban los pacientes con CP en el momento de su diagnóstico, siendo destacable como se observa en la figura 20, el alto porcentaje de estadios evolucionados de la enfermedad (más del 50% en estadio IV).

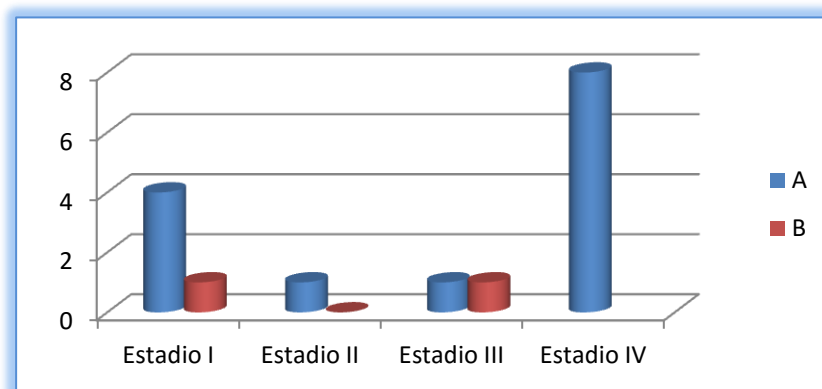


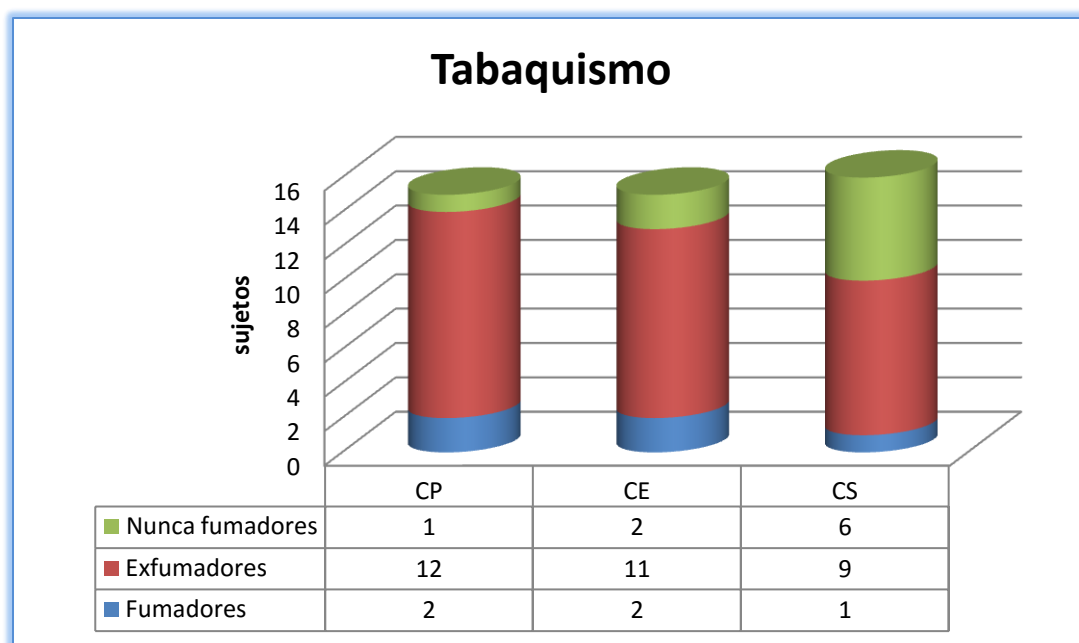
Figura 20. Distribución de la población según estadio de cáncer de pulmón (Estadios IA, IIA, IIIA y IV en azul y Estadios IB, IIB y IIIB en rojo).

### 5.3.1.3. Antecedentes neoplásicos previos en la población estudiada

Es importante destacar que de los 15 pacientes del grupo de casos, un 13.3% (n=2), presentaron antecedentes de neoplasias previas (cáncer de esófago y laringe). Ambos eran varones y tenían historia de tabaquismo.

### 5.3.1.4. Hábito tabáquico en la población estudiada

El porcentaje de fumadores activos en el momento de la inclusión en el estudio era reducido para todos los grupos, mientras que el grueso se contaba entre los que habían sido fumadores pero en el momento del estudio habían cesado el hábito durante al menos 6 meses (Ex fumadores), con un 80% entre los pacientes con CP, el 73.3% en CE y 56% en CS. En este último grupo de controles sanos cabe destacar que el porcentaje de no fumadores fue bastante superior (37.7%) con respecto al resto (figura 21).



**Figura 21. Hábito tabáquico en los diferentes grupos a estudio: CP (Cáncer de Pulmón), CE (Controles enfermos) y CS (Controles Sanos).**

### 5.3.2. Perfiles metabolómicos en muestras de suero sin hemólisis

Una vez realizado el análisis estadístico, obtenemos los espectros de masas característicos de muestras de cada grupo, representados en las figuras de la 22 a la 24, a partir de los extractos polares.

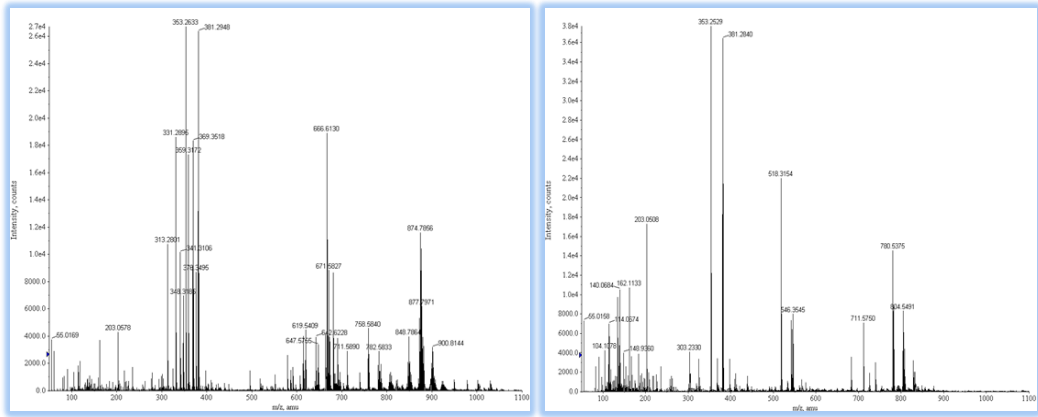


Figura 22. Espectro de masas-tipo de muestras de enfermos de cáncer de pulmón (CP), obtenidas a partir de suero sin hemólisis (IH < 20mg/dl). Extracto apolar izquierda, extracto polar derecha.

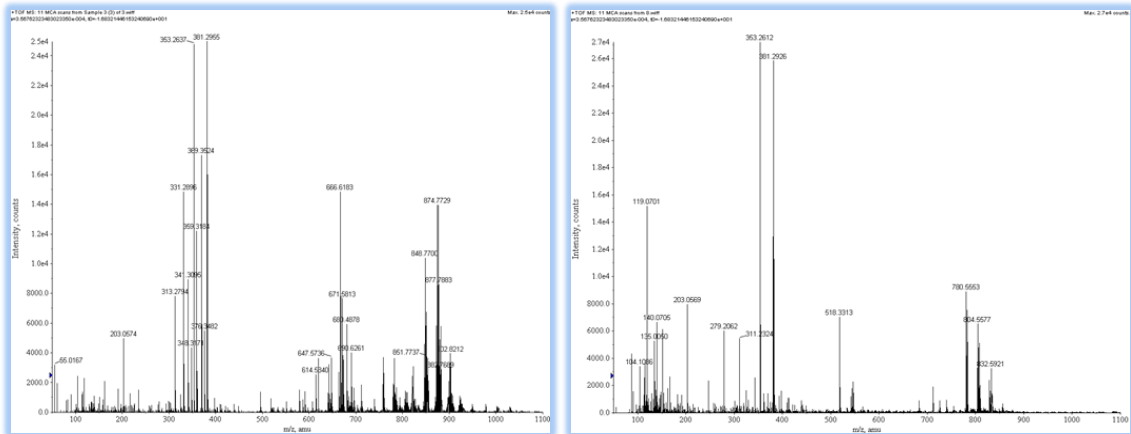


Figura 23. Espectro de masas-tipo de muestras de pacientes con enfermedad pulmonar no tumoral (CE), obtenidas a partir de suero sin hemólisis (IH < 20mg/dl). Extracto apolar izquierda, extracto polar derecha.

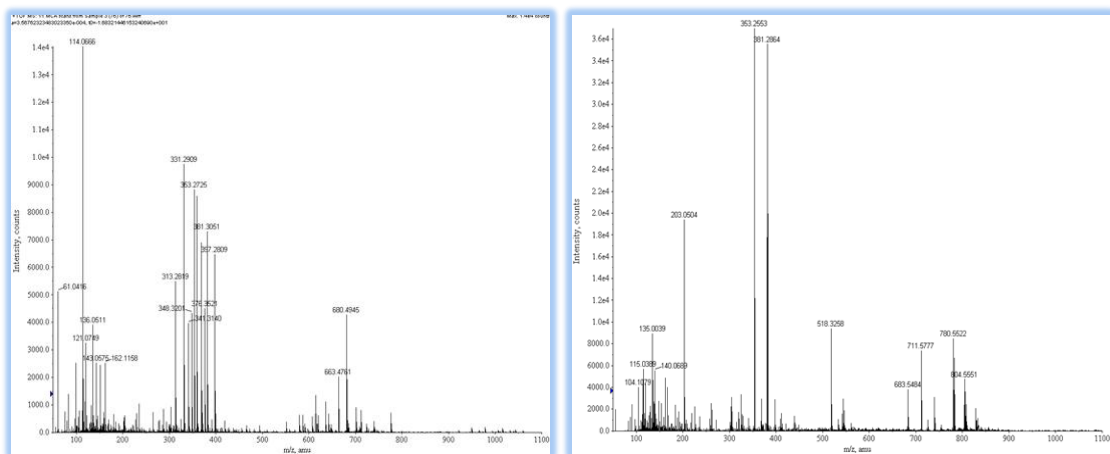
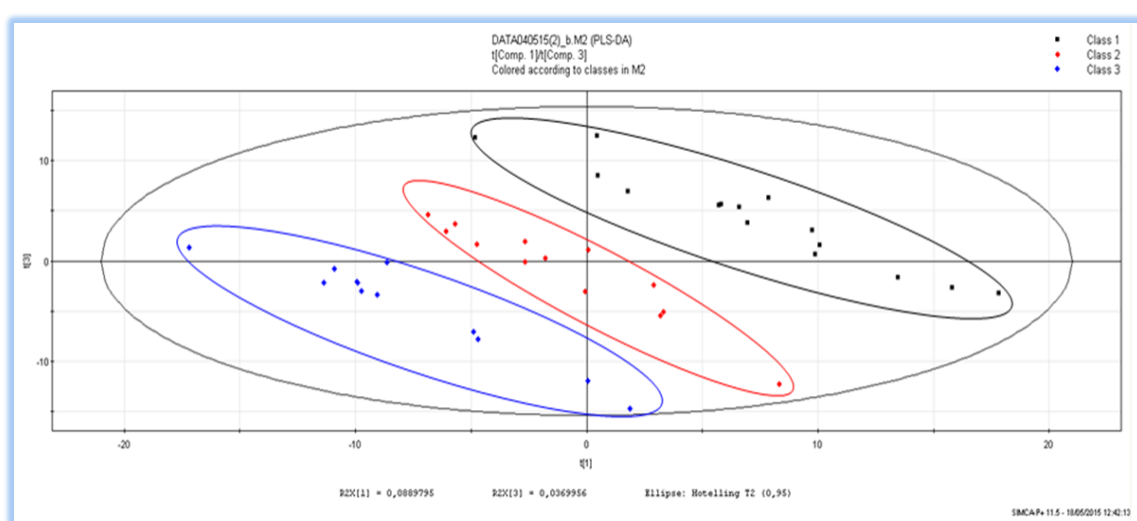


Figura 24. Espectro de masas-tipo de muestras de controles sanos (CS), obtenidas a partir de suero sin hemólisis (IH < 20). Extracto apolar izquierda, extracto polar derecha.

Aunque se observan diferencias entre los espectros de las figuras 22 a 24, la simple inspección visual no es suficiente para poder diferenciarlos de manera significativa, por lo que hemos utilizado un tratamiento estadístico mediante análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), que permite establecer diferencias entre los grupos estudiados. A pesar que el número de muestra no es muy elevado (15 de enfermos con cáncer de pulmón, 15 muestras de controles enfermos y 16 controles sanos), representa un número suficiente para sacar conclusiones significativas.



**Figura 25. Gráfica de “scores” correspondiente a extractos polares de los diversos grupos considerados: cáncer de pulmón (CP), puntos negros; controles enfermos no cáncer (CE), puntos rojo; controles sanos (CS) puntos azules.**

### Extractos polares

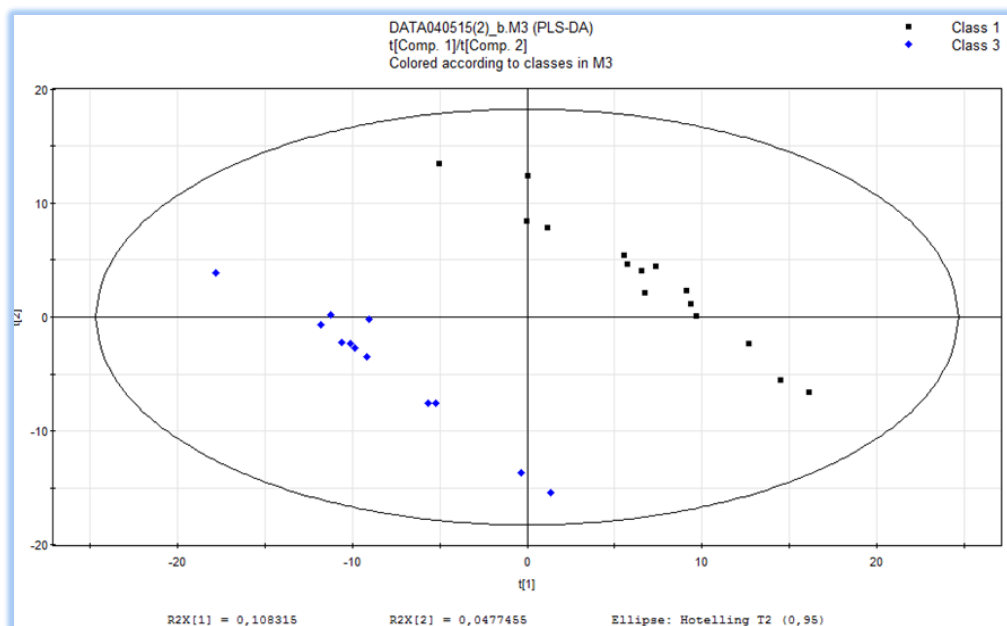
Como puede observarse en la figura 25, se produce una clara separación entre los tres grupos de estudio, presentándose una progresión en los clúster a medida que se avanza tanto en el eje de abscisas como en el eje de ordenadas. La componente uno separa al grupo de control sano del grupo de cáncer, quedando el control sano a la izquierda, el cáncer a la derecha y en medio el grupo de control enfermo. De forma similar la componente tres separa estos grupos. Puede decirse que la gráfica muestra una

progresión de la enfermedad (partiendo de sujetos sin patología a nivel pulmonar, seguido de enfermos pulmonares no cáncer y en último lugar los pacientes con CP), ordenándose los puntos de izquierda a derecha.

Con el fin de encontrar las variables que permitan discriminar entre los grupos estudiados, y que puedan servir como potenciales biomarcadores en el cáncer de pulmón, se representaron las gráficas de PLS-DA de los tres grupos estudiados de dos en dos:

- Control sano vs Cáncer de pulmón
- Control enfermo vs Cáncer de pulmón

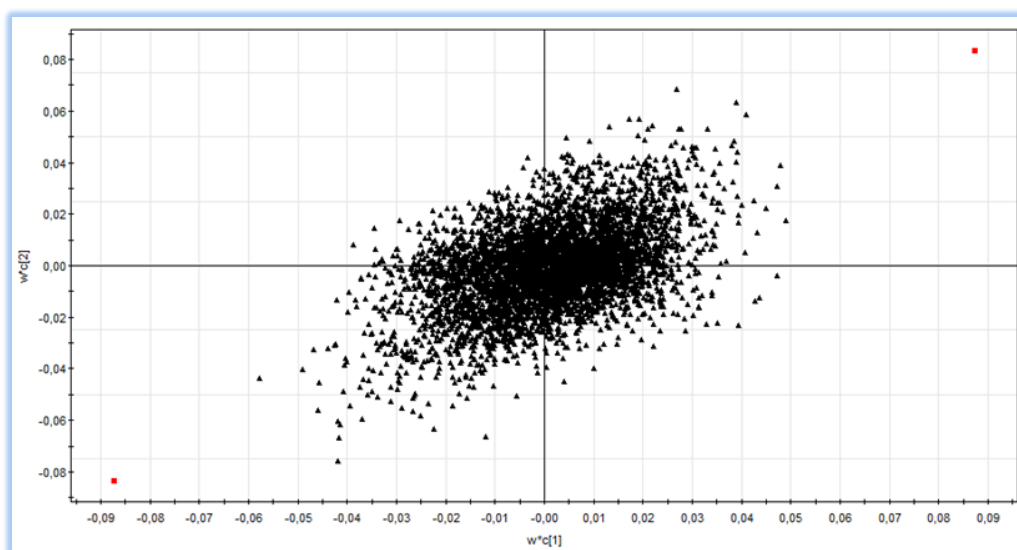
En la figura 26 se observa una buena clasificación entre los enfermos de cáncer y los controles sanos.



**Figura 26. Gráfica de "scores" correspondiente a extractos polares cáncer de pulmón (CP), puntos negros frente a controles sanos (CS), puntos azules.**

La representación del gráfico de "loadings" correspondiente al tratamiento de los resultados mediante PLS-DA (figura 27), nos muestra los metabolitos que contribuyen a

una mayor discriminación entre clases, que son los situados en los extremos de la nube de dispersión. Los triángulos representan a los metabolitos o variables, de tal forma que aquellos situados en el centro de la nube de puntos no contribuyen a la clasificación, mientras que los situados a la derecha, por encima de la línea horizontal, se encuentran sobreexpresados en el grupo de cáncer, y los situados a la izquierda, por debajo de esta línea, están inhibidos en este grupo (o sobreexpresados en el grupo de controles sanos).



**Figura 27. Representación de la gráfica de “loadings” (PLS-DA) correspondiente a la discriminación de cáncer de pulmón vs controles sanos. Extracto polar.**

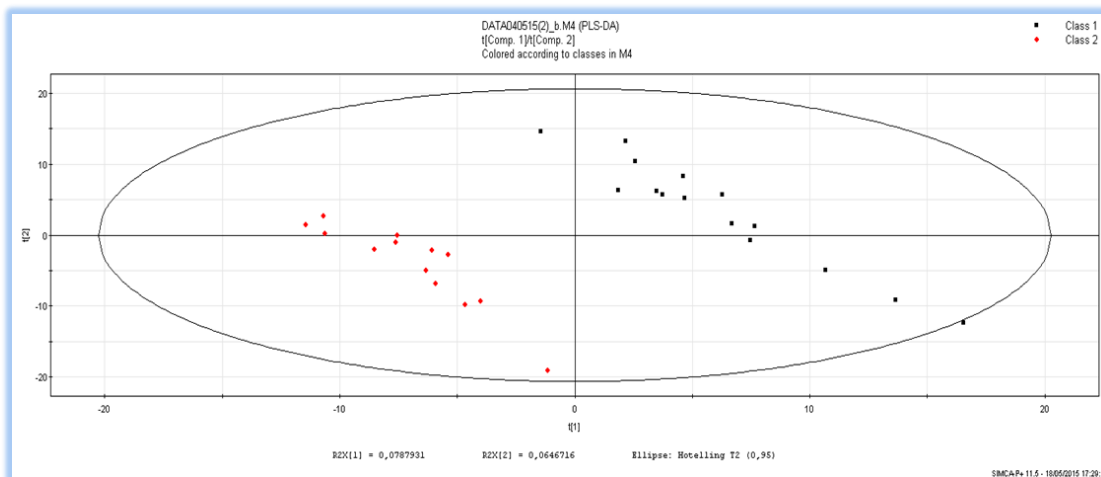
Los metabolitos que se han identificado, aquellos que han experimentado cambios en su expresión entre el grupo de CP y CS, se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 9. Metabolitos alterados en cáncer de pulmón con respecto a controles sanos. Extracto polar.**

m/z	METABOLITO	FOLD CHANGE (%)
61,0413	Urea	-41,6
120,0535	Treonina	46,2
133,0147	L-Ornitina	-31,9
147,0672	Glutamina	34,9
532,348	Lisofosfocolina (LPC)	-0,8
542,3289	LPL	-23,3
546,3591	LPL	-12,7
566,3296	LPL	-20,2
768,5712	Fosfocolina (PC)	29,8
782,5668	PL	27,5
784,5777	PL	37,6
798,5502	PL	25,1
810,5977	PL	34,0
844,5575	PL	25,6
850,5669	PL	26,8
856,5858	PL	38,7
858,5919	PL	35,1
894,5825	PL	24,4

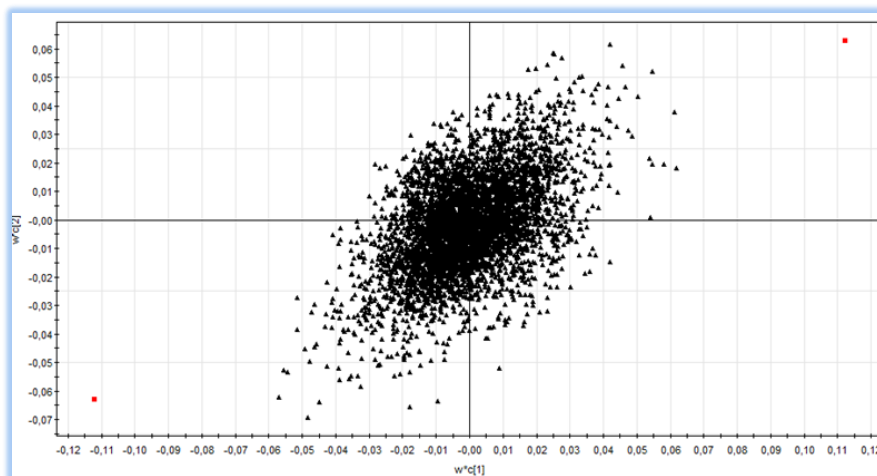
PC: Fosfocolina; PL: Fosfolípidos; LPC: Lisofosfocolina.

En la figura 28 observamos los “scores” del estudio PLS-DA de los casos de CP frente a CE. Se observa que en la región inferior izquierda se agrupan las variables representativas de las muestras de control enfermo, mientras que en la esquina superior derecha se encuentran las correspondientes a las muestras de cáncer.



**Figura 28. Gráfica de “scores” correspondiente a extractos polares cáncer de pulmón (CP), puntos negros frente a controles enfermo no cáncer (CE), puntos rojos. Extractos polares.**

En este caso en la representación de “loadings” (figura 29), las variables o metabolitos con cambio de expresión en las muestras de control enfermo se encuentran en la región inferior izquierda, mientras que en la esquina superior derecha se encuentran las correspondientes a las muestras de cáncer.



**Figura 29. Representación de la gráfica de “loadings” (PLS-DA) correspondiente a la discriminación de cáncer vs controles con enfermedad pulmonar no cáncer. Extracto polar.**

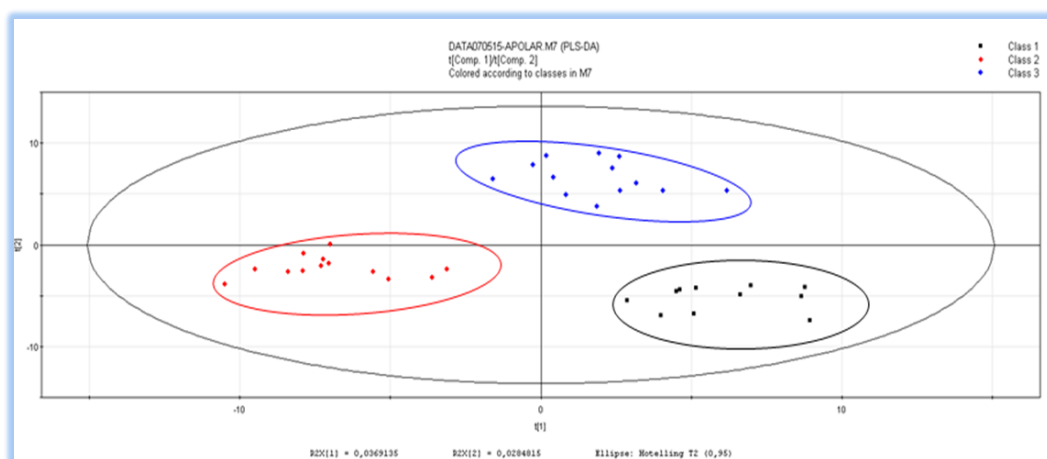
**Tabla 10.- Metabolitos alterados en cáncer de pulmón con respecto a controles con enfermedad pulmonar no cáncer. Extracto polar.**

m/z	METABOLITO	FOLD CHANGE (%)
61,04	Urea	-35,6
120,05	Treonina	38,5
147,06	Glutamina	15,2
184,09	Fosfocolina (PC)	-15,9
372,2	C14-CAR	-29,3
542,3	Lisofosfocolina (LPC)	-11,3
546,3	LPC(20:3)	-13,6
808,5	PC(18;2/18:0)	-15,4
826,5	PC(16:1/22:6)	-12,1
828,5	PC(16:0/22:6)	-13,3
838,5	PC	-22,2
846,5	PC	-11,9
856,5	PC(18:0/22:6)	-18,7
860,5	PC	-16,4
862,5	PL	-15,7
866,5	PL	-23,9
868,5	PL	-18,7
888,5	PL	-23,1
890,5	PL	-18,7
892,5	PL	-14,3
894,5	PL	-12,1
896,5	PL	-17,8
898,5	PL	-15,5

PC: Fosfocolina; PL: Fosfolípidos; CAR: Carnitina; LPC: Lisofosfocolina.

## Extractos apolares

De manera análoga se repitió el estudio utilizando los extractos apolares. En este caso el análisis discriminante, permite observar la separación entre los 3 grupos estudiados: CP, CE y CS, como se observa en la figura 30. El grupo control sano queda en la parte superior del gráfico PLS-DA de modo que separa por la componente 2 de los otros dos grupos (cáncer de pulmón y control enfermo), y a su vez, la componente uno separa al grupo de los controles enfermos de los pacientes con cáncer de pulmón, quedando los controles enfermos a la izquierda de la elipse y los casos de cáncer a la derecha.



**Figura 30. Gráfica de “scores” correspondiente a extractos apolares de los diversos grupos considerados: cáncer de pulmón (CP), puntos negros; controles enfermos no cáncer (CE), puntos rojo; controles sanos (CS), puntos azules.**

Con el fin de complementar el conocimiento sobre las variables (metabolitos) que discriminan entre los grupos estudiados, considerando ahora los resultados de los extractos apolares, se han representado de nuevo las gráficas de PLS-DA de los tres grupos estudiados de dos en dos, como se hizo con los extractos polares. En la figura 31 se muestran la representación de los “scores” de los resultados de extractos apolares de las muestras de CP frente a controles sanos. En la figura 32 se muestra la representación de “loadings” entre estos dos grupo. Pueden observarse los metabolitos que sufren

alteración en su expresión, los cuales fueron posteriormente identificados mediante experiencias MS/MS y se muestran en la Tabla 11.

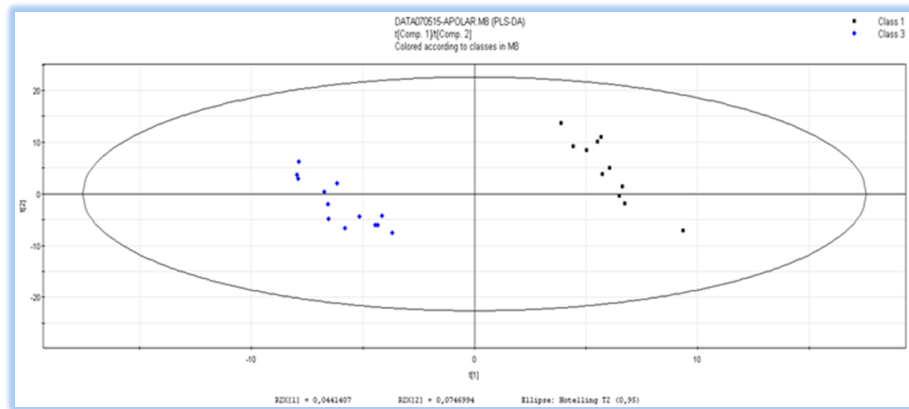


Figura 31. Gráfica de “scores” correspondiente a extractos apolares cáncer de pulmón (CP), puntos negros frente a controles sanos (CS), azules.

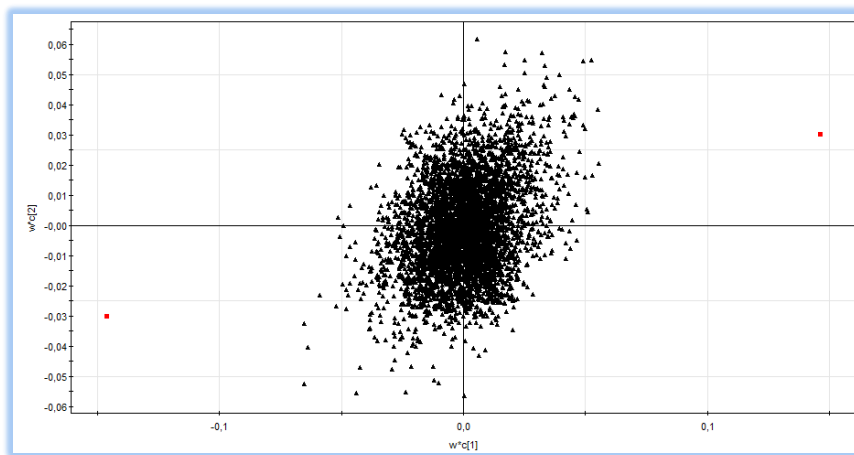


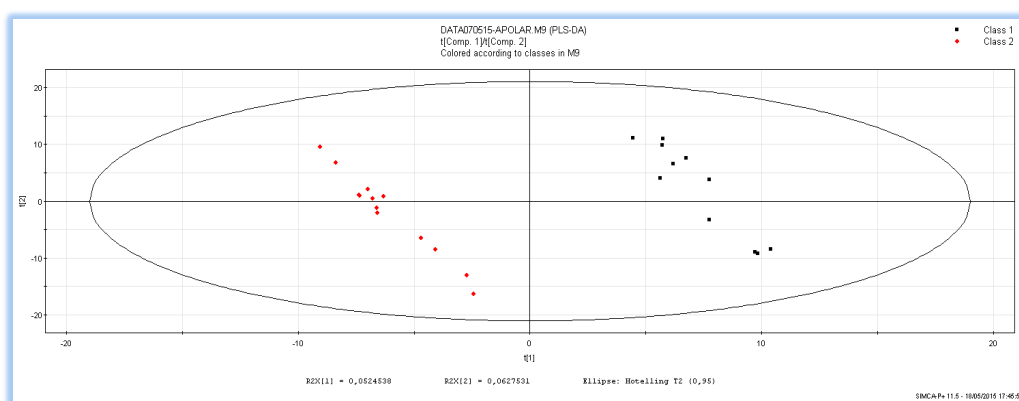
Figura 32. Representación de la gráfica de “loadings” (PLS-DA) correspondiente a la discriminación de cáncer vs controles sanos. Extracto apolar.

Tabla 11.- Metabolitos alterados en cáncer de pulmón con respecto a controles sanos. Extracto apolar.

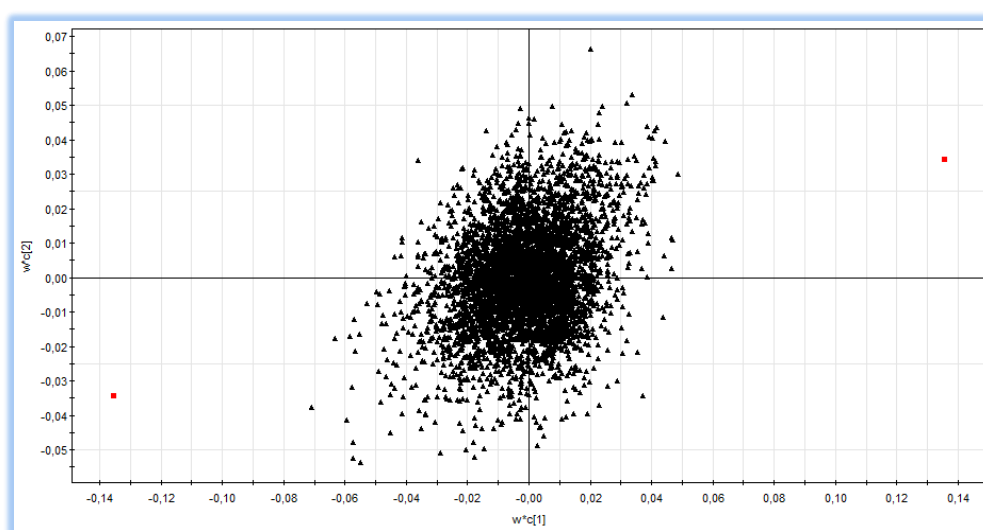
m/z	METABOLITO	FOLD CHANGE (%)
870,7	TAG	-19,9
880,7	TAG	-23,1
900,8	TAG	-13,3
934,8	TAG	-14,7

TAG: triacilglicéridos.

En la figura 33 se muestra la representación de “scores” de enfermos no cáncer frente a enfermos con cáncer de pulmón, que se clasifican perfectamente en dos grupos. La figura 34 de “loadings” permite caracterizar los metabolitos que sufren cambios significativos en los enfermos de cáncer obtenidos a partir del extracto apolar. Se agrupan las variables representativas de las muestras de control enfermo, mientras que en la esquina superior derecha se encuentran las correspondientes a las muestras de cáncer. Los metabolitos con cambios de expresión significativos en estos extractos apolares se muestran en la tabla 12.



**Figura 33. Gráfica de “scores” correspondiente a extractos apolares de cáncer de pulmón (CP), puntos negros frente a controles enfermo no cáncer (CE), puntos rojos.**



**Figura 34.- Representación de la gráfica de “loadings” (PLS-DA) correspondiente a la discriminación de cáncer vs controles con enfermedad pulmonar no cáncer. Extracto apolar.**


**Tabla 12.- Metabolitos alterados en cáncer de pulmón con respecto a controles con patología pulmonar no cáncer. Extracto apolar.**

m/z	METABOLITO	FOLD CHANGE (%)
796,7	TAG	-48,4
870,7	TAG	-26,6
872,7	TAG	-22,5
934,8	TAG	-11,5

TAG: triacilglicérido

En las tablas 13 y 14 se resumen los resultados obtenidos en los diversos estudios realizados: se muestran los metabolitos alterados en los casos de cáncer respecto a pacientes con enfermedad pulmonar no cáncer en la tabla 13, y controles sanos en la tabla 14. Las tablas indican la sobreexpresión (↑) o inhibición (↓) que experimentan los metabolitos, y la evaluación semicuantitativa (*fold change*) de dicho cambio.



**Tabla 13.- Resumen de los cambios de expresión de los metabolitos en enfermos de cáncer de pulmón respecto a controles enfermos sin cáncer.**

m/z	Metabolito	Extracto	Fold Change (%)	Alteración 
61,0416	<b>Urea</b>	POLAR	-35,6	↓
120,053	<b>Treonina</b>	POLAR	38,5	↑
147,0669	<b>Glutamina</b>	POLAR	15,2	↑
184,0974	<b>Fosfocolina</b>	POLAR	-15,9	↓
372,2473	<b>C14-CAR</b>	POLAR	-29,3	↓
542,3288	<b>LPC</b>	POLAR	-11,3	↓
546,3591	<b>LPC(20:3)</b>	POLAR	-13,6	↓
796,7923	<b>TAG</b>	APOLAR	-48,4	↓
808,586	<b>PC(18;2/18:0)</b>	POLAR	-15,4	↓
826,5576	<b>PC(16:1/22:6)</b>	POLAR	-12,1	↓
828,5578	<b>PC(16:0/22:6)</b>	POLAR	-13,3	↓

838,5217	PC	POLAR	-22,2	↓
846,558	PC	POLAR	-11,9	↓
856,5855	PC(18:0/22:6)	POLAR	-18,6	↓
860,5802	PC	POLAR	-16,4	↓
862,5246	PL	POLAR	-15,7	↓
866,547	PL	POLAR	-23,9	↓
868,5558	PL	POLAR	-18,7	↓
870,7629	TAG	APOLAR	-26,6	↓
872,7765	TAG	APOLAR	-22,5	↓
888,5339	PL	POLAR	-23,1	↓
890,551	PL	POLAR	-18,7	↓
892,5682	PL	POLAR	-14,3	↓
894,5825	PL	POLAR	-12,1	↓
896,527	PL	POLAR	-17,8	↓
898,5264	PL	POLAR	-15,5	↓
934,8058	TAG	APOLAR	-11,5	↓

TAG: Triacilglicéridos; PL: Fosfolípidos; PC: Fosfatidilcolina; CAR: Carnitina; LPC: Lisofosfatidilcolinas; LPL: Lisofosfolípidos.

**Tabla 14.- Resumen de los cambios de expresión de los metabolitos en pacientes con cáncer de pulmón respecto a controles sanos**

m/z	Metabolito	Extracto	Fold Change (%)	Alteración  
61,0413	Urea	POLAR	-41,6	↓
120,0535	Treonina	POLAR	46,2	↑
133,0147	L-Ornitina	POLAR	-31,9	↓
147,0672	Glutamina	POLAR	34,9	↑
532,348	LPL	POLAR	-0,8	↓
542,3289	LPL	POLAR	-23,3	↓
546,3591	LPL	POLAR	-12,7	↓

566,3296	<b>LPL</b>	POLAR	-20,2	↓
768,5712	<b>PL</b>	POLAR	29,8	↑
782,5668	<b>PL</b>	POLAR	27,5	↑
784,5777	<b>PL</b>	POLAR	37,6	↑
798,5502	<b>PL</b>	POLAR	25,1	↑
810,5977	<b>PL</b>	POLAR	34,0	↑
844,5575	<b>PL</b>	POLAR	25,6	↑
850,5669	<b>PL</b>	POLAR	26,8	↑
856,5858	<b>PL</b>	POLAR	38,7	↑
858,5919	<b>PL</b>	POLAR	35,1	↑
870,7629	<b>TAG</b>	APOLAR	-19,9	↓
880,7634	<b>TAG</b>	APOLAR	-23,1	↓
894,5825	<b>PL</b>	POLAR	24,4	↑
900,8067	<b>TAG</b>	APOLAR	-13,3	↓
934,8058	<b>TAG</b>	APOLAR	-14,7	↓

TAG: Triacilglicéridos; PL: Fosfolípidos; CAR: Carnitina; LPL: lisofosfolípidos.

### 5.3.3. Discusión sobre alteración de rutas metabólicas causadas por el cáncer de pulmón

Utilizando los resultados que se muestran en la tabla 14, se ha llevado a cabo un estudio de las rutas metabólicas que se alteran como consecuencia del proceso oncológico en relación a los controles sanos. Las familias de metabolitos que sufren cambios en su expresión en los enfermos con cáncer, a consecuencia de esta enfermedad son:

- Con niveles sobreexpresados: La presencia de fosfolípidos aumenta en los enfermos con cáncer de pulmón respecto a los controles sanos (figura 34), posiblemente por el incremento de la proliferación celular que produce la

demanda de estos componentes de la membrana celular. Todas las células eucariotas están rodeadas por una membrana cuya base estructural es una bicapa lipídica. Debido a la incontrolada división celular que se produce en el cáncer, se crean numerosas células invasivas que necesitan de estos compuestos lipídicos y por ello se pueden ver aumentados en el cáncer. La glutamina es un aminoácido abundante en sangre, y una vez dentro de la célula constituye un importante sustrato en el metabolismo energético celular. Parece afectar al transporte de aminoácidos y autofagia a través de la activación del complejo mTOR 1 (32). Es bien sabido que las células cancerosas utilizan la glutamina como una importante fuente de energía (13). El metabolismo de la glutamina permite a las células tumorales sostener la actividad del ciclo de Krebs durante la proliferación tumoral, y está en relación con la síntesis de macromoléculas mediante las llamadas reacciones anapleróticas. La treonina es un aminoácido polar que puede ser convertido en piruvato, constituyendo una vía de intersección en varias rutas metabólicas, que puede promover la metabolización a otros aminoácidos, incluyendo glicina y alanina (186). Se ha identificado una proteína con actividad de serina-treonina quinasa (LKB1), implicada en la polaridad celular, el metabolismo energético, la apoptosis, la detención del ciclo celular y la proliferación celular, participando en estos procesos con función supresora de tumores y con actividad catalítica (32).

- Con niveles disminuidos: La L-ornitina es un compuesto químico orgánico del grupo de los  $\alpha$ -aminoácidos, que juega un papel importante en el ciclo de la urea. Su síntesis se produce a partir de la L-arginina por acción de la enzima arginasa

hidrolasa para obtener como producto de esta reacción la urea, de ahí la importancia de la ornitina en este ciclo. La síntesis está condicionada por las reservas de arginina procedentes de la dieta, de forma que una disminución en ésta (como hemos obtenido en nuestro estudio) condiciona un aumento de la producción de ornitina a partir del glutamato a nivel mitocondrial, que posteriormente pasa al citosol para la biosíntesis de prolinas. El metabolismo de las proteínas tiene como producto final la urea, la cual es sintetizada a partir de diversas reacciones químicas en el ciclo de la urea. Este ciclo es especialmente importante en el metabolismo de los aminoácidos (134), estando relacionado por tanto con el metabolismo energético. Como se ha mencionado anteriormente, algunos de los metabolitos intermediarios involucrados en este ciclo están disminuidos en procesos cancerosos, como es el caso de la ornitina, involucrada directamente en la formación de urea, por lo que se podría explicar en base a esto la disminución de este compuesto observada en nuestros resultados. Los lisofosfolípidos (LPL) son glicerofosfolípidos que presentan un grupo acilo menos en su estructura, y la acetilación de un grupo hidroxilo. Poseen propiedades similares a los fosfolípidos. La principal diferencia con respecto a estos es que se encuentran en pequeñas cantidades en las membranas biológicas. Son moléculas de señalización de membranas con relevancia en multitud de procesos fisiológicos. Están implicados en un número creciente de trastornos tales como la inflamación, enfermedades autoinmunes, dolor neuropático, la aterosclerosis, el cáncer y la obesidad (8). Los triacilglicéridos (TAGs) son macromoléculas lipídicas encargadas del almacenamiento de los ácidos grasos para su posterior utilización como fuente de energía mediante una serie de reacciones conocidas como  $\beta$ -

oxidación. La principal enzima encargada de la degradación de esta macromolécula es la triacilglicerol lipasa, y su catabolismo dependerá entonces de su entrada o no en el interior mitocondrial. Los ácidos grasos liberados son degradados hasta conseguir un intermediario común: Acetil-CoA. Éste último continuará su proceso oxidativo a través del ciclo del ácido cítrico. En nuestro estudio, los niveles de triacilglicéridos se encuentran disminuidos, probablemente en relación con un mayor consumo de energía, y fomento por tanto de la  $\beta$ -oxidación, vía metabólica aumentada en procesos cancerosos en los que existe un incremento de la lipólisis, con movilización de TAGs.

La validación interna de la ecuación de regresión fue realizada mediante la evaluación de los valores AUC de las curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para cada metabolito. En la tabla 15 aparecen los valores de AUC para cada metabolito referido en nuestros resultados.

**Tabla 15.- Valor AUC para aquellos metabolitos que varían su expresión entre cáncer de pulmón y control sano.**

m/z	Metabolito	AUC value
<b>133.01</b>	L-Ornitina	0.90
<b>566.33</b>	LPL	0.86
<b>61.04</b>	Urea	0.82
<b>542.33</b>	LPL	0.77
<b>120.05</b>	L-Treonina	0.75
<b>546.36</b>	LPL	0.74
<b>532.35</b>	LPL	0.73
<b>858.59</b>	PL	0.70
<b>856.59</b>	PL	0.65
<b>934.81</b>	TAG	0.65
<b>798.55</b>	PL	0.59
<b>147.07</b>	L-Glutamina	0.58
<b>810.60</b>	PL	0.58
<b>784.58</b>	PL	0.58

<b>844.56</b>	PL	0.56
<b>768.57</b>	PL	0.55
<b>900.81</b>	TAG	0.54
<b>894.58</b>	PL	0.54
<b>850.57</b>	PL	0.53
<b>870.76</b>	TAG	0.53
<b>880.76</b>	TAG	0.53
<b>218.14</b>	C3-CAR	0.53
<b>782.57</b>	PL	0.52

LPL: Lisofosfolípido, PL: Fosfolípido, TAG: Triglicérido, C3-CAR: Propionil-carnitina.

Los valores AUC de la curva ROC para cada metabolito por encima de 0.75 (valor indicativo de buen test), indican que el metabolito en cuestión podría corresponder con un “buen biomarcador” (187). En los diferentes metabolitos mencionados en nuestro estudio como discriminantes entre cáncer de pulmón y controles sanos hemos obtenido las siguientes curvas (figura 35):

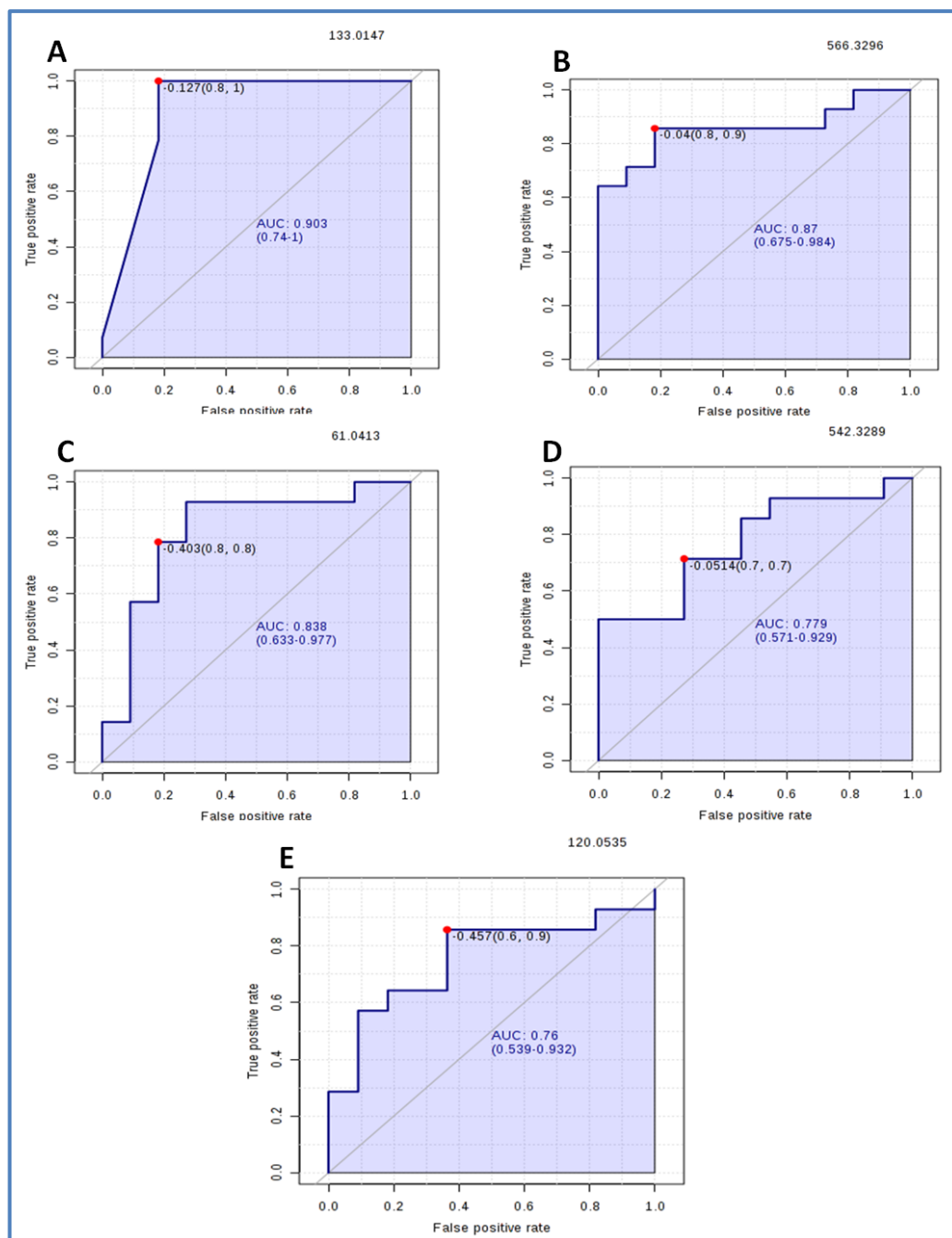


Figura 35. Representación de las curvas ROC con su valor correspondiente AUC para L-Ornitina (A), Lisofosfolípido m/z 566.3 (B), Urea (C), Lisofosfolípido m/z 542.(D) y L-Treonina (E).

## **5.4. INFLUENCIA DE LA CARGA TABÁQUICA EN LOS PERFILES METABOLÓMICOS DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN Y CONTROLES SANOS**

En nuestro trabajo, además de lo ya expuesto, hemos determinado la influencia de la carga tabáquica (CT) en los perfiles metabólicos de pacientes con CP y diferenciado cuales son aquellos metabolitos que causan la discriminación en fumadores con respecto a no fumadores. Todo ello puede contribuir a la búsqueda de un biomarcador útil para el diagnóstico de esta patología neoplásica, dada su establecida relación con el hábito tabáquico.

Incluimos en el estudio 12 pacientes reclutados con diagnóstico final de CP. El 75% eran varones, con una edad media de  $62 \pm 2$  años. Todos los integrantes de este grupo presentaban historia de tabaquismo (50% fumadores activos en el momento del diagnóstico y el otro 50%, ex fumadores). En cuanto a las estirpes histológicas, 6 de los casos correspondían a adenocarcinoma, y el 50% de éstos fueron diagnosticados en un estadio precoz (estadio I y II). De los cuatro casos con diagnóstico de carcinoma epidermoide de pulmón, el 50% presentaba datos de enfermedad extendida (estadio III y IV). Del resto de pacientes incluidos en el estudio, un caso de cáncer de pulmón de células grandes y otro de cáncer de pulmón de células pequeñas, ambos en estadios avanzados. Cabe destacar la presencia en un elevado porcentaje de pacientes con HTA (66.6%) como comorbilidad asociada, al igual que en la muestra general incluida inicialmente en nuestro estudio (30 CP y 30 CS). Solamente un caso de CP presentaba diagnóstico previo de EPOC. En la tabla 16 se recogen las características clínicas y epidemiológicas principales de ambos grupos.

Tabla 16: características de la población incluida en el estudio.

	Cáncer de pulmón (n=12)	Control sano (n=9)
<b>Sexo (H/M)</b>	8/4	2/7
<b>Edad media</b>	63 ± 2	62 ± 2
<b>Comorbilidad</b>	HTA (66.6%), DM (41.6%)	HTA (44.4%), DM (11%)
<b>Tabaquismo</b>		
- Fumador	6 (4H/2M)	-
- Ex fumador	6 (4H/2M)	-
- Nunca fumador	-	9
<b>Carga tabáquica</b>		
- Moderada (< 35p/año)	6	-
- Elevada (>70p/año)	6	-
<b>Histología</b>		
- Adenocarcinoma	6 (5H/1M)	-
- Epidermoide	4 (1H/3M)	-
- CP células grandes	1(1H/0M)	-
- CPCP	1(1H/0M)	-
<b>Estadios CP</b>		
- I (a y b)	1	-
- II (a y b)	4	-
- III (a y b)	4	-
- IV	3	-

HTA: Hipertensión Arterial, DM: Diabetes Mellitus, H: Hombre, M: Mujer, CP: Cáncer de Pulmón, CPCP: Cáncer de Pulmón de Células Pequeñas.

Tras el análisis metabólico de las muestras de suero, se obtuvieron los perfiles metabólicos de cada uno de los sujetos integrantes del estudio. Estos perfiles mostraron diferencias de señales en distintos rangos de m/z del espectro de masas para cada grupo de estudio (CS, CP con CT moderada y CP con elevada CT), comprobándose

este hecho tras el análisis discriminante. La figura 36, muestra el perfil metabolómico representativo de cada grupo de estudio, donde se aprecian diferentes señales, cada una correspondiente a un metabolito determinado, y como puede observarse, en los tres perfiles existen diferencias tanto a nivel cualitativo como cuantitativo.

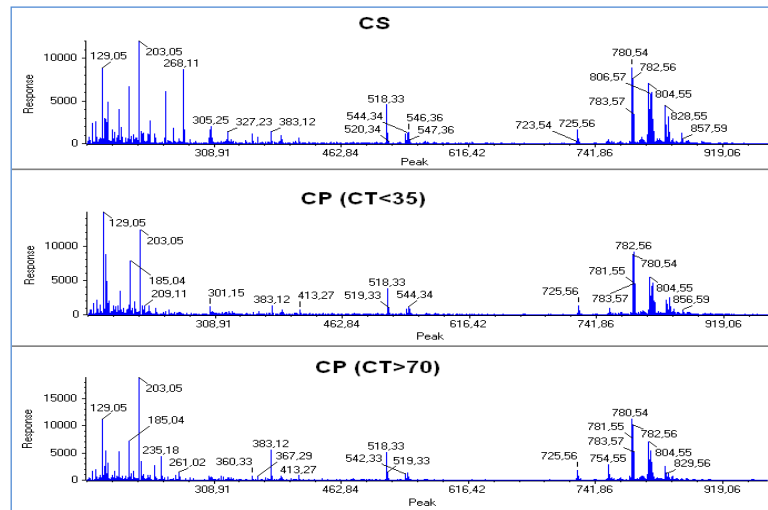
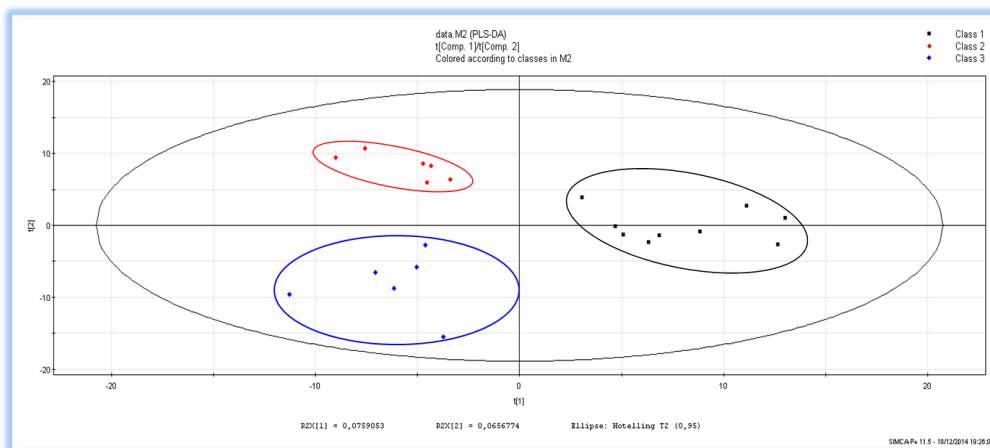
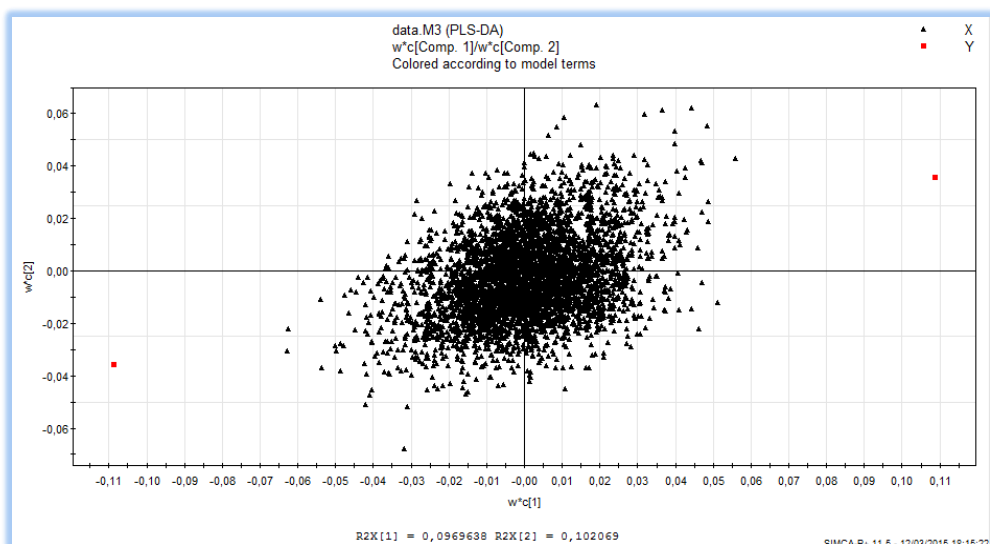


Figura 36. Espectros de masa de un sujeto de cada grupo a estudio: CS (control sano), CP (Cáncer de Pulmón) con CT (Carga Tabáquica) > 70 paq/año y CP con CT <35 paq/año.

El análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) mostró una clara separación de los diferentes grupos de estudio (figura 37), donde la componente t1 separa el grupo CS de los dos grupos CP, siendo la componente t2 la que separa los grupos CP de diferente carga tabáquica, indicando la existencia de variables (metabolitos) que provocan la discriminación entre los mismos. Se aprecia, en definitiva una diferenciación entre los 3 grupos, con clara influencia de la carga tabáquica presente en cada uno de ellos. En la figura 38, se muestra el diagrama "loading plot" que representa una nube de puntos, en la que cada punto corresponde a un metabolito en concreto. Aquellos que se encuentran en los extremos (señalados con una flecha roja) son lo que influyen de forma significativa en la separación de los grupos de estudio (CP (CT>70) y CS), y por tanto son aquellos metabolitos que provocan la discriminación entre los mismos.



**Figura 37. Diagrama correspondiente a la comparación de los tres grupos a estudio: CP (CT>70), CP (CT<35) y CS. En negro (clase 1) CS; Rojo (Clase 2) CP con CT >70 paq/año; y en Azul (Clase 3) CP con CT < 35 paq/año.**



**Figura 38. Diagrama "Loading plot" correspondiente a la comparación del grupo CP (CT>70) frente a CS.**

Los metabolitos causantes de esta discriminación, entre pacientes con diferente carga tabáquica y controles sanos se muestran en la tabla 17.

Tabla 17. Metabolitos encontrados en el estudio con su m/z correspondiente en el espectro de masa

Metabolito		% Cambio		
Identificación	m/z	CP>70 vs CS	CP <35 vs CS	CP>70 vs CP<35
Valina	118,085	N.S.	N.S.	41,44
A.Picolínico	130,085	126,15	N.S.	N.S.
Creatina	132,093	79,59	30,65	37,46
C4-Car	232,155	266,76	140,81	N.S.
GSH	308,124	-74,05	-23,61	N.S.
C10-Car	316,246	85,18	N.S.	N.S.
C12-Car	344,258	46,72	N.S.	N.S.
PL	754,541	142,62	56,78	N.S.
PL	760,574	46,14	35,97	N.S.
PL	802,538	N.S.	103,29	N.S.
PL	840,531	N.S.	35,45	N.S.

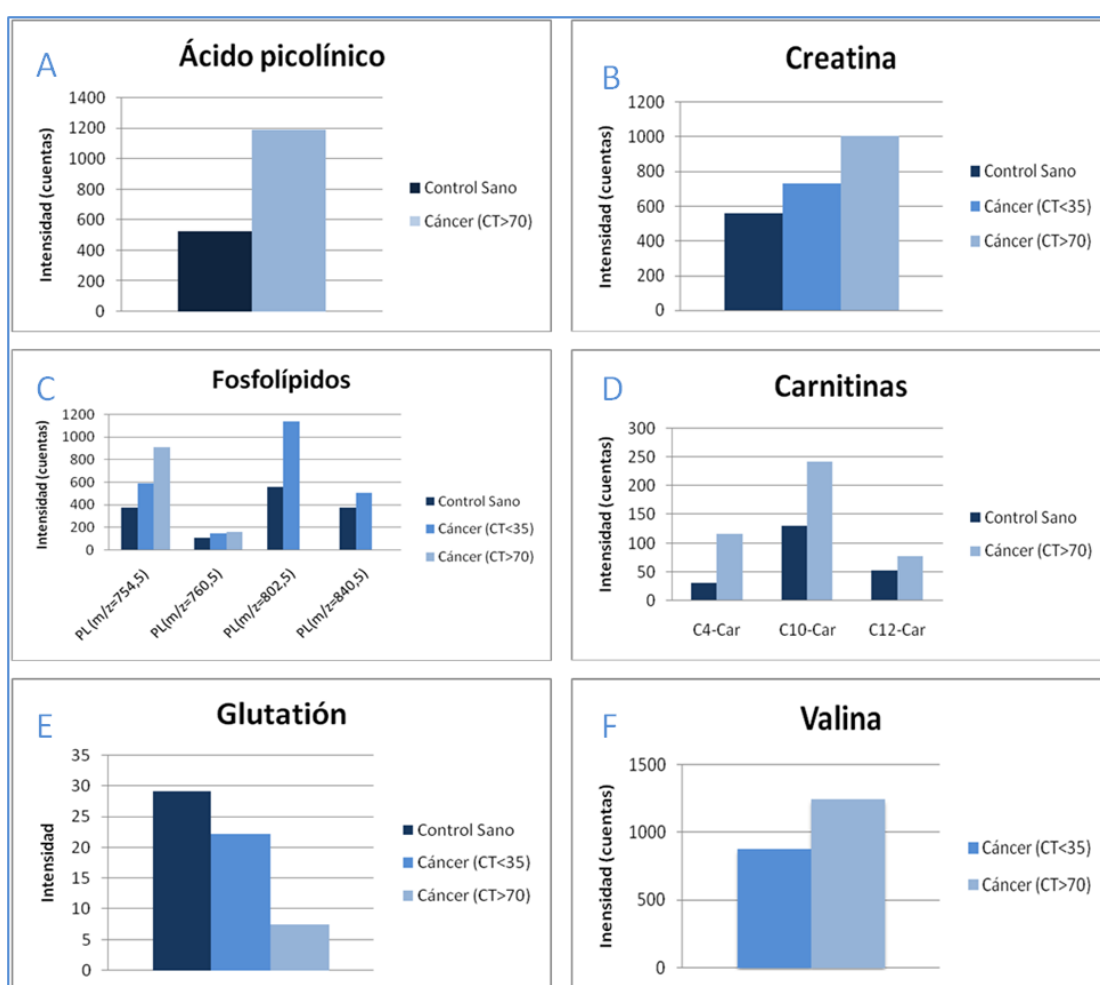
N.S.: No significativo

Los niveles del glutatión, indicativo de situación de estrés oxidativo a nivel celular, se encuentran disminuidos en pacientes con CP fumadores con respecto al grupo de sanos, observándose también que a mayor carga tabáquica, menor es el nivel detectado de este metabolito. Con el resto de metabolitos observados, ocurre justo al contrario, es decir, sus niveles aumentan en CP y el aumento es más evidente a mayor exposición al humo del tabaco. Este es el caso de la creatina, derivado de aminoácidos, y que constituye una fuente inmediata y directa para la producción de ATP; carnitina (C4, C10 y C12), encargados del transporte de los ácidos grasos de cadena larga desde el citosol a la matriz mitocondrial para la beta-oxidación; fosfolípidos de membrana, involucrados en alteraciones de la proliferación celular e invasión de células cancerosas; y por último el ácido picolínico, derivado sustitutivo de la piridina, y la valina, aminoácido esencial implicado en muchos procesos metabólicos (es un producto en la vía de síntesis de CoA).

Los niveles de valina, como se aprecia en el diagrama de barras de la figura 39, difieren de forma clara entre el grupo con CP y CT moderada y los pacientes con CP y CT elevada.

Como hemos mencionado anteriormente, la mayoría de estas anomalías metabólicas se acentuaron en pacientes con una CT elevada, lo que sugiere la influencia de la carga tabáquica en la aparición de estos procesos metabólicos en CP.

**Figura 39. Diagramas de barras de los metabolitos encontrados en nuestro estudio.**



Comparación de intensidad de ácido picolínico en controles sanos y pacientes con cáncer el pulmón CT>70. B: Comparación de intensidad de creatina en controles sanos, pacientes CP CT<35 y pacientes CP CT>70. C: Comparación de intensidad de diferentes fosfolípidos en controles sanos, pacientes CP CT<35 y pacientes CP CT>70. D: Comparación de intensidad de diferentes carnitinas en controles sanos, pacientes CP CT<35 y pacientes CP CT>70. E: Comparación de intensidad de valina en pacientes con CP CT<35 y pacientes CP CT>70. F: Comparación de intensidad del glutación en controles sanos, pacientes CP CT<35 y pacientes CP CT>70.



# 6 DISCUSIÓN



## 6. DISCUSIÓN

---

<b>6.1. REPERCUSIÓN DE LA HEMÓLISIS EN EL ESTUDIO METABOLÓMICO EN MUESTRAS DE SUERO DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN .....</b>	<b>141</b>
6.1.1. TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA.....	142
6.1.2. TIPO DE MUESTRA UTILIZADA PARA EL ESTUDIO: SUERO O PLASMA .....	143
6.1.3. IDONEIDAD DE LOS TUBOS DE RECOGIDA .....	143
6.1.4. TIEMPO DE PERMANENCIA DE LAS MUESTRAS A TEMPERATURA AMBIENTE ANTES DE SU CONGELACIÓN .....	145
6.1.5. TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS .....	146
6.1.6. NÚMERO DE CICLOS CONGELACIÓN/DESCONGELACIÓN .....	146
<b>6.2. PERFILES METABOLÓMICOS EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN Y SUJETOS SANOS .....</b>	<b>147</b>
6.2.1. PATRONES METABOLÓMICOS.....	147
6.2.2. PATRONES METABOLÓMICOS EN DIFERENTES TIPOS HISTOLÓGICOS.....	154
<b>6.3. INFLUENCIA DE LA CARGA TABÁQUICA EN LOS PERFILES METABOLÓMICOS DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN EN MUESTRAS SIN HEMÓLISIS.....</b>	<b>155</b>
6.3.1. INFLUENCIA DE LA CARGA TABÁQUICA EN LOS PERFILES METABOLÓMICOS EN DIFERENTES MUESTRAS BIOLÓGICAS. ESTADO DE LA CUESTIÓN. ....	156
6.3.2. RELEVANCIA DE ESTOS HALLAZGOS EN EL CAMPO DE LA METABOLÓMICA EN EL CÁNCER DE PULMÓN.....	160
<b>6.4. PERSPECTIVAS DE FUTURO Y NUEVAS LINEAS DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>161</b>
6.4.1. PATOLOGÍAS A NIVEL RESPIRATORIO RELACIONADAS CON CP. ....	161
6.4.2. PERSPECTIVAS DE FUTURO Y NUEVAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN ABIERTAS .....	164
<b>DISCUSIÓN SOBRE METODOLOGÍA.....</b>	<b>167</b>

## 6.1. REPERCUSIÓN DE LA HEMÓLISIS EN EL ESTUDIO METABOLÓMICO EN MUESTRAS DE SUERO DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN

La hemólisis se define como la rotura de los eritrocitos y la subsiguiente liberación de hemoglobina y otros componentes intracelulares al plasma circundante. Es posible diferenciar entre la hemólisis *in vitro*, que sucede durante la recogida, manipulación y el procesado de la muestra; e *in vivo*, propia de enfermedades sanguíneas. La elevada concentración de analitos intracelulares pueden mostrar un sesgo positivo como resultado de la liberación de éstos desde el compartimiento intracelular al plasma sanguíneo, llevando a posteriores errores analíticos (188).

En el estudio de las variables pre-analíticas para evitar errores o sesgos en los resultados de un estudio metabolómico es preciso tener en cuenta diferentes puntos, responsables del 60-80% de los errores en estudios metabolómicos:

### 6.1.1. Técnica de extracción de la muestra

Quizás sea éste el aspecto que menos interés ha suscitado hasta el momento. Constituye el primer paso, y por tanto de gran importancia ya que una incorrecta extracción de la muestra puede determinar el resultado de todo un estudio y llevar a errores.

En nuestro estudio, las muestras de sangre se obtuvieron por punción venosa de la región antero-cubital, después de 8 horas de ayuno (13), y fueron recogidas en tubos BD Vacutainer SST II con gel separador y sistema de vacío *Advance*. Tras la punción se conectó directamente al tubo de vacío para la recolección de la sangre, lo que disminuye la hemólisis al evitar el paso de jeringa a tubo. También, con el mismo fin, se evitó la extracción directa desde un catéter. La correcta posición del brazo, aplicación del

torniquete y cantidad de muestra en los tubos de recogida son medidas de gran importancia para evitar la hemólisis de las muestras, como viene explicado en el protocolo de extracción de muestras (Anexo 4).

### **6.1.2. Tipo de muestra utilizada para el estudio: suero o plasma**

Existe amplia información acerca del tipo de muestra más apropiada para los estudios metabolómicos, aunque hasta el momento no se ha llegado a consenso. Wedge et al. en 2011 (142) encontraron una distribución en cuanto a metabolitos muy similar en suero con respecto a plasma con alguna diferencia en la distribución específica, concluyendo finalmente que ambas muestras biológicas son útiles para este tipo de estudio. Siendo estrictos, y como veremos a continuación, aunque realmente el componente de metabolitos sea muy similar, con pequeñas diferencias (la caracterización de metabolitos aumenta en suero con respecto a plasma, aunque en este último, la reproductibilidad es mayor) (189), (190), (191), (192) el uso de un recipiente u otro puede variar en el perfil metabolómico de suero con respecto a plasma, como sugiere Yin et al. (170) en su estudio. Dunn et al. (180), al contrario que Yin y su equipo, proponen como mejor medio para la obtención de metabolitos el suero. Los datos aportados por Dunn quedan reforzado por el estudio de Breier et al. (193) en 2014, en el que demostró que el uso de suero en tubos de gel en comparación con EDTA-plasma aporta mayor número de metabolitos, encontrando solamente cambios en la reproductibilidad de la meteonina.

### **6.1.3. Idoneidad de los tubos de recogida**

Varias recomendaciones un tanto contradictorias sugieren que la interferencia en los estudios metabolómicos sobre muestras de sangre puede estar determinada por el tipo de recipiente (tubo) utilizado y fabricante del mismo (180), (194), (195). En el estudio

de Yin et al. (170) los resultados aportados hablan a favor del uso de plasma en tubos con EDTA-plasma, en detrimento de aquellos con heparina-litio con muestras de plasma o suero por el mayor “ruido químico”, punto en el que difieren Dunn et al. (180). Las razones por las que es más adecuado EDTA, enunciadas por Yin et al. (170) son las siguientes:

- Los tubos de EDTA pueden inmediatamente incluirse en hielo, a diferencia de las muestras de suero que requieren una media hora de exposición a temperatura ambiente para que se produzca el coágulo.
- El EDTA como quelante inhibe diversas enzimas e impide reacciones químicas que podrían alterar los resultados.
- Los tubos de suero pueden permitir la activación de procesos adicionales relacionados con la actividad plaquetaria.
- Unos niveles de plaquetas altos o extremadamente bajos, podrían afectar los patrones metabolómicos de las muestras de suero.

Con iguales premisas, Kamlage et al. (179) proponen EDTA-plasma como medio ideal sobre heparina (con suero o plasma), ya que el primero no solo inhibe la coagulación, sino que también actúa sobre determinadas enzimas glucolíticas con acción en el eritrocito. Observan por otra parte que periodos largos de incubación en EDTA conllevan una significativa disminución de los niveles de glucosa. Por otro lado Breier et al. (193) observan que la fiabilidad de las mediciones de metabolitos fue mayor en suero que en plasma. La mayoría de los metabolitos permanecieron estables durante 24 h expuestos a frío y a temperatura ambiente en tubos que no se centrifugaron. Las concentraciones de metabolitos séricos en su mayoría no se afectaron según el tipo de tubo y tras uno o dos ciclos de congelación-descongelación.

Ante la diversidad en las conclusiones de los diferentes estudios expuestos, estos comentarios tendrían que validarse (por ejemplo realizando en las mismas muestras análisis con suero y con plasma EDTA), y trabajos futuros podrían aclarar estos aspectos. El fin sería diseñar estudios metabólicos en los que la fase pre-analítica contemplase la identificación del metabolito más afectado por otras causas; determinar cuál es la fuente más importante de variabilidad en esta fase; definir los procedimientos operativos estándar recomendables para suero y plasma para minimizar los efectos pre-analíticos, y por último desarrollar herramientas de control en esta etapa (179).

#### **6.1.4. Tiempo de permanencia de las muestras a temperatura ambiente antes de su congelación**

El tiempo hasta la centrifugación de la sangre, la alta afinidad en la unión de la hemoglobina al oxígeno y el sistema antioxidante eritrocitario (glutación oxidasa), hacen del plasma más susceptible de procesos de oxidación, por ello es de gran importancia minimizar los tiempos en todos los pasos, no solo en procesos pre-analíticos ya mencionados, sino también en los tiempos de centrifugación y congelación/descongelación de las muestras (179), (181). Al mantener las muestras a temperatura ambiente durante diferentes intervalos horarios se ha observado un aumento de determinados metabolitos (la hipoxantina un 800% y la esfingosina 1-fosfato 380%, tras 2 horas de exposición), variando en gran medida la estabilidad de los mismos en las 4 primeras horas si se colocan las muestras de plasma inmediatamente tras su obtención en hielo. Ante estos resultados, los autores del trabajo recomiendan el uso de estos dos metabolitos como marcadores de errores en procesos pre-analíticos. También se ha observado que además de los cambios obtenidos, si el tiempo de exposición a

temperatura ambiente supera las 8–24 horas, aumentan los niveles de linoleil y carnitina (185). Bernini et al. (181), encuentran alteraciones en el metaboloma después de la exposición a temperatura ambiente durante 24h, estos cambios fueron más pronunciados para la glucosa, el lactato y piruvato.

### 6.1.5. Transporte de las muestras

Para el envío, las muestras idealmente deben ser separadas y congeladas inmediatamente después de la recolección, ya que algunos aminoácidos y aminos biogénicas se vuelven inestables tras 3 h de exposición al frío. Según Breier et al. (193), el suero en tubos de gel de barrera pueden utilizarse con seguridad para este proceso ya que no tienen efecto sobre la concentración en la mayoría de los metabolitos. Por otro lado, el envío de muestras no centrifugadas en los paquetes fríos es una alternativa rentable para la mayoría de los metabolitos.

Hasta el momento, todos los estudios coinciden en minimizar al máximo los tiempos de congelación de las muestras para su posterior transporte y análisis. De esta forma se evitan posibles sesgos y errores finales.

### 6.1.6. Número de ciclos congelación/descongelación

Aunque de forma unánime se considera que hay que minimizar los ciclos de congelación/descongelación, Breier et al. (193) en su estudio comprueban que las concentraciones de metabolitos séricos en su mayoría no se afectaron según el tipo de tubo y tras uno o dos ciclos de congelación-descongelación. Igualmente, y de forma inesperada, Yin et al. (185) observaron que hasta cuatro ciclos de congelación/descongelación solo modificaron ligeramente el metaboloma en las muestras de EDTA-plasma procesadas.

Con todas las consideraciones anteriores y a modo de resumen, podemos afirmar que las muestras de suero son especialmente útiles en estudios metabolómicos en los que se pretende un barrido del metaboloma al aportar un mayor número de metabolitos; los tubos con gel separador en este tipo de muestras ofrecen ventajas en cuanto a tiempos de congelación al no presentar efectos en la mayoría de los metabolitos, y por último, resultan fáciles en el transporte.

En el presente estudio hemos relacionado la interferencia de la hemólisis en los perfiles metabolómicos de pacientes con CP concretamente y como al aumentar el índice hemolítico la diferenciación entre los dos grupos a estudio se hace más patente, afectando directamente en los resultados finales. Proponemos un sistema de recogida y mantenimiento de muestras específicos (anexo 4) que ha aportado muy buenos resultados.

## **6.2. PERFILES METABOLÓMICOS EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN Y SUJETOS SANOS EN MUESTRAS SIN HEMÓLISIS**

### **6.2.1. Patrones metabolómicos**

De forma general, en la literatura encontramos múltiples estudios en sangre (tanto en suero como en plasma), en los que tras la aplicación de diferentes técnicas metabolómicas, se han obtenidos perfiles que podrían relacionarse con el CP. Entre los metabolitos detectados aparecen aminoácidos (196), lípidos (38), ácidos grasos (156) y los involucrados en el metabolismo de la glutamina. Todos ellos sugieren diferencias en los perfiles entre sanos y pacientes con CP, pero con un amplio abanico de posibilidades en cuanto a la obtención de un biomarcador útil hasta el momento (169). Los siguientes

supuestos pueden estar involucrados en esta variabilidad o poca unificación en cuanto resultados:

- Variabilidad poblacional en la que se realizan los estudio, tanto intrínseca como extrínseca.
- Falta de estandarización metodológica tanto en fases iniciales de recogida de muestras como en fases analítica.
- Limitaciones en cuanto al conocimiento del metaboloma humano y su relación con las diferentes vías metabólicas implicadas en procesos patológicos, como el cáncer de pulmón. En este sentido es muy importante la capacidad de detección de metabolitos. Nuestro grupo de estudio, con las técnicas aplicadas que presentan una alta resolución, detectan unos 1.200 metabolitos frente a la capacidad de detección de entre 400 y 600 metabolitos en la mayoría de trabajos publicados hasta la fecha.

En relación a los resultados obtenidos en nuestro estudio, hemos encontrado una clara discriminación entre los perfiles metabolómicos de pacientes con CP, CE y controles sanos. Así mismo, hemos identificados los metabolitos causantes de las diferencias encontradas y relacionado con rutas previamente conocidas en procesos neoplásicos. En la tabla 18 se observan las diferentes vías metabólicas implicadas.

**Tabla 18. Vías metabólicas que intervienen en el proceso.**

Vía metabólica	Componentes			
	totales	Valor p	FDR	Impacto
<b>Metabolismo de arginina y prolina</b>	77	$1.23 \cdot 10^{-4}$	0.01	0.16
<b>Metabolismo de Pirimidinas</b>	60	0.003	0.14	0.00
<b>Biosíntesis de aminoacil-ARNt</b>	75	0.005	0.15	0.00

<b>Metabolismo de las purinas</b>	92	0.008	0.16	0.01
<b>D-arginina y L-ornitina metabolismo</b>	8	0.013	0.21	0.00
<b>Metabolismo de D-glutamina y el de D-glutamato</b>	11	0.018	0.24	0.03
<b>Metabolismo de Alanina, aspartato y el del glutamato</b>	24	0.039	0.44	0.21
<b>Metabolismo de Valina, leucina e isoleucina</b>	27	0.044	0.44	0.00
<b>Metabolismo del glutatión</b>	38	0.062	0.51	0.00
<b>Metabolismo del nitrógeno</b>	39	0.063	0.51	0.00
<b>Metabolismo de Glicina, serina y treonina</b>	48	0.077	0.56	0.10
<b>Metabolismo Porfirina y la clorofila</b>	104	0.162	1.00	0.0

En nuestro estudio, los metabolitos obtenidos están relacionados con rutas conocidas en procesos neoplásicos. Se han obtenido, con niveles sobreexpresados en pacientes con cáncer de pulmón los fosfolípidos, glutamina y treonina, y con niveles disminuidos, urea, L-ornitina, lisofosfolípidos y triacilglicéridos.

Los fosfolípidos, componentes principales de las membranas celulares, con relevancia en el metabolismo energético y en vías de señalización celular (153). En diferentes estudios se ha señalado el aumento de los fosfolípidos en procesos cancerosos de diferente estirpe y localización, en relación principalmente con el aumento de proliferación celular típica de estos procesos (178). Así mismo, se ha observado que la expresión de la enzima colina quinasa se encuentra aumentada. Esta enzima es necesaria para la síntesis de fosfatidilcolina y fosfatiletanolamina (principal fosfolípido encontrado en membranas celulares), y su expresión en tumores de muchos tejidos se relaciona con un peor pronóstico (197).

La glutamina, se relaciona con el metabolismo energético celular como uno de los sustratos más importantes en esta vía. Cabría esperar por tanto, una disminución de los niveles de este aminoácido en procesos tumorales por el mayor consumo del mismo. Sin

embargo, en un estudio sobre el cáncer gástrico y de colon se ha puesto de manifiesto que los niveles de diferentes aminoácidos están elevados en estos tejidos tumorales en comparación con el tejido normal (198). En el caso del cáncer de colon se ha visto que la conversión de glutamina a glutamato y su intervención en el ciclo de Krebs en la vía del  $\alpha$ -cetoglutarato es esencial en la inducción del oncogén K-Ras para el crecimiento de células tumorales (36). La actividad de la encima glutaminasa (con actividad en el paso de glutamina a glutamato), está relacionada con el crecimiento tumoral, y la inhibición de la misma disminuye la tasa de crecimiento (199). En los resultados aportados por Hori y su equipo (13), los niveles de expresión de la glutamina eran significativamente mayores en el tejido pulmonar de pacientes con cáncer de pulmón en comparación con tejido pulmonar sano, y con otros tipos de tumor, como el de estómago o colon. En contraposición a estos resultados, Puchales-Carrasco (157), encuentran el nivel de este aminoácido disminuido en pacientes con cáncer de pulmón con respecto a sujetos sanos. Sin embargo, la importancia pronóstica de la glutamina y las enzimas implicadas en su metabolismo en el cáncer de pulmón no han sido bien estudiadas hasta el momento. Parece ser que el humo del tabaco así como los fenómenos inflamatorios a nivel celular podrían estar en relación con unos niveles elevados de glutamina (200).

La treonina, también con niveles elevados en el CP. Se trata de un aminoácido importante en el metabolismo de otros aminoácidos como la glicina y alanina, e implicado en diversas rutas metabólicas. El incremento de los niveles de treonina sugiere una alta actividad de LKB1 como respuesta para detener el crecimiento tumoral. En nuestro estudio se observa un aumento de su expresión en muestras de suero de pacientes con cáncer de pulmón, al igual que en otros estudios como el de Hori et al. (13). Sin embargo, otros autores como Wen et al. (169) en su estudio refieren una disminución de la

expresión de este aminoácido en pacientes con adenocarcinoma de pulmón en comparación con controles sanos. Igualmente, Puchades-Carrasco et al. (157) encuentran una disminución de este aminoácido para pacientes con CPNCP en comparación con sanos. Por otro lado conocemos que la hipoxia es una de las características encontradas en las áreas pobremente vascularizados de tumores sólidos, pero las células cancerosas pueden sobrevivir en estas áreas. Este mecanismo pasa por una adaptación de las células tumorales en las que la hipoxia no es uniforme por todo el tumor, y en las zonas afectadas se favorece la autofagia como vía para la producción de ATP y por tanto, como fuente de energía. En esta situación, se ha observado un aumento de aminoácidos como la treonina, prolina o glutamina, debido posiblemente a un aumento de la absorción de aminoácidos, o a una disminución de la síntesis de proteínas en este contexto. El aumento del catabolismo proteico que tiene lugar en situaciones de hipoxia, junto con la autofagia, proporcionan a las células el sustento metabólico necesario (167).

En cuanto a aquellos metabolitos con niveles disminuidos en el grupo de cáncer de pulmón, la L-orinitina es un compuesto químico orgánico del grupo de los  $\alpha$ -aminoácidos implicado en el ciclo de la urea. En el estudio publicado por Hori (13), los niveles de este aminoácido aparecen aumentados en muestras de tejido pulmonar de pacientes con cáncer de pulmón, al comparar con CS. En nuestro estudio, sin embargo, los niveles de L-Orinitina se encuentran descendidos en pacientes con CP. Teniendo en cuenta su ruta metabólica, podría ser explicado por un uso anómalo de la L-arginina, alteraciones en la enzima convertidora a este nivel y en el paso de glutamato a ornitina (lo que podría estar en relación con una alteración metabólica necesaria de las células cancerosas para favorecer la producción de energía, en este caso por la vía glucolítica). La urea, también disminuida en pacientes con cáncer de pulmón, constituye el paso final en la degradación

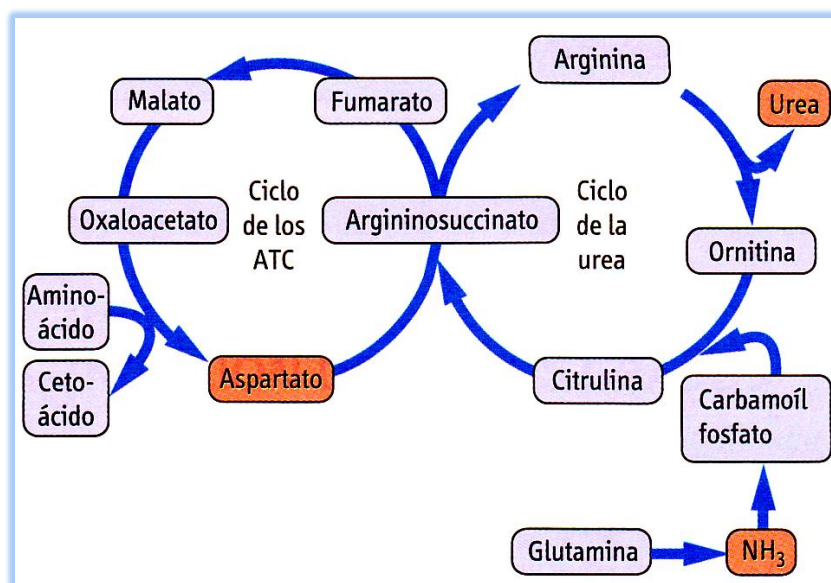
de los aminoácidos (134), y con relación directa por tanto en el metabolismo energético. En los procesos cancerosos existe una alta tasa de reposición de diferentes compuestos para la síntesis de proteínas y otros compuestos celulares. Un consumo y por tanto disminución de productos intermediarios como la ornitina, puede llevar a una disminución de la urea. Los lisofosfolípidos son moléculas de señalización de membranas con relevancia en variedad de procesos fisiológicos, entre los que está presente el cáncer (8). En un ensayo publicado en 2010 en ratones, observaron la importancia de los lisofosfolípidos en la angiogénesis, migración e invasión de células endoteliales, convirtiéndose así en una importante diana molecular en la terapia contra el cáncer (201). En nuestro estudio, este metabolito se encuentra disminuido, probablemente en relación con el aumento de proliferación vascular propio de estos procesos.

Los niveles de triacilglicéridos se encuentran disminuidos, probablemente en relación con un mayor consumo de energía y fomento por tanto de la  $\beta$ -oxidación, vía metabólica aumentada en procesos cancerosos en los que existe un incremento de la lipólisis, con movilización de TAGs. En los casos de caquexia paraneoplásica se ha comprobado este hecho al observarse un aumento de de la proteólisis, del recambio de la glucosa o resistencia a la insulina entre otros (202). La insulina cobra mayor relevancia en el metabolismo de los lípidos, de forma indirecta en el consumo de ácidos grasos al constituir la principal reguladora de la síntesis de TAGs.

En resumen, en nuestro estudio encontramos aumentados los niveles de fosfolípidos, en relación con aumento de la formación de estructuras celulares en procesos tumorales. En base a esto podemos decir que el hallazgos de TAGs disminuidos en pacientes con cáncer de pulmón, va en consonancia con lo anterior, al precisar una movilización de las reservas lipídicas en procesos tumorales para facilitar la proliferación



Figura 41. Relación del ciclo de los ácidos tricarboxílico y el de la urea.



Fuente: Baynes, JW. Bioquímica médica 3ª Ed. 2011

### 6.2.2. Patrones metabolómicos en diferentes tipos histológicos

En relación a los perfiles metabolómicos en los distintos tipos histológicos del CP, ya Hori y su equipo (13) encuentran diferencias entre los tres grandes grupos adenocarcinoma, epidermoide y cáncer de pulmón de células pequeñas. Por otro lado, Wen et al. (169) en 2013 distinguen entre adenocarcinoma y sujetos sanos encontrando diferencias en cuanto a niveles de aminoácidos y otros ácidos orgánicos y lípidos. Este grupo también describe alteraciones en perfiles hormonales, los sulfatos de tres hormonas sexuales, testosterona, androsterona y la pregnenolona, disminuyeron de forma significativa en el plasma de pacientes con adenocarcinoma de pulmón con respecto a controles sanos. Ambos grupos usaron como método de análisis GC-MS, en el caso de Wen, combinado con LC-MS. En nuestro estudio, a pesar de disponer de un número muestral reducido, con el uso de técnicas de DI-ESI-QqQ-TOF-MS se logra una clara discriminación entre los diferentes tipos histológicos, sin poder por el momento

diferenciar el metabolito o los metabolitos responsables, a falta nuevas determinaciones, ya en marcha en por nuestro grupo.

### **6.3. INFLUENCIA DE LA CARGA TABÁQUICA EN LOS PERFILES METABOLÓMICOS DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN**

Existe una amplia evidencia científica acerca del tabaco y su relación establecida con diferentes procesos patológicos, entre ellos el CP. Se considera que este hábito constituye una fuente de oxidantes exógenos que conducen, cuando el hábito es continuado, a una inflamación crónica de la vía aérea con acumulación y activación de leucocitos y polimorfonucleares, que conllevan un aumento de los niveles de Metabolitos Reactivos del Oxígeno (ROMs) y de óxido nítrico. Un balance negativo entre los mecanismos antioxidantes (como la enzima superóxido dismutasa) encargados de la protección del tejido pulmonar y los ROMs puede conducir a un aumento del estrés oxidativo en el tejido pulmonar. Medir los ROMs puede resultar útil para comprobar el daño producido a nivel pulmonar, pero resulta complicado debido a su corta vida media (50).

El estudio de los metabolitos intermediarios de la nicotina y otros componentes del tabaco constituye otra vía utilizada para comprobar el daño ocasionado por éste. Existen múltiples publicaciones enfocadas al estudio del papel de la nicotina y sus derivados, nitrosaminas específicas del tabaco o hidrocarburos aromáticos policíclicos entre otros, que pretenden en primer lugar aclarar el papel de estas sustancias mencionadas en la fisiopatogenia del cáncer en pacientes expuestos al humo del tabaco (203), (204). Para esto, la metabolómica está jugando un papel muy importante en los últimos años. Uno de los estudios más relevantes por el gran tamaño muestral es el realizado por Xu et al.

(205), aunque no incluyen entre los grupos a estudio pacientes con CP. En él comparan los perfiles metabolómicos de sujetos fumadores, con no fumadores o ex fumadores, encontrando diferencias significativas entre los tres grupos y poniendo de manifiesto que en la evaluación tras el cese del hábito tabáquico, gran parte de los metabolitos encontrados vuelven a sus niveles normales.

### **6.3.1. Influencia de la carga tabáquica en los perfiles metabolómicos en diferentes muestras biológicas. Estado de la cuestión.**

El tipo de muestra utilizado en los estudios metabolómicos ha sido diverso. En el estudio de la influencia o relación del tabaco con diferentes procesos neoplásicos destacan las siguientes:

- Las muestras de orina se han utilizado en numerosos estudios, como el de Hetch et al. (206), que evalúan el riesgo de cáncer en fumadores con respecto a no fumadores, determinando que ciertos metabolitos, como el 4(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL), derivado de nitrosaminas específicas del tabaco; el r-1,t-2,3,c-4-tetrahydroxy-1,2,3,4-tetrahydrophenanthrene (Phet), derivado de hidrocarburos aromáticos policíclicos; N'-nitrosornicotine (NNN), también derivado de nitrosaminas específicas del tabaco y la cotinina (derivado de la nicotina), se relacionan con un riesgo aumentado de cáncer. Otros estudios como el de Camella et al. (207), también en orina, y el de Yuan et al. (51), evalúan el riesgo de CP en pacientes fumadores y continúan encontrando elevados algunos de los metabolitos mencionados por Hecht, como el NNAL, Phet y la cotinina en este tipo de tumor. En este estudio además, asocian el NNN con un mayor riesgo para el

cáncer de esófago específicamente. También en orina pero con el estudio de compuestos orgánicos volátiles (*Volatile Organic Compounds*, VOC) en esta muestra, Yuan et al. (208), en 2012 hacen una comparación entre los resultados mencionados anteriormente y los metabolitos del ácido mercaptopurínico, presentes en VOC en muestras de sujetos fumadores, concluyendo que presentan menor importancia como factor de riesgo para el CP, en comparación con el PAH y las nitrosaminas específicas del tabaco, como el NNK. Estos resultados fueron superponibles a los obtenidos por otros grupos (209). Otros autores proponen como marcadores de tabaquismo a nivel metabolómico cotinina, nicotina-N'-óxido, y trans-3'-hidroxicotinina, metabolitos de la nicotina que aumentaban sus niveles en fumadores con respecto a ex fumadores o nunca fumadores (210).

- Como hemos mencionado anteriormente, el humo del tabaco es una fuente de radicales libres y especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, principales causantes de estrés oxidativo, de ahí el interés que suscita el análisis de los VOC en el aire exhalado, que constituye un método indirecto para cuantificar dicho estrés en las vías aéreas. Se han realizado estudios en población sana para observar este hecho. En el artículo publicado por Jareño-Esteban et al. (166), sobre el análisis de VOCs analizados (hexanal, heptanal, octanal, nonanal, ácido propanoico y ácido nonanoico) mediante identificación de los tiempos de retención en cromatografía de gases con detección mediante espectrometría de masas, reveló que sólo el nonanal está asociado al consumo de tabaco, actual o previo. Al ser un producto secundario de la destrucción de la membrana celular, su hallazgo probablemente muestra daño celular en

personas fumadoras y permanece una vez cesa el hábito, manteniéndose el estrés oxidativo a nivel celular, por lo que es más probable una evolución a patología inflamatoria o tumoral, dependiendo en parte del polimorfismo del citocromo P450 (49).

Todos los trabajos mencionados están enfocados al estudio de vías ya conocidas y relacionadas con el tabaco. Se basan principalmente en el aumento del estrés oxidativo dependiente del hábito tabáquico (hay que tener en cuenta que otros factores como el envejecimiento también influyen de forma independiente en este hecho). En nuestro estudio pretendemos identificar los metabolitos a nivel sérico que pueden estar relacionados con el hábito tabáquico, y por lo tanto, aumentan el riesgo de padecer CP. Para ello se han estudiado pacientes ya diagnosticados de neoplasia a nivel pulmonar.

Se ha observado que ciertos metabolitos en las muestras de suero incluidas en el análisis varían su expresión entre los diferentes grupos de estudio. En el caso del glutatión, sus niveles disminuyen en los grupos de cáncer de pulmón con respecto a sujetos sanos (se ha encontrado una disminución de los niveles de este metabolito en pacientes con CPNCP y mutación de KRAS, presente en el 20-25% de este tipo de tumores (159)). El descenso fue mayor a mayor carga tabáquica. Se trata de un tripéptido no proteico que contiene un enlace peptídico inusual entre el grupo amino de la cisteína y el carboxilo de la cadena lateral del glutamato (en el estudio publicado por Hori et al. (13), la cisteína modifica sus niveles en CP, influenciados por la exposición al tabaco). En su biosíntesis también interviene la glicina, con niveles disminuidos en pacientes con adenocarcinoma en comparación con sujetos sanos según algunos estudios (153). El glutatión (con acción antiradical libre y peróxidos), constituye una defensa celular antioxidante que protege contra los ROS. Alteraciones en el mecanismo antioxidante

conlleva daño a nivel de proteínas, ácidos grasos poliinsaturados y de ADN, fomentando así la carcinogénesis (147). Los restantes metabolitos muestran una presencia elevada: valina, aminoácido esencial (es uno de los 20 aminoácidos codificadores para el ADN) cuyos niveles se han visto alterados en procesos neoplásicos, concretamente en muestras de tejido pulmonar de pacientes con CP, en los que sus niveles están aumentados (13). Ácido picolínico, producto intermediario en la degradación del triptófano, sin relación hasta el momento con el CP, aunque sabemos que está involucrado en el metabolismo energético celular, modificado en procesos neoplásicos. Otros metabolitos sobreexpresado han sido: algunos fosfolípidos de membrana, carnitina y la creatina. Todos ellos relacionados con rutas previamente conocidas en el proceso del cáncer, involucrados principalmente en el metabolismo energético y estrés oxidativo a nivel celular. En el caso de fosfolípidos, existen múltiples estudios en los que ponen de manifiesto la relación con patologías cancerosas, además de relacionarse con variaciones en la expresión de varios subtipos en función de la exposición al humo de tabaco (204), (205). La carnitina, sintetizada a partir de los aminoácidos lisina y metionina, está involucrada en el metabolismo energético, transportando los grasos al interior mitocondrial, lo que sugiere un metabolismo lipídico anormal en pacientes con cáncer de pulmón (141). En cuanto a la exposición a los efectos de tabaco, no existen datos en la literatura hasta el momento sobre este metabolito. La creatina, también relacionada con el CP, e incluso con los diferentes estadios de la enfermedad, ha sido estudiada y comparada con otras enfermedades pulmonares con severa afectación del metabolismo en general, como la EPOC, sin encontrar alteraciones atribuidas a esta patología ni relación con el hábito tabáquico, por lo que podría suponer una posible diana como biomarcador para el CP, a falta de más estudios para confirmar (211), (210).

El estudio se ha realizado sobre muestras de suero que presenta una gran ventaja porque permite caracterizar un número mayor de metabolitos que el plasma, aunque en este último la reproducibilidad es mayor por la mayor estabilidad de este fluido. Si es importante mencionar que el suero supone una mejor matriz de biomarcadores con respecto a otro tipo de muestras como la orina, porque no depende de la excreción renal (203), (189).

### **6.3.2. Relevancia de estos hallazgos en el campo de la metabolómica en el cáncer de pulmón**

Hasta el momento todos los metabolitos encontrados por diversos autores relacionando CP y tabaco han sido en su mayoría en muestras diferentes al suero, y todos ellos relacionados directamente con la nicotina y nitrosaminas específicas del tabaco (las que con mayor evidencia se han relacionado con CP han sido el NNK y PAH). En el presente estudio piloto se han utilizado muestras de suero de pacientes con cáncer de pulmón expuestos al humo de tabaco, evaluándose el perfil metabolómico de una forma global y no dirigido a metabolitos concretos previamente seleccionados, lo que proporciona una visión mucho más amplia del problema a analizar sin estar condicionado por los resultados de estudios previos. La evaluación de la influencia del humo de tabaco en los perfiles metabolómicos de pacientes con CP es novedosa, aunque el tamaño muestral utilizado sea menor a otros estudios de metabolómica dirigida. Con todo ello se ha observado que la presencia relativa de determinados metabolitos varía en pacientes con diagnóstico de CP con respecto a sanos, y se ha podido comprobar cuáles de ellos podrían estar influenciados por el consumo de tabaco, y en qué medida, destacando

algunos metabolitos como el glutatión o la creatina, los cuales pueden relacionarse con distintos mecanismos patológicos propios de esta enfermedad.

## **6.4. PERSPECTIVAS DE FUTURO Y NUEVAS LINEAS DE INVESTIGACIÓN**

### **6.4.1. Patologías a nivel respiratorio relacionadas con CP.**

Es de gran interés el estudio de aquellas enfermedades pulmonares que puede predisponer al CP, ya que estrategias dirigidas al conocimiento fisiopatológico y prevención de las mismas podría modificar el curso de la enfermedad y posterior desarrollo de otros procesos como el cáncer. Este es el caso de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) con o sin la coexistencia de enfisema pulmonar.

Otra enfermedad pulmonar estudiada y relacionadas con el CP es el asma. En este caso concreto parece presentar una relación inversa, incluso se ha propuesto la hipótesis de que el asma podría reducir el riesgo de CP, quizás asociado a su eficiente eliminación de células anormales. Tratamientos prolongados con corticoides (tanto vía inhalada con vía oral), podrían tener un papel importante en la vía inflamatoria y explicar en parte esta relación inversa entre asma y CP (212). La relación entre neumonía y CP también ha sido establecida, dependiendo según parece del tiempo transcurrido entre el diagnóstico de ambas (213).

Aquellos pacientes diagnosticados de EPOC presentan un mayor riesgo de CP (214), y la asociación con enfisema (con uso de tomografía computarizada para su diagnóstico) está vinculado con una menor tasa de supervivencia entre los pacientes con CP de diagnóstico temprano (215). Por otro lado, se conoce que la incidencia de EPOC aumenta

el riesgo de CP hasta 4,5 veces (a mayor gravedad de la EPOC, medida en valores de FEV1, mayor riesgo de CP y peor pronóstico) (216), (217), (218), siendo considerado como factor de riesgo independiente (219). Esta relación se ha asociado tanto para la EPOC con enfisema como en bronquitis crónica, e historia de tabaquismo, no siendo significativa en aquellos que presenten EPOC pero no han sido fumadores (219), (220). La asociación de CP y enfisema parece predominar sobre el fenotipo de bronquitis crónica.

Esta interesante asociación sugiere que la EPOC y el cáncer de pulmón presentan procesos patológicos que se superponen, por lo que es importante establecer las diferencias entre ambas enfermedades (tabla 19) (216).

**Tabla 19. Diferencias en la patogénesis del cáncer de pulmón y la EPOC.**

CÁNCER DE PULMÓN	EPOC
Anti-apoptosis	Aumento de la apoptosis
Pro-invasión de tejidos	Degradación de la matriz extracelular
Proliferación celular ilimitada	Reparación tisular inefectiva
Angiogénesis mantenida	Angiogénesis limitada

El tabaco es un conocido factor de riesgo para el CP y la EPOC. Parece ser que la inflamación juega un papel importante en la patogénesis de ambas enfermedades (221), (222). Como sabemos, el humo del tabaco contiene un alto índice de ROS que induce inflamación en las vías aéreas y mutaciones a nivel del ADN de células epiteliales a este nivel. El riesgo de desarrollo de CP no desaparece tras el cese del hábito tabáquico (223). Aunque la expresión de muchos de estos genes, especialmente antioxidantes y genes que metabolizan fármacos, vuelven a su correcto funcionamiento tras dos años sin fumar, un número significativo de oncogenes y genes supresores de tumores pueden estar activos

décadas después del abandono del hábito. De igual manera el proceso inflamatorio local producido por los ROS en relación con el humo del tabaco, permanece en pacientes con EPOC a pesar de haber dejado de fumar, lo que explicaría la persistencia y progresión de la enfermedad a posteriori (224), (222). Este mecanismo de inflamación conduce a la aparición de neoplasias, como también se observa en otros órganos: Esofagitis por reflujo, inflamación gástrica por *Helicobacter pylori*, hepatitis viral, colitis ulcerosa... (225).

Desde el punto de vista metabolómico, recientemente se están abriendo vías de estudio que pretenden establecer la relación entre pacientes con EPOC y aquellos que presentan CP como herramienta útil para mejor conocimiento de la patogenia de ambas enfermedades. En el estudio de Deja et al. publicado en 2014 (211), se compara mediante el uso de técnicas metabolómicas basadas en RMN en muestras de suero, tres grupos de pacientes: 1. EPOC; 2. Cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPNCP) en estadios precoces (estadio I y II) y tardíos (estadios III y IV); y 3. CPNCP asociado a EPOC.

En el primer grupo, observaron una disminución de lipoproteínas y N,N-dimetilglicina, junto con el incremento de glutamina, fenilalanina, 3-metilhistidina y cuerpos cetónicos en todos los pacientes con EPOC. Por otro lado, los aminoácidos de cadena ramificada estaban alterados (disminuidos) sólo en pacientes con EPOC en estadio IV de la GOLD (226). Estos resultados coinciden con lo publicado por otros autores en los que existe una reducción de los niveles de valina, alanina e isoleucina en pacientes con EPOC comparados con sanos (227). Por otro lado los perfiles metabolómicos de los pacientes con CP y EPOC de forma simultánea presentaron diferencias significativas al comparar con el grupo de pacientes que solo padecen EPOC. Los niveles de acetato, citrato y metanol están reducidos en pacientes con CPNCP comparado con pacientes con EPOC. En el estudio de Rocha et al. (228) los resultados son similares al comparar CP con

sujetos sanos: niveles disminuidos de citrato en tejido tumoral, en comparación con tejido sano (lo que sugiere una mayor actividad del ciclo de Krebs en el tejido tumoral) (35). Además de niveles disminuidos de citrato, los niveles de glucosa, formiato, acetato, varios aminoácidos (alanina, glutamina, histidina, tirosina, valina), y metanol también estaban alterados. Los niveles de piruvato y lactato, sin embargo, estaban aumentados.

En conclusión, Deja et al. (211) mencionan 6 metabolitos útiles para diferenciación entre estadios de CP. Tres de ellos aparecen cuando la EPOC es considerada como posible sustrato para CP: dos señales de acetyl glicoproteínas (NAC1 y NAC2) y glicerol. Otros biomarcadores encontrados incluyen isoleucina, acetoacetato y creatina, sin embargo estos metabolitos solo se correlacionan con los estadios de CP y no con la EPOC.

El hecho de comparar los perfiles metabolómicos de pacientes con CP y/o EPOC, supone una interesante vía para la detección de biomarcadores precoces, enfocados a un grupo de especial riesgo para el desarrollo de CP, como se ha mencionado anteriormente.

#### **6.4.2. Perspectivas de futuro y nuevas líneas de investigación abiertas**

Las PERSPECTIVAS DE FUTURO y NUEVAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN de nuestro grupo, atendiendo a lo mencionado anteriormente son las siguientes:

- Comparar los perfiles metabolómicos y metabolitos causales de posibles diferencias entre perfiles entre CS, CP y población de riesgo especial para padecer CP (principalmente pacientes con EPOC tipo enfisema y tabaquismo > 20 paquetes año). Para este fin ya se ha solicitado para su financiación una Beca, ofertada por el Sistema Andaluz de Salud.

- El área sanitaria de Huelva incluye zona industrial con diversos alérgenos ambientales no bien catalogados en cuanto a su relación con la patología tratada en nuestro estudio. Sería una cuestión a considerar en futuros estudios, con mayor tamaño muestral y diversidad poblacional (por la influencia en el metaboloma de las condiciones ambientales).
- Detectar diferencias en los perfiles metabolómicos y metabolitos causantes de las posibles diferencias entre pacientes con CP en estadios precoces (estadios I y II) y estadios tardíos (III y IV). Además, pretendemos tras aumento del número muestral, continuar con la búsqueda de diferencias en los perfiles metabolómicos entre los diferentes tipos histológicos de CP.
- Estudios metabolómicos comparativos entre muestras de suero, orina y LBA. En la actualidad, además de los resultados presentados en este estudio, existen datos preliminares de estudios pilotos tanto en orina como en LBA, pendientes de validar.
- Posibles análisis comparativos sobre la correlación entre muestras de biopsia bronquial (tejido) y LBA. Este último, con poca representación en los estudios metabolómicos dirigidos al CP, dado que su obtención es más fácil y menos invasiva que biopsias de tejido pulmonar, puede aportar información importante del lecho tumoral con menos riesgos para el paciente.
- Profundizar en las vías metabólicas del CP.
- Mejorar el proceso pre-analítico y, especialmente, el analítico en el uso de la metabolómica en el CP en distintas muestras biológicas (suero, orina, LBA...).

- Una vez se establezcan posibles BIOMARCADORES de CP, plantearemos estudios de COHORTES dirigidos al control evolutivo en los biomarcadores obtenidos, su estabilidad y capacidad de detección precoz para esta enfermedad.
- Una vez establecida la utilidad de Biomarcadores para su uso en el DIAGNÓSTICO PRECOZ de CP, plantearemos su utilidad en la DETECCIÓN de la respuesta a diversos tratamientos aplicados en el CP (Cirugía de tórax, QT o RT) y valorar si los metabolitos se modifican ante un tratamiento efectivo. Para ello, realizaremos controles evolutivos en pacientes con CP sometidos a un determinado tratamiento y contemplar según resultados y evolución, la posibilidad de su uso para DIAGNÓSTICO PRECOZ de RECIDIVAS.
- Una vez logrados los puntos anteriores, valorar la utilidad de la metabolómica (con el uso de uno o varios biomarcadores específicos) dentro del protocolo global de diagnóstico precoz del CP, y su papel como paso previo para seleccionar a los sujetos que podrían beneficiarse del TAC de BAJA DOSIS de radiación.
- Posibilidad del uso y estudio de la relación entre resultados de la utilización de distintas TÉCNICAS ÓMICAS en el CP: a) Posible uso de la Genómica (Colaboración con el laboratorio del Centro de Investigación de Corrales); b) Proteómica (estudios previos que relacionan niveles disminuidos de bilirrubina con el desarrollo de CP o otros estudios futuros).

## **DISCUSIÓN SOBRE METODOLOGÍA**

Nuestro estudio pretende establecer los perfiles metabolómicos en pacientes con CP y sujetos sanos como primer paso para la posterior identificación de biomarcadores precoces del cáncer de pulmón. En relación a lo publicado en la actualidad, como FORTALEZAS del estudio:

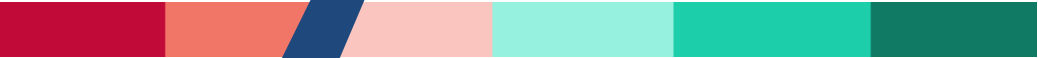
- Una mejora en las técnicas de análisis metabolómico de última generación en la discriminación de los diferentes metabolitos (1.200 metabolitos frente a 400-600).
- Hemos analizado la influencia de la hemólisis en un estudio metabolómico en muestras de suero de pacientes con CP.
- En la parte metodológica hemos conseguido una estandarización en la toma de muestras (técnica y sistemas de recogida) para evitar sesgos como la hemólisis.
- A pesar del tamaño muestral de nuestro estudio, hemos establecido los perfiles metabolómicos entre los grupos incluidos en el estudio y determinado cuales son los metabolitos causantes de la diferenciación entre ellos, encontrando significación en nuestros resultados.
- Hemos conseguido una discriminación en función de sus perfiles metabolómicos entre los diferentes tipos histológicos de CP.
- Existen escasas publicaciones que evalúen la asociación entre el hábito tabáquico y cáncer de pulmón según sus perfiles metabólicos en muestras de suero. En este estudio, se han descrito cuales son aquellos metabolitos implicados.

Sin embargo, el estudio realizado presenta LIMITACIONES:

- El limitado número de pacientes estudiados, aunque equiparable o superior al descrito por otros estudios similares. Un mayor tamaño muestral hubiera permitido una mayor precisión para la detección de biomarcadores. Es preciso comprobar la reproductibilidad de los resultados obtenidos, aumentando el tamaño muestral.
- Aunque con las muestras analizadas hemos podido responder a los objetivos planteados, el aumento del número muestral nos permitiría confirmar los resultados y responder a otros interrogantes (por ejemplo, los diferentes perfiles metabolómicos entre diferentes tipos de CP) con mayor potencia.

A pesar de tratarse de un proyecto inicial y de los análisis parciales para evitar sesgos (controles por edad, sexo, tabaquismo, enfermedades previas, fármacos,...), hay otros posibles factores (como la dieta o el peso) que pueden influir en el perfil metabolómico y en los metabolitos específicos detectados. Éstos son factores muy difíciles de controlar.

# 7 CONCLUSIONES



## 7. CONCLUSIONES

---

Con base en los resultados obtenidos en la presente investigación, se pueden establecer las siguientes conclusiones, ajustadas a nuestros objetivos iniciales:

- Con la aplicación de tecnología analítica en el campo de la metabolómica de última generación (espectrometría de masas en tándem utilizando el híbrido QqQ-TOF triple cuadruplo) es posible la discriminación de unos 1.200 metabolitos por muestra analizada (habitualmente los datos publicados discriminan entre 400 y 600 metabolitos máximo).
- Los resultados obtenidos en muestras de suero demuestran la utilidad del empleo de este fluido en el estudio metabolómico del CP, ya que permiten investigar distintas rutas bioquímicas y así ampliar el número de potenciales BM.
- La hemólisis es un factor perturbador en estudios metabolómicos relacionados con el cáncer de pulmón, y debe evitarse en los diseños metodológicos para la toma de muestras de sangre. La capacidad de discriminación disminuye con el aumento de las concentraciones de hemoglobina.
- Los grupos de estudio (CP, CE y CS) presentan perfiles metabolómicos diferentes que permiten su discriminación estadística.
- Se han identificado posibles biomarcadores para el diagnóstico de CP, los cuales pueden relacionarse con distintos mecanismos patológicos propios de esta enfermedad.

- Ha sido posible la diferenciación entre los diferentes tipos histológicos del cáncer de pulmón partiendo de sus perfiles metabolómicos. La separación entre diferentes estadios de la enfermedad se valorará en posteriores estudios de nuestro grupo, con mayor número muestral, para la identificación de aquellos metabolitos causantes de la discriminación observada en el estudio actual.
- Las alteraciones metabolómicas detectadas en el estudio se vieron influenciadas por la carga tabáquica de los pacientes incluidos, lo que subraya la importancia del tabaquismo como factor de riesgo primario en el desarrollo del CP.
- Es preciso la realización de estudios prospectivos con amplia base poblacional para confirmar los resultados obtenidos y aportar mayor fuerza a los biomarcadores obtenidos.

Resulta muy interesante la aplicación de técnicas metabolómicas en aquellos grupos de pacientes con riesgo elevado de desarrollo de cáncer de pulmón (EPOC, enfisema, tabaquismo...) para el estudio de patrones metabolómicos, con el fin de facilitar el proceso diagnóstico en estadios iniciales del CP. Así mismo, como se ha mencionado de forma detallada en nuestras perspectivas de futuro, estamos desarrollando en la actualidad un estudio dirigido en muestras de orina y LBA.



# 8 BIBLIOGRAFÍA



## 8. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380:2095–128.
2. Escuín JS de C. Registro del Grupo Cooperativo de Cáncer de Pulmón-II de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica. Estudio descriptivo. *Arch Bronconeumol*. 2013;49(11):462–7.
3. Molina JR, Adjei A a, Jett JR. Advances in chemotherapy of non-small cell lung cancer. *Chest*. 2006;130(4):1211–9.
4. Aberle D, Adams A, Berg C. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med*. 2011;365(5):395–409.
5. Mazzone P, Powell CA, Arenberg D. Components Necessary for High-Quality Lung Cancer Screening American College of Chest Physicians and American Thoracic Society Policy Statement. *CHEST J*. 2015;174(2):295–303.
6. Wiener RS, Gould MK, Arenberg DA, Au DH, Fennig K, Lamb CR, et al. AMERICAN THORACIC SOCIETY An Official American Thoracic Society / American College of Chest Physicians Policy Statement: Implementation of Low-Dose Computed Tomography Lung Cancer Screening Programs in Clinical Practice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192(7):881–91.
7. Xiang D, Zhang B, Doll D, Shen K, Kloecker G, Freter C. Lung cancer screening: from imaging to biomarker Lung cancer screening: from imaging to biomarker. *Biomark Res*. 2013;1:4.
8. Raynal P, Montagner A, Dance M, Yart A. [Lysophospholipids and cancer: current status and perspectives]. *Pathol Biol [Internet]*. 2005;53(1):57–62.
9. Pérez-Valderrama B, Toscano Murillo F, Chaves Conde M. Cáncer de pulmón. *Medicine (Baltimore)*. 2010;10:4637–45.
10. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest*. 2003;123(1 Suppl):21S – 49S.
11. Nakajima T, Yasufuku K. Early Lung Cancer. Methods for Detection. *Clinics in Chest Medicine*. 2013;34(3):373–83.
12. Dettmer K. MASS SPECTROMETRY-BASED METABOLOMICS. *Mass Spectrom Rev*. 2007;26(1):51–78.
13. Hori S, Nishiumi S, Kobayashi K, Shinohara M, Hatakeyama Y, Kotani Y, et al. A metabolomic approach to lung cancer. *Lung Cancer*. Elsevier Ireland Ltd; 2011;74(2):284–92.

14. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin.* 2013;63:11–30.
15. Bigbee WL, Gopalakrishnan V, Weissfeld JL, Wilson DO, Dacic S, Lokshin AE, et al. A Multiplexed Serum Biomarker Immunoassay Panel Discriminates Clinical Lung Cancer Patients from High-Risk Individuals Found to be Cancer-Free by CT Screening. *J Thorac Oncol.* 2012;7:698–708.
16. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69–90.
17. de Torres Tajés JP, Macario CC. EPOC en la mujer. *Arch Bronconeumol.* 2010;46(Supl 3):23–7.
18. Instituto Nacional de Estadística. Defunciones según la causa de muerte en España. <http://www.ine.es>. 2012;
19. Edwards BK, Noone AM, Mariotto AB, Simard EP, Boscoe FP, Henley SJ, et al. Annual Report to the Nation on the status of cancer, 1975-2010, featuring prevalence of comorbidity and impact on survival among persons with lung, colorectal, breast, or prostate cancer. *Cancer.* 2014;120(9):1290-314.
20. Sánchez de Cos Escuín J, Miravet Sorribes L, Abal Arca J, Núñez Ares A, Hernández Hernández J, Castañar Jover AM, et al. Estudio multicéntrico epidemiológico-clínico de cáncer de pulmón en España (estudio EpicliCP-2003). *Arch Bronconeumol.* 2006;42(9):446–52.
21. Escuín JSDC. El cáncer de pulmón en España. Epidemiología, supervivencia y tratamientos actuales. *Arch Bronconeumol.* 2009;45(7):341–8.
22. Duque J, Lopez-Encuentra A, Porta R. Survival of 2,991 patients with surgical lung cancer: the denominator effect in survival. *Chest.* 2005;4(128):2274–81.
23. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2011;6(2):244–85.
24. Thorsteinsson H, Alexandersson A, Oskarsdottir GN, Skuladottir R, Isaksson HJ, Jonsson S, et al. Resection rate and outcome of pulmonary resections for non-small-cell lung cancer: a nationwide study from Iceland. *J Thorac Oncol.* 2012;7(7):1164–9.
25. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(4):212–36.
26. Flieder DB, Port JL, Korst RJ, Christos PJ, Levin M a, Becker DE, et al. Tumor size is a determinant of stage distribution in t1 non-small cell lung cancer. *Chest.* 2005;128(4):2304–8.
27. Czene K, Lichtenstein P, Hemminki K. Environmental and heritable causes of cancer among

- 9.6 million individuals in the Swedish Family-Cancer Database. *Int J Cancer*. 2002;99:260–6.
28. Yang IA, Holloway JW, Fong KM. Genetic susceptibility to lung cancer and co-morbidities. *J Thorac Dis*. 2013;5(55):454–62.
  29. Feron O. Pyruvate into lactate and back: From the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiotherapy and Oncology*. 2009;92(3):329–33.
  30. Chen Z, Lu W, Garcia-Prieto C, Huang P. The Warburg effect and its cancer therapeutic implications. *J Bioenerg Biomembr*. 2007;39(3):267–74.
  31. Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science*. 1956;123(3191):309–14.
  32. Hammoudi N, Ahmed KBR, Garcia-Prieto C, Huang P. Metabolic alterations in cancer cells and therapeutic implications. *Chinese Journal of Cancer*. 2011;30(8):508-25.
  33. Amoêdo ND, Rodrigues MF, Pezzuto P, Galina A, da Costa RM, de Almeida FCL, et al. Energy metabolism in H460 lung cancer cells: effects of histone deacetylase inhibitors. *PLoS One*. 2011;6(7):e22264.
  34. Fan TW-M, Lane AN, Higashi RM, Yan J. Stable isotope resolved metabolomics of lung cancer in a SCID mouse model. *Metabolomics*. 2011;7(2):257–69.
  35. Fan TWM, Lane AN, Higashi RM, Farag M a, Gao H, Bousamra M, et al. Altered regulation of metabolic pathways in human lung cancer discerned by (13)C stable isotope-resolved metabolomics (SIRM). *Mol Cancer*. 2009;8:41.
  36. Weinberg F, Hamanaka R, Wheaton WW, Weinberg S, Joseph J, Lopez M, et al. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(19):8788–93.
  37. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet*. 2006;367:1747–57.
  38. Kato I, Tominaga S, Ikari A. Lung cancer prognostic factors from the Aichi Cancer Registry. *JpnJ ClinOncol*. 1990;20:238–45.
  39. US Department of Health and Human Services. A report of the Surgeon General: how tobacco smoke causes disease: the biology and behavioral basis for smoking-attributable disease: a report of the Surgeon General. [Internet]. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. 2010 [cited 2014 Jun 20]. 706 p. Available from: <http://www.surgeongeneral.gov/library/>
  40. Ruano-Ravina A, Figueiras A, Montes-Martínez A, Barros-Dios JM. Dose–response relationship between tobacco and lung cancer: new findings. *European Journal of Cancer Prevention*. 2003;12(4):257-63.
  41. Doll R, Peto R, Wheatley K, Gray R, Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 40 years' observations on male British doctors. *BMJ*. 1994;309(6959):901–11.

42. Rades D, Setter C, Schild SE, Dunst J. Effect of Smoking During Radiotherapy, Respiratory Insufficiency, and Hemoglobin Levels on Outcome in Patients Irradiated for Non-Small-Cell Lung Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008;71:1134–42.
43. Abramowitz MC, Li T, Morrow M, Anderson PR, Bleicher RJ, Goldstein LJ, et al. History of smoking is associated with younger age at diagnosis of breast cancer. *Breast J.* 2010;16:344–9.
44. Vaporciyan AA, Merriman KW, Ece F, Roth JA, Smythe WR, Swisher SG, et al. Incidence of major pulmonary morbidity after pneumonectomy: Association with timing of smoking cessation. *Ann Thorac Surg.* 2002;73:420–6.
45. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo P a. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin.* 1999;49(1):8–31, 1.
46. Bryant A, Cerfolio RJ. Differences in epidemiology, histology, and survival between cigarette smokers and never-smokers who develop non-small cell lung cancer. *Chest.* 2007;132(1):185–92.
47. Warren G, Singh A. Nicotine and lung cancer. *J Carcinog.* 2013;12:1.
48. El Sadeck N, Ibrahim BM, Alassal M a. Cytochrome P450-isoenzyme 1A1 in susceptibility to tobacco-related lung cancer. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 2014;22(3):315–8.
49. Tekpli X, Zienolddiny S, Skaug V, Stangeland L, Haugen A, Mollerup S. DNA methylation of the CYP1A1 enhancer is associated with smoking-induced genetic alterations in human lung. *Int J Cancer.* 2012;131(7):1509–16.
50. Okur HK, Yuksel M, Lacin T, Baysungur V, Okur E. Detection of reactive oxygen metabolites in malignant and adjacent normal tissues of patients with lung cancer. *World J Surg Oncol. World Journal of Surgical Oncology;* 2013;11(1):9.
51. Yuan JM, Butler LM, Stepanov I, Hecht SS. Urinary tobacco smoke-constituent biomarkers for assessing risk of lung cancer. *Cancer Res.* 2014;74(2):401–11.
52. Oken MM, Hocking WG, Kvale PA, Andriole GL, Buys SS, Church TR, et al. Screening by chest radiograph and lung cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian (PLCO) randomized trial. *JAMA.* 2011;306(17):1865–73.
53. Kaneko M, Eguchi K, Ohmatsu H, Kakinuma R, Naruke T, Suemasu K, et al. Peripheral lung cancer: screening and detection with low-dose spiral CT versus radiography. *Radiology.* 1996;201:798–802.
54. Bach PB, Mirkin JN, Oliver TK, Azzoli CG, Berry D a, Brawley OW, et al. Benefits and harms of CT screening for lung cancer: a systematic review. *JAMA.* 2012 ;307(22):2418–29.
55. Manser R, Lethaby A, Irving LB, Stone C, Byrnes G, Abramson MJ, et al. Screening for lung cancer. *Cochrane database Syst Rev.* 2013;6:CD001991.
56. Kovalchik S a, Tammemagi M, Berg CD, Caporaso NE, Riley TL, Korch M, et al. Targeting of

- low-dose CT screening according to the risk of lung-cancer death. *N Engl J Med*. 2013;369(3):245–54.
57. Humphrey LL, Deffebach M, Pappas M, Baumann C, Artis K, Mitchell JP, et al. Screening for lung cancer with low-dose computed tomography: a systematic review to update the US Preventive services task force recommendation. *Ann Intern Med*. 2013;159:411–20.
  58. Sanchez-salcedo P, Berto J, Juan P, Campo A, Alcaide AB, Bastarrika G, et al. Cribado de cáncer de pulmón: catorce a nos Programa Internacional de Detección Precoz de Cáncer de Pulmón con TBDR de Pamplona (P-IELCAP). *Arch Bronconeumol*. 2015;51(4):169–76.
  59. Ruano-Ravina A, Pérez Ríos M, Fernández-Villar A. Cribado de cáncer de pulmón con tomografía computarizada de baja dosis después del National Lung Screening Trial. El debate continúa abierto. *Arch Bronconeumol*. 2013;49(4):158–65.
  60. Wilson DO, Weissfeld JL, Fuhrman CR, Fisher SN, Balogh P, Landreneau RJ, et al. The Pittsburgh Lung Screening Study (PLuSS): outcomes within 3 years of a first computed tomography scan. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178(9):956–61.
  61. Bach PB. Is our natural-history model of lung cancer wrong? *Lancet Oncol*. 2008;9(7):693–7.
  62. Brodersen J, Dirksen A PJ. Screening for Lung Cancer With Low-Dose Computed Tomography. *Ann Intern Med*. 2014;3(16):211.
  63. Field JK, Duffy SW, Baldwin DR, Whynes DK, Devaraj A, Brain KE, et al. UK Lung Cancer RCT Pilot Screening Trial: baseline findings from the screening arm provide evidence for the potential implementation of lung cancer screening. *Thorax [Internet]*. 2016;71(2):161–70.
  64. Neumann H, Fuchs FS, Vieth M, Atreya R, Siebler J, Kiesslich R, et al. Review article: In vivo imaging by endocytoscopy. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2011;33:1183–93.
  65. Ohtani K, Lee AMD, Lam S. Frontiers in bronchoscopic imaging. *Respirology*. 2012;17(2):261-9.
  66. Pastor A, Menendez R. Diagnostic value of SCC, CEA and CYFRA 21.1 in lung cancer: a Bayesian analysis. *Eur Respir J*. 1997;1:603–9.
  67. Cho J-Y, Sung H-J. Proteomic approaches in lung cancer biomarker development. *Expert Rev Proteomics*. 2009;6:27–42.
  68. Hammarström S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol*. 1999;9(2):67–81.
  69. Akoun GM, Scarna HM, Milleron BJ, Bénichou MP, Herman DP. Serum neuron-specific enolase. A marker for disease extent and response to therapy for small-cell lung cancer. *Chest*. 1985;87(1):39–43.
  70. Grossi F, Loprevite M, Chiaramondia M, Ceppa P, Pera C, Ratto GB, et al. Prognostic

- significance of K-ras, p53, bcl-2, PCNA, CD34 in radically resected non-small cell lung cancers. *Eur J Cancer*. 2003;39:1242–50.
71. Okada M, Nishio W, Sakamoto T, Uchino K, Yuki T, Nakagawa A, et al. Prognostic significance of perioperative serum carcinoembryonic antigen in non-small cell lung cancer: Analysis of 1,000 consecutive resections for clinical stage I disease. *Ann Thorac Surg*. 2004;78:216–21.
  72. Schneider J. Tumor markers in detection of lung cancer. *Advan Clin Chem*. 2006;42:1–41.
  73. Kulpa J, Wójcik E, Reinfuss M, Kołodziejcki L. Carcinoembryonic antigen, squamous cell carcinoma antigen, CYFRA 21-1, and neuron-specific enolase in squamous cell lung cancer patients. *Clin Chem*. 2002;48:1931–7.
  74. Salgia R, Harpole D, Herndon 2nd JE, Pisick E, Elias A, Skarin AT. Role of serum tumor markers CA 125 and CEA in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*. 2001;21:1241–6.
  75. Molina R, Filella X, Augé JM. ProGRP: A new biomarker for small cell lung cancer. *Clinical Biochemistry*. 2004; 37(7):505-11.
  76. Pujol JL, Quantin X, Jacot W, Boher JM, Grenier J, Lamy PJ. Neuroendocrine and cytokeratin serum markers as prognostic determinants of small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2003;39:131–8.
  77. Ferrigno D, Buccheri G, Giordano C. Neuron-specific enolase is an effective tumour marker in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer*. 2003;41:311–20.
  78. Shackelford DB, Shaw RJ. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 2009;9:563–75.
  79. Zhukov TA, Johanson RA, Cantor AB, Clark RA, Tockman MS. Discovery of distinct protein profiles specific for lung tumors and pre-malignant lung lesions by SELDI mass spectrometry. *Lung Cancer*. 2003;40(3):267-79.
  80. Meert AP, Martin B, Verdebout JM, Paesmans M, Berghmans T, Ninane V, et al. Correlation of different markers (p53, EGF-R, c-erbB-2, Ki-67) expression in the diagnostic biopsies and the corresponding resected tumors in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2004;44:295–301.
  81. Filiberti R, Marroni P, Paganuzzi M, Izzo V, Padovani P, Cafferata M, et al. c-erbB-2 protein in serum of primary lung cancer patients. *Cancer Detect Prev*. 2002;26:64–8.
  82. Walter K, Holcomb T, Januario T, Yauch RL, Du P, Bourgon R, et al. Discovery and development of DNA methylation-based biomarkers for lung cancer. *Epigenomics [Internet]*. 2014;6:59–72.
  83. Sozzi G, Conte D, Leon M, Ciricione R, Roz L, Ratcliffe C, et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21:3902–8.
  84. Altundag O. Free Circulating DNA: Good As a Diagnostic Marker in Lung Cancer? *J Clin*

- Oncol. 2004;22(15):3200–1.
85. Xiang, D. Garbett, N. C. Chaires J, D. Laber L and KH. Plasma thermogram profiling: A novel biomarker for lung cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27:15S e22074.
  86. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia.* 2006;20(5):847–56.
  87. Rabinowits G, Gerçel-Taylor C, Day JM, Taylor DD, Kloecker GH. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 2009;10:42–6.
  88. Lebanony D, Benjamin H, Gilad S, Ezagouri M, Dov A, Ashkenazi K, et al. Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small-cell lung carcinoma. *J Clin Oncol.* 2009 Apr 20;27(12):2030–7.
  89. Bishop J a, Benjamin H, Cholakh H, Chajut A, Clark DP, Westra WH. Accurate classification of non-small cell lung carcinoma using a novel microRNA-based approach. *Clin Cancer Res.* 2010;16(2):610–9.
  90. Cuadros-Celorrio M. MicroRNAs como herramienta diagnóstica en el cáncer de pulmón. Informe de síntesis de tecnología emergente. 2010. p. Infrm. Eval.Tecnologías Sanitarias AETSA 2010/2–3.
  91. Hirota T, Date Y, Nishibatake Y, Takane H, Fukuoka Y, Taniguchi Y, et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) expression is negatively regulated by certain microRNAs in human lung tissues. *Lung Cancer.* Elsevier Ireland Ltd; 2012;77(1):16–23.
  92. Neely LA, Patel S, Garver J, Gallo M, Hackett M, McLaughlin S, et al. A single-molecule method for the quantitation of microRNA gene expression. *Nat Methods.* 2006;3:41–6.
  93. Tan F, Jiang Y, Sun N, Chen Z, Lv Y, Shao K, et al. Identification of isocitrate dehydrogenase 1 as a potential diagnostic and prognostic biomarker for non-small cell lung cancer by proteomic analysis. *Mol Cell Proteomics.* 2012;11(2):M111.008821.
  94. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer.* 1997;33:787–91.
  95. Miyazu YM, Miyazawa T, Hiyama K, Kurimoto N, Iwamoto Y, Matsuura H, et al. Telomerase expression in noncancerous bronchial epithelia is a possible marker of early development of lung cancer. *Cancer Res.* 2005;65(21):9623–7.
  96. Iwao K, Watanabe T, Fujiwara Y, Takami K, Kodama K, Higashiyama M, et al. Isolation of a novel human lung-specific gene, LUNX, a potential molecular marker for detection of micrometastasis in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer.* 2001;91(4):433–7.
  97. Mitas M, Hoover L, Silvestri G, Reed C, Green M, Turrisi AT, et al. Lunx is a superior molecular marker for detection of non-small cell lung cancer in peripheral blood [corrected]. *J Mol Diagn.* 2003;5:237–42.

98. Sarwar M, Tomiyoshi K, Inoue T, Fukazawa K, Endo K. CYFRA 21-1 as a tumor marker used in measuring the serum fragment of cytokeratin subunit 19 by immunoradiometric assay. *Ann Nucl Med*. 1994;8(4):301–6.
99. Ryter SW, Morse D, Choi AMK. Carbon monoxide and bilirubin: Potential therapies for pulmonary/vascular injury and disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;36(2):175–82.
100. Horsfall LJ, Rait G, Walters K, Swallow DM, Pereira SP, Nazareth I, et al. Serum bilirubin and risk of respiratory disease and death. *JAMA*. 2011;305(7):691–7.
101. Lim J, Kimm H, Jee SH. Combined Effects of Smoking and Bilirubin Levels on the Risk of Lung Cancer in Korea: The Severance Cohort Study. *PLoS One*. 2014;9(8):e103972.
102. García-Foncillas J, Garridob P, Gómezc J, Palaciosd J, Taróne M. Recomendaciones para la determinación de las mutaciones del gen EGFR en el carcinoma de pulmón no microcítico. *Rev Esp Patol*. 2011;44(1):17–31.
103. Naima Hammoudi, Kausar Begam Riaz Ahmed, Celia Garcia-Prieto PH. Metabolic alterations in cancer cells and therapeutic implications. *Chin J Cancer*. 2011;30(8):508–25.
104. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica [Internet]*. 1999;29(11):1181–9.
105. Jordan KW, Adkins CB, Su L, Halpern EF, Mark EJ, Christiani DC, et al. Comparison of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung by metabolomic analysis of tissue-serum pairs. *Lung Cancer*. Elsevier Ireland Ltd; 2010;68(1):44–50.
106. Henschke CI, McCauley DI, Yankelevitz DF, Naidich DP, McGuinness G, Miettinen OS, et al. Early Lung Cancer Action Project: Overall design and findings from baseline screening. *Lancet*. 1999;354:99–105.
107. Kaderbhai NN, Broadhurst DI, Ellis DI, Goodacre R, Kell DB. Functional genomics via metabolic footprinting: Monitoring metabolite secretion by *Escherichia coli* tryptophan metabolism mutants using FT-IR and direct injection electrospray mass spectrometry. *Comp Funct Genomics*. 2003;4(4):376–91.
108. Bouhifd M, Hartung T, Hogberg HT, Kleensang A, Zhao L. Review: Toxicometabolomics. *J Appl Toxicol*. 2013;33(12):1365–83.
109. Orešič M. Metabolomics, a novel tool for studies of nutrition, metabolism and lipid dysfunction. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2009;19(11):816–24.
110. Tan Y, Yin P, Tang L, Xing W, Huang Q, Cao D, et al. Metabolomics Study of Stepwise Hepatocarcinogenesis From the Model Rats to Patients: Potential Biomarkers Effective for Small Hepatocellular Carcinoma Diagnosis. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2012;11(2):M111.010694–M111.010694.
111. Yang LW and T. Identification of possible biomarkers for breast cancer from free fatty acid profiles determined by GC-MS and multivariate statistical analysis. *Clin Biochem*.

- 2012;45(1-2):127–33.
112. Nishiumi S, Shinohara M, Ikeda A, Yoshie T, Hatano N, Kakuyama S, et al. Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for pancreatic cancer. *Metabolomics*. 2010;6:518–28.
  113. Sampson JN, Boca SM, Shu XO, Stolzenberg-Solomon RZ, Matthews CE, Hsing AW, et al. Metabolomics in epidemiology: Sources of variability in metabolite measurements and implications. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013;22(4):631–40.
  114. Kochhar S, Jacobs DM, Ramadan Z, Berruex F, Fuerholz A, Fay LB. Probing gender-specific metabolism differences in humans by nuclear magnetic resonance-based metabolomics. *Anal Biochem*. 2006;352:274–81.
  115. Guo Y, Wang X, Qiu L, Qin X, Liu H, Wang Y, et al. Probing gender-specific lipid metabolites and diagnostic biomarkers for lung cancer using Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Clin Chim Acta*. Elsevier B.V.; 2012 ;414:135–41.
  116. Stella C, Beckwith-Hall B, Cloarec O, Holmes E, Lindon JC, Powell J, et al. Susceptibility of human metabolic phenotypes to dietary modulation. *J Proteome Res*. 2006;5:2780–8.
  117. Spitale RC, Cheng MY, Chun K a, Gorell ES, Munoz C a, Kern DG, et al. Differential effects of dietary supplements on metabolomic profile of smokers versus non-smokers. *Genome Med*. BioMed Central Ltd; 2012;4(2):14.
  118. Mondul AM, Sampson JN, Moore SC, Weinstein SJ, Evans AM, Karoly ED, et al. Metabolomic profile of response to supplementation with  $\beta$ -carotene in the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study. *Am J Clin Nutr*. 2013;98(2):488–93.
  119. Psychogios N, Hau DD, Peng J, Guo AC, Mandal R, Bouatra S, et al. The Human Serum Metabolome. Flower D, editor. *PLoS One*. 2011;6(2):e16957.
  120. Gonzalez-Dominguez R, Garcia A, Garcia-Barrera T, Barbas C, Gomez-Ariza JL. Metabolomic profiling of serum in the progression of Alzheimer's disease by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Electrophoresis*. 2014;35(23):3321–30.
  121. Garcia-Sevillano MA, Garcia-Barrera T, Navarro F, Gomez-Ariza JL. Analysis of the biological response of mouse liver (*Mus musculus*) exposed to As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> based on integrated -omics approaches. *Metallomics [Internet]*. 2012;5(12):1644–55.
  122. Sun G, Yang K, Zhao Z, Guan S, Han X, Gross RW. Shotgun Metabolomics Approach for the Analysis of Negatively Charged Water-Soluble Cellular Metabolites from Mouse Heart Tissue Shotgun Metabolomics Approach for the Analysis of Negatively Charged Water-Soluble Cellular Metabolites from Mouse Heart Tissue. *Anal Chem*. 2007;79(17):6629–40.
  123. Junot C, Madalinski G, Tabet J-C, Ezan E. Fourier transform mass spectrometry for metabolome analysis. *Analyst*. 2010;135(9):2203–19.
  124. Kamleh A, Barrett MP, Wildridge D, Burchmore RJS, Scheltema RA, Watson DG. Metabolomic profiling using Orbitrap Fourier transform mass spectrometry with

- hydrophilic interaction chromatography: A method with wide applicability to analysis of biomolecules. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2008;22(12):1912–8.
125. Xu F, Zou L, Ong CN. Multiorigin of chromatographic peaks in derivatized GC/MS metabolomics: a confounder that influences metabolic pathway interpretation. *J Proteome Res.* 2009;8(12):5657–65.
  126. Lawton K a, Berger A, Mitchell M, Milgram KE, Evans AM, Guo L, et al. Analysis of the adult human plasma metabolome. *Pharmacogenomics.* 2008;9(4):383–97.
  127. Naz S, García A, Barbas C. Multiplatform analytical methodology for metabolic fingerprinting of lung tissue. *Anal Chem.* 2013;85(22):10941–8.
  128. Rocha CM, Carrola J, Barros AS, Gil AM, Goodfellow BJ, Carreira IM, et al. Metabolic signatures of lung cancer in biofluids: NMR-based metabonomics of blood plasma. *J Proteome Res.* 2011;10:4314–24.
  129. Niu Y, Jiang Y, Xu C, Wang X, Liu Y, Zhao H, et al. [Preliminary results of metabolite in serum and urine of lung cancer patients detected by metabolomics]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi.* 2012;15(4):195–201.
  130. Yang Q, Shi X, Wang Y, Wang W, He H, Lu X, et al. Urinary metabonomic study of lung cancer by a fully automatic hyphenated hydrophilic interaction/RPLC-MS system. *J Sep Sci.* 2010;33(10):1495–503.
  131. Wu Q, Wang Y, Gu X, Zhou J, Zhang H, Lv W, et al. Urinary metabolomic study of non-small cell lung carcinoma based on ultra high performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Sep Sci.* 2014;37(14):1728-35.
  132. Matsumura K, Opiekun M, Oka H, Vachani A, Albelda SM, Yamazaki K, et al. Urinary volatile compounds as biomarkers for lung cancer: a proof of principle study using odor signatures in mouse models of lung cancer. *PLoS One.* 2010;5(1):e8819.
  133. Mathé EA, Patterson AD, Haznadar M, Manna SK, Krausz KW, Bowman ED, et al. Noninvasive urinary metabolomic profiling identifies diagnostic and prognostic markers in lung cancer. *Cancer Res.* 2014;74:3259–70.
  134. Evans CR, Karnovsky A, Kovach M a, Standiford TJ, Burant CF, Stringer K a. Untargeted LC-MS metabolomics of bronchoalveolar lavage fluid differentiates acute respiratory distress syndrome from health. *J Proteome Res.* 2014;13(2):640–9.
  135. Mazzone PJ. Exhaled breath volatile organic compound biomarkers in lung cancer. *J Breath Res.* 2012;6(2):027106.
  136. Chen X, Xu F, Wang Y, Pan Y, Lu D, Wang P, et al. A study of the volatile organic compounds exhaled by lung cancer cells in vitro for breath diagnosis. *Cancer.* 2007;110:835–44.
  137. Brown M V, McDunn JE, Gunst PR, Smith EM, Milburn M V, Troyer D a, et al. Cancer detection and biopsy classification using concurrent histopathological and metabolomic analysis of core biopsies. *Genome Med. BioMed Central Ltd;* 2012;4(4):33.

138. Hocker JR, Peyton MD, Lerner MR, Mitchell SL, Lightfoot S a, Lander TJ, et al. Serum discrimination of early-stage lung cancer patients using electrospray-ionization mass spectrometry. *Lung Cancer*. Elsevier Ireland Ltd; 2011;74(2):206–11.
139. Wedge DC, Allwood JW, Dunn W, Vaughan AA, Simpson K, Brown M, et al. Is serum or plasma more appropriate for intersubject comparisons in metabolomic studies? An assessment in patients with small-cell lung cancer. *Anal Chem*. 2011;83:6689–97.
140. Lokhov PG, Trifonova OP, Maslov DL, Archakov AI. Blood plasma metabolites and the risk of developing lung cancer in Russia. *Eur J Cancer Prev*. 2013;22:335–41.
141. Li Y, Song X, Zhao X, Zou L, Xu G. Serum metabolic profiling study of lung cancer using ultra high performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. Elsevier B.V.; 2014;966:147–53.
142. Wedge DC, Allwood JW, Dunn W, Vaughan AA, Simpson K, Brown M, et al. Is serum or plasma more appropriate for intersubject comparisons in metabolomic studies? An assessment in patients with small-cell lung cancer. *Anal Chem*. 2011;83(17):6689–97.
143. Hubers a J, Prinsen CFM, Sozzi G, Witte BI, Thunnissen E. Molecular sputum analysis for the diagnosis of lung cancer. *Br J Cancer*. Nature Publishing Group; 2013;109(3):530–7.
144. Chen Y, Ma Z, Min L, Li H, Wang B, Zhong J, et al. Biomarker identification and pathway analysis by serum metabolomics of lung cancer. *Biomed Res Int*. 2015;2015: 183624.
145. Rocha CM, Barros AS, Gil AM, Goodfellow BJ, Humpfer E, Spraul M, et al. Metabolic profiling of human lung cancer tissue by <sup>1</sup>H high resolution magic angle spinning (HRMAS) NMR spectroscopy. *J Proteome Res*. 2010;9(1):319–32.
146. Lane AN, Fan TW-M, Bousamra M, Higashi RM, Yan J, Miller DM. Stable isotope-resolved metabolomics (SIRM) in cancer research with clinical application to nonsmall cell lung cancer. *OMICS*. 2011;15(3):173–82.
147. Kalluri U, Naiker M, Myers M a. Cell culture metabolomics in the diagnosis of lung cancer- the influence of cell culture conditions. *J Breath Res*. 2014;8:027109.
148. Singh C, Rai RK, Azim A, Sinha N, Baronia AK. Mini-bronchoalveolar lavage fluid can be used for biomarker identification in patients with lung injury by employing <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Crit Care*. 2013;17(2):430.
149. Wolak JE, Esther CR, O'Connell TM. Metabolomic analysis of bronchoalveolar lavage fluid from cystic fibrosis patients. *Biomarkers*. 2009;14(1):55–60.
150. Rai RK, Azim A, Sinha N, Sahoo JN, Singh C, Ahmed A, et al. Metabolic profiling in human lung injuries by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy of bronchoalveolar lavage fluid (BALF). *Metabolomics*. 2012;9(3):667–76.
151. Denoroy L, Zimmer L, Renaud B, Parrot S. Ultra high performance liquid chromatography as a tool for the discovery and the analysis of biomarkers of diseases: a review. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. Elsevier B.V.; 2013;927:37–53.

152. Spratlin JL, Serkova NJ, Eckhardt SG. Clinical applications of metabolomics in oncology: a review. *Clin Cancer Res.* 2009;15(2):431–40.
153. Wen T, Gao L, Wen Z, Wu C, Tan CS, Toh WZ, et al. Exploratory investigation of plasma metabolomics in human lung adenocarcinoma. *Mol Biosyst.* 2013;9:2370–8.
154. Maeda J, Higashiyama M, Imaizumi A, Nakayama T, Yamamoto H, Daimon T, et al. Possibility of multivariate function composed of plasma amino acid profiles as a novel screening index for non-small cell lung cancer: a case control study. *BMC Cancer.* 2010;10:690.
155. Dong J. Lysophosphatidylcholine Biomarkers of Lung Cancer Detected by Ultra-performance Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole Time-of-flight Mass Spectrometry. *Chem Res Chinese Univ.* 2011;27(5):750–5.
156. de Castro J, Rodríguez MC, Martínez-Zorzano VS, Llanillo M, Sánchez-Yagüe J. Platelet linoleic acid is a potential biomarker of advanced non-small cell lung cancer. *Exp Mol Pathol.* Elsevier Inc.; 2009;87(3):226–33.
157. Puchades-carrasco L, Jantus-lewintre E, Pérez-rambla C, Camps C, Pineda-lucena A. Serum metabolomic profiling facilitates the non-invasive identification of metabolic biomarkers associated with the onset and progression of non-small cell lung cancer. 2016;7(11): 12904-16.
158. Cai X, Dong J, Zou L, Xue X, Zhang X, Liang X. Metabonomic Study of Lung Cancer and the Effects of Radiotherapy on Lung Cancer Patients: Analysis of Highly Polar Metabolites by Ultraperformance HILIC Coupled with Q-TOF MS. *Chromatographia.* 2011;74(5-6):391–8.
159. Brunelli L, Caiola E, Marabese M, Brogгинi M. Capturing the metabolomic diversity of KRAS mutants in non- small-cell lung cancer cells. *Oncotarget.* 2014;5(13): 4722-31.
160. Weaver Z, Difilippantonio S, Carretero J, Martin PL, El Meskini R, Iacovelli AJ, et al. Temporal molecular and biological assessment of an erlotinib-resistant lung adenocarcinoma model reveals markers of tumor progression and treatment response. *Cancer Res.* 2012;72:5921–33.
161. Hanai Y, Shimono K, Matsumura K, Vachani A, Albelda S, Yamazaki K, et al. Urinary Volatile Compounds as Biomarkers for Lung Cancer. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2014;76(4):679–84.
162. Uribarri M, Hormaeche I, Zalacain R, Lopez-Vivanco G, Martinez A, Nagore D, et al. A New Biomarker Panel in Bronchoalveolar Lavage for an Improved Lung Cancer Diagnosis. *J Thorac Oncol.* 2014;9(10):1504–12.
163. Pauling L, Robinson AB, Teranishi R, Cary P. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971;68:2374–6.
164. Loft S, Poulsen HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med.* 1996;74:297–312.

165. Kushch I, Schwarz K, Schwentner L, Baumann B, Dzien A, Schmid A, et al. Compounds enhanced in a mass spectrometric profile of smokers' exhaled breath versus non-smokers as determined in a pilot study using PTR-MS. *J Breath Res.* 2008;2:026002.
166. Jareño-Esteban JJ, Muñoz-Lucas MÁ, Carrillo-Aranda B, Maldonado-Sanz JÁ, de Granda-Orive I, Aguilar-Ros A, et al. Estudio de compuestos orgánicos volátiles en aire exhalado en una población clínicamente sana: Efecto del tabaquismo. *Arch Bronconeumol.* 2013;49(11):457–61.
167. Frezza C, Zheng L, Tennant DA, Papkovsky DB, Hedley BA, Kalna G, et al. Metabolic profiling of hypoxic cells revealed a catabolic signature required for cell survival. *PLoS One.* 2011;6(9):e24411.
168. Jurado B. Estudio metabolómico en el sudor. Aportación diagnóstica en el cáncer de pulmón. *Rev Española Patol Torácica.* 2014;26(4):253–8.
169. Wen T, Gao L, Wen Z, Wu C, Tan CS, Toh WZ, et al. Exploratory investigation of plasma metabolomics in human lung adenocarcinoma. *Mol Biosyst.* 2013;9(9):2370–8.
170. Yin P, Peter A, Franken H, Zhao X, Neukamm SS, Rosenbaum L, et al. Preanalytical aspects and sample quality assessment in metabolomics studies of human blood. *Clin Chem.* 2013;59(5):833–45.
171. Barri T, Dragsted LO. UPLC-ESI-QTOF/MS and multivariate data analysis for blood plasma and serum metabolomics: Effect of experimental artefacts and anticoagulant. *Anal Chim Acta.* 2013;768(1):118–28.
172. Bruce SJ, Jonsson P, Antti H, Cloarec O, Trygg J, Marklund SL, et al. Evaluation of a protocol for metabolic profiling studies on human blood plasma by combined ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry: From extraction to data analysis. *Anal Biochem.* 2008;372(2):237–49.
173. Grafmeyer D, Bondon M, Manchon M, Levillain P. The influence of bilirubin, haemolysis and turbidity on 20 analytical tests performed on automatic analysers. Results of an interlaboratory study. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1995;33(1):31–52.
174. Zaugg K, Yao Y, Reilly PT, Kannan K, Kiarash R, Mason J, et al. Carnitine palmitoyltransferase 1C promotes cell survival and tumor growth under conditions of metabolic stress. *Genes Dev.* 2011;25(10):1041–51.
175. Peluso G, Nicolai R, Reda E, Benatti P, Barbarisi A, Calvani M. Cancer and anticancer therapy-induced modifications on metabolism mediated by carnitine system. *Journal of Cellular Physiology.* 2000; 182(3):339–50.
176. Vinci E, Rampello E, Zanolli L, Oreste G, Pistone G, Malaguarnera M. Serum carnitine levels in patients with tumoral cachexia. *Eur J Intern Med.* 2005;16(6):419–23.
177. Glunde K, Jie C, Bhujwalla ZM. Molecular causes of the aberrant choline phospholipid metabolism in breast cancer. *Cancer Res.* 2004;64(12):4270–6.

178. Santos, CR. and Schulze A. Lipid metabolism in cancer. *FEBS J.* 2012;279(15):2610–23.
179. Kamlage B, Maldonado SG, Bethan B, Peter E, Schmitz O, Liebenberg V, et al. Quality markers addressing preanalytical variations of blood and plasma processing identified by broad and targeted metabolite profiling. *Clin Chem.* 2014;60(2):399–412.
180. Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-McIntyre S, Anderson N, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *NatProtoc.* 2011;6:1060–83.
181. Bernini P, Bertini I, Luchinat C, Nincheri P, Staderini S, Turano P. Standard operating procedures for pre-analytical handling of blood and urine for metabolomic studies and biobanks. *J Biomol NMR.* 2011;49(3-4):231–43.
182. Carraro P, Zago T, Plebani M. Exploring the initial steps of the testing process: Frequency and nature of pre-preanalytic errors. *Clin Chem.* 2012;58(3):638–42.
183. Lippi G, Guidi GC, Mattiuzzi C, Plebani M. Preanalytical variability: The dark side of the moon in laboratory testing. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.* 2006;44(4):358-65.
184. Szecsi PB, Ødum L. Error tracking in a clinical biochemistry laboratory. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(10):1253–7.
185. Yin P, Peter A, Franken H, Zhao X, Neukamm SS, Rosenbaum L, et al. Preanalytical aspects and sample quality assessment in metabolomics studies of human blood. *Clin Chem.* 2013;59(5):833–45.
186. Podoly E, Hanin G, Soreq H. Alanine-to-threonine substitutions and amyloid diseases: butyrylcholinesterase as a case study. *Chem Biol Interact.* 2010;187(1-3):64–71.
187. Fan J, Upadhye S, Worster A. Understanding receiver operating characteristic (ROC) curves. *CJEM Can J Emerg Med [Internet].* 2006;8(1):19–20.
188. Pineda Tenor D, Martínez Laborde C, Menchén Herreros A, Fernández Rodríguez E. Aproximación matemática para la corrección de la influencia de la hemólisis en pruebas frecuentes del laboratorio clínico. *Rev del Lab Clínico.* 2010;3(1):25–30.
189. Yu Z, Kastenmüller G, He Y, Belcredi P, Möller G, Prehn C, et al. Differences between human plasma and serum metabolite profiles. *PLoS One.* 2011;6(7): e21230.
190. Denery JR, Nunes AAK, Dickerson TJ. Characterization of differences between blood sample matrices in untargeted metabolomics. *Anal Chem.* 2011;83(3):1040–7.
191. Zivkovic AM, Wiest MM, Nguyen UT, Davis R, Watkins SM, German JB. Effects of sample handling and storage on quantitative lipid analysis in human serum. *Metabolomics.* 2009;5(4):507–16.
192. Fahrman JF, Kim K, DeFelice BC, Taylor SL, Gandara DR, Yoneda KY, et al. Investigation of

- metabolomic blood biomarkers for detection of adenocarcinoma lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2015;24(11):1716–23.
193. Breier M, Wahl S, Prehn C, Fugmann M, Ferrari U, Weise M, et al. Targeted metabolomics identifies reliable and stable metabolites in human serum and plasma samples. *PLoS One.* 2014;9(2):1–11.
  194. Deprez S, Sweatman BC, Connor SC, Haselden JN, Waterfield CJ. Optimisation of collection, storage and preparation of rat plasma for <sup>1</sup>H NMR spectroscopic analysis in toxicology studies to determine inherent variation in biochemical profiles. *J Pharm Biomed Anal.* 2002;30(4):1297–310.
  195. Bando K, Kawahara R, Kunimatsu T, Sakai J, Kimura J, Funabashi H, et al. Influences of biofluid sample collection and handling procedures on GC-MS based metabolomic studies. *J Biosci Bioeng.* 2010;110(4):491–9.
  196. Maeda J, Higashiyama M, Imaizumi A, Nakayama T, Yamamoto H, Daimon T, et al. Possibility of multivariate function composed of plasma amino acid profiles as a novel screening index for non-small cell lung cancer: a case control study. *BMC Cancer. BioMed Central Ltd;* 2010;10(1):690.
  197. Ramírez de Molina A, Rodríguez-González A, Gutiérrez R, Martínez-Pieiro L, Sánchez JJ, Bonilla F, et al. Overexpression of choline kinase is a frequent feature in human tumor-derived cell lines and in lung, prostate, and colorectal human cancers. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;296:580–3.
  198. Hirayama A, Kami K, Sugimoto M, Sugawara M, Toki N, Onozuka H, et al. Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Res.* 2009;69(11):4918–25.
  199. Lobo C, Ruiz-Bellido M a, Aledo JC, Márquez J, Núñez De Castro I, Alonso FJ. Inhibition of glutaminase expression by antisense mRNA decreases growth and tumourigenicity of tumour cells. *Biochem J.* 2000;348:257–61.
  200. Vulimiri S V, Misra M, Hamm JT, Mitchell M, Berger A. Effects of mainstream cigarette smoke on the global metabolome of human lung epithelial cells. *Chem Res Toxicol [Internet].* 2009;22(3):492–503.
  201. Linkous AG, Yazlovitskaya EM, Hallahan DE. Cytosolic phospholipase A2 and lysophospholipids in tumor angiogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(18):1398–412.
  202. Tuca Rodríguez A, Calsina-Berna A, González-Barboteo J, Gómez-Batiste Alentorn X. Caquexia en cáncer. *Med Clin (Barc).* 2010;135(12):568–72.
  203. Hsu PC, Zhou B, Zhao Y, Ressom HW, Cheema AK, Pickworth W, et al. Feasibility of identifying the tobacco-related global metabolome in blood by UPLC-QTOF-MS. *J Proteome Res.* 2013;12(2):679–91.
  204. Cruickshank-Quinn CI, Mahaffey S, Justice MJ, Hughes G, Armstrong M, Bowler RP, et al. Transient and persistent metabolomic changes in plasma following chronic cigarette

- smoke exposure in a mouse model. *PLoS One*. 2014;9(7): e101855.
205. Xu T, Holzapfel C, Dong X, Bader E, Yu Z, Prehn C, et al. Effects of smoking and smoking cessation on human serum metabolite profile: results from the KORA cohort study. *BMC Med*. BioMed Central Ltd; 2013;11(1):60.
  206. Hecht SS, Murphy SE, Stepanov I, Nelson HH, Yuan J-M. Tobacco smoke biomarkers and cancer risk among male smokers in the Shanghai Cohort Study. *Cancer Letters*. 2012;334(1):34-8.
  207. Carmella SG, Ming X, Olvera N, Brookmeyer C, Yoder A, Hecht SS. High throughput liquid and gas chromatography-tandem mass spectrometry assays for tobacco-specific nitrosamine and polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites associated with lung cancer in smokers. *Chem Res Toxicol*. 2013;26(8):1209–17.
  208. Yuan J-M. Urinary tobacco smoke-constituent biomarkers for assessing risk of lung cancer. *Changes*. 2012;29(6):997–1003.
  209. Eom S-Y, Yim D-H, Moon SI, Youn J-W, Kwon H-J, Oh HC, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon-induced oxidative stress, antioxidant capacity, and the risk of lung cancer: a pilot nested case-control study. *Anticancer Res*. 2013;33(8):3089–97.
  210. Mathé, Ewy A. Patterson, AD. Haznadar M. Non-invasive urinary metabolomic profiling identifies diagnostic and prognostic markers in lung cancer. *Cancer Res*. 2014;72(12):3259–70.
  211. Deja S, Porebska I, Kowal A, Zabek A, Barg W, Pawelczyk K, et al. Metabolomics provide new insights on lung cancer staging and discrimination from chronic obstructive pulmonary disease. *J Pharm Biomed Anal*. 2014;100:369–80.
  212. El-Zein M, Parent M-E, Kâ K, Siemiatycki J, St-Pierre Y, Rousseau M-C. History of asthma or eczema and cancer risk among men: a population-based case-control study in Montreal, Quebec, Canada. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2010;104(5):378–84.
  213. Denholm R, Schüz J, Straif K, Stücker I, Jöckel K-H, Brenner DR, et al. Is Previous Respiratory Disease a Risk Factor for Lung Cancer? *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;190(5):549-59.
  214. Skillrud DM, Offord KP, Miller RD. Higher risk of lung cancer in chronic obstructive pulmonary disease. A prospective, matched, controlled study. *Ann Intern Med*. 1986;105(4):503–7.
  215. Ueda K, Jinbo M, Li TS, Yagi T, Suga K, Hamano K. Computed tomography-diagnosed emphysema, not airway obstruction, is associated with the prognostic outcome of early-stage lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12(22):6730–6.
  216. Punturieri A, Szabo E, Croxton TL, Shapiro SD, Dubinett SM. Lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease: Needs and opportunities for integrated research. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(8):554–9.
  217. Potton E, McCaughan F, Janes S. Chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer.

- Respiratory Medicine: COPD Update. 2009;5(2):34-37.
218. Tockman MS, Anthonisen NR, Wright EC, Donithan MG. Airways obstruction and the risk for lung cancer. *Ann Intern Med.* 1987;106(4):512–8.
  219. Wang H, Yang L, Zou L, Huang D, Guo Y, Pan M, et al. Association between Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Lung Cancer: A Case-Control Study in Southern Chinese and a Meta-Analysis. *PLoS One.* 2012;7(9): e46144.
  220. Brenner DR, McLaughlin JR, Hung RJ. Previous lung diseases and lung cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2011;6(3): e17479.
  221. Petty TL. Are COPD and Lung Cancer Two Manifestations of the Same Disease? *CHEST J.* 2005;128(4):1895.
  222. Brody JS, Spira A. State of the art. Chronic obstructive pulmonary disease, inflammation, and lung cancer. *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3(6):535–7.
  223. Proctor RN. Tobacco and the global epidemic of lung cancer. *Cas Lek Cesk.* 2002;141(18):567–70.
  224. Rutgers SR, Postma DS, Ten Hacken NH, Kauffman HF, Van der Mark TW, Koeter GH, et al. Ongoing airway inflammation in patients with COPD who do not currently smoke. *Chest.* 2000;55(1): 12–18.
  225. Houghton J. Feeding the Flame : New Research Adds to. *Cancer.* 2005;97(4):251–3.
  226. Ubhi BK, Riley JH, Shaw PA, Lomas DA, Tal-Singers R, MacNeef W, et al. Metabolic profiling detects biomarkers of protein degradation in COPD patients. *Eur Respir J.* 2012;40(2):345–55.
  227. Rodríguez D a., Alcarraz-Vizán G, Díaz-Moralli S, Reed M, Gómez FP, Falciani F, et al. Plasma metabolic profile in COPD patients: Effects of exercise and endurance training. *Metabolomics.* 2012;8(3):508–16.
  228. Rocha CM, Carrola J, Barros AS, Gil AM, Goodfellow BJ, Carreira IM, et al. Metabolic signatures of lung cancer in biofluids: NMR-based metabonomics of blood plasma. *J Proteome Res.* 2011;10(9):4314–24.



# 9 ANEXOS



## 9. ANEXOS

---

ANEXO-1. HOJA INFORMATIVA DE PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO: ESTUDIO DE LOS PATRONES METABOLÓMICOS EN MUESTRAS DE SANGRE DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN Y SIN CÁNCER DE PULMÓN.....	194
ANEXO-2. CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	196
ANEXO-3. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS. ....	197
ANEXO-4. COMUNICACIONES A CONGRESOS INTERNACIONALES. ....	198
ANEXO-5. COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES.....	201
<i>A. Comunicaciones a congresos Regionales</i> .....	201
<i>B. Comunicaciones a congresos Nacionales.</i> .....	206
ANEXO-6. PUBLICACIONES EN REVISTAS.....	210
<b>ADEMUM</b> .....	<b>212</b>

## ANEXO-1. Hoja informativa de participación en el estudio: Estudio de los patrones metabólicos en muestras de sangre de pacientes con cáncer de pulmón y sin cáncer de pulmón

### Hoja de información al paciente.

#### TITULO DEL ESTUDIO:

#### **Búsqueda de biomarcadores metabólicos para la detección precoz de Cáncer de Pulmón en población de riesgo.**

Línea de investigación: Diagnóstico precoz de cáncer de pulmón

Nuestro fin es identificar posibles sustancias que sean características del cáncer de pulmón y que puedan utilizarse, en un futuro, para diagnosticar precozmente los cánceres de pulmón y de esa forma, detectar y tratar antes los casos de cáncer y mejorar su supervivencia.

El diagnóstico precoz del cáncer de pulmón requiere una serie de pasos en su investigación. En primer lugar, es preciso comprobar si el metabolismo en general de los pacientes con cáncer de pulmón es diferente de las personas que no tienen cáncer de pulmón en las sustancias que produce, lo que podríamos llamar el "patrón metabólico", que se puede estudiar en muestras de sangre. Si se comprueban esas diferencias, el segundo paso consistiría en intentar identificar cuáles son las sustancias responsables de esas diferencias generales, y comprobar que esas sustancias individuales diferencian claramente entre personas con y sin cáncer de pulmón. De esta forma, su determinación en una persona podría usarse como marcador biológico de mayor riesgo de cáncer de pulmón, y concentrar en ella los medios diagnósticos para descartarlo o diagnosticarlo precozmente. En este sentido, sería especialmente importante observar si esto ocurre también entre pacientes con cáncer de pulmón y otros con alto riesgo de padecerlo pero que no lo tienen.

Las muestras de sangre se obtendrán mediante una punción de una vena del brazo. Es la técnica habitual de extracción sanguínea, siendo sus posibles complicaciones unas ligeras molestias locales. Tras informarle, se le solicitará que firme usted un consentimiento.

En base a lo anterior, realizaremos el análisis de las muestras con fines exclusivamente científicos relacionados con el objetivo del estudio. Las muestras de sangre serán identificadas con un código (manteniendo así el anonimato del paciente). Todo el material que no sea utilizado inmediatamente será conservado para su posible utilización en otros proyectos dentro de la línea de investigación diagnóstico precoz de cáncer de pulmón formando parte de una colección inscrita en el Biobanco Andaluz.

En un futuro, en cualquier momento, usted puede solicitar a los investigadores que sus datos y muestras sean retirados del estudio. En caso de que usted retire su consentimiento, sus muestras de sangre serán destruidas.

**Confidencialidad:**

La información obtenida en el estudio será confidencial, de acuerdo con lo que establece la Ley Orgánica 15/99 de Protección de datos de Carácter Personal (LOPD), la declaración de Helsinki, BCP y la Ley 14/07 de Investigación biomédica. Nadie, excepto los miembros del estudio y el Comité Ético de Investigación Clínica, tendrá acceso a su información. Los resultados obtenidos sólo se podrán publicar de forma anónima y nunca de forma individual.

- Confirmando que he leído y entiendo la información correspondiente al estudio mencionado anteriormente en este documento y que he tenido oportunidad de realizar preguntas sobre el mismo.
- Comprendo que mi participación es voluntaria y que tengo total libertad para retirarme en cualquier momento, sin necesidad de aducir ninguna razón y sin que ello afecte a la atención sanitaria que me corresponde ni a mis derechos legales.
- Comprendo que se almacenará una cierta cantidad de suero de forma anónima e indefinida para su uso en futuros análisis y estoy de acuerdo con que se utilice para investigaciones relativas al diagnóstico precoz de cáncer de pulmón.
- Consiento en que los investigadores que realizan el estudio almacenen las muestras sanguíneas y lo analicen de forma anónima nuevamente en fecha posterior para fines relacionados con la línea de investigación propuesta.
- Accedo a que cualquier muestra residual de sangre sea utilizada de forma anónima en estudios futuros en torno al cáncer de pulmón y otras patologías pulmonares.
- Cabe la posibilidad de que los investigadores deseen ponerse en contacto conmigo de nuevo a fin de comprobar si mi estado de salud ha variado. Accedo a que los investigadores sanitarios se vuelvan a poner en contacto conmigo.
- Accedo a que los investigadores que deseen ponerse en contacto conmigo soliciten a mi médico de cabecera permiso para conocer mi nueva dirección (en caso de haberme mudado).

## ANEXO-2. Consentimiento informado.

### Consentimiento informado

#### TÍTULO DEL ESTUDIO:

#### **Búsqueda de biomarcadores metabolómicos para la detección precoz de Cáncer de Pulmón en población de riesgo.**

He leído la hoja de información al paciente, he hecho todas las preguntas que creía necesarias y estoy de acuerdo en participar en las siguientes partes del estudio:

	SI	NO
Entrevista		
Cuestionarios específicos		
Medidas antropométricas		
Recogida de muestra de sangre		

Nombre y apellidos del participante:

Fecha:

Firma:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Nombre y apellidos del investigador:

Fecha:

Firma

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Apreciamos sinceramente su cooperación en este proyecto de investigación. Si tiene alguna pregunta sobre el estudio, puede llamar al coordinador del estudio: Dr. Pereira Vega (+34 959016060).

### ANEXO-3. Protocolo de extracción de muestras sanguíneas.

#### Protocolo de extracción de sangre

1. Preparar el material de extracción (los tubos caducados aumentan la incidencia de hemólisis). Realizar la extracción directa al tubo de vacío mediante el correspondiente adaptador o porta tubos. Dos causas muy importantes de Hemólisis, son:
  - a. La extracción con jeringa y posterior paso al tubo.
  - b. La extracción directa desde catéter.
2. Identificar el paciente y comprobar que esté en ayunas de 12 horas.
3. Colocar el paciente en posición correcta con el brazo completamente extendido.
4. Palpar las venas para elegir el lugar de punción. Intentar utilizar las venas de la fosa antecubital que presentan un calibre de vena adecuado.
5. Aplicar el torniquete, 7-10 cm. por encima de la flexura del codo. Pedir al paciente cierre el puño. Mantener el torniquete como máximo 1 minuto, aplicando una presión suficiente pero que permita palpar el pulso.
6. Ponerse los guantes.
7. Desinfectar el lugar de punción alcohol 70%. Dejar secar al aire. No volver a tocar con el dedo.
8. Pinchar. Cuando empieza a fluir la sangre en el tubo, pedir al paciente que abra la mano y retirar el torniquete.
9. Llenar los tubos en el correcto orden (en nuestro caso, primero el de suero y luego el de anticoagulante) y en la cantidad adecuada. Una menor cantidad de sangre da lugar:
  - a. A una menor cantidad de muestra disponible en todos los casos
  - b. A una proporción inadecuada de anticoagulante/sangre en el caso de los tubos de EDTA y Heparina Litio.
10. Retirar la aguja. Activar el mecanismo de seguridad. Desechar el dispositivo entero (aguja o palometa y porta tubo).
11. Aplicar presión en el lugar de punción con una gasa durante unos minutos.
12. Etiquetar los tubos y registrar la hora de la extracción.
13. Homogenizar los tubos suavemente por inversión.
  - a. El tubo de suero debe dejarse a Temperatura Ambiente y en posición vertical durante 30 minutos (máximo 2 horas).
  - b. El tubo de plasma (EDTA o Heparina Litio) se mete en baño de hielo hasta su centrifugación (máximo 2 horas)
14. Transporte cuidadoso evitando movimientos bruscos.
15. Centrifugar antes de las 2 horas a las revoluciones adecuadas y a 4º C.
16. Separación de 4 alícuotas de 0.5 mL en tubo identificado con tapón de rosca.
17. Congelar a -80º C. Evitar congelaciones y descongelaciones sucesivas.

## ANEXO-4. Comunicaciones a congresos internacionales.

### 4.1. Congreso Internacional ERS (European Respiratory Society), Viena 2012.


**EUROPEAN RESPIRATORY *journal***  
OFFICIAL SCIENTIFIC JOURNAL OF THE ERS

[HOME](#) | [ERS PUBLICATIONS](#) | [IN PRESS](#) | [CURRENT ISSUE](#) | [ARCHIVE](#) | [SUBSCRIPTIONS](#) | [MY STACKS](#) | [ALERTS](#)

Eva Vázquez Gandullo [View/Change User Info](#) [CiteTrack](#) [Personal Alerts](#) [Subscription HELP](#) [Sign Out](#)

## Lung cancer metabolomics in plasma, urine and bronchoalveolar lavage. A pilot study ➔

Ricardo Aguilar<sup>1</sup>, Eva Vázquez<sup>1</sup>, Antonio Ruiz<sup>1</sup>, Rocío Castilla<sup>2</sup>, Raúl González<sup>2</sup>, Jesús Grávalos<sup>1</sup>, Tamara García<sup>2</sup>, Jose Luis Gómez-Ariza<sup>2</sup>, Jose Antonio Maldonado<sup>1</sup> and Antonio Pereira-Vega<sup>1</sup>

+ Author Affiliations

 stack this

**Abstract**

---

Lung cancer (LC) has high morbimortality rates. Today, research in biomarkers is a hot topic, and among these, the least frequently studied, are those of the metabolomics field.

Our aims are to present preliminary data using metabolomics technics for detection of differentiated patterns between patients with LC and non-lung cancer (NLC) patients, to obtain an effective screening method.

We obtained blood, urine, and bronchoalveolar lavage (BLA) samples from a group of patients who underwent bronchoscopy, for further analysis through mass

« Previous | Next Article »  
[Table of Contents](#)

**This Article**

ERJ **September 1, 2012** vol. 40 no. Suppl 36 P4217

» [Abstract](#) *Free*  
[Full Text \(PDF\)](#) *Free*

- **Classifications**

11.1 Lung Cancer

- **Services**

Email this article to a colleague  
 Alert me when this article is cited  
 Alert me if a correction is posted  
 Article Usage Statistics  
 Similar articles in this journal  
 Download to citation manager  
 Request permissions

+ **Citing Articles**

+ **Google Scholar**

+ **PubMed**

+ **Social Bookmarking**

4.2. Congreso Internacional ERS (European Respiratory Society), Múnich 2014.

The screenshot displays the article page for "Metabolomic analysis of serum samples from patients with lung cancer" in the European Respiratory Journal. The journal's logo and name are at the top, along with navigation links like "HOME", "ERS PUBLICATIONS", "IN PRESS", "CURRENT ISSUE", "ARCHIVE", "SUBSCRIPTIONS", "MY STACKS", and "ALERTS". A search bar is located in the top right corner. The article title is prominently displayed, followed by the authors: Eva Vázquez-Gandullo<sup>1</sup>, Macarena González<sup>2,3,4</sup>, Antonio José Ruiz-Reina<sup>1</sup>, Tamara García-Barrena<sup>2,3,4</sup>, Ricardo Aguilar Pérez-Grovas<sup>1</sup>, Jesús Grávalos-Guzmán<sup>1</sup>, José Luis Sánchez-Ramos<sup>5</sup>, José Antonio Maldonado-Pérez<sup>1</sup>, José Luis Gómez-Ariza<sup>2,3,4</sup> and Antonio Pereira-Vega<sup>1</sup>. Below the authors, there are links for "Author Affiliations" and "stack this". The abstract text begins: "In this study, potential biomarkers (BM) that allow differentiation between patients diagnosed with lung cancer (LC) and healthy subjects have been identified using the metabolic method. This enables diagnosis in the early stages of the disease. This paper explores the identification of specific BM in certain types of LC." On the right side, there is a sidebar with "This Article" information, including the volume (ERJ September 1, 2014 vol. 44 no. Suppl 33 P2702), a link to the "Abstract Free", and a "Classifications" section showing "11.1 Lung Cancer". Below this are "Services" such as "Email this article to a colleague", "Alert me when this article is cited", "Alert me if a correction is posted", "Article Usage Statistics", "Similar articles in this journal", "Download to citation manager", and "Request permissions". Further down are links for "Citing Articles", "Google Scholar", "PubMed", and "Social Bookmarking". A vertical menu on the far right contains links for "About the ERJ", "Manuscript Submissions", "Editorial Board", "CME", "Reprints", "Permissions", "Advertising", "Press Releases", "Feedback", "Help", "RSS", and "Our use of cookies". The ERS logo is visible in the bottom right corner.

The screenshot displays the article page for "Metabolic signatures associated with lung cancer using serum samples. Influence of hemolysis" in the European Respiratory Journal. The journal's logo and name are at the top, along with navigation links like "HOME", "ERS PUBLICATIONS", "IN PRESS", "CURRENT ISSUE", "ARCHIVE", "SUBSCRIPTIONS", "MY STACKS", and "ALERTS". A search bar is located in the top right corner. The article title is prominently displayed, followed by the authors: Antonio Jose Ruiz Reina<sup>1</sup>, Macarena Gonzalez<sup>2,3,4</sup>, Eva Vazquez<sup>1</sup>, Ricardo Ismael Aguilar Perez Grovas<sup>1</sup>, Ignacio Vazquez Rico<sup>2,3,4</sup>, Tamara Garcia Barrera<sup>2,3,4</sup>, Jesus Gravalos Guzman<sup>1</sup>, Jose Luis Sanchez Ramos<sup>2,3,4</sup>, Jose Antonio Maldonado Perez<sup>1</sup>, Jose Luis Gomez Ariza<sup>2,3,4</sup> and Antonio Pereira Vega<sup>1</sup>. Below the authors, there are links for "Author Affiliations" and "stack this". The abstract text begins: "Sampling procedure greatly affects results and conclusions in metabolomic studies. This is the case of serum samples sustaining hemolysis, which need accurate evaluation in assessment of lung cancer (LC)." On the right side, there is a sidebar with "This Article" information, including the volume (ERJ September 1, 2014 vol. 44 no. Suppl 33 P2694), a link to the "Abstract Free", and a "Classifications" section showing "11.1 Lung Cancer". Below this are "Services" such as "Email this article to a colleague", "Alert me when this article is cited", "Alert me if a correction is posted", "Article Usage Statistics", "Similar articles in this journal", "Download to citation manager", and "Request permissions". Further down are links for "Citing Articles", "Google Scholar", "PubMed", and "Social Bookmarking". A vertical menu on the far right contains links for "About the ERJ", "Manuscript Submissions", "Editorial Board", "CME", "Reprints", "Permissions", "Advertising", "Press Releases", "Feedback", "Help", "RSS", and "Our use of cookies". The ERS logo is visible in the bottom right corner.

## 4.3. Congreso Internacional ERS (European Respiratory Society), Ámsterdam 2015.

**EUROPEAN RESPIRATORY *journal***  
OFFICIAL SCIENTIFIC JOURNAL OF THE ERS

[Advanced Search](#)

[Home](#) [Articles](#) [About](#) [For authors](#) [For readers](#) [Subscriptions](#)

## Metabolomic profiles in lung cancer subjects and healthy controls. Influence of smoking tobacco exposure

Ricardo Aguilar Perez-Grovas, Eva Vázquez Gandullo, Belén Callejón Leblic, Macarena González Fernández, Jesús Grávalos Guzmán, Tamara García Barrera, José Luis Sánchez Ramos, José Antonio Maldonado Pérez, María Pilar Muñoz Zara, José Luis Gómez Ariza, Antonio Pereira Vega  
DOI: 10.1183/13993003.congress-2015.PA4295 Published 1 September 2015

[Article](#) [Info & Metrics](#)

**Abstract**

The metabolomic field has great potential for finding diagnostic biomarkers in lung cancer (LC). We are considering a metabolomic approach based on mass spectrometry to characterize metabolomic changes underlying LC and the influence of smoking exposure defined as cigarette pack-years (P/Y), on metabolic profiles.

A total of 21 subjects were included: 9 healthy non-smokers controls, 6 LC subjects (4 Adenocarcinomas, 1 Squamous Cell Carcinoma, 1 Large Cell Carcinoma) with moderate P/Y (<35), and 6 LC subjects (2 Adenocarcinomas, 3 Squamous Cell Carcinoma, 1 Small Cell Carcinoma) with high P/Y (>70).

**Vol 46 Issue suppl 59 Table of Contents**

[Table of Contents](#)  
[Index by author](#)

[Email](#) [Request Permissions](#)  
 [Alerts](#) [Share](#)  
 [Citation Tools](#)

**Jump To**

[Article](#)  
 [Info & Metrics](#)

## ANEXO-5. Comunicaciones a congresos nacionales.

### A. Comunicaciones a congresos Regionales

#### 1.- XXXVIII CONGRESO NEUMOSUR, GRANADA 2012.

	XXXVIII CONG
<p><b>CÁNCER DE PULMÓN Y METABOLÓMICA. ESTUDIO PILOTO</b></p> <p>E. Vázquez Gandullo<sup>1</sup>, R. Castilla Quintero<sup>2</sup>, R. González Domínguez<sup>2</sup>, J. Grávalos Guzman<sup>1</sup>, T. García Barrera<sup>2</sup>, J. L. Gómez Ariza<sup>2</sup>, J. A. Maldonado Pérez<sup>1</sup>, A. Pereira Vega<sup>1</sup></p> <p><sup>1</sup> Sección de Neumología. Hospital Juan Ramón Jiménez. Huelva. <sup>2</sup> Dpto. de Química y CC.MM. Fac. de CC Experimentales. Campus of Excellence International ceiA3. Universidad. Huelva.</p> <p><b>Introducción:</b> El cáncer de pulmón (CP) es la neoplasia más frecuente en varones y presenta una alta morbilidad y mortalidad. Es importante la identificación de factores que incrementen el riesgo de padecer esta enfermedad y la búsqueda de marcadores que orienten en su detección. En los últimos años se han realizado múltiples estudios enfocados a la búsqueda de biomarcadores, entendiendo estos como parámetros biológicos medibles y cuantificables. Menos frecuente son los que emplean la metabolómica, que consiste en la medida de la respuesta metabólica frente a un estímulo determinado. Resultados previos del análisis metabólico sobre suero se han presentado previamente.</p> <p><b>Objetivo:</b> Presentar los datos preliminares de la utilización de técnicas metabólicas para detectar patrones diferenciados entre pacientes con CP y pacientes sin esa enfermedad en muestras de orina, que puedan ser útiles para su detección precoz.</p> <p><b>Metodología:</b> A un grupo de pacientes sometidos a broncoscopia se les extrajeron muestras de sangre, orina y líquido broncoalveolar (BAL) para su posterior análisis mediante espectrometría de masas en tándem (QqQ-TOF-MS); esta técnica proporciona perfiles metabólicos (metabolic fingerprinting), con una alta sensibilidad y versatilidad, permitiendo llevar a cabo análisis en diferentes modalidades (+ y -), y cubrir así un mayor rango de metabolitos implicados en el proceso. Presentamos en este momento los resultados de la aplicación de esta técnica sobre orina diluida. Se realizó la cuantificación e identificación mediante experimentos de fragmentación masas-masas (MS-MS). A partir del espectro de masas, los resultados fueron procesados mediante análisis estadístico con "Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-</p>	<p>DA)" y comparados con el diagnóstico histológico obtenido.</p> <p><b>Resultados:</b> Inicialmente hemos incluido muestras de orina de 3 pacientes diagnosticados de CP (edad media 60 años) y 10 controles (media de edad 37,6 años). En el análisis de las muestras mediante QqQ-TOF-MS se han observado diferencias en cuanto a la intensidad de algunas de las señales presentes. En el análisis estadístico de los resultados anteriores se observa una clara discriminación entre los casos de CP y los controles. Finalmente esta técnica permite identificar potenciales marcadores sobreexpresados en CP en modo positivo como son la colina, la fosfocolina y carnitina; y en modo negativo el ácido úrico y ácido hipúrico.</p> <p><b>Conclusiones:</b></p> <ol style="list-style-type: none"><li>1.- Los dos grupos de estudio presentan perfiles metabólicos diferentes, que permiten su discriminación estadística.</li><li>2.- Se han identificado los metabolitos que causan esta discriminación y se han correlacionado con rutas previamente asociadas a procesos neoplásicos.</li><li>3.- Estos datos preliminares plantean la posibilidad de ampliar estudios que permitan la obtención de marcadores precoces en la detección de CP.</li></ol>

## 2.- 39º CONGRESO NEUMOSUR, BADAJOZ 2013.

## Comunicaciones

**BIOMARCADORES DE CÁNCER DE PULMÓN EN DISTINTAS MUESTRAS BIOLÓGICAS**

E. Vázquez Gandullo <sup>1</sup>, R. Castilla Quintero <sup>2</sup>, R. González Domínguez <sup>2</sup>, J. Grávalos Guzmán <sup>1</sup>, T. García Barrera <sup>2</sup>, J. L. Gómez Ariza <sup>2</sup>, J. A. Maldonado Pérez <sup>1</sup>, A. Pereira Vega <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sección de Neumología. H. Juan Ramón Jiménez, Huelva.

<sup>2</sup> Dpto. de Química y CC.MM. Fac. de CC Experimentales. Campus de Excelencia Internacional ceiA3. Universidad de Huelva

**Introducción:** Dada la alta mortalidad que presenta el cáncer de pulmón (CP) en la actualidad, y con el fin de su diagnóstico precoz, se está potenciando el estudio mediante técnicas metabolómicas de diferentes muestras biológicas como sangre, orina, aire exhalado o biopsias, entre otras, para la obtención de biomarcadores (BM) útiles para este propósito. Hasta el momento, el análisis complementario de distintas muestras biológicas en una misma población no se había considerado aún.

**Objetivo:** Analizar comparativamente mediante el uso de herramientas metabolómicas basadas en espectrometría de masas de alta resolución, los perfiles metabolómicos obtenidos en suero sanguíneo y orina de una población con CP y sujetos controles.

**Metodología:** Obtención de muestras de sangre, orina y líquido broncoalveolar (BAL) para su posterior análisis metabolómico, de un grupo de pacientes sometidos a broncoscopia (por sospecha de CP y otras enfermedades pulmonares no neoplásicas). Mediante el uso de espectrometría de masas en tándem (QqQ-TOF-MS), que permite estudiar un gran número de metabolitos en cada una de las muestras consideradas, se han obtenido perfiles metabolómicos para los dos grupos de estudio. Posteriormente estos perfiles son comparados estadísticamente mediante análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), con el fin de encontrar los metabolitos alterados a causa de la enfermedad, y emplearlos como potenciales BM. Los resultados mostrados proceden de muestras de suero sanguíneo y orina de un estudio piloto constituido por 7 pacientes diagnosticados de CP y 7 controles. Para las muestras de BAL, aún se están desarrollando los procedimientos de análisis.

**Resultados:** Observamos una clara discriminación metabolómica entre los casos CP y los controles, con la obtención de distintos metabolitos sobreexpresados en los fluidos biológicos procedentes de enfermos de CP, que pueden relacionarse con distin-

tas anomalías bioquímicas asociadas al cáncer, y que por lo tanto podrían ser usados como BM. En suero sanguíneo encontramos marcadores como la colina, la fosfocolina y componentes de la familia de las glicerofosfocolinas (integrantes de las membranas celulares); los ácidos málico y láctico (implicados en el metabolismo energético) y la taurina. Por otro lado, en orina, los metabolitos sobreexpresados fueron la colina y fosfocolina, la carnitina (relacionada con el metabolismo de lípidos); y los ácidos úrico e hipúrico (metabolismo de las purinas).

**Conclusiones:**

- 1.- Los grupos de estudio (CP y no CP) presentan perfiles metabolómicos diferentes, que permiten su discriminación estadística.
- 2.- Se han identificado los metabolitos que causan esta discriminación y se han relacionado con rutas previamente asociadas a procesos neoplásicos.
- 3.- Los resultados obtenidos con ambos fluidos biológicos (suero y orina) demuestran la utilidad del empleo de distintas muestras en el estudio del CP, ya que permiten investigar distintas rutas bioquímicas y así ampliar el número de potenciales BM.

**TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DEL CARCINOMA BRONCOGÉNICO (CB): SUPERVIVENCIA EN FUNCIÓN DEL TIPO DE RESECCIÓN REALIZADA**

M. García Sáez, J. F. Galán Jiménez, R. A. Fernández Anzules, R. Risco Rojas, D. León Medina, C. López García, S. García Barajas

Servicio de Cirugía Torácica. H. Infanta Cristina. Badajoz

**Introducción:** La cirugía es el tratamiento de elección en los casos de carcinoma broncogénico con enfermedad localizada en el momento del diagnóstico. El objetivo de nuestro estudio es analizar en qué medida influye el tipo de resección pulmonar sobre la supervivencia de los pacientes como posible factor pronóstico de la enfermedad.

**Metodología:** Estudio descriptivo y retrospectivo realizado sobre 283 casos de CB intervenidos quirúrgicamente entre Mayo de 2001 y Diciembre de 2010. Se han excluido las toracotomías exploradoras, los casos de mortalidad postoperatoria y los fallecimientos por causas no relacionadas con progresión de la enfermedad. Describimos la estirpe tumoral, el tipo de cirugía realizada en cada caso y la supervivencia de los pacientes en función del tipo de resección con un periodo de seguimiento mínimo de 2 años postoperatorio.

**Resultados:** De los 283 pacientes intervenidos

3.- 40º CONGRESO NEUMOSUR, JEREZ DE LA FRONTERA, CÁDIZ 2014.

Comunicaciones

te estableció que la edad (OR: 1,02; IC 95%: 1-1,05), sexo masculino (OR: 1,6; IC 95%: 1,03-2,6), número de ingresos previos (OR: 1,1; IC 95%: 1,03-1,20), indicación incorrecta (OR: 1,9; IC 95%: 1,29-2,8), no tratamiento con BIPAP (OR: 4,5; IC 95%: 1,1-19,2), cáncer de pulmón (OR:3,3; IC 95%:1,1 -10,1), presencia de enfermedad renal (OR:1,4; IC 95%: 0,9-2,3) y hematocrito en el seguimiento (OR:0,95; IC 95%:0,91 -0,99) se asociaron independientemente a una mayor mortalidad. La curva COR del modelo tuvo un AUC de (0,60; IC 95%: 0,54-0,66), por lo que su capacidad predictiva no fue buena.

**Conclusiones:**

1. La OD en pacientes no EPOC incluye un grupo heterogéneo de patologías, sobre todo de origen cardiológico.
2. La supervivencia de estos pacientes fue inferior a la de pacientes con EPOC.
3. Las principales causas de mortalidad fueron de origen cardiológico (53,7%) y oncológico (13,9%).
4. Fueron predictores independientes de mortalidad la edad, sexo masculino, nº de ingresos previos, indicación incorrecta, ausencia de tratamiento con BIPAP, cáncer de pulmón, enfermedad renal y hematocrito en el seguimiento.

**ANÁLISIS METABOLÓMICO EN MUESTRAS DE SUERO DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN**

E. Vázquez Gandullo<sup>1</sup>, M. González Fernández<sup>2</sup>, J.A. Maldonado Pérez<sup>1</sup>, T. García Barrera<sup>2</sup>, J. Grávalos Guzmán<sup>1</sup>, J.L. Gómez Ariza<sup>2</sup>, A.J. Ruiz Reina<sup>1</sup>, J.L. Sánchez Ramos<sup>3</sup>, M.C. Huertas Cifredo<sup>1</sup>, R. Aguilar Pérez-Grovas<sup>1</sup>, R. Ayerbe García<sup>1</sup>, J. Fernández de Córdoba<sup>1</sup>, A. Pereira Vega<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Sección de Neumología del H. Juan Ramón Jiménez, Huelva.

<sup>2</sup> Departamento de Química y Ciencia de los Materiales, U. de Huelva (UHU). <sup>3</sup> Departamento de Enfermería de la UHU.

**Introducción:** A través de un procedimiento metabolómico, basado en el uso de espectrometría de masas, se han detectado posibles biomarcadores (BM) que permitirían diferenciar entre pacientes con cáncer de pulmón (CP) y sujetos sanos, posibilitando un diagnóstico precoz de esta enfermedad. Asimismo se investiga la identificación de BM específicos de determinados tipos de CP.

**Metodología:** A un grupo de 30 pacientes diagnosticados de CP, y a 30 controles sanos, se les extrajeron

muestras de sangre para su posterior análisis. Se obtuvieron los metabolitos del suero, mediante precipitación de proteínas, y se analizaron mediante infusión directa en espectrómetro de masas de triple cuadrúpolo tiempo de vuelo (utilizando modo de ionización positiva y negativa). Esta técnica junto a sistemas de masas de alta resolución (QqQ-TOF-MS), permite el análisis de un gran número de muestras en poco tiempo, con la obtención de un gran número de metabolitos. Los perfiles metabolómicos obtenidos para ambos, fueron comparados estadísticamente mediante análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), con el fin de encontrar los metabolitos alterados a causa de la enfermedad, y emplearlos como potenciales BM. Aplicamos, igualmente, la metodología descrita para obtener perfiles metabólicos de los distintos tipos de CP.

**Resultados:** El registro de la espectrometría de masas muestra una clara discriminación metabolómica entre los casos de CP y los controles sanos. Se han observado distintos metabolitos sobreexpresados en pacientes con CP, tales como la carnitina y sus derivados (butiril-carnitina y oleil-carnitina), que reflejan alteraciones en el metabolismo energético celular, y la fenilalanina y dopamina, relacionados con la regulación de la función inmune. Se observó también una disminución de los niveles de fosfolípidos (derivados de colina e inositol), probablemente como consecuencia de alteraciones lipídicas de las membranas celulares, y de las lisofosfatidilcolinas, involucradas en la regulación de la proliferación celular e invasión de células cancerígenas. El registro de la espectrometría, según los distintos tipos de CP (epidermoide, células grandes, adenocarcinoma y células pequeñas), también permitió una clara diferenciación entre ellos.

**Conclusiones:**

1. Los grupos de estudio (CP y controles sanos) presentan perfiles metabolómicos diferentes, que permiten su discriminación estadística. Se han identificado los metabolitos que causan esta discriminación, y se han relacionado con rutas previamente asociadas a procesos neoplásicos.
2. Los distintos tipos de CP también presentan perfiles metabolómicos diferentes entre sí, y permiten su diferenciación estadística. Estos resultados preliminares son muy alentadores, una vez confirmados en mayor número de casos, con el fin de la obtención de BM específicos para los distintos tipos de CP.
3. Los resultados obtenidos sugieren la utilidad del empleo de esta técnica en muestras de suero, ya que permiten investigar distintas rutas bioquímicas y así ampliar el número de potenciales BM de CP.

## 4.- 41º CONGRESO NEUMOSUR, CÓRDOBA 2015.

## Comunicaciones

cia global fue pobre (5,5%), con supervivencias al año, 3º año y 5º año del 37%, 10% y 7%, respectivamente.

- 2- Estos hechos se relacionan con la situación avanzada de la neoplasia al diagnóstico en la mayor parte de los pacientes (estadio III-IV: 81,4%).
- 3- Encontramos predictores de mortalidad relacionados con la sintomatología y los estudios de extensión realizados al diagnóstico.

#### PERFILES METABOLÓMICOS DE SUJETOS SANOS Y CON CÁNCER DE PULMÓN. INFLUENCIA DE LA CARGA TABÁQUICA

E. Vázquez Gandullo<sup>1</sup>, B. Callejón Leblic<sup>3</sup>, M. González Fernández<sup>2</sup>, T. García Barrera<sup>3</sup>, J.L. Sánchez Ramos<sup>4</sup>, J.A. Maldonado Pérez<sup>2</sup>, J.L. Gómez Ariza<sup>3</sup>, A. Pereira Vega<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Servicio de Neumología, Hospital Punta de Europa. Algeciras. <sup>2</sup>Sección de Neumología, Hospital Juan Ramón Jiménez, Huelva. <sup>3</sup>Dpto. de y CC.MM. Fac. de CC Experimentales, Campus de Excelencia Internacional ceiA3, Universidad de Huelva. <sup>4</sup>Departamento de Enfermería, Universidad de Huelva.

**Introducción:** la aplicación de técnicas metabólicas presenta un gran potencial para la búsqueda de posibles biomarcadores de diagnóstico en numerosas enfermedades. En este estudio, se ha empleado un procedimiento metabólico basado en espectrometría de masas para estudiar las modificaciones metabólicas subyacentes al cáncer de pulmón (CP) y la influencia de la carga tabáquica (CT) en paquetes/año en los correspondientes perfiles metabólicos.

**Metodología:** se obtuvieron muestras de suero de 9 controles sanos (no fumadores), 6 enfermos de CP (4 adenocarcinomas, 1 epidermoide, 1 carcinoma de células grandes) con carga tabáquica moderada (CT <35) y 6 enfermos de CP (2 adenocarcinomas, 3 epidermoides, 1 carcinoma de células pequeñas) con elevada carga tabáquica (CT >70). Se analizaron los metabolitos mediante infusión directa en un espectrómetro de masas de alta resolución (DI-ESI-QTOF-MS). Los perfiles metabólicos obtenidos se sometieron a análisis estadístico multivariante (PCA, PLS-DA).

**Resultados:** los tres grupos de estudio mostraron unos perfiles metabólicos claramente diferentes, lo que permitió identificar algunos posibles biomarcadores. Los niveles de glutatión se encontraron disminuidos en muestras de suero de pacientes con CP (23,61 % en CT <35 y 74,05 % en CT >70), indicati-

vo de una situación de estrés oxidativo, mientras que el contenido de distintos fosfolípidos de membrana (PL) se incrementó en estas muestras (con aumentos del 56,78 % en CT <35 y 142,62 % en CT >70), probablemente como consecuencia de alteraciones en los procesos de regulación de la proliferación celular e invasión de células cancerígenas. La mayoría de estas anomalías metabólicas, se acentuaron en pacientes con una CT elevada, lo que sugiere la influencia de la carga tabáquica en la aparición de estos procesos metabólicos en CP.

**Conclusiones:** el análisis metabólico de muestras de suero permitió diferenciar claramente entre sanos y pacientes con CP. Asimismo, se identificaron posibles biomarcadores para el diagnóstico del CP, los cuales pueden relacionarse con distintos mecanismos patológicos propios de esta enfermedad. Además, estas alteraciones se vieron influenciadas por la carga tabáquica de los pacientes incluidos en el estudio, lo que remarca la importancia del tabaquismo como factor de riesgo primario en el desarrollo del CP.

Proyecto financiado con Beca Neumosur 8/2012 y Beca SEPAR 124/2012.

#### FACTORES DEPENDIENTES DE LA NECESIDAD DE USO DE VENTILACIÓN MECÁNICA NO INVASIVA EN NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD

G.E. González Angulo, E. Rodríguez Posadas, M.C. Morillo Domínguez, M. Arroyo Varela, P. Gutiérrez Castaño, J.L. de la Cruz Ríos.

Servicio de Neumología, Hospital Regional Universitario de Málaga.

**Introducción:** la aplicación precoz de ventilación mecánica no invasiva en la neumonía aguda grave disminuye la tasa de intubación, así como las complicaciones asociadas a la ventilación invasiva y disminuye la estancia hospitalaria, así como la mortalidad. El efecto beneficioso es debido al reclutamiento de áreas alveolares colapsadas por la inflamación pulmonar.

**Metodología:** estudio observacional, transversal, multidimensional de un grupo de 159 pacientes con neumonía adquirida en la comunidad (NAC), ingresados en el Hospital Regional de Málaga desde el 1 de enero al 31 de diciembre del 2013, de los cuales 26 precisaron ventilación mecánica no invasiva (VMNI). Edades entre los 28 y los 91 años, media de 71 años, con un 64,78% de varones y 35,22% de mujeres.

5.- 42º CONGRESO NEUMOSUR, HUELVA 2016.

42º CONGRESO NEUMOSUR

0,46 y 0,85 para las AMN. El 54,1 % de las AMNN mostraron  $SUVr < 0,5$ . Se demostró una correlación negativa entre el tamaño y el SUV en las AMNN ( $r = -0,43$ ,  $p = 0,03$ ) y una correlación positiva en las AMN ( $r = 0,41$ ,  $p = 0,02$ ). El único hallazgo en la EBUS relacionado con benignidad fue la presencia de estructura hilar central, pero con un 28 % de sensibilidad en las ADNN.

**Conclusiones:** en la valoración de las AMNN preTBNA guiada por EBUS para estadificación del CP, la presentación de las AMNN en el CP es heterogénea, sin mostrar correlación entre las técnicas morfológicas, metabólicas y de EBUS. La falta de concordancia entre estos parámetros es, por tanto, sugestiva de un origen no neoplásico.

#### RESULTADOS DE LOS CASOS DE ECOBRONCOSCOPIA LINEAL REALIZADOS EN EL HOSPITAL QUIRÓN DE MARBELLA

C.M. Merinas López<sup>1</sup>, M. Martín Benavides<sup>2</sup>, V. Moreno Ramírez<sup>3</sup>, E. Rodríguez Posadas<sup>2</sup>, R. Aguilar Pérez<sup>2</sup>, J.M. Ignacio García<sup>2</sup>, E. Rodríguez Ruiz<sup>2</sup>, C. Moreno Giraldez<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Hospital Quirón Campo de Gibraltar. Servicio de Neumología. <sup>2</sup> Hospital Quirón Marbella. Servicio de Neumología. <sup>3</sup> Quirón Salud Málaga y Marbella. Servicio de Anatomía Patológica.

**Introducción:** analizar los resultados de las ecobroncoscopias lineales realizadas en el Hospital Quirón de Marbella, desde el 01/10/2014 hasta el 31/10/2015.

**Metodología:** se recogieron todos los casos de ecobroncoscopia lineal realizados desde el 01/10/2014 al 31/04/2015 y se analizaron los resultados reportados desde el laboratorio de anatomía patológica con el que trabaja el Hospital, así como los del laboratorio de microbiología. Para el análisis de los datos, se utilizaron los programas IBM SPSS *Statistics* 19. Se calcularon frecuencias absolutas y relativas para variables cualitativas y la media y desviación típica para las numéricas.

**Resultados:** se realizaron un total de 16 casos. La mayoría de ellos (un 29,4%) fueron indicados por sospecha de carcinoma broncogénico, que no pudo diagnosticarse por otras técnicas (fibrobroncoscopia flexible). En un 23,5% de los casos, la indicación clínica fue para la realización de estadificación en un carcinoma broncogénico ya conocido. Otro 23,5% de ellos fueron indicados por sospecha clínica de sarcoidosis. En todos los casos se obtuvo un diag-

nóstico anatomopatológico concluyente, siendo los diagnósticos más frecuentes los de metástasis de adenocarcinoma de pulmón (17,6% de los casos) y sarcoidosis (17,6%). Se diagnosticó un carcinoma de pulmón de células grandes en el 11,8% de los casos y se halló material compatible con tumor neuroendocrino en un 11,8% de ellos. Como metástasis de carcinoma epidermoide, se informó el 5,9% de los casos. El estudio microbiológico reportó el diagnóstico de 1 caso de tuberculosis.

**Conclusiones:**

- 1: la indicación clínica más frecuente por la que se realizaron las ecobroncoscopias lineales fue la sospecha de un carcinoma broncogénico.
- 2: otras indicaciones fueron la estadificación de un carcinoma conocido y la sospecha de sarcoidosis.
- 3: los resultados del estudio anatomopatológico dieron un diagnóstico en todos los casos, siendo el más frecuente el de metástasis de adenocarcinoma y sarcoidosis.

#### EXPRESIÓN METABÓLICA EN SUERO Y LAVADO BRONCOALVEOLAR EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN Y EN OTRAS ENFERMEDADES PULMONARES

P. Muñoz Zara<sup>1</sup>, B. Callejón Leblíc<sup>2</sup>, T. García Barrera<sup>2</sup>, E. Vázquez Gandullo<sup>3</sup>, J. Grávalos Guzmán<sup>1</sup>, J.L. Gómez Ariza<sup>2</sup>, A. Pereira Vega<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Complejo Hospitalario Universitario de Huelva. <sup>2</sup> Department of Chemistry. Faculty of Experimental Science. University of Huelva. Spain. <sup>3</sup> Sección de Neumología. Hospital de Algeciras.

**Introducción:** el cáncer de pulmón (CP) es una de las patologías de mayor incidencia y mortalidad, fundamentalmente por su diagnóstico tardío, de ahí la necesidad de su diagnóstico precoz. Con este propósito, la metabolómica se ha empleado en muestras de suero y lavado broncoalveolar (LBA), estas últimas, nunca empleadas previamente en relación a esta dolencia. En el presente trabajo se han analizado las diferencias de expresión metabólica del suero y LBA de enfermos con CP y pacientes con otras enfermedades respiratorias no cancerosas (controles), con los OBJETIVOS de: 1, comprobar si ambos tipos de perfiles metabólicos discriminan entre ambos tipos de muestra; 2, identificar los metabolitos que clasifican los casos empleando suero y LBA; 3, establecer coincidencias y diferencias entre los metabolitos obtenidos en los dos tipos de muestras.

**Metodología:** se han analizado sueros de 15 en-

## B. Comunicaciones a congresos Nacionales.

### 1.- 45º CONGRESO NACIONAL SEPAR, MADRID 2012.

132

45 Congreso Nacional de la SEPAR

tabaquismo y EPOC, incluidos como casos de referencia; 30 voluntarios sanos (no-fumadores). La presencia de MICA soluble (sMICA) fue confirmada en 42% del total de pacientes (rango 1-42.415 pg/ml).

**Conclusiones:** La detección de sMICA circulante es anormal e identifica un grupo de riesgo para progresión de la enfermedad. Como un nuevo biomarcador, sMICA puede ser complementaria a la estadificación de TNM normalizada, y representativa de la inmunovigilancia antitumoral en pacientes con cáncer de pulmón.

#### CÁNCER DE PULMÓN EN EL SEXO FEMENINO: ESTUDIO COMPARATIVO

N.J. Martínez Hernández, A. Arnau Obrer, J. Martínez Baños, E. García del Olmo, S. Figueroa Almánzar y R. Guijarro Jorge

*Hospital General Universitario de Valencia.*

**Introducción:** El cáncer de pulmón ha sido clásicamente más frecuente en hombres que en mujeres, si bien la proporción tiende actualmente a la paridad. En el presente trabajo pretendemos estudiar las diferencias que esta enfermedad presenta en pacientes resecados entre las el sexo femenino y masculino.

**Material y métodos:** Estudio analítico retrospectivo. Se incluyeron los 1420 cánceres consecutivos tratados quirúrgicamente en nuestro servicio entre 1990 y 2010. En análisis estadístico se realizó mediante SIGMA (Horus Hardware), utilizando chi-cuadrado para la comparación de variables cualitativas, y log-rank para comparación de supervivencias.

**Resultados:** Del total de los 1.420 cánceres tratados, 144 fueron mujeres (10,14%). Edad media: Hombres (H) 62,36 (27-85); Mujeres (M) 59 (20-82). Hábito tabáquico: H 98%; M 43,6% (p = 0,011). Los estadios hasta II-B suponen el 62,06% en M y 72,87% en H, y mayores de III-A, 34,74% en M y 27,12% M (p < 0,001). En lo que respecta a la supervivencia (S), los datos arrojados son como siguen: la S en H es a 1 año, 68%, 3 años, 42% y 5 años, 32%, con una mediana de 750 días. En M, al año es del 77%, 3 años, 51%, 5 años, 36%, con una mediana de 1.120 días. Estas diferencias no son estadísticamente significativas (p = 0,051). Según histología, en Epidermoide, la S mediana en H es 710 días y en M, 2600 (p = 0,45). Adenocarcinoma, H, 870 días; M 1.145 (p = 0,46). Según estadio, en aquellos hasta II-B, S mediana en H es 972 días y en M, 1.150 (p = 0,0025). En III-A, S mediana en H es 365 y en M, 425 (p = 0,46).

**Conclusiones:** El cáncer de pulmón representa un espectro patológico diferente en la mujer, con una menor influencia del tabaco y estadios más avanzados al diagnóstico, pero una mayor supervivencia en aquellos que son detectados en estadios precoces.

#### CÁNCER DE PULMÓN Y METABOLÓMICA. ESTUDIO PILOTO

E. Vázquez Gandullo<sup>1</sup>, R. Castilla Quintero<sup>2</sup>, R. González Domínguez<sup>2</sup>, J. Grávalos Guzmán<sup>1</sup>, J.L. Gómez Ariza<sup>2</sup>, J.A. Maldonado Pérez<sup>1</sup>, M. Alwakil Olbah<sup>1</sup>, A.J. Ruiz Reina<sup>1</sup>, R.I. Aguilar Pérez-Grovas<sup>1</sup>, T. García Barrera<sup>2</sup> y A. Pereira Vega<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UGC Neumología y Alergia. Área Hospitalaria Juan Ramón Jiménez.

<sup>2</sup>Departamento de Química y CC.MM. Facultad de Ciencias Experimentales; Campus of Excellence International ceiA3. Research Center of Health and Environment (CY SMA). Universidad de Huelva.

**Introducción:** El cáncer de pulmón (CP), neoplasia más frecuente en varones, presenta una alta morbimortalidad. Es importante la identificación de factores que incrementen el riesgo de padecer esta enfermedad y la búsqueda de marcadores que orienten en su detección. En los últimos años se han realizado múltiples estudios enfocados a la búsqueda de biomarcadores. Menos frecuente son los que emplean la metabolómica: medida de la respuesta metabólica frente a un estímulo determinado.

**Objetivo:** Presentar datos preliminares de la utilización de técnicas metabolómicas para detectar patrones diferenciados entre pacientes con CP y pacientes sin esa enfermedad.

**Material y métodos:** A un grupo de pacientes sometidos a broncoscopia se les extrajeron muestras de sangre, orina y líquido broncoalveolar (BAL) para su posterior análisis mediante espectrometría de masas en tándem (QqQ-TOF-MS); que proporciona perfiles metabolómicos (metabolic fingerprinting), con una alta sensibilidad y versatilidad, permitiendo llevar a cabo análisis en diferentes modalidades (+ y -), y cubrir así un mayor rango de metabolitos implicados en el proceso. Posteriormente se realizó la cuantificación e identificación mediante experimentos de fragmentación masas-masas (MS-MS). Los resultados fueron procesados mediante análisis estadístico con "Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA)" y comparados con el diagnóstico histológico obtenido.

**Resultados:** Hemos incluido suero sanguíneo de 3 pacientes diagnosticados de CP (edad media 60 años) y 19 controles (media de edad 68,15 años). Para las muestras: orina y BAL, aún se están desarrollando los procedimientos de análisis. En el análisis de las muestras mediante QqQ-TOF-MS se han observado diferencias en la intensidad de algunas de las señales presentes, que tras análisis estadístico mostró una clara discriminación entre los casos de CP y los controles. La identificación de los potenciales marcadores sobreexpresados ha sido de colina, fosfocolina, componentes de la familia de las fosfocolinas y de ácido málico en modo positivo; y en modo negativo el ácido láctico y la taurina.

**Conclusiones:** Los dos grupos de estudio presentan perfiles metabolómicos diferentes, que permiten su discriminación estadística. Se han identificado los metabolitos que causan esta discriminación y se han correlacionado con rutas previamente asociadas a procesos neoplásicos. Estos datos preliminares plantean la posibilidad de ampliar estudios que permitan la obtención de marcadores precoces en el CP.

#### CÁNCER DE VEJIGA EN PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE CÁNCER DE PULMÓN

M.J. Pavón Fernández, S. Flórez Martín, R. López Vime, A. Encabo Motiño, D. Vázquez Güil, A. Perpiñá Ferrí, P. Alba García Baquero y N. Abad Santamaría

*Hospital Severo Ochoa.*

**Introducción:** El cáncer de pulmón y el de vejiga comparten factores etiopatogénicos como son el humo del tabaco y alteraciones genéticas (mutaciones en el P53 y polimorfismos en las enzimas GST M1 y GST T1). En España representan la 1ª y la 5ª causa de muerte por neoplasia en varones respectivamente. El tipo histológico más frecuente en el cáncer broncogénico es el epidermoide aunque se advierte una tendencia en aumento del adenocarcinoma. Respecto al cáncer de vejiga, el tipo histológico predominante (93%) es el de células transicionales. Ambos tumores se diagnostican con frecuencia en estadios avanzados, pero sería deseable el diagnóstico en estadios más precoces.

**Objetivo:** Evaluar la existencia de cáncer de vejiga en pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón.

**Material y métodos:** Estudio retrospectivo y descriptivo de pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón entre mayo/2008 y sep/2011 en una consulta específica hospitalaria. Se analizaron las siguientes variables: edad, sexo, hábito tabáquico e IPA (índice paquetes/año), histología y estadio del cáncer de pulmón, diagnóstico de cáncer de vejiga previo o posterior al diagnóstico de cáncer de pulmón e histología del cáncer de vejiga. Los datos se registraron en una base de datos de ACCESS y se analizaron con el programa SPSS 15.0.

**Resultados:** Se estudiaron 162 casos de los cuales 138 eran varones (85%). La edad media era de 67,8 (DE 8,9). El 93,8% eran fumadores con un IPA medio de 47,7 (mínimo de 7 y máximo de 120). El porcentaje según el tipo histológico era el siguiente: epidermoide: 33,3%;

2.- 46º CONGRESO NACIONAL SEPAR, BARCELONA 2013.

144

46 Congreso Nacional de la SEPAR

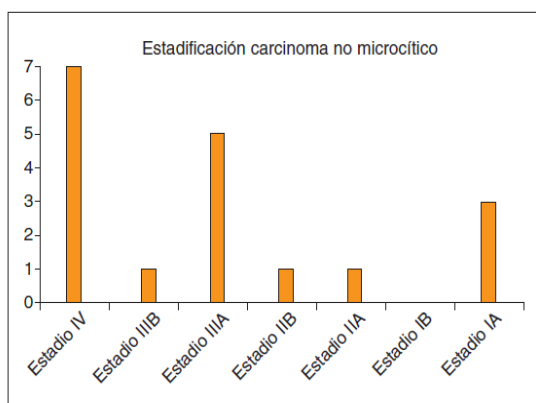


Fig. 2

microcítico. La mayoría de los pacientes se encontraba en estadio IV, lo que condiciona que el tratamiento empelado, en la mayoría de los casos, haya sido la quimioterapia.

#### ESTUDIO METABOLÓMICO DEL CÁNCER DE PULMÓN MEDIANTE EL ANÁLISIS COMPARATIVO DE DISTINTAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

E. Vázquez Gandullo<sup>1</sup>, R. Castilla Quintero<sup>2</sup>, R. González Domínguez<sup>2</sup>, J. Grávalos Guzmán<sup>1</sup>, T. García Barrera<sup>2</sup>, J.L. Gómez Ariza<sup>2</sup>, J.A. Maldonado Pérez<sup>1</sup>, A.J. Ruiz Reina<sup>1</sup>, R.I. Aguilar Pérez-Grovas<sup>1</sup>, M.C. Huertas Cifredo<sup>1</sup>, R.Ayerbe García<sup>1</sup>, J. Fernández de Córdoba Gamero<sup>1</sup> y A. Pereira Vega<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sección de Neumología. Hospital Juan Ramón Jiménez. <sup>2</sup>Departamento de Química. Facultad de Ciencias Experimentales. Centro de Investigación en Salud y Medioambiente (CYSMA). Universidad de Huelva.

**Introducción:** En la aplicación de técnicas metabolómicas para la caracterización de posibles biomarcadores (BM) de cáncer de pulmón (CP), que permitan su diagnóstico precoz, se han propuesto distintas muestras como sangre, orina, aire exhalado o biopsias, entre otras. Sin embargo, el análisis complementario de distintas matrices biológicas en una misma población no ha sido aun considerado. Aplicar herramientas metabolómicas basadas en la espectrometría de masas para el estudio del CP, analizando comparativamente los perfiles metabolómicos obtenidos en suero sanguíneo y orina de pacientes con CP y sujetos controles.

**Material y métodos:** A un grupo de pacientes sometidos a broncoscopia (por sospecha de CP u otras enfermedades pulmonares no neoplásicas) se les extrajeron muestras de sangre, orina y líquido broncoalveolar (BAL), para posterior análisis metabolómico mediante espectrometría de masas en tándem (QqQ-TOF-MS), que permite estudiar gran número de metabolitos en cada muestra. Estos perfiles metabolómicos obtenidos, en pacientes con CP y controles sin CP, fueron comparados estadísticamente mediante análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), con el fin de encontrar los metabolitos alterados a causa de la enfermedad, y que por lo tanto pudieran ser empleados como potenciales BM. Los resultados mostrados proceden de un estudio piloto constituido por 7 pacientes diagnosticados de CP y 7 controles. Para las muestras de BAL, aún se están desarrollando los procedimientos de análisis.

**Resultados:** Clara discriminación metabolómica entre casos de CP y controles. Se obtuvieron distintos metabolitos sobreexpresados en los

fluidos biológicos procedentes de enfermos de CP, que pueden relacionarse con distintas anomalías bioquímicas asociadas al cáncer, y que podrían ser usados como BM. En suero sanguíneo encontramos la colina, la fosfocolina y componentes de la familia de las glicero-fosfolinas; los ácidos málico y láctico y la taurina. Por otro lado, en orina, la colina y fosfocolina, la carnitina; y los ácidos úrico e hipúrico.

**Conclusiones:** Los grupos de estudio (CP y no CP) presentan perfiles metabolómicos diferentes, que permiten su discriminación estadística. Se han identificado los metabolitos que causan esta discriminación, ya relacionados con rutas previamente asociadas a procesos neoplásicos. Los resultados obtenidos con suero y orina demuestran la utilidad del empleo de distintas muestras en el estudio del CP, permitiendo investigar distintas rutas bioquímicas y ampliar el número de potenciales BM.

#### EVOLUCIÓN A CORTO Y LARGO PLAZO DE LOS PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN NO CÉLULA PEQUEÑA T1 Y T2

R. Zapata González, L. Romero Vielva, J. Solé Montserrat, M. Deu Martín, I. López Sanz, J. Pérez Vélez, A. Jauregui Aburalach, M. Wong Jaen, I. Bello Rodríguez y M. Canela Cardona

Hospital Vall d'Hebron.

**Introducción:** El objetivo de nuestro trabajo es revisar las resecciones pulmonares realizadas por cáncer de pulmón no célula pequeña (CP-NCP) y analizar su supervivencia a corto y largo plazo de forma global, en relación al tamaño del tumor (T1 y T2), los ganglios resecaados y la recidiva ganglionar mediastínica.

**Material y métodos:** Se realizó una revisión retrospectiva secuencial de las resecciones pulmonares mayores, lobectomía, bilobectomía y neumonectomías, realizadas en el Hospital Vall d'Hebron, entre octubre de 1993 y diciembre de 2011, por CPNCP T1 y T2. La media de seguimiento fue de 50 meses (r: 0,3-210).

**Resultados:** Se analizaron un total de 755 pacientes, 646 hombres (85,5%) y 109 mujeres (14,5%) con una edad media de 64 años (r: 21-84). La histología más frecuente fue el escamoso (45%) seguido por el adenocarcinoma (35%). Se realizaron 595 lobectomías, 119 neumonectomías y 41 bilobectomías. A mayor número de ganglios resecaados, mayor número de pacientes con ganglios positivos ( $p \leq 0,001$ ). Se encontró significativamente más ganglios positivos en los T2 ( $p \leq 0,001$ ). Los estadios fueron IA: 152 pacientes (20%), IB: 348 pacientes (46%), IIA: 24 pacientes (3%), IIB: 99 pacientes (13%), IIIA: 113 pacientes (15%), IIIB: 1 paciente (0,1%), IV: 18 pacientes (2%), de los cuales eran T1: 193 pacientes (25,6%) y T2: 562 pacientes (74,4%). Al último seguimiento 377 pacientes (49,9%) habían fallecido, de los cuales 82 pacientes (22%) fallecieron a causa directa de la neoplasia. La mortalidad postoperatoria fue de 22 pacientes (2,9%), 73 pacientes (12,2%) presentaron recidiva ganglionar mediastínica, siendo bilateral en el 89%. La media de tiempo entre la cirugía y la aparición de la recidiva fue 27 meses. La supervivencia media global fue de 7,6 años (al año: 85%, tres años: 65%, cinco años: 51%). La supervivencia media según el tamaño, T1: 9 años, T2: 7 años ( $p = 0,006$ ), según los ganglios, negativos (N0): 8,3 años ( $p \leq 0,001$ ), positivos: 5,8 años: N1: 6,9 años, N2: 4,9 años, N3: 1,7 años ( $p \leq 0,001$ ) y según la recidiva ganglionar mediastínica, presente: 3,8 años, ausente: 8,7 años ( $p \leq 0,001$ ).

**Conclusiones:** En nuestra serie el tipo de neoplasia pulmonar más frecuente continua siendo el escamoso, siendo más frecuente en hombres. La supervivencia media global a 5 años en nuestra serie es del 51%, viéndose significativamente reducida por el tamaño del tumor, la afectación de los ganglios mediastínicos y la presencia de recidiva.

## 3.- 47º CONGRESO NACIONAL SEPAR, BILBAO 2014.

144

47 Congreso Nacional de la SEPAR

dermoide (38,8%, 71 casos) fue el más frecuente, seguido del adenocarcinoma (36,6%, 67 casos). En las mujeres, el 73,9% (17) era adenocarcinoma. El carcinoma microcítico representó el 9,8% (18). Estadificación y cirugía: Al diagnóstico el 48,6% (89) era estadio IV. El 24,6% (45) fue quirúrgico: (16% lobectomía 3,4% neumonectomía). El 71,06% (130) no fue reseccable y el 4,37% (8) inoperable. La mortalidad global fue al año de 49,2% (90 casos).

Tabla 1. Estirpe histológica

	Hombres	%	Mujeres	%	Total	% total
Adenocarcinoma	50	31,25%	17	73,91%	67	36,61%
C. epidermoide	69	43,12%	2	8,70%	71	38,79%
Microcítico	17	10,63%	1	4,34%	18	9,83%
Células grandes	18	11,25%	2	8,70%	20	10,93%
No microcítico sp.	6	3,75%	0	0%	6	3,27%
2 tumores sincrónicos	0	0%	1	4,34%	1	0,55%
Total	160		23		183	100%

Tabla 2. Estadios clínicos y mortalidad

Estadio clínico	No.	%	Mortalidad al año	No	%
0	1	0,5	0	0	
IA	23	12,5	1	4,3	
IB	19	10,4	3	15,8	
IIA	4	2,2	1	25%	
IIB	5	2,7	1	20%	
IIIA	24	13,1	9	37,5	
IIIB	18	9,8	8	44,4	
IV	89	48,6	67	75,3%	
Total	183	100%	90	49,2%	

**Conclusiones:** 1. La gran mayoría de los pacientes con CP eran fumadores (89,6%). En las mujeres, el porcentaje de fumadoras fue menor (56,5%). 2. El carcinoma epidermoide sigue siendo el más frecuente, por poca diferencia; en las mujeres el adenocarcinoma es el más frecuente con diferencia. 3. Casi la mitad se diagnostica en estadio IV, y sólo el 24,29% fue candidato a la cirugía. 4. La mortalidad global al año fue del 49,2%.

#### ESTUDIO METABOLÓMICO EN SUERO DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN Y CONTROLES SANOS

E. Vázquez-Gandullo<sup>1</sup>, M. González-Fernández<sup>2</sup>, J.L. Sánchez-Ramos<sup>2</sup>, T. García-Barrera<sup>2</sup>, J. Grávalos-Guzmán<sup>1</sup>, J.A. Maldonado-Pérez<sup>1</sup>, M.C. Huertas-Cifredo<sup>1</sup>, A.J. Ruiz-Reina<sup>1</sup>, R. Aguilar Pérez-Grovas<sup>1</sup>, J.L. Gómez-Ariza<sup>2</sup> y A. Pereira-Vega<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hospital Juan Ramón Jiménez. <sup>2</sup>Universidad de Huelva.

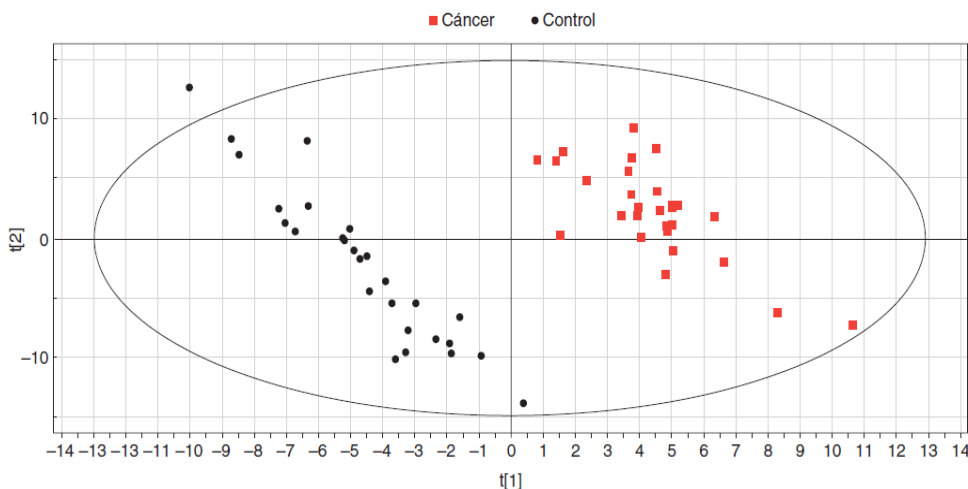
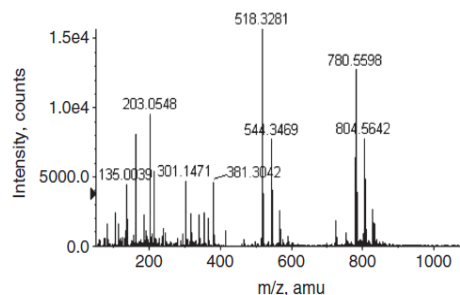
**Introducción:** Se ha utilizado la metabolómica para el hallazgo de posibles biomarcadores de cáncer de pulmón (CP), y de esta forma

conseguir su diagnóstico precoz. Los estudios hasta ahora publicados utilizan tamaños de muestra relativamente pequeños. El objetivo del estudio es determinar los perfiles metabolómicos obtenidos en suero sanguíneo de una población de pacientes con CP y sujetos controles sanos.

**Material y métodos:** A un grupo de 30 pacientes diagnosticados de CP y a 30 controles sanos se les extrajeron muestras de sangre, para su posterior análisis metabolómico. Para ello se hizo uso de la espectrometría de masas en tándem (QqQ-TOF-MS), técnica que permite estudiar un gran número de metabolitos. Se realizó una extracción de metabolitos del suero mediante precipitación de proteínas con disolventes orgánicos y análisis mediante infusión directa en espectrómetro de masas de alta resolución (ionización positiva y negativa). Estos perfiles metabolómicos obtenidos para los dos grupos de estudio (pacientes con CP, controles sanos) fueron comparados estadísticamente mediante análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), con el fin de encontrar los metabolitos alterados a causa de la enfermedad, y que por lo tanto pudieran ser empleados como potenciales biomarcadores.

**Resultados:** El registro de la espectrometría de masas (fig. 1) permitió observar una clara discriminación metabolómica entre los casos de cáncer y los controles sanos (fig. 2). De este modo se pudieron dilucidar distintos metabolitos sobreexpresados en el suero procedente de enfermos de CP, como los derivados de carnitina (butiril-carnitina y oleil-carnitina) que reflejan alteraciones en el metabolismo energético celular. Por otra parte, los fosfolípidos (derivados de colina e inositol) estaban disminuidos en las muestras de enfermos, probablemente como consecuencia de alteraciones lipídicas de las membranas celulares.

**Conclusiones:** 1. Los grupos de estudio (CP y controles sanos) presentan perfiles metabolómicos diferentes, que permiten su discrimina-



4.- CONGRESO NACIONAL SEPAR, LAS PALMAS DE GRAN CANARIA 2015.

**CONCLUSIONES:** En los pacientes con diagnóstico de cáncer de pulmón en estadios avanzados (estadios IIIb y IV), la presencia de EPOC, no tiene un impacto significativo en la supervivencia.

**IMPLICACIÓN PRONÓSTICA DEL MICROAMBIENTE INMUNOLÓGICO EN CPNM RESECABLE: ANÁLISIS DE ARNm Y PROTEÍNAS**

E. García del Olmo, A.I. Martínez Maradiaga, C.A. Sampedro Salinas, E. Pastor Martínez, A. Arnau Obrer, M. Usó, J. Forteza, C. Camps y R. Gujjarro Jorge

Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.

**Introducción:** La infiltración tumoral por células inmunes ha demostrado jugar un papel esencial en la progresión tumoral.

**Material y métodos:** En este estudio retrospectivo se utilizaron muestras FFPE (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded) de tejido del tumor primario de 117 pacientes con CPNM en etapa temprana. Se evaluaron los niveles de expresión de ARNm de 11 genes (CD127, CD25, FOXP3, CTLA-4, IL-10, TGFβ-1, LAG-3, GITR y TNFA así como CD4 y CD8) en el tumor y el estroma tumoral por RTqPCR usando sondas de hidrólisis. Además los niveles de expresión de la proteína CD4, CD8 y FOXP3 se evaluaron en 84 de estas muestras FFPE por inmunohistoquímica usando un Dako Autostainer. Todos los análisis estadísticos se consideraron significativos valores de  $p < 0,05$ .

**Resultados:** Tanto en tumor como en estroma, encontramos sobreexpresión de CD25 (19.46X y 11.59X, respectivamente), FOXP3 (4.96X y 4.08X, respectivamente), CTLA-4 (2.89X y 3,02, respectivamente) y TGFβ-1 (3.24X y 2.11X, respectivamente) e infraexpresión de TNFA (0.39X y 0.27X, respectivamente). Los análisis de supervivencia revelaron que los pacientes con niveles más bajos de expresión de CD8 en las zonas tumorales tienen peor supervivencia global (SG) y peor supervivencia libre de progresión (SLP). Menores niveles de expresión también se asociaron con una menor SG para CD4 y LAG-3 en el tumor. Por otra parte, los pacientes con un "perfil Treg" ( $\uparrow$  CD25 y  $\downarrow$  CD127) en el estroma tuvieron peor SLP. También se encontró que los pacientes con niveles altos de relación FOXP3 estroma/FOXP3 tumor,

**INFLUENCIA DE LA HEMÓLISIS EN ESTUDIOS METABOLÓMICOS EN MUESTRAS DE SUERO DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN**

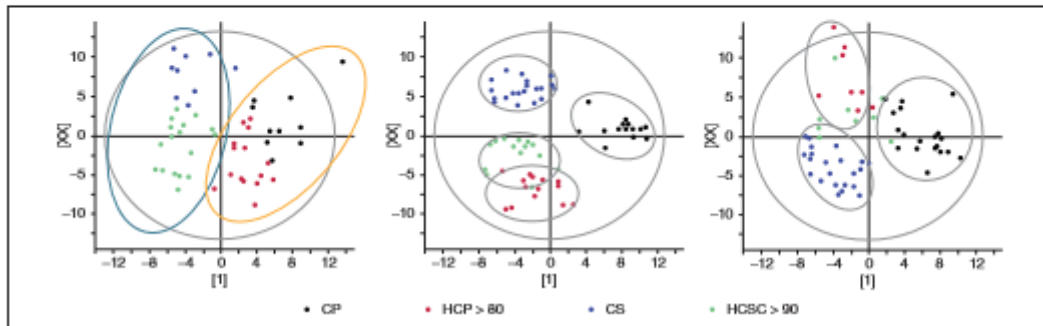
E. Vázquez Gandullo<sup>1</sup>, A. Pereira Vega<sup>2</sup>, J.L. Sánchez Ramos<sup>3</sup>, I. Vázquez Rico<sup>4</sup>, M. González Fernández<sup>5</sup>, A.J. Rufz Reina<sup>6</sup>, T. García Barrera<sup>7</sup>, J. Grávalos Guzmán<sup>8</sup>, J.A. Maldonado Pérez<sup>2</sup>, R.I. Aguilar-Pérez Growas<sup>9</sup> y J.L. Gómez Ariza<sup>9</sup>

<sup>1</sup>Sección de Neumología, Hospital Punta de Europa. <sup>2</sup>Sección de Neumología, Hospital Juan Ramón Jiménez. <sup>3</sup>Departamento de Enfermería, Facultad de CC Experimentales, Campus of Excellence Internacional ceiA3, Research Center of Health and Environment (CYSMA), Universidad de Huelva. <sup>4</sup>Servicio de Laboratorio, Hospital Juan Ramón Jiménez. <sup>5</sup>Departamento de Química y CCMM, Facultad de CC Experimentales, Campus of Excellence Internacional ceiA3, Research Center of Health and Environment (CYSMA), Universidad de Huelva.

**Introducción:** Los procedimientos de obtención y análisis de muestras condicionan los resultados y conclusiones de los estudios metabolómicos. Pretendemos evaluar la influencia de la hemólisis en los estudios metabolómicos sobre muestras de suero mediante un estudio piloto en 30 casos de cáncer de pulmón (CP) y 30 controles sanos (CS).

**Material y métodos:** Se obtuvieron las características metabolómicas de las muestras de suero de 30 pacientes con CP y 30 CS, tras la precipitación de proteínas por espectrometría de masas de infusión directa (DIMS), utilizando un espectrómetro en tándem (QqQ-TOF-MS). El índice hemolítico (IH) se evaluó de forma semicuantitativa por espectrofotometría ultravioleta visible. Se clasificaron los perfiles metabolómicos mediante análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales, teniendo en cuenta la concentración de hemoglobina estimada por el IH en las muestras para los diferentes puntos de corte de IH ( $> 20$ ,  $> 40$  y  $> 80$  mg/dl).

**Resultados:** Teniendo en cuenta sólo las muestras no hemolizadas (Hb  $\leq 20$  mg/dl) hemos encontrado una excelente discriminación entre CP y CS. Cuando el punto de corte para hemólisis es  $> 40$  mg/dl, las muestras no hemolizadas o ligeramente hemolizadas ( $\leq 40$  mg/dl), mantienen una buena capacidad de discriminación entre CP y CS. Sin



## ANEXO-6. Publicaciones en Revistas.

## 1.- REVISTA ESPAÑOLA DE PATOLOGÍA TORÁCICA: Rev Esp Patol Torac 2016; 28 (1).

## ● ● ● ● ORIGINALES

PERFILES METABOLÓMICOS DE SUJETOS SANOS Y CON CÁNCER DE PULMÓN.  
INFLUENCIA DE LA CARGA TABÁQUICA

E. Vázquez Gandullo<sup>1,5</sup>, B. Callejón Leblic<sup>2,3,4,5</sup>, M. González Fernández<sup>2,3,4,5</sup>, J. Grávalos Guzmán<sup>1</sup>, T. García Barrera<sup>2,3,4,5</sup>, J.L. Sánchez Ramos<sup>6</sup>, J.A. Maldonado Pérez<sup>1</sup>, I. Vázquez Rico<sup>7</sup>, J.L. Gómez Ariza<sup>2,3,4,5</sup>, A. Pereira Vega<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Sección de Neumología. H. Juan Ramón Jiménez, Huelva. <sup>2</sup> Dpto. de Química y CC.MM. Fac. de CC Experimentales. <sup>3</sup> Campus of Excellence International ceiA3. <sup>4</sup> Research Center of Health and Environment (CYSMA). <sup>5</sup> U. de Huelva. Campus de El Carmen, Huelva. <sup>6</sup> Departamento de Enfermería. U. de Huelva. <sup>7</sup> Servicio de Laboratorio. H. Juan Ramón Jiménez, Huelva.

Proyecto financiado con Beca Neumostur 8/2012 y Beca SEPAR 125/2012

## Resumen

**Introducción:** la aplicación de técnicas metabolómicas presenta un gran potencial para la búsqueda de posibles biomarcadores de diagnóstico precoz en numerosas enfermedades. El empleo de procedimientos metabolómicos basados en espectrometría de masas permite estudiar las modificaciones metabólicas subyacentes al cáncer de pulmón (CP) y la influencia de la carga tabáquica (CT), medida en paquetes-año, en los correspondientes perfiles metabólicos.

**Metodología:** se estudió el suero de 9 controles sanos (no fumadores), 6 enfermos de CP con carga tabáquica moderada (CT <35) y 6 enfermos de CP con elevada carga tabáquica (CT >70). Se analizaron los metabolitos mediante técnicas de espectrometría de masas de alta resolución (DI-ESI-QTOF-MS). Los perfiles metabolómicos obtenidos se sometieron a análisis estadístico multivariante (PCA, PLS-DA).

**Resultados:** los tres grupos de estudio mostraron perfiles metabólicos claramente diferentes, lo que permitió identificar algunos posibles biomarcadores. Los niveles de glutatión se encontraron disminuidos en muestras de suero de pacientes con CP, mientras que se incrementó el contenido de distintos fosfolípidos de membrana (PL). La mayoría de estas anomalías metabólicas se acentuó en pacientes con una CT elevada.

**Conclusiones:** el análisis metabolómico en muestras de suero permitió diferenciar claramente entre sujetos sanos y pacientes con CP. Así mismo, se identificaron posibles biomarcadores para el diagnóstico del CP (relacionados con rutas previamente conocidas en el proceso del cáncer). Además, estas alteraciones se vieron influenciadas por la carga tabáquica, confirmando la importancia del tabaquismo como factor de riesgo primario en el desarrollo del CP.

**Palabras clave:** metabolómica, cáncer de pulmón, carga tabáquica, biomarcadores.

## THE METABOLOMICS OF HEALTHY SUBJECTS AND THOSE WITH LUNG CANCER: THE INFLUENCE OF SMOKING

## Abstract

By using high resolution metabolomics, we obtained the metabolomic profiles for patients who smoked and had lung cancer (LC) and a healthy, non-smoker control (HC) group; we assessed the influence of smoking on said profiles. The results show a clear discrimination between the metabolomic profiles of both groups studied; the metabolites causing said difference could be determined. Moreover, differences were encountered between the metabolomic profiles of heavy smokers with lung cancer compared to moderate smokers.

**Introduction:** the application of metabolomic techniques offers extensive potential to search for possible biomarkers in the early detection of several diseases. Using metabolomic procedures based on mass spectrometry allow us to study underlying metabolic changes in lung cancer and the influence of smoking, measured as packets/year, in the corresponding metabolic profiles.

**Method:** the serum from 9 healthy control subjects (non-smokers) was studied, as well as that of 6 patients with lung cancer who were moderate smokers (CT 70). The metabolites were analyzed using high resolution mass spectrometry techniques (DI-ESI-QTOF-MS). The metabolomic profiles obtained were subject to multivariate statistical analysis (PCA, PLS-DA).

**Results:** the three groups studied showed clearly differentiated metabolic profiles, which facilitated the identification of certain biomarkers. Glutathione levels were found to be decreased in the sample from patients with lung cancer, while the content of various membrane phospholipids increased. Most of these metabolic abnormalities were heightened in patients who were heavy smokers.

**Conclusions:** the metabolomics analysis in serum samples clearly differentiated healthy subjects from patients with lung cancer. Also, possible biomarkers were identified to diagnose lung cancer (linked to previously known routes in the cancer process). Moreover, these alterations were influenced by the amount smoked, thus confirming the importance of smoking as a primary risk factor in developing lung cancer.

**Key words:** metabolomics, lung cancer, smoking, biomarkers.

Recibido: 29 de mayo de 2015. Aceptado: 20 de octubre de 2015.

Antonio Pereira Vega  
apv01h@gmail.com



# ADEMDUM

---

Los resultados preliminares del presente estudio han sido objeto de comunicación en los siguientes congresos (anexos 4, 5 Y 6):

- Cáncer de Pulmón y metabólica. Estudio Piloto. Autores: E. Vázquez Gandullo, R. Castilla Quintero, R. González Domínguez, J. Grávalos Guzmán, T. García Barrera, JL. Gómez Ariza, JA. Maldonado Pérez, A. Pereira Vega. 38 Congreso NEUMOSUR. celebrado en Granada 2012.
- Cáncer de pulmón y metabólica. Estudio piloto. Autores: E. Vázquez Gandullo, R. Castilla Quintero, R. González Domínguez, J. Grávalos Guzmán, T. García Barrera, JL. Gómez Ariza, JA. Maldonado Pérez, A. Pereira Vega. 45º congreso SEPAR, celebrado en Madrid 2012.
- Lung cancer metabolomics in plasma, urine and bronchoalveolar lavage. Pilot Study. Autores: R. Aguilar Pérez-Grovas, E. Vázquez Gandullo, R. Castilla Quintero, R. González Domínguez, J. Grávalos Guzmán, T. García Barrera, JL. Gómez Ariza, JA. Maldonado Pérez, A. Pereira Vega. European Respiratory Society Congress 2012, celebrado en Viena en septiembre de 2012.
- Biomarcadores de cáncer de pulmón en distintas muestras biológicas. Autores: E. Vázquez Gandullo, R. Castilla Quintero, R. González Domínguez, J. Grávalos Guzmán, T. García Barrera, JL. Gómez Ariza, JA. Maldonado Pérez, A. Pereira Vega. 39 Congreso NEUMOSUR celebrado en Badajoz, 2013.
- Estudio metabólico del cáncer de pulmón mediante análisis comparativo de distintas muestras biológicas. Autores: E. Vázquez Gandullo, R. Castilla Quintero, R.

González Domínguez, J. Grávalos Guzmán, T. García Barrera, JL. Gómez Ariza, JA. Maldonado Pérez), Antonio José Ruiz Reina, Ricardo Ismael Aguilar Pérez-Grovas, MC. Huertas Cifredo, Rut Ayerbe García, Javier Fernández de Córdoba Gamero, A. Pereira Vega. 46º congreso SEPAR, celebrado en Barcelona 2013.

■ Análisis metabolómico en muestras de suero de pacientes con cáncer de pulmón.

Autores: E. Vázquez Gandullo, R. Castilla Quintero, R. González Domínguez, J. Grávalos Guzmán, T. García Barrera, JL. Gómez Ariza, JA. Maldonado Pérez, Antonio José Ruiz Reina, J.L. Sánchez-Ramos, Ricardo Ismael Aguilar Pérez-Grovas, MC. Huertas Cifredo, Rut Ayerbe García, Javier Fernández de Córdoba Gamero, A. Pereira Vega. 40 Congreso Neumosur, celebrado en Jerez de la Frontera 2014.

- Premiado con Beca Neumosur.

■ Estudio metabolómico en suero de pacientes con cáncer de pulmón y controles sanos.

Autores: E. Vázquez Gandullo, M. González-Fernández, J.L. Sánchez-Ramos, T. García Barrera, J. Grávalos Guzmán, JA. Maldonado Pérez, MC. Huertas Cifredo, Antonio José Ruiz Reina, Ricardo Ismael Aguilar Pérez-Grovas, JL. Gómez Ariza, A. Pereira Vega. 47º Congreso SEPAR, celebrado en Bilbao 2014.

- Comunicación oral en Sesión Oro

- Premiado con Publibeca 2014

■ Metabolomic analysis of serum samples from patients with lung cancer. Autores: E.

Vázquez-Gandullo, M. González-Fernández, AJ. Ruiz-Reina, T. García-Barrena, R. Aguilar-Pérez Grovas, J. Grávalos-Guzmán, JL. Sanchez-Ramos, JL. Gómez-Ariza, JA.

Maldonado-Pérez, A. Pereira-Vega. European Respiratory Society Congress 2014, celebrado en Múnich en septiembre de 2014.

■ Perfiles metabolómicos de sujetos sanos y con cáncer de pulmón. Influencia de la carga tabáquica. E. Vázquez-Gandullo, B. Callejón-Leblic, M. González-Fernández J. Grávalos-Guzmán, T. García-Barrena, JL. Sanchez-Ramos, JA. Maldonado-Pérez, JL. Gómez-Ariza, A. Pereira-Vega. Congreso NEUMOSUR, celebrado en Córdoba 2015.

- Premiado con Beca Neumosur.

■ Influencia de la hemólisis en estudios metabolómicos en muestras de suero de pacientes con cáncer de pulmón. E. Vázquez-Gandullo, A. Pereira-Vega, JL. Sánchez-Ramos, I. Vázquez-Rico, M. González-Fernández, AJ. Ruíz-Reina, T. García-Barrera, J. Grávalos-Guzmán, JA. Maldonado-Pérez, RI. Aguilar-Pérez Grovas, JL. Gómez-Ariza. Congreso SEPAR, celebrado en Gran Canaria 2015.

■ Metabolomic profiles in lung cancer subjects and healthy controls. Influence of smoking tobacco exposure. R. Aguilar PerezGrovas, E. Vázquez-Gandullo, B. Callejón-Leblic, M. González-Fernández, J. Grávalos-Guzmán, T. García-Barrera, JL. Sánchez-Ramos, JA. Maldonado-Pérez, MP. Muñoz-Zara, JL. Gómez-Ariza, A. Pereira-Vega. Congreso ERS, celebrado en Ámsterdam 2015.

■ Expresión metabolómica en suero y lavado broncoalveolar en pacientes con cáncer de pulmón y en otras enfermedades pulmonares. MP. Muñoz-Zara, B. Callejón-Leblic, T. García-Barrera, E. Vázquez-Gandullo, J. Grávalos-Guzmán, JL. Gómez-Ariza, A. Pereira-Vega. Congreso Neumosur, celebrado en Huelva 2016.

Los resultados preliminares del presente estudio han sido objeto de los siguientes artículos publicados y pendiente de envío a revisión y publicación:

■ ORIGINAL: Perfiles metabolómicos de sujetos sanos y con cáncer de pulmón. Influencia de la carga tabáquica. E. Vázquez-Gandullo, B. Callejón-Leblic, M. González-Fernández, J. Grávalos-Guzmán, T. García-Barrera, JL. Sánchez-Ramos, JA. Maldonado-Pérez, I. Vázquez-Rico, JL. Gómez-Ariza), A. Pereira-Vega.

- Publicado recientemente: Rev Esp Patol Torac 2016; 28 (1).

■ Metabolomic study of patterns in serum samples for diagnosis of lung cancer. E. Vázquez-Gandullo, A. Pereira-Vega, JL. Gómez-Ariza, M. González-Fernández, JL. Sánchez-Ramos, AJ. Ruiz-Reina, B. Callejón-Leblic, J. Grávalos Guzmán, JA. Maldonado-Pérez, T. García-Barrera.

- Pendiente de enviar a Lung Cancer. Pendiente de envío para revisión.

■ Influence of hemolysis in metabolic signatures associated with lung cancer using serum samples. A. Pereira-Vega, JL. Sánchez-Ramos, E. Vázquez-Gandullo, M. González-Fernández, I. Vázquez-Rico, AJ. Ruiz-Reina, T. García-Barrer, J. Grávalos-Guzmán, JA. Maldonado-Pérez, RI. Aguilar Pérez-Grovas, JL. Gómez-Ariza.

- Pendiente de enviar a Clinical Chemistry. Pendiente de envío para revisión.



