

# Universidad de Huelva

Departamento de Química “Profesor José Carlos Vílchez  
Martín”



## Desarrollo de metodología ómicas para el estudio y diagnóstico precoz del cáncer de pulmón

Memoria para optar al grado de doctora  
presentada por:

**María Belén Callejón Leblic**

Fecha de lectura: 25 de junio de 2019

Bajo la dirección de los doctores:

José Luis Gómez Ariza

Tamara García Barrera

Antonio Pereira Vega

**Huelva, 2019**



# Universidad de Huelva

Departamento de Química "Profesor José Carlos Vilchez Martín"



Universidad  
de Huelva

## **Desarrollo de metodologías ómicas para el estudio y diagnóstico precoz del cáncer de pulmón.**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

**María Belén Callejón Leblic**

Bajo la dirección de los doctores:

**José Luis Gómez Ariza**

**Tamara García Barrera**

**Antonio Pereira Vega**

**Huelva, 2019**

Universidad de Huelva

Departamento de Química “Profesor José Carlos Vílchez Martín”



Universidad  
de Huelva

**Desarrollo de metodologías ómicas para el estudio y  
diagnóstico precoz del cáncer de pulmón.**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

**María Belén Callejón Leblic**

**Fdo.: María Belén Callejón Leblic**

**Bajo la dirección de los doctores:**

**José Luis Gómez Ariza      Tamara García Barrera**

**Fdo.: Dr. José Luis Gómez Ariza      Fdo.: Dra. Tamara García Barrera**

**Antonio Pereira Vega**

**Fdo.: Dr. Antonio Pereira Vega**

**Programa de Doctorado: Ciencia y Tecnología Industrial y Ambiental**

**Huelva, 2019**

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincera gratitud a todos aquellos que, de alguna forma u otra, me han apoyado en la realización de esta Tesis Doctoral, tanto en el ámbito profesional como en el personal.

Gracias a mis tutores de Tesis José Luis Gómez Ariza y Tamara García Barrera por confiar en mí para el desarrollo de este trabajo de investigación y guiarme y aconsejarme en el progreso del mismo. Gracias por darme la oportunidad de formar parte de vuestro grupo de investigación y enseñarme la verdadera importancia de la química analítica.

Agradezco al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte la concepción de una ayuda predoctoral código FPU13/03615 durante 48 meses para la realización de esta Tesis Doctoral y una ayuda para la realización de una estancia breve en el extranjero durante 3 meses.

Gracias a Antonio Pereira Vega y a sus compañeros del área de Neumología del Hospital Juan Ramón Jiménez de Huelva por la aportación necesaria de la visión médica a esta Tesis Doctoral. Muchas gracias.

Agradecer a la Dr. Heidi Goenaga-Infante haberme dado la oportunidad de realizar una estancia predoctoral en su grupo de investigación en LGC y a Estela del Castillo y Christian Deitrich por enseñarme durante este periodo.

A mis compañeros, Ana Arias, Sara Ramírez, Paqui Arellano, Adrián Rodríguez, Antonio Domínguez, Juan Rodríguez, Jessica Dos Santos y Daniel Barrios, por los ratos compartidos durante la convivencia en el laboratorio. En especial quisiera agradecer a Manuel Contreras su buena predisposición para ayudar en cualquier problema y sobre todo su creatividad reflejada en la portada de esta Tesis Doctoral. Gracias compañeros.

A Raúl González, Miguel Ángel García, Verónica Gómez, Macarena González y Rocío Jara por introducirme al mundo del análisis químico y enseñarme sus conocimientos y experiencias en mis primeros pasos. Gracias a todos.

A Rocío Baya, por ser más que una compañera de trabajo y darle sentido a la palabra amistad. Espero que sigamos siendo amigas, aunque nuestros destinos profesionales se hayan separado y que podamos compartir muchas más anécdotas juntas. Por todo lo vivido y lo que nos queda por vivir, gracias.

Y como no, a mi compañera, amiga, hermana, confidente y pelirroja favorita, Gema Rodríguez Moro. Sabes que esto no hubiera sido posible sin ti. Gracias por apoyarme constantemente, regañarme cuando era necesario y abrazarme en los momentos más difíciles. Porque esto comenzó contigo y no acaba sin ti. Porque esa golondrina nos estará eternamente agradecida por enterrarla junto al resto de organismos vivos y porque “de perdidos al río” será siempre nuestro lema. Gracias por ti.

Quisiera agradecer a toda mi familia el continuo apoyo emocional necesario para realizar esta Tesis Doctoral. A mi hermana Amparo, porque es la mayor, y porque aunque ella no lo crea, es un gran referente para mí. Gracias hermana, por enseñarme las particularidades de todas las enfermedades del mundo, en especial del síndrome de “Wolff-Parkinson-White”. También, quisiera darte las gracias por traer al mundo a Javier, no sabes lo feliz que me hace escuchar “tita Belén”. A mi madre María José, por preocuparse tanto por mí y sufrir incluso más que yo en los momentos más difíciles, gracias por escucharme y aguantarme en mis peores días. A mi padre, Rogelio, porque el motivo por el cual elegí estudiar química fue su pasión por la ciencia, y porque es, en el buen sentido de la palabra, bueno. Gracias papá, sin ti no hubiera llegado hasta aquí. Y por último, mencionar a la más importante de la

familia, a la que siempre será pequeña y revoltosa y sobre todo fundamental en mi vida. Mariché, gracias por enseñarme que la verdadera bondad existe y por abrazarme y mostrarme una sonrisa sincera sin pedírtelo. Gracias de corazón a todos, os quiero.

Además, quisiera mencionar a dos personas que han estado en mi pensamiento durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral debido a su lucha contra esta enfermedad. A mi tía Emi, por ser un ejemplo para todos y no venirse abajo a pesar de todo lo que ha tenido que afrontar. Y a mi tío Julio, que se fue, pero que de alguna forma siempre estará.

Y finalmente, no puedo terminar este apartado sin mencionar a Álvaro de Orta, la persona que cambió mi vida en la mitad de esta aventura científica. Gracias por hacer de mí una mejor persona y por hacerme entender que la vida tiene muchos puntos de vista. Tu apoyo ha sido fundamental en este periodo y no hace falta que quede escrito en esta Tesis Doctoral, porque queda reflejado en nuestra convivencia diaria, en los momentos de debilidad, de llantos, de agobios, pero sobre todo de amor. Porque “pa’lante” significa mucho más que seguir, y espero que algún día se convierta en “pa’ siempre”. Gracias mi vida. Te quiero.



**A los pequeños de la familia, Mariché y Javier.**

*“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”*

Albert Einstein

ÍNDICE DE FIGURAS .....	xiii
ÍNDICE DE TABLAS .....	xv
ABREVIATURAS .....	xvii
RESUMEN .....	3
SUMMARY .....	5
INTRODUCCIÓN .....	9
<b>1. El cáncer de pulmón.....</b>	<b>9</b>
1.1. Definición de cáncer de pulmón.....	9
1.2. Clasificación anatomopatológica del cáncer de pulmón. ....	10
1.3. Incidencia, prevalencia y mortalidad del cáncer de pulmón. ....	12
1.4. Factores de riesgo. ....	17
1.5. Diagnóstico, pronóstico y tratamiento.....	20
1.6. Definición de biomarcador.....	24
1.7. Biomarcadores del cáncer de pulmón. ....	25
<b>2. La espectrometría de masas.....</b>	<b>26</b>
2.1. Espectrometría de masas inorgánica. ....	29
2.2. Espectrometría de masas orgánicas. ....	34
2.3. La técnica de dilución isotópica (IDA). ....	38
2.3.1. Fundamento matemático de la dilución isotópica.....	41
<b>3. Metodologías ómicas.....</b>	<b>42</b>
<b>3.1. Metabolómica.....</b>	<b>43</b>
3.1.1. Desarrollo de un experimento metabolómico.....	44
3.1.2. La metabolómica como herramienta analítica para el estudio del cáncer de pulmón. ....	45
3.1.2.1. Muestras biológicas empleadas en el estudio metabolómico de cáncer de pulmón. Metabolitos alterados.....	46

<b>3.2. Ionómica y metalómica.....</b>	<b>56</b>
3.2.1. La importancia de los metales en la salud.....	57
3.2.2. Homeostasis de metales en cáncer de pulmón. Elementos químicos como posibles biomarcadores de la enfermedad.....	60
3.2.3. Metaloproteínas en el cáncer de pulmón.....	67
3.2.4. La importancia de las selenoproteínas en el organismo.....	68
3.2.5. Selenoproteínas y el cáncer.....	72
3.2.5.1. Suplemento de selenio como agente quimiopreventivo.....	72
OBJETIVOS.....	77
PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.....	81
<b>4. Población de estudio.....</b>	<b>81</b>
<b>5. Procedimientos experimentales empleados en el estudio.....</b>	<b>88</b>
<b>5.1. Plataforma metabólica basadas en espectrometría de masas orgánica. 88</b>	
5.1.1. Análisis de suero sanguíneo y LBA mediante DI-ESI-QTOF-MS.....	88
5.1.2. Análisis de suero sanguíneo, orina y LBA mediante GC-MS.....	90
5.1.3. Procesamiento de los datos.....	91
<b>5.2. Plataforma metalómica basada en espectrometría de masas inorgánica. ... 93</b>	
5.2.1. Análisis multielemental de suero, orina y lavado broncoalveolar mediante ICP-QQQ-MS.....	93
5.2.3. Determinación de selenoproteínas en suero sanguíneo mediante IDA-SEC-AP-ICP-QQQ-MS.....	95
5.2.4. Procesamiento de datos.....	99
<b>5.3. Análisis estadístico de los resultados..... 99</b>	
5.3.1. Análisis multivariante.....	99
5.3.2. Análisis univariante.....	100

5.3.3. Análisis de especificidad y sensibilidad de biomarcadores. Curvas ROC.	
101	
5.3.4. Análisis de rutas metabólicas.....	101
5.3.5. Análisis de correlación.....	102
<b>5.4. Identificación de metabolitos alterados.....</b>	<b>102</b>
Capítulo 1. Estudio metabolómico en muestras de suero, orina y lavado broncoalveolar de pacientes con cáncer de pulmón mediante el análisis por GC-MS. ....	105
Capítulo 2. Estudio metabolómico de la evolución por estadios del cáncer de pulmón y la relación con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica mediante DI-ESI-QqQ- TOF-MS.....	117
Capítulo 3. Estudio de la dishomeostasis de metales en muestras de suero, orina y lavado broncoalveolar de pacientes con cáncer de pulmón mediante ICP-QQQ-MS. ....	133
Capítulo 4. Análisis metalómico de selenoproteínas en muestras de suero de pacientes con cáncer de pulmón mediante la técnica de dilución isotópica. ....	165
CONCLUSIONES.....	195
CONCLUSIONS.....	197
REFERENCIAS.....	201



## ÍNDICE DE FIGURAS.

**Figura 1.** Proceso de división de una célula normal (A) y una célula tumoral (B).

**Figura 2.** Ilustración del cáncer de pulmón.

**Figura 3.** Incidencia estimada de tumores a nivel mundial en el año 2012, ambos sexos (excluidos tumores cutáneos no melanoma) Fuente: GLOBOCAN 2012.

**Figura 4.** Incidencia estimada de los tumores más frecuentes en el mundo en el año 2012 (ambos sexos). Fuente: GLOBOCAN 2012.

**Figura 5.** Incidencia estimada de los tumores más frecuentes en España en hombres y mujeres. Fuente: GLOBOCAN 2012, y extrapolados a los datos de la población española para el año 2017 proporcionada por el INE.

**Figura 6.** Estimación de la prevalencia a 5 años de tumores en la población general a nivel mundial para el año 2012.

**Figura 7.** Estimación de la prevalencia a 5 años de tumores en España en ambos sexos para el año 2017 (población general). Fuente: GLOBOCAN 2012, y extrapolados a los datos de la población española para el año 2017 proporcionada por el INE.

**Figura 8.** Estimación de la mortalidad en el mundo para el año 2012 en la población general (tumores más frecuentes). Fuente: GLOBOCAM 2012.

**Figura 9.** Espectrómetro de masas general.

**Figura 10.** Esquema de la instrumentación convencional de un ICP-MS.

**Figura 11.** Diferencias en el análisis de  $m/z$  de un ICP con cuadrupolo simple convencional y un ICP triple cuadrupolo.

**Figura 12.** Ionización por electrospray.

**Figura 13.** Aplicación de las API en función del rango de masa molecular y de la polaridad de los analitos.

**Figura 14.** Principio de la dilución isotópica para un elemento que contiene dos isótopos estables.

**Figura 15.** Cascada de las ómicas.

**Figura 16.** Etapas de un experimento metabolómico general.

**Figura 17.** Diferencia de componentes entre plasma y suero.

**Figura 18.** Mecanismos para la obtención de EBC.

**Figura 19.** Mecanismo de obtención de LBA mediante broncoscopio.

**Figura 20.** Localización del líquido pleural.

**Figura 21.** Transporte de selenio en el torrente sanguíneo y otros órganos.

**Figura 22.** Diagrama esquemático del acoplamiento IDA-SEC-AF-ICP-QQQ-MS para la especiación selenoproteínas en muestras suero humano.

**Figura 23.** Cromatograma resultante de una muestra de suero humano determinado por la metodología SEC-AF-ICP-QQQ-MS.

**Figura 24.** Cromatogramas correspondientes a una muestra de orina de un paciente con CP a) sin tratamiento con ureasa, b) con tratamiento de ureasa.

**Figura 25.** Descripción general de los cambios metabólicos más importantes observados en suero, orina y LBA de pacientes con CP. a: metabolismo de la glicina, serina y treonina, b: metabolismo de la alanina, aspartato y glutamato, c: metabolismo del fosfato de inositol, d: metabolismo de la arginina y prolina, e: metabolismo de la cisteína y metionina, f: ciclo del TCA, g: metabolismo de la galactosa, h: metabolismo del piruvato.

**Figura 26.** Esquema de las rutas metabólicas más alteradas en CP determinadas en el análisis por MetaboAnalyst.

**Figura 27.** PLS-DA de los diferentes extractos de suero de pacientes con CP en distintos estadios. HC: grupo control, SII: estadio II, SIII: estadio III, SIV: estadio IV. (+) Modo de ionización positiva, (-) Modo de ionización negativa (-).

**Figura 28.** Diagrama PLS-DA de los grupos CP y control empleando las concentraciones a) total, b) fracción HMM y c) fracción LMM.

ÍNDICE DE TABLAS.

**Tabla 1.** Clasificación TNM del cáncer de pulmón

**Tabla 2.** Agrupación por estadios.

**Tabla 3.** Metabolitos alterados en diferentes estudios actuales en el CP.

**Tabla 4.** Metabolitos alterados en orina de pacientes con CP.

**Tabla 5.** Fold change de los metales alterados en diferentes muestras biológicas de pacientes con CP determinados por diferentes técnicas analíticas

**Tabla 6a.** Características clínicas de los pacientes del estudio metabolómico realizado por la metodología GC-MS (Capítulo 1). Muestras de suero y orina.

**Tabla 6b.** Características clínicas de los pacientes del estudio metabolómico realizado por la metodología GC-MS (Capítulo 1). Muestras de LBA.

**Tabla 7.** Características clínicas de los pacientes del estudio metabolómico realizado por la metodología DI-ESI-QTOF-MS (Capítulo 2). Muestras de suero.

**Tabla 8a.** Características clínicas de los pacientes del estudio metalómico realizado por la metodología ICP-QQQ-MS (Capítulo 3). Muestras de suero y orina

**Tabla 8b.** Características clínicas de los pacientes del estudio metalómico realizado por la metodología ICP-QQQ-MS (Capítulo 3). Muestras de LBA.

**Tabla 9.** Características clínicas de los pacientes del estudio metalómico realizado por la metodología IDA-SEC-AF-ICP-QQQ-MS (Capítulo 4). Muestras de suero.

**Tabla 10.** Condiciones operacionales del análisis IDA-SEC-AF-ICP-QQQ-MS.

**Tabla 11.** Metabolitos alterados en suero, orina y LBA de pacientes con CP.

**Tabla 12.** Fold change de los metabolitos alterados en CP y EPOC con respecto al control.

**Tabla 13.** Concentraciones medias y desviación estándar de la media de los elementos que cumplen los criterios  $0.5 < FC > 2$ ,  $VIP > 1$ ,  $p > 0.05$  y  $AUC > 0.75$  en suero, orina y LBA.

**Tabla 14.** Concentraciones de selenio de las selenoproteínas determinadas por el método de especiación SEC-AF-ICP-QQQ-MS en muestras de suero de pacientes con CP y grupo control.

**Tabla 15.** Ratios entre selenoproteínas determinadas por el método de especiación SEC-AF-ICP-QQQ-MS en muestras de suero de pacientes con CP y grupo control.

**ABREVIATURAS.**

AAS	Atomic Absorption Spectroscopy	Espectroscopía de absorción atómica
AF4	Asymmetric Flow Field Flow Fractionation	Fraccionamiento en flujo a través de un flujo asimétrico
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization	Ionización química a presión atmosférica
API	Atmospheric pressure ionization	Ionización a presión atmosférica
APPI	Atmospheric Pressure Photoionization	Fotoionización a presión atmosférica
AUC	Area Under the Curve	Área bajo la curva
BLU-HP	Blue Sepharose Column	Columna Blue-Sepharose
C	Control group	Grupo control
CE	Capilar Electrophoresis	Electroforesis capilar
CI	Chemical Ionization	Ionización química
CP	Lung cancer	Cáncer de pulmón
CPCP	Small cells lung cancer	Cáncer de pulmón de células pequeñas
CPNCP	Non-small cells lung cancer	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
DI	Direct Infusion	Infusión directa
DM	Diabetes Mellitus	Diabetes Mellitus
EBC	Exhaled Breath Condensate	Condensado de aire exhalado
eGPx	Gluthation Peroxidase	Glutación peroxidasa

EI	Electronic Impact	Impacto electrónico
EPNC	Non-cancerous pulmonary diseases group	Enfermedad pulmonar no cancerosa
EPOC	Chronic Obstructive Pulmonary Disease	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FAB	Fast atom bombardment	rápido bombardeo atómico
FIA	Flow injection analysis	Análisis por inyección en flujo
FTICR	Fourier Transform ion cyclotron resonance	Transformada de Fourier de resonancia de ciclotrón iónico
GC	Gas chromatography	Cromatografía de gases
HEP-HP	Heparine Sepharose Column	Columna Blue-Sepharose
HILIC	Hydrophilic interaction chromatography	Cromatografía de interacción hidrofílica
HMM	High molecular mass	Fracción de alto peso molecular
HPLC	High performance liquid chromatography	Cromatografía líquida de alta eficacia
HTA	Arterial hypertension	Hipertensión arterial
ICP-MS	Inductive coupled plasma-mass spectrometry	Plasma de acoplamiento inductivo-espectrometría de masas
ICP-OES	Inductive coupled plasma-optical emission spectroscopy	Plasma de acoplamiento inductivo-espectroscopía de emisión óptica
ICP-QQQ-MS	Inductive coupled plasma-triple quadrupole-mass spectrometry	Plasma de acoplamiento inductivo-triple cuadrupolo-espectrometría de masas
IDA	Isotopic dilution analysis	Análisis por dilución isotópica
KED	Kinetic energy discrimination	Discriminación de energía cinética

## ABREVIATURAS

---

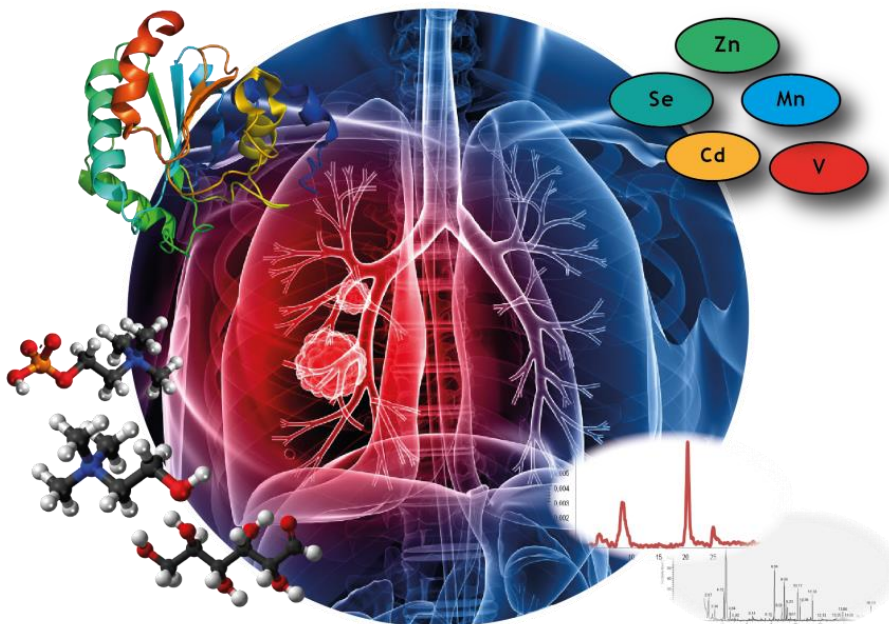
LBA	Bronchoalveolar Lavage Fluid	Lavado broncoalveolar
LMM	Low Molecular Mass	Fracción de bajo peso molecular
m/z	mass/charge	masa/carga
MALDI	Matrix-assisted laser desorption ionization	Ionización/desorción laser asistida por matriz
IMS	Imaging mass spectrometry	Espectrometría de masas de imagen
MS	Mass spectrometry	Espectrometría de masas
MS/MS	Tandem mass spectrometry	Espectrometría de masas en tándem
MTs	Metallothioneins	Metalotioneínas
MW	Molecular Weight	Peso molecular
OMS	World Health Organization	Organización Mundial de la Salud
ORS	Octapole Reaction	Celda de colisión/reacción
PCA	Principal Component Analysis	Análisis de componentes principale
PLS-DA	Partial Least Square Discriminant Analysis	Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales
Q	Quadrupole	Cuadrupolo
QIT	Quadrupole-Ionic Tramp	Cuadrupolo-Trampa iónica
QQQ	Triple quadrupole	Triple cuadrupolo
RMN	Nuclear Magnetic Resonance	Resonancia Magnética Nuclar
ROC	Receiver Operator Characteristic	Característica Operativa del Receptor

## ABREVIATURAS

---

RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SeAlb	Selenoalbumin	Selenoalbúmina
SEC	Size Exclusion Chromatography	Cromatografía de exclusión de tamaños
SeCys	Selenocysteine	Selenocisteína
SELDI	Surface-enhanced laser desorption/ionization	Desorción /ionización por láser de superficie mejorada
SeMet	Selenomethionine	Selenometionina
SELENOP	Selenoprotein P	Selenoproteína P
SF	Field Sector	Campo magnético
SOD	Superoxide Dismutase	Superóxido dismutasa
SUID	Species-unspecific isotopic dilution	Dilución isotópica de especies inespecíficas
TACAR	High resolution computerized axial tomography	Tomografía axial computerizada de alta resolución
TOF	Time of flight	Tiempo de vuelo
TrxR	Thioredoxin Reductase	Tioredoxina reductasa
uma	Atomic mass unit	Unidad de masa atómica
VIP	Variable Importance in the projection	Importancia de la variable en la proyección

# RESUMEN - SUMMARY





**RESUMEN**

El cáncer de pulmón (CP) constituye una de las muertes más comunes por neoplasia en el mundo provocando más de 1.300.000 muertes al año. La supervivencia a 5 años comprende un 65% cuando la enfermedad se diagnostica en estadios precoces, disminuyendo a un 10% cuando se encuentra en estados avanzados. Por ello, la búsqueda de biomarcadores capaces de detectar de forma precoz el CP, así como capaces de evaluar la progresión del mismo, constituye un importante reto en medicina. En este sentido, las metodologías ómicas son herramientas de análisis muy poderosas que permiten determinar un gran número de moléculas, como metabolitos, proteínas o metales unidos a proteínas. Estas biomoléculas pueden sufrir alteraciones en respuesta a una enfermedad, por lo que podrían servir como marcadores de diagnóstico. Así, en esta Tesis Doctoral se han aplicado tres metodologías ómicas (metabólicoma, ionómica y metalómica), basadas en la espectrometría de masas, a muestras biológicas humanas de pacientes con cáncer de pulmón, con el objetivo de identificar biomoléculas alteradas en esta enfermedad que puedan servir como biomarcadores.

Con el fin de abarcar una mayor cobertura de metabolitos se optimizó una plataforma metabolómica “no dirigida” basada en dos técnicas analíticas: la cromatografía de gases (GC-MS) y la infusión directa (DI-MS) acopladas a espectrometría de masas (MS). Esta plataforma fue aplicada a muestras de pacientes con CP, pacientes control y pacientes con diversas enfermedades pulmonares no cancerosas como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, EPOC. Las muestras empleadas en el estudio fueron muestras de suero sanguíneo, de orina, y como principal novedad del estudio, muestras de lavado broncoalveolar (LBA), de las que no había antecedentes en

bibliografía. Para ello, los perfiles metabolómicos de pacientes con CP se compararon estadísticamente con los de personas sanas empleando el análisis multivariante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) para encontrar metabolitos diferentes de forma significativa entre los grupos. El análisis PLS-DA también fue aplicado para comparar la existencia de metabolitos alterados en pacientes con EPOC y evaluar su posible relación con el CP. Así mismo, se evaluó la diferenciación metabolómica entre estadios tempranos y avanzados de la enfermedad.

Por otro lado, se desarrolló una metodología ionómica basada en ICP-QQQ-MS para la determinación multielemental en muestras de suero, orina y LBA con el fin de evaluar la distribución de oligoelementos y metales tóxicos en CP. Además, a las muestras de suero sanguíneo se les aplicó un método de fraccionamiento para la separación de la fracción de alta (HMM) y baja (LMM) masa molecular y determinar la concentración de elementos en cada fracción. Finalmente, se desarrolló una metodología metalómica basada en la técnica de dilución isotópica por ICP-QQQ-MS para determinar la concentración de 3 selenoproteínas importantes presentes en suero: glutatión peroxidasa (eGPx), selenoproteína P (SELENOP) y selenoalbúmina (SeAlb). Esta metodología también permitió la separación de moléculas pequeñas de selenio.

De esta forma, la aplicación de estas plataformas metabolómicas, ionómicas y metalómicas en diferentes muestras biológicas de pacientes con CP, han permitido estudiar la alteración de metabolitos, metales y biomoléculas de selenio asociadas al CP aportando nuevas contribuciones a la patología de esta enfermedad.

## SUMMARY

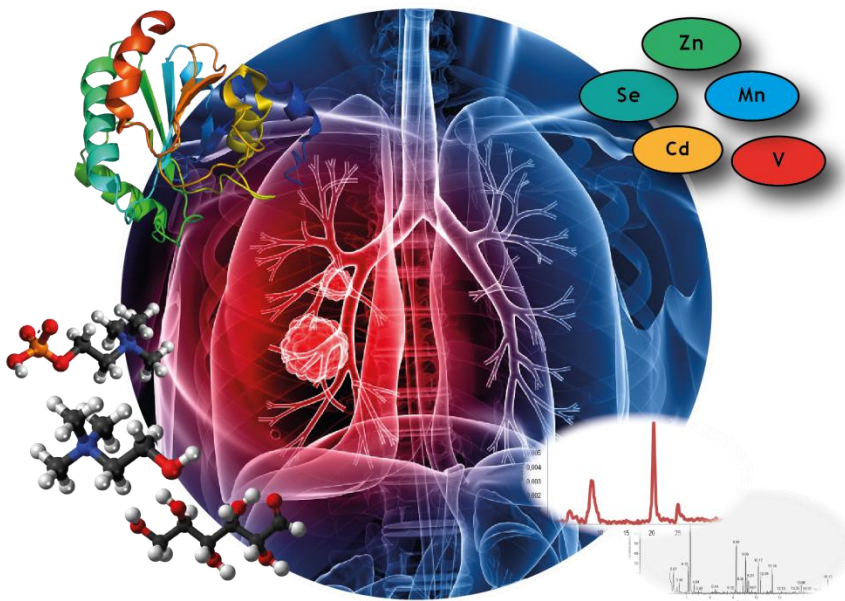
Lung cancer (LC) is one of the most common deaths from neoplasia in the world, causing more than 1,300,000 deaths per year. The 5-year survival comprises 65% when the disease is diagnosed in early stages, decreasing to 10% in advanced stages. Therefore, the search for biomarkers capable of early detection of LC, as well as capable of evaluating its progression, is a challenge of great interest in medicine. In this sense, omics methodologies are very powerful analysis tools that allow determining a large number of molecules (metabolites, proteins, metals bound to proteins). These biomolecules can undergo alterations in response to a disease, so they could serve as diagnostic markers. Thus, in this Doctoral Thesis, three omics methodologies (metabolomics, ionomics and metallomics) based on mass spectrometry have been applied to human biological samples of patients with lung cancer in order to identify altered biomolecules in this disease that can serve as biomarkers.

In order to achieve greater metabolite coverage, a "non-target" metabolomic platform was optimized based on two analytical techniques: gas chromatography (GC-MS) and direct infusion (DI-MS) coupled to mass spectrometry. This platform was applied to samples of patients with LC, control patients and patients with various non-cancerous lung diseases such as chronic obstructive pulmonary disease COPD. The samples used in the study were samples of blood serum, urine, and as the main novelty of the study, samples of bronchoalveolar lavage (BAL), of which there was no background in the literature. Therefore, the metabolic profiles of LC patients with those of healthy people were compared statistically by means of the multivariate analysis of partial least squares discriminant analysis (PLS-DA)

in order to find significantly different metabolites between the groups. The PLS-DA analysis was also applied to compare the occurrence of altered metabolites in patients with COPD and evaluate their possible relationship with LC. Likewise, the metabolomic differentiation between early and advanced stages of the disease was evaluated. On the other hand, an ionic methodology based on ICP-QQQ-MS was developed for multielemental determination in samples of serum, urine and BAL in order to evaluate the distribution of trace elements and toxic metals in LC. In addition, serum samples were subjected to a fractionation method for the separation of the high fraction (HMM) and low fraction (LMM) molecular mass and determine the concentration of elements in each fraction. Finally, a metallomic methodology based on the isotope dilution technique by ICP-QQQ-MS was developed to determine the concentration of 3 important selenoproteins present in serum: glutathione peroxidase (eGPx), selenoprotein P (SELENOP) and selenoalbumin (SeAlb). This methodology also allowed the separation of low molecular mass species of selenium.

Thus, the application of these metabolomic, ionic and metallomic platforms in different biological samples from patients with LC has allowed the study of the alteration of metal metabolites and selenium biomolecules associated with LC disease, giving place to new contributions to the pathology of this disease.

# INTRODUCCIÓN



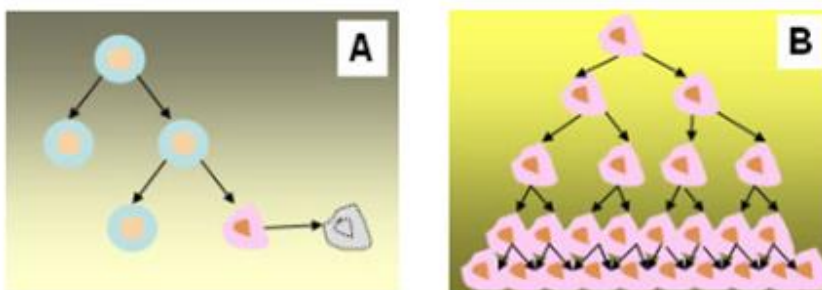


## INTRODUCCIÓN.

**1. El cáncer de pulmón.**

## 1.1. Definición de cáncer de pulmón.

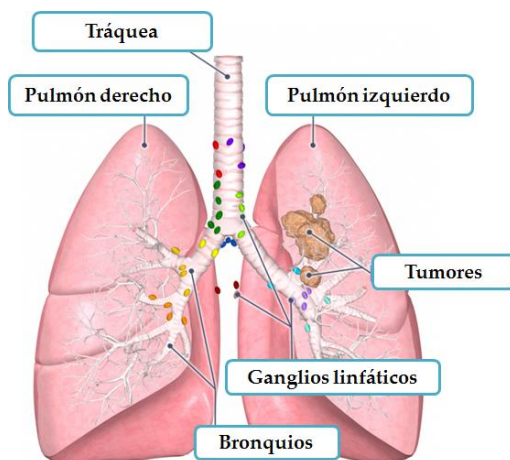
El cáncer es una enfermedad muy compleja en la que se producen una serie de transformaciones celulares que dan lugar a la conversión de células normales a células tumorales. Cuando una célula normal desarrolla mutaciones que no pueden ser reparadas, activa su función de muerte celular para poder controlar su crecimiento y desarrollo. El proceso de muerte celular controlada se denomina apoptosis. Por el contrario, la célula tumoral pierde esta función, dividiéndose de forma progresiva, acelerada y sin límite. La Figura 1 ilustra la división de una célula normal (A) y una célula tumoral (B).



*Figura 1. Proceso de división de una célula normal (A) y una célula tumoral (B).*

La continua proliferación de células tumorales da lugar a la formación de masas denominadas “neoplasias” que provocan la destrucción y sustitución de tejidos normales. Además, estas células también pueden diseminarse a través del torrente sanguíneo y del sistema linfático invadiendo los tejidos cercanos y produciendo metástasis.

En el proceso del cáncer de pulmón (CP) la célula normal que se transforma en tumoral se encuentra en el epitelio que reviste el árbol respiratorio, que comprende desde la tráquea hasta el bronquiolo terminal más fino incluyendo a las células que se encuentran en los alvéolos pulmonares. La Figura 2 representa la formación de un tumor en el pulmón.



*Figura 2. Ilustración del cáncer de pulmón.*

## 1.2. Clasificación anatomopatológica del cáncer de pulmón.

El CP puede clasificarse en dos grandes grupos por sus características histológicas, curso clínico y respuesta al tratamiento. La evaluación histológica se realiza sobre muestras de tejido de biopsia, punciones o procedimientos quirúrgicos. Así pues, la clasificación histológica se divide en:

- Carcinoma de pulmón de células pequeñas (CPCP).

Este cáncer está compuesto por células pequeñas de forma redondeada, ovals o fusiformes, con escaso citoplasma, límites celulares no definidos, cromatina finamente regular y nucléolos invisibles. Suele tener una localización peribronquial y gran porcentaje de metástasis en el momento del

diagnóstico. La evolución de este tipo de tumor es muy agresiva y suele ser sensible a quimioterapia [1]. El CPCP representa el 20 % del total del CP.

- Carcinoma de pulmón de células no pequeñas (CPNCP).

El CPNCP está compuesto de células de un mayor tamaño, con abundancia de citoplasma, presencia de nucléolos y ausencia de gránulos de neurosecreción. Además, comprende el 80% del total de casos diagnosticados de tumores de pulmón [1]. El CPNCP se divide en tres tipos diferentes: carcinoma escamoso o epidermoide, adenocarcinoma y carcinoma de células grandes.

El carcinoma epidermoide representa el 40% del total de todos los cánceres de pulmón diagnosticados, se origina en el epitelio bronquial, con una localización general central, aunque un tercio de este tipo de cáncer tiene localización periférica. Se encuentra relacionado con el tabaquismo, ya que más del 75% de estos tumores se encuentran en individuos fumadores. Además, la supervivencia a 5 años del carcinoma epidermoide es del 60% cuando se diagnostica en estadios tempranos [2].

El adenocarcinoma representa el 30% del total de CP diagnosticados. Presenta una localización periférica, y su diseminación es más rápida que en el cáncer epidermoide. La supervivencia a los 5 años es menor al 60% cuando es diagnosticado en estadio I, disminuyendo a menos del 30% cuando es detectado en estadios avanzados [3]. Finalmente, el carcinoma de células grandes representa el 10% del total de CP diagnosticados. Generalmente presentan una localización periférica, aunque también puede ser de tipo central [1]. Es un carcinoma anaplásico, en el que las células se reproducen rápidamente y no presentan parecido con las células normales. La agresividad de este tipo de carcinoma es similar a la del adenocarcinoma.

Por otro lado, la clasificación histológica del cáncer de pulmón definida por la OMS y por la IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer) en 1999, incluye una clasificación de cuatro tipos de lesiones preinvasivas, la displasia escamosa, el carcinoma *in situ*, la hiperplasia adenomatosa y las hiperplasias idiopáticas de células neuroendocrinas. Todas estas lesiones se caracterizan por tener la capacidad de poder desarrollar CP [1].

### 1.3. Incidencia, prevalencia y mortalidad del cáncer de pulmón.

El CP constituye una de las principales causas de muerte por neoplasia en el mundo, con aproximadamente 14 millones de nuevos casos diagnosticados en el año 2012 (datos más recientes estimados por el proyecto GLOBOCAN de la OMS) [4]. La Figura 3 muestra la distribución del número de casos diagnosticados de cáncer por continente en el año 2012, siendo Asia el continente con mayor incidencia estimada (6.763.030 casos), seguida de Europa (3.420.021 casos) y Norte América (1.786.369 casos).

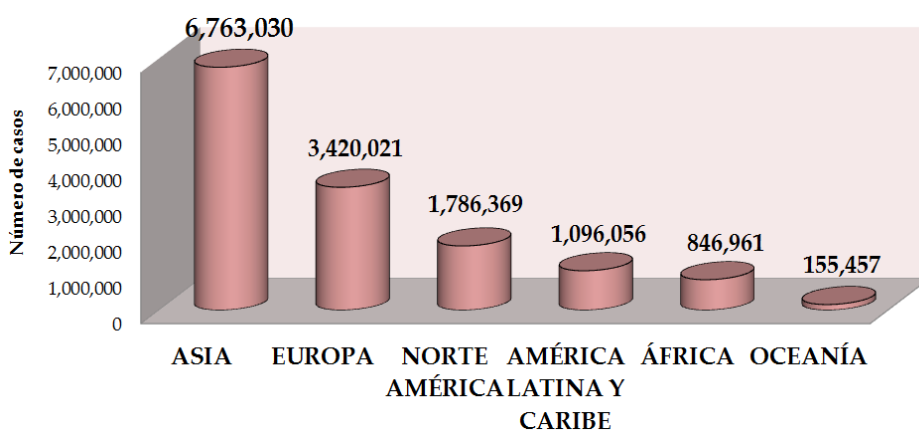


Figura 3. Incidencia estimada de tumores a nivel mundial en el año 2012, ambos sexos (excluidos tumores cutáneos no melanoma). Fuente: GLOBOCAN 2012.

Las estimaciones poblacionales indican un aumento del 70 % en el diagnóstico de nuevos casos de CP durante las próximas décadas, alcanzando los 24 millones de enfermos en el año 2035 [4].

Por otra parte, el CP fue uno de los tumores más frecuentes a nivel mundial en el año 2012, con una incidencia estimada de 1.824.701 casos, colocándose en primer lugar, seguido del cáncer de mama (1.671.149 casos), colorrecto (1.360.602 casos) y próstata (1.094.916 casos) [4]. En la Figura 4 se muestran el número de casos de los diferentes tipos de cáncer diagnosticados en 2012 en el mundo.

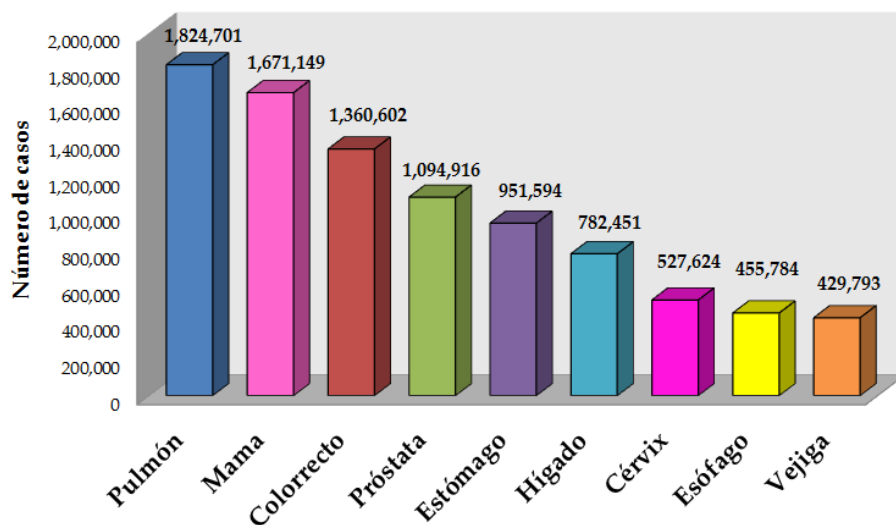


Figura 4. Incidencia estimada de los tumores más frecuentes en el mundo en el año 2012 (ambos sexos). Fuente: GLOBOCAN 2012.

En España, el CP constituyó el tercer tumor más frecuente en el año 2017 para ambos sexos (28.645 casos), precedido por el cáncer de colorrecto (34.331 casos) y próstata (30.076 casos) y seguido por el cáncer de mama (26.370 casos), vejiga (14.677 casos) y estómago (8.284 casos). Sin embargo,

esta incidencia cambia si se clasifica por sexos (Figura 5), siendo el CP el segundo en varones y el cuarto en mujeres, con una incidencia estimada de 23.398 y 5.247 casos respectivamente [5].

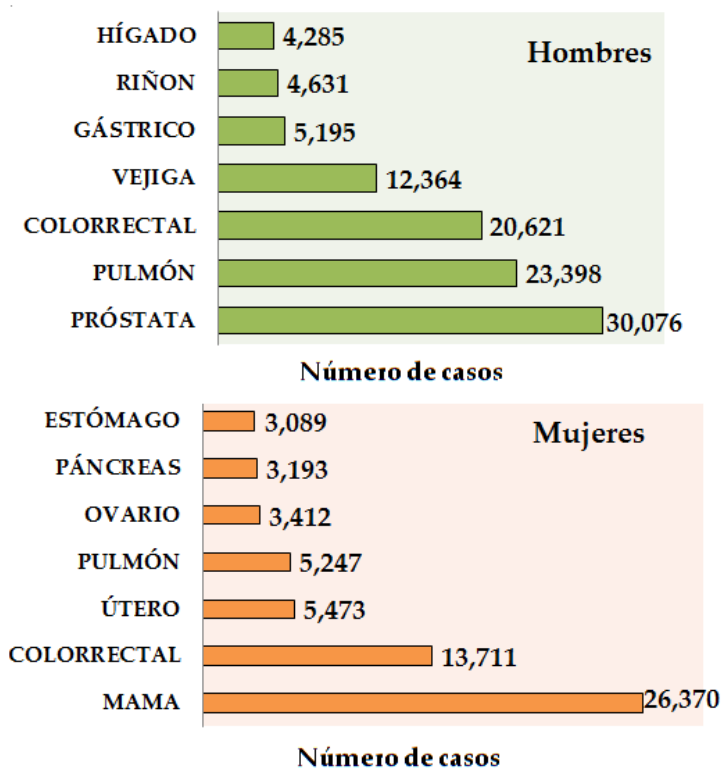


Figura 5. Incidencia estimada de los tumores más frecuentes en España en hombres y mujeres. Fuente: GLOBOCAN 2012, y extrapolados a los datos de la población española para el año 2017 proporcionada por el INE.

Otro aspecto importante a tener en cuenta, además de la incidencia del cáncer, es la prevalencia del mismo, que se define como la proporción de población con cáncer durante un periodo de tiempo concreto. La definición de prevalencia más comúnmente empleada es el número de pacientes diagnosticados con un tipo concreto de tumor que continúan vivos a los 5

años del diagnóstico. Así pues, la prevalencia es más elevada en tumores con mayor supervivencia.

A nivel mundial el CP constituyó el cuarto tumor más prevalente para el año 2012 en la población general (prevalencia a los 5 años) con una estimación de 1.893.075 casos, precedido del cáncer de mama (6.232.108 casos), cáncer de próstata (3.857.500 casos) y colorrecto (3.543.582 casos) y seguido del cáncer de cervix (1.547.161 casos) y estómago (1.538.127 casos) [4]. La Figura 6 muestra la prevalencia estimada de diferentes tipos de tumores en el año 2012 para ambos sexos.

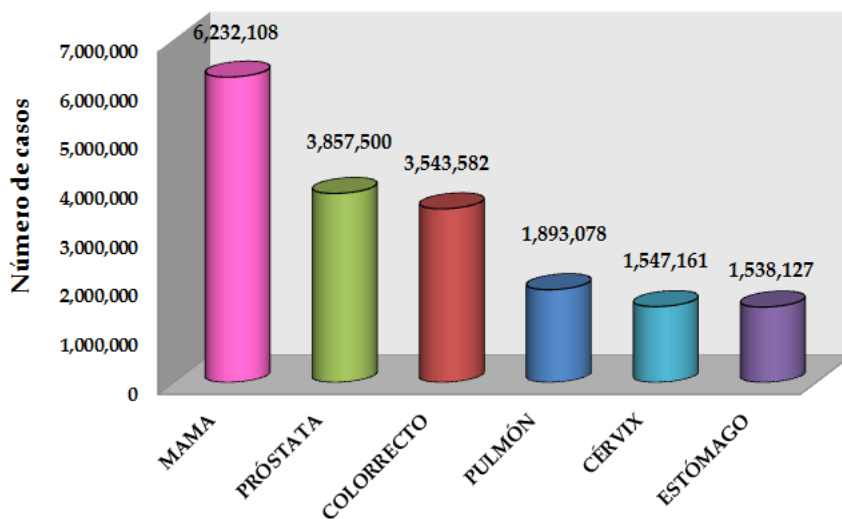


Figura 6. Estimación de la prevalencia a 5 años de tumores en la población general a nivel mundial para el año 2012.

Sin embargo en España (Figura 7), el CP fue el quinto tumor con mayor prevalencia en la población general (año 2017), precedido del cáncer de mama (104.405 casos), próstata (101.781 casos), colorrecto (89.635 casos) y vejiga (46.936 casos), y seguido de melanoma (19.741 casos), útero (19.308 casos) y riñón (18.607 casos) [5].

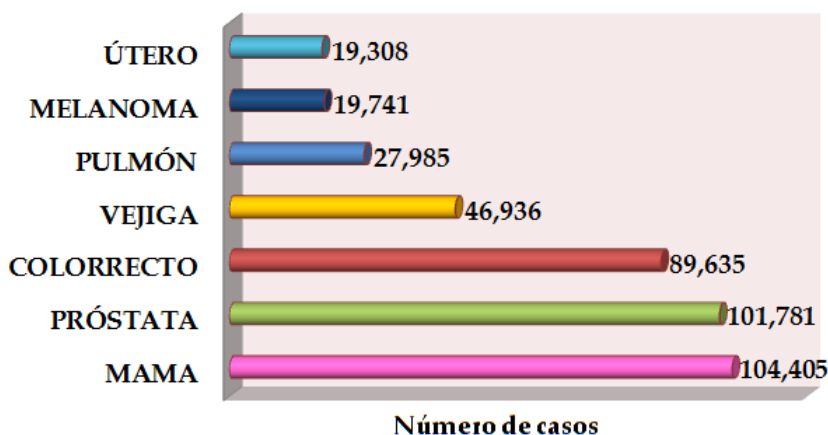


Figura 7. Estimación de la prevalencia a 5 años de tumores en España en ambos sexos para el año 2017 (población general). Fuente: GLOBOCAN 2012, y extrapolados a los datos de la población española para el año 2017 proporcionada por el INE.

Por otra parte, el cáncer constituye la segunda causa de muerte en el mundo, siendo responsable de 8,8 millones de muertes en el año 2015 según la OMS [4]. Las predicciones poblacionales estiman que el número de muertes producidas por tumores aumentará a más de 14 millones en el año 2035. El CP fue el primer tumor responsable del mayor número de fallecidos en ambos sexos a nivel mundial en 2012 (1.589.925 fallecidos), seguido del cáncer de hígado (745.533 fallecidos), estómago (723.073 fallecidos), colorrecto (693.933 fallecidos) y mama (521.907 fallecidos). La Figura 8 muestra la estimación de la mortalidad en el mundo para el año 2012 en la población general en los tumores más frecuentes.

En España, el CP también encabezó la lista de tumores responsables del mayor número de fallecimientos en la población general en el año 2017 con 22.187 fallecidos, seguido del cáncer colorrectal (15.802 fallecidos), cáncer de páncreas (6.789 fallecidos), cáncer de mama (6.477 fallecidos), y de próstata (5.752 fallecidos) [5].

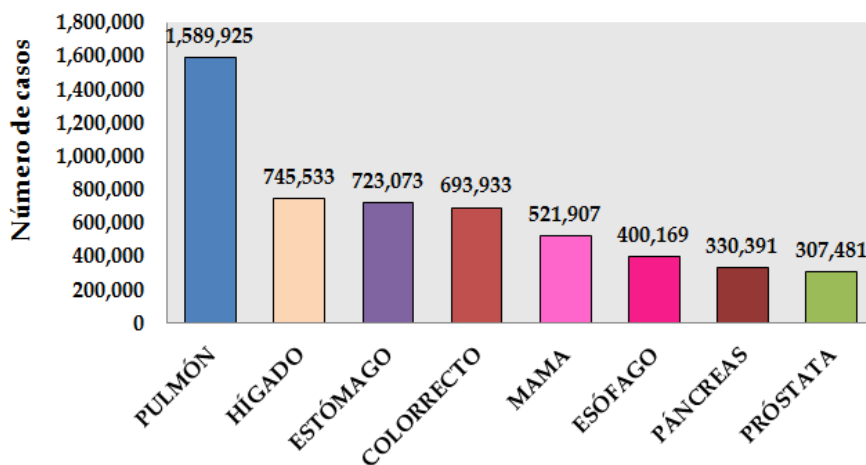


Figura 8. Estimación de la mortalidad en el mundo para el año 2012 en la población general (tumores más frecuentes). Fuente: GLOBOCAM 2012.

El 85 % de pacientes con CP mueren debido al tumor [6]. No obstante, el aumento de la incidencia de CP en España, no solo es debido al incremento de la población, sino también, al desarrollo de nuevas técnicas de detección precoz y al aumento de la esperanza de vida. Así pues, el riesgo de desarrollar cualquier tipo de tumor es mayor con el avance de la edad, por la acumulación en la exposición a carcinogénicos y a una tendencia a presentar mecanismos de reparación celular ineficiente [7]. Se estima que, en España, uno de cada dos hombres y casi una de cada tres mujeres desarrollará cáncer a lo largo de su vida [5].

#### 1.4. Factores de riesgo.

La causa principal de CP es el consumo activo de tabaco, siendo un factor de riesgo directamente proporcional a la duración del hábito y la intensidad de consumo [8]. Se ha demostrado que dejar de fumar reduce el riesgo de desarrollar CP, siendo notorio a partir de los 5 años sin consumo, el cual sigue disminuyendo a lo largo del tiempo, pero sin llegar a igualarse a

los no fumadores [9]. Por otra parte, se ha reconocido que la exposición ambiental al humo del tabaco (tabaquismo pasivo) es un factor de riesgo asociado a padecer CP, ya que existen estudios que han demostrado alteraciones genéticas en personas fumadoras pasivas similares a las encontrados en fumadores activos. Además, se han encontrado concentraciones más altas de cotinina (marcadores biológico de exposición al humo del tabaco) en fumadores pasivos que en la población no expuesta [10]. Al igual que con el tabaquismo activo, el riesgo de padecer CP debida a la inhalación pasiva del humo del tabaco disminuye con el tiempo tras desaparecer la exposición.

Asimismo, existen datos epidemiológicos que indican que la exposición ambiental a carcinogénicos, como los encontrados en el humo del tabaco o en las fibras de asbesto, inducen a mutaciones genéticas y afectan al metabolismo. El asbesto es el carcinogénico ocupacional más importante en España. La exposición puede ser directa, en minas e industria, o indirecta, a través de ropas impregnadas. El 4% de los CP están relacionados con este mineral [11]. Otro carcinogénico a tener en cuenta, es el radón, un gas inerte producto de degradación del radio, que se encuentra en la mayoría de suelos. La población que presenta un mayor riesgo de desarrollar CP por la exposición a radón es el sector de trabajadores de minas subterráneas, bodegas y cuevas. Aunque el riesgo es pequeño, este gas puede acumularse en edificios, haciendo directa la exposición en la vivienda. Se conoce que más del 2% de muertes por CP son debidas a la exposición a radón [12].

Otros factores de riesgo asociados al desarrollo del CP están relacionados con ciertas enfermedades respiratorias, como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la fibrosis pulmonar idiopática o la asbestosis [13].

La EPOC es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por una limitación progresiva, y parcialmente reversible, del flujo de aire, siendo la cuarta causa de muerte en todo el mundo [14]. Debido a la heterogeneidad de la enfermedad y la falta de marcadores moleculares predictivos, el diagnóstico temprano de la EPOC es una tarea difícil [15]. Existen estudios que demuestran la relación entre el CP y la EPOC, ya que la mayoría de pacientes diagnosticados con CP a menudo experimentan los síntomas de la EPOC [16] concluyendo que la inflamación crónica es un factor potencial asociado con el desarrollo del tumor. En consecuencia, se cree que la EPOC aumenta el riesgo de CP [17]. En esta Tesis Doctoral se presentan resultados preliminares del estudio metabolómico comparativo de muestras de suero sanguíneo en pacientes con CP y EPOC.

Por otra parte, cabe mencionar que tanto el consumo frecuente de alcohol como de dietas con un alto contenido en grasas totales, saturadas y colesterol, son factores de riesgo adicionales asociados a desarrollar CP [18]. Existen diversos estudios que sugieren que la ingesta habitual de alimentos con propiedades antioxidantes como frutas y verduras, tiene un efecto protector frente al desarrollo del CP, pudiendo reducir la posibilidad de padecerlo entre un 20 y un 30% [19]. A pesar de ello, la Organización Mundial de la Salud no considera que se disponga de evidencias suficientes a favor del papel protector que pudiera jugar la dieta en la génesis del CP.

Sin embargo, todos los factores de riesgo mencionados anteriormente vienen limitados por la susceptibilidad genética del organismo ya que siendo el tabaco el responsable del 90% de CP en hombres y del 80% en mujeres, solo el 11% de personas fumadoras desarrollan este tipo de cáncer [20]. Además,

se conoce que hay un aumento del riesgo de padecer CP en fumadores de familiares directos de enfermos de cáncer [21].

#### 1.5. Diagnóstico, pronóstico y tratamiento.

La dificultad de diagnóstico de CP reside en que la mayoría de casos determinados se encuentran en estadios avanzados. En estas condiciones, la supervivencia es inferior al 15% al cabo de 5 años de detectarse e iniciarse el tratamiento [21]. Los métodos de detección del CP se basaban inicialmente en la radiografía torácica y en los estudios citológicos de esputo. Sin embargo, estos medios son ineficaces en la detección precoz del CP. Por otro lado, la tomografía axial computarizada de alta resolución (TACAR) es un medio de detección más sensible que la radiografía torácica, capaz de detectar un mayor número de tumores. Complementariamente a estos métodos, es necesario confirmar el diagnóstico mediante técnicas de invasión como la broncoscopia, punción o la toracotomía [22].

La actual estadificación del CP (2017) se basa en la extensión anatómica del tumor, y se encuentra definida por tres parámetros, T, N y M (TNM). El parámetro T describe la extensión del tumor primario; el parámetro N define la existencia o ausencia de metástasis ganglionares regionales; y el parámetro M representa la ausencia o presencia de metástasis hematogénica a distancia. Este sistema de clasificación se describió según lo adoptado por el American Joint Committee on Cancer (AJCC), y la Union Internationale contre le Cancer (UICC), y fue aceptada por la American Thoracic Society (ATS) y la European Respiratory Society (ERS) [23].

Además, para definir la magnitud de la afectación del tumor, existen diversos subíndices relacionados con los parámetros TNM [23]. La Tabla 1 recoge la descripción de los parámetros TNM del CP.

Tabla 1. Clasificación TNM del cáncer de pulmón.

CATEGORÍA T: TUMOR PRIMARIO	
<b>Tx</b>	El tumor primario no puede ser evaluado o, existe un tumor demostrado por la presencia de células malignas en esputo o lavados bronquiales, pero no puede ser visualizado por técnicas de imagen o broncoscopia.
<b>T0</b>	No hay evidencia de tumor primario.
<b>Tis</b>	Carcinoma <i>in situ</i> .
	El Tumor es de hasta 3 cm o menos en su diámetro mayor, rodeado de pulmón o pleura visceral.
<b>T1</b>	T1mi Adenocarcinoma mínimamente invasivo
	T1a Tumor de 1 cm o menos en su diámetro mayor
	T1b Tumor de más de 1 cm pero de 2 cm o menos en su diámetro mayor
	T1c Tumor de más de 2 cm pero de 3 cm o menos en su diámetro mayor
<b>T2</b>	Tumor con cualquiera de las características de tamaño o extensión: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Más de 3 cm en su diámetro mayor.</li> <li>• Afecta al bronquio principal a 2 cm o más de la carina principal</li> <li>• Invade la pleura visceral</li> </ul> Asociado con atelectasia o neumonitis obstructiva y que se extiende a la región hilar, pero no afecta al pulmón entero.
	T2a Tumor de más de 3 cm pero de 4 cm o menos en su diámetro mayor
	T2b Tumor de más de 4 cm pero de 5 cm o menos en su diámetro mayor
<b>T3</b>	Tumor de más de 5 cm pero de 7 cm o menos en su diámetro mayor o tumor que invade directamente cualquiera de las siguientes estructuras: pleura parietal, pared torácica (incluyendo los tumores del surco pulmonar superior), nervio frénico, pericardio parietal; o existencia de nódulo/s tumoral/es separado/s del tumor primario pero en el mismo lóbulo que este
<b>T4</b>	Tumor de más de 7 cm o tumor de cualquier tamaño que invade cualquiera de las siguientes estructuras: diafragma, mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio laríngeo recurrente, esófago, cuerpo vertebral o carina; o existencia de nódulo/s tumoral/es separado/s del tumor primario, en un lóbulo diferente del pulmón homolateral

<b>CATEGORÍA N: GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES</b>	
<b>Nx</b>	Los ganglios linfáticos no pueden ser evaluados.
<b>N0</b>	No hay metástasis en ganglios linfáticos regulares.
<b>N1</b>	Metástasis en ganglios linfáticos peribronquiales y/o ipsilaterales hiliares, incluyendo la extensión directa.
<b>N2</b>	Metástasis en ganglios mediastínicos ipsilaterales y/o subcarínicos
<b>N3</b>	Metástasis en ganglios mediastínicos contralaterales, hiliares contralaterales, escalénicos o supraclaviculares (ipsi- o contralateral).
<b>CATEGORÍA M: METÁSTASIS DISTANTES</b>	
<b>M0</b>	Ausencia de metástasis a distancia
	Metástasis a distancia.
<b>M1</b>	M1a Presencia de nódulo/s tumoral/es en un lóbulo contralateral; tumor con nódulos pleurales o pericárdicos o derrame pleural o pericárdico maligno
	M1b Presencia de una sola metástasis extratorácica en un solo órgano
	M1c Presencia de más de una metástasis extratorácica en un órgano o en varios

Asimismo, la clasificación TNM predice el estadio de la enfermedad. La Tabla 2 recoge la agrupación por estadios según los parámetros TNM.

La estadificación tumoral puede realizarse en diferentes momentos del proceso diagnóstico-terapéutico: antes del tratamiento (estadificación clínica), después de tratamiento quirúrgico (estadificación patológica), después o durante el tratamiento de inducción, o en la autopsia. La estadificación clínica permite adjudicar el mejor tratamiento al paciente, mientras que la patológica permite emitir un pronóstico y decidir el tratamiento de consolidación. La estadificación después o durante en tratamiento de inducción permite conocer si han habido cambios tumorales en la clasificación clínica y si el paciente puede ser o no sometido a proceso quirúrgico tras la terapia de inducción.

La esperanza de vida del CP de personas que deciden no someterse a tratamiento es de 3 a 6 meses [24]. Por tanto, recibir tratamiento es una opción positiva para mejorar la esperanza de vida del paciente. Los tratamientos más comunes son la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia y la inmunoterapia que dependiendo del tipo y estadio del tumor pueden realizarse de forma conjunta o aislada. Para el CNM en estadio I y II, la opción más adecuada es la cirugía (lobectomía o segmentectomía), aunque si está contraindicada se elige la radioterapia como alternativa.

Tabla 2. Agrupación por estadios.

<b>Estadio</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>Oculto</b>	Tx	N0	M0
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>IA</b>	T1	N0	M0
<b>IA1</b>	T1mi	N0	M0
	T1a	N0	M0
<b>IA2</b>	T1b	N0	M0
<b>IA3</b>	T1c	N0	M0
<b>IB</b>	T2a	N0	M0
<b>IIA</b>	T2b	N0	M0
<b>IIB</b>	T1a-c, T2a,b	N1	M0
	T3	N0	M0
<b>IIIA</b>	T1a-c, T2a,b	N2	M0
	T3	N1	M0
<b>IIIB</b>	T4	N0, N1	M0
	T1a-c, T2a,b	N3	M0
<b>IIIC</b>	T3, T4	N2	M0
<b>IV</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1
<b>IVA</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1a, M1b
<b>IVB</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1c

Si el estadio del tumor es IIIA, debe contemplarse la opción quirúrgica. Si no es posible, debe administrarse quimioterapia neoadyuvante. La supervivencia de pacientes de CP diagnosticado en estadio IIIA se encuentra entre el 20-35% a los 5 años. Respecto al estadio IIIB, el tratamiento de elección es la quimioterapia y la radioterapia torácica, permitiendo una supervivencia del 5 al 13%. Finalmente, en un estadio IV la quimioterapia aumenta la supervivencia al 2% a los 5 años y mejora la calidad de vida [25].

Debido a los bajos porcentajes de esperanza de vida de un paciente con CP avanzado, es necesaria la investigación para la búsqueda, determinación e identificación de posibles biomarcadores capaces de detectar la enfermedad en estado precoz. En esta Tesis Doctoral, se presentan resultados metabolómicos, ionómicos y metalómicos de biomoléculas que se encuentran alteradas en CP, que podrían ser utilizados como marcadores de diagnóstico precoz, tras su evaluación en estadios tempranos y en la práctica clínica.

#### 1.6. Definición de biomarcador.

Se define biomarcador como una molécula específica que puede ser utilizada para distinguir entre un estado anormal de un estado normal [26]. El cáncer es un enfermedad muy heterogénea que refleja tanto perturbaciones genéticas como proteicas en una misma célula cancerosa, por lo que existe un gran conjunto de biomoléculas que pueden servir como biomarcadores de estas alteraciones (proteínas, ADN, ADN metilados, ARN y microARN, oligosacáridos, lípidos y metabolitos) [27]. Como ya se ha comentado previamente, es necesaria la mejora de las medidas de diagnóstico para facilitar la detección temprana de la enfermedad de CP y disminuir el índice de mortalidad que esta enfermedad posee en la actualidad. La identificación

de biomarcadores del cáncer potencia el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico más efectivas, que ayudan en el pronóstico y predicción de la enfermedad, así como en la elección y seguimiento de la terapia asignada al paciente. Los biomarcadores pueden clasificarse en diferentes categorías dependiendo de su propósito:

- Biomarcadores de diagnóstico: Seguimiento, detección temprana y biomarcadores de diagnóstico.
- Biomarcadores de predicción/estadificación: Predicción del cáncer, riesgo de estratificación y biomarcadores del estadio de la enfermedad.
- Biomarcadores de pronóstico: recurrencia o metástasis.
- Biomarcadores de tratamiento: para la selección o repuesta de la terapia.

### 1.7. Biomarcadores del cáncer de pulmón.

El número de biomarcadores empleados en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento del CP se encuentra muy limitado. Solo unos pocos son considerados útiles en la actualidad [26]:

- CEA (antígeno carcinoembrionario), perteneciente a la familia de las glicoproteínas de membrana celular. Se conocen alteraciones de la expresión de CEA en tejido cancerígeno. Este biomarcador presenta una sensibilidad del 33% para el adenocarcinoma.
- CYFRA 21.1 (fragmento de citoqueratina 19), perteneciente a una familia de proteínas del citoesqueleto, liberado al citosol debido a la lisis celular o necrosis tumoral. Presenta una sensibilidad del 72% para el carcinoma epidermoide.

- NSE (Neuronal-Specific Enolase), forma neuronal de la enolasa intracitoplasmática glucolítica, presente en células del tejido cerebral, células neuroendocrinas y de tumores neuroendocrinos incluyendo el CPCP. La sensibilidad para este tipo de cáncer alcanza el 90%.
- Gen de fusión ALK, biomarcador predictivo identificado en pacientes con CPNCP debido al tratamiento con crizotinib.
- CA15.3 (antígeno carbohidrato), glicoproteína de alto peso molecular relacionada con los carbohidratos y elevada en CP [28].
- ProGRP, neuropéptido con actividad hormonal sensible al CPCP [29].
- KRAS, biomarcador pronóstico asociado al tabaquismo que se encuentra en el 25% de pacientes con adenocarcinoma. Los pacientes con mutación tienen peor supervivencia que los pacientes KRAS nativo.

La búsqueda de nuevos biomarcadores asociados al CP en diferentes fluidos y tejidos biológicos es un reto de vital importancia en medicina. Por ello, el desarrollo de nuevos biomarcadores se hace necesario, no solo para su uso como marcadores de cribado si no para poder realizar valoraciones pronósticas adecuadas, además de ayudar a seleccionar el tratamiento terapéutico más eficiente, con el objetivo de mejorar la calidad de vida y la tasa de supervivencia del paciente.

## **2. La espectrometría de masas.**

La espectrometría de masas (MS) es una herramienta analítica que se utiliza para medir ratios de masa-carga ( $m/z$ ) de iones, con el fin de determinar su masa molecular (MW). El análisis por MS se divide en tres pasos fundamentales enumerados a continuación:

- La conversión de moléculas en iones en fase gas por la fuente de ionización.
- La separación de iones por su  $m/z$  a través de campos eléctricos o magnéticos en el analizador de masas.
- La detección de los iones separados en forma de señal eléctrica proporcional a la abundancia de cada especie.

Por otra parte, la MS puede incorporar configuraciones adicionales basadas en el análisis de masas en tándem (MS/MS) en el que un único ion es seleccionado en el primer analizador y posteriormente transportado hacia una celda de colisión, donde colisiona con moléculas de gas causando la fragmentación del mismo. Seguidamente, los iones fragmentados son analizados en un analizador de masas proporcionando información sobre la estructura del ion padre. También es posible realizar todo el proceso MS/MS con un único analizador, como en el caso de la trampa de iones. De esta manera, la MS puede proporcionar información fundamental de los analitos, incluyendo la estructura, pureza y composición. Además, la MS es una técnica con gran potencial en medicina, ya que existen numerosos estudios que han proporcionado avances significativos en el descubrimiento de nuevos fármacos, en el diagnóstico de enfermedades y en el campo general del bioanálisis [30]. Un espectrómetro de masas está formado por cinco unidades fundamentales (Figura 9):

- 1) Sistema de introducción de muestra: su función es introducir una pequeña cantidad de muestra en el espectrómetro de masas. Este sistema suele presentar un mecanismo que permite la volatilización de la muestra, aunque a veces es un punto crítico a tener en cuenta debido a la posibilidad de pérdida de la misma. En algunos casos no

es necesaria la volatilización de la muestra, por ejemplo si esta se introduce a través de un cromatógrafo de gases o una generación de hidruros, siendo imprescindible en estos casos una línea de transferencia a una temperatura determinada.

- 2) Fuente de iones: convierte a los componentes de una muestra en iones. Existen numerosos métodos para producir la ionización de la muestra en estado gaseoso, siendo los dos más habituales: ionización por impacto o bombardeo electrónico (más ampliamente utilizado) y la ionización química. Si la muestra no es gaseosa, las fuentes de ionización más comunes con las de electronebulización (ESI), ionización química a presión atmosférica (APCI) y fotoionización (APPI).
- 3) Analizador de masas: la función del analizador de masas es la separación de iones según su relación  $m/z$ . Existen una amplia variedad de analizadores utilizados comúnmente, como el analizador de campo magnético, cuadrupolo (Q), trampa (IT), tiempo de vuelo (TOF), resonancia de ion ciclotrón por la transformada de Fourier (FT-ICR) y Orbitrap. También cabe citarse los analizadores híbridos como el triple cuadrupolo (QQQ), cuadrupolo con trampa iónica (QTI), triple cuadrupolo tiempo de vuelo (QqQTOF), etc.
- 4) Detector: El detector se encarga de convertir el haz de iones en una señal eléctrica para ser procesada y almacenada. El detector más utilizado es el multiplicador de electrones, que consiste en la incidencia del haz de iones sobre un cátodo, generando electrones, que van incidiendo sobre múltiples dínodos con mayor potencial amplificando la señal final.

- 5) Sistema de tratamiento de datos. El espectrómetro de masas posee un ordenador donde se procesan y se almacenan los datos. A menudo presentan programas especiales para tratar los resultados generados de manera específica.

Cabe destacar que para mejorar la calidad de los resultados, los espectrómetros de masas están acoplados a una unidad de separación, como la electroforesis capilar (CE), la cromatografía de gases (GC) o la cromatografía líquida (LC). También es posible realizar infusión directa (DIMS) o análisis por inyección en flujo (FIA).

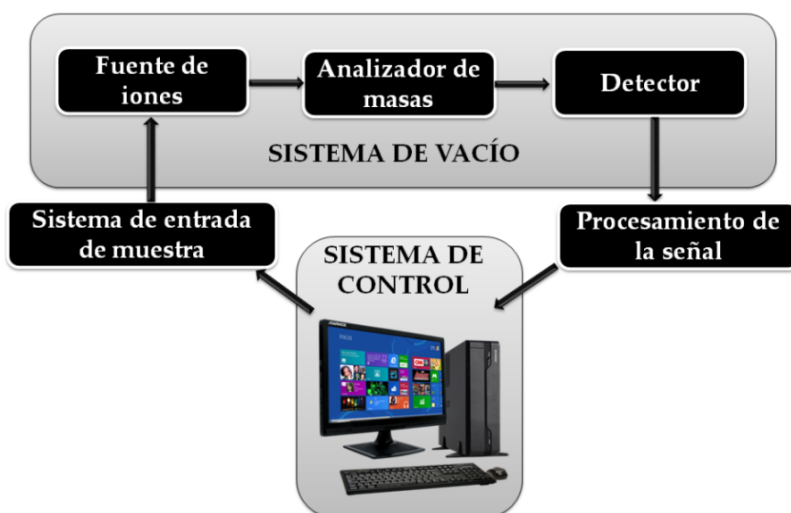


Figura 9. Espectrómetro de masas general.

### 2.1. Espectrometría de masas inorgánica.

Actualmente, la técnica de análisis inorgánico más ampliamente usada es la espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS), ya que presenta numerosas ventajas frente a otras técnicas de análisis más convencionales como la espectroscopía de emisión atómica (ETAAS) o la espectroscopía de emisión óptica con plasma de

acoplamiento inductivo (ICP-OES). Entre estas ventajas se encuentra su capacidad multielemental, ya que puede analizar el 90% de elementos de la tabla periódica de forma simultánea, su amplio rango lineal (hasta 9 órdenes de magnitud), su elevada sensibilidad y precisión, y la rapidez del análisis. Cabe destacar que con ICP-MS es posible aplicar la técnica de dilución isotópica (IDA) [31] debido a su capacidad multiisotópica y la posibilidad de medir relaciones isotópicas.

Sin embargo, ICP-MS presenta algunos inconvenientes relacionados con la presencia de interferencias en el análisis. Existen dos tipos de interferencias principales (debidas a la matriz de muestra o espectrales). Las interferencias de efecto matriz son causadas por los sólidos disueltos en la muestra y suelen generar una deriva en la señal resultante del instrumento. Estas interferencias pueden resolverse mediante la dilución de la muestra o mediante la adición de uno o varios patrones internos, los cuales deben presentar una masa y un potencial de ionización similar al del analito ayudando a compensar los efectos causados por la matriz de muestra. Por otro lado, las interferencias espectrales pueden dividirse en cuatro tipos principales:

- Isobáricas: Superposición directa de un elemento diferente con un isótopo de la misma masa nominal. Por ejemplo:  $^{114}\text{Sn}$  con  $^{114}\text{Cd}$ .
- Poliatómicas. Superposición de un ion poliatómico formado por la combinación de especies derivadas de los gases presentes en el plasma, disolvente de la muestra o la matriz de la muestra. Por ejemplo, la interferencia de  $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$  sobre  $^{80}\text{Se}$ .
- Dobles cargas. Especies que se originan en el plasma por la pérdida de dos electrones en lugar de uno. Como el cuadrupolo separa las especies en función de su masa/carga, los iones doblemente cargados

originarán una masa  $M/2$ . Por ejemplo  $^{136}\text{Ba}^{2+}$  interfiere en el análisis de  $^{68}\text{Zn}^+$ .

- Iones de óxidos e hidróxidos: del propio analito, de los componentes de la matriz de la muestra, del disolvente o de los gases del plasma. Casi todas estas especies forman iones  $\text{MO}^+$  y  $\text{MOH}^+$ . Por ejemplo, los  $\text{MO}^+$  de los cinco isótopos del titanio que aparecen de forma natural tienen masas de 62, 63, 64, 65 y 66 que causan interferencia en la medida de  $^{62}\text{Ni}^+$ ,  $^{63}\text{Cu}^+$ ,  $^{64}\text{Zn}^+$ ,  $^{65}\text{Cu}^+$  y  $^{66}\text{Zn}^+$ .

La solución a este tipo de interferencias es el uso de analizadores con una mayor resolución a los convencionales. Los analizadores más comúnmente utilizados en la técnica ICP-MS son cuadrupolo simple (Q), triple cuadrupolo (QQQ), tiempo de vuelo (TOF) y sector magnético (SF).

En la técnica ICP-MS, la muestra se introduce en el plasma de acoplamiento inductivo mediante arrastre con un gas (que suele ser argón) como un aerosol, ya sea mediante la aspiración de una muestra de líquido o un sólido disuelto en un nebulizador. También cabe la posibilidad de emplear un sistema de introducción de muestras basado en el uso de un rayo que ablaciona directamente las muestras sólidas en una corriente de gas inerte, convirtiéndolas en aerosol. Asimismo, también es posible la introducción de muestras gaseosas mediante GC o generación de hidruros, en cuyo caso no es necesario utilizar un nebulizador. Después del nebulizador se interpone una cámara de nebulización que elimina las gotas de mayor tamaño para lograr una respuesta más sensible. El aerosol se introduce en la antorcha de cuarzo del ICP-MS para la atomización de la muestra, que se convierte, primero en átomos gaseosos y conforme avanzan en el plasma, en iones. La interfase del plasma al espectrómetro de masas está compuesta por dos conos, el de “muestreo” y el separador o “skimmer” que a través de un pequeño orificio

inyectan el flujo del plasma en la zona de vacío permitiendo pasar de presión atmosférica (760 Torr) donde se encuentra el plasma. La función de las lentes iónicas que se encuentran tras los conos, es transportar los iones procedentes del cono separador al espectrómetro de masas. La celda de colisión/reacción que se interpone al sistema final de discriminación de muestras cuadrupolar, consta de un octapolo (ORS) en el que se eliminarán las interferencias, generalmente presentes en el flujo de iones, por efecto de:

- Proceso de reacción: Se emplea un gas reactivo ( $H_2$ ,  $CH_4$ ,  $NH_3$ ,  $He/H_2$ ,  $O_2$ ) en la celda para eliminar las interferencias mediante una reacción química. Normalmente, la interferencia es más reactiva que el analito, permitiendo la eliminación de la misma, aunque en ocasiones, el analito es más reactivo y se forma una nueva especie con  $m/z$  diferente.
- Proceso de colisión: Se emplea un gas inerte ( $He$ ) en la celda. En este proceso se producen dos mecanismos no reactivos, la disociación inducida por colisiones (CID) y la discriminación de energías cinéticas (KED), sin conversión de las especies.

La Figura 10 muestra un esquema instrumental de las partes de un ICP-MS convencional.

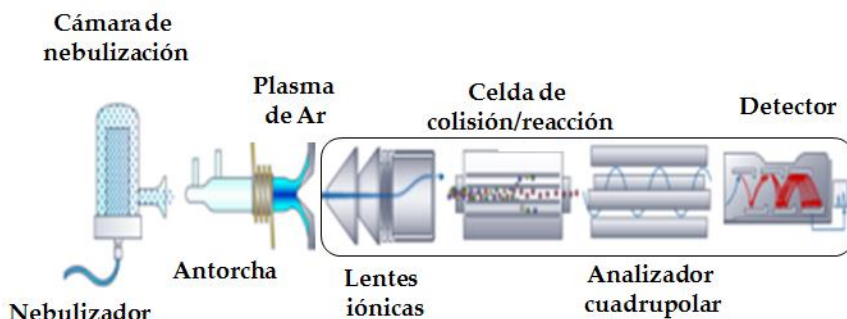


Figura 10. Esquema de la instrumentación convencional de un ICP-MS

Actualmente, la técnica de ICP-MS ha sido mejorada mediante la incorporación de un cuadrupolo adicional entre el analizador de masas (Q1), en la parte frontal de la celda de colisión/reacción y un analizador cuadrupolar (Q2), dando lugar a una configuración denominada MS/MS. En esta modalidad (ICP-QQQ-MS), el Q1 actúa como filtro de masas y permite que pasen a la celda solo los elementos con la masa de interés del analito, descartando aquellos con  $m/z$  diferente, de tal modo que la eliminación de los mismos en el modo colisión/reacción es más eficaz.

La Figura 11 muestra el mecanismo de un ICP-MS convencional con celda de reacción, comparado con el de un ICP-QQQ-MS utilizando como ejemplo la medida de selenio.

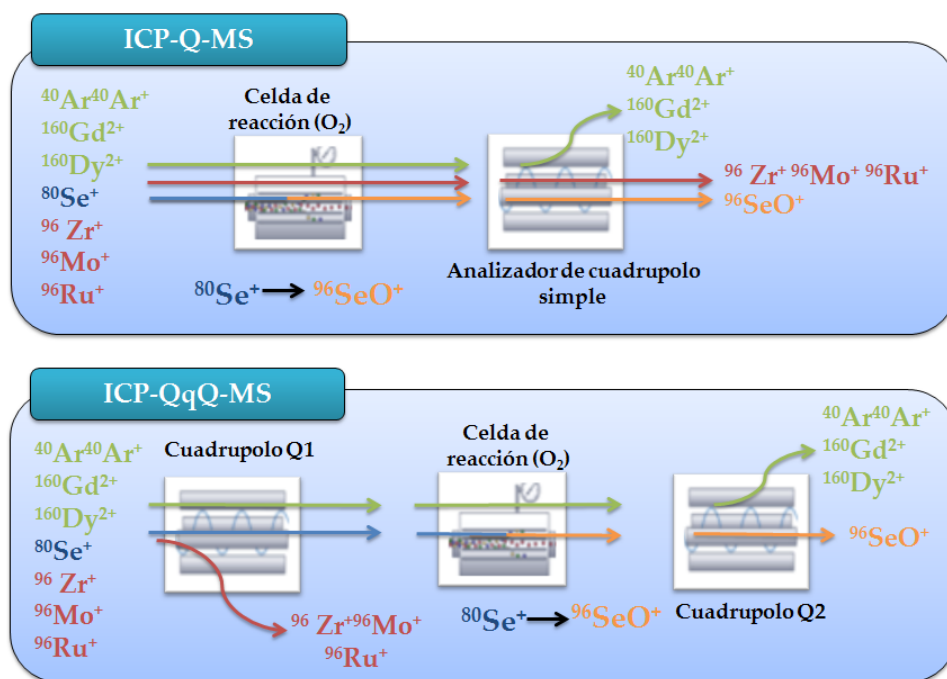


Figura 11. Diferencias en el análisis de  $m/z$  de un ICP con cuadrupolo simple convencional y un ICP triple cuadrupolo.

En la medida de selenio en un ICP-MS convencional en el que se emplea O<sub>2</sub> como gas reactivo, el selenio reacciona, se transforma en <sup>80</sup>Se<sup>16</sup>O con m/z 96 y se aleja de las interferencias con m/z 80 (Ar<sup>2+</sup>, Gd<sup>2+</sup>, Dy<sup>2+</sup>). Sin embargo, debido a la existencia de otros iones de la matriz con la misma m/z 96 (Zr, Mo y Ru) las medidas de selenio pueden llegar a ser imprecisas. Para evitar este tipo de interferencias es necesario el uso de ICP-QQQ-MS, ya que en el Q1 pasan los iones de la m/z exclusiva 80, en la celda de reacción el selenio se transforma en <sup>80</sup>Se<sup>16</sup>O<sup>+</sup> y posteriormente en el Q2 se mide la m/z 96. En este caso, las interferencias de Zr, Mo y Ru no afectan a la medida, ya que han sido eliminadas en el Q1.

## 2.2. Espectrometría de masas orgánicas.

La espectrometría de masas molecular permite obtener principalmente información acerca de la estructura y composición química de las moléculas biológicas como proteínas, metabolitos o metaloproteínas [32–34].

La elección del tipo de fuente de ionización en la espectrometría de masas orgánicas viene determinada principalmente por la naturaleza de la muestra y por la masa molecular de los analitos de interés. Actualmente se utilizan técnicas “suaves” de ionización, en las que solo una pequeña cantidad de energía interna es transmitida a las moléculas durante el proceso. Entre estas técnicas, podemos mencionar la ionización electrónica (EI), en la que las especies de la muestra en fase gas se ionizan debido a la colisión de un haz de electrones sobre la misma. Este haz de electrones se genera mediante calentamiento de un filamento. Por otro lado, en la ionización química (CI) los electrones colisionan con moléculas neutras dando lugar a especies protonadas. Tanto EI como CI presentan limitaciones basadas principalmente

en el rango de masas ya que solo son capaces de ionizar moléculas de  $m/z < 1000$  uma. Además estas técnicas tampoco pueden ionizar compuestos biológicos termolábiles [35]. Posteriormente, se han desarrollado otras técnicas de ionización suave, como la de rápido bombardeo atómica “fast atom bombardment” (FAB) [36,37], la espectrometría de masas de ion secundario líquido (liquid secondary ion mass spectrometry) [38], ionización por electrospray “electrospray ionization” (ESI) [39] e ionización/desorción laser asistida por matriz (matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) [40].

La fuente ESI es una técnica de ionización a presión atmosférica (API) que ioniza la muestra mediante la aplicación de un potencial eléctrico dando lugar a la formación de un spray a través de un capilar. Las especies ionizadas son transportadas y vaporizadas por un gas neutro, que suele ser nitrógeno [41]. La Figura 12 ilustra la formación de los iones mediante la ionización por electrospray.

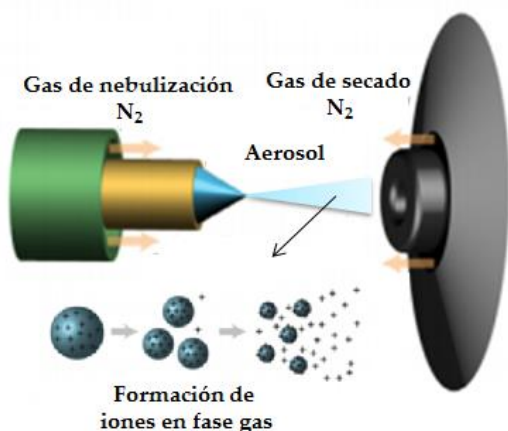


Figura 12. Ionización por electrospray.

El análisis por ESI puede utilizarse en modo de ionización positivo y negativo, así como provocar la fragmentación de la molécula si se aumenta el voltaje aplicado. Al ser una técnica de ionización suave permite conservar los enlaces metal-proteína, permitiendo identificar isoformas y estequiometría de complejos metálicos [42]. Además, con ESI, los compuestos orgánicos ionizados pueden adquirir múltiples cargas en función de su estructura y masa molecular, como en el caso de macromoléculas, ya que pueden ser protonadas de forma sucesiva y variar su relación  $m/z$  hasta que se adapten al rango de mayor exactitud del analizador empleado.

De forma alternativa, existen otros dos tipos de fuentes de ionización API como la fotoionización a presión atmosférica (APPI), que emplea una fuente de radiación ultravioleta capaz de producir la ionización de los compuestos, y la ionización química a presión atmosférica (APCI), cuya principal diferencia con la ESI radica en la presencia de un gas que ayuda en el proceso de ionización.

Las diferentes técnicas API presentan una gran complementariedad, ya que mientras que APCI y APPI se utilizan para ionizar compuestos poco polares, la ESI, se emplea principalmente para la ionización de compuestos de elevada polaridad. Así pues, debido a que la mayoría de metabolitos presentes en las muestras biológicas son de carácter polar, y debido al gran rango de masas que abarca la ESI, esta fuente será empleada en los estudios metabolómicos realizados en esta Tesis Doctoral. La Figura 13 muestra la aplicabilidad de las fuentes API en función del peso y polaridad de los metabolitos.

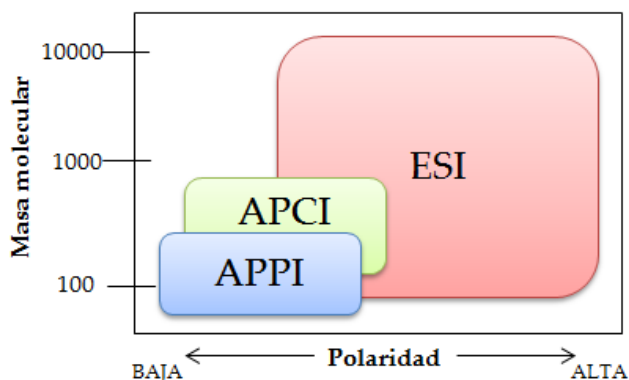


Figura 13. Aplicación de las API en función del rango de masa molecular y de la polaridad de los analitos.

Por otra parte, el uso de tecnología “nanospray” permite mejorar los mecanismos de formación de los iones en comparación con la fuente ESI [43,44]. Esta técnica es capaz de trabajar a flujos del orden de nanolitros por minuto y presenta ventajas como la ausencia de contaminación cruzada, escasas posibilidades de pérdida de muestra, y la capacidad de escoger y cambiar el disolvente a voluntad, aún durante el análisis.

De forma similar, MALDI, es una técnica capaz de analizar proteínas, ADN, lípidos y glicoconjugados [40]. Con MALDI, los iones son desorbidos de una fase sólida. La muestra diluida se mezcla con una matriz y se expone en un soporte MALDI antes de co-cristalizar dentro de la matriz. Los componentes de la mezclas se transportan hacia la fase gaseosa con la ayuda de un láser que interacciona con el cristal de muestra-matriz causando la evaporación de la matriz que contiene los analitos. La matriz absorbe la energía del láser y actúa como donadora o receptora de protones, ionizando los analitos en ambas especies catiónicas y aniónicas [45,46]. Una técnica específica de MALDI es la MALDI imaging MS (MALDI-IMS), una

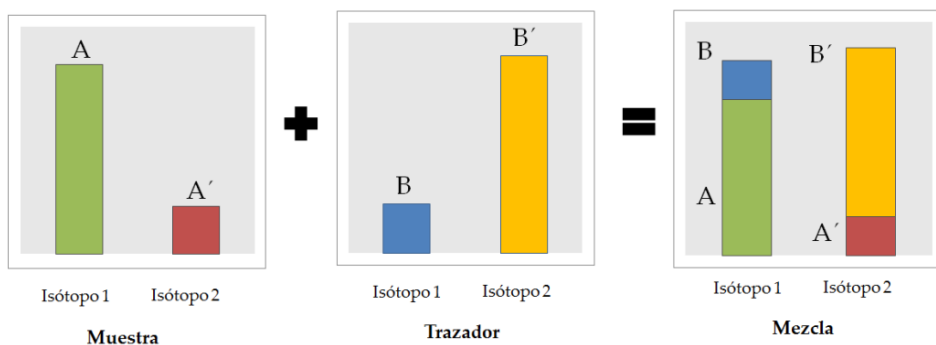
prometedora herramienta en el descubrimiento de biomarcadores y en la medicina translacional. Esta técnica permite obtener imágenes moleculares de tejidos (gran cantidad de datos que permiten generar mapas de densidad para cada valor de  $m/z$ ) y trazar la presencia de metabolitos en secciones de tejido de 30-50  $\mu\text{m}$  [47,48]. Otra variante de MALDI es el método SELDI "Surface-enhanced laser desorption/ionization" [49] basado en el procesamiento directo de la muestra en matrices de chips de proteínas o protein-chip arrays (PCAs) que pueden tener varios tipos de superficies activadas químicamente y capturar moléculas de muestras biológicas a través de interacciones específicas (p. ej., interacción electrostática) o afinidad cromatográfica (p. ej., anticuerpo-antígeno, proteína-ADN, y enzima-sustrato). Las proteínas son cristalizadas, usando energía absorbida de las moléculas, desorbidas e ionizadas por un láser de nitrógeno [50,51].

### 2.3. La técnica de dilución isotópica (IDA).

Una gran parte de los elementos químicos existentes están constituidos por una mezcla de varios isótopos, que difieren entre sí solo en el número de neutrones del núcleo. La masa atómica que normalmente utilizamos para cada elemento es una media ponderada de las masas de todos los isótopos de un elemento teniendo en cuenta la abundancia natural que poseen. Por tanto, desde un punto de vista analítico, un isótopo cuya abundancia isotópica haya sido modificada artificialmente ("enriquecida") constituye un patrón interno ideal para la medida por espectrometría de masas del elemento considerado.

El análisis por dilución isotópica ("isotopic dilution analysis (IDA)") es una técnica analítica basada en la medida de relaciones isotópicas de muestras cuya composición isotópica ha sido alterada al añadir una cantidad

perfectamente conocida de un elemento o compuesto, previamente enriquecido isotópicamente, ya sean isótopos radiactivos o estables. El elemento a analizar debe tener, al menos, dos isótopos estables que se puedan medir. Después de un tiempo de equilibración del elemento o compuesto enriquecido añadido o "spike" con el elemento natural presente en la muestra, se lleva a cabo la medida de las relaciones isotópicas alteradas. Es posible conocer la concentración de un elemento en la muestra mediante la medida del cambio provocado en una relación isotópica concreta del elemento de estudio, ya que las abundancias isotópicas de la mezcla y, por tanto, las relaciones isotópicas, serán intermedias entre las de la muestra y el "spike", y dependerán tanto de la cantidad de "spike" adicionado como de la cantidad original del elemento en la muestra. La Figura 14 muestra el principio de análisis por IDA para un elemento que posee dos isótopos estables.



*Figura 14. Principio de la dilución isotópica para un elemento que contiene dos isótopos estables.*

Además, dependiendo del momento y de la forma química del isótopo trazador (spike) añadido a la muestra, la aplicación del análisis por dilución isotópica para la especiación elemental se puede realizar bajo dos modos diferentes.

- 1) Modo de especies inespecíficas. La adición del “spike” se lleva a cabo tras la completa separación de especies presentes en la muestra. Este modo es especialmente útil cuando, ya sea la estructura o la composición de la especie buscada, no son exactamente conocidas, o cuando el correspondiente compuesto, marcado isotópicamente, no está disponible comercialmente o no puede ser sintetizado.
- 2) Modo de especies específicas. En este modo se requiere el uso de una disolución de “spike” que contenga las especies a analizar en una forma marcada isotópicamente. Por lo tanto, a diferencia del modo de especies inespecíficas, la composición y estructura de las especies de interés deben ser conocidas exactamente con el fin de sintetizar o adquirir comercialmente la especie enriquecida correspondiente. Además, en este modo, la disolución “spike” es añadida a la muestra en el comienzo del procedimiento analítico.

La principal ventaja de IDA reside en que al medir relaciones isotópicas cualquier variación de la sensibilidad debida a la deriva de la señal del plasma o al efecto matriz no afectará al valor final de la concentración del elemento en la muestra. Sin embargo, existen algunos factores que han de tenerse en cuenta para que la medida de la relación isotópica sea lo más exacta posible, ya que cualquier pérdida de sustancia antes de que se produzca el equilibrio isotópico puede ser una fuente de error. Por otra parte, la medida de las intensidades de los isótopos 1 y 2 deben estar libres de interferencias espectrales, y se debe controlar además el valor del blanco, ya que cualquier tipo de contaminación puede afectar a la medida de la relación isotópica.

## 2.3.1. Fundamento matemático de la dilución isotópica.

La ecuación que permite determinar la concentración original del elemento en una muestra a partir de la medida de la relación isotópica en la mezcla, depende, tanto del número de moles de un elemento poli-isotópico presente en la muestra, como del número de moles del mismo elemento en la disolución "spike", además de otras relaciones a tener en cuenta. La ecuación de la dilución isotópica es:

$$C_s = C_{sp} \frac{m_s m_{sp} A_{sp}}{M_s M_{sp} A_n} \left( \frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m R_s} \right)$$

Donde:

- $C_s$  es la concentración del elemento en la muestra.
- $C_{sp}$  es la concentración del elemento en la disolución "spike".
- $m_s$  y  $m_{sp}$  son las masas de muestra y "spike", respectivamente.
- $M_n$  y  $M_{sp}$  son las masas atómicas del elemento en la muestra y en el "spike."
- $A_{sp}$  es la relación de abundancia de la mezcla en el "spike".
- $A_n$  es la relación de abundancia natural de la mezcla.
- $R_{sp}$  es la relación de la mezcla en el "spike".
- $R_m$  es la relación entre los isótopos a y b en la mezcla, siendo b el isótopo minoritario.
- $R_n$  es la relación natural de los isótopos. Los parámetros anteriores son todos conocidos a excepción de  $R_m$  que se determina directamente mediante ICP-MS midiendo la abundancia de los isótopos a y b en la mezcla muestra/spike.

### 3. Metodologías ómicas.

Las ciencias ómicas son tecnologías de gran potencial que permiten la monitorización simultánea de un gran número de moléculas biológicas de pequeño o gran tamaño (macromoléculas) como ARN, proteínas o metabolitos intermedios, permitiendo la caracterización de las mismas, así como obtener evaluaciones completas de la actividad funcional de las rutas bioquímicas y la estructura genética de los diferentes individuos y especies [52]. Las principales ciencias ómicas incluyen la genómica (estudio de los genes y su función), la transcriptómica (estudio de los transcritos), la proteómica (estudio de las proteínas, su localización, estructura, estabilidad e interacción) y la metabolómica (estudios de los metabolitos y de las rutas metabólicas) (Figura 15), aunque actualmente existen términos para ciencias ómicas particulares, como la lipidómica, relacionada con el estudio de los lípidos, “foodómica” relacionada con el análisis de moléculas presentes en alimentos, “ionómica” que mide la composición elemental de un organismo, o la metalómica que estudia las moléculas biológicas asociadas a un metal [52–55].

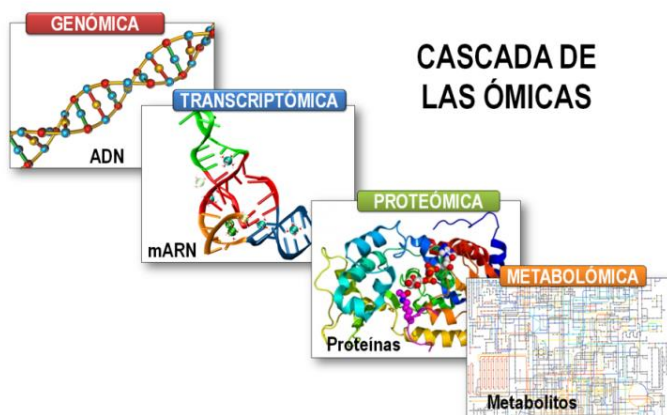


Figura 15. Cascada de las ómicas

### 3.1. Metabolómica.

La metabolómica es la ciencia que estudia el conjunto de pequeñas biomoléculas presentes en células, tejidos y fluidos corporales que intervienen en el metabolismo de un organismo individual [56]. Esta ciencia desempeña un gran potencial como técnica de análisis, ya que es capaz de determinar un gran número de metabolitos de manera rápida y simultánea. Esta característica hace que sea una técnica de gran interés en la medicina práctica. Además, la metabolómica presenta varias ventajas frente a otras ómicas, debido a las funciones que desempeñan estos metabolitos en el organismo [57]. Estas ventajas radican en la naturaleza de los metabolitos, ya que son sustratos finales en las reacciones biológicas y reflejan interacciones directas entre la expresión génica, las proteínas y el medioambiente, siendo además indicadores instantáneos de las alteraciones producidas en el organismo. Las técnicas metabolómicas pueden aplicarse a diferentes muestras biológicas permitiendo investigar de forma global las perturbaciones metabólicas de un organismo. Finalmente, cabe destacar, que el tiempo y coste de análisis de la metabolómica son menores que en otras técnicas ómicas.

Aunque como hemos comentado anteriormente, la metabolómica presenta ventajas frente a otras ómicas, existen algunas desventajas que limitan su estudio, como por ejemplo la heterogeneidad de los metabolitos. La variabilidad en las propiedades físico-químicas de los diferentes metabolitos presentes en una muestra (aminoácidos, ácidos grasos, lípidos, ácidos orgánicos y otros compuestos), como el peso molecular, la polaridad o la volatilidad dificultan la determinación de los mismos. Otra limitación es el origen de los metabolitos ya que pueden ser endógenos (sintetizados y metabolizados por el organismo), exógenos (nutrientes o fármacos) o resultantes de la interacción entre distintos organismos (microflora intestinal),

complicando la interpretación metabólica de sus posibles alteraciones. Finalmente, el rango de concentraciones en que se pueden encontrar los diferentes metabolitos (desde pM a mM) también puede dificultar la determinación de los mismos.

### 3.1.1. Desarrollo de un experimento metabólico.

El diseño de un experimento metabólico es crucial para asegurar tanto el análisis de una gran cobertura de metabolitos presentes en la muestra como la determinación de resultados fiables y consistentes. Las etapas generales que debe seguir un estudio metabólico se resumen en la Figura 16 e incluyen la obtención y el tratamiento de las muestras, el análisis metabólico, el procesado y análisis estadístico de los datos, la determinación e identificación de los metabolitos discriminantes y la interpretación metabólica de los resultados.



Figura 16. Etapas de un experimento metabólico general.

### 3.1.2. La metabolómica como herramienta analítica para el estudio del cáncer de pulmón.

La metabolómica se ha convertido en una alternativa importante para el análisis simultáneo de metabolitos alterados en respuesta a una enfermedad [58]. Hasta la fecha, los estudios metabolómicos realizados en muestras de pacientes con CP se han basado en técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) [59,60] y espectrometría de masas (MS) [61,62]. La mayoría de las aplicaciones metabolómicas basadas en MS incluyen acoplamientos con técnicas de separación cromatográficas como la cromatografía líquida de alta eficacia (High Performance Liquid Chromatography-HPLC) [60,63], la electroforesis capilar (CE-MS) o la cromatografía de gases (GC-MS) [61,64–69].

Por otra parte, se puede obtener una descripción más global de la composición metabólica de una muestra biológica a partir de técnicas que no incorporan un "filtro" cromatográfico como son la técnica de inyección en flujo (FIA-MS) [70,71] o la infusión directa (DIMS) [72] introduciendo directamente los analitos en disolución en la fuente de ionización. DIMS proporciona una estimación semicuantitativa de la presencia de metabolitos si se utilizan instrumentos de mayor resolución de masa.

Sin embargo, la supresión de iones de matrices biológicas complejas como suero [73] puede ser un serio inconveniente que requiere el uso de analizadores de alta resolución y alta precisión de masa, como el tiempo de vuelo (TOF), la transformada de Fourier de resonancia de ciclotrón iónico (FTICR) [74] o el Orbitrap [75].

### 3.1.2.1. Muestras biológicas empleadas en el estudio metabólico de cáncer de pulmón. Metabolitos alterados.

Varios fluidos biológicos humanos han sido estudiados con el fin de encontrar biomarcadores metabólicos en CP, entre ellos se encuentran:

- Sangre (plasma o suero):

El plasma es el principal componente de la sangre (junto con el suero), que se obtiene a partir de la misma mediante su filtración y separación de glóbulos rojos y blancos. Su composición es de 90% de agua, 7% de proteínas (albúmina, lipoproteínas, globulinas y fibrinógeno) y el resto corresponde a grasas, glucosa, vitaminas y hormonas entre otras biomoléculas. El suero está compuesto principalmente de agua, proteínas, hormonas, minerales y dióxido de carbono. La obtención del suero se lleva a cabo mediante la filtración de la sangre para separar el plasma y la eliminación de proteínas fibrinógenas. Cuando el plasma es extraído y se deja coagular, con el paso del tiempo el coágulo se reduce, y la eliminación del coágulo da lugar al suero. La Figura 17 muestra la diferencia de componentes entre plasma y suero tras la obtención de los mismos.

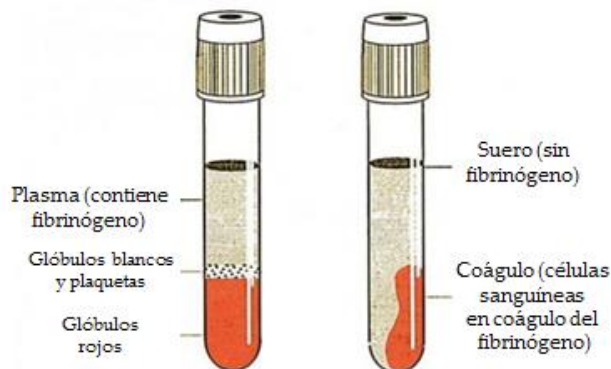


Figura 17. Diferencia de componentes entre plasma y suero.

Estos biofluidos son muestras ampliamente utilizadas en el diagnóstico clínico, debido a que además de presentar numerosos y diferentes compuestos celulares y moleculares susceptibles de análisis, son fluidos biológicos obtenidos de forma no invasiva. La mayoría de estudios metabolómicos en CP realizados hasta la fecha se basan en el análisis de muestras de suero o plasma [67,76–84]. Algunos autores describen alteraciones de aminoácidos en muestras de suero y plasma de pacientes con CP, especialmente en treonina [67,68,85], glutamato [67,86,87], tirosina [88,89], alanina [85,90], isoleucina [80,90] y valina [89,90]. Además de los aminoácidos, también se ha demostrado la existencia de perturbaciones en rutas metabólicas relacionadas con ácidos grasos como el ácido linoléico o el palmítico [77,84,85] y con ácidos orgánicos como el ácido cítrico [82] o el ácido málico [91]. Por otra parte, también se han descrito las alteraciones de lípidos como la colina, la fosforilcolina y la esfingosina [67,82,84] en pacientes con CP. La Tabla 3 muestra los metabolitos alterados en los estudios metabolómicos de suero y plasma de CP realizados hasta la fecha.

Tabla 3. Metabolitos alterados en diferentes estudios actuales en el CP.

Metabolitos	Muestra	Técnica	Grupo de estudio	Referencia
Hidroxilamina y treonina	Suero	<sup>1</sup> H-RMN y GC-MS	CP de estadios I, II y III	[68]
Fosfatiletanolamina	Suero	GC-TOFMS y HILIC-QTOFMS	CP y personas sanas	[92]
Ácido glutámico, colina y treonina	Suero	<sup>1</sup> H-RMN	CPNCP y persona sanas	[67]

(Continuación de Tabla 3).

Metabolitos	Muestra	Técnica	Grupo de estudio	Referencia
Diacetil espermina	Suero	HILIC-QTOFMS	CPNCP y persona sanas	[93]
Fosforilcolina y esfingosina	Suero	GC-MS y LC-QTOF-MS	CP y P	[94]
Bilirrubina	Suero	LC-MS/MS	CPNCP y persona sanas	[95]
Ácido cítrico, colina y lisina	Suero	<sup>1</sup> H-RMN	CPNCP y EPOC	[82]
Colina y ácido linoleico	Suero	UPLC/Q-TOF MS	CP y personas sanas	[84]
Ácido hidroxi-isobutírico y ácido linoleico	Suero	LC-QTOF-MS	CP y personas sanas	[77]
Carnitina, propionil-carnitina, tirosina, metionina, ácido málico, histidina y 5-oxoprolina	Suero	LC-Q-Orbitrap-MS	CPNCP y persona sanas	[91]
Glucosa, tirosina, glicerol y valina	Suero	<sup>1</sup> H-RMN	CP y personas sanas	[89]
Benzaldehído, urea, isoleucina, ácido glicólico y fenilalanina	Suero	GC-MS	CP y personas sanas	[80]
Ácido glutámico, ácido aspártico y xilosa	Suero y plasma	GC-TOF-MS	Adenocarcinoma y personas sanas	[83]

(Continuación de Tabla 3).

Metabolitos	Muestra	Técnica	Grupo de estudio	Referencia
Glicerol, ácido láctico y triptófano	Plasma	GC-TOF-MS	CPNCP y persona sanas	[86]
Ácido benzoico, ácido láctico y glucosa	Plasma	GC-MS	CPNCP, personas sanas y EPOC	[76]
Alanina, treonina y ácido linoleico	Plasma	GC-MS y LC-MS	Adenocarcinoma y personas sanas	[85]
Ácido glutámico, erotriol y ácido palmítico	Plasma	GC-TOFMS	CPCP y persona sanas	[87]
Alanina, valina e isoleucina	Plasma	LC-MS	CPNCP y persona sanas	[90]

- Orina:

La orina es un fluido transparente o amarillento que contiene un 95% de agua, un 2% de minerales y un 3% de urea y ácido úrico. El residuo sólido que presenta la orina es principalmente urea, producto de degradación del metabolismo de las proteínas. El resto incluye nitrógeno, cloruros, cetosteroides, fósforo, amonio, creatinina y ácido úrico. El análisis de orina y el urocultivo pueden ayudar al diagnóstico de varias enfermedades. Los estudios metabólicos más recientes realizados en orina de pacientes con CP muestran sobre todo alteraciones en carnitinas y acetilcarnitinas [96–98], ácido hipúrico [97–99] y creatina y creatinina [99,100].

La Tabla 4 muestra los metabolitos alterados encontrados en orina de pacientes con CP de estudios actuales. En esta Tesis Doctoral se han obtenido resultados de metabolitos alterados en orina de pacientes con CP, aportando nuevas contribuciones a los resultados actuales de la bibliografía.

Tabla 4. Metabolitos alterados en orina de pacientes con CP.

Muestra	Técnica	Grupo de estudio	Referencia
Carnitina y acetilcarnitina	LC-qTOF-MS	CPNCP y personas sanas	[96]
Creatina, ácido ribónico y ácido acetilneuramínico	LC-MS	CPNCP y personas sanas	[100]
Ácido hipúrico, ácido hidroxi-isovalérico y creatinina	<sup>1</sup> H RMN	CP y personas sanas	[99]
Triptófano, ácido hipúrico y carnitina	ESI-RRLC-MS	CP y personas sanas	[97]
Taurina, ácido hipúrico y carnitina	HILIC/RPLC-MS	CP y personas sanas	[98]

- Esputo:

El esputo es una secreción procedente de la nariz, la garganta o los bronquios que se escupe de una vez por la boca en una expectoración. Una muestra de esputo se considera representativa si están presentes macrófagos alveolares o células epiteliales bronquiales ya que es una muestra de que estos fluidos se originan en las profundidades del pulmón. A pesar de que esta muestra presenta la ventaja de tener carácter no invasivo la citología del

esputo desempeña un papel limitado en los estudios prospectivos de detección de CP. Existen muy pocos estudios metabolómicos que utilizan el esputo para investigar el CP. En concreto, Cameron et al, analizaron los metabolitos presentes en el esputo de pacientes con CP mediante GC-MS y encontraron alterados putrescina y cisteamina en la enfermedad [101].

- Saliva:

El hallazgo de que la saliva contiene perfiles moleculares que reflejan las enfermedades sistémicas ha permitido desarrollar una técnica de diagnóstico denominada “diagnóstico salival”. La saliva contiene secreciones de la parotida, de las glándulas submandibular y sublingual, cientos de glándulas salivales minoritarias y líquido de la grieta gingival [102]. Hasta la fecha, solo hay antecedentes sobre una investigación en muestras de saliva de pacientes con CP, que concluía la existencia de cambios significativos en el metabolismo de los aminoácidos y de los ácidos nucleicos [103].

- Sudor:

Las muestras de sudor pueden obtenerse de forma fácil utilizando técnicas no invasivas [104]. Existen estudios que demuestran la idoneidad del análisis del sudor para monitorizar la salud humana, siendo una muestra empleada en el diagnóstico de fibrosis quística [105] y también para el desarrollo de una técnica de screening para el CP, donde metabolitos como aminoácidos, ácidos carboxílicos de cadena corta, azúcares y algunos lípidos presentaban alteraciones respecto al grupo control [106].

- Condensado de Aliento Exhalado:

El condensado de aliento exhalado (exhaled breath condensate, EBC) es una muestra resultante de la condensación del gas exhalado mediante

enfriamiento. El análisis de EBC debe proporcionar información sobre la composición del líquido de revestimiento extracelular y los gases exhalados solubles [107]. La Figura 18 representa dos tipos de mecanismos empleados en medicina para la obtención de EBC.

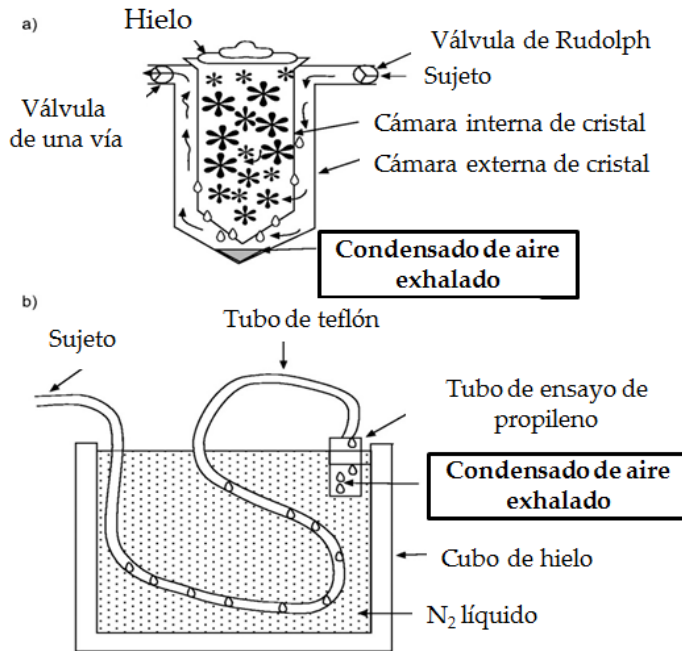


Figura 18. Mecanismos para la obtención de EBC.

A pesar de que el componente principal del EBC es el vapor de agua, también pueden encontrarse cientos de componentes diferentes como iones inorgánicos, péptidos, proteínas, surfactantes y macromoléculas. El EBC es un biofluido poco estudiado en la búsqueda de biomarcadores clínicos a pesar de ser una muestra que se obtiene mediante métodos no invasivos y de que existe una relación entre su composición y los fenotipos de enfermedades respiratorias como el CP [108].

- Fluido de Lavado broncoalveolar:

Este fluido no biológico se obtiene mediante una técnica que consiste en la instilación de suero salino en bolos de 20-50 ml hasta el volumen total deseado a través del canal interno del broncofibroscopio, tras encajarlo en el bronquio elegido. Después de cada instilación, se aspira con la misma jeringa con la presión adecuada para no colapsar las paredes bronquiales. Se estima que con la realización del LBA se toma muestra de alrededor de un millón de alvéolos (1 % de la superficie pulmonar), obteniéndose aproximadamente 1 ml de secreciones reales pulmonares en el total del líquido recuperado. El LBA se ha usado ampliamente en el diagnóstico de las infecciones pulmonares [109,110], pero su sensibilidad y especificidad varían en función de que se trate de un enfermo inmunocompetente, o no, del microorganismo causal, de la técnica empleada y de la utilización, o no, de antibioterapia previa. La Figura 19 muestra un diagrama del procedimiento de obtención de LBA. Esta Tesis Doctoral presenta los primeros resultados metabolómicos en muestras de LBA de pacientes con CP [65].

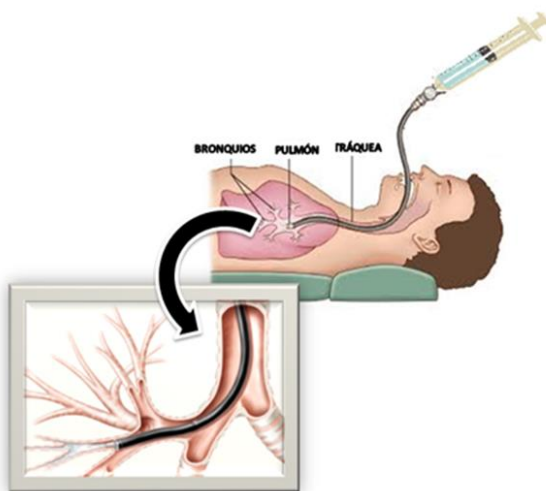
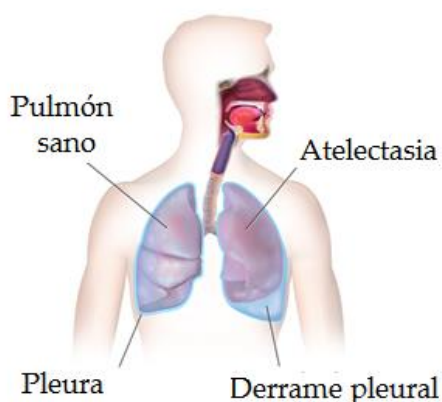


Figura 19. Mecanismo de obtención de LBA mediante broncoscopio.

- Líquido pleural:

El líquido pleural se encuentra en la cavidad pleural y sirve como lubricante del movimiento de los pulmones durante la inhalación y la exhalación. Se forma a partir de un filtrado plasmático desde los capilares sanguíneos de los pulmones y se encuentra en pequeñas cantidades entre las dos capas de la pleura, membranas que recubren el interior de la cavidad torácica y el exterior de cada uno de los pulmones. Existe una gran variedad de trastornos y enfermedades que pueden producir inflamación de la pleura (pleuritis) y/o una acumulación excesiva de líquido pleural (efusión pleural). La Figura 20 muestra la localización del líquido pleural. El análisis del líquido pleural consiste en realizar una serie de pruebas que permiten establecer la causa del incremento de dicho líquido. La extracción de la muestra se realiza mediante una jeringa, por un procedimiento conocido como toracocentesis. Los estudios metabolómicos realizados hasta la fecha, en este tipo de fluido mostraron alteraciones en metabolitos orgánicos volátiles [111] y ácidos grasos [112].



*Figura 20. Localización del líquido pleural*

- Tejido pulmonar.

Existen diferentes técnicas para la obtención de muestras de tejido pulmonar. Entre ellas destacan [113]:

- La biopsia por punción, también denominada biopsia transtorácica o percutánea, donde se emplean técnicas de imagen como el TAC (tomografía computarizada) o una radiografía fluoroscópica para guiar a la aguja de biopsia. Este procedimiento se lleva a cabo con anestesia local.
- La biopsia transbronquial, donde un fibroscopio se introduce en la boca y se hace llegar hasta el pulmón a través de los bronquios. El fibroscopio contiene un sistema de video para visualizar la operación además del material quirúrgico con el que se obtiene la muestra.
- La biopsia torascoscópica, que consiste en la introducción de un endoscopio a través de una abertura quirúrgica practicada en la pared torácica. El instrumental quirúrgico con que está dotado el endoscopio permite, además de obtener muestras de tejido, realizar intervenciones terapéuticas como la extirpación de nódulos. Esta técnica se lleva a cabo con anestesia general.
- La biopsia abierta, es la técnica de extracción de tejido más característica, y consiste en la obtención directa de tejido pulmonar a través de una incisión en el tórax. Un estudio rápido de la muestra obtenida puede llevar a realizar una operación más extensa con objeto de extirpar porciones anatómicas grandes, como un lóbulo pulmonar. Se realiza con el paciente hospitalizado y bajo anestesia general.

Los estudios metabolómicos del CP en tejido pulmonar suelen comparar los perfiles metabolómicos del tejido dañado con los del tejido adyacente no afectado de un mismo paciente, debido a que las técnicas invasivas no pueden realizarse sobre personas que no presentan ningún tipo de patología relacionada con el pulmón. Debido a la dificultad de obtención de tejido pulmonar existe un número muy limitado de estudios metabolómicos en CP. Uno de los primeros trabajos fue realizado por Fan et al, quienes analizaron glucosa marcada con  $^{13}\text{C}$  en extractos de tejido de pacientes con CP y concluyeron que había alteraciones en el ciclo de Krebs y en el metabolismo del piruvato [114]. El estudio realizado por Rocha et al, determinó diferencias entre tejido pulmonar tumoral y el adyacente no afectado de pacientes con CP, y demostró un incremento en fosfocolina, lactato y glicerofosfocolina y una disminución en los niveles de inosina/adenosina, acetato, mioinositol y glucosa [115]. En otro estudio, realizado por Hori et al, se identificaron alrededor de 40 metabolitos alterados en tejido pulmonar de pacientes con CP [61]. Finalmente, un estudio más reciente realizado por Fahrman et al, en el que combinaban análisis metabolómicos con proteómicos, compararon muestras de tejido pulmonar maligno y benigno de pacientes con adenocarcinoma diagnosticado en estadio temprano y concluyeron un aumento de glicosilación y glutaminólisis [83].

### 3.2. Ionómica y metalómica.

Los iones metálicos son componentes vitales en la química de la vida [116]. Se cree que un tercio de las proteínas requieren un metal como cofactor, como Cu, Fe, Zn o Mo [117] en forma de ion simple o complejo, o como compuesto que contiene un metal en su estructura. La comprensión de los

mecanismos por el cual un metal es almacenado o incorporado como cofactor requiere, además de poder identificar las metaloproteínas, la caracterización de moléculas no proteicas que interaccionan con iones metálicos o metabolitos de metalocompuestos exógenos como metalofármacos. El análisis y estudio de los metales y especies metálicas de un sistema biológico son de gran importancia para poder entender la homeostasis de estas especies y su repercusión en el fenotipo. En este sentido, existen dos ciencias ómicas relacionadas con el estudio de los elementos en un organismo, la ionómica y la metalómica. Mientras que la ionómica tiene como objetivo medir la composición elemental de un organismo vivo (ionoma) y su dinámica en relación con la variabilidad genética, fisiológica y metabólica [55], la metalómica estudia el metaloma y las interacciones y conexiones funcionales de las especies metálicas de los genes, proteínas y metabolitos y otras biomoléculas en los sistemas biológicos [118].

### 3.2.1. La importancia de los metales en la salud.

Los elementos son esenciales para regular la homeostasis humana, ya que juegan un papel muy importante en los sistemas biológicos participando en numerosos procesos celulares. Estos metales esenciales, los cuales solo son requeridos a nivel de traza, son cruciales para la función de numerosas enzimas involucradas en reacciones bioquímicas fundamentales [119]. Por ejemplo, el Fe es esencial para la función de la ribonucleótido reductasa [120] y el Zn es un cofactor de alrededor de 300 enzimas vitales en la expresión génica [121]. Además de su importancia en la función enzimática, los metales también son necesarios en otros procesos biológicos, como el transporte de oxígeno en la sangre mediado por la hemoglobina, que contiene Fe [122].

La deficiencia o exceso de muchos de estos elementos pueden provocar efectos tóxicos en el organismo, inflamación [123] o incluso conducir al desarrollo de enfermedades incluyendo el cáncer [124]. Como consecuencia, los niveles de los metales esenciales deben estar cuidadosamente equilibrados, manteniendo el cuerpo en un estado homeostático [123]. Algunos elementos poseen un carácter quimiopreventor, como es el caso del selenio, que participa en la inhibición de la angiogénesis [125], la mejora de la respuesta inmune [126] y es un antagonista bien documentado contra los metales tóxicos [127]. También controla la proliferación innecesaria de células [128] e inhibe la activación de ciertos factores de transcripción [129]. Otros autores han informado sobre las propiedades anticancerígenas del vanadio demostrando que los complejos de este elemento presentan beneficios en el tratamiento de varios tipos de cáncer, como el cáncer de pulmón [130].

El Cu es un oligoelemento esencial en la dieta que posee un papel fundamental en las reacciones enzimáticas relacionadas con el metabolismo oxidativo, ya que es necesario para la conversión de iones cúpricos y cuprosos [131]. Sin embargo, este elemento también contribuye a la generación de radicales libres [131]. El aumento de los niveles de cobre en suero de CP se ha relacionado con la progresión tumoral a través de la angiogénesis (formación de nuevos capilares a partir de los vasos sanguíneos existentes) para cumplir con los requisitos nutricionales de un tumor en crecimiento [132,133]. La disminución de los niveles de Zn se ha relacionado con alteraciones en el ciclo celular y la apoptosis [134,135] y con la incapacidad de bloquear la absorción adicional de Cu [136]. Las bajas concentraciones séricas de Zn pueden afectar a la síntesis de proteínas y retrasar los procesos de reparación del cuerpo debido a la reducción de la formación de metaloenzimas de Zn [137].

La superóxido dismutasa de manganeso (Mn-SOD), como único eliminador de radicales superóxido en las mitocondrias, puede tener un papel clave en la prevención de células como antioxidante y supresor de tumores [138]. En los pulmones, la Mn-SOD se considera de importancia crítica para la defensa antioxidante [139]. Se ha declarado que existe una alteración en la homeostasis de Mn durante el desarrollo del cáncer que resulta en la movilización de un compartimento a otro [140].

Un gran número de elementos no esenciales puede tener importantes implicaciones en la salud humana. En este sentido, la exposición a As, Cd, Pb y Ni tienen consecuencias carcinogénicas [124] debido a la activación de rutas de señalización oncogénicas [141,142], estrés oxidativo [143,144] o la inhibición del sistema de reparación del ADN [145]. Muchos metales también contribuyen a la progresión y metástasis del cáncer [146–148]. Se ha demostrado que el Ni es un agente carcinógeno pulmonar encontrado en el humo del tabaco [149] y que causa daño oxidativo en el ADN [150]. El Cr está asociado al metabolismo de la glucosa y los lípidos, la síntesis de proteínas y otras funciones fisiológicas importantes [151]. Por otro lado, la forma hexavalente de cromo y sus compuestos que contienen son carcinógenos pulmonares bien establecidos. La exposición crónica de las células epiteliales humanas normales es capaz de inducir la transformación de células malignas, la primera etapa de la carcinogénesis de metales [152].

Además, el estudio de los niveles de los elementos en tejido humano y particularmente en suero puede proporcionar información interesante acerca de los cambios ocurridos durante un proceso biológico involucrado en la progresión de enfermedades como es el CP. Por ello los cambios en la presencia de algunos elementos y el perfil de sus formas químicas pueden

reflejar el estado de la nutrición y el metabolismo humanos pudiendo ayudar a una posible predicción temprana del inicio y desarrollo del cáncer.

Existen dos puntos de vista diferentes para relacionar el comportamiento de los elementos en el organismo durante un proceso carcinogénico: la alteración de la forma química natural del elemento esencial en el metabolismo debido a la aparición y progresión del cáncer, y la consideración de los elementos involucrados en el proceso carcinogénico como consecuencia de su alta exposición.

La mayoría de los trabajos se centran en la estimación de un estado de deficiencia o exceso y, en menor medida, en los episodios de desequilibrio en los que el exceso de un elemento afecta a la función de otro. Sin embargo, la importancia de la forma química de los elementos en la biología es bien conocida. Los elementos pueden estar presentes principalmente como complejos lábiles o en complejos con ligandos de baja masa molecular, o en forma de metaloproteínas. Esta diferencia entre las especies de baja masa molecular (LMM) y alta masa molecular (HMM) es muy importante, ya que finalmente afecta a la actividad biológica o al potencial toxicológico del elemento y su movilidad a través de diferentes compartimentos biológicos.

3.2.2. Homeostasis de metales en cáncer de pulmón. Elementos químicos como posibles biomarcadores de la enfermedad.

Muchos autores han determinado las concentraciones de elementos esenciales y tóxicos en muestras biológicas de pacientes con CP, como suero [140,153–155], plasma [156,157], orina [158,159], líquido pleural [160] o pelo [154,156,161].

La mayoría de análisis elemental en estos biofluidos han sido realizados por técnicas de absorción atómica [162–166], de emisión de rayos X inducida por partículas [167], fluorescencia de rayos X de dispersión de energía [168], espectroscopia de emisión atómica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES) [154,158,159] o espectrometría de masas de plasma por acoplamiento inductivo (ICP-MS) [156,157,160–162]. Además, en esta Tesis Doctoral se describen por primera vez concentraciones de metales en fluido de lavado broncoalveolar de pacientes con CP empleando ICP-QQQ-MS [169].

La relación entre la exposición al metal y CP se ha estudiado en profundidad, especialmente en medicina y estudios ambientales. El uso de metales para el diagnóstico es más escaso, pero varios autores clasifican a los pacientes con CP y personas sanas utilizando el contenido de metales en tejidos tumorales [170,171], suero y cabello [154,161] y orina [159] porque encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la distribución normal de los elementos para el diagnóstico de CP.

En suero, la disminución de Zn y el incremento de Cu (alta proporción del ratio Cu/Zn) son los biomarcadores más comunes en CP [140,153,154,164–166,172]. La concentración de Cu [173] y la relación Cu:Zn [157,174] también se ha demostrado que aumenta en el plasma de los pacientes con esta enfermedad. La concentración de Cu está relacionada con el estado y la localización del cáncer y se encuentra principalmente en el suero (95% como parte de la enzima oxidativa ceruloplasmina y el resto se une libremente a la albúmina) [175]. Por otro lado, los niveles séricos generalmente bajos de Zn se correlacionan con los niveles altos de Zn en la autopsia tumoral, lo que sugiere que los requisitos metabólicos de este elemento por parte de las células CP se toman del suero [176]. Ren et al,

encontraron los niveles de Cu, Cr, P y Zn significativamente diferentes entre CP y personas sanas [154]. Lin et al [156], encontraron niveles más altos de Mn en el suero del grupo CP, pero hay resultados contradictorios [140,153].

Entre otros elementos, se han determinado concentraciones aumentadas de Ti, Ni y Cu, pero concentraciones reducidas de V, Cr, Mn, Fe, Co, Zn, Se y Br en suero de pacientes CP [153].

Por otro lado, las determinaciones de metales en líquido pleural (LP) de personas fumadores con CP revelaron concentraciones de Zn más bajas [160]. La ingesta adecuada de Zn se ha asociado a un menor riesgo de trastornos pulmonares obstructivos asociados al tabaquismo [177]. Además, los niveles bajos de Zn pueden dar lugar a niveles altos de glucosa en la LP de los fumadores con CP debido a una disminución del metabolismo de la glucosa [160].

En la orina, Tan et al, demostraron que el Fe, Mn y Al disminuyeron significativamente en pacientes con CP mientras que Se, Ni, Cu, Zn, Cd y Cr aumentaron [158,159]. Voyatzoglou et al [178] concluyeron que los personas con CP e hiperzincuria tenían una enfermedad más generalizada y una menor esperanza de vida en comparación con los pacientes con niveles normales de Zn.

Las concentraciones de algunos elementos también se ha determinado en pelo de pacientes CP demostrando que los niveles de Zn, Mg, Fe y Se fueron mayores, mientras que los niveles de Ca, Sn y Na fueron menores [161]. Otros autores también describieron que Al, B, Cr, P y Sr eran variables significativas para la clasificación entre CP y personas sanas [154].

El estudio de metales en tejidos tumorales de pacientes con CP mostró niveles disminuidos de Fe y Mn en tejido pulmonar maligno comparado con el tejido normal [170]. Otros autores encontraron que las concentraciones de P, Ti y Pb aumentaron en pacientes CP comparado con personas sanas, mientras que los niveles de Ca, Fe, Cu y Zn disminuyeron [171]. Otros autores informaron que los niveles de los elementos estudiados mostraron una tendencia a la acumulación en los tejidos cancerosos [173]. Además, varios autores encontraron diferencias entre las concentraciones de varios metales según el sexo [171] y la edad [179] en tejidos tumorales de pacientes con CP. La Tabla 5 resume los metales en diferentes muestras biológicas de pacientes con CP.

Tabla 5. Fold change de los metales alterados en diferentes muestras biológicas de pacientes con CP determinados por diferentes técnicas analíticas. N.C: No calculado.  $FC > 1$  (Concentración aumentada en CP),  $FC < 1$  (Concentración disminuida en CP).

Elemento	Muestra	FC (CP/C)	Técnica analítica	Referencia
Al	Líquido pleural	0.46	ICP-MS	[160]
	Pelo	0.15	ICP-AES	[154]
		1.45	ICP-MS	[161]
	Orina	0.86	ICP-AES	[158]
As	Líquido pleural	1.48	ICP-MS	[180]
	Plasma	0.91	ICP-MS	[156]
	Pelo	0.82	ICP-MS	[161]

(Continuación de Tabla 5).

Elemento	Muestra	FC (CP/C)	Técnica analítica	Referencia
Cd	Pelo	0.21	ICP-AES	[154]
		0.66	ICP-MS	[161]
	Orina	1.50	ICP-AES	[158]
Co	Líquido pleural	1.41	ICP-MS	[180]
	Pelo	0.58	ICP-AES	[154]
		7.99	ICP-MS	[161]
Cr	Líquido pleural	1.40	ICP-MS	[180]
	Suero	15.37	ICP-AES	[154]
	Pelo	N.C	ICP-AES	[154]
		2.67	ICP-MS	[161]
	Plasma	1.06	ICP-MS	[156]
	Orina	1.93	ICP-AES	[158]
Cu	Líquido pleural	0.93	ICP-MS	[180]
	Pelo	0.85	ICP-AES	[154]
		1.55	ICP-MS	[161]
	Orina	2.45	ICP-AES	[158]
	Plasma	1.25	ICP-MS	[156]
	Suero	1.20	AAS	[164]
		1.50	ICP-AES	[154]
		1.53	AAS	[166]
N.C		AAS	[165]	

(Continuación de Tabla 5).

Elemento	Muestra	FC (CP/C)	Técnica analítica	Referencia
Fe	Líquido pleural	0.71	ICP-MS	[180]
	Suero	1.09	ICP-AES	[154]
	Pelo	1.43	ICP-AES	[154]
		0.39	ICP-MS	[161]
	Plasma	0.88	ICP-MS	[156]
	Orina	1.00	ICP-AES	[158]
Mn	Líquido pleural	0.95	ICP-MS	[180]
	Pelo	2.23	ICP-AES	[154]
		1.59	ICP-MS	[161]
	Plasma	1.25	ICP-MS	[156]
	Orina	0.68	ICP-AES	[158]
Mo	Líquido pleural	1.17	ICP-MS	[180]
	Pelo	1.20	ICP-AES	[154]
Ni	Plasma	1.07	ICP-MS	[156]
	Pelo	0.26	ICP-AES	[154]
		1.94	ICP-MS	[161]
	Orina	2.83	ICP-AES	[158]
P	Pelo	0.87	ICP-AES	[154]
	Suero	0.89	ICP-AES	[154]

(Continuación de Tabla 5).

Elemento	Muestra	FC (CP/C)	Técnica analítica	Referencia
Pb	Líquido pleural	0.61	ICP-MS	[180]
	Plasma	1.14	ICP-MS	[156]
	Pelo	0.53	ICP-AES	[154]
		1.69	ICP-MS	[161]
		1.38	ICP-MS	[161]
Se	Plasma	0.90	ICP-MS	[156]
	Pelo	0.68	ICP-MS	[161]
	Orina	2.80	ICP-AES	[158]
V	Líquido pleural	0.61	ICP-MS	[180]
	Plasma	0.99	ICP-MS	[156]
	Pelo	1.75	ICP-MS	[161]
Zn	Líquido pleural	0.64	ICP-MS	[180]
	Pelo	0.88	ICP-AES	[154]
		0.48	ICP-MS	[161]
	Plasma	0.91	ICP-MS	[156]
	Orina	2.67	ICP-AES	[158]
	Suero	0.90	AAS	[164]
		N.C	AAS	[165]
		0.88	ICP-AES	[154]
0.87		AAS	[166]	

### 3.2.3. Metaloproteínas en el cáncer de pulmón.

La forma química de un elemento determina tanto su toxicidad como su actividad y movilidad a través de diferentes compartimentos biológicos. En este sentido, las metalobiomoléculas juegan un papel clave en la aparición y progresión de varias enfermedades, como es por ejemplo el CP y, por tanto, pueden utilizarse como biomarcadores de diagnóstico o pronóstico. Sin embargo, el diseño de terapias basadas en metaloproteínas es un área de investigación en desarrollo por lo que no hay muchos estudios al respecto [181]. Algunas metaloenzimas de zinc actúan como supresoras de tumores al reducir la proliferación celular, la migración y la invasión, y la inducción de apoptosis en líneas celulares humanas de glioblastoma [182,183]. Por otro lado, se ha demostrado la importancia de las metalotioneínas (MTs) en la formación de tumores, la progresión y la resistencia a fármacos [184]. Por esta razón, las MTs pueden llegar a ser posibles marcadores prometedores para el cáncer. Las MTs son proteínas de alto contenido en cisteína, involucradas en la homeostasis, más en concreto controlando la relación Cu/Zn [184] y la protección contra los metales pesados, el daño al ADN y el estrés oxidativo. Se conoce que existen diferentes isoformas de estas MTs en el pulmón determinadas por el análisis de la reacción en la cadena de polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) [185,186]. Además, concretamente en CP, se ha descrito la expresión descendente de las diferentes isoformas MT1A, MT2A, MT1E y MT1G [187].

Otros estudios han descrito los perfiles de metaloproteínas en plasma humano mediante el empleo de un sistema de fraccionamiento de flujo con un campo de flujo asimétrico acoplado a un plasma de acoplamiento inductivo con detector de masas (AF4-ICP-MS). Los resultados demostraron

diferencias en los perfiles de Mn, Ni, Cu Zn, I y Ba de pacientes con CP con respecto a sujetos control, identificando varias metaloproteínas mediante el acoplamiento de la nanocromatografía y la espectrometría de masas con trampa iónica con la fuente de ionización por electronebulización [157].

#### 3.2.4. La importancia de las selenoproteínas en el organismo.

Las alteraciones metabólicas producidas por el cáncer en las células tumorales producen un incremento del estrés oxidativo, es decir, un desequilibrio entre los antioxidantes y las especies reactivas de oxígeno (ROS) [188]. Aunque a bajas concentraciones los ROS juegan un papel fisiológico muy importante, a altos niveles pueden producir daños irreversibles, dando lugar a cambios oxidativos en lípidos, proteínas y ADN relacionados con el desarrollo de numerosas enfermedades incluyendo el cáncer [188]. Para evitar este daño, el cuerpo se protege mediante la activación de un sistema antioxidante de defensa que interacciona con los ROS para regular su producción. Sin embargo, si este mecanismo de defensa fuera superado por la producción de ROS, o no tuviera la suficiente suplementación antioxidante, el estrés oxidativo acaba ocurriendo [188].

El selenio es un micronutriente con capacidad antioxidante con funciones antimutagénicas, es decir, que previene la transformación de células normales en malignas. Este elemento puede presentarse en forma inorgánica, como metal ( $\text{Se}^0$ ), u oxoaniones como selenito ( $\text{SeO}(\text{OH})_2$ ) o selenato ( $\text{SeO}_2(\text{OH})_2$ ). También se encuentra en formas orgánicas como selenocisteína (SeCys) o selenometionina (SeMet), análogos de los aminoácidos cisteína y metionina, respectivamente [189]. Por otra parte las proteínas que contienen selenio en forma de SeCys se llaman selenoproteínas

y las que presentan selenio en forma orgánica , proteínas que contienen selenio [189].

Así pues, el efecto protector del selenio está relacionado principalmente con su presencia en enzimas que protegen el ADN y otros componentes celulares del daño oxidativo [190,191], como la glutatión peroxidasa o la tioredoxina reductasa.

En la actualidad, se han explicado algunos mecanismos relacionados con el efecto anticarcinogénico del selenio: la acción de las selenoenzimas para reducir el daño del ADN, el estrés oxidativo, la inflamación, la detoxificación, la mejora de la respuesta inmune, la inactivación de la proteína kinasa C, la alteración en la metilación del ADN y la inducción de las células cancerígenas a la apoptosis e inhibición de la angiogénesis [191,192].

Existe una familia de isoenzimas denominadas glutatión peroxidasas (GPx) que contienen selenio en forma de SeCys y que poseen funciones diferentes y específicas [193]:

- GPx-1: Esta proteína se localiza en el citoplasma, y tiene como función proteger la hemoglobina de los eritrocitos de las posibles rutas producidas por la oxidación.
- GPx-2: Se localiza en el citoplasma y el núcleo, y se expresa principalmente en el hígado y en el epitelio del tracto gastrointestinal. Su principal función es proteger a los mamíferos de los hidroperóxidos orgánicos tóxicos ingeridos.
- GPx-3 o eGPx: Esta selenoproteína es secretada en el plasma y se expresa en órganos como hígado, riñón o corazón. También se

encuentra en fluidos biológicos como plasma, suero o fluido cerebroespinal.

- GPx-4: Se trata de un fosfolípido hidroxidrolasa localizado en el citoplasma, núcleo y mitocondria cuya función es proteger las membranas celulares del daño oxidativo reduciendo los hidroxidros de fosfolípidos y colesterol a sus alcoholes correspondientes. GPX4 juega diferentes papeles en la señal de transducción, inflamación y apoptosis.
- GPx-5: Esta selenoproteína es expresada y secretada específicamente en el epidídimo (tracto reproductor masculino), y tiene la misma función que la GPX-3 constituyendo un sistema de protección contra el daño de los peróxidos en los lípidos de las membranas del esperma.
- Existen otras 3 isoenzimas de GPx (GPx-6, GPx-7 y GPx-8) cuyas funciones no se conocen por completo. GPx-6, es secretada y expresada en el epitelio olfativo, GPx-7 se localiza en el citoplasma y GPx-8 es una proteína de membrana.

Otra familia de selenoproteínas importante es la de tioredoxina reductasas (TrxR) cuya función principal es degradar hidroxidros [194]. Esta selenoproteína se encuentra involucrada en numerosos procesos biológicos como la síntesis del ADN, y la regulación de la apoptosis [194], y aunque TrxR cataliza principalmente la reducción de tioredoxina, en humanos también pueden reducir otros sustratos, como la vitamina C. Las tres isoenzimas TrxR humanas contienen el residuo de SeCys en su C-terminal, y son: TrxR-1 citosólica, TrxR-2 mitocondrial y TrxR-3 una enzima glutatión/tioredoxina reductasa específica de los testículos.

La selenoproteína P (SELENOP) es una selenoenzima que se expresa en numerosos tejidos, produciéndose en el hígado y siendo secretada en el plasma. Por ello, representa la forma más grande de selenio en el plasma y además está involucrada en el transporte del elemento (Figura 21) [195,196]. Entre las funciones más relevantes de esta proteína pueden mencionarse la capacidad de reducir peroxinitritos e hidroperóxidos de fosfolípidos [197,198] y de formar complejos de mercurio y cadmio [199]. Además, SELENOP también presenta carácter protector de los astrocitos humanos y células endoteliales del daño oxidativo [200].

Finalmente, la selenoalbúmina (SeAlb), aunque no se define como selenoproteína en sí misma, debido a que no presenta residuos de SeCys en su estructura, sino que contiene el elemento, se ha convertido en una proteína de gran importancia en el metabolismo debido a su importante papel en el transporte de selenio al hígado para llevar a cabo la síntesis de SELENOP.

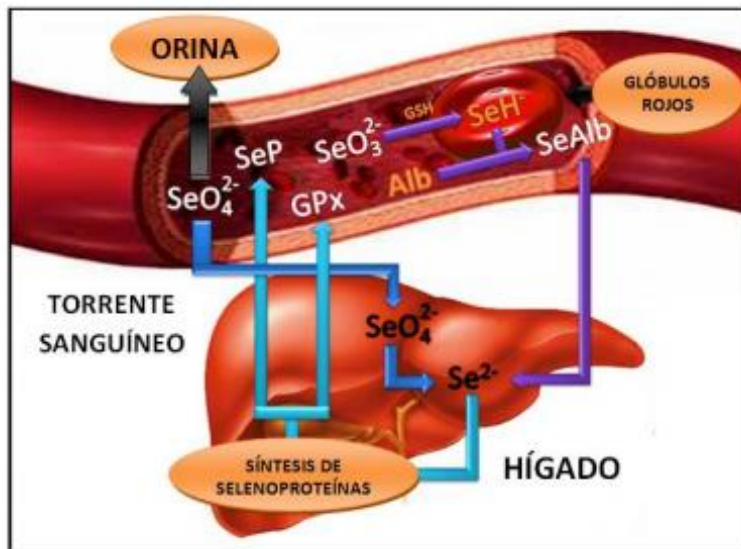


Figura 21. Transporte de selenio en el torrente sanguíneo y otros órganos.

### 3.2.5. Selenoproteínas y el cáncer.

Estudios genéticos afirman una conexión entre el riesgo de padecer cáncer y la alteración en la expresión de selenoproteínas en tejidos [201]. Por ejemplo, Ratnasinghe et al, asociaron un incremento del CP al encuentro de una variante de un alelo del gen de GPx-1 causado por un polimorfismo nucleótido en el codón 198 [202]. Estudios similares demostraron una reducción significativa en la regulación en los niveles de mRNA de SELENOP en tejidos de pacientes con cáncer de colon y próstata [203,204]. Murawaki et al, demostraron que durante la progresión del cáncer de colon, disminuye la expresión de GPx-1, GPx-3 y SELENOP, mientras que la expresión de GPx-2 incrementa [205]. Por otra parte, la inhibición de TrxR-1 también es característica para varios tipos de cáncer [206]. El papel anticarcinogénico de GPx-1, GPx-4 y SELENOP parece recaer en su función de degradación de peróxidos. Existen estudios que muestran una disminución de la actividad de GPx en carcinoma hepatocelular comparado con tejido normal adyacente [207]. Esta reducción puede ser debida a la intensificación de la peroxidación lipídica y el incremento de los productos finales de la peroxidación como el malondialdehído

Así pues, debido a que las modificaciones oxidativas causadas por el daño genotóxico son una característica para el desarrollo del cáncer, el selenio puede considerarse como anticancerígeno por su capacidad de detoxificación de radicales libres a través de las selenoproteínas.

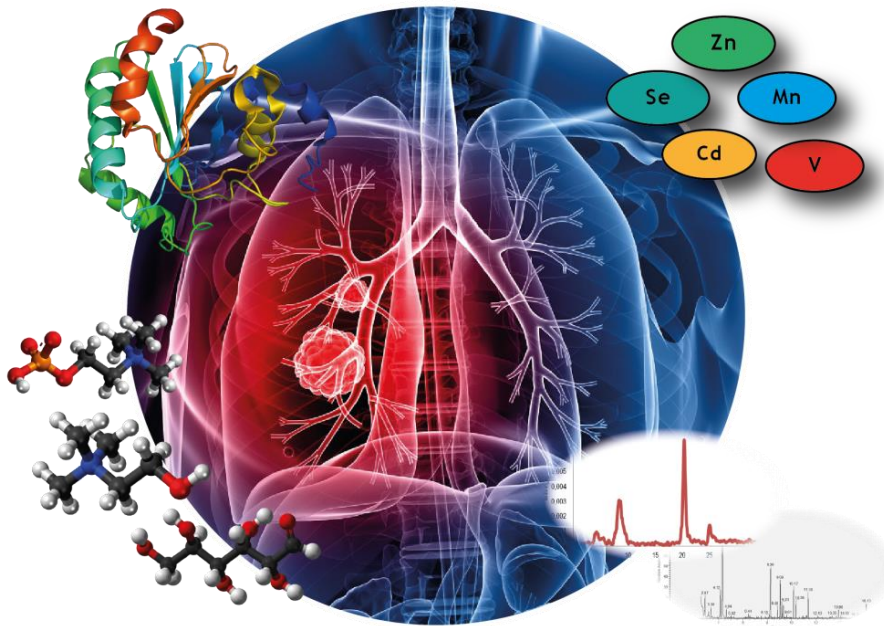
#### 3.2.5.1. Suplemento de selenio como agente quimiopreventivo.

El selenio es un nutriente esencial con potencial anticarcinogénico, sobre todo cuando es suplementado en la dieta. Las principales formas de

selenio en suplementación son SeMet y SeCys. En dosis bajas, el selenio funciona como componente de SeCys en selenoproteínas específicas promoviendo la proliferación celular, importante para la respuesta inmune. En altas dosis, pero no tóxicas, el selenio puede reducir el riesgo de padecer cáncer, bloqueando el ciclo de células tumorales, estimulando su apoptosis e inhibiendo la migración e invasión de las mismas [206]. Algunos investigadores recomiendan el selenio en la nutrición de profilaxis cancerígena a dosis de 50 a 100  $\mu\text{g}$  de Se/día. También lo recomiendan como suplemento a la quimioterapia en el tratamiento del cáncer a dosis de 200  $\mu\text{g}$  de Se/día [208,209]. Otros estudios relacionados con la suplementación de selenio y la expresión de GPx en diferentes líneas celulares de CP concluyeron que la completa expresión de las selenoproteínas GPx-1 y GPx-4 de estas líneas celulares requería la presencia de al menos 100 nM de selenio, aunque el efecto era diferente según la línea celular y la selenoproteína estudiada [208,209]. Sin embargo, no se puede demostrar a ciencia cierta la función quimiopreventiva del selenio y de las selenoproteínas ya que es un campo poco profundizado y en desarrollo.



# OBJETIVOS





## OBJETIVOS.

Debido a la dificultad de diagnóstico precoz del cáncer de pulmón por su carácter asintomático en estadios tempranos y al aumento de la probabilidad de supervivencia cuando la enfermedad no se encuentra en estados muy avanzados, la búsqueda e identificación de nuevos biomarcadores de diagnóstico precoz es de gran interés en medicina. Además también es importante el estudio de biomoléculas que permitan el seguimiento del avance de la enfermedad. En este sentido, las técnicas metabolómicas, metalómicas y ionómicas, representan una herramienta muy útil para la identificación de moléculas alteradas en la enfermedad, que pudieran servir como posibles biomarcadores de diagnóstico.

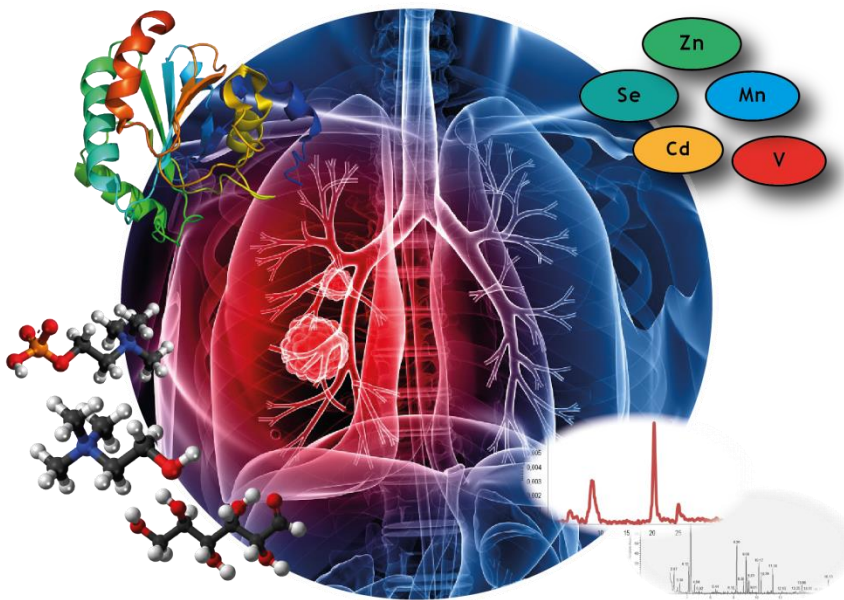
Así pues, el principal objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido la determinación e identificación de moléculas y elementos alterados en el cáncer de pulmón empleando tanto técnicas ionómicas, metalómicas y metabolómicas, así como el estudio de la evolución de la enfermedad. De este modo, los objetivos específicos de este trabajo se enumeran a continuación:

1. Análisis metabolómico en suero, orina y lavado broncoalveolar de pacientes con cáncer de pulmón. (*Capítulo 1*).
2. Evaluación metabolómica en la progresión del cáncer de pulmón. (*Capítulo 2*).
  - 2.1. Estudio por estadios.
  - 2.2. Comparación con enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
3. Estudio de la dishomeostasis de metales en suero, orina y lavado broncoalveolar de pacientes con cáncer de pulmón. (*Capítulo 3*).
4. Análisis de selenoproteínas en suero de pacientes con cáncer de pulmón. Importancia del selenio en el cáncer. (*Capítulo 4*).

Para alcanzar estos objetivos se desarrollaron metodologías analíticas complementarias basadas en la espectrometría de masas para llevar a cabo los análisis metabólicas y metalómicas en muestras biológicas humanas (suero, orina y lavado broncoalveolar).

- Desarrollo de plataformas metabólicas basadas en la infusión directa de la muestra a un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolar-tiempo de vuelo (DI-ESI-QTOF-MS).
- Desarrollo de plataformas metabólicas basadas en el acoplamiento de la cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS).
- Desarrollo de un método metalómico basado en la separación de las metalo-especies en la fracción de alto peso molecular (HMM) y en la fracción de bajo peso molecular (LMM) basado en el análisis por ICP-QQQ-MS.
- Desarrollo de un procedimiento metalómico basado en la técnica de la dilución isotópica de especies inespecíficas para la determinación de selenoproteínas en suero (IDA-SEC-AF-ICP-QQQ-MS).

# PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES





## PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.

### 4. Población de estudio.

Para la búsqueda de posibles biomarcadores del CP, así como de metabolitos, metales y metalo-especies específicas de selenio, se estudiaron tres poblaciones:

- **Pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón:** muestras de suero sanguíneo, de orina y de lavado broncoalveolar.
- **Pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC):** muestras de suero sanguíneo.
- **Pacientes con enfermedades pulmonares no cancerosas (EPNC) (Hemoptisis, enfermedad pulmonar intersticial difusa, contusión pulmonar):** muestras de suero sanguíneo, de orina y de lavado broncoalveolar.
- **Pacientes control:** muestras de suero sanguíneo, de orina y de lavado broncoalveolar.

La población utilizada en estos estudios está compuesta por pacientes residentes en la provincia de Huelva, reclutados por el Área de Neumología del Hospital de Juan Ramón Jiménez (Huelva, Andalucía, España) durante el periodo comprendido entre julio de 2011 y marzo de 2017. El primer grupo de estudio está formado por pacientes con enfermedad neoplásica de origen pulmonar diagnosticados mediante técnicas convencionales (fibrobroncoscopia y análisis anatómico-patológico de las muestras obtenidas).

El grupo control, estuvo compuesto por personas sanas (sin patología pulmonar conocida ni historia oncológica previa), evaluados en el citado hospital por otras causas. Asimismo, los dos grupos restantes pertenecieron a

pacientes con enfermedades pulmonares no cancerosas (ENC), incluyendo la EPOC, diagnosticados al igual que los pacientes de CP por técnicas como la broncoscopia y análisis anatómico-patológico de las muestras obtenidas. Cabe destacar que para cada estudio la distribución de grupos fue diferente debido principalmente a la disponibilidad de la cantidad de muestra en ese periodo concreto. Las siguientes tablas muestran características clínicas de todos los pacientes que participaron en cada estudio. Las tablas 6a y 6b resumen las características clínicas de los pacientes del estudio metabólico por la metodología GC-MS.

Tabla 6a. Características clínicas de los pacientes del estudio metabólico realizado por la metodología GC-MS (Capítulo 1). Muestras de suero y orina.

SUERO Y ORINA	CP (n=32)	C(n=29)
Sexo (H/M)	28/8	18/11
Edad (años)	66 ± 12	56 ± 13
Histología		
CPNCP	26	-
CPCP	6	-
Hábito tabáquico		
Fumadores	7	0
Ex fumadores	20	16
No fumadores	3	13
Comorbilidades		
HTA(%)	59	48
Asma (%)	6	0
DM (%)	25	28

H: hombre, M: mujer, CPNCP: cáncer de pulmón de células no pequeñas, CPCP: cáncer de pulmón de células pequeñas, HTA: hipertensión arterial, DM: diabetes mellitus.

Tabla 6b. Características clínicas de los pacientes del estudio metabólico realizado por la metodología GC-MS (Capítulo 1). Muestras de LBA.

LBA	CP (n=24)	EPNC(n=30)
Sexo (H/M)	16/8	25/5
Edad (años)	65± 12	55 ± 15
<b>Histología</b>		
CPNCP	21	-
CPCP	3	-
EPID	-	17
Hemoptisis	-	9
Bronquiectasias	-	4
<b>Hábito tabáquico</b>		
Fumadores	4	11
Ex fumadores	20	16
No fumadores	-	3
<b>Comorbilidades</b>		
HTA(%)	79	33
Asma (%)	8	3
DM (%)	33	17

H: hombre, M: mujer, CPNCP: cáncer de pulmón de células no pequeñas, CPCP: cáncer de pulmón de células pequeñas, EPID: Enfermedad pulmonar difusa, HTA: hipertensión arterial, DM: diabetes mellitus.

Las características de los pacientes de CP y EPOC del estudio metabólico en suero por DI-ESI-QTOF-MS, así como el análisis por estadios se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Características clínicas de los pacientes del estudio metabólico realizado por la metodología DI-ESI-QTOF-MS (Capítulo 2). Muestras de suero.

Características	CP (n=30)	C (n=30)	EPOC (n=30)
Edad (años)	67 ± 12	56 ± 14	66 ± 9
Sexo (H/M)	25/5	14/16	25/5
Histología			
CPNCP	26	-	-
CPCP	4	-	-
Estadios			
II	8	-	-
III	8	-	-
IV	14	-	-
Bronquitis crónica	-	-	12
Enfisema pulmonar	-	-	18
Hábito tabáquico			
Fumadores	10	1	7
Ex fumadores	17	18	20
No fumadores	3	11	3
Comorbilidades			
HTA(%)	60	49	50
Asma (%)	4	0	2
DM (%)	27	18	18

H: hombre, M: mujer, CPNCP: cáncer de pulmón de células no pequeñas, CPCP: cáncer de pulmón de células pequeñas, HTA: hipertensión arterial, DM: diabetes mellitus.

La Tabla 8 muestra las características de los pacientes del estudio multielemental incluyendo las fracciones HMM y LMM de suero por ICP-QQQ-MS.

Tabla 8a. Características clínicas de los pacientes del estudio metalómico realizado por ICP-QQQ-MS (Capítulo 3). Muestras de suero y orina

Muestras	Características	CP	C
	Nº de muestras	n=48	n=39
	Edad (años)	65 ± 11	58 ± 14
	Sexo (H/M)	39/9	17/22
	Histología		
	CPNCP	42	-
	CPCP	6	-
SUERO Y ORINA	Hábito tabáquico		
	Fumadores	11	0
	Ex-fumadores	32	22
	No fumadores	5	17
	Comorbilidades		
	HTA (%)	59	48
	Asma (%)	6	0
	DM (%)	25	28

H: hombre, M: mujer, CPNCP: cáncer de pulmón de células no pequeñas, CPCP: cáncer de pulmón de células pequeñas, HTA: hipertensión arterial, DM: diabetes mellitus.

Tabla 8b. Características clínicas de los pacientes del estudio metalómico realizado por ICP-QQQ-MS (Capítulo 3). Muestras de suero y orina.

Muestras	Características	CP	EPNC
	Nº de muestras	n=24	n=31
	Edad (años)	65 ± 13	54 ± 14
	Sexo (H/M)	20/4	27/4
	Histología		
	CPNCP	22	-
	CPCP	2	-
	EPID	-	11
	Hemoptisis	-	5
	Bronquiestasias	-	5
LBA	NPS	-	3
	Otros*	-	7
	Hábito tabáquico		
	Fumadores	4	11
	Ex-fumadores	20	16
	No fumadores	-	3
	Comorbilidades		
	HTA (%)	79	33
	Asma (%)	8	3
	DM (%)	33	17

H: hombre, M: mujer, CPNCP: cáncer de pulmón de células no pequeñas, CPCP: cáncer de pulmón de células pequeñas, EPID: enfermedad pulmonar no difusa, NPS: nódulo pulmonar solitario, HTA: hipertensión arterial, DM: diabetes mellitus. \*Contusión pulmonar.

Finalmente, para el estudio de selenoproteínas por IDA-SEC-AF-ICP-QQQ-MS se utilizaron muestras de suero correspondientes a pacientes con CP y a pacientes sanos cuyas características clínicas se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Características clínicas de los pacientes del estudio metalómico realizado por la metodología IDA-SEC-AF-ICP-QQQ-MS (Capítulo 4). Muestras de suero.

Muestras	Características	CP	C
	Nº de muestras	n=48	n=39
	Edad (años)	64 ± 10	58 ± 13
	Sexo (H/M)	38/10	18/21
	Histología		
	CPNCP	42	-
	CPCP	6	-
	Hábito tabáquico		
SUERO	Fumadores	12	0
	Ex-fumadores	31	23
	No fumadores	5	16
	Comorbilidades		
	HTA (%)	58	49
	Asma (%)	5	0
	DM (%)	23	27

H: hombre, M: mujer, CPNCP: cáncer de pulmón de células no pequeñas, CPCP: cáncer de pulmón de células pequeñas, HTA: hipertensión arterial, DM: diabetes mellitus.

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción venosa de la región antecubital, después de 8 horas, y se recolectaron en tubos BD Vacutainer SST II con separador de gel y sistema de vacío Advance. Las muestras se enfriaron inmediatamente y se protegieron de la luz durante 30 minutos para permitir la retracción del coágulo. Junto a la extracción sanguínea se recogieron muestras de orina de los diferentes pacientes. Del mismo modo, las muestras de lavado broncoalveolar (LBA) fueron obtenidas mediante broncoscopia. Debido al carácter invasivo de la técnica utilizada para obtener el LBA, no fue posible obtener muestras de personas sanas. Después de la centrifugación (2057 g durante 10 minutos) de los tres tipos de muestra se dividieron alícuotas de suero, orina y LBA en tubos Eppendorf y se congelaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Además, se recogieron datos clínicos de los pacientes para realizar su clasificación en un grupo concreto, así como para tener en cuentas las posibles comorbilidades que puedan afectar en el estudio.

El trabajo se realizó de acuerdo con los principios contenidos en la Declaración de Helsinki y aprobado por el Comité Ético del Hospital Juan Ramón Jiménez.

## **5. Procedimientos experimentales empleados en el estudio.**

5.1. Plataforma metabolómica basadas en espectrometría de masas orgánica.

5.1.1. Análisis de suero sanguíneo y LBA mediante DI-ESI-QTOF-MS.

El tratamiento de muestras de suero para análisis metabolómico por DI-ESI-QTOF-MS se llevó a cabo mediante una extracción secuencial en dos etapas. La primera etapa de extracción consistió en la adición de 400  $\mu\text{l}$  de una mezcla MeOH:EtOH (1:1 v/v) a 100  $\mu\text{l}$  de suero con el fin de provocar la precipitación de proteínas. Las muestras se agitaron en un vórtex durante 5

minutos y se centrifugaron a 2057 g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante resultante se recogió y se llevó a sequedad mediante un concentrador a vacío SAVANT SPD111V SpeedVac Concentrator, Thermo Fisher™. Seguidamente se reconstituyó con 100 µl de MeOH:H<sub>2</sub>O (8:2 v/v) y se acidificó con 0,1% (v/v) de ácido fórmico antes de su análisis. El precipitado aislado se sometió a una extracción adicional basada en la adición de 400 µl de una mezcla CHCl<sub>3</sub>:MeOH (1:1 v/v) seguida de agitación durante 5 minutos. El extracto obtenido se centrifugó a 12857 g, a 4°C, durante 10 minutos y se llevó a sequedad a través de una corriente de nitrógeno. Finalmente se reconstituyó con 100 µl de una mezcla Cl<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH (6:4 v/v) que contenía 10 mM de formiato de amonio.

El tratamiento de muestra para la extracción de metabolitos en LBA se basó en el método propuesto por Charles R. Evans et al, [210] con algunas modificaciones, que consistió en la adición de 400 µl de mezcla de MeOH:CHCl<sub>3</sub> 9:1 (v/v) a 100 µl de LBA. La mezcla se agitó durante 5 minutos en un vórtex y se centrifugó a 15,000 g durante 10 min. Finalmente, al sobrenadante resultante se añadieron 10 µl de 0,1 % (v/v) de ácido fórmico para favorecer la ionización de las moléculas.

Los experimentos DI-ESI-QQQ-TOF-MS se realizaron en un sistema híbrido QSTAR XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.), utilizando una fuente de ionización por electrospray (ESI). Las muestras se introdujeron en el espectrómetro de masas a una velocidad de flujo de 5 ml min<sup>-1</sup> mediante una bomba de infusión integrada con una jeringa Hamilton de 1 ml de volumen. Los datos se obtuvieron en modos de ionización positiva y negativa, adquiriendo espectros de barrido completo durante 0,2 min en el rango m/z 50 a 1100 amu. Para la ionización positiva el voltaje (IS) se ajustó a

3300 V, mientras que para el modo negativo se fijó a -4000 V. Se utilizó nitrógeno de alta pureza como gas de nebulización y cortina, a velocidades de flujo de aproximadamente 1.13 l min<sup>-1</sup> y 1.56 l min<sup>-1</sup>, respectivamente. La temperatura de la fuente se fijó a 60 °C para ambos modos de ionización. Para el modo positivo el potencial de desintegración (DP) se fijó a 60 V y el potencial de enfoque (FP) a 250 V. En el caso del modo de ionización negativa los parámetros fueron DP: -100 V y FP: -250 V. La energía iónica (IE) se fijó a 2.0 V en modo positivo y -2.0 V en el caso de modo negativo. Para adquirir los espectros MS/MS, se utilizó nitrógeno como gas de colisión.

#### 5.1.2. Análisis de suero sanguíneo, orina y LBA mediante GC-MS.

La extracción de las muestras de suero para el análisis metabolómico por GC-MS fue la misma que la empleada la primera etapa de extracción del procedimiento descrito en el apartado anterior (Sección 5.1.1. “Análisis de suero sanguíneo y LBA mediante DI-ESI-QTOF-MS”). Antes de la extracción de metabolitos, se añadieron 10µl de ureasa de *Canavalia ensiformis* (Jack bean) Tipo IX (1 mg l<sup>-1</sup>) a la orina para degradar la urea. La mezcla se incubó a 37 °C durante 10 min. La extracción de metabolitos consistió en la adición de 200 µl de MeOH a 50 µl de muestra, con posterior agitación para la completa homogeneidad del extracto. Las muestras se llevaron a sequedad empleando el sistema de sequedad a vacío SAVANT SPD111V SpeedVac Concentrator, Thermo Fisher, en las mismas condiciones que las muestras de suero. Las muestras de LBA fueron preconcentradas utilizando el mismo sistema de sequedad SAVANT SPD111V SpeedVac Concentrator, Thermo Fisher.

Finalmente, para el análisis por GC-MS, los tres tipos de extractos (suero, orina y LBA) se reconstituyeron con agentes derivatizantes. Para la

protección de los grupos carbonilo por metoximación, los extractos se resuspendieron en 50  $\mu\text{l}$  de 20  $\text{mg mL}^{-1}$  de metoxiamina en piridina, y se incubaron a 80°C durante 15 minutos en un baño termostatzado. Posteriormente, se realizó la reacción de sililación mediante la adición de 50  $\mu\text{l}$  de trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) y la incubación a 80 °C durante 15 min. Finalmente, los extractos se centrifugaron a 2057 g durante 5 minutos y el sobrenadante se recogió para su análisis.

La separación cromatográfica se realizó en un cromatógrafo de gases UltraTrace GC-MS acoplado a un detector de espectrometría de masas con trampa de iones ITQ900 (Thermo Fisher Scientific), utilizando una columna VF-5MS Factor Four capillary 30 mx 0,25 mm ID, con 0,25 mm de diámetro (Varian). La temperatura de la columna GC se ajustó a 100 °C durante 0,5 minutos y se programó para alcanzar los 320°C a una velocidad de 15°C por minuto. Finalmente, esta temperatura se mantuvo durante otros 7 min, siendo el tiempo total de análisis 22.17 min. La temperatura del inyector se mantuvo a 280 °C y se utilizó helio como gas portador, a una velocidad de flujo constante de 1  $\text{ml min}^{-1}$ . Para la detección por espectrometría de masas, la ionización se llevó a cabo mediante impacto electrónico (EI) con un voltaje de 70 eV, en el rango de  $m/z$  35–650 uma, con una temperatura de la fuente fijada en 200° C. Se inyectó un 1 $\mu\text{l}$  de muestra en modo sin división (splitless).

### 5.1.3. Procesamiento de los datos.

- Perfiles de DI-ESI-QTOF-MS.

Los datos en bruto del análisis por DI-ESI-QTOF-MS se exportaron en formato .wif directamente del programa informático del sistema QSTAR XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.). Estos archivos fueron

importados al software Markerview™ (Applied Biosystems) con el fin de reducir valores de  $m/z$  e intensidades con menos importancia, para la construcción de una matriz de datos bidimensional ( $m/z$  vs intensidad). Para este propósito, se aplicó un filtro de 100 cuentas de intensidad y se realizó la prueba  $t$ -Student para eliminar las variables no significativas del conjunto de datos. Además, los resultados fueron normalización utilizando la suma total del área para corregir posibles desviaciones instrumentales.

- Perfiles de GC-MS.

Los cromatogramas resultantes del análisis metabolómico por GC-MS se procesaron siguiendo el procedimiento descrito por Katajamaa y Oresic [211] basado en la aplicación de diferentes etapas a los datos, incluyendo la detección de variables, la alineación de picos y la normalización. Para este propósito se utilizó el software de libre acceso XCMS incluido en la plataforma R (<http://www.r-project.org>). En primer lugar, los archivos en bruto se transformaron en formato netCDF empleando la herramienta Thermo File Converter (ThermoFisher Scientific) y posteriormente se procesaron siguiendo el método matchfilter, basado en un algoritmo que divide los perfiles metabolómicos en diferentes cromatogramas de iones extraídos (XIC) empleando un ancho de  $m/z$  constante (0.1 Da). Seguidamente cada división del cromatograma se filtra utilizando la segunda derivada de la función Gaussiana como modelo de forma de pico. Además para extraer la máxima información posible los parámetros de XCMS fueron optimizados. En este sentido, se ajustó el valor de umbral de ruido a S/N (signal to noise) a 2 y el ancho total a la mitad de la altura del pico (fwhm, fullwidth at half-maximum) a 3. Después de la extracción completa, se realizaron correcciones tanto en la agrupación de picos como en su tiempo de retención (alineación)

empleando tres ciclos iterativos con ancho de banda descendente (bw) de 5 a 1 s. Finalmente, se llevó a cabo la normalización de los datos utilizando el método de normalización LOESS “locally weighted scatterplot smoothing”, que corrige la variabilidad intermuestral aproximando a cero las diferencias en las intensidades de los picos entre muestras distintas. Los datos pre-procesados fueron exportados a archivo .csv para el posterior análisis estadístico mediante procedimientos multivariantes.

## 5.2. Plataforma metalómica basada en espectrometría de masas inorgánica.

### 5.2.1. Análisis multielemental de suero, orina y lavado broncoalveolar mediante ICP-QQQ-MS.

El tratamiento de las muestras de suero, orina y LBA para la determinación multielemental consistió en una dilución de 1 ml de las mismas con agua ultrapura teniendo en cuenta la relación muestra:disolvente 1:5 (v/v). Además, a estas disoluciones se le añadieron 100  $\mu\text{g l}^{-1}$  de Rh como patrón interno.

El análisis se llevó a cabo utilizando un plasma de acoplamiento inductivo acoplado a espectrómetro de masas equipado con un triple cuadrupolo, ICP-QQQ-MS (Agilent 8800 Triple Quad, Agilent Technologies, Tokio, Japón). Las condiciones instrumentales se optimizaron utilizando una disolución acuosa de sintonización que contenía 1  $\text{mg l}^{-1}$  de Li, Co, Y y Tl, y conos de muestreo y skimmer de níquel. Otros parámetros optimizados fueron el *forward power* (1550 W), la distancia de la antorcha a la interfase (10mm) y los caudales de los diferentes gases empleados: 15  $\text{l min}^{-1}$  para gas de plasma y 1,08  $\text{l min}^{-1}$  para gas portador. Para analizar la mayor parte de los elementos se utilizó un flujo de helio de 4.5  $\text{ml min}^{-1}$  con una pureza de 99,999 %. Para el análisis de selenio, se utilizó un flujo de 2  $\text{ml min}^{-1}$  de  $\text{H}_2$

(pureza>95%) con 40% de O<sub>2</sub> (pureza>99,999%) en modo MS/MS. Los isótopos monitorizados fueron <sup>51</sup>V, <sup>53</sup>Cr, <sup>55</sup>Mn, <sup>57</sup>Fe, <sup>63</sup>Cu, <sup>64</sup>Zn, <sup>65</sup>Cu, <sup>66</sup>Zn, <sup>78</sup>Se, <sup>80</sup>Se, <sup>95</sup>Mo, <sup>98</sup>Mo, <sup>103</sup>Rh, <sup>112</sup>Cd, <sup>114</sup>Cd y <sup>208</sup>Pb con un *dwell time* de 0,3 s por isótopo.

Además para la validación del método analítico se analizaron materiales de referencia de suero (Clinchek, Serum control lyophilized for trace elements, level II, RECIPE) y de orina (Clinchek, Urine control lyophilized for trace elements, level II, RECIPE) y se realizaron análisis de repetitividad.

5.2.2. Determinación de elementos en la fracción de alto y bajo peso molecular en muestras de suero (HMM, LMM) mediante precipitación no desnaturizante e ICP-QQQ-MS.

El fraccionamiento de las muestras de suero en fracción de alta masa molecular (HMM) y de baja masa molecular (LMM) se basó en la precipitación de proteínas en condiciones no desnaturizantes. Para ello, se añadieron 600 µl de acetona fría (20°C) a 300 µl de suero manteniéndose durante 10 min en un baño de hielo. La mezcla se agitó en un vórtex y se sometió a centrifugación (12 857 g, 4 °C, 5 min) para separar el sobrenadante del pellet resultante. El sobrenadante, que contiene especies de LMM se llevó a sequedad bajo una corriente de nitrógeno y se reconstituyó en 1 ml de agua ultrapura con 100 µg l<sup>-1</sup> de Rh como patrón interno. Por otro lado, el precipitado se sometió a digestión ácida asistida por microondas para la determinación de metales contenidos en la fracción HMM. El precipitado se introdujo en un recipiente de microondas junto con 500 µl de una mezcla HNO<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4:1, v/v). La mineralización se llevó a cabo en un horno microondas MARS (CEM Matthews, NC, EUA) a 400 W, incrementando la

temperatura a 150 °C en 10 min. Tras la digestión, los extractos se diluyeron a 3 ml con agua ultrapura que contenía 100 µg l<sup>-1</sup> de Rh.

Antes del análisis por ICP-QQQ-MS las muestras se filtraron utilizando filtros de PTFE de 0,45 µm. La separación de la fracción HMM y LMM solo pudo realizarse en las muestras de suero, ya que las muestras de orina y LBA no presentaron precipitación con la adición de disolventes orgánicos. Para garantizar la integridad del enlace metal-proteína, la metodología se validó mediante el análisis de una disolución patrón de albúmina de suero bovino que contenía Cu y Zn, empleando el mismo fraccionamiento que a las muestras de suero.

### 5.2.3. Determinación de selenoproteínas en suero sanguíneo mediante IDA-SEC-AP-ICP-QQQ-MS.

El tratamiento de muestras de suero para la determinación de selenoproteínas solo consistió en el filtrado de las mismas a través de filtros de PVDF (polidifluoruro de vinilideno) de 20 mm de diámetro y 0.2µm de tamaño de poro, con el fin de evitar la obstrucción o sobrecarga de columnas. La separación de los selenometabolitos y de las selenoproteínas se realizó mediante el acoplamiento de columnas de cromatografía de exclusión (SEC) y cromatografía de afinidad (AF) haciendo uso de una válvula de conmutación de seis vías, según el esquema que se muestra en la Figura 22.

Las selenoproteínas a separar fueron eGPx, SELENOP y SeAlb. Además el uso de dos columnas SEC en serie permitió aumentar el poder de resolución para separar el pico cromatográfico correspondiente a las especies de selenio de bajo peso molecular.

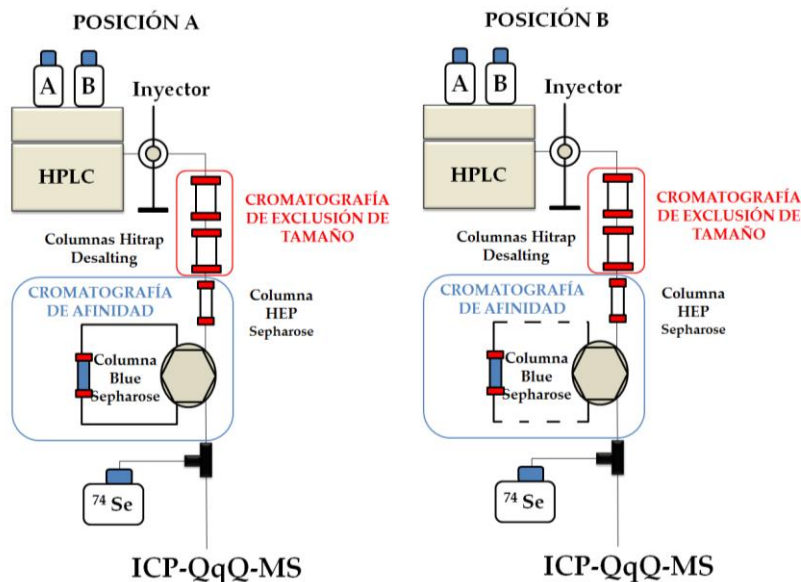


Figura 22. Diagrama esquemático del acoplamiento IDA-SEC-AF-ICP-QQQ-MS para la especiación selenoproteínas en muestras suero humano.

De forma detallada, el acoplamiento SEC-AF-ICP-QqQ-MS (Figura 20) consistió en la conexión en serie de 2 columnas de exclusión de tamaño HiTrap® Desalting (GE Healthcare, Sigma Aldrich, Germany) de 5 ml a una columna de afinidad de 1 ml de heparina sefarosa (HiTrap® Heparine High Performance, GE Healthcare, Sigma Aldrich, Germany) y a una columna de azul sefarosa de 1 ml (HiTrap® Blue High Performance, GE Healthcare, Sigma Aldrich, Germany) esta última en el bucle de una válvula de conmutación de seis vías. La columna SEC HiTrap Desalting se usa normalmente para eliminar componentes de baja masa molecular (MW <1000 Da) de moléculas de alta masa molecular, tales como ADN, proteínas o péptidos (MW > 5000 Da). Por otro lado, la columna HEP-HP es capaz de retener selectivamente SELENOP mientras que la columna BLUE-HP retiene tanto SELENOP como SeAlb [212–214]. Finalmente, se conecta la salida de la

unidad cromatográfica con una pieza en forma de T y esta con la entrada del nebulizador del ICP-QQQ-MS a través de un tubo de PEEK de 30cm (0,6 mm de diámetro interno).

La cuantificación absoluta de selenoproteínas se llevó a cabo mediante análisis de dilución isotópica de “especies no específicas” mediante la introducción directa y post-columna de un flujo de 0.1 ml min<sup>-1</sup> de una disolución de 5 ng·g<sup>-1</sup> de <sup>74</sup>Se a través del conector T al ICP-QQQ-MS. La elución de las proteínas se basó en el aumento de la fuerza iónica de la fase móvil, a través de un gradiente de menor a mayor concentración, pasando de la fase móvil A (0.05 M de AcNH<sub>4</sub>, pH=7.4) a la B (1.5 M de AcNH<sub>4</sub>, pH=7.4). El volumen de inyección de muestra fue de 100 µl y el flujo de elución de las proteínas de 1.3 ml min<sup>-1</sup> siguiendo el programa cromatográfico y el cambio de posición de las válvulas que se detallan en la Tabla 10. Las posiciones A y B se describen a continuación.

Tabla 10. Condiciones operacionales del análisis IDA-SEC-AF-ICP-QqQ-MS.

<b>Programa cromatográfico</b>	
<b>Tiempo (min)</b>	<b>Fase móvil</b>
0-12	100 % de A
12-35	100 % de B
35-40	100% de A
<b>Posición de válvulas</b>	
<b>Tiempo (min)</b>	<b>Posición</b>
0	A: Inyección (1 → 2)
19	B: Carga (1 → 6)
24	A: Inyección (1 → 2)

Posición A. La muestra es transportada por la fase móvil A y pasa por las diversas columnas, quedando retenidas las selenoproteínas, que posteriormente eluyen de forma diferencial. Con la fase móvil A eluye eGPx (Tr= 4,5 min), que no queda retenida en las columnas de afinidad y los selenometabolitos a Tr= 8,5 min que se separan gracias a la segunda unidad de SEC. SELENOP queda retenida en la columna heparina-sefarosa eluyendo con fase móvil B a los 21 minutos. En esta posición, la fase móvil B no pasa por la columna de azul-sefarosa, no produciéndose la elución de la SeAlb.

Posición B. En esta posición, la fase móvil B pasa por la columna de afinidad de azul-sefarosa, eluyendo SeAlb a Tr=26 minutos. Tras la elución de todas las selenoproteínas se pasa la fase móvil A a través del sistema durante 10 min, para equilibrarlo antes de la siguiente inyección.

La Figura 23 muestra el cromatograma de una muestra de suero humano analizada mediante IDA-SEC-AF-ICP-QQQ-MS.

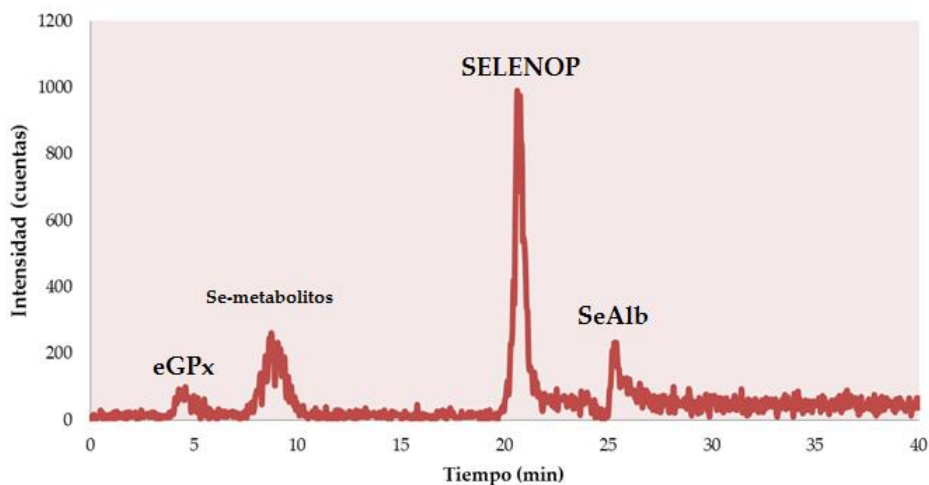


Figura 23. Cromatograma resultante de una muestra de suero humano determinado por la metodología SEC-AF-ICP-QQQ-MS

#### 5.2.4. Procesamiento de datos.

- Cuantificación de selenoproteínas en suero.

La cuantificación del contenido de selenio en eGPx, selenometabolitos, SELENOP y SeAlb se llevó a cabo mediante dilución isotópica de especies inespecíficas post-columna. El procedimiento de cuantificación se basó en la conversión de las intensidades de los diferentes isótopos monitorizados de selenio a cromatograma de flujo másico mediante la ecuación de la dilución isotópica (*Sección 2.3.1: Fundamento matemático de la dilución isotópica*) [215]. Para ello se utilizó la relación isotópica  $^{74}\text{Se}/^{78}\text{Se}$ . Las áreas de los picos de los cromatogramas de flujo másico se integraron utilizando el programa Origin 8.0, OriginLab Corporation. Cada scan del cromatograma, en unidades arbitrarias, representa una relación isotópica  $^{74}\text{Se}/^{78}\text{Se}$ , que tras su integración mediante la ecuación de dilución isotópica correspondiente, se divide por la cantidad de muestra analizada (0.1 g) para calcular las concentraciones de selenio en cada selenoproteína en unidades de  $\text{ng g}^{-1}$ .

#### 5.3. Análisis estadístico de los resultados.

##### 5.3.1. Análisis multivariante.

Los datos resultantes de los análisis realizados por DI-ESI-QqQ-TOF-MS y GC-MS se procesaron con el software SIMCA P™ (versión 11.5, publicado por UMetrics AB, Umeå, Suecia) para realizar el análisis de componentes principales (PCA) y el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) con el fin de discriminar entre los grupos del estudio. Antes de realizar el análisis estadístico, se aplicó el escalado de Pareto a los datos para reducir la importancia relativa de los valores más elevados, y la transformación logarítmica, para aproximarse a una

distribución normal [216]. La validación de los modelos se llevó a cabo mediante el valor de los parámetros  $R^2$  y  $Q^2$ , que cuantifican la separación de clases y el poder determinante del modelo, respectivamente.

Finalmente, los metabolitos responsables de la discriminación se seleccionaron de acuerdo con Variable Importance in the Projection, VIP (suma ponderada de cuadrados del peso en PLS, que indica la importancia de la variable en el modelo), considerando solo las variables con valores VIP superiores a 1, indicativos de diferencias significativas entre grupos. Cabe destacar que la clasificación de grupos CP y controles teniendo en cuenta la concentración de metales también se realizó mediante el análisis estadístico PLS-DA.

### 5.3.2. Análisis univariante.

El análisis univariante se empleó tanto en los resultados metabolómicos como en los metalómicos. Así pues, para determinar la existencia de diferencias significativas en los metabolitos con  $VIP > 1$  determinados en el análisis multivariante, los datos se sometieron a análisis univariante ANOVA de una vía seguida de una corrección múltiple con el test de Tukey (las variables mostraron una distribución Gaussiana) con el software STATISTICA 8.0 software, StatSoft, Tulsa, EE. UU. Se utilizó un nivel de probabilidad de 0.05 como criterio de significación. Este análisis también se empleó para comprobar la existencia de diferencias significativas entre concentraciones de diferentes selenoproteínas de grupos de pacientes CP y controles.

El análisis univariante realizado para comprobar la existencia de diferencias significativas en el estudio ionómico mediante ICP-QQQ-MS fue

de tipo no paramétrico ya que la mayoría de las variables mostraron una distribución sesgada (verificada por gráficas de probabilidad normal) y las varianzas no fueron homogéneas (comprobado por la prueba de Levene). Así, se aplicó la comparación de grupos utilizando el análisis de varianza de una vía de Krustal-Wallis, y cuando se observaron efectos significativos, se aplicó la prueba U de Mann Whitney de comparaciones por parejas.

### 5.3.3. Análisis de especificidad y sensibilidad de biomarcadores. Curvas ROC.

Para determinar la especificidad y sensibilidad de los metabolitos, metales y metalobiomoléculas alteradas determinadas en esta Tesis Doctoral se empleó el análisis de curvas ROC (Receiver Operator Characteristic) cuyo valor de área bajo la curva, (AUC, Area Under the Curve) es indicativo de la calidad de la variable como biomarcador de diagnóstico. Así pues, un biomarcador puede considerarse excelente cuando el valor AUC es mayor a 0.9, muy bueno si se encuentra entre 0.9-0.8, bueno 0.8-0.7, moderado 0.7-0.6 y pobre si es menor a 0.6. Estos valores se determinaron con ayuda de por la herramienta web Metaboanalyst 4.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>).

### 5.3.4. Análisis de rutas metabólicas.

Se realizó un análisis de rutas metabólicas para identificar las vías afectadas a partir de los metabolitos alterados mediante la herramienta web Metaboanalyst 4.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>). Este análisis consiste en la combinación del análisis de enriquecimiento y del topológico de las rutas, para los que se seleccionaron las opciones de la biblioteca "Homo sapiens" y los algoritmos predeterminados de "Hypergeometric test" y "Relative-Betweenness Centrality". Para identificar las rutas más relevantes, el umbral

de valor de impacto calculado a partir del análisis de la topología de la ruta se estableció en 0.1.

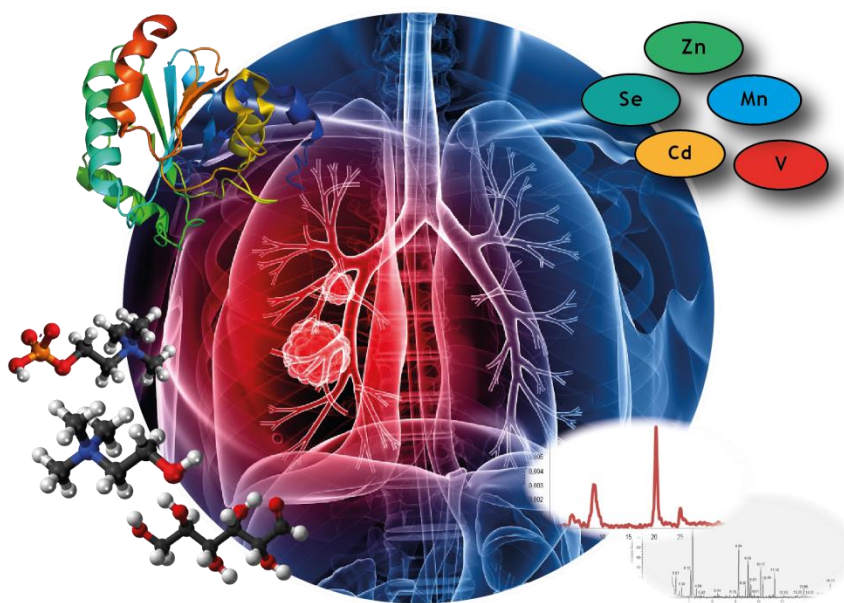
#### 5.3.5. Análisis de correlación.

Se realizaron análisis de correlación mediante el cálculo de los coeficientes de correlación de Spearman utilizando el software STATISTICA 8.0. (StatSoft, Tulsa, USA).

#### 5.4. Identificación de metabolitos alterados.

La identificación de metabolitos se llevó a cabo de diferentes formas dependiendo de la metodología empleada. En el caso de los resultados de DI-ESI-QTOF-MS, la identificación se basó principalmente en la realización de experimentos MS/MS y la búsqueda de fragmentos característicos en bases de datos como METLIN (<http://metlin.scripps.edu>), MassBank (<http://massbank.eu>) y Human Metabolome DataBase (<http://hmdb.ca>) disponibles de forma gratuita en la web. Los metabolitos alterados determinados por GC-MS se identificaron con la ayuda de la base de datos NIST, integrada en el propio software del instrumento, teniendo en cuenta una probabilidad de coincidencia del espectro de masas del 80%.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN





**Capítulo 1. Estudio metabolómico en muestras de suero, orina y lavado broncoalveolar de pacientes con cáncer de pulmón mediante el análisis por GC-MS.**

**Artículo 1.** B. Callejón-Leblic, T. García-Barrera, A. Pereira-Vega, J.L. Gómez-Ariza, Metabolomic study of serum, urine and bronchoalveolar lavage fluid based on gas chromatography mass spectrometry to delve into the pathology of lung cancer, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 163 (2019) 122–129.

**Artículo 2.** B. Callejón-Leblic, T. García-Barrera, J. Grávalos-Guzmán, A. Pereira-Vega, J.L. Gómez-Ariza, Metabolic profiling of potential lung cancer biomarkers using bronchoalveolar lavage fluid and the integrated direct infusion/gas chromatography mass spectrometry platform, *Journal of Proteomics*. 145 (2016) 197–206.



## Capítulo 1.

Los artículos *“Metabolomic study of serum, urine and bronchoalveolar lavage fluid based on gas chromatography mass spectrometry to delve into the pathology of lung cancer”* y *“Metabolic profiling of potential lung cancer biomarkers using bronchoalveolar lavage fluid and the integrated direct infusion/gas chromatography mass spectrometry platform”* han sido retirados de la Tesis Doctoral debido a restricciones relativas a los derechos de autor. Estas publicaciones han sido sustituidas por su referencia bibliográfica, enlace al artículo, DOI y resumen.

### **Artículo 1:**

B. Callejón-Leblic, T. García-Barrera, A. Pereira-Vega, J.L. Gómez-Ariza, *Metabolomic study of serum, urine and bronchoalveolar lavage fluid based on gas chromatography mass spectrometry to delve into the pathology of lung cancer*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 163 (2019) 122–129.

**Enlace a la publicación:** <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.09.055>

**DOI:** 10.1016/j.jpba.2018.09.055

### **RESUMEN:**

This study explores for the first time the combination of serum, urine and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) to deep insight into the pathology of lung cancer (LC) using a metabolomic platform based on gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). The study includes LC patients, healthy control group (HC) and a group of patients with noncancerous lung diseases (NCC)

used as a control group respect to BALF because of the invasive nature this fluid collection.

The metabolomic platform was applied to serum, urine and BALF samples in order to compare the metabolomic profiles of these biological fluids and establish metabolic similarities and differences between them. The application of PLS-DA presented a clear classification of groups for all types of samples, indicating the existence of altered metabolites in LC. Twenty six and thirty one perturbed metabolites in the LC were annotated in the comparison of serum and urine samples. On the other hand, sixteen metabolites were altered in BALF of LC patients compared to NCC. The pathway analysis indicated that several amino acid metabolic routes were the most affected in LC. Finally, ROC curves were applied to the dataset and metabolites with an AUC value higher than 0.75 were considered as relevant in the progression of LC.

### **Artículo 2:**

B. Callejón-Leblic, T. García-Barrera, J. Grávalos-Guzmán, A. Pereira-Vega, J.L. Gómez-Ariza, Metabolic profiling of potential lung cancer biomarkers using bronchoalveolar lavage fluid and the integrated direct infusion/gas chromatography mass spectrometry platform, *Journal of Proteomics*. 145 (2016) 197–206.

**Enlace a la publicación:** <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.09.055>

**DOI:** 10.1016/j.jpba.2018.09.055

**RESUMEN:**

Lung cancer is one of the ten most common causes of death worldwide, so that the search for early diagnosis biomarkers is a very challenging task. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) provides information on cellular and biochemical epithelial surface of the lower respiratory tract constituents and no previous metabolomics studies have been performed with BALF samples from patients with lung cancer. Therefore, this fluid has been explored looking for new contributions in lung cancer metabolism. In this way, two complementary metabolomics techniques based on direct infusion high resolution mass spectrometry (DI-ESI-QTOF-MS) and gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) have been applied to compare statistically differences between lung cancer (LC) and control (C) BALF samples, using partial least square discriminant analysis (PLS-DA) in order to find and identify potential biomarkers of the disease. A total of 42 altered metabolites were found in BALF from LC. The metabolic pathway analysis showed that glutamate and glutamine metabolism pathway was mainly altered by this disease. In addition, we assessed the biomarker specificity and sensitivity according to the area under the receiver operator characteristic (ROC) curves, indicating that glycerol and phosphoric acid were potential sensitive and specific biomarkers for lung cancer diagnosis and prognosis.



Este capítulo describe la aplicación de una plataforma metabolómica basada en GC-MS a muestras de suero, orina y LBA de pacientes con CP. La principal novedad de este estudio fue el análisis metabolómico de LBA de pacientes con CP por primera vez, y el estudio comparativo de estos resultados con los de otros fluidos biológicos (suero y orina) de los mismos pacientes. El propósito de relacionar los metabolitos alterados en diferentes fluidos fue obtener un conjunto de biomarcadores que faciliten el diagnóstico de CP. La metodología por GC-MS permitió analizar los tres fluidos, con la particularidad del uso de ureasa en orina, necesario para eliminar una banda producida en el cromatograma debido a la saturación por urea (Figura 24).

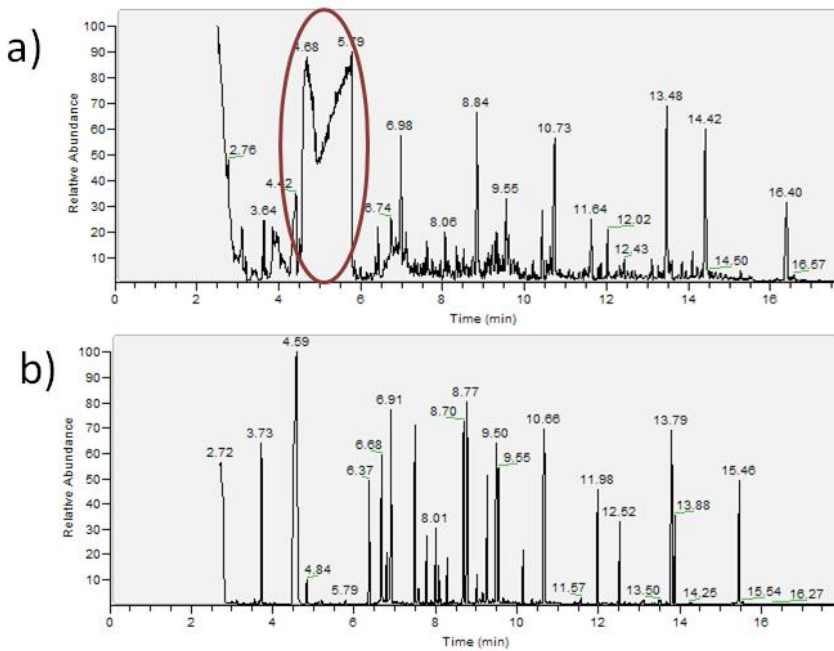


Figura 24. Cromatogramas correspondiente a una muestra de orina de un paciente con CP a) sin tratamiento con ureasa, b) con tratamiento de ureasa.

Los resultados estadísticos mostraron el cambio de un gran número de aminoácidos en CP (L-glicina, L-alanina, L-valina, L-prolina, L-serina, L-asparagina, L-glutamato, L-aspartato, L-treonina, L-ornitina, L-cisteína y L-glutamina). Los niveles de ácido palmítico, margárico, araquidónico, oleico y esteárico también se encontraron alterados en los fluidos de pacientes con CP, asociados a la proliferación de células tumorales que utilizan cadenas largas de ácidos grasos para formación de la membrana celular, modificaciones lipídicas de proteínas y producción de energía. Solo las alteraciones de ácido palmítico y esteárico fueron comunes en los tres fluidos, pero el comportamiento fue diferente entre ellos, aumentando en LBA y orina y disminuyendo en suero. En la Tabla 11 se resumen los metabolitos alterados comunes en suero, orina y LBA determinados en CP por GC-MS.

Tabla 11. Metabolitos alterados en suero, orina y LBA de pacientes con CP.

Metabolitos	SUERO	ORINA	LBA
Ácido palmítico	↓( FC = 0.94)	↑( FC = 1.85)	↑( FC = 1.37)
Ácido fosfórico	↓( FC = 0.82)	↓( FC = 0.39)	↓( FC = 0.42)
Ácido isocítrico	↓( FC = 0.77)	↓( FC = 0.41)	↓( FC = 0.53)
L-Serina	↓( FC = 0.67)	↑( FC = 2.71)	-
L-Prolina	↓( FC = 0.64)	-	↓( FC = 0.68)
Inositol	↓( FC = 0.56)	↓( FC = 0.17)	↓( FC = 0.63)
Ácido esteárico	↓( FC = 0.41)	↑( FC = 2.79)	↑( FC = 1.36)
Ácido úrico	↓( FC = 0.38)	↑( FC = 4.25)	-
L-Glicina	↓( FC = 0.91)	↓( FC = 0.29)	↓( FC = 0.60)
L-Treonina	↑( FC = 1.54)	↑( FC = 4.07)	-
Ácido malónico	↑( FC = 1.02)	↑( FC = 3.31)	-
L-Aspartato	-	↑( FC = 2.41)	↓( FC = 0.48)

Otros ácidos orgánicos como ácido acético, láctico, fosfórico, malónico, isocítrico, úrico, butanoico, ribónico, hexanodioico, hipúrico y aconítico también se mostraron alterados en CP. Sin embargo, solo los ácidos fosfóricos e isocítrico mostraron cambios similares en suero, orina y LBA. El

ácido isocítrico está relacionado con la formación de cetoglutarato involucrado en el ciclo de Krebs, y el ácido fosfórico participa en la fosforilación oxidativa, vía metabólica relacionada con la producción de ATP. La disminución de glicerol en LBA en pacientes CP podría relacionarse con la rápida conversión a glucosa, aumentada en CP, para sostener el crecimiento del cáncer [217]. Además, se encontraron niveles reducidos de inositol en los tres fluidos. Este metabolito es un componente fundamental de la membrana celular y nutriente esencial requerido para el crecimiento y supervivencia de las células humanas. Hay estudios que concluyen que existe una disminución del inositol en pacientes con CP, proponiendo que el inositol se reduce en los tumores, posiblemente como consecuencia de cambios locales en la regulación osmótica [115].

El análisis de rutas metabólicas de los metabolitos alterados en cada biofluido mostró un total de 22, 34 y 40 rutas metabólicas en CP en suero, la orina y el LBA, respectivamente. La Figura 25 representa los diagramas correspondientes a estos análisis, donde cada punto representa una ruta metabólica y su tamaño indica el impacto de las mismas. Los resultados destacaron la perturbación común del metabolismo de la glicina, serina y treonina en los tres fluidos de pacientes con CP entre otras rutas no comunes, como el metabolismo de la arginina y la prolina, el del inositol y el fosfato, el de la alanina, el aspartato y el glutamato o el metabolismo del piruvato. La Figura 26 muestra un cuadro resumen de las rutas metabólicas relacionadas con los metabolitos alterados en CP.

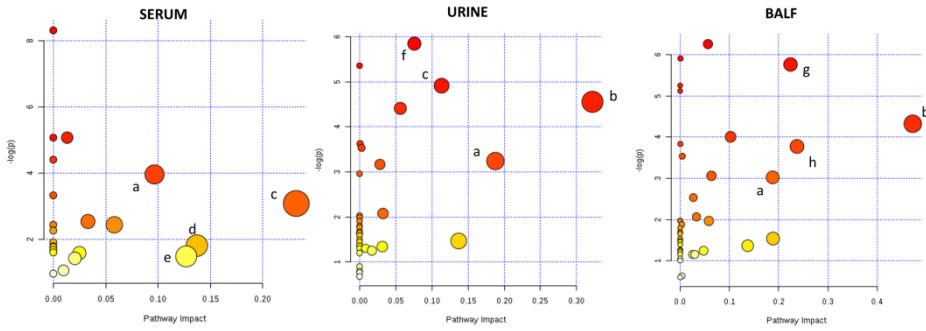


Figura 25. Descripción general de los cambios metabolómicos más importantes observados en suero, orina y LBA de pacientes con CP. a: metabolismo de la glicina, serina y treonina, b: metabolismo de la alanina, aspartato y glutamato, c: metabolismo del fosfato de inositol, d: metabolismo de la arginina y prolina, e: metabolismo de la cisteína y metionina, f: ciclo del TCA, g: metabolismo de la galactosa, h: metabolismo del piruvato.

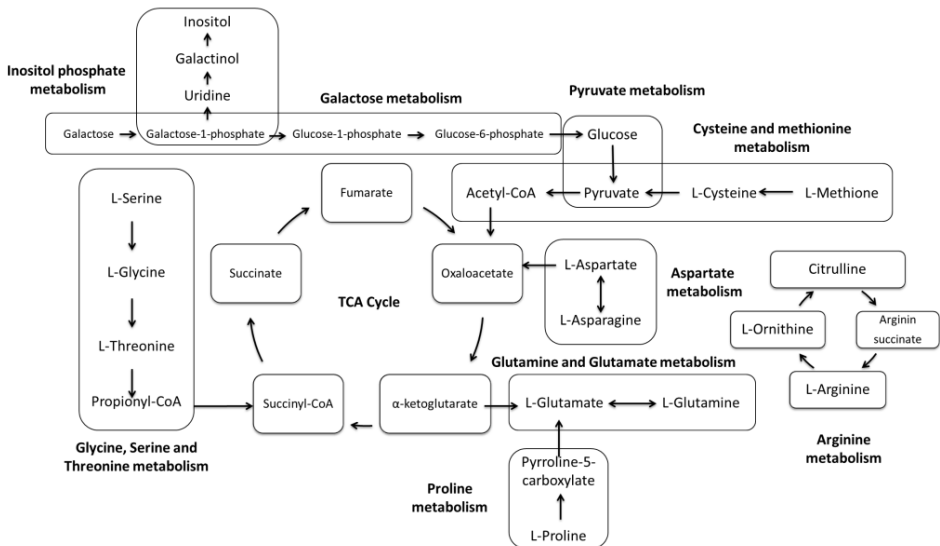


Figura 26. Esquema de las rutas metabólicas más alteradas en CP determinadas en el análisis por MetaboAnalyst.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

**METABOLOMIC STUDY OF SERUM, URINE AND BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID BASED ON GAS CHROMATOGRAPHY MASS SPECTROMETRY TO DELVE INTO THE PATHOLOGY OF LUNG CANCER**

Belén Callejón-Leblic<sup>a,b,c</sup>, Tamara García-Barrera<sup>\*a,b,c</sup>, Antonio Pereira-Vega<sup>d</sup>, José Luis Gómez-Ariza<sup>\*a,b,c</sup>

<sup>a</sup>Department of Chemistry, Faculty of Experimental Sciences. University of Huelva. Campus de El Carmen. 21007, Huelva. SPAIN; <sup>b</sup>International Agrofood Campus of Excellence International ceiA3. University of Huelva. SPAIN; <sup>c</sup>Research Center of Natural Resources, Health and Environment (RENSMA). University of Huelva. Campus de El Carmen. 21007, Huelva. SPAIN; <sup>d</sup>Pneumonology Area of Juan Ramón Jiménez Hospital, Huelva, Spain.

Table 1. Clinical characteristics of patients (serum and urine)

Serum and urine samples	LC (n=32)	HC (n=29)
Sex (M/W)	22/8	18/11
Age (years)	66 ± 12	56 ± 13
BMI	25 ± 3	-
Histology		
NSCLC (AD/SCC/UNSCLC)	26 (9/9/8)	-
SCLC	6	-
Smoking Habits		
Smokers	7	0
Ex smokers	20	16
Non smokers	3	13
Comorbities		
HT (%) / ACE(%)*	59/33*	48/40*
Asthma (%)	6	0
DM (%)	25	28

NSCLC: Non-small cell lung cancer, AD: Adenocarcinoma, SCC: Squamous cell cancer, UNSCLC: Undifferentiated non small cell lung cancer, SCLC: Small cell lung cancer, BMI: Body Mass Index, HT: Hypertension, DM: Diabetes Mellitus, M: Men, W: Women, LC: Lung cancer, HC: Healthy control, \*Percentage of patient taking ACE: angiotensin-converting-enzyme inhibitor.

Table 2. Clinical characteristics of patients (BALF)

BALF samples	LC (n=24)	NCC(n=30)
Sex (M/W)	16/8	25/5
Age (years)	65± 12	55 ± 15
BMI	25±3	26±4
Histology		
NSCLC (AD/SCC/UNSCLC)	21(8/7/6)	-
SCLC	3	-
DILD	-	17
Hemoptisis	-	9
Bronchiectasis	-	4
Smoking Habits		
Smokers	4	11
Ex smokers	20	16
Non smokers	-	3
Comorbidities		
HTA (%) / ACE (%)*	79/44*	33/41*
Asthma (%)	8	3
DM (%)	33	17

NSCLC: Non-small cell lung cancer, NSCLC: Non-small cell lung cancer, AD: Adenocarcinoma, SCC: Squamous cell cancer, UNSCLC: Undifferentiated non small cell lung cancer, SCLC: Small cell lung cancer, DILD: Diffuse Interstitial Lung Disease, BMI: Body Mass Index, HT: Hypertension, DM: Diabetes Mellitus, M: Men, W: Women, LC: Lung cancer, NCC: Non-cancerous control. \*Percentage of patient taking ACE: angiotensin-converting-enzyme inhibitor

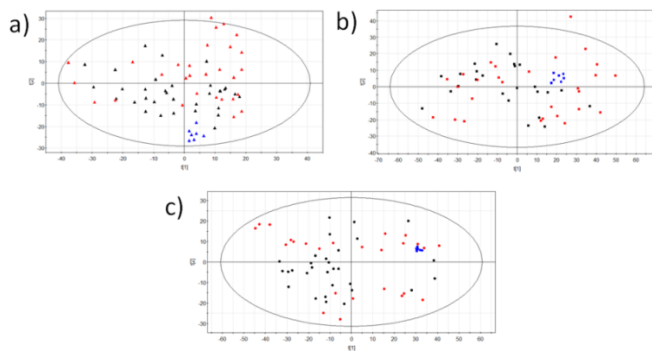


Figure 1. PCA score plot of a) serum, b) urine and c) BALF from LC patients (red points), control patients (black points) and quality controls (blue points).

**Capítulo 2. Estudio metabolómico de la evolución por estadios del cáncer de pulmón y la relación con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica mediante DI-ESI-QqQ-TOF-MS.**

**Artículo 3.** B. Callejón-Leblic, A. Pereira-Vega, E. Vázquez-Gandullo, J.L. Sánchez-Ramos, J.L. Gómez-Ariza, T. García-Barrera, Study of the metabolomic relationship between lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease based on direct infusion mass spectrometry, *Biochimie*. 157 (2019) 111–122.



## Capítulo 2.

El artículo "*Study of the metabolomic relationship between lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease based on direct infusion mass spectrometry*" ha sido retirado de la Tesis Doctoral debido a restricciones relativas a los derechos de autor. Estas publicaciones han sido sustituidas por su referencia bibliográfica, enlace al artículo, DOI y resumen.

### **Artículo 3:**

B. Callejón-Leblic, A. Pereira-Vega, E. Vázquez-Gandullo, J.L. Sánchez-Ramos, J.L. Gómez-Ariza, T. García-Barrera. Study of the metabolomic relationship between lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease based on direct infusion mass spectrometry, *Biochimie*. 157 (2019) 111–122.

**Enlace a la publicación:** <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.11.007>

**DOI:** 10.1016/j.biochi.2018.11.007

### **RESUMEN:**

The high prevalence of lung cancer (LC) has triggered the search of biomarkers for early diagnosis of this disease. For this purpose the study of metabolic changes related to the development of lung cancer could provide interesting information about its early diagnosis. In this sense, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), a disease associated with tumor development, is a comorbidity that increases the risk of onset and progression of lung neoplasia and has also to be considered in the study of pathology related to lung cancer.

This work develop a metabolomic approach based on direct infusion mass spectrometry using a hybrid triple quadrupole-time of flight mass spectrometer (DI-ESI-QqQ-TOF-MS) in order to identify altered metabolites from serum of LC and COPD patients and evaluate its relationship and implication in the progression of LC. This methodology has been applied to 30 serum samples from LC, 30 healthy patients used as controls (HC) and 30 serum samples from COPD to found altered metabolites from both LC and COPD diseases. In addition, some metabolic differences and similarities were found in Pulmonary Emphysema and Chronic Bronchitis patients. On the other hand, altered metabolites were studied in different stages of LC (II, III and IV) to evaluate the perturbation of them throughout the progression of disease. The sample treatment consisted of the extraction of polar and non-polar metabolites from serum that was later infused into the mass spectrometer using an electrospray ionization source in positive and negative mode. Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) allowed a classification between LC, HC and COPD groups in all acquisition modes.

A total of 35 altered and common metabolites between LC and COPD, including amino acids, fatty acids, lysophospholipids, phospholipids and tryacylglycerides were identified, being alanine, aspartate and glutamate metabolism the most altered route. Finally, ROC curves were applied to the dataset and metabolites with AUC values higher than 0.7 were considered as relevant in the progression of LC.

La alta prevalencia de cáncer de pulmón ha estimulado la búsqueda de biomarcadores para el diagnóstico temprano de esta enfermedad. Para este propósito, el estudio de los cambios metabólicos relacionados con el desarrollo del cáncer de pulmón podría proporcionar información interesante sobre su diagnóstico temprano. En este sentido, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), una enfermedad asociada con el desarrollo tumoral, es una comorbilidad que aumenta el riesgo de aparición y progresión de la neoplasia pulmonar, por lo que debe considerarse en el estudio de la patología relacionada con el cáncer de pulmón.

Este capítulo describe el análisis metabolómico de muestras de suero de pacientes con CP basado en la metodología DI-ESI-QqQ-TOF-MS. El objetivo principal de este estudio fue investigar la alteración de metabolitos durante la progresión del CP en diferentes estadios de la enfermedad (II, III y IV), así como la posible relación metabólica con enfermedades asociadas al riesgo de desarrollar CP, como es la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, EPOC. Esta asociación radica en que a menudo los pacientes con cáncer experimentan los síntomas de la EPOC, indicando que la inflamación crónica es un factor potencial asociado con el desarrollo del tumor [16,17].

La primera parte del estudio se centró en la determinación de perfiles metabolómicos de pacientes CP, EPOC y sanos mediante DI-ESI-QTOF-MS, en modo positivo y negativo, con el objetivo de encontrar metabolitos diferentes entre los grupos. Además, el análisis de los extractos acuosos y orgánicos del suero permitió abarcar un mayor número de determinaciones.

Los resultados generales obtenidos por infusión directa fueron complementados por los obtenidos mediante GC-MS, ya que la infusión

directa permite analizar moléculas de carácter no volátil y de mayor masa molecular, como son los lisofosfolípidos, fosfolípidos, diacilglicéridos y triacilglicéridos, mientras que la aplicación de GC-MS proporciona información sobre metabolitos más volátiles de menor masa molecular. Así pues, se comprobó que los metabolitos alterados en CP respecto al grupo control ( $AUC > 0.7$ ) fueron treonina, fosfoetanolamina, glutamato, carnitina, fosfocolina, tirosina, LPC(16:0), PC(16:0/16:1), PC(16:0/20:5) y TAG(16:0/16:0/18:1). Como se comentó en el capítulo anterior los aminoácidos juegan un papel importante en la carcinogénesis, aunque es difícil establecer si los cambios de los aminoácidos están relacionados directamente con la detección del CP o si son marcadores del estado nutricional, ya que la malnutrición y la caquexia son también factores que afectan los perfiles de aminoácidos en los pacientes con cáncer [81]. El aumento de carnitina y acilcarnitinas en pacientes con CP sugiere un incremento en la demanda de energía, que se reproduce en el aumento de la transferencia de acetil coenzima A al ciclo de Krebs.

Entre los metabolitos alterados en EPOC respecto al grupo control, destacaron el piroglutamato, involucrado en el ciclo del glutatión, en el cual se convierte en glutamato por la 5-oxoprolinasa, y glutatión, cuya perturbación está asociada al aumento del estrés oxidativo, involucrado en la patogénesis de muchas enfermedades como el CP o la EPOC. Por otro lado, la disminución del ácido aspártico en pacientes con EPOC podría estar asociada a la inhibición de la actividad de la aspartato aminotransferasa, que cataliza la reacción de transferencia de un grupo amino de L-aspartato a 2-oxoglutarato, formando L-glutamato y oxaloacetato. Cepelak et al, han descrito una disminución de esta enzima en el suero de pacientes con EPOC en comparación con un grupo de personas sanas [218]. Finalmente, algunos

autores han descrito la importancia de los lípidos en la patogénesis de la EPOC debido a la acumulación de lisolípidos en sangre, indicativo de un predominio del catabolismo lipídico [219]. Nuestros resultados mostraron el aumento de LPC (20:4) en la EPOC, lo que está relacionado con el uso de compuestos lipídicos de tipo eicosanoide derivados de ácido graso poliinsaturado, particularmente ácido araquidónico (C20:4), en regulaciones inflamatorias e inmunitarias [219]. Además, la disminución de DAGs seguida del aumento de TAG en la EPOC podría estar relacionada con la hiperlipidemia, factor de riesgo importante para las enfermedades cardiovasculares, que son comorbilidades comunes en los pacientes de EPOC [220].

Por otra parte, se realizó un estudio comparativo entre diferentes tipos de EPOC para determinar posibles diferencias metabólicas entre pacientes con bronquitis crónica y con enfisema pulmonar. Los resultados mostraron alteraciones en piroglutamato, tirosina, acetilcarnitina, ácido miristoleico y diferentes PCs (PC(16:0/16:1), PC(16:0/18:0), PC(18:2/18:2), PC(16:0/22:6) y PC(18:1/20:4) aumentando en suero de pacientes con bronquitis crónica. Por el contrario, adenina, fenilalanina, glucosa e hidroxihexanoil-carnitina incrementaron en suero de pacientes con enfisema pulmonar.

Varios metabolitos aparecieron alterados tanto en pacientes con CP como EPOC en comparación con el grupo control. El ácido acético, la propionilcarnitina y la adenosina aumentaron en ambas enfermedades, siendo el aumento mayor en CP que en los pacientes con EPOC. Varios autores han descrito altos niveles de ácido acético en CP [67,78,221]. El acetato es el producto final del metabolismo de los lípidos y su aumento refleja la

alteración del mismo. La adenosina es un nucleótido formado por la base nitrogenada de adenina, y la alteración de la adenosina y la adenina podrían indicar perturbaciones en el metabolismo energético debido a que el ATP es la principal fuente de energía celular. Por otro lado, el glutatión fue el único metabolito que disminuyó en ambas enfermedades, siendo la disminución en la CP mayor que en EPOC. El glutatión (GSH) desempeña un papel importante en muchos procesos celulares, incluida la diferenciación celular, la proliferación y la apoptosis. Se conoce que alteraciones en la homeostasis del GSH están implicadas en la progresión de varias enfermedades humanas como CP y la EPOC [222].

El aumento de los ácidos grasos oleico y palmitoleico en CP y EPOC sugirieron alteraciones en la  $\beta$ -oxidación, que desempeña un papel fundamental en la proliferación, migración e invasión de células cancerosas. La desregulación del metabolismo de los ácidos grasos se reconoce como una transformación maligna en muchos cánceres diferentes [223].

Finalmente, este estudio reveló la alteración de LPCs, PCs y TAGs en CP y EPOC con respecto al grupo control. Sin embargo no se apreciaron cambios de estos metabolitos en la comparación de ambas enfermedades sugiriendo la ausencia de diferencias en el metabolismo de los glicerofosfolípidos. La Tabla 12 resume los metabolitos alterados en CP, EPOC con respecto al grupo control, así como los alterados entre enfermedades.

Tabla 12. Fold change de los metabolitos alterados en CP y EPOC con respecto al control. \*Fold Change calculado.

Metabolitos	Fold Change		
	CP/C	EPOC/C	CP/EPOC
Ácido acético	↑ (FC=1.33)	↑ (FC=1.3)	↑ (FC=1.15)
Treonina	↑ (FC=1.43)	-	↑ (FC=1.51)
Ácido aspartico	↑ (FC=1.32)	↓(FC=0.7)	↑ (FC=1.88)
Creatina	↑ (FC=1.33)	↓(FC=0.7)	↑ (FC=1.85)
Adenina	↑ (FC=1.1)	↑ (FC=1.54)	↓(FC=0.68)
Ornitina	-	↓(FC=0.8)	↑ (FC=1.42)
Glutamato	↑ (FC=1.35)	-	↑ (FC=1.43)
Carnitina	↑ (FC=1.44)	-	↑ (FC=1.44)
Fenilalanina	↓(FC=0.56)	↑ (FC=1.48)	↑ (FC=0.41)
Tirosina	↓(FC=0.66)	↑ (FC=1.47)	↓ (FC=0.51)
Arginina	-	↑ (FC=1.41)	↑ (FC=1.31)
Fosfocholina	↑ (FC=1.4)	↑ (FC=1.52)	↓(FC=0.92*)
Glucosa	↑ (FC=1.62)	↑ (FC=1.67)	↓(FC=0.97*)
Acetilcarnitina	-	↑ (FC=1.41)	↑ (FC=1.29)
Propionilcarnitina	↑ (FC=2.55)	↑ (FC=1.36)	↑ (FC=1.82)
Butirilcarnitina	↑ (FC=2.28)	-	↑ (FC=1.46)
Pentoilcarnitina	↑ (FC=1.81)	-	↑ (FC=2.55)
Ácido palmitoleico	↑ (FC=1.97)	↑ (FC=2.27)	↓(FC=0.87*)
Adenosina	↑ (FC=2.86)	↑ (FC=1.45)	↑ (FC=1.97*)
Ácido oleico	↑ (FC=1.68)	↑ (FC=2.22)	↓(FC=0.76*)
Glutati3n	↓(FC=0.48)	↓(FC=0.56)	↓(FC=0.71)
Glicerofosfocolina	-	↑ (FC=1.22)	↑ (FC=1.24)
Ácido docohexaenoico	↓(FC=0.72)	↓(FC=0.55)	↑ (FC=1.34)

(Continuación de Tabla 12).

Metabolitos	Fold Change		
	CP/C	EPOC/C	CP/C
LPC(16:0)	↑ (FC=1.66)	↑ (FC=1.46)	↑ (FC=1.14*)
LPC(18:0)	↑ (FC=1.38)	↑ (FC=1.52)	↓ (FC=0.91*)
LPC(18:1)	-	↑ (FC=1.65)	↓ (FC=0.69)
LPC(20:4)	-	↑ (FC=1.94)	↓ (FC=0.65)
PC(16:0/16:1)	↑ (FC=1.43)	↑ (FC=1.37)	↑ (FC=1.04*)
PC(16:0/18:0)	↑ (FC=1.67)	↓ (FC=0.53)	↑ (FC=3.15*)
PC(16:0/20:5)	↑ (FC=1.5)	↑ (FC=1.55)	↓ (FC=0.97*)
PC(18:2/18:2)	↑ (FC=1.52)	↑ (FC=1.46)	↑ (FC=1.04*)
TAG(16:0/16:0/18:2)	↑ (FC=1.67)	-	↑ (FC=1.4)
TAG(16:0/16:0/18:1)	↑ (FC=1.43)	↑ (FC=1.32)	↑ (FC=1.08*)
TAG(16:0/18:1/18:1)	↑ (FC=1.43)	↑ (FC=1.43)	↑ (FC=1.00*)
TAG(18:3/18:2/18:2)	↑ (FC=1.4)	-	↑ (FC=1.43)

Por otro lado, se realizó un estudio metabólico de la estadificación del CP para comprobar la alteración de los metabolitos durante el desarrollo de la enfermedad. La Figura 27 representa los diagramas PLS-DA de los diferentes análisis realizados sobre los extractos de suero mostrando una clasificación de los estadios del CP.

Así, el análisis metabólico mostró la alteración de fosfoetanolamina y glucosa en las tres etapas de la enfermedad (estadios II, III y IV) sugiriendo que las diferentes rutas del metabolismo energético como el ciclo de Krebs, la  $\beta$ -oxidación y la glucólisis están afectadas en la progresión del CP. Se observó el aumento de glucosa en todas las etapas del CP siendo mayor en el estadio II, indicando una mayor alteración al inicio de la

enfermedad. Esta conclusión concuerda con la de otros autores que describieron una disminución de glucosa en la etapa avanzada del CP en comparación con el estadio precoz de la enfermedad [224]. Por el contrario, la presencia de fosfoetanolamina fue menor en estadios tempranos que en el avanzado. De manera similar, la pentanoil-carnitina en CP fue mayor en la etapa IV que en la etapa II y III. Por otra parte, la presencia de glutatión fue significativa en los estadios III y IV de CP aumentando en el estadio más avanzado. Finalmente cabe destacar que los lípidos (LPC, PC, DAG y TAG) mostraron alteración solo en los estadios avanzados, sin embargo los ácidos grasos revelaron perturbación en la etapa temprana de la enfermedad.

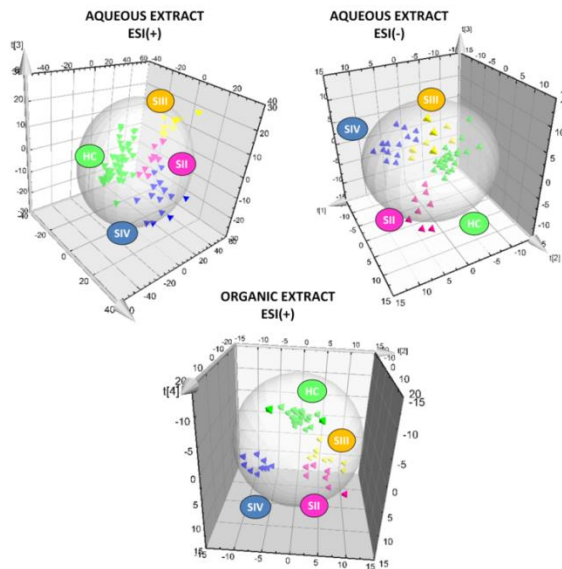


Figura 27. PLS-DA de los diferentes extractos de suero de pacientes con CP en distintos estadios. HC: grupo control, SII: estadio II, SIII: estadio III, SIV: estadio IV.

(+) Modo de ionización positiva, (-) Modo de ionización negativa (-).



## Supplementary Material

### Study of the metabolomic relationship between lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease based on direct infusion mass spectrometry

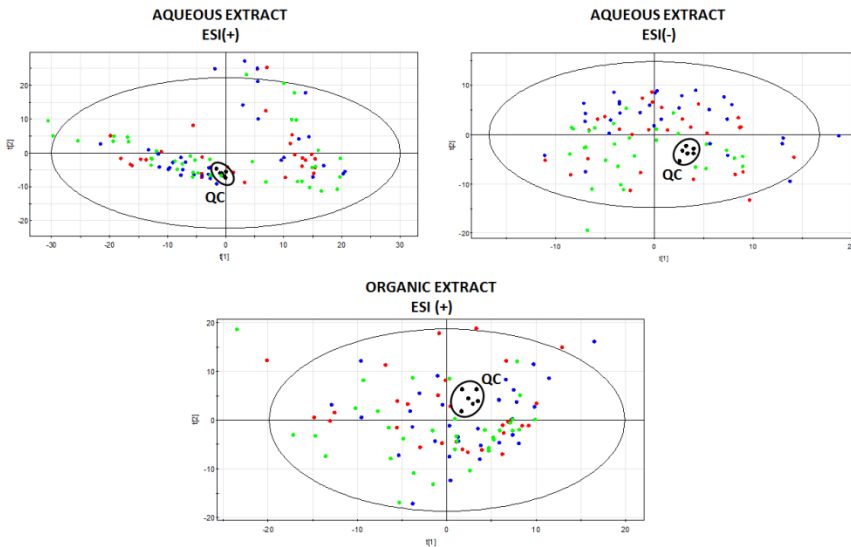
B. Callejón-Leblic<sup>a</sup>, A. Pereira-Vega<sup>b\*</sup>, E. Vazquez-Gandullo<sup>b</sup>, J.L. Sánchez-Ramos<sup>c</sup>, J.L. Gómez-Ariza<sup>a</sup>, T. García-Barrera<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemistry, Faculty of Experimental Sciences, University of Huelva, Campus de El Carmen, 21007-Huelva, Spain. Research Center on Health and Environment (RENSMA)

<sup>b</sup> Pneumology Area of Juan Ramón Jiménez Hospital, Huelva, Spain

<sup>c</sup> Nursing Department, University of Huelva

Supplementary Material Figure 1. PCA of aqueous and organic extract of serum samples from LC, COPD and HC patients. QC: quality control



Supplementary Material, Table 1. Statistical performances and predictive parameters of PLS-DA of all acquisition modes. LC: Lung cancer, HC: Healthy control, COPD: Chronic Obstructive Pulmonary Disease, CB: Chronic Bronchitis, PE: Pulmonary Emphysema.

EXTRACT	AQUEOUS				ORGANIC	
MODE	POSITIVE		NEGATIVE		POSITIVE	
GROUPS	R2Y	Q2	R2Y	Q2	R2Y	Q2
LC vs HC	0.992	0.725	0.999	0.761	0.990	0.804
COPD vs HC	0.998	0.745	0.99	0.743	0.999	0.737
LC vs COPD	0.997	0.736	0.997	0.755	0.999	0.802
CB vs PE	0.999	0.714	0.993	0.727	0.999	0.708
LC vs PE	0.996	0.774	0.999	0.664	0.996	0.661
LC vs CE	0.999	0.784	0.991	0.701	0.990	0.665

Supplementary Material, Table 2. Altered metabolites in serum from BC compared to PE, with VIP, FC: fold change, p-value (statistical pairwise comparisons by one-way ANOVA followed by Tuckey test), AUC values, extract type, mode of analysis and adduct formed by metabolites. PC: Phosphocholine.

Metabolite	m/z	VIP	FC	p_ANOVA	AUC	Extract	Mode
Pyroglutamate	130.1	1.87	3.74	0.036	0.63	Aqueous	ESI(+)
Adenine	136.05	1.35	0.8	0.033	0.56	Aqueous	ESI(+)
Phenylalanine	166.09	1.64	0.56	0.0035	0.79	Aqueous	ESI(+)
Tyrosine	182.04	1.63	1.34	0.001	0.72	Aqueous	ESI(+)
Glucose	203.05	1.1	0.82	0.039	0.71	Organic	ESI(+)
Acetylcarnitine	218.22	1.46	1.27	0.038	0.63	Organic	ESI(+)
Myristoleic acid	225.21	1.47	1.28	0.0035	0.64	Aqueous	ESI(-)
Hydroxyhexanoylcarnitine	276.12	1.21	0.6	0.01	0.80	Organic	ESI(+)
Glycerophosphocholine	296.12	1.23	0.97	0.016	0.51	Organic	ESI(+)
PC(16:0/16:1)	754.59	1.1	1.76	0.011	0.67	Aqueous	ESI(+)
PC(16:0/18:0)	782.61	1.85	1.54	0.019	0.64	Aqueous	ESI(+)
PC(18:2/18:2)	804.59	2.01	1.83	0.0014	0.75	Aqueous	ESI(+)
PC(16:0/22:6)	828.6	1.44	1.41	0.0002	0.71	Aqueous	ESI(+)
PC(18:1/20:4)	830.62	1.87	1.52	0.014	0.75	Aqueous	ESI(+)

Supplemental Material, Table 3. Altered metabolites in serum from BC or PE compared to LC, with VIP, FC: fold change, p-value (statistical pairwise comparisons by one-way ANOVA followed by Tukey test), AUC values, extract type, mode of analysis and adduct formed by metabolites. LPC: Lysophosphocholine.

Metabolite	m/z	Groups	VIP	FC	p_ANOVA	AUC	Mode
<b>Aspartic acid</b>	132.015	LC vs CB	1.15	1.22	0.04	0.72	ESI(-)
		LC vs PE	1.14	1.23	0.03	0.69	
<b>Creatine</b>	132.104	LC vs CB	1.13	1.3	0.03	0.77	ESI(+)
		LC vs PE	1.26	1.19	0.01	0.68	
<b>Ornithine</b>	133.106	LC vs CB	1.41	1.74	0.03	0.81	ESI(+)
		LC vs PE	1.23	1.23	0.04	0.69	
<b>Phenylalanine</b>	166.09	LC vs CB	1.75	0.62	0.001	0.72	ESI(+)
		LC vs PE	1.63	0.64	0.001	0.72	
<b>Tyrosine</b>	182.036	LC vs CB	2.5	0.59	0.002	0.8	ESI(+)
		LC vs PE	1.5	0.78	0.001	0.78	
<b>Acetylcarnitine</b>	204.087	LC vs CB	1.39	2.15	0.02	0.74	ESI(+)
		LC vs PE	1.51	2.17	0.01	0.64	
<b>Glycerophosphocholine</b>	296.117	LC vs CB	1.21	1.1	0.02	0.7	ESI(+)
		LC vs PE	1.16	1.21	0.03	0.51	
<b>Glutathione</b>	308.151	LC vs CB	1.17	0.68	0.02	0.69	ESI(+)
		LC vs PE	1.27	0.73	0.03	0.6	
<b>LPC(18:2)</b>	520.352	LC vs CB	1.13	0.86	0.001	0.66	ESI(+)
		LC vs PE	1.03	0.86	0.02	0.61	

Supplementary Material, Tabla 4. Altered metabolites in serum from LC patients compared to HC and COPD determined by GC-MS. with VIP, FC: fold change, p-value (statistical pairwise comparisons by one-way ANOVA followed by Tuckey test), AUC values, extract type, mode of analysis and adduct formed by metabolites.

Metabolite	Groups	Retention				
		Time (min)	VIP	FC	p_ANOVA	AUC
<b>Threonine</b>	LC vs HC	5.48	1.74	1.54	0.009	0.70
	LC vs COPD		1.38	1.69	0.016	0.70
<b>Glutamate</b>	LC vs HC	6.88	1.57	1.65	0.043	0.68
	LC vs COPD		1.55	1.33	0.046	0.69
<b>Tyrosine</b>	LC vs HC	11.13	1.57	0.61	0.022	0.73
	LC vs COPD		1.92	0.63	0.037	0.73

**Capítulo 3. Estudio de la dishomeostasis de metales en muestras de suero, orina y lavado broncoalveolar de pacientes con cáncer de pulmón mediante ICP-QQQ-MS.**

**Artículo 4.** B. Callejón-Leblic, J.L. Gómez-Ariza, A. Pereira-Vega, T. García-Barrera, Metal dyshomeostasis based biomarkers of lung cancer using human biofluids, *Metallomics*. 10 (2018) 1444–1451.

**Artículo 5.** B. Callejón-Leblic, A. Arias-Borrego, A. Pereira-Vega, J.L. Gómez-Ariza and T. García-Barrera, The metallome of lung cancer and its potential use as biomarker. *International Journal of Molecular Sciences*, 778 (2019) 1-16. Review



### Capítulo 3.

El artículo "*Metal dyshomeostasis based biomarkers of lung cancer using human biofluids*" ha sido retirado de la Tesis Doctoral debido a restricciones relativas a los derechos de autor. Estas publicaciones han sido sustituidas por su referencia bibliográfica, enlace al artículo, DOI y resumen.

#### **Artículo 4:**

B. Callejón-Leblic, J.L. Gómez-Ariza, A. Pereira-Vega, T. García-Barrera, Metal dyshomeostasis based biomarkers of lung cancer using human biofluids, *Metallomics*. 10 (2018) 1444–1451.

#### **Enlace a la publicación:**

<https://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2018/MT/C8MT00139A#!divAabstract>

DOI: 10.1039/c8mt00139a

#### **RESUMEN:**

Lung cancer (LC) is one of the most common causes of cancer-related deaths in the world and it is well known that trace elements play important roles in the carcinogenic process activating and inhibiting enzymatic reactions and metalloproteins, in which they usually participate as cofactors. A cross-sectional study was conducted on 48 lung cancer patients and 39 controls (56 men and 31 women), aged 44-76 years between March 2011 and June 2012. Eleven elements have been included in the study: V, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Se, Mo, Cd, and Pb, some of them considered toxic (V, Cd, Cr and Pb), while others are essential (Co, Mo, Se, Fe and Zn), and they have been analyzed by ICP-QQQ-MS in serum, urine and for the first time in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). In order to

understand the involvement of metals in this process, an analytical metallomic approach based on non-denaturing precipitation of proteins (NDPP) has been optimized for the fractionation of high molecular mass (HMM) and low molecular mass (LMM) metal species, in order to distinguish between metal species that affect the biological activity and toxicological potential of the elements. In this work, the NDPP followed by the analysis of metals by ICP-QQQ-MS has been applied for the first time to serum, urine and BALF samples from lung cancer patients and controls in order to get metal-size molecule profiles (MSMP), which can be used as metal-based biomarkers of altered metabolic processes such as oxidative stress and homeostasis. In this sense, we have demonstrated that several metals are good biomarkers when they are related to labile complexes, complexed with low molecular mass ligands, or in the form of metalloproteins (*i.e.* V and Cr in HMM and Cu in LMM), which has been described for the first time. On the other hand, metal dyshomeostasis biomarkers are proposed using metal ratios and correlations. Finally, the ratios between elements were shown to be important biomarkers for lung cancer in serum (V/Mn, V/Pb, V/Zn, Cr/Pb), urine (Cr/Cd, Mn/Cd, V/Cd, Co/Cd, Cd/Pb) and BALF (V/Cu), which reflects the dyshomeostasis of metals in lung cancer. In this sense, several metals are correlated to others suggesting also the existence of an interconnected homeostasis in lung cancer.

El amplio estudio del papel de los metales en la aparición y progresión del cáncer, así como en el proceso de metástasis [146–148] ha permitido establecer dos posibles hipótesis generales. La primera relaciona la presencia y la evolución de la enfermedad con la perturbación de los niveles de los elementos esenciales del metabolismo, y la segunda asocia el proceso carcinogénico con una alta exposición a los metales. Por otra parte, los oligoelementos juegan un papel muy importante en el proceso carcinogénico activando e inhibiendo reacciones enzimáticas fundamentales en las que suelen participar como cofactores, mientras que los elementos no esenciales o tóxicos pueden alterar estos procesos biológicos.

La exposición a algunos elementos tóxicos como As, Cd, Pb y Ni pueden tener consecuencias carcinogénicas [124] debido a la activación de las rutas de señalización oncogénicas [142,225] y al estrés oxidativo [124,142,225,226]. En este capítulo se presentan los resultados del desarrollo de una metodología de análisis multielemental basada en ICP-QQQ-MS y su aplicación a muestras biológicas de pacientes con CP. Concretamente, se analizaron once elementos (V, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Se, Mo, Cd y Pb) en muestras de suero, orina y, por primera vez, en LBA de pacientes con CP, considerados elementos tóxicos (V, Cd, Cr y Pb), o esenciales (Co, Mo, Se, Fe y Zn). Además la optimización de un método de fraccionamiento basado en la precipitación de proteínas en condiciones no desnaturizantes (NDPP) permitió el análisis de metales en la fracción de HMM y LMM por ICP-QQQ-MS en las muestras de suero. Tanto las concentraciones de elementos totales en suero, orina y LBA, como las determinaciones en las fracciones de HMM y LMM de pacientes CP y controles fueron sometidas a diferentes análisis estadísticos con el fin de encontrar las variables más significativas en la enfermedad. Además de las concentraciones totales, también se estudiaron los

ratios de los elementos para comprobar la posible interrelación entre los mismos en CP y su posible uso como biomarcadores. Así pues, se realizó el análisis multivariante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) para establecer una clasificación de los grupos de estudio en base a las concentraciones de los elementos en los distintos fluidos, teniendo en cuenta el parámetro VIP (variable importance in the projection) para determinar los elementos más influyentes en clasificación de los grupos. La Figura 28 muestra la clasificación de los grupos CP y control en base a su distribución elemental en suero y sus fracciones independientes.

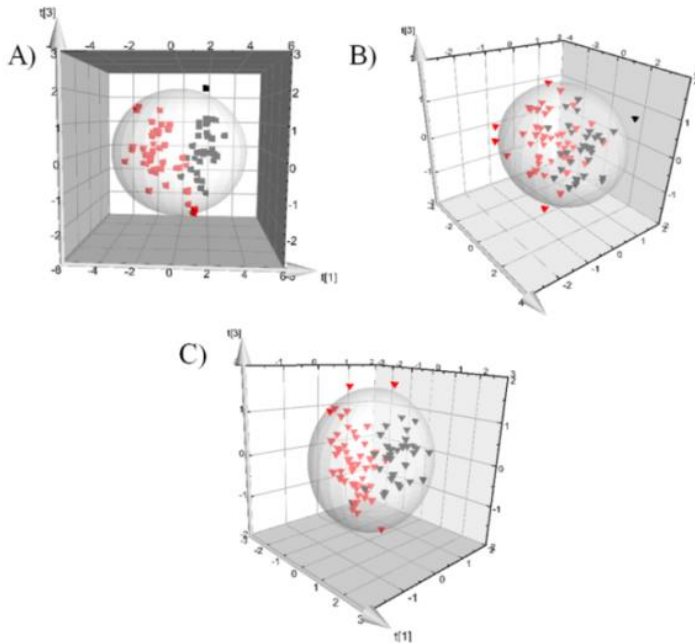


Figura 28. Diagrama PLS-DA de los grupos CP y control empleando las concentraciones a) total, b) fracción HMM y c) fracción LMM.

Por otra parte, se realizó el análisis univariante basado en el test U de Mann Whitney para determinar si existían diferencias significativas entre

las concentraciones de los elementos en CP y pacientes control utilizando el criterio  $p > 0.05$  como parámetro significativo. Por último, la evaluación de las curvas ROC y del valor de AUC de cada variable determinada, permitió clasificar cada elemento según la especificidad y la sensibilidad hacia el CP. Es decir, aquellos elementos con AUC mayor a 0.75 fueron considerados buenas variables de diagnóstico. Por tanto, se seleccionaron aquellos elementos que presentaron una relación de cambio (fold change) menor a 0.5 o mayor a 2,  $VIP > 1$ ,  $p > 0.05$  (prueba U de Mann-Whitney) y valor  $AUC > 0.75$ . La Tabla 13 resume las concentraciones de los elementos y los ratios de los mismos que cumplen los criterios más significativos en los diferentes fluidos estudiados.

Tabla 13. Concentraciones medias y desviación estándar de la media de los elementos que cumplen los criterios  $0.5 < FC < 2$ ,  $VIP > 1$ ,  $p > 0.05$  y  $AUC > 0.75$  en suero, orina y LBA.

Concentraciones ( $\text{ng g}^{-1}$ )								
	CONTROL		CP		FC CP/C	VIP	p value	AUC
	Media	SEM	Media	SEM				
<b>SUERO</b>								
V-TOTAL	0.05	0.02	0.18	0.04	3.8	1.8	<0.00	0.76
V-HMM	0.04	0.02	0.19	0.05	5.1	1.7	<0.00	0.78
Cr-HMM	0.4	0.2	0.83	0.12	2.1	1.9	<0.00	0.78
Cu-LMM	33.3	2.8	76.3	2.58	2.3	2.1	<0.00	0.92
V/Mn	0.02	0.01	0.08	0.01	3.6	1.5	<0.00	0.77
V/Pb	0.03	0.01	0.14	0.02	4.3	1.5	<0.00	0.76
V/Zn	0.0001	0.0001	0.002	0.00004	4.1	1.5	<0.00	0.76
Cr/Pb	0.4	0.14	0.96	0.19	2.8	1.6	<0.00	0.76

(Continuación de Tabla 13).

Concentraciones (ng g <sup>-1</sup> )								
	CONTROL		CP		FC CP/C	VIP	P value	AUC
	Media	SEM	Media	SEM				
<b>ORINA</b>								
Cd	0.67	0.07	1.55	0.21	2.3	1.7	<0.00	0.79
Cr/Cd	6.38	1.47	2.33	0.47	0.4	1.8	<0.00	0.76
Mn/Cd	10.62	1.66	3.95	0.48	0.4	2.17	<0.00	0.77
V/Cd	3.83	0.73	1.6	1.43	0.4	1.5	<0.00	0.75
Co/Cd	1.56	0.24	0.42	0.05	0.3	1.9	<0.00	0.81
Cd/Pb	0.09	0.01	0.23	0.03	2.47	1.6	<0.00	0.75
<b>LBA</b>								
Mn	0.46	0.06	0.69	0.09	1.51	1.3	<0.00	0.75
V/Cu	1.03	0.1	0.51	0.11	0.49	1.2	<0.00	0.76

La concentración de vanadio fue de 3.8 y 5.1 veces mayor en pacientes con CP en suero y en la fracción de HMM, respectivamente. Hay muy poca información sobre el papel este elemento en el metabolismo, aunque varios autores han estudiado los niveles de V en procesos cancerosos, como Lin et al, [156] que analizó V en plasma de mujeres con CP aunque no encontraron diferencias significativas entre grupo cáncer y el control. Otros autores han estudiado el uso de complejos de V como tratamiento en varios tipos de cánceres incluyendo el CP demostrando posibles características anticarcinogénicas [130]. Otros estudios realizados sobre células específicas de CP han demostrado la influencia de algunos compuestos de vanadio como agente citotóxico [227].

El cromo está asociado al metabolismo de los lípidos, a la síntesis de proteínas y otras funciones fisiológicas importantes. Se conoce que la forma hexavalente del Cr y los compuestos que contienen esta forma química en su estructura son carcinógenos pulmonares bien establecidos. Algunos

estudios afirman que la exposición crónica a cromo induce a la transformación de células epiteliales humanas normales a células malignas [152]. En nuestro estudio la concentración de Cr fue 2,11 veces mayor en la fracción HMM de suero de pacientes CP en pacientes con CP concordando con los resultado de otros autores [154,156].

El Cu, Zn y Mn regulan los niveles y actividades de los antioxidantes enzimáticos. Estos metales son cofactores o iones que estabilizan la estructura de la superóxido dismutasa (SOD), un antioxidante endógeno [228].

Los niveles de Cu suelen ser mayores en pacientes con CP comparado con personas sanas y su concentración está relacionada con el estado y la localización del cáncer [154,156,164,165,175,229,230]. En este estudio, la concentración de Cu en la fracción LMM de suero fue 2,29 veces mayor que en el grupo control. El cobre es un elemento ultra traza esencial en la dieta, y juega un papel muy importante en el metabolismo oxidativo ya que es necesario para la interconversión de iones cúpricos y cuprosos, aunque también contribuye a la liberación de radicales libres [231]. Altos niveles de Cu en suero de pacientes con CP están relacionados con la progresión del tumor por angiogénesis (formación de nuevos capilares a partir de los vasos sanguíneos) para soportar los requerimientos nutricionales por el crecimiento del tumor [131,132]. Bajos niveles de Zn están relacionados con alteración en el ciclo celular y la apoptosis, y pueden afectar a la síntesis de proteínas y a la función de los linfocitos [137].

Los niveles de Cd se encontraron alterados en la orina de pacientes con CP. El cadmio es conocido como un carcinogénico en humanos, una clasificación basada principalmente en estudios ocupacionales de CP [232].

Los niveles de cadmio en orina, suero y sangre de personas fumadoras fueron propuestos como un marcador del desarrollo y progresión de enfermedades pulmonares [233] y también se ha encontrado un aumento en la orina de pacientes con CP [158,159].

Los pacientes con CP presentaron niveles mayores en LBA que en el grupo control. La superóxido dismutasa de manganeso (Mn-SOD) posee un papel importante como antioxidante y supresor tumoral [138]. La Mn-SOD es de importancia para la defensa antioxidante en los pulmones [139]. Varios estudios han descrito la asociación entre el polimorfismo Ala16Val de Mn-SOD y diferentes tipos de cáncer [234–236]. Otros estudios encontraron niveles más altos de Mn en suero del grupo CP de acuerdo a nuestros resultados. Por otro lado, Tan et al, han descrito una disminución de este elemento en orina de CP [159]. Algunos autores reportaron niveles disminuidos de manganeso en LBA de pacientes con enfermedades pulmonares difusas [163], pero no hay antecedente sobre la concentración de manganeso en muestras LBA de pacientes con CP, siendo nuestros resultados los primeros que aparecen en bibliografía.

Con el fin de analizar las inter-relaciones entre elementos, se estudiaron los ratios de las concentraciones de todos los elementos analizados en cada fluido. Así pues, los resultados obtenidos mostraron claras interacciones de V con Mn, Pb y Zn, Cr con Pb en suero, Cd con Cr, Mn, V, Co y Pb en orina y V con Cu en LBA. Varios artículos describen la interacción entre Cu y Zn, concluyendo que altos ratios de Cu/Zn son comunes en el suero de pacientes con CP [160,172,174,178,229,230]. Sin embargo en nuestro estudio no se encontró que esta interacción fuera significativa utilizando los criterios VIP, p-valor, AUC y FC.

Otros autores han encontrado diferencias en el ratio Cd/Zn entre personas fumadoras y no fumadoras, así como entre fumadores con numerosas enfermedades y procesos tumorales [233].

Finalmente, se estudiaron las posibles correlaciones de elementos en los pacientes con CP. Para ello se calculó el coeficiente de correlación de Spearman para evaluar la interdependencia de metales en el organismo sugiriendo la existencia de una homeostasis interconectada. Los coeficientes de correlación de V-Cr ( $r=0.62$ ) en suero, Mn-Fe ( $r=0.7$ ) en orina y Zn-Se ( $r=0.68$ ) en LBA fueron los más próximos a uno, indicando una correlación fuerte entre elementos. Las alteraciones en los niveles de selenio en el organismo están relacionadas con el estrés oxidativo.

El selenio se correlaciona positivamente con el zinc en las muestras de LBA implicado en los numerosos trastornos glucometabólicos [237]. Se conoce que niveles disminuidos de selenio en suero de pacientes CP pueden ser consecuencia del incremento de absorción de este elemento por los tejidos tumorales en respuesta al estrés oxidativo debido a los radicales libres, ya que la GPX es requerida por el tumor para prevenir el daño causado por los ROS. Además el selenio está involucrado en la inhibición de la angiogénesis [125], la mejora de la respuesta inmune [126], el control de la proliferación innecesaria de células [128] y la inhibición de la activación de ciertos factores de transcripción [129].





Review

# The Metallome of Lung Cancer and its Potential Use as Biomarker

Belén Callejón-Leblic<sup>1</sup>, Ana Arias-Borrego<sup>1</sup>, Antonio Pereira-Vega<sup>2</sup>, José Luis Gómez-Ariza<sup>1,\*</sup> and Tamara García-Barrera<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Faculty of Experimental Sciences, University of Huelva, Campus de El Carmen, Research Center on Health and Environment (RENSMA), 21007 Huelva, Spain; belen.callejon@dqcm.uhu.es (B.C.-L.); ana.arias@dqcm.uhu.es (A.A.-B.)

<sup>2</sup> Pneumology Area of Juan Ramón Jiménez Hospital, 21005 Huelva, Spain; antonio.pereira@gmail.com

\* Correspondence: ariza@uhu.es (J.L.G.-A.); tamara@dqcm.uhu.es (T.G.-B.); Tel.: +34-959219968 (J.L.G.-A.); +34-959219962 (T.G.-B.)

Received: 20 December 2018; Accepted: 6 February 2019; Published: 12 February 2019



**Abstract:** Carcinogenesis is a very complex process in which metals have been found to be critically involved. In this sense, a disturbed redox status and metal dyshomeostasis take place during the onset and progression of cancer, and it is well-known that trace elements participate in the activation or inhibition of enzymatic reactions and metalloproteins, in which they usually participate as cofactors. Until now, the role of metals in cancer have been studied as an effect, establishing that cancer onset and progression affects the disturbance of the natural chemical form of the essential elements in the metabolism. However, it has also been studied as a cause, giving insights related to the high exposure of metals giving a place to the carcinogenic process. On the other hand, the chemical species of the metal or metallobiomolecule is very important, since it finally affects the biological activity or the toxicological potential of the element and their mobility across different biological compartments. Moreover, the importance of metal homeostasis and metals interactions in biology has also been demonstrated, and the ratios between some elements were found to be different in cancer patients; however, the interplay of elements is rarely reported. This review focuses on the critical role of metals in lung cancer, which is one of the most insidious forms of cancer, with special attention to the analytical approaches and pitfalls to extract metals and their species from tissues and biofluids, determining the ratios of metals, obtaining classification profiles, and finally defining the metallome of lung cancer.

**Keywords:** lung cancer; metals; homeostasis; ICP-MS; elemental ratios; classification

## 1. Introduction

Cancer is a multifaceted disease and over time, metals, metabolites, and microbes, among others, have been proven to be critically involved in the onset and progression of this disease. In particular, lung cancer (LC) is the second most prominent type of cancer in the world, the first cancer death cause [1], and the five-year survival rate is only 15% [2].

In relation to metals, there are two different points of view to explain their role in the organism during the carcinogenic process, because they can be considered a cause or an effect. The first one is based on the hypothesis that cancer onset and progression disturb the natural chemical form of the essential element in the metabolism. The second one considers that elements are involved in the carcinogenic process because they are a consequence of their high exposure. Moreover, metals also contribute to cancer progression and metastasis [3–7]. On the other hand, the majority of works focus on the estimation of a deficiency state or excess and into a lesser extent in the unbalance episodes in which one element affects the function of others.

Approximately one-third of proteins need the presence of metals as cofactors to develop their function (metalloproteins), and in general, more than 50% of the proteins are influenced by metals [8]. Likewise, metals are responsible for the structure or catalytic properties of proteins, and their link to a molecule is usually determined by the genome [9]. Moreover, elements are essential to maintain human homeostasis and play key roles in systems biology, participating in many cellular processes. Essential metals, which are only required in trace amounts, are crucial for the function of numerous enzymes that are required for fundamental biochemical processes, and non-essential metals can alter the function of some enzymes as well [10]. However, metals are also involved in numerous biological processes such as the transport of oxygen in the blood; this process is mediated by hemoglobin, which contains Fe [11]. The deficiency or excess of any of these elements can lead to disease (e.g., anemia) or deleterious toxic effects, inflammation [12], and cancer [13]. For this reason, the levels of essential metals have to be carefully balanced, and a homeostatic state has to be maintained within the body [12].

On the other hand, a number of non-essential elements can also have important implications on human health. In this way, environmental exposure to As, Cd, Pb, and Ni has carcinogenic consequences [13] due to the activation of oncogenic signaling pathways [14,15] and oxidative stress [13,16,17]. The concentration and activity of enzymatic antioxidants are related to the concentration of elements [18]. Likewise, a disturbed redox status in lung cancer patients has been proven to be related to alterations of Zn, Mn, and Cu, since they regulate the levels and activities of antioxidants (mainly enzymatic ones), and the disturbed redox status may be critical to lung carcinogenesis. In this sense, these metals are cofactors or ions stabilizing the molecular structure of superoxide dismutase (SOD), which is an endogenous antioxidant [19]. Moreover, the type of biological fluid influences both alterations in the metal profile and relationships with redox status parameters [18].

Although the interaction of elements has not been extensively researched, it is known that metals can influence the function of others through antagonistic or synergistic mechanisms, as is the case of the competitive interaction of Zn and Cd for many enzymes due to their very similar atomic structure [20]. It has been pointed out that this interaction has dramatic effects on many zinc-containing enzymes that are involved in important biological processes leading to cancer onset [21]. Another important interaction between metals that has been described in the literature in connection with lung cancer is that of Cu and Zn. Decreased Zn and elevated Cu concentrations (high Cu:Zn ratio) in serum are the most successfully used predictor variables to distinguish between lung cancer (LC) and healthy controls (HC) [18,22–24]. Cu is an essential trace element in the diet, and has a pivotal role in enzymes related to oxidative metabolism, since it is needed for the interconversion of cupric and cuprous ions [25], but also contributes to the generation of free radicals [25]. Zn is a constituent of over 300 enzymes that play vital roles in gene expression [26]. Increased levels of Cu in serum of LC have been related to tumor progression through angiogenesis (the formation of new capillaries from existing blood vessels) to meet the nutritional requirements of a growing tumor [27,28]. Decreased levels of Zn have been related to alterations in the cell cycle and apoptosis [29,30], and the inability to block the further absorption of Cu [31]. Low serum Zn concentrations may affect protein synthesis and delay the repair processes of the body because of possible influences of depleting Zn-binding protein and metalloenzymes [32]. Moreover, it seems to be correlated with lymphocyte dysfunction [33]. Moreover, Zn<sup>2+</sup> acts a cofactor for histone deacetylases (HDACs), which are a family of enzymes that are responsible for protein acetylation and deacetylation. An anomalous histone acetylation, and consequently an alteration in the expression of HDACs, is related to cancer [34–39]. Likewise, an overexpression of HDAC1 and HDAC2 has been found in LC [40], and HDAC8 knockdown leads to the inhibition of cell proliferation in lung and other types of cancer [41]. Thus, an upregulation in concentrations of Zn<sup>2+</sup> could be related to perturbation in the action of HDACs.

Synergistic interactions have also been described as in the case of Zn and Se, whose depressed levels seem to be involved in carcinogenesis by increasing DNA damage and oxidative stress, decreasing antioxidant defense capacity, inhibiting DNA repair mechanisms, and declining immune function [42,43]. The chemopreventive character of Se for most cancers has been extensively reviewed,

mostly in relation to its antioxidative role via glutathione peroxidase (GSH-Px) [44]. It seems that the depressed levels of Se in serum from LC patients might be a consequence of increased uptake by tumoral tissues in response to oxidative stress mediated by free radicals, since GSH-Px is required by the tumor tissues to prevent the damage caused by free radicals. Se is also involved in inhibiting angiogenesis [45] and enhancing the immune response [46], and is a well-documented antagonist against toxic metals [47]. Se also controls the unnecessary proliferation of cells [48] and inhibits the activation of certain transcription factors [49]. Mn superoxide dismutase (Mn-SOD), as a single superoxide radical scavenger in mitochondria, may have a key role in preventing cells as an antioxidant and tumor suppressor [50]. In the lungs, Mn-SOD is considered to be of critical importance for antioxidant defense [51]. A number of studies have defined associations between the Mn-SOD Ala16Val polymorphism and different cancer types [52–54]. It has been stated that there is a disruption in Mn homeostasis during cancer development, resulting in mobility from one compartment to other [18].

Ni is a carcinogenic agent that has been implicated as a pulmonary carcinogen in tobacco smoke [55]. Nickel causes oxidative DNA damage. [56]. Cr is associated with glucose and lipid metabolism, protein synthesis, and other important physiological functions [57]. On the other hand, the hexavalent form of chromium and its containing compounds are well-established lung carcinogens. Chronic exposure of the normal human epithelial cells is able to induce malignant cell transformation, which is the first stage of metal carcinogenesis [58]. Some authors have reported on the anticancer properties of V, and showed that the complexes of these metals are the new metal-based drugs that are used in the treatment of several cancers, such as lung cancer [59]. Other authors have demonstrated the influence of vanadium compounds in the cytotoxicity of some ligands in human lung cancer-cultured cells [60].

The “metallome” can be defined as the ensemble of all the biomolecules in a system, which bind a given metal ion or an inorganic element, or are affected by that element. A number of subsets of a metallome can then be defined based on the nature of the biomolecules interacting with the metal ions and the inorganic elements in general [61]. Williams defined the “metallome” as the distribution of elements, or concentration at equilibrium of free metallic ions or free elements in a cellular compartment, cell, or organism [62]; the metallome is related to the identity and/or quantity of metals/metalloids and their chemical species [8,63,64]. In this way, metallomics considers that the identification of a metal cofactor in a protein is critical to finally assigning its function as well as placing it in the context of known cellular pathways [65,66]. In metallomics, metal or metalloids are used as tags or heteroatomic markers to measure metallomolecules in complex matrices, usually by means of a chromatographic separation step coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) [67–69]. On the other hand, considering that chemical species can be defined as “the specific forms of an element defined to isotopic composition, electronic, or oxidation state and/or complex or molecular structure” [70], metallomics, metal-metabolomics, and chemical speciation are completely imbricated.

## 2. Metal Dyshomeostasis in Lung Cancer: Biofluids and Tissues

The relationship between metal exposure and lung cancer (LC) has been deeply studied, especially in occupational medicine and environmental studies. The use of metals for diagnosis is more scarce, but several authors have classified lung cancer patients and healthy people using metals content in tumor tissues [71,72], serum, hair [24,73], urine [74], and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) [75], because they found statistically significant differences from the normal distribution of elements for the diagnosis of LC. Then, in the literature, it is possible to find levels of essential and non-essential elements in different biofluids and tissues of lung cancer (LC) patients, for example in plasma [76,77], serum [18,24,42,75,78], urine [74,75,79], pleural effusion [80], or hair [24,73], and recently in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) for the first time [75]. Table 1 has a collection of the typical concentrations in tissues and biofluids of LC patients and HC that can be found in the literature.

**Table 1.** Typical concentrations of metals in biofluids and tissues of lung cancer (LC) patients.

Element	Sample	Average Concentration (ug·L <sup>-1</sup> )				FC (LC/HC)	P	Analytical Technique	Reference
		LC	SD	HC	SD				
Ag	Pleural effusion	0.2 ± <sup>1</sup>	-	0.18 ± <sup>1</sup>	-	1.11	N.S. <sup>a</sup>	ICP-MS	[80]
	Hair	0.547	0.696	0.722	1.416	0.76	p < 0.05 <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
Al	Pleural effusion	91.1 ± <sup>1</sup>	-	199.3 ± <sup>1</sup>	-	0.46	N.S. <sup>a</sup>	ICP-MS	[80]
	Hair	1879	2405	12820	4104	0.15	N.SP.	ICP-AES	[24]
	Hair	16.46	16.31	11,366	12,685	1.45	N.S. <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
	Urine	189.11	58.94	220.8	147.3	0.86	p < 0.01 <sup>b</sup>	ICP-AES	[79]
As	Pleural effusion	3.95 ± <sup>1</sup>	-	2.66 ± <sup>1</sup>	-	1.48	N.S. <sup>a</sup>	ICP-MS	[80]
	Plasma	2.49	1.35	2.74	1.91	0.91	N.S. <sup>b</sup>	ICP-MS	[76]
Au	Hair	0.458	1.269	0.558	0.742	0.82	N.S. <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
	Hair	2.744	6.471	0.687	1.218	3.99	p < 0.05 <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
B	Hair	277	386	1896	953	0.15	N.SP.	ICP-AES	[24]
	Plasma	65.79	38.06	70.13	35.81	0.94	N.S. <sup>b</sup>	ICP-MS	[76]
	Hair	1.764	2.058	1.136	1.915	1.55	N.S. <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
Ba	Hair	96,780	117,900	156,900	114,800	0.62	N.SP.	ICP-AES	[24]
	Plasma	7.78	5.98	6.42	5.07	1.21	N.S. <sup>b</sup>	ICP-MS	[76]
	Hair	1.461	1.972	1.396	1.513	1.05	N.S. <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
Be	Hair	0.012	0.017	0.038	0.074	0.32	p < 0.05 <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
Bi	Hair	0.872	0.916	0.445	0.718	1.96	p < 0.05 <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
Ca	Serum	75,620	11,140	93,780	6851	0.81	N.SP.	ICP-AES	[24]
	Hair	969,300	944,700	1,215,000	822,200	0.80	N.SP.	ICP-AES	[24]
	Hair	68.25	61.33	30.812	18.809	2.22	p < 0.05 <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
Cd	Hair	51	48	245	501	0.21	N.SP.	ICP-AES	[24]
	Hair	0.209	0.176	0.316	0.426	0.66	p < 0.05 <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
	Urine	10.06	2.66	6.69	5.11	1.50	p < 0.01 <sup>b</sup>	ICP-AES	[79]
	Serum	0.18 <sup>1</sup>	0.04	0.07 <sup>1</sup>	0.00	2.50	N.S. <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
	Urine	1.58 <sup>1</sup>	0.21	0.55 <sup>1</sup>	0.07	2.86	p < 0.05 <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
	BALF	0.14 <sup>1</sup>	0.04	0.08 <sup>1</sup>	0.02	1.82	N.S. <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
Ce	Hair	2.724	8.11	0.958	2.886	2.84	p < 0.05 <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
Cd	Hair	51	48	245	501	0.21	N.SP.	ICP-AES	[24]
	Hair	0.209	0.176	0.316	0.426	0.66	p < 0.05 <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
	Urine	10.06	2.66	6.69	5.11	1.50	p < 0.01 <sup>b</sup>	ICP-AES	[79]
	Serum	0.18 <sup>1</sup>	0.04	0.07 <sup>1</sup>	0.00	2.50	N.S. <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
	Urine	1.58 <sup>1</sup>	0.21	0.55 <sup>1</sup>	0.07	2.86	p < 0.05 <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
	BALF	0.14 <sup>1</sup>	0.04	0.08 <sup>1</sup>	0.02	1.82	N.S. <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
Ce	Hair	2.724	8.11	0.958	2.886	2.84	p < 0.05 <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
Co	Pleural effusion	0.24 ± <sup>1</sup>	-	0.17 ± <sup>1</sup>	-	1.41	N.S. <sup>a</sup>	ICP-MS	[80]
	Hair	33	36	57	47	0.58	N.SP.	ICP-AES	[24]
	Hair	3.131	11,057	0.392	0.467	7.99	p < 0.05 <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
	Serum	0.46	0.07	0.27	0.07	1.71	p < 0.05 <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
	Urine	0.43	0.02	0.65	0.05	0.67	p < 0.05 <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
	BALF	0.008	0.003	0.001	0.001	5.60	p < 0.05 <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
Cr	Pleural effusion	1.37 ± <sup>1</sup>	-	0.98 ± <sup>1</sup>	-	1.40	N.S. <sup>a</sup>	ICP-MS	[80]
	Serum	1706	1326	111	164	15.37	N.SP.	ICP-AES	[24]
	Hair	ND	-	814	401	-	N.SP.	ICP-AES	[24]
	Plasma	33.4	7.64	31.47	8.55	1.06	N.S. <sup>b</sup>	ICP-MS	[76]
	Hair	2.492	4.021	0.934	1.016	2.67	p < 0.05 <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
	Urine	44.61	14.44	23.08	20.52	1.93	p < 0.01 <sup>b</sup>	ICP-AES	[79]
	Serum	0.96	0.15	0.51	0.21	1.89	p < 0.05 <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
	BALF	1.90	0.17	1.91	0.27	0.99	N.S. <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
Cu	Hair	0.30	0.07	0.19	0.04	1.58	N.S. <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
	Hair	0.264	0.284	0.246	384	1.07	N.S. <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
	Pleural effusion	850.2 ± <sup>1</sup>	-	910.5 ± <sup>1</sup>	-	0.93	N.S. <sup>a</sup>	ICP-MS	[80]
	Serum	1392	278	929	232	1.50	N.SP.	ICP-AES	[24]
	Hair	9827	1526	11,540	1237	0.85	N.SP.	ICP-AES	[24]
	Plasma	1256.3	214.7	1007	197.4	1.25	p < 0.01 <sup>b</sup>	ICP-MS	[76]
	Serum	1518.8	69.9	1264.7	57.2	1.20	N.S. <sup>**</sup>	AAS	[81]
	Hair	24.45	18.47	15,753	16.73	1.55	p < 0.05 <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
	Urine	73.25	24.04	29.93	21.87	2.45	p < 0.01 <sup>b</sup>	ICP-AES	[79]
	Serum	1455.3	394.01	953.25	95.325	1.53	p < 0.05 <sup>b</sup>	AAS	[82]
Fe	Serum	1428.7	51.5	1251.1	56.0	1.14	p < 0.05 <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
	Urine	20.5	2.0	15.2	1.8	1.35	N.S. <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
	BALF	4.93	0.96	3.55	1.54	1.39	N.S. <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
	Pleural effusion	747.7 ± <sup>1</sup>	-	1049 ± <sup>1</sup>	-	0.71	N.S. <sup>a</sup>	ICP-MS	[80]
	Serum	2168	938	1988	913	1.09	N.SP.	ICP-AES	[24]
	Hair	23,100	13,550	16,180	4619	1.43	N.SP.	ICP-AES	[24]
	Plasma	1298.2	642.6	1469.1	514.2	0.88	N.S. <sup>b</sup>	ICP-MS	[76]
	Hair	9.65	6.64	25,052	22.93	0.39	p < 0.05 <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
	Urine	309.32	85.05	310.4	242.1	1.00	N.S. <sup>b</sup>	ICP-AES	[79]
	Serum	6151.7 <sup>3</sup>	981.3	2947.9 <sup>1</sup>	470.8	2.09	p < 0.05 <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
Ga	Urine	50.5 <sup>1</sup>	4.2	35.5 <sup>1</sup>	3.6	1.42	p < 0.05 <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
	BALF	21.7 <sup>1</sup>	5.1	39.8 <sup>1</sup>	20.1	0.55	N.S. <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
	Hair	0.288	0.59	0.25	0.23	1.15	p < 0.05 <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
	Hg	Hair	1.233	1.367	0.585	0.713	2.11	p < 0.05 <sup>b</sup>	ICP-MS
K	Hair	15.32	18.66	10.701	9.25	1.43	p < 0.05 <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]

Table 1. Cont.

Element	Sample	Average Concentration (µg.L <sup>-1</sup> )				FC (LC/HC)	p	Analytical Technique	Reference
		LC	SD	HC	SD				
La	Hair	369	381	728	372	0.51	N.SP.	ICP-AES	[24]
Li	Hair	0.595	0.67	571	0.586	0.00	N.S. <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
Mg	Serum	20,160	3770	24,580	2655	0.82	N.SP.	ICP-AES	[24]
	Hair	77,330	93,220	141,800	107,900	0.55	N.SP.	ICP-AES	[24]
	Hair	28.92	24.203	31.921	21.315	0.91	N.S. <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
Mn	Pleural effusion	0.83 <sup>*1</sup>	-	0.87 <sup>*1</sup>	-	0.95	N.S. <sup>a</sup>	ICP-MS	[80]
	Hair	2523	1898	1130	1714	2.23	N.SP.	ICP-AES	[24]
	Plasma	5.29	5.06	4.22	2.88	1.25	N.S. <sup>b</sup>	ICP-MS	[76]
	Hair	1.82	2.16	1.144	1.119	1.59	N.S. <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
	Urine	4.74	3.23	6.95	5.43	0.68	p < 0.01 <sup>b</sup>	ICP-AES	[79]
	Serum	1.74 <sup>1</sup>	0.08	1.14 <sup>1</sup>	0.14	1.52	p < 0.05 <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
	Urine	3.48 <sup>1</sup>	0.23	4.09 <sup>1</sup>	0.58	0.85	N.S. <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
	BALF	0.69 <sup>1</sup>	0.09	0.46 <sup>1</sup>	0.06	1.51	p < 0.05 <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
Mo	Pleural effusion	1.23 <sup>*1</sup>	-	1.05 <sup>*1</sup>	-	1.17	N.S. <sup>a</sup>	ICP-MS	[80]
	Hair	158	221	132	75	1.20	N.SP.	ICP-AES	[24]
	Serum	0.73 <sup>1</sup>	0.22	0.43 <sup>1</sup>	0.06	1.67	p < 0.05 <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
	Urine	32.8 <sup>1</sup>	2.9	25.8 <sup>1</sup>	3.5	1.27	N.S. <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
BALF	0.11 <sup>1</sup>	0.02	0.09 <sup>1</sup>	0.02	1.14	N.S. <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]	
Na	Hair	23.316	30.458	21.378	15.79	1.09	N.S. <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
Ni	Hair	117	168	454	907	0.26	N.SP.	ICP-AES	[24]
	Plasma	14.35	11.09	13.36	9.43	1.07	N.S. <sup>b</sup>	ICP-MS	[76]
	Hair	1.126	0.8	0.58	0.547	1.94	p < 0.05 <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
	Urine	59.378	8.21	21	12.7	2.83	p < 0.01 <sup>b</sup>	ICP-AES	[79]
P	Hair	176,800	3,891,000	203,100	44,160	0.87	N.SP.	ICP-AES	[24]
	Serum	103,700	17,600	116,100	32,760	0.89	N.SP.	ICP-AES	[24]
Pb	Pleural effusion	0.63 <sup>*1</sup>	-	1.04 <sup>*1</sup>	-	0.61	N.S. <sup>a</sup>	ICP-MS	[80]
	Hair	2364	2302	4476	7295	0.53	N.SP.	ICP-AES	[24]
	Plasma	10.61	5.63	9.31	5.94	1.14	N.S. <sup>b</sup>	ICP-MS	[76]
	Hair	8.577	19.88	5.09	6.198	1.69	N.S. <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
	Serum	1.54 <sup>1</sup>	0.18	1.11 <sup>1</sup>	0.11	1.38	N.S. <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
	Urine	7.37 <sup>1</sup>	0.46	6.20 <sup>1</sup>	0.48	1.19	N.S. <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
	BALF	0.47 <sup>1</sup>	0.13	0.16 <sup>1</sup>	0.02	2.98	p < 0.05 <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
Rb	Hair	0.47	0.753	0.251	0.3	1.87	p < 0.05 <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
Rh	Hair	0.555	0.614	0.414	0.486	1.34	p < 0.05 <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
Sb	Plasma	4.8	3.36	5.93	3.55	0.81	p < 0.05 <sup>b</sup>	ICP-MS	[76]
	Hair	0.988	0.77	0.235	0.344	4.20	p < 0.05 <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
Sc	Hair	0.134	0.545	0.027	0	4.96	p < 0.05 <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
Se	Plasma	69.88	15.88	77.95	17.38	0.90	p < 0.05 <sup>b</sup>	ICP-MS	[76]
	Hair	13.7	19.784	20.135	21.042	0.68	N.S. <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
	Urine	15.026	8.33	5.36	2.78	2.80	p < 0.01 <sup>b</sup>	ICP-AES	[79]
	Serum	191.9 <sup>1</sup>	6.6	187.8 <sup>1</sup>	5.9	1.02	N.S. <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
	Urine	51.6 <sup>1</sup>	6.4	36.5 <sup>1</sup>	4.5	1.42	N.S. <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
	BALF	3.54 <sup>1</sup>	0.58	3.43 <sup>1</sup>	0.52	1.03	N.S. <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
Sn	Pleural effusion	0.36 <sup>*1</sup>	-	0.33 <sup>*1</sup>	-	1.09	N.S. <sup>a</sup>	ICP-MS	[80]
	Hair	33.94	24.72	21.509	19.48	1.58	N.S. <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
Sr	Serum	753	209	762	253	0.99	N.SP.	ICP-AES	[24]
	Hair	3037	2663	4894	3889	0.62	N.SP.	ICP-AES	[24]
	Plasma	24.4	12.8	23.9	13.2	1.02	N.S. <sup>b</sup>	ICP-MS	[76]
	Hair	1.91	1.914	1.455	1.68	1.31	N.S. <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
Ti	Plasma	48.5	24.5	44.5	30.1	1.09	N.S. <sup>b</sup>	ICP-MS	[76]
	Hair	12.64	19.128	2.079	4.46	6.08	p < 0.05 <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
V	Pleural effusion	0.22 <sup>*1</sup>	-	0.36 <sup>*1</sup>	-	0.61	N.S. <sup>a</sup>	ICP-MS	[80]
	Plasma	3.54	1.23	3.57	1.18	0.99	N.S. <sup>b</sup>	ICP-MS	[76]
	Hair	1.83	2.29	1.047	1.74	1.75	p < 0.05 <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
	Serum	0.17	0.04	0.05	0.02	3.77	N.S. <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
	Urine	1.34	0.09	1.31	0.09	1.02	N.S. <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
	BALF	1.38	0.03	1.24	0.04	1.11	p < 0.05 <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
Y	Hair	10	33	ND	-	-	N.SP.	ICP-AES	[24]
	Pleural effusion	351.7 <sup>*1</sup>	-	545.7 <sup>*1</sup>	-	0.64	p < 0.05 <sup>a</sup>	ICP-MS	[80]
Zn	Hair	151,380	37,160	171,100	41,160	0.88	N.SP.	ICP-AES	[24]
	Plasma	702.4	129.2	772.2	191.4	0.91	p < 0.01 <sup>b</sup>	ICP-MS	[76]
	Serum	836.87	45.77	934.93	84.99	0.90	N.S. <sup>a</sup>	AAS	[81]
	Hair	53.22	60.3	109.763	95.33	0.48	p < 0.05 <sup>b</sup>	ICP-MS	[73]
	Urine	1519.8	194.8	568.9	544.7	2.67	p < 0.01 <sup>b</sup>	ICP-AES	[79]
	Serum	1136.4	67.0	917.5 <sup>1</sup>	75.5	1.24	p < 0.05 <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
	Urine	637.0	89.7	572.3 <sup>1</sup>	115.1	1.11	N.S. <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
	BALF	35.1	13.4	15.0 <sup>1</sup>	5.7	2.33	p < 0.05 <sup>c</sup>	ICP-QQQ-MS	[75]
	Serum	29	12	33	14	0.88	N.SP.	ICP-AES	[24]
	Serum	784.56	130.36	902.24	130.76	0.87	p < 0.05 <sup>b</sup>	AAS	[82]

BALF: Bronchoalveolar Lavage Fluid; LC: Lung Cancer; HC: Healthy Control; ND: Not Detected; SD: Standard Deviation; FC: Fold Change. N.S.: Not significant, N.SP.: Not specified. Average Concentration: Arithmetic Mean, Gaussian Distribution, \* Data expressed on the median.; <sup>1</sup>: Non-parametric method; <sup>a</sup>: Kruskal–Wallis test; <sup>b</sup>: Student T-test; <sup>c</sup>: Mann–Whitey U-test; \*\* Statistical test not specified.

It is well-known that the use of biomarkers such as metals in hair, nails, blood (serum, plasma, or whole blood) or urine can be used to detect abnormal levels in the human body as a consequence of acute (biofluids) or long-term exposure (hair and nails). The type of biosample used in the study is also important, because metal profiles and their relationships with redox status parameters are different [18]. Likewise, serum seems to be better for Cu and whole blood for Mn, while in the case of Zn, it is not relevant. For the determination of the relationships between trace elements and redox status parameters, authors have recommended the use of different samples [18]. On the other hand, there are several papers describing the analysis of metals in bronchoalveolar lavage fluid [83,84], but only one is related to lung cancer patients [75].

BALF is obtained during the exploratory study of patients with lung diseases, and provides constituents' information on the cellular and biochemical epithelial surface of the lower respiratory tract through the instillation and later aspiration of liquid in one or more lung segments. It is estimated that BALF samples take a million cells (1% of the lung surface) to yield about one ml of pulmonary secretions in the actual total recovered liquid [85]. Since BALF is in close interaction with lung tissue, it is a more representative sample of lung status than other biofluids such as blood or urine.

In serum, decreased Zn and elevated Cu concentrations (high Cu:Zn ratio) are the most common biomarkers of LC [18,24,42,81,82,86,87]. The concentration of Cu [88] and the Cu:Zn ratio [22,77] have also been demonstrated to be increased in the plasma of LC patients. The concentration of copper is related to the cancer state and localization, and is primarily found in serum (95% as part of the oxidative enzyme ceruloplasmin, and the remainder is loosely bound to albumin) [89]. On the other hand, low serum levels of Zn are usually correlated with high levels of Zn in tumor autopsy, which suggest that the metabolic requirements of this element by LC cells are taken from serum [90]. Ren et al. also found that Cu, Cr, P, and Zn were found to be significantly different between LC and HC [24]. As can be seen in Table 1, there are some contradictory results regarding the decreased concentration of Zn, which in some papers in the literature have been found to be increased in serum, urine, and BALF. However, the most important fact is that the Cu:Zn ratio is increased.

Lin et al. [76] found higher levels of Mn in serum from the LC group, but there are contradictory results [18,42]. Among other elements, increased concentrations of Ti, Ni, and Cu, but lowered concentrations of V, Cr, Mn, Fe, Co, Zn, Se, and Br have been determined in the serum of LC patients [42].

However, other studies revealed higher concentrations of V in the serum of LC patients [75]. Finally, Cr is another element that is usually increased in the serum of LC patients [24,75,76].

The determination of 11 elements in the BALF of LC patients demonstrated that increased levels of Mn can be used as a biomarker, since it showed a VIP (Variable Importance on the Projection) value of 1.29, a fold change of 1.5, a p-value of 0.003, and an AUC (Area Under the Curve) value of 0.75 [75]. Other authors also reported decreased levels of manganese in BALF from patients with diffuse lung diseases [91] or calves with mycoplasma bronchopneumonia [92]. On the other hand, the determinations of metals in the pleural effusion (PE) of smokers with lung cancer revealed lower Zn concentrations [80]. On the other hand, an adequate Zn intake has been associated with a decreased risk of smoking-associated obstructive lung disorders [93]. Moreover, low Zn levels may result in high glucose levels in the PE of smokers with LC due to a decreased glucose metabolism [80].

In urine, Tan et al. demonstrated that Fe, Mn, and Al were significantly decreased in the urine of LC patients, while Se, Ni, Cu, Zn, Cd, and Cr increased [74,79]. Voyatzoglou et al. [23] reported that patients with lung cancer and hyperzincuria had more widespread disease and a shorter life expectancy compared with patients with normal urinary zinc levels. On the other hand, a recent study revealed that the concentration of Cd, which is a recognized carcinogen, was increased in the urine of LC patients [75].

The concentration of elements has also been determined in the hair of LC patients versus HC, showing that the levels of Zn, Mg, Fe, and Se were higher in LC patients, while Ca, Sn, and Na were

lower [73]. Other authors also described that Al, B, Cr, P, and Sr were significant variables for the classification between LC versus HC [24].

The study of metals in the tumor tissues of lung cancer patients showed decreased Fe and Mn levels in malignant versus normal lung tissue giving the best classification. These two elements correctly identified 10 of the 13 malignant tissues with an accuracy of 77%. The inclusion of other elements, especially Cu, but also others such as Ca, V, Fe, Cu, Zn, Se, Br, Sr, Hg, As, and Mo resulted in the correct grouping of 100% of samples [71]. Other authors found that the concentrations of P, Ti, and Pb increased in LC patients versus HC, while the levels of Ca, Fe, Cu, and Zn decreased [72]. Other authors reported that the levels of studied elements showed a trend of accumulation in cancer tissues [88]. Moreover, several authors found differences between concentrations of several metals according to sex [72] and age [94] in the tumor tissues of LC patients.

In relation with the analytical techniques used in these studies, most elemental determinations in biofluids have been performed by atomic absorption spectroscopy (AAS) [81–83,87,91], particle-induced X-ray emission [95], energy-dispersive X-ray fluorescence [96], inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) [24,74,79], or inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) [73,76,77,80,84]. The main advantage of using an ICP-MS equipped with a triple quadrupole is the elimination of interferences by operating in either standard single quadrupole (SQ) mode or triple quadrupole (ICP-QQQ-MS). For instance, in the case of selenium, great advantages can be obtained with an ICP-QQQ-MS, because the signal of  $^{80}\text{Se}$  in oxygen mode ( $^{96}\text{SeO}^+$ ) would overlap with signals such as  $^{96}\text{Zr}^+$ ,  $^{96}\text{Mo}^+$ , or  $^{96}\text{Ru}^+$  in a conventional ICP-MS, but with the ICP-QQQ-MS, this drawback is overcome through eliminating these elements in the first quadrupole [75].

### 3. Inter-Element Ratios and Correlations as Biomarkers of Lung Cancer

The importance of metal homeostasis and metals interactions in biology has been extensively investigated [47]. Regarding lung cancer disease, the majorities of works have focused on the estimation of a deficiency state or excess, and have examined the unbalanced episodes in which the excess of one element affects the function of other to a lesser extent. Although the interplay of elements is rarely reported, it is possible to find two different ways to evaluate the interactions of metals based on the metals' ratios and correlation coefficients. As commented before, the Cu:Zn ratio has been demonstrated to be increased in the serum [18,23,24,42,81,82,86,87], plasma [22,77], whole blood [18], urine [23], hair [24], and pleural effusion [80] of lung cancer patients against healthy controls.

A recent study of our group demonstrated that the ratios between elements were important biomarkers for lung cancer disease, including: V/Mn, V/Pb, V/Zn, Cr/Pb in serum, Cr/Cd, Mn/Cd, V/Cd, Co/Cd, Cd/Pb in urine and V/Cu in BALF. These ratios reflect the dyshomeostasis of metals that takes place. Taken into account that cancerous and normal tissues differ significantly in their cell composition, other authors measured for each metal the ratio to K, since it is the most abundant intracellular cation [88]. The results showed that the Zn/K ratio was reduced in LC and HC, whereas Cu/K slightly increased [88]. The ratio between Cd and Zn has also been found to be different between smokers and nonsmokers, and it is also different among smokers for several different diseases and cancers [97].

On the other hand, several metals are correlated to others, suggesting also the existence of an interconnected homeostasis in lung cancer [75], as can be seen in Table 2. In this way, selenium is positively correlated with zinc in BALF samples of LC. The antioxidant properties of selenium are well-known, and alterations of this element can be related to oxidative stress. In this work, selenium is positively correlated with zinc in BALF samples, which is implicated in glucometabolic disorders [98]. Cobalt and copper are also positively correlated in BALF. The function of cobalt in the body is to be a cofactor of vitamin B12, but in the form of labile ions, it is able to generate reactive oxygen species, such as copper and iron [99].

**Table 2.** Significant correlations between elements in the biofluids and tissues of lung cancer patients.

	P	S	Ti	Cr	Se	Mn	Fe	Hg	V	Zn	Pb	Cu	Co	Mo	
P	Tissue [72]														
S															
Ti	Tissue [72]														
Cr	Tissue [72] BALF [75] Hair [73] Urine [73]														
Se	Tissue [72] BALF [75]														
Mn	Tissue [72] Urine [73]														
Fe	Urine [75]														
Hg															
V	BALF [75]														
Zn															
Pb															
Cu	BALF [75]														
Co	BALF [75]														
Mo	BALF [75]														

BALF: Bronchoalveolar Lavage Fluid.

#### 4. Selenometabolites and Selenoproteins and Their Role in Lung Cancer

One of the most known elements for its beneficial effects on health and antagonistic protective action against many pollutants is selenium. However, selenium is essential only in a narrow range of concentrations, and the chemical form also determines its essentiality/toxicity. The active center of selenoproteins (with selenocysteiny residues) such as glutathione peroxidase and other selenoenzymes is (-SeH), but selenium can also be present in the living body as selenium-containing proteins (with selenomethionyl residues, ie selenoalbumin), inorganic selenium, selenoamino acids, and methylated selenium [100]. The selenium species that is most abundant in the bloodstream is selenoprotein P (SeP), and its concentration is a good indicator of Se status in humans, while extracellular glutathione peroxidase (eGPx) is a complementary marker of selenium status in several clinical studies [101]. Moreover, Se-proteins are interrelated, because Se bound to albumin (SeAlb) is assumed to be transported to the liver for the new synthesis of SeP and GPx, which are then released into the bloodstream. The concentration of selenium in human serum is about 90 ng·g<sup>-1</sup>, and this elements occurs as SeP > Selenoalbumin (SeAlb) > GPx > SeO<sub>3</sub><sup>2-</sup> [102]. As previously commented, selenium is part of the enzyme glutathione peroxidase (GPx), which is considered the main agent against free radicals, as an anticancer, and inhibits the toxicity of some xenobiotics [103]. Until now, only 25 selenoproteins are known in humans, including four types of glutathione peroxidase (GPX1, GPX2, GPX3, and GPX4) and two thioredoxin reductases (TXNRD1, TXNRD2), but the function of many others is still unknown [104].

Selenium has been studied previously in relation to cancer from several points of view. On the one hand, it has been shown that there is a decrease in the risk of lung cancer in populations where selenium levels are high [105]. To this end, selenium levels in plasma samples from 372 lung cancer patients were determined by SeP determination using the ELISA method [105]. In another study, serum selenium levels were determined in 95 patients with lung cancer and the genotypes of four selenoprotein genes (GPX1, GPX4, TXNRD2, and SEP15) were determined, demonstrating that a selenium level less than 60 µg·L<sup>-1</sup> is associated with a higher risk of lung cancer [106].

On the other hand, the chemopreventive character of selenium against cancer has been studied. In this way, it has been shown that selenium supplements reduce the mortality caused by several types of cancer, including lung cancer [107]. The molecular mechanism is not completely known, although different biological and biochemical processes have been identified [108], demonstrating that the effects observed at the molecular, cellular, and systemic levels include the expression of genes and the direct alteration of proteins [109]. The effects of selenium depend on its concentration, since low concentrations are absolutely necessary for cell growth, but moderate to high concentrations inhibit it. This inhibition of growth is tumor-specific, and selenium induces apoptosis in malignant cells at concentrations that do not affect the viability of normal cells [110]. Selenium species can affect carcinogenesis in different stages depending on the chemical species of selenium that is administered.

Several studies have suggested that polymorphisms in the selenoprotein gene of 15 kDa (SEP15) can alter the interaction of selenium with this protein, which is associated with an increase in susceptibility to various types of cancer [111], including LC [112]. The 15-kDa selenoprotein (SEP15) and other members of the thioredoxin family [113] are a type of catalytic agent that can regulate cellular redox reaction and reduce accumulated oxidative stress, which correlates with cell death and oncogenesis [114]. Finally, the relationship between the CASP8, MMP1, IL10, and SEPS1 genes and the risk of non-small cell lung cancer have also been demonstrated [115].

#### 5. Chemical Species, Metal-Metabolites, and Metalloproteins

It is well-known that the chemical form of an element determines its toxicity and biological activity, as well as its mobility across different biological compartments. On the other hand, metallobiomolecules play key roles in the onset and progression of several diseases, in particular in lung cancer, and for this reason, they may be used as biomarkers of diagnosis and prognosis, as well as in therapies. Likewise, the design of the therapies based on metalloproteins is a growing research

area [116]. For instance, the targeting of the zinc finger proteins by miRNAs, which act as a tumor suppressor by reducing cell proliferation, migration, and invasion as well as inducing apoptosis in human glioblastoma cell lines and glioma stem cells [117].

In this sense, there are few works related with the determination of metallobiomolecules in cancer, and even less in relation to lung cancer. In this context, the importance of metallothioneins (MT) in tumor formation, progression, and drug resistance has been proven [118]. For this reason, MTs may provide potential promising markers for cancer. MTs are high-content cysteine proteins, which play critical roles in homeostasis and protection against heavy metals, DNA damage, and oxidative stress, acting as antioxidants against free radicals and oxidative stress. Moreover, MTs control the homeostasis of the Cu/Zn ratio, which is essential in cell proliferation and differentiation [118]. Different isoforms of these metallothioneins (MTs) have been determined in the lung by studying related genes by means of the analysis of the reaction in the polymerase chain with reverse transcriptase (RT-PCR) [119,120]. The down-expression of MTs isoforms (MT1A, MT2A, MT1E, and MT1G), which are related to gene methylation, has been described in lung cancer [119].

On the other hand, the metalloprotein profiles in human plasma have also been described using a flow fractionation system with asymmetric flow field coupled to inductive coupling plasma with mass detector (AF4-ICP-MS). This study demonstrated that the profiles of Mn, Ni, Cu, Zn, I, and Ba are different in patients with lung cancer and controls, and several metalloproteins have been identified by coupling nanochromatography and ion trap mass spectrometry with an electrospray ionization source/mass spectrometry [77]. In particular, the Zn metallobiomolecules have been studied in childhood brain tumors [117].

Under our knowledge, the speciation of elements should be performed in samples of LC patients. As discussed before, elements can be mainly present as labile ions or complexed with low molecular mass ligands, or in the form of metalloproteins. In a study of our group, an analytical metallomic approach based on the non-denaturing precipitation of proteins (NDPP) was optimized for the fractionation of high molecular mass (HMM) and low molecular mass (LMM) metal species, in order to distinguish between metal species that affect the biological activity and toxicological potential of the elements [75]. We concluded that several metals are good biomarkers when they are related to the labile ions, complexed with low molecular mass ligands, or in the form of metalloproteins (i.e., V and Cr in HMM and Cu in LMM), which were described for the first time. The analytical methodology was based on the use of an inductively coupled plasma triple quadrupole mass spectrometry (ICP-QQQ-MS), which has not been previously used in biofluids from LC patients [75].

## 6. Gaps and Future

Significant evidences can be found in the literature in relation to the key role of metals in the onset and progression of cancer, particularly in lung cancer. This opens the possibilities of using them as biomarkers of early diagnosis, prognosis, or therapy. However, intense research should be performed in connection with the differentiation between chemical species, metalloproteins, and the interplay of elements on the basis of metals ratios and correlations. The Cu:Zn ratio has been demonstrated to be the best inter-element biomarker for lung cancer diagnosis in the majority of the samples, but recent studies have also demonstrated the importance of V/Mn, V/Pb, V/Zn, and Cr/Pb in serum; Cr/Cd, Mn/Cd, V/Cd, Co/Cd, and Cd/Pb in urine; and V/Cu in BALF, which reflect the dyshomeostasis of metals that takes place in LC. Important significant correlations can be found between elements in LC patients, such as for example between selenium and zinc, which is implicated in glucometabolic disorders, cobalt and copper, and copper and iron, among others. The influence of individual factors (i.e., sex, age, diet, etc.) in the concentration of metals that can be found in biofluids may be the main pitfall regarding the use of metals dyshomeostasis as biomarkers of lung cancer, and effort should be made in this direction to correctly establish a direct cause–effect link.

Powerful analytical techniques can be used for metal identification and quantification, mainly inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) with single or preferably triple quadrupole

mass spectrometer equipped with a collision/reaction cell for the elimination of interferences. The selection of the biofluid to be analyzed is critical, as well as the sample preparation procedure to isolate metal-containing fractions (high/low molecular mass fractions) or metallobiomolecules, for instance metalloproteins, of which 50% are influenced by metals.

**Funding:** This research was funded by the projects CTM2015-67902-C1-P from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, and P12-FQM-0442 from the Regional Ministry of Economy, Innovation, Science and Employment (Andalusian Government, Spain). Projects Neumosur (8/2012 and 9/2015) and SEPAR (124/2012 and 091/2016). Belén Callejón Leblic thanks the Ministry of Education, Culture and Sport for a predoctoral scholarship. Finally, authors are grateful to FEDER (European Community) for financial support, grants number UNHU13-1E-1611 and UNHU15-CE-3140.

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

## References

1. Jemal, A.; Bray, F.; Center, M.M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* **2011**, *61*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Spira, A.; Ettinger, D.S. Multidisciplinary Management of Lung Cancer—NEJM. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 379–392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Lui, G.Y.L.; Kovacevic, Z.; Richardson, V.; Merlot, A.M.; Kalinowski, D.S.; Richardson, D.R. Targeting cancer by binding iron: Dissecting cellular signaling pathways. *Oncotarget* **2015**, *6*, 18748–18779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Lane, D.J.R.; Mills, T.M.; Shafie, N.H.; Merlot, A.M.; Saleh Moussa, R.; Kalinowski, D.S.; Kovacevic, Z.; Richardson, D.R. Expanding horizons in iron chelation and the treatment of cancer: Role of iron in the regulation of ER stress and the epithelial-mesenchymal transition. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2014**, *1845*, 166–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Déliot, N.; Constantin, B. Plasma membrane calcium channels in cancer: Alterations and consequences for cell proliferation and migration. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2015**, *1848*, 2512–2522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Thakur, V.; Bedogni, B. The membrane tethered matrix metalloproteinase MT1-MMP at the forefront of melanoma cell invasion and metastasis. *Pharmacol. Res.* **2016**, *111*, 17–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Fouani, L.; Menezes, S.V.; Paulson, M.; Richardson, D.R.; Kovacevic, Z. Metals and metastasis: Exploiting the role of metals in cancer metastasis to develop novel anti-metastatic agents. *Pharmacol. Res.* **2017**, *115*, 275–287. [[CrossRef](#)]
8. Mounicou, S.; Szpunar, J.; Lobinski, R. Metallomics: the concept and methodology. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1119–1138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Tainer, J.A.; Roberts, V.A.; Getzoff, E.D. Metal-binding sites in proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1991**, *2*, 582–591. [[CrossRef](#)]
10. Maret, W. The metals in the biological periodic system of the elements: Concepts and conjectures. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**. [[CrossRef](#)]
11. Hsia, C.C.W. Respiratory function of hemoglobin. *N. Engl. J. Med.* **1998**, *338*, 239–247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Kalinowski, D.S.; Stefani, C.; Toyokuni, S.; Ganz, T.; Anderson, G.J.; Subramaniam, N.V.; Trinder, D.; Olynyk, J.K.; Chua, A.; Jansson, P.J.; et al. Redox cycling metals: Pedaling their roles in metabolism and their use in the development of novel therapeutics. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2016**, *1863*, 727–748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kim, H.S.; Kim, Y.J.; Seo, Y.R. An Overview of Carcinogenic Heavy Metal: Molecular Toxicity Mechanism and Prevention. *J. Cancer Prev.* **2015**, *20*, 232–240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Huff, M.O.; Todd, S.L.; Smith, A.L.; Elpers, J.T.; Smith, A.P.; Murphy, R.D.; Bleser-Shartzter, A.S.; Hoerter, J.E.; Radde, B.N.; Klinge, C.M. Arsenite and cadmium activate MAPK/ERK via membrane estrogen receptors and g-protein coupled estrogen receptor signaling in human lung adenocarcinoma cells. *Toxicol. Sci.* **2016**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Watson, W.H.; Yager, J.D. Arsenic: Extension of its endocrine disruption potential to interference with estrogen receptor-mediated signaling. *Toxicol. Sci.* **2007**, *98*, 1–4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Wang, Y.; Fang, J.; Leonard, S.S.; Rao, K.M.K. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, *36*, 1434–1443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Hei, T.K.; Filipic, M. Role of oxidative damage in the genotoxicity of arsenic. *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, *37*, 574–581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Zablocka-Słowińska, K.; Plączkowska, S.; Prescha, A.; Pawelczyk, K.; Porębska, I.; Kosacka, M.; Pawlik-Sobecka, L.; Grajeta, H. Serum and whole blood Zn, Cu and Mn profiles and their relation to redox status in lung cancer patients. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2018**, *45*, 78–84. [[CrossRef](#)]
19. Aguirre, J.D.; Culotta, V.C. Battles with iron: Manganese in oxidative stress protection. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 13541–13548. [[CrossRef](#)]
20. Lützen, A.; Liberti, S.E.; Rasmussen, L.J. Cadmium inhibits human DNA mismatch repair in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *321*, 21–25. [[CrossRef](#)]
21. Hartwig, A. Cadmium and cancer. *Met. Ions Life Sci.* **2013**, *11*, 491–507.
22. Andrews, G.S. Studies of plasma zinc, copper, caeruloplasmin, and growth hormone. With special reference to carcinoma of the bronchus. *J. Clin. Pathol.* **1979**, *32*, 325–333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Voyatzoglou, V.; Mountokalakis, T.; Tsata-Voyatzoglou, V.; Koutselinis, A.; Skalkeas, G. Serum zinc levels and urinary zinc excretion in patients with bronchogenic carcinoma. Effects of tumor resection. *Am. J. Surg.* **1982**, *144*, 355–358. [[CrossRef](#)]
24. Ren, Y.; Zhang, Z.; Ren, Y.; Li, W.; Wang, M.; Xu, G. Diagnosis of lung cancer based on metal contents in serum and hair using multivariate statistical methods. *Talanta* **1997**, *44*, 1823–1831. [[CrossRef](#)]
25. Armendariz, D.; Vulpe, A. International symposium on trace elements in man and animals. *11 th Int. Symp. trace Elem. man Anim.* **2003**, *113*, 203E–282E.
26. Parisi, A.F.; Vallee, B.L. Zinc metalloenzymes: characteristics and significance in biology and medicine. *Am. J. Clin. Nutr.* **1969**, *22*, 1222–1239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Park, J.-W.; Floyd, R.A. Lipid peroxidation products mediate the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA. *Free Radic. Biol. Med.* **1992**, *12*, 245–250. [[CrossRef](#)]
28. Raju, K.S.; Alessandri, G.; Ziche, M.; Gullino, P.M. Ceruloplasmin, copper ions, and angiogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* **1982**, *69*, 1183–1188.
29. Ho, E.; Ames, B.N. Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NF-κB, and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 16770–16775. [[CrossRef](#)]
30. Ho, E. Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. *J. Nutr. Biochem.* **2004**, *15*, 572–578. [[CrossRef](#)]
31. Brewer, G.J.; Dick, R.D.; Grover, D.K.; LeClaire, V.; Tseng, M.; Wicha, M.; Pienta, K.; Redman, B.G.; Jahan, T.; Sondak, V.K.; et al. Treatment of metastatic cancer with tetrathiomolybdate, an anticopper, antiangiogenic agent: Phase I study. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 1–10.
32. Domej, W.; Krachler, M.; Goessler, W.; Maier, A.; Irgolic, K.J.; Lang, J.K. Concentrations of copper, zinc, manganese, rubidium, and magnesium in thoracic emphyemata and corresponding sera. *Biol. Trace Elem. Res.* **2001**, *78*, 53–66. [[CrossRef](#)]
33. Babacan, E.; Cavdar, A.O.; Arcasoy, A. Serum zinc levels, lymphocyte counts and functions in pediatric Hodgkin's disease. *Boll Ist Sieroter Milan.* **1977**, *56*, 228–234. [[PubMed](#)]
34. Barneda-zahonero, B.; Parra, M. Histone deacetylases and cancer. *Mol. Oncol.* **2012**, *6*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Belinsky, S.A.; Klinge, D.M.; Stidley, C.A.; Issa, J.; Herman, J.G.; March, T.H.; Baylin, S.B. Advances in Brief Inhibition of DNA Methylation and Histone Deacetylation Prevents Murine. *Cancer Res.* **2003**, 7089–7093.
36. Osada, H.; Tatematsu, Y.; Saito, H.; Yatabe, Y.; Mitsudomi, T.; Takahashi, T. Reduced expression of class II histone deacetylase genes is associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Int. J. Cancer* **2004**, *112*, 26–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Marks, P.A.; Rifkind, R.A.; Richon, V.M.; Breslow, R.; Miller, T.; Kelly, W.K. Histone deacetylases and cancer: Causes and therapies. *Nat. Rev. Cancer* **2001**, *1*, 194–202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Lane, A.A.; Chabner, B.A. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 5459–5468. [[CrossRef](#)]

39. Amin, S.A.; Adhikari, N.; Jha, T. Structure-activity relationships of HDAC8 inhibitors: Non-hydroxamates as anticancer agents. *Pharmacol. Res.* **2018**, *131*, 128–142. [[CrossRef](#)]
40. Jung, K.H.; Noh, J.H.; Kim, J.K.; Eun, J.W.; Bae, H.J.; Xie, H.J.; Chang, Y.G.; Kim, M.G.; Park, H.; Lee, J.Y.; et al. HDAC2 overexpression confers oncogenic potential to human lung cancer cells by deregulating expression of apoptosis and cell cycle proteins. *J. Cell. Biochem.* **2012**, *113*, 2167–2177. [[CrossRef](#)]
41. Vannini, A.; Volpari, C.; Filocamo, G.; Casavola, E.C.; Brunetti, M.; Renzoni, D.; Chakravarty, P.; Paolini, C.; De Francesco, R.; Gallinari, P.; et al. Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 15064–15069. [[CrossRef](#)]
42. Sarita, P.; Raju, G.J.N.; Kumar, M.R.; Pradeep, A.S.; Reddy, S.B. Analysis of blood serum of lung cancer patients using particle induced X-ray emission. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2013**, *297*, 431–436. [[CrossRef](#)]
43. Ho, E.; Courtemanche, C.; Ames, B.N. Zinc Deficiency Induces Oxidative DNA Damage and Increases P53 Expression in Human Lung Fibroblasts. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 2543–2548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Nève, J. Methods in determination of selenium states. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* **1991**, *5*, 1–17.
45. Combs, G., Jr.; Clark, L.; Turnbull, B. An analysis of cancer prevention by selenium. *BioFactors* **2001**, *14*, 153–159. [[CrossRef](#)]
46. Baum, M.K.; Miguez-Burbano, M.J.; Campa, A.; Shor-Posner, G. Selenium and interleukins in persons infected with human immunodeficiency virus type 1. *J. Infect. Dis.* **2000**, *182 Suppl*, S69–S73. [[CrossRef](#)]
47. García-Barrera, T.; Gómez-Ariza, J.L.; González-Fernández, M.; Moreno, F.; García-Sevillano, M.A.; Gómez-Jacinto, V. Biological responses related to agonistic, antagonistic and synergistic interactions of chemical species. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 2237–2253. [[CrossRef](#)]
48. Menter, D.G.; Sabichi, A.L.; Lippman, S.M. Selenium effects on prostate cell growth. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2000**, *9*, 1171–1182.
49. Stoltzfus, R.J. Iron-deficiency anemia: reexamining the nature and magnitude of the public health problem. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 616–635. [[CrossRef](#)]
50. Oberley, L.W. Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomed. Pharmacother.* **2005**, *59*, 143–148. [[CrossRef](#)]
51. Kinnula, V.L.; Crapo, J.D. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2003**, *167*, 1600–1619. [[CrossRef](#)]
52. Ambrosone, C.B.; Freudenheim, J.L.; Thompson, P.A.; Bowman, E.; Vena, J.E.; Marshall, J.R.; Graham, S.; Laughlin, R.; Nemoto, T.; Shields, P.G. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 602–606. [[PubMed](#)]
53. Mitrinen, K.; Sillanpää, P.; Kataja, V.; Eskelinen, M.; Kosma, V.-M.; Benhamou, S.; Uusitupa, M.; Hirvonen, A. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and breast cancer risk. *Carcinogenesis* **2001**, *22*, 827–829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Bergman, M.; Ahnström, M.; Wegman, P.P.; Wingren, S. Polymorphism in the manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene and risk of breast cancer in young women. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2005**, *131*, 439–444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Sunderman, F.W.; Selin, C.E. The metabolism of nickel-63 carbonyl. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1968**, *12*, 207–218. [[CrossRef](#)]
56. KS, K. Possible role of oxidative damage in metal-induced carcinogenesis. *Cancer Investig.* **1995**, *13*, 411–430.
57. Schrauzer, G.N.; White, D.A.; Schneider, C.J. Cancer mortality correlation studies-IV: Associations with dietary intakes and blood levels of certain trace elements, notably se-antagonists. *Bioinorg. Chem.* **1977**, *7*, 35–56. [[CrossRef](#)]
58. Clementino, M.; Shi, X.; Zhang, Z. Oxidative stress and metabolic reprogramming in Cr(VI) carcinogenesis. *Curr. Opin. Toxicol.* **2018**, *8*, 20–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. León, I.E.; Cadavid-Vargas, J.F.; Di Virgilio, A.L.; Etcheverry, S. Vanadium, ruthenium and copper compounds: A new class of non-platinum Metallodrugs with anticancer activity. *Curr. Med. Chem.* **2016**, *23*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Le, M.; Rathje, O.; Levina, A.; Lay, P.A. High cytotoxicity of vanadium(IV) complexes with 1,10-phenanthroline and related ligands is due to decomposition in cell culture medium. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2017**, *22*, 663–672. [[CrossRef](#)]

61. Banci, L.; Bertini, I. Metallomics and the cell: Some definitions and general comments. In *Metal Ions in Life Sciences*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2013; pp. 1–13.
62. Williams, R.J. Chemical selection of elements by cells. *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *216–217*, 583–595. [[CrossRef](#)]
63. Lobinski, R.; Becker, J.S.; Haraguchi, H.; Sarkar, B. Metallomics: Guidelines for terminology and critical evaluation of analytical chemistry approaches (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2010**, *82*, 493–504. [[CrossRef](#)]
64. Koppenaal, D.W.; Hieftje, G.M. Metallomics?an interdisciplinary and evolving field. *J. Anal. At. Spectrom.* **2007**, *22*, 855.
65. González-Fernández, M.; García-Barrera, T.; Jurado, J.; Prieto-Álamo, M.J.; Pueyo, C.; López-Barea, J.; Gómez-Ariza, J.L. Integrated application of transcriptomics, proteomics, and metallomics in environmental studies. *Pure Appl. Chem.* **2008**, *80*, 2609–2626. [[CrossRef](#)]
66. Luis Gómez-Ariza, J.; García-Barrera, T.; Lorenzo, F.; Arias, A. Analytical characterization of bioactive metal species in the cellular domain (metallomics) to simplify environmental and biological proteomics. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2005**, *85*, 255–266. [[CrossRef](#)]
67. Gómez-Ariza, J.L.; Gonzalez-Fernandez, M.; Garcia-Barrera, T.; Lopez-Barea, J.; Pueyo, C. Integration metallomics, proteomics and transcriptomics in environmental issues. *Chem. List.* **2008**, *102*.
68. González-Fernandez, M.; García-Sevillano, M.A.; Jara-Biedma, R.; Navarro-Roldán, F.; García-Barrera, T.; López-Barea, J.; Pueyo, C.; Gomez-Ariza, J.L. Use of metallomics in environmental pollution assessment using mice *mus musculus*/ *mus spretus* as bioindicators. *Curr. Anal. Chem.* **2013**, *9*, 229–243.
69. Sanz-Medel, A. Heteroatom(isotope)-tagged genomics and proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390*, 1–2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Templeton, D.M.; Ariese, F.; Cornelis, R.; Danielsson, L.G.; Muntau, H.; Van Leeuwen, H.P.; Łobiński, R. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC recommendations 2000). *Pure Appl. Chem.* **2000**, *72*, 1453–1470. [[CrossRef](#)]
71. Drake Ii, E.N.; Sky-Peck2, H.H. Discriminant Analysis of Trace Element Distribution in Normal and Malignant Human Tissues1. *CANCER Res.* **1989**, *49*, 4210–4215.
72. Kubala-Kukuś, A.; Braziewicz, J.; Banaś, D.; Majewska, U.; Gózdź, S.; Urbaniak, A. Trace element load in cancer and normal lung tissue. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. Atoms* **1999**, *150*, 193–199. [[CrossRef](#)]
73. Benderli Cihan, Y.; Öztürk Yildirim, S. A discriminant analysis of trace elements in scalp hair of healthy controls and Stage-IIIb non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *Biol. Trace Elem. Res.* **2011**, *144*, 272–294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Tan, C.; Chen, H.; Xia, C. Early prediction of lung cancer based on the combination of trace element analysis in urine and an Adaboost algorithm. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *49*, 746–752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Callejón-Leblic, B.; Gómez-Ariza, J.L.; Pereira-Vega, A.; García-Barrera, T. Metal dyshomeostasis based biomarkers of lung cancer using human biofluids. *Metallomics* **2018**, *10*, 1444–1451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Zhang, L.-L.; Wei, F.-S.; Wu, G.-P. Study on the relationship between lung cancer of indoor air pollution exposure and trace elements in blood plasma. In Proceedings of the 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, Beijing, China, 11–13 June 2009.
77. Kim, J.Y.; Lim, H.B.; Moon, M.H. Online Miniaturized Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for Metalloprotein Analysis of Plasma from Patients with Lung Cancer. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 10198–10205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Jin, Y.; Zhang, C.; Xu, H.; Xue, S.; Wang, Y.; Hou, Y.; Kong, Y.; Xu, Y. Combined effects of serum trace metals and polymorphisms of CYP1A1 or GSTM1 on non-small cell lung cancer: A hospital based case-control study in China. *Cancer Epidemiol.* **2011**, *35*, 182–187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Tan, C.; Chen, H.; Wu, T. Classification models for detection of lung cancer based on nine element distribution of urine samples. *Biol. Trace Elem. Res.* **2011**, *142*, 18–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Lee, K.-Y.; Feng, P.-H.; Chuang, H.-C.; Wu, S.-M.; Liu, W.-T.; Chen, K.-Y.; Liu, C.-Y.; Ho, S.-C. Trace Elements in Pleural Effusion Correlates with Smokers with Lung Cancer. *Biol. Trace Elem. Res.* **2017**, *182*, 14–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Atukorala, S.; Basu, T.K.; Dickerson, J.W.; Donaldson, D.; Sakula, A. Vitamin A, zinc and lung cancer. *Br. J. Cancer* **1979**, *40*, 927–931. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

82. Zowczak, M.; Iskra, M.; Paszkowski, J.; Manczak, M.; Torlinski, L.; Wysocka, E. Oxidase activity of ceruloplasmin and concentrations of copper and zinc in serum of cancer patients. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2001**, *15*, 193–196. [[CrossRef](#)]
83. Harlyk, C.; Mccourt, J.; Bordin, G.; Rodriguez, A.R.; Van Der Eeckhout, A. Determination of copper, zinc and iron in broncho-alveolar lavages by atomic absorption spectroscopy. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **1997**, *11*, 137–142. [[CrossRef](#)]
84. Censi, P.; Zuddas, P.; Randazzo, L.A.; Tamburo, E.; Speziale, S.; Cuttitta, A.; Punturo, R.; Aricò, P.; Santagata, R. Source and nature of inhaled atmospheric dust from trace element analyses of human bronchial fluids. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 6262–6267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Escribano Montaner, A.; Moreno Galdó, A. Técnicas fibrobronoscópicas especiales: lavado broncoalveolar, biopsia bronquial y biopsia transbronquial. *An. Pediatría* **2005**, *62*, 352–366. [[CrossRef](#)]
86. Díez, M.; Cerdà, F.J.; Arroyo, M.; Balibrea, J.L. Use of the copper/zinc ratio in the diagnosis of lung cancer. *Cancer* **1989**, *63*, 726–730. [[CrossRef](#)]
87. Issell, B.F.; Macfadyen, B.V.; Gum, E.T.; Valdivieso, M.; Dudrick, S.J.; Bodey, G.P. Serum zinc levels in lung cancer patients. *Cancer* **1981**, *47*, 1845–1848. [[CrossRef](#)]
88. Borella, P.; Bargellini, A.; Caselgrandi, E.; Piccinini, L. Observations on the use of plasma, hair and tissue to evaluate trace element status in cancer. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **1997**, *11*, 162–165. [[CrossRef](#)]
89. Schwartz, M.K. Role of Trace Elements in Cancer. *Cancer Res.* **1975**, *35*, 3481–3487. [[PubMed](#)]
90. Schicha, H.; Klein, H.; Kasperk, K.; Ritzl, F. Activation analytical estimation of some trace elements in several organs and in cancerous tissue. *Beitr. Path. Anat. Allg. Pathol.* **1969**, *138*, 245–271.
91. Bargagli, E.; Monaci, F.; Bianchi, N.; Bucci, C.; Rottoli, P. Analysis of trace elements in bronchoalveolar lavage of patients with diffuse lung diseases. *Biol. Trace Elem. Res.* **2008**, *124*, 225–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Suzuki, K.; Higuchi, H.; Iwano, H.; Lakritz, J.; Sera, K.; Koiwa, M.; Taguchi, K. Analysis of trace and major elements in bronchoalveolar lavage fluid of Mycoplasma bronchopneumonia in calves. *Biol. Trace Elem. Res.* **2012**, *145*, 166–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Lin, Y.-S.; Caffrey, J.L.; Chang, M.-H.; Dowling, N.; Lin, J.-W. Cigarette smoking, cadmium exposure, and zinc intake on obstructive lung disorder. *Respir. Res.* **2010**, *11*, 53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Vanoeteren, C.; Cornelis, R.; Dams, R. Evaluation of trace elements in human lung tissue. II. Recovery and analysis of inhaled particulates. *Sci. Total Env.* **1986**, *54*, 231–236. [[CrossRef](#)]
95. Suzuki, K.; Yamaya, Y.; Kanzawa, N.; Chiba, M.; Sera, K.; Asano, R. Trace and major elements status in bronchoalveolar lavage fluid in dogs with or without bronchopneumonia. *Biol. Trace Elem. Res.* **2008**, *124*, 92–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Maier, E.A.; Dietemann-Molard, A.; Rastegar, F.; Heimbürger, R.; Ruch, C.; Maier, A.; Roegel, E.; Leroy, M.J. Simultaneous determination of trace elements in lavage fluids from human bronchial alveoli by energy-dispersive X-ray fluorescence. 3. Routine analysis. *Clin. Chem.* **1987**, *33*, 2234–2239. [[PubMed](#)]
97. Richter, P.; Faroon, O.; Pappas, R.S. Cadmium and cadmium/zinc ratios and tobacco-related morbidities. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2017**, *14*, 1154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Wiernsperger, N.; Rapin, J. Trace elements in glucometabolic disorders: An update. *Diabetol. Metab. Syndr.* **2010**, *2*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. González-Domínguez, R.; García-Barrera, T.; Gómez-Ariza, J.L. Characterization of metal profiles in serum during the progression of Alzheimer's disease. *Metallomics* **2014**, *6*, 292–300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Lobinski, R.; Edmonds, J.S.; Suzuki, K.T.; Uden, P.C. Species-selective determination of selenium compounds in biological materials (Technical report). *Pure Appl. Chem.* **2000**, *72*, 447–461. [[CrossRef](#)]
101. Burk, R.F.; Hill, K.E. Selenoprotein P: An Extracellular Protein with Unique Physical Characteristics and a Role in Selenium Homeostasis. *Annu. Rev. Nutr.* **2005**, *25*, 215–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. García-Sevillano, M.A.; García-Barrera, T.; Gómez-Ariza, J.L. Development of a new column switching method for simultaneous speciation of selenometabolites and selenoproteins in human serum. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1318*, 171–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Rayman, M.P. The importance of selenium to human health. *Lancet* **2000**, *356*, 233–241. [[CrossRef](#)]
104. Kryukov, G.V.; Castellano, S.; Novoselov, S.V.; Lobanov, A.V.; Zehtab, O.; Guigó, R.; Gladyshev, V.N. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* **2003**, *300*, 1439–1443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

105. Epplein, M.; Burk, R.F.; Cai, Q.; Hargreaves, M.K.; Blot, W.J. A prospective study of plasma selenoprotein P and lung cancer risk among low-income adults. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2014**, *23*, 1238–1244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Jaworska, K.; Gupta, S.; Durda, K.; Muszyńska, M.; Sukiennicki, G.; Jaworowska, E.; Grodzki, T.; Sulikowski, M.; Woloszczyk, P.; Wójcik, J.; et al. A Low Selenium Level Is Associated with Lung and Laryngeal Cancers. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e59051. [[CrossRef](#)]
107. Clark, L.C.; Combs, G.F., Jr.; Turnbull, B.W.; Slate, E.H.; Chalker, D.K.; Chow, J.; Davis, L.S.; Glover, R.A.; Graham, G.F.; Gross, E.G.; et al. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin: A randomized controlled trial. *J. Am. Med. Assoc.* **1996**, *276*, 1957–1963. [[CrossRef](#)]
108. Jackson, M.L.; Combs, G.F., Jr. Selenium and anticarcinogenesis: Underlying mechanisms. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2008**, *11*, 718–726. [[CrossRef](#)]
109. Selenius, M.; Rundlöf, A.-K.; Olm, E.; Fernandes, A.P.; Björnstedt, M. Selenium and the selenoprotein thioredoxin reductase in the prevention, treatment and diagnostics of cancer. *Antioxidants Redox Signal.* **2010**, *12*, 867–880. [[CrossRef](#)]
110. Björnstedt, M.; Fernandes, A.P. Selenium in the prevention of human cancers. *EPMA J.* **2010**, *1*, 389–395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Chen, Q.-C.; Ding, X.-L.; Zhu, S.-F.; Su, L.; Cai, D.-M.; Chen, L.; He, W. Common SEP15 polymorphisms and susceptibility to cancer: A systematic review and meta-analysis. *Transl. Cancer Res.* **2017**, *6*, 886–893. [[CrossRef](#)]
112. Jablonska, E.; Gromadzinska, J.; Sobala, W.; Reszka, E.; Wasowicz, W. Lung cancer risk associated with selenium status is modified in smoking individuals by Sep15 polymorphism. *Eur. J. Nutr.* **2008**, *47*, 47–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Rayman, M.P. Selenoproteins and human health: Insights from epidemiological data. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2009**, *1790*, 1533–1540. [[CrossRef](#)]
114. Poerschke, R.L.; Moos, P.J. Thioredoxin reductase 1 knockdown enhances selenazolidine cytotoxicity in human lung cancer cells via mitochondrial dysfunction. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *81*, 211–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Hart, K.; Landvik, N.E.; Lind, H.; Skaug, V.; Haugen, A.; Zienolddiny, S. A combination of functional polymorphisms in the CASP8, MMP1, IL10 and SEPS1 genes affects risk of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **2011**, *71*, 123–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Anzellotti, A.I.; Farrell, N.P. Zinc metalloproteins as medicinal targets. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1629–1651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Hrabeta, J.; Eckschlagler, T.; Stiborova, M.; Heger, Z.; Krizkova, S.; Adam, V. Zinc and zinc-containing biomolecules in childhood brain tumors. *J. Mol. Med.* **2016**, *94*, 1199–1215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Si, M.; Lang, J. The roles of metallothioneins in carcinogenesis. *J. Hematol. Oncol.* **2018**, *11*, 107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Liang, G.-Y.; Lu, S.-X.; Xu, G.; Liu, X.-D.; Li, J.; Zhang, D.-S. Expression of metallothionein and Nrf2 pathway genes in lung cancer and cancer-surrounding tissues. *World J. Surg. Oncol.* **2013**, *11*, 199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Da Motta, L.L.; De Bastiani, M.A.; Stapenhorst, F.; Klamt, F. Oxidative stress associates with aggressiveness in lung large-cell carcinoma. *Tumor Biol.* **2015**, *36*, 4681–4688. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

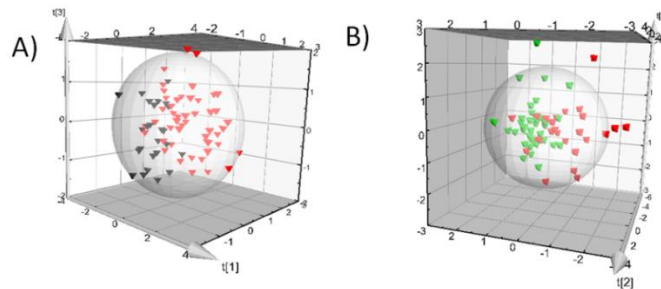
## SUPPLEMENTARY MATERIAL

## Metal dyshomeostasis based biomarkers of lung cancer using human biofluids

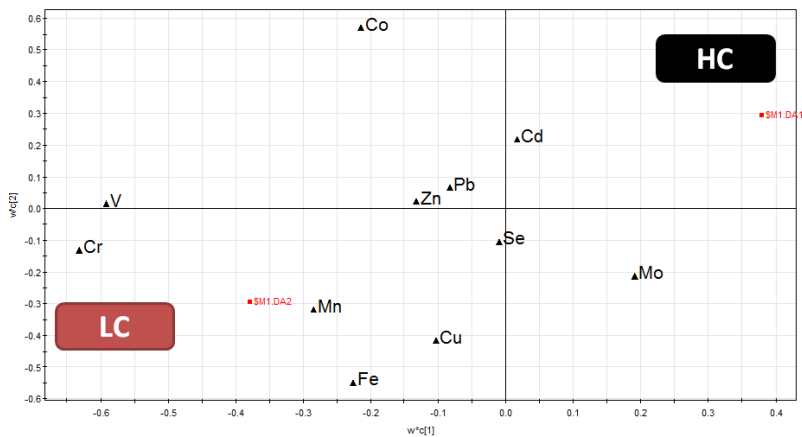
Belén Callejón Leblic<sup>a</sup>, José Luis Gómez Ariza<sup>a\*</sup>, Antonio Pereira Vega<sup>b</sup> and Tamara García Barrera<sup>\*a</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemistry, Faculty of Experimental Sciences, University of Huelva, Campus de El Carmen, 21007-Huelva, Spain. Research Center on Health and Environment (RENSMA)

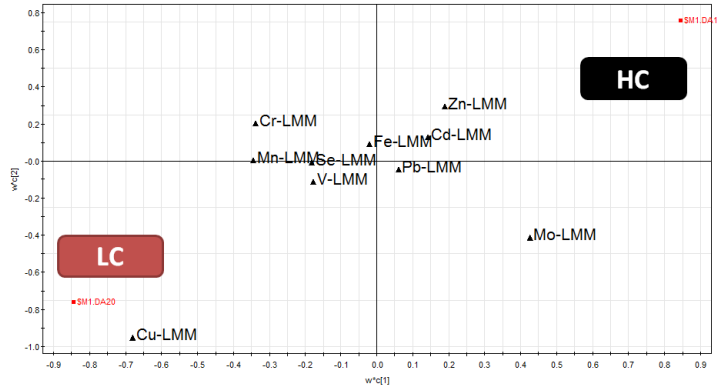
<sup>b</sup> Pneumology Area of Juan Ramón Jiménez Hospital, Huelva, Spain



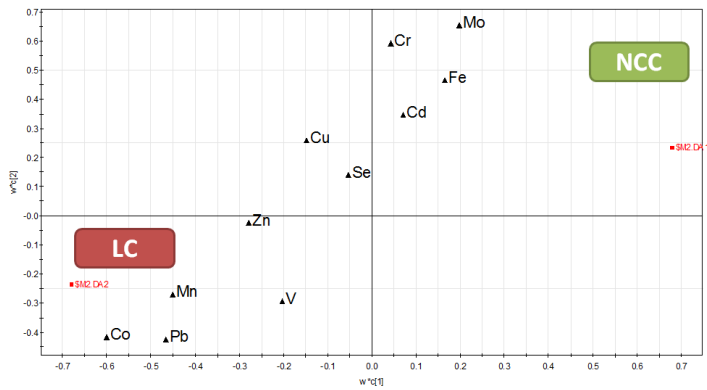
Supplementary Figure 1. PLS-DA of A) urine and B) BALF samples. Red triangles: cancer group, black triangles: healthy control group, green triangles: non-cancerous control group.



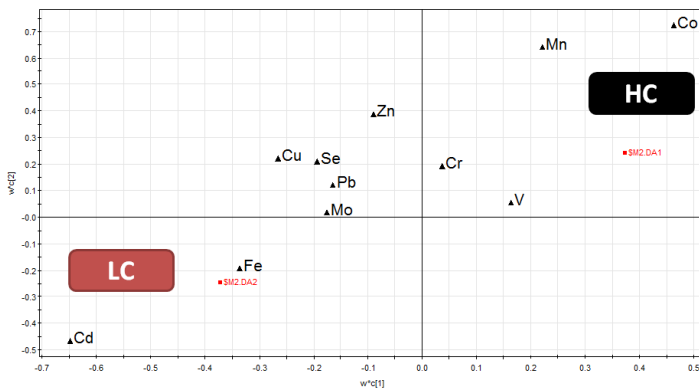
Supplementary Figure 2. Loading plot from serum samples in LC vs HC comparison.



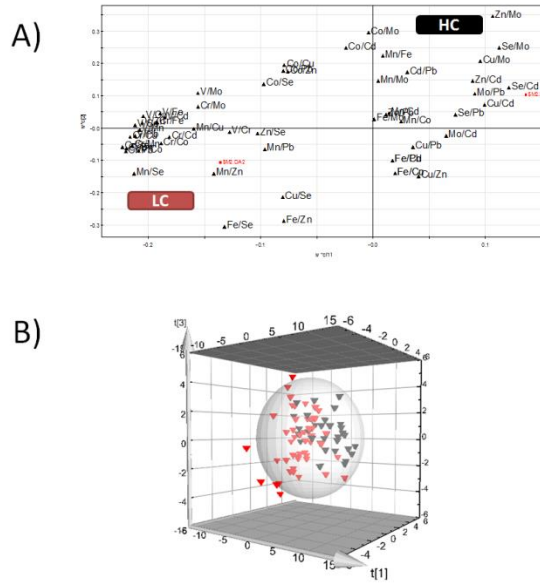
Supplementary Figure 3. Loading plot from LMM of serum samples in LC vs HC comparison.



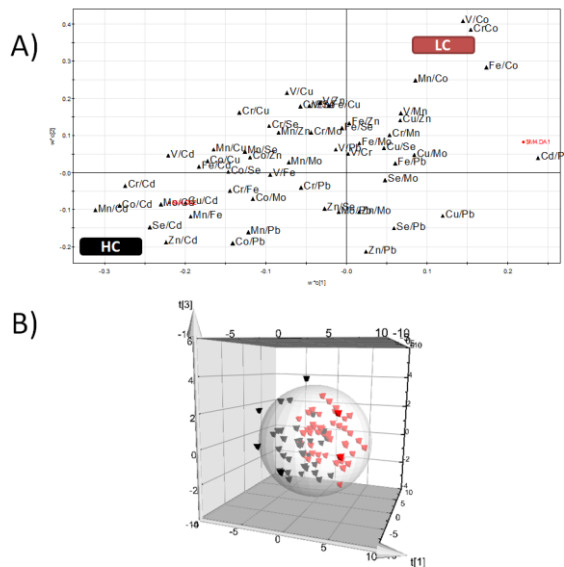
Supplementary Figure 4. Loading plot from BALF samples in LC vs NCC comparison.



Supplementary Figure 5. Loading plot from urine samples in LC vs HC comparison.



Supplementary Figure 6. A) Loadings plot for comparison of inter-element ratios in serum obtained from LC and HC. B) 3D score plot obtained by PLS-DA.



Supplementary Figure 7. A) Loadings plot for comparison of inter-element ratios in urine obtained from LC and HC. B) 3D score plot obtained by PLS-DA.

Supplementary Table 1. Medium concentration and % RSD of ten replicates of serum reference material.

SERUM (Reference Material) *	Medium Concentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) n=10	RSD (%)	Certified range ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
V	8.16	3.94	6.47-9.71
Cr	5.37	3.17	4.53-6.79
Mn	6.04	2.68	4.83-7.24
Fe	1519.3	2.72	1190-1780
Co	5.47	4.42	4.59-6.89
Cu	1359.6	2.34	1150-1560
Zn	1532.8	2.22	1208-1740
Se	117.34	4.10	89.9-135
Mo	5.42	3.38	4.33-6.50
Cd	5.44	2.40	4.04-6.73
Pb	-	-	Non certified

\* Clinchek, Serum Control lyophilized for trace elements, level II, Recipe.

Supplementary Table 2. Medium concentration and % RSD of ten replicates of urine reference material.

URINE (Reference Material)*	Medium Concentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) n=10	RSD (%)	Certified range ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
V	53.69	3.03	40.7-61
Cr	20.36	4.25	15.9-23.9
Mn	18.59	3.79	15.9-23.9
Fe	240.1	3.97	178-266
Co	32.51	4.36	27.5-41.2
Cu	96.64	4.25	88.7-133
Zn	542.4	4.18	425-638
Se	92.61	4.06	71.4-107
Mo	90.22	2.92	79.5-119
Cd	15.33	2.02	11.4-17.2
Pb	55.17	3.27	43.5-65.2

\* Clinchek, Urine Control lyophilized for trace elements, level II, Recipe.

**Capítulo 4. Análisis metalómico de selenoproteínas en muestras de suero de pacientes con cáncer de pulmón mediante la técnica de dilución isotópica.**

**Artículo 6.** B. Callejón-Leblic, G. Rodríguez-Moro, A. Arias-Borrego, A. Pereira-Vega, J.L. Gómez-Ariza, T. García-Barrera. Absolute quantification of selenoproteins and selenometabolites in lung cancer human serum by means of species unspecific isotopic dilution and size exclusion followed by affinity chromatography coupled to triple quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2019 (En revisión).



El selenio es uno de los elementos más estudiados en el cáncer debido a su carácter quimiopreventivo, asociado a la función antioxidante que desempeñan las selenoproteínas [238]. Existen varios estudios que relacionan la alteración en la expresión de las selenoproteínas con el riesgo de padecer cáncer, como la eGPx [239] y la SELENOP [240].

En este capítulo se describe por primera vez la aplicación de un método metalómico basado IDA-SEC-AF-ICP-QQQ-MS para la cuantificación absoluta de selenoproteínas (eGPx, SELENOP, SeAlb), y el contenido total de selenometabolitos, en muestras de suero de pacientes CP (n = 48) y controles sanos (n = 39). El método de separación de los analitos consistió en el acoplamiento de dos tipos de cromatografía, la cromatografía de exclusión por tamaño y la cromatografía de afinidad, cuya descripción se detalla en la sección de *“Procedimientos Experimentales, apartado 5.2.3. Determinación de selenoproteínas en suero sanguíneo mediante IDA-SEC-AF-ICP-QQQ-MS”*.

La cuantificación absoluta de las selenoproteínas y de los selenometabolitos se llevó a cabo empleando el análisis de dilución isotópica inespecífica (SEC-AF-HPLC-SUID-ICP-QQQ-MS) utilizando  $^{74}\text{Se}$  como patrón enriquecido de selenio. Los cromatogramas de los picos en unidad de intensidad (cps) fueron convertidos en cromatogramas másicos a través de la ecuación de la dilución isotópica (*Sección 2.3.1. Fundamento matemático de la dilución isotópica*), y las áreas resultantes se integraron y dividieron por la cantidad de muestra total para determinar la concentración final de selenio en cada selenoproteína. La Tabla 14 muestra las concentraciones promedio del contenido de selenio de cada selenoproteína en suero de pacientes con CP y pacientes sanos (C).

Las concentraciones de eGPx, SELENOP, SeAlb y del contenido total de los selenometabolitos fueron mayores en el grupo CP, siendo significativas las concentraciones de eGPx y SeAlb ( $p > 0.05$ , ANOVA de una cola).

Tabla 14. Concentraciones de selenio de las selenoproteínas determinadas por el método de especiación SEC-AF-ICP-QQQ-MS en muestras de suero de pacientes con CP y grupo control. FC: Fold change, p-value (test ANOVA) y valores AUC. Se-MB: Selenometabolitos.

<b>Concentración (ng of Se g<sup>-1</sup>)</b>	<b>eGPx</b>	<b>Se-MB</b>	<b>SELENOP</b>	<b>SeAlb</b>	<b>TOTAL</b>
Promedio C	8.96	1.71	66.74	28.33	105.74
SD <sub>C</sub>	3.44	0.83	24.11	17.26	40.00
Promedio CP	11.24	2.12	72.08	39.56	124.91
SD <sub>CP</sub>	4.98	1.07	28.55	20.45	47.67
FC (CP/C)	1.25	1.24	1.08	1.40	1.18
p	0.03	0.08	0.4	0.02	0.07
AUC	0.64	0.63	0.55	0.67	0.63

Además, el balance de masas del contenido total de selenio determinado por ICP-QQQ-MS y la suma de las concentraciones de las diferentes selenoproteínas analizadas por IDA-SEC-AF-ICP-QQQ-MS de las muestras de suero de los grupos CP y C mostró desviaciones inferiores al 5 %, indicando que las posibles pérdidas de analito en la separación cromatográfica debidas a retención en las columnas fueron mínimas.

El contenido de selenio total en suero de pacientes con CP ( $127.91 \pm 30.48 \text{ ng g}^{-1}$ ) fue mayor que el promedio del grupo control ( $C=110.48 \pm 20.07 \text{ ng g}^{-1}$ ), aunque estas concentraciones no mostraron diferencias significativas.

Por otra parte, se calcularon los ratios de las concentraciones de las selenoproteínas para determinar posibles relaciones y su uso potencial como biomarcadores. La Tabla 15 muestra el promedio de estas proporciones para los grupos de CP y C.

Tabla 15. Ratios entre selenoproteínas determinadas por el método de especiación SEC-AF-ICP-QQQ-MS en muestras de suero de pacientes con CP y grupo control. FC: Fold change, p-value (test ANOVA) y valores AUC.

Se-MB: Selenometabolitos.

	$\frac{eGPx}{SeMB}$	$\frac{eGPx}{SELENOP}$	$\frac{eGPx}{SeAlb}$	$\frac{SeMB}{SELENOP}$	$\frac{SeMB}{SeAlb}$	$\frac{SELENOP}{SeAlb}$
Promedio C	5.44	0.14	0.39	0.03	0.07	2.71
SD <sub>C</sub>	1.03	0.04	0.26	0.01	0.05	0.95
Promedio CP	5.49	0.16	0.33	0.03	0.06	2.07
SD <sub>CP</sub>	1.15	0.05	0.16	0.01	0.02	0.77
FC (CP/C)	1.01	1.16	0.84	1.13	0.8	0.68
p	0.84	<b>0.04</b>	0.26	0.24	0.13	<b>0.04</b>
AUC	0.51	<b>0.67</b>	0.61	0.66	0.60	<b>0.72</b>

El test ANOVA mostró que el ratio eGPx/SELENOP fue significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) entre los grupos CP ( $0.16 \pm 0.05$ ) y control ( $0.14 \pm 0.04$ ). De la misma manera, las diferencias encontradas en el ratio SELENOP/SeAlb también fueron significativas ( $CP= 2.07 \pm 0.77$ ,  $C = 2.71 \pm 0.95$ ). Además, los valores de AUC para estas relaciones fueron los más altos, especialmente para la relación SELENOP/SeAlb ( $AUC = 0.72$ ).

Finalmente, se realizaron estudios de correlaciones entre selenoproteínas en los grupos CP y C. Para ello, se aplicó el test de correlación de Pearson a los resultados, concluyendo una alta correlación entre eGPx y selenometabolitos en las muestras de suero de los grupos C ( $r = 0.89$ ) y CP ( $r = 0.86$ ). Por otro lado, SELENOP y eGPx también mostraron una alta correlación entre personas sanas ( $r = 0.91$ ), aunque esta correlación disminuyó para el grupo CP ( $r = 0.69$ ). De la misma manera, la correlación para eGPx y SeAlb fue mayor en el suero del grupo control ( $r = 0.77$ ) que en suero de pacientes con CP ( $r = 0.56$ ), y la correlación de SELENOP y SeAlb fue menor en el suero del grupo CP ( $r = 0.54$ ) que en el suero de C ( $r = 0.69$ ). Finalmente, SeAlb y selenometabolitos se correlacionaron de forma similar en ambos grupos C ( $r = 0.69$ ) y CP ( $r = 0.68$ ).

Así pues, las diferencias significativas encontradas en las concentraciones de eGPx y SeAlb en las muestras de suero de pacientes con CP y los ratios eGPx/SELENOP y SELENOP/SeAlb podrían indicar alteraciones en estas proteínas como consecuencia de la enfermedad. Además, la relación SELENOP/SeAlb mostró un valor de AUC  $> 0.7$ , considerado como buen valor en la clasificación de los valores AUC para marcador de diagnóstico.

Manuscript Number:

Title: Absolute quantification of selenoproteins and selenometabolites in lung cancer human serum by means of species unspecific isotopic dilution and size exclusion followed by affinity chromatography coupled to triple quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry

Article Type: VSI: Sample treatment 2018

Keywords: Lung cancer, serum, isotopic dilution, selenoproteins, selenium, ICP-QQQ-MS

Corresponding Author: Professor TAMARA GARCIA-BARRERA, Professor

Corresponding Author's Institution: UNIVERSITY OF HUELVA

First Author: BELÉN CALLEJÓN-LEBLIC

Order of Authors: BELÉN CALLEJÓN-LEBLIC; GEMA RODRÍGUEZ-MORO; ANA ARIAS-BORREGO; Antonio Pereira-Vega; JOSÉ LUIS GÓMEZ-ARIZA; TAMARA GARCIA-BARRERA, Professor

Abstract: Due to the low life expectancy and high occurrence of lung cancer, the search for early diagnosis biomarkers is of great interest. Selenium (Se) is an essential element for the human body and a powerful antioxidant capable of protecting against cancer being also an important constituent of selenoproteins which play important roles. In this work, the absolute quantification of selenoproteins and total selenometabolites has been performed in serum of lung cancer (LC) patients and healthy controls (HC) for the first time. To this end, a method for the simultaneous speciation of selenoproteins and selenometabolites in serum using size exclusion chromatography (SEC) and affinity chromatography (AFC) with detection by inductively coupled plasma triple quadrupole mass spectrometer (ICP-QQQ-MS) has been developed. Absolute quantification was performed by isotopic dilution (IDA) (2D/SEC-AF-HPLC-SUID-ICP-QQQ-MS) to determine the concentration of three important selenoproteins in serum from LC patients, as well as the total content of selenometabolites, in order to find alterations that may serve as a diagnosis of this disease. The results showed that the mean concentrations of eGPx and SeAlb were significantly higher in LC (eGPx:  $11.24 \pm 4.98$  ng g<sup>-1</sup>; SeAlb:  $39.56 \pm 20.45$  ng g<sup>-1</sup>) than in HC (eGPx:  $8.96 \pm 3.44$  ng g<sup>-1</sup>; SeAlb:  $28.33 \pm 17.26$  ng g<sup>-1</sup>). Moreover, the ratios between selenoproteins have been calculated for the first time in LC and HC to study their potential use as LC biomarkers showing that eGPx/SELENOP and SELENOP/SeAlb ratios are significantly different between the LC group and the group of healthy people. Correlations coefficients between selenoproteins have also been calculated in order to demonstrate the interconnected homeostasis. Correlations between selenoproteins in both LC and HC groups were determined using Pearson's coefficients concluding a high correlation between eGPx and selenometabolites ( $r=0.89$ ), SELENOP( $r=0.91$ ) and SeAlb( $r=0.77$ ) in control group. These correlations diminished in the group of LC patients, with the exception of eGPx and selenometabolites ( $r=0.86$ ), but they are also present.

1 **Absolute quantification of selenoproteins and selenometabolites in lung cancer human**  
2 **serum by means of species unspecific isotopic dilution and size exclusion followed by**  
3 **afinity chromatography coupled to triple quadrupole inductively coupled plasma mass**  
4 **spectrometry**

5

6 Belén Callejón-Leblic<sup>a,b,c</sup>, Gema Rodríguez-Moro<sup>a,b,c</sup>, Ana Arias-Borrero<sup>a,b,c</sup>, Antonio Pereira-  
7 Vega<sup>d</sup>, José Luis Gómez-Ariza<sup>a,b,c</sup>, Tamara García-Barrera<sup>a,b,c</sup>

8

9 <sup>a</sup>Department of Chemistry, Faculty of Experimental Sciences. University of Huelva.  
10 Campus de El Carmen. 21007, Huelva. SPAIN; <sup>b</sup>International Agrofood Campus of  
11 Excellence International ceiA3. University of Huelva. SPAIN; <sup>c</sup>Research Center of Natural  
12 Resources, Health and Environment (RENSMA). University of Huelva. Campus de El  
13 Carmen. 21007, Huelva. SPAIN; <sup>d</sup>Pneumology Area of Juan Ramón Jiménez Hospital,  
14 Huelva, Spain

15

16 Corresponding author at:

17 Department of Chemistry. Faculty of Experimental Science. University of Huelva. Campus  
18 de El Carmen. 21007, Huelva. Tel.: +34959219962, fax: +34 959 219942, e-mail address:  
19 tamara@dqcm.uhu.es (T. García-Barrera); ariza@uhu.es (J.L. Gómez-Ariza).

20 **Abstract**

21 Due to the low life expectancy and high occurrence of lung cancer, the search for early  
22 diagnosis biomarkers is of great interest. Selenium (Se) is an essential element for the  
23 human body and a powerful antioxidant capable of protecting against cancer being also an  
24 important constituent of selenoproteins which play important roles.

25 In this work, the absolute quantification of selenoproteins and total selenometabolites has  
26 been performed in serum of lung cancer (LC) patients and healthy controls (HC) for the  
27 first time. To this end, a method for the simultaneous speciation of selenoproteins and  
28 selenometabolites in serum using size exclusion chromatography (SEC) and affinity  
29 chromatography (AFC) with detection by inductively coupled plasma triple quadrupole  
30 mass spectrometer (ICP-QQQ-MS) has been developed. Absolute quantification was  
31 performed by isotopic dilution (IDA) (2D/SEC-AF-HPLC-SUID-ICP-QQQ-MS) to

32 determine the concentration of three important selenoproteins in serum from LC patients,  
33 as well as the total content of selenometabolites, in order to find alterations that may serve  
34 as a diagnosis of this disease. The results showed that the mean concentrations of eGPx and  
35 SeAlb were significantly higher in LC (eGPx:  $11.24 \pm 4.98 \text{ ng g}^{-1}$ ; SeAlb:  $39.56 \pm 20.45 \text{ ng g}^{-1}$ )  
36 than in HC (eGPx:  $8.96 \pm 3.44 \text{ ng g}^{-1}$ ; SeAlb:  $28.33 \pm 17.26 \text{ ng g}^{-1}$ ). Moreover, the ratios  
37 between selenoproteins have been calculated for the first time in LC and HC to study their  
38 potential use as LC biomarkers showing that eGPx/SELENOP and SELENOP/SeAlb ratios  
39 are significantly different between the LC group and the group of healthy people.  
40 Correlations coefficients between selenoproteins have also been calculated in order to  
41 demonstrate the interconnected homeostasis. Correlations between selenoproteins in both  
42 LC and HC groups were determined using Pearson's coefficients concluding a high  
43 correlation between eGPx and selenometabolites ( $r=0.89$ ), SELENOP( $r=0.91$ ) and  
44 SeAlb( $r=0.77$ ) in control group. These correlations diminished in the group of LC patients,  
45 with the exception of eGPx and selenometabolites ( $r=0.86$ ), but they are also present.

46 **Keywords:**

47 Lung cancer, serum, isotopic dilution, selenoproteins, selenium, ICP-QQQ-MS.

48

49 **1. Introduction**

50 Lung cancer (LC) is one of the ten most common causes of death in the world [1] inducing  
51 more than 1.3 million deaths per year [1,2]. Due to the majority of LC cases diagnosed are  
52 in advanced stages, the 5-year survival period is only 15% [3–5], which highlight the need  
53 for an early diagnosis to increase the rate [6–9]. Metabolic disturbances are associated to  
54 cancer appearance and development, increasing oxidative stress [10]. Oxidative stress is an  
55 imbalance between antioxidants and reactive oxygen species (ROS) including free radicals,  
56 which can cause irreversible damage at high concentrations through oxidative changes in  
57 lipids, proteins and DNA [10]. To limit the damage caused by ROS, an antioxidant system  
58 formed by enzymatic and non-enzymatic system may interact with these species to  
59 regulate their production. However, if this antioxidant system is surpassed by the  
60 production of ROS or not sufficiently provided through diet or supplementation, oxidative  
61 stress takes place [10].

62

63 The role of metals in cancer onset and progression as well as in metastasis has been  
64 extensively reviewed [11–14] and two general hypothesis has been stated, one of them is  
65 that cancer onset and progression disturb the levels and natural chemical form of the  
66 essential elements in the metabolism. The second one considers that carcinogenic process is  
67 caused by a high exposure to metals. However, the majority of papers focus on the  
68 estimation of a deficiency state or excess and into a lesser extent in the unbalance episodes  
69 in which one element affects the function of others.

70

71 In this context, selenium has been claimed as one of the most important elements in cancer  
72 research due to its chemopreventive character, related with its antioxidant role via the  
73 glutathione peroxidase selenoprotein (GPx) [15]. It seems that the mechanism is based on  
74 an increase of this selenoprotein in tissues from lung cancer patients to overcome the  
75 oxidative stress caused by free radicals, with a correlative decrease of selenium in the  
76 bloodstream. On the other hand, selenium also plays essential roles in inhibiting  
77 angiogenesis [16], enhancement of immune response [17], control of unnecessary  
78 proliferation of cells [18], inhibition of the activation of certain transcription factors [19] and  
79 as antagonist against the toxic action of several toxic elements such as mercury [20].  
80 Synergistic interactions of selenium have also been described as in the case of zinc, whose  
81 depressed levels seem to be involved in carcinogenesis by increasing DNA damage and  
82 oxidative stress, inhibiting DNA repair mechanisms, declining immune function and  
83 decreasing antioxidant defense capacity [21]. Several studies have shown the key role of  
84 selenium in cancer demonstrating that selenium supplements reduce the mortality of  
85 several types of cancers, including lung cancer [22] and that there is a decrease in the risk of  
86 lung cancer in populations with high levels of selenium [23]. The role of selenium depend  
87 on its concentration as it has been evidenced in cell cultures that while low concentrations  
88 are absolutely necessary for cell growth, moderate to high concentrations inhibit it. This  
89 inhibiting action is tumor-specific and selenium induces apoptosis in malignant cells at  
90 concentrations that do not affect the viability of normal cells [24].

91

92 The active center of selenoproteins (with selenocysteiny residues incorporated by a  
93 specific codon) like glutathione peroxidase (GPx), selenoprotein P (SeP) and other  
94 selenoenzymes is -SeH, but selenium can also be present in living body as selenium

95 containing proteins (with selenomethionyl residues, ie selenoalbumin (SeAlb)), inorganic  
96 selenium, selenoamino acids and methylated selenium [25]. Some selenium species are  
97 transformed into selenide, a common intermediate metabolite in the synthesis of  
98 selenoproteins. Selenomethionine (SeMet) can be transformed into selenocysteine (SeCys)  
99 through the trans-selenation pathway and then lysed by  $\beta$ -lyase or directly by  $\gamma$ -lyase to  
100 selenide. At the same time, SeMet can be used for the synthesis of proteins by methionine-  
101 RNAt [26]. The most abundant selenium specie in the bloodstream is selenoprotein P  
102 (SELENOP), and its concentration is a good indicator of Se status in humans, while  
103 extracellular glutathione peroxidase (eGPx) is a complementary marker in several clinical  
104 studies. Although SeAlb is not a “real” selenoprotein because its synthesis is not  
105 genetically encoded, it can **also** play the role of a potential bio-indicator of selenium status,  
106 particularly correlated with nutrition [27]. Plasma GPx (eGPx) is the most important  
107 selenoenzyme in the detoxification of ROS in human plasma and catalyzes the reduction of  
108 extracellular hydrogen peroxide and lipid hydroperoxide and accepts both thioredoxin and  
109 glutathione as a reduction co-substrate [28]. SELENOP is expressed in many tissues, but it  
110 is produced primarily in the liver and secreted into the plasma. It is the largest form of  
111 selenium in plasma and it is involved in its transport [29,30]. There are indication that  
112 SELENOP also acts as an antioxidant in the extracellular space, and it is located in the  
113 endothelium bound to heparin and associated with carbohydrates [30]. SELENOP reduced  
114 phospholipid hydroperoxides using glutathione or thioredoxin as a co-substrate and  
115 protected plasma proteins against oxidation and nitration induced by peroxynitrite-  
116 induced oxidation or peroxidation of low density lipoproteins (LDL) [31]. In addition,  
117 SELENOP was also shown to protect human astrocytes and endothelial cells from  
118 oxidative damage [32]. Serum is the most accessible bio-indicator for selenium level as it  
119 responds rapidly to changes in selenium status correlated with its dietary intake or  
120 physiological disorders. The concentration of selenium in human serum is about 90 ng g<sup>-1</sup>  
121 and the relative abundance of the species is: SeP>SeAlb>GPx>SeO<sub>3</sub><sup>2-</sup> [33].

122

123 There is a relationship between the altered expression of selenoproteins and cancer risk  
124 have also been reviewed [34]. For example, Moscow et al found an allelic variant of GPx1  
125 gene, caused by a single nucleotide polymorphism at codon 198 which is associated to an  
126 increase risk of lung cancer [35]. Several studies also suggest that polymorphisms in the  
127 selenoprotein gene of 15 kDa (SELENOP15) can alter the interaction of selenium with this

128 protein, which is associated with an increase in susceptibility of various types of cancer [36]  
129 including LC [37]. Moreover, SELENOP has been determined in 372 lung cancer patients  
130 using the ELISA method demonstrating that there is a decrease in the risk of lung cancer in  
131 populations with high levels [23]. The genotypes of GPX1, GPX4, TXNRD2 and SEP15 as  
132 well as total selenium were also determined in 95 patients with lung cancer, demonstrating  
133 that a selenium level less than  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  is associated with a higher risk of lung cancer [38].  
134 Finally, the relationship between the CASP8, MMP1, IL10 and SEPS1 genes and the risk of  
135 non-small cell lung cancer have also been demonstrated [39].

136 In spite of many authors have reported activities or concentrations of some selenoproteins  
137 in several cancers such as, prostate [40–42], renal [40], breast [43], colorectal [44] and  
138 laryngeal cancers [38], few studies are related with the determination of selenoproteins in  
139 LC patients [23]. On the other hand, the most commonly used analytical techniques for the  
140 determination of selenoproteins concentrations in cancer patients have been based on  
141 immunoluminometric sandwich assay [40,41], radioimmunoassay [43], colorimetric  
142 enzyme-limled immunoassay [44] or Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) [23].

143

144 In this work, the concentration of selenoproteins (eGPx, SELENOP, SeAlb) and the total  
145 content of selenometabolites have been determined for the first time in serum from lung  
146 cancer (n=48) and healthy controls (n=39) using a column switching system based on two  
147 size exclusion chromatography columns (SEC) and two affinity columns (AF). For the first  
148 time an inductively coupling plasma mass spectrometer equipped with a triple quadrupole  
149 (ICP-QQQ-MS) has been used for the detection of selenium in serum of lung cancer  
150 patients. Finally, absolute quantification of selenoproteins was carried out using unspecific  
151 isotopic dilution analysis (2D/SEC-AF-HPLC-SUID-ICP-QQQ-MS).

152

## 153 **2. Materials and methods.**

### 154 **2.1. Study population.**

155 Blood samples were collected from lung cancer patients (LC) and healthy people  
156 used as control (HC) at the Pneumology Area of Juan Ramón Jiménez Hospital  
157 (Huelva, Spain). The blood samples were obtained by venipuncture of the  
158 antecubital region, after 8 hours of fasting, and collected in BD Vacutainer SST II  
159 tubes with gel separator and Advance vacuum system. The samples were

160 immediately cooled and protected from light for 30 minutes to allow clot retraction.  
161 After centrifugation (2000 g for 10 minutes) serum samples were frozen at -80°C  
162 until analysis. A total of 87 serum samples (LC=48 and HC= 39) were collected for  
163 the analysis. The study was performed in accordance with the principles contained  
164 in the Declaration of Helsinki and approved by the Ethical Committee from Juan  
165 Ramón Jiménez Hospital and University of Huelva. In addition, all people gave  
166 informed consent for the extraction of peripheral venous blood. Table 1 showed  
167 clinical characteristics of patients (LC) and healthy controls (HC).

168

## 169 **2.2. Standard solutions and reagents**

170 Human serum certified reference material (CRM) BCR-637 was purchased from the  
171 Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM, Geel, Belgium).  
172 Enriched <sup>74</sup>Se was obtained from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA,  
173 USA). Water was purified with a Milli-Q Gradient system (Millipore, Watford, UK).  
174 Ammonium acetate was purchased from Sigma Aldrich, (Steinheim, Germany).

175

## 176 **2.3. Instrumentation**

177 The absolute quantification of selenoproteins and the total content of selenium were  
178 performed by inductively coupled plasma mass spectrometry equipped with a triple  
179 quadrupole using the Agilent 8800 Triple Quad (Agilent Technologies, Tokyo, Japan), with  
180 oxygen of high-purity grade (>99.999%), and pure hydrogen gas (>95%) as reaction gases.  
181 Instrumental conditions were optimized using a Tuning aqueous solution containing Li,  
182 Co, Y and Tl at 1 µg L<sup>-1</sup>. Nickel sampling and skimmer cones were employed, with a  
183 sampling depth of 10 mm. The forward power was set at 1550 W, and the gas flow rates  
184 were fixed at 15 L min<sup>-1</sup> and 1.08 L min<sup>-1</sup> for plasma and carrier gas, respectively. Selenium  
185 was determined using a mixture of H<sub>2</sub> (2 ml min<sup>-1</sup>) and O<sub>2</sub> (40%). Isotopes monitored  
186 were <sup>74</sup>Se, <sup>76</sup>Se, <sup>77</sup>Se, <sup>78</sup>Se y <sup>80</sup>Se with a dwell time of 0.3 s per isotope. Chromatographic  
187 separation was performed using an HPLC model 1260 Infinity Quaternary LC (Agilent  
188 Technologies). Separation of selenoproteins was carried out by two 5 ml HiTrap ®  
189 Desalting Columns (GE Healthcare, Uppsala, Sweden ) connected to two affinity columns,  
190 with stationary phases of heparin-sepharose (HEP-HP) and blue-sepharose (BLU-HP), both  
191 purchased from GE Healthcare, Uppsala, Sweden.

192

#### 193 **2.4. Total selenium determination**

194 Total Se content of serum was determined in diluted samples as previously described [45].  
195 To this end, serum was five-fold diluted with ultrapure water and 0.1  $\mu\text{g L}^{-1}$  of Rh was  
196 added as internal standard. Samples were filtered using 0.45  $\mu\text{m}$  pore size filters of PTFE  
197 before the analysis by ICP-QQQ-MS.

198

#### 199 **2.5. Selenoproteins speciation by size exclusion-affinity chromatography hyphenated** 200 **to species-unspecific isotope dilution ICP-QQQ-MS (SEC-AF-ICP-QQQ-MS).**

201 The absolute quantification of selenoproteins has been performed by a previously  
202 optimized method 2D/SE-AF-HPLC-SUID-ICP-MS [46], although in this using a triple  
203 quadrupole ICP-QQQ-MS. The separation of analytes was carried out using two columns  
204 of size exclusion (HiTrap® Desalting) connected to two affinity columns of heparine  
205 sepharose (HEP-HP) and blue-sepharose (BLU-HP) interconnected by a six-way switching  
206 column valve. The combination of two HiTrap Desalting columns increases the resolution  
207 of the chromatographic separation and allows separating the peak of eGPx from  
208 selenometabolites. On the other hand, the HEP-HP column is able to retain selectively SeP,  
209 whereas BLUE-HP column retains both SELENOP and SeAlb [27]. The chromatography  
210 based on SEC-AF-HPLC was connected to the nebulizer of ICP-QQQ-MS using a T piece.  
211 In the same way, the T piece was also used for the introduction of  $^{74}\text{Se}$  in post-column mode  
212 to carry out the dilution analysis. Serum samples were centrifuged before the speciation  
213 analysis and 100  $\mu\text{l}$  were injected into the system SEC-AF-ICP-QQQ-MS directly.  
214 Ammonium acetate was used as mobile phase using a gradient from 0.05 M (mobile phase  
215 A) to 1.5 M (mobile phase B), at a flow rate of 1.3  $\text{ml min}^{-1}$  and the acquisition time was  
216 adjusted to 40 minutes.

217 In a first step (Position A), mobile phase A is pumped through the system during 12  
218 minutes eluting eGPx and selenometabolites, which are not retained in the affinity  
219 columns, at the time of 3 and 5 minutes respectively. Subsequently, the gradient change to  
220 mobile phase B for the elution of SELENOP at 20 minutes and at this moment, the valve is  
221 switch to Position B to isolate the BLUE-HP column, which contains SeAlb. In the following  
222 step, the valve is switched on to the Position A again for the elution of SeAlb which elutes  
223 at 25 minutes with mobile phase B. Finally, mobile phase A is passed through the system  
224 for equilibration during 15 minutes before the next injection. Figure 1 illustrates the

225 instrumentation and both positions used in the analysis. After that, the intensity of  
226 selenium isotopes were converted to mass flow chromatograms for the quantification of  
227 selenium species in serum samples, using mathematical equation of isotopic dilution and  
228 the ratio  $^{78}\text{Se}/^{74}\text{Se}$ . Figure 2 shows a mass flow chromatogram corresponding to a serum  
229 sample from a LC patient. Finally, the resulting areas of the mass flow chromatograms  
230 were integrated using Origin 8.0, OriginLab Corporation software. The final concentrations  
231 were calculated dividing the areas between the amounts of sample introduced.

232

## 233 **2.6. Statistical Analysis.**

234 Statistical calculations were made in STATISTICA 8.0 software (StatSoft, Tulsa,  
235 USA). Parametric methods were used since most of the variables showed a skewed  
236 distribution (checked by normal probability plots) and variances were not  
237 homogeneous (checked by Levene's test). One-way ANOVA followed by Tuckey  
238 test was carried out for pairwise comparisons to find differences between groups.  
239 Only p values below 0.05 were regarded as statistically significant. Finally, to  
240 evaluate the specificity and sensitivity of metabolites altered by the disease, ROC  
241 (receiver operator characteristic) curves were applied to the dataset and species with  
242 "area under the curve" (AUC) higher than 0.70 were considered as relevant in the  
243 progression of LC.

244

## 245 **3. Results and discussion.**

### 246 **3.1. Absolute quantification of proteins by IDA-SEC-AF-ICP-QQQ-MS.**

247 The speciation methodology has been validated using a CRM of human serum (BCR-637)  
248 certified for total Se content ( $81 \pm 7 \text{ ng ml}^{-1}$ ). In addition, a spike of  $20 \text{ ng g}^{-1}$  of  
249 selenomethione was added to the material to test the recovery and the resolution of IDA-  
250 SEC-AF-ICP-QQQ-MS for selenometabolites. Moreover, the isotopic dilution equation was  
251 used to calculate the concentration of selenoproteins in the BCR-637 and serum samples  
252 from LC and HC patients. The concentration of different selenium species obtained in the  
253 BCR-637 are in concordance with other results reported in literature [33,47], and the  
254 recovery of selenomethione was close to 85 %, (n=5).

255 The analysis of LC and HC serum samples reveals that SELENOP accounts for the highest  
256 content of selenium in both studied groups, followed by SeAlb, eGPx and finally,  
257 selenometabolites. In addition, the percentage of SELENOP was lower in LC (58%) than in

258 HC group (63%), while the percentage of SeAlb respect to the total (31%) was higher in  
259 serum from LC than in HC group (27%). The content of eGPx and selenometabolites were  
260 very similar in both groups. Figure 3 illustrates the percentages of each selenoprotein  
261 against the total sum of species.

262 Table 2 shows the concentration of selenoproteins in the serum of HC and LC patients. The  
263 sum of selenospecies in LC patients ( $129.91 \pm 47.67 \text{ ng g}^{-1}$ ) was higher than that in HC  
264 patients ( $105.74 \pm 40.00 \text{ ng g}^{-1}$ ). In addition, SELENOP was the protein with highest  
265 concentration in both HC ( $66.74 \pm 24.11 \text{ ng g}^{-1}$ ) and LC ( $72.08 \pm 28.55 \text{ ng g}^{-1}$ ) serum samples,  
266 being higher in the cancer group, but one-way ANOVA test did not show significant  
267 differences. On the contrary, SeAlb and eGPx showed significant differences in  
268 concentration ( $p < 0.05$ ) from LC (eGPx:  $11.24 \pm 4.98 \text{ ng g}^{-1}$ ; SeAlb:  $39.56 \pm 20.45 \text{ ng g}^{-1}$ ) and  
269 HC (eGPx:  $8.96 \pm 3.44 \text{ ng g}^{-1}$ ; SeAlb:  $28.33 \pm 17.26 \text{ ng g}^{-1}$ ) being also higher in serum from  
270 LC patients (Table 2). Finally, the lowest concentration of selenium in both, LC and HC  
271 serum samples, was in the form of selenometabolites and they also did not show significant  
272 differences between groups. Areas under the curve (AUC) of the receiver operating  
273 characteristic curves (ROC) are also showed in Table 2. The AUC value of SeAlb (AUC=  
274 0.67) was higher than other selenoproteins (eGPx (AUC= 0.64), SELENOP (AUC= 0.55)), se-  
275 metabolites (AUC= 0.63), and the total sum of species (AUC= 0.63)).

276

### 277 **3.2. Total selenium in serum from LC and HC patients.**

278 The concentrations of total selenium in serum samples from LC and HC were determined  
279 by ICP-QQQ-MS with the conditions described previously. The selenium content in serum  
280 from LC patients ( $127.91 \pm 30.48 \text{ ng g}^{-1}$ ) was higher than the concentration of HC group  
281 ( $110.48 \pm 20.07 \text{ ng g}^{-1}$ ). These concentrations were compared to the sum of selenium species  
282 determined in the speciation analysis showed a standard deviation lower than 5 % in both  
283 LC and HC groups.

284

### 285 **3.3. Inter-selenoproteins ratios and correlations**

286

287 It has been reported that selenoproteins are interrelated, because Se bound to albumin  
288 (SeAlb) is assumed to be transported to the liver for new synthesis of SELENOP and GPx  
289 that are then released into the bloodstream [33]. On the other hand, as previously reported,  
290 the ratios between several elements have resulted to be important biomarkers of lung

291 cancer, which reflect the existence of an interconnected homeostasis in lung cancer [48]. In  
292 this case, the ratios between selenoproteins were calculated to determine their relationships  
293 and their potential use as biomarkers. Table 3 reported the average of these ratios for HC  
294 and LC group.

295

296 ANOVA test showed that the ratio of eGPx/SELENOP was significantly different ( $p < 0.05$ )  
297 between LC ( $0.16 \pm 0.05$ ) and HC ( $0.14 \pm 0.04$ ) groups. In the same way, the differences  
298 found in the ratio of SELENOP/SeAlb were also significant (LC =  $2.07 \pm 0.77$ , HC =  $2.71 \pm$   
299  $0.95$ ). In addition, AUC values for these ratios were the highest (Table 3), especially that for  
300 SELENOP/SeAlb ratio (AUC=0.72). Figure 4 shows graphically the calculated ratios above  
301 commented.

302 Finally, Pearson's test was carried out to determine correlations between selenoproteins  
303 from HC and LC. This test was applied to the dataset of HC and LC independently and the  
304 results are shown in Table 4.

305

306 There is a high correlation between eGPx and selenometabolites in both serum samples  
307 from HC ( $r=0.89$ ) and LC ( $r=0.86$ ) groups. On the other hand, SELENOP and eGPx showed  
308 a high correlation from HC people ( $r=0.91$ ), although this correlation diminished for LC  
309 people ( $r=0.69$ ). In the same way, the correlation for eGPx and SeAlb was higher in serum  
310 from HC group ( $r=0.77$ ) than in serum from LC patients ( $r=0.56$ ). Similarly, correlation of  
311 SELENOP and SeAlb was lower in serum from LC group ( $r=0.54$ ) than in serum from HC  
312 people ( $r=0.69$ ). Finally, correlation between SeAlb and selenometabolites was similar in  
313 both groups HC ( $r=0.69$ ) and LC ( $r=0.68$ ).

314

#### 315 4. Conclusions.

316 In this work, the absolute quantification of selenoproteins has been performed for the first  
317 time in serum of lung cancer and healthy controls using an ICP-QQQ-MS. The  
318 methodology was based on the separation of selenoproteins and selenometabolites by a  
319 column switching system based on the use of size exclusion chromatography (SEC) and  
320 affinity chromatography (AF) with detection by ICP-QQQ-MS and quantification by  
321 species unspecific isotopic dilution analysis (SUID). The analysis of LC and HC serum  
322 samples reveals that SELENOP accounts for the highest content of selenium in serum,  
323 followed by SeAlb, eGPx and finally, selenometabolites. The selenoproteins eGPx and

324 SeAlb showed significantly increased concentrations in the LC group. In addition, the  
325 ratios: eGPx/SELENOP and SELENOP/SeAlb are significantly different in LC and HC,  
326 showing the interconnected homeostasis between selenoproteins. Moreover, there is a high  
327 correlation between eGPx and selenometabolites in both LC and HC groups.

328

### 329 **Acknowledgments**

330 This research was funded by the projects CTM2015-67902-C-1-P from the Spanish Ministry  
331 of Economy and Competitiveness, and P12-FQM-0442 from the Regional Ministry of  
332 Economy, Innovation, Science and Employment (Andalusian Government, Spain). Projects  
333 Neumosur (8/2012 and 9/2015) and SEPAR (124/2012 and 091/2016). Finally, authors are  
334 grateful to FEDER (European Community) for financial support, grants number UNHU13-  
335 1E-1611 and UNHU15-CE-3140.

336

### 337 **References.**

- 338 [1] R. Lozano, M. Naghavi, K. Foreman, S. Lim, K. Shibuya, V. Aboyans, et al., Global and  
339 regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A  
340 systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010, *Lancet*. 380 (2012)  
341 2095–2128. doi:10.1016/S0140-6736(12)61728-0.
- 342 [2] A. Jemal, F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman, Global cancer statistics,  
343 *CA Cancer J. Clin.* 61 (2011) 69–90. doi:10.3322/caac.20107.
- 344 [3] Y. Chen, Z. Ma, A. Li, H. Li, B. Wang, J. Zhong, et al., Metabolomic profiling of human  
345 serum in lung cancer patients using liquid chromatography/hybrid quadrupole time-of-  
346 flight mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry, *J. Cancer Res.*  
347 *Clin. Oncol.* 141 (2015) 705–718. doi:10.1007/s00432-014-1846-5.
- 348 [4] P.G. Likhov, O.N. Kharybin, A.I. Archakov, Diagnosis of lung cancer based on direct-  
349 infusion electrospray mass spectrometry of blood plasma metabolites, *Int. J. Mass*  
350 *Spectrom.* 309 (2012) 200–205. doi:10.1016/j.ijms.2011.10.002.
- 351 [5] J.R. Hocker, M.D. Peyton, M.R. Lerner, S.L. Mitchell, S.A. Lightfoot, T.J. Lander, et al.,  
352 Serum discrimination of early-stage lung cancer patients using electrospray-ionization  
353 mass spectrometry, *Lung Cancer*. 74 (2011) 206–211. doi:10.1016/j.lungcan.2011.03.014.
- 354 [6] A. Jemal, R. Siegel, E. Ward, Y. Hao, J. Xu, T. Murray, et al., Cancer statistics, 2008, *CA*  
355 *Cancer J. Clin.* 58 (2008) 71–96. doi:10.3322/CA.2007.0010.
- 356 [7] S. Hori, S. Nishiumi, K. Kobayashi, M. Shinohara, Y. Hatakeyama, Y. Kotani, et al., A  
357 metabolomic approach to lung cancer, *Lung Cancer*. 74 (2011) 284–292.

- 358 doi:10.1016/j.lungcan.2011.02.008.
- 359 [8] T. Wen, L. Gao, Z. Wen, C. Wu, C.S. Tan, W.Z. Toh, et al., Exploratory investigation of  
360 plasma metabolomics in human lung adenocarcinoma, *Mol. Biosyst.* 9 (2013) 2370–2378.  
361 doi:10.1039/c3mb70138g.
- 362 [9] R. Molina, J.M. Auge, J.M. Escudero, R. Marrades, N. Viñolas, E. Carcereny, et al.,  
363 Mucins CA 125, CA 19.9, CA 15.3 and TAG-72.3 as tumor markers in patients with lung  
364 cancer: Comparison with CYFRA 21-1, CEA, SCC and NSE, *Tumor Biol.* 29 (2009) 371–  
365 380. doi:10.1159/000181180.
- 366 [10] R.G. CUTLER, Oxidative Stress Profiling: Part I. Its Potential Importance in the  
367 Optimization of Human Health, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1055 (2005) 93–135.  
368 doi:10.1196/annals.1323.027.
- 369 [11] G.Y.L. Lui, Z. Kovacevic, V. Richardson, A.M. Merlot, D.S. Kalinowski, D.R. Richardson,  
370 Targeting cancer by binding iron: Dissecting cellular signaling pathways, *Oncotarget.* 6  
371 (2015) 18748–18779. doi:10.18632/oncotarget.4349.
- 372 [12] D.J.R. Lane, T.M. Mills, N.H. Shafie, A.M. Merlot, R. Saleh Moussa, D.S. Kalinowski, et  
373 al., Expanding horizons in iron chelation and the treatment of cancer: Role of iron in the  
374 regulation of ER stress and the epithelial-mesenchymal transition, *Biochim. Biophys.*  
375 *Acta - Rev. Cancer.* 1845 (2014) 166–181. doi:10.1016/j.bbcan.2014.01.005.
- 376 [13] N. Déliot, B. Constantin, Plasma membrane calcium channels in cancer: Alterations and  
377 consequences for cell proliferation and migration, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*  
378 1848 (2015) 2512–2522. doi:10.1016/j.bbamem.2015.06.009.
- 379 [14] L. Fouani, S.V. Menezes, M. Paulson, D.R. Richardson, Z. Kovacevic, Metals and  
380 metastasis: Exploiting the role of metals in cancer metastasis to develop novel anti-  
381 metastatic agents, *Pharmacol. Res.* 115 (2017) 275–287. doi:10.1016/j.phrs.2016.12.001.
- 382 [15] Nève J, Methods in determination of selenium states, *J. Trace Elem. Electrolytes Health*  
383 *Dis.* 5 (n.d.) 1–17.
- 384 [16] G. Combs Jr, L. Clarkb, B. Turnbullc, An analysis of cancer prevention by selenium,  
385 *BioFactors.* 14 (2001) 153–159.
- 386 [17] M.K. Baum, M.J. Miguez-Burbano, a Campa, G. Shor-Posner, Selenium and interleukins  
387 in persons infected with human immunodeficiency virus type 1, *J Infect.Dis.* 182 Suppl  
388 (2000) S69–S73. doi:10.1086/315911.
- 389 [18] D.G. Menter, a. L. Sabichi, S.M. Lippman, Selenium effects on prostate cell growth,  
390 *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9 (2000) 1171–1182.
- 391 [19] M.H. and D.P. Bernard J. Brabin, Iron-deficiency anemia: reexamining the nature and

- 392 magnitude of the public health problem, *J. Nutr.* 131 (2001) 616–635.
- 393 [20] T. García-Barrera, J.L. Gómez-Ariza, M. González-Fernández, F. Moreno, M.A. García-  
394 Sevillano, V. Gómez-Jacinto, Biological responses related to agonistic, antagonistic and  
395 synergistic interactions of chemical species., *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 2237–53.  
396 doi:10.1007/s00216-012-5776-2.
- 397 [21] E. Ho, C. Courtemanche, B.N. Ames, Zinc Deficiency Induces Oxidative DNA Damage  
398 and Increases P53 Expression in Human Lung Fibroblasts, *J. Nutr.* 133 (2003) 2543–2548.  
399 doi:10.1093/jn/133.8.2543.
- 400 [22] L.C. Clark, G.F. Combs Jr., B.W. Turnbull, E.H. Slate, D.K. Chalker, J. Chow, et al.,  
401 Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of  
402 the skin: A randomized controlled trial, *J. Am. Med. Assoc.* 276 (1996) 1957–1963.
- 403 [23] M. Epplein, R.F. Burk, Q. Cai, M.K. Hargreaves, W.J. Blot, A prospective study of plasma  
404 selenoprotein P and lung cancer risk among low-income adults, *Cancer Epidemiol.*  
405 *Biomarkers Prev.* 23 (2014) 1238–1244. doi:10.1158/1055-9965.EPI-13-1308.
- 406 [24] M. Björnstedt, A.P. Fernandes, Selenium in the prevention of human cancers, *EPMA J.* 1  
407 (2010) 389–395. doi:10.1007/s13167-010-0033-2.
- 408 [25] R. Lobinski, J.S. Edmonds, K.T. Suzuki, P.C. Uden, Species-selective determination of  
409 selenium compounds in biological materials (Technical report), *Pure Appl. Chem.* 72  
410 (2000) 447–461. doi:10.1351/pac200072030447.
- 411 [26] K.T. Suzuki, Metabolomics of Selenium: Se Metabolites Based on Speciation Studies, *J.*  
412 *Heal. Sci.* 51 (2005) 107–114. doi:10.1248/jhs.51.107.
- 413 [27] P. Jitaru, H. Goenaga-Infante, S. Vaslin-Reimann, P. Fisicaro, A systematic approach to  
414 the accurate quantification of selenium in serum selenoalbumin by HPLC-ICP-MS.,  
415 *Anal. Chim. Acta.* 657 (2010) 100–7. doi:10.1016/j.aca.2009.10.037.
- 416 [28] H.A. Björnstedt M, Xue J, Huang W, Akesson B, The thioredoxin and glutaredoxin  
417 systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase, 269  
418 (1994) 29382–29382.
- 419 [29] B. Åkesson, T. Bellew, R.F. Burk, Purification of selenoprotein P from human plasma,  
420 *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1204 (1994) 243–249.  
421 doi:10.1016/0167-4838(94)90014-0.
- 422 [30] R.F. Burk, K.E. Hill, A.K. Motley, Selenoprotein Metabolism and Function: Evidence for  
423 More than One Function for Selenoprotein P, *J. Nutr.* 133 (2018) 1517S–1520S.  
424 doi:10.1093/jn/133.5.1517s.
- 425 [31] S.H. Arteel GE1, Mostert V, Oubrahim H, Briviba K, Abel J, Protection by selenoprotein

- 426 P in human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration, *Biol. Chem.*  
427 379 (1998) 1201–1205.
- 428 [32] H. Steinbrenner, L. Alili, E. Bilgic, H. Sies, P. Brenneisen, Involvement of selenoprotein P  
429 in protection of human astrocytes from oxidative damage, *Free Radic. Biol. Med.* 40  
430 (2006) 1513–1523. doi:10.1016/j.FREERADBIOMED.2005.12.022.
- 431 [33] M.A. García-Sevillano, T. García-Barrera, J.L. Gómez-Ariza, Development of a new  
432 column switching method for simultaneous speciation of selenometabolites and  
433 selenoproteins in human serum., *J. Chromatogr. A.* 1318 (2013) 171–9.  
434 doi:10.1016/j.chroma.2013.10.012.
- 435 [34] H. Steinbrenner, H. Sies, Protection against reactive oxygen species by selenoproteins,  
436 *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1790 (2009) 1478–1485.  
437 doi:10.1016/j.BBAGEN.2009.02.014.
- 438 [35] C.K. Moscow JA, Schmidt L, Ingram DT, Gnarra J, Johnson B, Loss of heterozygosity of  
439 the human cytosolic glutathione peroxidase I gene in lung cancer, *Carcinogenesis.* 15  
440 (1994) 2769–2773.
- 441 [36] Q.-C. Chen, X.-L. Ding, S.-F. Zhu, L. Su, D.-M. Cai, L. Chen, et al., Common SEP15  
442 polymorphisms and susceptibility to cancer: A systematic review and meta-analysis,  
443 *Transl. Cancer Res.* 6 (2017) 886–893. doi:10.21037/tcr.2017.08.16.
- 444 [37] E. Jablonska, J. Gromadzinska, W. Sobala, E. Reszka, W. Wasowicz, Lung cancer risk  
445 associated with selenium status is modified in smoking individuals by Sep15  
446 polymorphism, *Eur. J. Nutr.* 47 (2008) 47–54. doi:10.1007/s00394-008-0696-9.
- 447 [38] K. Jaworska, S. Gupta, K. Durda, M. Muszyńska, G. Sukiennicki, E. Jaworowska, et al., A  
448 Low Selenium Level Is Associated with Lung and Laryngeal Cancers, *PLoS One.* 8  
449 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0059051.
- 450 [39] K. Hart, N.E. Landvik, H. Lind, V. Skaug, A. Haugen, S. Zienolddiny, A combination of  
451 functional polymorphisms in the CASP8, MMP1, IL10 and SEPS1 genes affects risk of  
452 non-small cell lung cancer, *Lung Cancer.* 71 (2011) 123–129.  
453 doi:10.1016/j.lungcan.2010.04.016.
- 454 [40] H.A. Meyer, B. Hollenbach, C. Stephan, T. Endermann, N.G. Morgenthaler, H.  
455 Cammann, et al., Reduced serum selenoprotein P concentrations in German prostate  
456 cancer patients, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 18 (2009) 2386–2390.  
457 doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-0262.
- 458 [41] A. Steinbrecher, C. Méplan, J. Hesketh, L. Schomburg, T. Endermann, E. Jansen, et al.,  
459 Effects of selenium status and polymorphisms in selenoprotein genes on prostate cancer

- 460 risk in a prospective study of European men, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 19  
461 (2010) 2958–2968. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0364.
- 462 [42] D.N. Ekoue, E. Ansong, L. Liu, V. Macias, R. Deaton, C. Lacher, et al., Correlations of  
463 SELENOF and SELENOF genotypes with serum selenium levels and prostate cancer,  
464 *Prostate.* 78 (2018) 279–288. doi:10.1002/pros.23471.
- 465 [43] H.A. Breedlove, A.M. Smith, R.F. Burk, K.E. Hill, C.L. Shapiro, Serum selenium  
466 measurements in women with early-stage breast cancer with and without  
467 chemotherapy-induced ovarian failure, *Breast Cancer Res. Treat.* 97 (2006) 225–230.  
468 doi:10.1007/s10549-005-9012-z.
- 469 [44] P. Souček, N. Swan, V. Liška, D. Hughes, T. Kunická, L. Schomburg, Expression of  
470 Selenoprotein Genes and Association with Selenium Status in Colorectal Adenoma and  
471 Colorectal Cancer, *Nutrients.* 10 (2018) 1812. doi:10.3390/nu10111812.
- 472 [45] C.S. Muñoz, J.L. Fernández-Martin, J.M. Marchante-Gayón, J.I.G. Alonso, J.B. Cannata-  
473 Andía, A. Sanz-Medel, Reference values for trace and ultratrace elements in human  
474 serum determined by double-focusing ICP-MS, *Biol. Trace Elem. Res.* 82 (2001) 259–272.  
475 doi:10.1385/BTER:82:1-3:259.
- 476 [46] M.Á. García-Sevillano, T. García-Barrera, F. Navarro-Roldán, Z. Montero-Lobato, J.L.  
477 Gómez-Ariza, A combination of metallomics and metabolomics studies to evaluate the  
478 effects of metal interactions in mammals. Application to *Mus musculus* mice under  
479 arsenic/cadmium exposure., *J. Proteomics.* 104 (2014) 66–79.  
480 doi:10.1016/j.jpro.2014.02.011.
- 481 [47] P. Jitaru, G. Cozzi, A. Gambaro, P. Cescon, C. Barbante, Simultaneous speciation  
482 analysis of glutathione peroxidase, selenoprotein P and selenoalbumin in human serum  
483 by tandem anion exchange-affinity HPLC and on-line isotope dilution ICP-quadrupole  
484 MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008). doi:10.1007/s00216-008-2043-7.
- 485 [48] B. Callejón-Leblic, J.L. Gómez-Ariza, A. Pereira-Vega, T. García-Barrera, Metal  
486 dyshomeostasis based biomarkers of lung cancer using human biofluids, *Metallomics.*  
487 10 (2018) 1444–1451. doi:10.1039/c8mt00139a.

488  
489 Figure caption:

490 Figure 1. Positions A and B for the elution of proteins by SEC-AF-ICP-QQQ-MS.

491 Figure 2. Mass Flow chromatogram from LC patients determined by IDA-SEC-AF-ICP-  
492 QQQ-MS.

493 Figure 3. Percentages of selenoproteins against the total sum of species

494 Figure 4. Ratios between mean concentrations of selenoproteins and selenometabolites in  
495 serum samples of LC and HC.

Figure 1  
[Click here to download high resolution image](#)

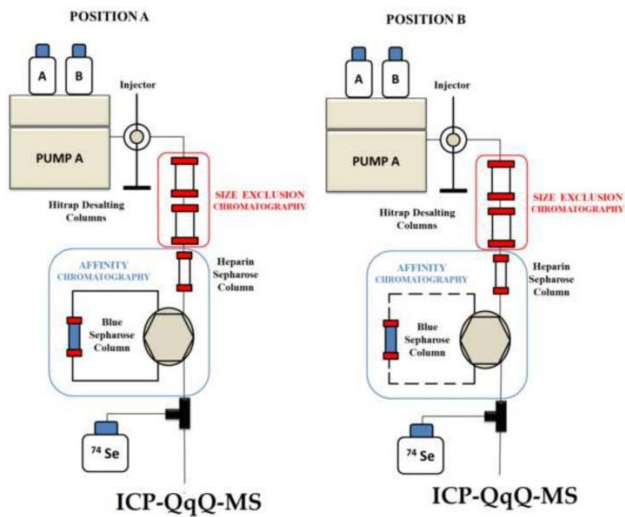


Figure 2  
[Click here to download high resolution image](#)

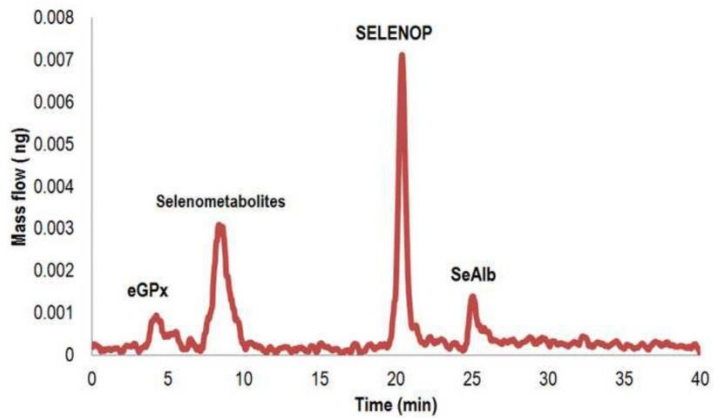


Figure 3  
[Click here to download high resolution image](#)

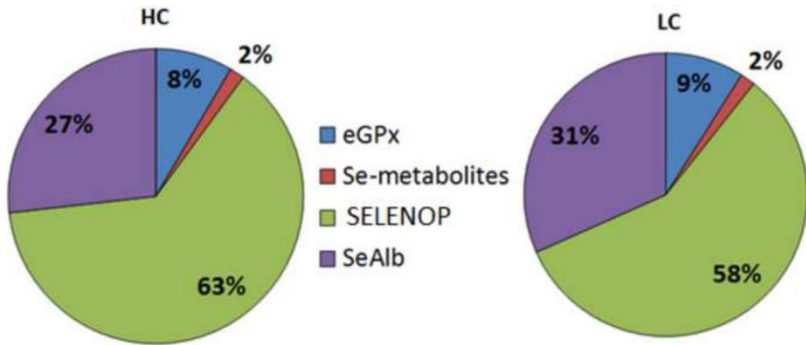


Figure 4  
[Click here to download high resolution image](#)

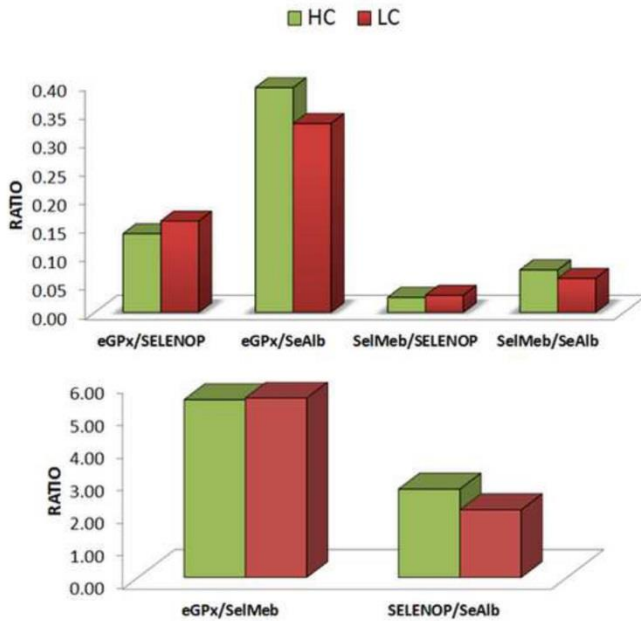


Table 1. Clinical Characteristics of patients (LC) and healthy controls (HC).

Characteristics	LC	HC
Number of samples	n=48	n=39
Age (years)	64 ± 10	58 ± 13
Sex (M/W)	38/10	18/21
Histology		
NSCLC	42	-
SCLC	6	-
Smoking habits		
Smokers	12	0
Ex-smokers	31	23
Non smokers	5	16
Comorbidities		
AHT (%)	58	49
Asthma (%)	5	0
DM (%)	23	27

NSCLC: Non-small cell lung cancer, SCLC: Small cell lung cancer, M: Men, W: Women, LC: Lung Cancer, AHT: Arterial Hypertension and DM: Diabetes Mellitus.

Table 2. Concentrations of selenoproteins in HC and LC. SD, SEM, MAX and MIN values for each group. FC: Fold change, p-value (statistical pairwise comparisons by one way ANOVA test) and AUC values of ROC curves.

Concentrations (ng of Se g <sup>-1</sup> )	eGPx	Se-metabolites	SEPP	SeAlb	TOTAL Sum
Average HC	8.96	1.71	66.74	28.33	105.74
SD HC	3.44	0.83	24.11	17.26	40.00
SEM HC	0.53	0.13	3.72	2.66	6.17
MAX HC	17.60	5.37	116.20	80.45	186.74

MIN HC	2.60	0.44	17.00	5.64	26.29
Average LC	11.24	2.12	72.08	39.56	124.91
SD LC	4.98	1.07	28.55	20.45	47.67
SEM LC	0.77	0.17	4.41	3.16	7.36
MAX LC	21.30	5.75	124.90	84.35	196.97
MIN LC	2.85	0.46	17.95	5.45	26.71
FC (LC/HC)	1.25	1.24	1.08	1.40	1.18
p	0.03	0.08	0.4	0.02	0.07
AUC	0.64	0.63	0.55	0.67	0.63

Table 3. Ratios between selenoproteins in HC and LC. SD,SEM, MAX and MIN values for each group. FC: Fold change, p-value (statistical pairwise comparisons by one way ANOVA test) and AUC values of ROC curves.

	eGPx/Sel Meb	eGPx/SELE NOP	eGPx/Se Alb	SelMeb/SEL ENOP	SelMeb/S eAlb	SELENOP/S eAlb
<b>Average HC</b>	5.44	0.14	0.39	0.03	0.07	2.71
<b>SD HC</b>	1.03	0.04	0.26	0.01	0.05	0.95
<b>SEM HC</b>	0.16	0.01	0.04	0	0.01	0.15
<b>MAX HC</b>	8.32	0.32	1.9	0.1	0.34	4.83
<b>MIN HC</b>	3.28	0.09	0.14	0.02	0.02	0.69
<b>Average LC</b>	5.49	0.16	0.33	0.03	0.06	2.07
<b>SD LC</b>	1.15	0.05	0.16	0.01	0.02	0.77
<b>SEM LC</b>	0.18	0.01	0.02	0	0	0.12
<b>MAX LC</b>	9.38	0.33	0.96	0.09	0.1	3.79
<b>MIN LC</b>	3.25	0.07	0.14	0.02	0.02	0.76

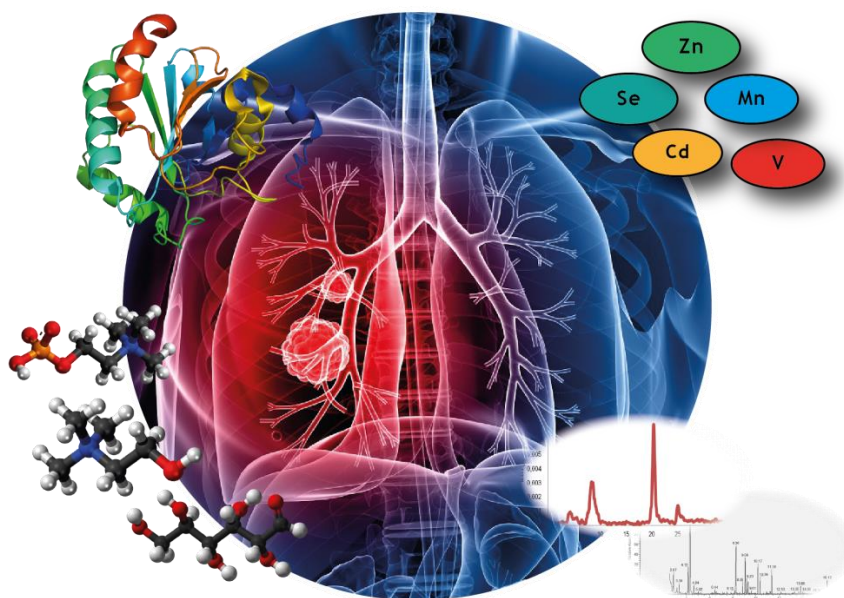
FC (LC/HC)	1.01	1.16	0.84	1.13	0.8	0.68
p_ANOVA	0.84	<b>0.04</b>	0.26	0.24	0.13	<b>0.04</b>
AUC	0.51	<b>0.67</b>	0.61	0.66	0.60	<b>0.72</b>

Table 4. Pearson's Coefficient for selenoproteins from LC and HC groups.

Pearson's Coefficients (r)								
Selenoproteins	eGPx		Se-metabolites		SELENOP		SeAlb	
	HC	LC	HC	LC	HC	LC	HC	LC
<b>eGPx</b>	-	-	0.89	0.86	0.91	0.69	0.77	0.56
<b>Se-metabolites</b>	0.89	0.86	-	-	0.89	0.63	0.69	0.68
<b>SELENOP</b>	0.91	0.69	0.89	0.63	-	-	0.69	0.54
<b>SeAlb</b>	0.77	0.56	0.69	0.68	0.69	0.54	-	-



# CONCLUSIONES - CONCLUSIONS





**CONCLUSIONES.**

A pesar de que los estudios realizados presentan limitaciones en relación al tamaño muestral, debidas a la dificultad de captación de pacientes y a la escasa aportación voluntaria de muestras biológicas, el desarrollo de metodologías analíticas y la aplicación a fluidos biológicos han permitido aportar nuevas contribuciones al estudio del cáncer de pulmón. Así pues, las conclusiones de esta Tesis Doctoral son las siguientes:

- 1) El análisis metabolómico basado en la infusión directa de muestras acoplado a espectrometría de masas (DI-ESI-QTOF-MS) ha permitido realizar un amplio screening metabolómico de las muestras de suero sanguíneo de humanos. Esta técnica ha demostrado tener un gran potencial, debido a su capacidad de abarcar una gran cobertura metabolómica en poco tiempo de análisis.
- 2) El uso de la técnica de separación basada en la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) ha permitido determinar metabolitos de baja masa molecular en muestras de suero, orina y lavado broncoalveolar. Además, la separación cromatográfica mejora los problemas de supresión iónica habituales de metodologías de inyección directa.
- 3) La combinación de las técnicas DI-ESI-QTOF-MS y GC-MS ha dado lugar a una plataforma metabolómica capaz de proporcionar información metabólica complementaria generando una mayor cantidad de resultados.
- 4) El estudio de diferentes muestras biológicas de pacientes con cáncer de pulmón ha permitido relacionar las alteraciones metabólicas entre las mismas. En este sentido, la calidad de determinados metabolitos, metales, ratios metálicos o selenoproteínas, como biomarcadores, está asociada al biofluido estudiado.
- 5) La optimización del análisis metabolómico de lavado broncoalveolar de pacientes con CP ha sido una de las principales aportaciones de esta Tesis Doctoral, ya que no existían antecedentes en la bibliografía.

- 6) La aplicación de las técnicas DI-ESI-QTOF-MS y GC-MS a las muestras ha permitido determinar un gran número de metabolitos alterados en pacientes cáncer de pulmón, así como evaluar la perturbación del avance de la enfermedad mediante su estudio por estadios.
- 7) La comparación metabolómica entre pacientes con cáncer de pulmón y pacientes con EPOC ha permitido relacionar ambas enfermedades ya que se han determinado metabolitos con comportamiento similar entre las mismas.
- 8) El análisis multielemental en suero, orina, y por primera vez en lavado broncoalveolar, de pacientes con cáncer de pulmón, así como en las fracciones de HMM y LMM de suero ha permitido determinar elementos alterados en la enfermedad, sugiriendo un desequilibrio la homeostasis de los elementos. Asimismo, los resultados ponen de manifiesto que determinados metales y/o sus ratios pueden ser buenos biomarcadores del CP.
- 9) La aplicación de la técnica de dilución isotópica (IDA-SEC-AF-ICP-QQQ-MS) por primera vez para la cuantificación de selenoproteínas en suero de pacientes con cáncer de pulmón ha permitido encontrar diferencias significativas entre eGPx y SeAlb, poniendo de manifiesto el importante papel del selenio en esta enfermedad.

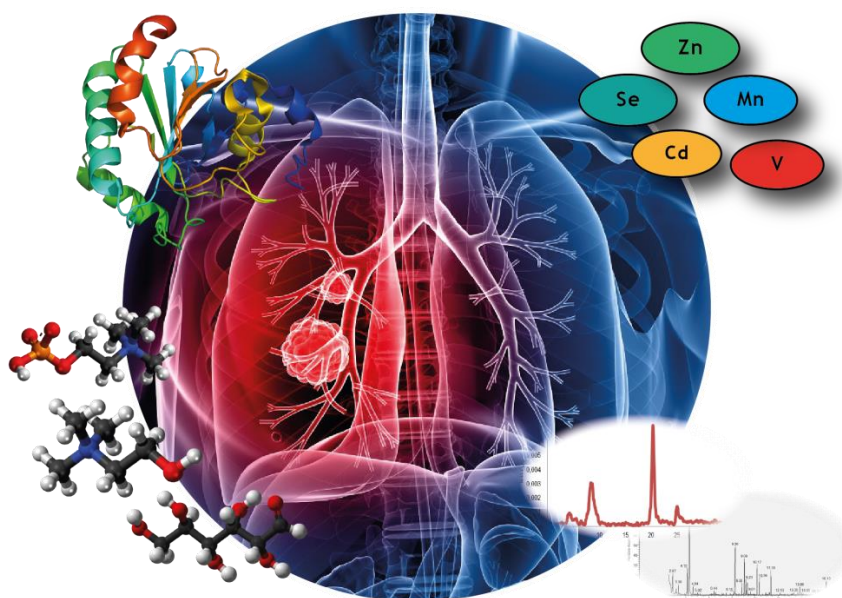
**CONCLUSIONS.**

Although the studies carried out have limitations in relation to the sample size, due to the difficulty of capturing patients and the limited voluntary contribution of biological samples, the development of analytical methodologies and the application to biological fluids have allowed to contribute new results to the study of lung cancer. Thus, the conclusions of this Doctoral Thesis are listed below:

- 1) The metabolomic analysis based on the direct infusion of samples coupled to mass spectrometry (DI-ESI-QTOF-MS) has allowed a broad metabolomic screening of human biological samples. This technique has shown great potential due to its ability to cover large metabolomic coverage in a short time of analysis.
- 2) The use of the separation technique based on gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) has allowed determining metabolites of low molecular weight. In addition, the chromatographic separation improves the problems of ion suppression.
- 3) The combination of DI-ESI-QTOF-MS and GC-MS techniques has given rise to a metabolomic platform capable of providing complementary metabolic information generating a greater number of results.
- 4) The study of different biological samples of patients with lung cancer has allowed relating the metabolic alterations between them.
- 5) The optimization of the metabolomic analysis of bronchoalveolar lavage of patients with PC was the main novelty of this Doctoral Thesis, since there were no antecedents in the literature.
- 6) The application of the techniques DI-ESI-QTOF-MS and GC-MS to the samples has allowed to determine a large number of altered metabolites in patients with lung cancer, as well as to assess the disturbance of the disease progression through its study by stadiums.

- 7) The metabolomic comparison between patients with lung cancer and patients with COPD has made it possible to relate both diseases since metabolites with similar behavior among them have been determined.
- 8) Multi-element analysis in serum, urine and bronchoalveolar lavage of patients with lung cancer, as well as in the fractions of HMM and LMM of serum have allowed to determine altered elements in the disease, suggesting an imbalance in the homeostasis of the elements.
- 9) The application of the isotopic dilution technique (IDA-SEC-AF-ICP-QQQ-MS) for the quantification of selenoproteins in serum of cancer patients has allowed finding significant differences between eGPx and SeAlb, suggesting that Selenium has an important role in this disease.

# REFERENCIAS





## REFERENCIAS.

- [1] W.D. Travis, Pathology of lung cancer, *Clin. Chest Med.* 23 (2002) 65–81. doi:10.1016/S0272-5231(03)00061-3.
- [2] S.B. Knight, P. a. Crosbie, H. Balata, J. Chudziak, T. Hussell, C. Dive, Progress and prospects of early detection in lung cancer, *Open Biol.* 7 (2017). doi:10.1098/rsob.170070.
- [3] G.E. Wynder EL, Etiologic factors in bronchiogenic carcinoma with special reference to industrial exposures; report of eight hundred fifty-seven proved cases., *AMA Arch Ind Hyg Occup Med.* 4 (1951) 221–235.
- [4] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, et al., Cancer incidence and mortality worldwide: Sources , methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, *Int. J. Cancer.* 136 (2015) E359–E3586. doi:10.1002/ijc.29210.
- [5] Las Cifras del Cáncer en España, *Soc. Española Oncol. Médica.* (2018).
- [6] O. Zurriaga, H. Vanaclocha, M.A. Martinez-beneito, P. Botella-rocamora, Spatio-temporal evolution of female lung cancer mortality in a region of Spain , is it worth taking migration into account?, *BMC Cancer.* 8 (2008) 1–9. doi:10.1186/1471-2407-8-35.
- [7] J. Malhotra, M. Malvezzi, E. Negri, C. La Vecchia, P. Boffetta, Risk factors for lung cancer worldwide, *Eur. Respir. J.* (2016) 1–14. doi:10.1183/13993003.00359-2016.
- [8] T. Biology, B. Basis, How Tobacco Smoke Causes Disease The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease 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, 2010.
- [9] S.T. Mayne, J. Buenconsejo, D.T. Janerich, Familial Cancer History and Lung Cancer Risk in United States Nonsmoking Men and Women 1, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 8 (1999) 1065–1069.
- [10] D.R. Baldwin, A R Champion, Diagnosis and treatment of lung cancer: summary of updated NICE guidance, *BMJ.* 342 (2011) d2110.
- [11] A.J. Alberg, J.M. Samet, Epidemiology of Lung Cancer, *Chest.* 123 (2003) 21S–49S. doi:10.1378/CHEST.123.1\_SUPPL.21S.
- [12] S. Darby, D. Hill, a. Auvinen, J.M. Barros-Dios, H. Baysson, F. Bochicchio, et al., Radon in homes and risk of lung cancer: Collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies, *Br. Med. J.* 330 (2005) 223–226. doi:10.1136/bmj.38308.477650.63.
- [13] C.E. Henley SJ, Thun MJ, Chao A, Association between exclusive pipe smoking and mortality from cancer and other diseases., *J. Natl. Cancer Inst.* 96 (2004) 853–861.

- [14] M. Eriksen, J. Mackay, H. Ross, *The tobacco atlas*, American Cancer Society, Atlanta, USA, 2013.
- [15] S.N. Reinke, H. Gallart-Ayala, C. Gómez, A. Checa, A. Fauland, S. Naz, et al., *Metabolomics analysis identifies different metabolotypes of asthma severity*, *Eur. Respir. J.* 49 (2017) 1DUMMY. doi:10.1183/13993003.01740-2016.
- [16] H. Yao, I. Rahman, *Current concepts on the role of inflammation in COPD and lung cancer*, *Curr. Opin. Pharmacol.* 9 (2009) 375–383. doi:10.1016/j.coph.2009.06.009.
- [17] E. Potton, F. McCaughan, S. Janes, *Chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer*, *Respir. Med. COPD Updat.* 5 (2009) 34–37. doi:10.1016/j.rmedu.2009.07.001.
- [18] K.S. Bilello, S. Murin, R.A. Matthay, *Epidemiology, etiology, and prevention of lung cancer*, *Clin. Chest Med.* 23 (2002) 1–25. doi:10.1016/S0272-5231(03)00057-1.
- [19] M.S. Donaldson, *Nutrition and cancer: A review of the evidence for an anti-cancer diet*, *Nutr. J.* 3 (2004) 1–21. doi:10.1186/1475-2891-3-19.
- [20] R. Doll, R. Peto, J. Boreham, I. Sutherland, *Mortality from cancer in relation to smoking: 50 Years observations on British doctors*, *Br. J. Cancer.* 92 (2005) 426–429. doi:10.1038/sj.bjc.6602359.
- [21] S.G. Schwartz AG, Yang P, *Familial risk of lung cancer among nonsmokers and their relatives*, *Am. J. Epidemiol.* 144 (1996) 554–562.
- [22] W.M. Gottlieb K, *Lung cancer staging by endoscopic and endobronchial ultrasound-guided fine-needle aspiration*, *Arch. Bronconeumonía.* 45 (2009) 603–610.
- [23] R. Rami-Porta, ed., *Manual de estadificación en oncología torácica*, Sociedad E, Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica del Sur, 2017.
- [24] H. Wao, R. Mhaskar, A. Kumar, B. Miladinovic, B. Djulbegovic, *Survival of patients with non-small cell lung cancer without treatment: a systematic review and meta-analysis.*, *Syst. Rev.* 2 (2013) 10. doi:10.1186/2046-4053-2-10.
- [25] S. Ozkaya, S. Findik, A. Dirican, A.G. Atici, *Long-term survival rates of patients with stage IIIB and IV non-small cell lung cancer treated with cisplatin plus vinorelbine or gemcitabine*, *Exp. Ther. Med.* 4 (2012) 1035–1038. doi:10.3892/etm.2012.714.
- [26] N. Goossens, S. Nakagawa, X. Sun, Y. Hoshida, *HHS Public Access*, 73 (2015) 389–400. doi:10.3978/j.issn.2218-676X.2015.06.04.Cancer.
- [27] H. I, J.-Y. Cho, *Lung Cancer Biomarkers*, *Adv. Clin. Chem.* 72 (2015) 107–170. doi:10.1016/BS.ACC.2015.07.003.
- [28] I. Ghosh, D. Bhattacharjee, A.K. Das, G. Chakrabarti, A. Dasgupta, S.K. Dey, *Diagnostic role of tumour markers CEA, CA15-3, CA19-9 and CA125 in lung cancer*, *Indian J. Clin. Biochem.* 28 (2013) 24–29. doi:10.1007/s12291-012-0257-0.

- [29] B. Nisman, H. Biran, N. Ramu, N. Heching, V. Barak, T. Peretz, The diagnostic and prognostic value of ProGRP in lung cancer, *Anticancer Res.* 29 (2009) 4827–4832.
- [30] M.F.M. Tavares, M., Electroforesis capilar: Conceitos básicos, *Quim. Nova.* 19 (1995) 173–181. doi:10.1002/mas.
- [31] A. Sanz-Medel, ICP-MS for multiplex absolute determinations of proteins., *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 1853–9. doi:10.1007/s00216-010-4091-z.
- [32] J. Bettmer, Metalloproteomics: a challenge for analytical chemists, *Anal. Bioanal. Chem.* 383 (2005) 370–371. doi:10.1007/s00216-005-3404-0.
- [33] A. Sanz-Medel, M. Montes-Bayón, M. Luisa-Fernández-Sánchez, Trace element speciation by ICP-MS in large biomolecules and its potential for proteomics, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 236–247. doi:10.1007/s00216-003-2082-z.
- [34] M.A. García-Sevillano, M. González-Fernández, R. Jara-Biedma, T. García-Barrera, J. López-Barea, C. Pueyo, et al., Biological response of free-living mouse *Mus spretus* from Doñana National Park under environmental stress based on assessment of metal-binding biomolecules by SEC-ICP-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 1967–1981. doi:10.1007/s00216-012-6274-2.
- [35] H.D. Beckey, Field desorption mass spectrometry: A technique for the study of thermally unstable substances of low volatility, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 2 (1969) 500–502. doi:10.1016/0020-7381(69)80047-1.
- [36] H.R. Morris, M. Panico, M. Barber, R.S. Bordoli, R.D. Sedgwick, A. Tyler, Fast atom bombardment: A new mass spectrometric method for peptide sequence analysis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101 (1981) 623–631. doi:10.1016/0006-291X(81)91304-8.
- [37] J.M. Miller, Fast-Atom Bombardment Mass Spectrometry and Related Techniques, *Adv. Inorg. Chem.* 28 (1984) 1–27. doi:10.1016/S0898-8838(08)60203-2.
- [38] H.J. Shackleton CH, Mattox VR, Analysis of intact steroid conjugates by secondary ion mass spectrometry (including FABMS) and by gas chromatography, *J. Steroid Biochem.* 19 (1983) 209–217.
- [39] M. Yamashita, J.B. Fenn, Negative ion production with the electrospray ion source, *J. Phys. Chem.* 88 (1984) 4671–4675. doi:10.1021/j150664a046.
- [40] F. Hillenkamp, M. Karas, [12] Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization, *Methods Enzymol.* 193 (1990) 280–295. doi:10.1016/0076-6879(90)93420-P.
- [41] Kebarle P., A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 25 (2000) 804–817.
- [42] I.A. Kaltashov, M. Zhang, S.J. Eyles, R.R. Abzalimov, Investigation of structure, dynamics and function of metalloproteins with electrospray ionization mass spectrometry., *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 472–81.

- <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33749011675&partnerID=tZOtx3y1> (accessed November 13, 2015).
- [43] M.R. Emmett, R.M. Caprioli, Micro-electrospray mass spectrometry: ultra-high-sensitivity analysis of peptides and proteins, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 5 (1994) 605–613. doi:10.1016/1044-0305(94)85001-1.
- [44] David C. Gale Richard D. Smith, Small volume and low flow-rate electrospray ionization mass spectrometry of aqueous samples, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 7 (1993) 1017–1021.
- [45] M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp, Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules, *Anal. Chem.* 57 (1985) 2935–2939. doi:10.1021/ac00291a042.
- [46] K. Strupat, M. Karas, F. Hillenkamp, 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption–ionization mass spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* 111 (1991) 89–102. doi:10.1016/0168-1176(91)85050-V.
- [47] P. Chaurand, S. a. Schwartz, M.L. Reyzer, R.M. Caprioli, Imaging Mass Spectrometry: PrincipleS and Potentials, *Toxicol. Pathol.* 33 (2005) 92–101. doi:10.1080/01926230590881862.
- [48] M. Stoeckli, D. Staab, A. Schweitzer, J. Gardiner, D. Seebach, Imaging of a  $\beta$ -Peptide Distribution in Whole-Body Mice Sections by MALDI Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18 (2007) 1921–1924. doi:10.1016/J.JASMS.2007.08.005.
- [49] T. William Hutchens Tai-Tung Yip, New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 7 (1993) 576–580.
- [50] E.T. Fung, V. Thulasiraman, S.R. Weinberger, E.A. Dalmasso, Protein biochips for differential profiling, *Curr. Opin. Biotechnol.* 12 (2001) 65–69. doi:10.1016/S0958-1669(00)00167-1.
- [51] H.J. Issaq, T.D. Veenstra, T.P. Conrads, D. Felschow, The SELDI-TOF MS Approach to Proteomics: Protein Profiling and Biomarker Identification, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292 (2002) 587–592. doi:10.1006/BBRC.2002.6678.
- [52] F. Girolamo, I. Lante, M. Muraca, L. Putignani, The Role of Mass Spectrometry in the “Omics” Era, *Curr. Org. Chem.* 17 (2013) 2891–2905. doi:10.2174/1385272817888131118162725.
- [53] F. Capozzi, A. Bordoni, Foodomics: A new comprehensive approach to food and nutrition, *Genes Nutr.* 8 (2013) 1–4. doi:10.1007/s12263-012-0310-x.
- [54] E.C.N. Shachuan Feng, Li Zhou, Canhua Huang, Ke Xie, Interactomics: toward protein function and regulation, *Expert Rev. Proteomics.* 12 (2015) 37–60.
- [55] T. Konz, E. Migliavacca, L. Dayon, G. Bowman, A. Oikonomidi, J. Popp, et al., ICP-MS/MS-Based Ionomics: A Validated Methodology to Investigate the Biological Variability of the Human Ionome, *J. Proteome Res.* 16 (2017) 2080–

2090. doi:10.1021/acs.jproteome.7b00055.
- [56] S.G. Oliver, M.K. Winson, D.B. Kell, F. Baganz, Systematic functional analysis of the yeast genome, *Trends Biotechnol.* 16 (1998) 373–378. doi:10.1016/S0167-7799(98)01214-1.
- [57] W.B. Dunn, D.I. Broadhurst, H.J. Atherton, R. Goodacre, J.L. Griffin, Systems level studies of mammalian metabolomes: The roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 387–426. doi:10.1039/b906712b.
- [58] J.C. Lindon, E. Holmes, J.K. Nicholson, Metabonomics and its role in drug development and disease diagnosis., *Expert Rev. Mol. Diagn.* 4 (2004) 189–99. doi:10.1586/14737159.4.2.189.
- [59] C.M. Rocha, A.S. Barros, B.J. Goodfellow, I.M. Carreira, A. Gomes, V. Sousa, et al., NMR metabolomics of human lung tumours reveals distinct metabolic signatures for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma, *Carcinogenesis.* 36 (2015). doi:10.1093/carcin/bgu226.
- [60] J.-H. Chen, B.M. Enloe, C.D. Fletcher, D.G. Cory, S. Singer, Biochemical analysis using high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy distinguishes lipoma-like well-differentiated liposarcoma from normal fat [2], *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001). doi:10.1021/ja016182u.
- [61] S. Hori, S. Nishiumi, K. Kobayashi, M. Shinohara, Y. Hatakeyama, Y. Kotani, et al., A metabolomic approach to lung cancer, *Lung Cancer.* 74 (2011) 284–292. doi:10.1016/j.lungcan.2011.02.008.
- [62] P.G. Lokhov, O.N. Kharybin, A.I. Archakov, Diagnosis of lung cancer based on direct-infusion electrospray mass spectrometry of blood plasma metabolites, *Int. J. Mass Spectrom.* 309 (2012). doi:10.1016/j.ijms.2011.10.002.
- [63] J.H. Granger, R. Williams, E.M. Lenz, R.S. Plumb, C.L. Stumpf, I.D. Wilson, A metabonomic study of strain- and age-related differences in the Zucker rat, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007). doi:10.1002/rcm.3059.
- [64] Y. Chen, Z. Ma, A. Li, H. Li, B. Wang, J. Zhong, et al., Metabolomic profiling of human serum in lung cancer patients using liquid chromatography/hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 141 (2015). doi:10.1007/s00432-014-1846-5.
- [65] B. Callejón-Leblic, T. Garcí-a-Barrera, J. Grávalos-Guzmán, A. Pereira-Vega, J.L. Gómez-Ariza, Metabolic profiling of potential lung cancer biomarkers using bronchoalveolar lavage fluid and the integrated direct infusion/ gas chromatography mass spectrometry platform, *J. Proteomics.* 145 (2016) 197–206. doi:10.1016/j.jprot.2016.05.030.
- [66] Y. Niu, Y. Jiang, C. Xu, X. Wang, Y. Liu, H. Zhao, et al., Preliminary results of metabolite in serum and urine of lung cancer patients detected by metabolomics., *Zhongguo Fei Ai Za Zhi.* 15 (2012) 195–201. doi:10.3779/j.issn.1009-3419.2012.04.01.

- [67] L. Puchades-Carrasco, E. Jantus-Lewintre, C. Pérez-Rambla, F. García-García, R. Lucas, S. Calabuig, et al., Serum metabolomic profiling facilitates the non-invasive identification of metabolic biomarkers associated with the onset and progression of non-small cell lung cancer, *Oncotarget*. 7 (2016) 12904–12916. doi:10.18632/oncotarget.7354.
- [68] D. Hao, M.O. Sarfaraz, F. Farshidfar, D.G. Bebb, C.Y. Lee, C.M. Card, et al., Temporal characterization of serum metabolite signatures in lung cancer patients undergoing treatment, *Metabolomics*. 12 (2016) 1–9. doi:10.1007/s11306-016-0961-5.
- [69] G. Lubes, M. Goodarzi, GC–MS based metabolomics used for the identification of cancer volatile organic compounds as biomarkers, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147 (2018) 313–322. doi:10.1016/J.JPBA.2017.07.013.
- [70] D.P. Overy, D.P. Enot, K. Tailliant, H. Jenkins, D. Parker, M. Beckmann, et al., Explanatory signal interpretation and metabolite identification strategies for nominal mass FIE-MS metabolite fingerprints, *Nat. Protoc.* 3 (2008) 471–485. doi:10.1038/nprot.2007.512.
- [71] R. González-Domínguez, T. García-Barrera, J.L. Gómez-Ariza, Application of a novel metabolomic approach based on atmospheric pressure photoionization mass spectrometry using flow injection analysis for the study of Alzheimer's disease, *Talanta*. 131 (2015) 480–489. doi:10.1016/J.TALANTA.2014.07.075.
- [72] R. González-Domínguez, T. García-Barrera, J.L. Gómez-Ariza, Using direct infusion mass spectrometry for serum metabolomics in Alzheimer's disease, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 7137–7148. doi:10.1007/s00216-014-8102-3.
- [73] T.M. Annesley, Ion suppression in mass spectrometry, *Clin. Chem.* 49 (2003) 1041–1044. doi:10.1373/49.7.1041.
- [74] H. Takahashi, K. Kai, Y. Shinbo, K. Tanaka, D. Ohta, T. Oshima, et al., Metabolomics approach for determining growth-specific metabolites based on Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry., *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 2769–82. doi:10.1007/s00216-008-2195-5.
- [75] D. Favretto, E. Cosmi, E. Ragazzi, S. Visentin, M. Tucci, P. Fais, et al., Cord blood metabolomic profiling in intrauterine growth restriction., *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 1109–21. doi:10.1007/s00216-011-5540-z.
- [76] S.G. Musharraf, S. Mazhar, M.I. Choudhary, N. Rizi, Atta-Ur-Rahman, Plasma metabolite profiling and chemometric analyses of lung cancer along with three controls through gas chromatography-mass spectrometry, *Sci. Rep.* 5 (2015). doi:10.1038/srep08607.
- [77] Y. Chen, Z. Ma, A. Li, H. Li, B. Wang, J. Zhong, et al., Metabolomic profiling of human serum in lung cancer patients using liquid chromatography/hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 141 (2015) 705–718. doi:10.1007/s00432-014-1846-5.
- [78] J.-M. Hu, H.-T. Sun, Serum proton NMR metabolomics analysis of human

- lung cancer following microwave ablation, *Radiat. Oncol.* 13 (2018). doi:10.1186/s13014-018-0982-5.
- [79] P.J. Mazzone, X.-F. Wang, M. Beukemann, Q. Zhang, M. Seeley, R. Mohny, et al., Metabolite profiles of the serum of patients with non-small cell carcinoma, *J. Thorac. Oncol.* 11 (2016) 72–78. doi:10.1016/j.jtho.2015.09.002.
- [80] M. Roś-Mazurczyk, A. Wojakowska, Ł. Marczak, K. Polański, M. Pietrowska, J. Polanska, et al., Panel of serum metabolites discriminates cancer patients and healthy participants of lung cancer screening - A pilot study, *Acta Biochim. Pol.* 64 (2017) 513–518. doi:10.18388/abp.2017\_1517.
- [81] A. Klupczynska, P. Dereziński, W. Dyszkiewicz, K. Pawlak, M. Kasprzyk, Z.J. Kokot, Evaluation of serum amino acid profiles' utility in non-small cell lung cancer detection in Polish population, *Lung Cancer.* 100 (2016). doi:10.1016/j.lungcan.2016.04.008.
- [82] S. Deja, I. Porebska, A. Kowal, A. Zabek, W. Barg, K. Pawelczyk, et al., Metabolomics provide new insights on lung cancer staging and discrimination from chronic obstructive pulmonary disease, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 100 (2014) 369–380. doi:10.1016/j.jpba.2014.08.020.
- [83] J.F. Fahrman, K. Kim, B.C. DeFelice, S.L. Taylor, D.R. Gandara, K.Y. Yoneda, et al., Investigation of metabolomic blood biomarkers for detection of adenocarcinoma lung cancer, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 24 (2015) 1716–1723. doi:10.1158/1055-9965.EPI-15-0427.
- [84] Y. Li, X. Song, X. Zhao, L. Zou, G. Xu, 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.* 966 (2014) 147–153. doi:10.1016/j.jchromb.2014.04.047.
- [85] T. Wen, L. Gao, Z. Wen, C. Wu, C.S. Tan, W.Z. Toh, et al., Exploratory investigation of plasma metabolomics in human lung adenocarcinoma, *Mol. Biosyst.* 9 (2013) 2370–2378. doi:10.1039/c3mb70138g.
- [86] S. Miyamoto, S.L. Taylor, D.K. Barupal, A. Taguchi, G. Wohlgemuth, W.R. Wikoff, et al., Systemic metabolomic changes in blood samples of lung cancer patients identified by gas chromatography Time-Of-Flight mass spectrometry, *Metabolites.* 5 (2015) 192–210. doi:10.3390/metabo5020192.
- [87] D.C. Wedge, J.W. Allwood, W. Dunn, A. a. Vaughan, K. Simpson, M. Brown, 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.* 83 (2011) 6689–6697. doi:10.1021/ac2012224.
- [88] Y. Chen, Z. Ma, A. Li, H. Li, B. Wang, J. Zhong, et al., Metabolomic profiling of human serum in lung cancer patients using liquid chromatography / hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry and gas chromatography / mass spectrometry, (2015) 705–718. doi:10.1007/s00432-014-1846-5.
- [89] E. Louis, F.X. Cantrelle, L. Mesotten, G. Reekmans, L. Bervoets, K. Vanhove, et al., Metabolic phenotyping of human plasma by 1H-NMR at high and medium

- magnetic field strengths: a case study for lung cancer, *Magn. Reson. Chem.* 55 (2017) 706–713. doi:10.1002/mrc.4577.
- [90] J. Maeda, M. Higashiyama, A. Imaizumi, T. Nakayama, H. Yamamoto, T. Daimon, 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*. 10 (2010). doi:10.1186/1471-2407-10-690.
- [91] A. Klupczynska, P. Dereziński, T.J. Garrett, V.Y. Rubio, W. Dyszkiewicz, M. Kasprzyk, et al., Study of early stage non-small-cell lung cancer using Orbitrap-based global serum metabolomics, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 143 (2017) 649–659. doi:10.1007/s00432-017-2347-0.
- [92] J.F. Fahrman, D. Grapov, B.C. Defelice, S. Taylor, K. Kim, K. Kelly, et al., Serum phosphatidylethanolamine levels distinguish benign from malignant solitary pulmonary nodules and represent a potential diagnostic biomarker for lung cancer, *Cancer Biomarkers*. 16 (2016) 609–617. doi:10.3233/CBM-160602.
- [93] W.R. Wikoff, S. Hanash, B. DeFelice, S. Miyamoto, M. Barnett, Y. Zhao, et al., Diacetylspermine is a novel prediagnostic serum biomarker for non-small-cell lung cancer and has additive performance with pro-surfactant protein B, *J. Clin. Oncol.* 33 (2015) 3880–3886. doi:10.1200/JCO.2015.61.7779.
- [94] Y. Chen, Z. Ma, L. Min, H. Li, B. Wang, J. Zhong, et al., Biomarker identification and pathway analysis by serum metabolomics of lung cancer, *Biomed Res. Int.* 2015 (2015). doi:10.1155/2015/183624.
- [95] C.-P. Wen, F. Zhang, H. , Dong Liang, Christopher Wen, Jian Gu, M. Skinner, Wong-Ho Chow, Yuanqing Ye, Xia Pu, Michelle A.T. Hildebrandt, C.K.T. Huang, Chien-Hua Chen, Chao Agnes Hsiung, Min Kuang Tsai, and X.W. Scott M. Lippman, The ability of bilirubin in identifying smokers with higher risk of lung cancer: a large cohort study in conjunction with global metabolomic profiling, *Clin. Cancer Res.* 21 (2015) 193–200. doi:10.1016/j.cmet.2011.06.020.White.
- [96] Q. Wu, Y. Wang, X. Gu, J. Zhou, H. Zhang, W. Lv, 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.* 37 (2014) 1728–1735. doi:10.1002/jssc.201400222.
- [97] Z. An, Y. Chen, R. Zhang, Y. Song, J. Sun, J. He, et al., Integrated ionization approach for RRLC-MS/MS-based metabolomics: finding potential biomarkers for lung cancer., *J. Proteome Res.* 9 (2010) 4071–81. doi:10.1021/pr100265g.
- [98] Q. Yang, X. Shi, Y. Wang, W. Wang, H. He, X. Lu, et al., Urinary metabolomic study of lung cancer by a fully automatic hyphenated hydrophilic interaction/RPLC-MS system., *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 1495–503. doi:10.1002/jssc.200900798.
- [99] J. Carrola, C.M. Rocha, A.S. Barros, A.M. Gil, B.J. Goodfellow, I.M. Carreira, et al., Metabolic signatures of lung cancer in biofluids: NMR-based

- metabonomics of urine., *J. Proteome Res.* 10 (2011) 221–30. doi:10.1021/pr100899x.
- [100] E. a. Mathé, A.D. Patterson, M. Haznadar, S.K. Manna, K.W. Krausz, E.D. Bowman, et al., Noninvasive urinary metabolomic profiling identifies diagnostic and prognostic markers in lung cancer, *Cancer Res.* 74 (2014) 3259–3270. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0109.
- [101] S.J.S. Cameron, K.E. Lewis, M. Beckmann, G.G. Allison, R. Ghosal, P.D. Lewis, et al., The metabolomic detection of lung cancer biomarkers in sputum, *Lung Cancer.* 94 (2016) 88–95. doi:10.1016/j.lungcan.2016.02.006.
- [102] N.J. Bonne, D.T.W. Wong, Salivary biomarker development using genomic, proteomic and metabolomic approaches, *Genome Med.* 4 (2012). doi:10.1186/gm383.
- [103] L.J. Li X, Yang T, Spectral analysis of human saliva for detection of lung cancer using surface-enhanced Raman spectroscopy, *J. Biomed. Opt.* 17 (2012) 37003.
- [104] M. Calderón-Santiago, F. Priego-Capote, B. Jurado-Gámez, M.D. Luque de Castro, Optimization study for metabolomics analysis of human sweat by liquid chromatography–tandem mass spectrometry in high resolution mode, *J. Chromatogr. A.* 1333 (2014) 70–78. doi:10.1016/j.CHROMA.2014.01.071.
- [105] A. Mishra, Ronda Greaves, J. Massie, The Limitations of Sweat Electrolyte Reference Intervals for the Diagnosis of Cystic Fibrosis: A Systematic Review, *Clin. Biochem. Rev.* 28 (2007) 60–76.
- [106] X. Robin, M.D. Luque de Castro, F. Priego-Capote, M. Calderón-Santiago, B. Jurado-Gámez, N. Turck, et al., Human sweat metabolomics for lung cancer screening, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 5381–5392. doi:10.1007/s00216-015-8700-8.
- [107] A. Peralbo-Molina, M. Calderón-Santiago, F. Priego-Capote, B. Jurado-Gámez, M.D. Luque De Castro, Metabolomics analysis of exhaled breath condensate for discrimination between lung cancer patients and risk factor individuals, *J. Breath Res.* 10 (2016). doi:10.1088/1752-7155/10/1/016011.
- [108] A. Peralbo-Molina, M. Calderón-Santiago, F. Priego-Capote, B. Jurado-Gámez, M.D. Luque De Castro, Identification of metabolomics panels for potential lung cancer screening by analysis of exhaled breath condensate, *J. Breath Res.* 10 (2016). doi:10.1088/1752-7155/10/2/026002.
- [109] P. Scheinmann, M.R. Benoist, S. Blanche, P. McKelvie, J. de Blic, M. Le Bourgeois, Value of bronchoalveolar lavage in the management of severe acute pneumonia and interstitial pneumonitis in the immunocompromised child., *Thorax.* 42 (2008) 759–765. doi:10.1136/thx.42.10.759.
- [110] J. Riedler, J. Grigg, C.F. Robertson, Role of bronchoalveolar lavage in children with lung disease, *Eur. Respir. J.* 8 (1995) 1725–1730. doi:10.1183/09031936.95.08101725.
- [111] H. Liu, H. Wang, C. Li, L. Wang, Z. Pan, L. Wang, Investigation of volatile

- organic metabolites in lung cancer pleural effusions by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* 945–946 (2014) 53–59. doi:10.1016/J.JCHROMB.2013.11.038.
- [112] C.W. Lam, C.Y. Law, Untargeted mass spectrometry-based metabolomic profiling of pleural effusions: Fatty acids as novel cancer biomarkers for malignant pleural effusions, *J. Proteome Res.* 13 (2014) 4040–4046. doi:10.1021/pr5003774.
- [113] R.S. Winokur, B.B. Pua, B. Sullivan, D.C. Madoff, Percutaneous lung biopsy: Technique, efficacy, and complications, *Semin. Intervent. Radiol.* 30 (2013) 121–127. doi:10.1055/s-0033-1342952.
- [114] A.N. Lane, M.A. Farag, M. Bousamra, R.M. Higashi, T.W. Fan, H. Gao, et al., Altered regulation of metabolic pathways in human lung cancer discerned by <sup>13</sup>C stable isotope-resolved metabolomics (SIRM), *Mol. Cancer.* 8 (2009) 41. doi:10.1186/1476-4598-8-41.
- [115] C.M. Rocha, A.S. Barros, A.M. Gil, B.J. Goodfellow, E. Humpfer, M. Spraul, 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.* 9 (2010) 319–32. doi:10.1021/pr9006574.
- [116] J.J.R. Fraústo da Silva, R.J.P. Williams, The Trinity of Life: The Genome, the Proteome, and the Mineral Chemical Elements, *J. Chem. Educ.* 81 (2009) 738. doi:10.1021/ed081p738.
- [117] J.A. Tainer, V.A. Roberts, E.D. Getzoff, Metal-binding sites in proteins, *Curr. Opin. Biotechnol.* 2 (1991) 582–591. doi:10.1016/0958-1669(91)90084-I.
- [118] R. Lobinski, J.S. Becker, H. Haraguchi, B. Sarkar, Metallomics: Guidelines for terminology and critical evaluation of analytical chemistry approaches (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* 82 (2010) 493–504. doi:10.1351/PAC-REP-09-03-04.
- [119] W. Maret, The metals in the biological periodic system of the elements: Concepts and conjectures, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016) 1–8. doi:10.3390/ijms17010066.
- [120] S.J. Elledge, Z. Zhou, J.B. Allen, Ribonucleotide reductase: regulation, regulation, regulation, *Trends Biochem. Sci.* 17 (1992) 119–123. doi:10.1016/0968-0004(92)90249-9.
- [121] A.F. Parisi, B.L. Vallee, Zinc metalloenzymes: characteristics and significance in biology and medicine., *Am. J. Clin. Nutr.* (1969).
- [122] C.C.W. Hsia, Respiratory Function of Hemoglobin, *N. Engl. J. Med.* (1998). doi:10.1056/NEJM199801223380407.
- [123] D.S. Kalinowski, C. Stefani, S. Toyokuni, T. Ganz, G.J. Anderson, N.V. Subramaniam, et al., Redox cycling metals: Pedaling their roles in metabolism and their use in the development of novel therapeutics, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1863 (2016) 727–748. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.01.026.

- [124] H.S. Kim, Y.J. Kim, Y.R. Seo, An Overview of Carcinogenic Heavy Metal: Molecular Toxicity Mechanism and Prevention, *J. Cancer Prev.* 20 (2015) 232–240. doi:10.15430/JCP.2015.20.4.232.
- [125] G. Combs Jr, L. Clarkb, B. Turnbullc, An analysis of cancer prevention by selenium, *BioFactors.* 14 (2001) 153–159.
- [126] M.K. Baum, M.J. Miguez-Burbano, a Campa, G. Shor-Posner, Selenium and interleukins in persons infected with human immunodeficiency virus type 1, *J Infect.Dis.* 182 Suppl (2000) S69–S73. doi:10.1086/315911.
- [127] T. García-Barrera, J.L. Gómez-Ariza, M. González-Fernández, F. Moreno, M.A. García-Sevillano, V. Gómez-Jacinto, Biological responses related to agonistic, antagonistic and synergistic interactions of chemical species, *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 2237–2253. doi:10.1007/s00216-012-5776-2.
- [128] D.G. Menter, a. L. Sabichi, S.M. Lippman, Selenium effects on prostate cell growth, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9 (2000) 1171–1182.
- [129] M.H. and D.P. Bernard J. Brabin, Iron-deficiency anemia: reexamining the nature and magnitude of the public health problem, *J. Nutr.* 131 (2001) 616–635.
- [130] I.E. León, J.F. Cadavid-Vargas, A.L. Di Virgilio, S. Etcheverry, Vanadium, ruthenium and copper compounds: A new class of non-platinum Metallodrugs with anticancer activity, *Curr. Med. Chem.* 23 (2016). doi:10.2174/0929867323666160824162546.
- [131] J.-W. Park, R.A. Floyd, Lipid peroxidation products mediate the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA, *Free Radic. Biol. Med.* 12 (1992) 245–250. doi:10.1016/0891-5849(92)90111-S.
- [132] R. KS, A. G, Z. M, G. PM., Ceruloplasmin, copper ions, and angiogenesis, *J Natl Cancer Inst.* 69 (1982) 1183–1188.
- [133] E. Ho, B.N. Ames, Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NF B, and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (2002) 16770–16775. doi:10.1073/pnas.222679399.
- [134] E. Ho, Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk, *J. Nutr. Biochem.* 15 (2004) 572–578. doi:10.1016/J.JNUTBIO.2004.07.005.
- [135] G.J. Brewer, R.D. Dick, D.K. Grover, V. LeClaire, M. Tseng, M. Wicha, et al., Treatment of metastatic cancer with tetrathiomolybdate, an anticopper, antiangiogenic agent: Phase I study, *Clin. Cancer Res.* 6 (2000) 1–10. doi:10.2307/2393944.
- [136] W. Domej, M. Krachler, W. Goessler, A. Maier, K.J. Irgolic, J.K. Lang, Concentrations of copper, zinc, manganese, rubidium, and magnesium in thoracic empyemata and corresponding sera, *Biol. Trace Elem. Res.* 78 (2001) 53–66. doi:10.1385/BTER:78:1-3:53.
- [137] A.A. Babacan E, Cavdar AO, Serum zinc levels, lymphocyte counts and

- functions in pediatric Hodgkin's disease, *Boll Ist Sieroter Milan*. 56 (1977) 228–234.
- [138] L.W. Oberley, Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression, *Biomed. Pharmacother.* 59 (2005) 143–148. doi:10.1016/j.biopha.2005.03.006.
- [139] V.L. Kinnula, J.D. Crapo, Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167 (2003) 1600–1619. doi:10.1164/rccm.200212-1479SO.
- [140] K. Zabłocka-Słowińska, S. Płaczkowska, A. Prescha, K. Pawełczyk, I. Porębska, M. Kosacka, et al., Serum and whole blood Zn, Cu and Mn profiles and their relation to redox status in lung cancer patients, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 45 (2018) 78–84. doi:10.1016/j.jtemb.2017.09.024.
- [141] M.O. Huff, S.L. Todd, A.L. Smith, J.T. Elpers, A.P. Smith, R.D. Murphy, et al., Arsenite and cadmium activate MAPK/ERK via membrane estrogen receptors and g-protein coupled estrogen receptor signaling in human lung adenocarcinoma cells, *Toxicol. Sci.* 152 (2016) 62–71. doi:10.1093/toxsci/kfw064.
- [142] W.H. Watson, J.D. Yager, Arsenic: Extension of its endocrine disruption potential to interference with estrogen receptor-mediated signaling, *Toxicol. Sci.* 98 (2007) 1–4. doi:10.1093/toxsci/kfm111.
- [143] Y. Wang, J. Fang, S.S. Leonard, K.M.K. Rao, Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species, *Free Radic. Biol. Med.* 36 (2004) 1434–1443. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.03.010.
- [144] T.K. Hei, M. Filipic, Role of oxidative damage in the genotoxicity of arsenic, *Free Radic. Biol. Med.* (2004). doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.003.
- [145] A. Hartwig, M. Asmuss, I. Ehleben, U. Herzer, D. Kostelac, A. Pelzer, et al., Interference by toxic metal ions with DNA repair processes and cell cycle control: Molecular mechanisms, *Environ. Health Perspect.* (2002). doi:10.1289/ehp.02110s5797.
- [146] G.Y.L. Lui, Z. Kovacevic, V. Richardson, A.M. Merlot, D.S. Kalinowski, D.R. Richardson, Targeting cancer by binding iron: Dissecting cellular signaling pathways, *Oncotarget*. 6 (2015) 18748–18779. doi:10.18632/oncotarget.4349.
- [147] D.J.R. Lane, T.M. Mills, N.H. Shafie, A.M. Merlot, R. Saleh Moussa, D.S. Kalinowski, et al., Expanding horizons in iron chelation and the treatment of cancer: Role of iron in the regulation of ER stress and the epithelial-mesenchymal transition, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*. 1845 (2014) 166–181. doi:10.1016/j.bbcan.2014.01.005.
- [148] N. Déliot, B. Constantin, Plasma membrane calcium channels in cancer: Alterations and consequences for cell proliferation and migration, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1848 (2015) 2512–2522. doi:10.1016/j.bbmem.2015.06.009.
- [149] F.W. Sunderman, C.E. Selin, The metabolism of nickel-63 carbonyl, *Toxicol.*

- Appl. Pharmacol. 12 (1968) 207–218. doi:10.1016/0041-008X(68)90033-1.
- [150] K. KS, Possible role of oxidative damage in metal-induced carcinogenesis, *Cancer Invest.* 13 (1995) 411–430.
- [151] G.N. Schrauzer, D.A. White, C.J. Schneider, Cancer mortality correlation studies-IV: Associations with dietary intakes and blood levels of certain trace elements, notably se-antagonists, *Bioinorg. Chem.* 7 (1977) 35–56. doi:10.1016/S0006-3061(00)80127-1.
- [152] M. Clementino, X. Shi, Z. Zhang, Oxidative stress and metabolic reprogramming in Cr(VI) carcinogenesis, *Curr. Opin. Toxicol.* 8 (2018) 20–27. doi:10.1016/j.cotox.2017.11.015.
- [153] P. Sarita, G.J.N. Raju, M.R. Kumar, A.S. Pradeep, S.B. Reddy, Analysis of blood serum of lung cancer patients using particle induced X-ray emission, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 297 (2013) 431–436. doi:10.1007/s10967-012-2398-2.
- [154] Y. Ren, Z. Zhang, Y. Ren, W. Li, M. Wang, G. Xu, Diagnosis of lung cancer based on metal contents in serum and hair using multivariate statistical methods, *Talanta.* 44 (1997) 1823–1831. doi:10.1016/S0039-9140(97)00062-3.
- [155] Y. Jin, C. Zhang, H. Xu, S. Xue, Y. Wang, Y. Hou, et al., Combined effects of serum trace metals and polymorphisms of CYP1A1 or GSTM1 on non-small cell lung cancer: A hospital based case-control study in China, *Cancer Epidemiol.* 35 (2011) 182–187. doi:10.1016/j.canep.2010.06.004.
- [156] L.-L. Zhang, F.-S. Wei, G.-P. Wu, Study on the relationship between lung cancer of indoor air pollution exposure and trace elements in blood plasma, in: 3rd Int. Conf. Bioinforma. Biomed. Eng. iCBBE 2009, 2009. doi:10.1109/ICBBE.2009.5163523.
- [157] J.Y. Kim, H.B. Lim, M.H. Moon, Online Miniaturized Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for Metalloprotein Analysis of Plasma from Patients with Lung Cancer, *Anal. Chem.* 88 (2016) 10198–10205. doi:10.1021/acs.analchem.6b02775.
- [158] C. Tan, H. Chen, T. Wu, Classification models for detection of lung cancer based on nine element distribution of urine samples, *Biol. Trace Elem. Res.* 142 (2011) 18–28. doi:10.1007/s12011-010-8748-4.
- [159] C. Tan, H. Chen, C. Xia, Early prediction of lung cancer based on the combination of trace element analysis in urine and an Adaboost algorithm, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 746–752. doi:10.1016/j.jpba.2008.12.010.
- [160] K.-Y. Lee, P.-H. Feng, H.-C. Chuang, S.-M. Wu, W.-T. Liu, K.-Y. Chen, et al., Trace Elements in Pleural Effusion Correlates with Smokers with Lung Cancer, *Biol. Trace Elem. Res.* 182 (2017) 14–20. doi:10.1007/s12011-017-1079-y.
- [161] Y. Benderli Cihan, S. Öztürk Yildirim, A discriminant analysis of trace elements in scalp hair of healthy controls and Stage-IIIB non-small cell lung cancer (NSCLC) patients, *Biol. Trace Elem. Res.* 144 (2011) 272–294. doi:10.1007/s12011-011-9086-x.

- [162] P. Censi, P. Zuddas, L.A. Randazzo, E. Tamburo, S. Speziale, A. Cuttitta, et al., Source and nature of inhaled atmospheric dust from trace element analyses of human bronchial fluids, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 6262–6267. doi:10.1021/es200539p.
- [163] E. Bargagli, F. Monaci, N. Bianchi, C. Bucci, P. Rottoli, Analysis of trace elements in bronchoalveolar lavage of patients with diffuse lung diseases, *Biol. Trace Elem. Res.* 124 (2008) 225–235. doi:10.1007/s12011-008-8143-6.
- [164] S. Atukorala, T.K. Basu, J.W. Dickerson, D. Donaldson, A. Sakula, Vitamin A, zinc and lung cancer, *Br. J. Cancer.* 40 (1979) 927–931. doi:10.1038/bjc.1979.287.
- [165] B.F. Issell, B.V. Macfadyen, E.T. Gum, M. Valdivieso, S.J. Dudrick, G.P. Bodey, Serum zinc levels in lung cancer patients, *Cancer.* 47 (1981) 1845–1848. doi:10.1002/1097-0142(19810401)47:7<1845::AID-CNCR2820470721>3.0.CO;2-B.
- [166] M. Zowczak, M. Iskra, J. Paszkowski, M. Manczak, L. Torlinski, E. Wysocka, Oxidase activity of ceruloplasmin and concentrations of copper and zinc in serum of cancer patients, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 15 (2001) 193–196. doi:10.1016/S0946-672X(01)80066-3.
- [167] K. Suzuki, Y. Yamaya, N. Kanzawa, M. Chiba, K. Sera, R. Asano, Trace and major elements status in bronchoalveolar lavage fluid in dogs with or without bronchopneumonia, *Biol. Trace Elem. Res.* 124 (2008) 92–96. doi:10.1007/s12011-008-8149-0.
- [168] E.A. Maier, A. Dietemann-Molard, F. Rastegar, R. Heimbürger, C. Ruch, A. Maier, et al., Simultaneous determination of trace elements in lavage fluids from human bronchial alveoli by energy-dispersive x-ray fluorescence. 3. Routine analysis., *Clin. Chem.* 33 (1987) 2234–2239.
- [169] B. Callejón-Leblic, J.L. Gómez-Ariza, A. Pereira-Vega, T. García-Barrera, Metal dyshomeostasis based biomarkers of lung cancer using human biofluids, *Metallomics.* 10 (2018) 1444–1451. doi:10.1039/c8mt00139a.
- [170] E.N. Drake Ii, H.H. Sky-Peck2, Discriminant Analysis of Trace Element Distribution in Normal and Malignant Human Tissues1, *CANCER Res.* 49 (1989) 4210–4215.
- [171] A. Kubala-Kukuś, J. Braziewicz, D. Banaś, U. Majewska, S. Gózdź, A. Urbaniak, Trace element load in cancer and normal lung tissue, *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms.* 150 (1999) 193–199. doi:10.1016/S0168-583X(98)01057-X.
- [172] M. Díez, F.J. Cerdà, M. Arroyo, J.L. Balibrea, Use of the copper/zinc ratio in the diagnosis of lung cancer, *Cancer.* 63 (1989) 726–730. doi:10.1002/1097-0142(19890215)63:4<726::AID-CNCR2820630421>3.0.CO;2-P.
- [173] P. Borella, a Bargellini, E. Caselgrandi, L. Piccinini, Observations on the use of plasma, hair and tissue to evaluate trace element status in cancer., *J. Trace Elem. Med. Biol.* 11 (1997) 162–165. doi:10.1016/S0946-672X(97)80046-6.

- [174] G.S. Andrews, Studies of plasma zinc, copper, caeruloplasmin, and growth hormone. With special reference to carcinoma of the bronchus, *J. Clin. Pathol.* 32 (1979) 325–333.
- [175] M.K. Schwartz, Role of Trace Elements in Cancer, *Cancer Res.* 35 (1975) 3481–3487.
- [176] F. Schicha, H., Klein, H., Kasperek, K., Ritzl, Activation analytical estimation of some trace elements in several organs and in cancerous tissue, *Beitr. Path. Anat. Allg. Pathol.* 138 (1969) 245–271.
- [177] Y.-S. Lin, J.L. Caffrey, M.-H. Chang, N. Dowling, J.-W. Lin, Cigarette smoking, cadmium exposure, and zinc intake on obstructive lung disorder, *Respir. Res.* 11 (2010) 53. doi:10.1186/1465-9921-11-53.
- [178] V. Voyatzoglou, T. Mountokalakis, V. Tsata-Voyatzoglou, A. Koutselinis, G. Skalkeas, Serum zinc levels and urinary zinc excretion in patients with bronchogenic carcinoma. Effects of tumor resection, *Am. J. Surg.* 144 (1982) 355–358. doi:10.1016/0002-9610(82)90019-8.
- [179] C. Vanoeteren, R. Cornelis, R. Dams, Evaluation of trace elements in human lung tissue. II. Recovery and analysis of inhaled particulates, *Sci. Total Env.* 54 (1986) 231–236.
- [180] K.-Y. Lee, P.-H. Feng, H.-C. Chuang, S.-M. Wu, W.-T. Liu, K.-Y. Chen, et al., Trace elements in pleural effusion correlates with smokers with lung cancer, *Biol. Trace Elem. Res.* 182 (2018) 14–20. doi:10.1007/s12011-017-1079-y.
- [181] A.I. Anzellotti, N.P. Farrell, Zinc metalloproteins as medicinal targets, *Chem. Soc. Rev.* 37 (2008) 1629–1651. doi:10.1039/b617121b.
- [182] J. Hrabeta, T. Eckschlager, M. Stiborova, Z. Heger, S. Krizkova, V. Adam, Zinc and zinc-containing biomolecules in childhood brain tumors, *J. Mol. Med.* 94 (2016) 1199–1215. doi:10.1007/s00109-016-1454-8.
- [183] Z. Li, P. Wang, Y. Liu, Y. Yao, Y. Xue, J. Ma, et al., MiR-449a exerts tumor-suppressive functions in human glioblastoma by targeting Myc-associated zinc-finger protein, *Mol. Oncol.* 9 (2014) 640–656. doi:10.1016/j.molonc.2014.11.003.
- [184] M. Si, J. Lang, The roles of metallothioneins in carcinogenesis, *J. Hematol. Oncol.* 11 (2018). doi:10.1186/s13045-018-0645-x.
- [185] G.-Y. Liang, S.-X. Lu, G. Xu, X.-D. Liu, J. Li, D.-S. Zhang, Expression of metallothionein and Nrf2 pathway genes in lung cancer and cancer-surrounding tissues, *World J. Surg. Oncol.* 11 (2013). doi:10.1186/1477-7819-11-199.
- [186] L.L. da Motta, M.A. De Bastiani, F. Stapenhorst, F. Klamt, Oxidative stress associates with aggressiveness in lung large-cell carcinoma, *Tumor Biol.* 36 (2015) 4681–4688. doi:10.1007/s13277-015-3116-9.
- [187] T. Wen, L. Gao, Z. Wen, C. Wu, C.S. Tan, W.Z. Toh, et al., Exploratory investigation of plasma metabolomics in human lung adenocarcinoma., *Mol.*

- Biosyst. 9 (2013) 2370–8. doi:10.1039/c3mb70138g.
- [188] R.G. CUTLER, Oxidative Stress Profiling: Part I. Its Potential Importance in the Optimization of Human Health, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1055 (2005) 93–135. doi:10.1196/annals.1323.027.
- [189] K.T. Suzuki, Metabolomics of Selenium: Se Metabolites Based on Speciation Studies, *J. Heal. Sci.* 51 (2005) 107–114. doi:10.1248/jhs.51.107.
- [190] G.A. Trueba GP, Sánchez GM, Oxygen free radical and antioxidant defense mechanism in cancer, *Front. Biosci.* 1 (2004) 2029–2044.
- [191] G.N. Schrauzer, Anticarcinogenic effects of selenium, *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1864–1873. doi:10.1007/PL00000668.
- [192] M.P. Rayman, The importance of selenium to human health, *Lancet.* 356 (2000) 233–241. doi:10.1016/S0140-6736(00)02490-9.
- [193] R. Brigelius-Flohé, M. Maiorino, Glutathione peroxidases, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1830 (2013) 3289–3303. doi:10.1016/J.BBAGEN.2012.11.020.
- [194] M. Selenius, A.-K. Rundlöf, E. Olm, A.P. Fernandes, M. Björnstedt, Selenium and the selenoprotein thioredoxin reductase in the prevention, treatment and diagnostics of cancer, *Antioxidants Redox Signal.* 12 (2010) 867–880. doi:10.1089/ars.2009.2884.
- [195] R.F. Burk, K.E. Hill, A.K. Motley, Selenoprotein metabolism and function: Evidence for more than one function for selenoprotein P, *J. Nutr.* 133 (2003).
- [196] B. Åkesson, T. Bellew, R.F. Burk, Purification of selenoprotein P from human plasma, *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1204 (1994) 243–249. doi:10.1016/0167-4838(94)90014-0.
- [197] T. Hayashi, Y. Watanabe, K. Takahashi, E. Saito, A. Tanaka, Y. Saito, et al., Selenoprotein P in Human Plasma as an Extracellular Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase, *J. Biol. Chem.* 274 (2002) 2866–2871. doi:10.1074/jbc.274.5.2866.
- [198] S.H. Arteel GE1, Mostert V, Oubrahim H, Briviba K, Abel J, Protection by selenoprotein P in human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration, *Biol. Chem.* 379 (1998) 1201–1205.
- [199] K.T. Suzuki, C. Sasakura, S. Yoneda, Binding sites for the (Hg-Se) complex on selenoprotein P, *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1429 (1998) 102–112. doi:10.1016/S0167-4838(98)00221-0.
- [200] H. Steinbrenner, L. Alili, E. Bilgic, H. Sies, P. Brenneisen, Involvement of selenoprotein P in protection of human astrocytes from oxidative damage, *Free Radic. Biol. Med.* 40 (2006) 1513–1523. doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2005.12.022.
- [201] H. Steinbrenner, H. Sies, Protection against reactive oxygen species by selenoproteins., *Biochim. Biophys. Acta.* 1790 (2009) 1478–85. doi:10.1016/j.bbagen.2009.02.014.

- [202] D. Ratnasinghe, J.A. Tangrea, M.R. Andersen, M.J. Barrett, J. Virtamo, P.R. Taylor, et al., Glutathione peroxidase codon 198 polymorphism variant increases lung cancer risk, *Cancer Res.* 60 (2000) 6381–6383.
- [203] K.J. Al-Taie OH, Uceyler N, Eubner U, Jakob F, Mörk H, ScheuAl-Taie OH, Uceyler N, Eubner U, Jakob F, Mörk H, Scheurlen M, Brigelius-Flohe R, Schöttker K, Abel J, Thalheimer A, Katzenberger T, Illert B, Melcher R, Köhrle J.rlen M, Brigelius-Flohe R, Schöttker, Expression profiling and genetic alterations of the selenoproteins GI-GPx and SePP in colorectal carcinogenesis., *Nutr. Cancer.* 48 (2004) 6–14.
- [204] A. Calvo, N. Xiao, J. Kang, C.J.M. Best, I. Leiva, M.R. Emmert-Buck, et al., Alterations in Gene Expression Profiles during Prostate Cancer Progression, *Cancer Res.* 62 (2002) 5325–5335.
- [205] Y. Murawaki, H. Tsuchiya, T. Kanbe, K. Harada, K. Yashima, K. Nozaka, et al., Aberrant expression of selenoproteins in the progression of colorectal cancer, *Cancer Lett.* 259 (2008) 218–230. doi:10.1016/J.CANLET.2007.10.019.
- [206] S. Urig, K. Becker, On the potential of thioredoxin reductase inhibitors for cancer therapy, *Semin. Cancer Biol.* 16 (2006) 452–465. doi:10.1016/J.SEMCANCER.2006.09.004.
- [207] H. Czczot, D. Ścibior, M. Skrzycki, M. Podsiad, Glutathione and GSH-dependent enzymes in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma, *Acta Biochim. Pol.* 53 (2006) 237–241.
- [208] M.J. Reid ME, Duffield-Lillico AJ, Slate E, Natarajan N, Turnbull B, Jacobs E, Combs GF Jr, Alberts DS, Clark LC, The nutritional prevention of cancer: 400 mcg per day selenium treatment, *Nutr. Cancer.* 60 (2008) 155–163.
- [209] and B.W.T. Larry C. Clark, Gerald F. Combs Jr, Effects of Selenium Supplementation for Cancer Prevention in Patients With Carcinoma of the Skin A Randomized Controlled Trial, *JAMA.* 276 (1996) 1957–1963.
- [210] C.R. Evans, A. Karnovsky, M.A. Kovach, T.J. Standiford, C.F. Burant, K.A. Stringer, Untargeted LC-MS metabolomics of bronchoalveolar lavage fluid differentiates acute respiratory distress syndrome from health., *J. Proteome Res.* 13 (2014) 640–9. doi:10.1021/pr4007624.
- [211] M. Katajamaa, M. Oresic, Data processing for mass spectrometry-based metabolomics., *J. Chromatogr. A.* 1158 (2007) 318–28. doi:10.1016/j.chroma.2007.04.021.
- [212] P. Jitaru, H. Goenaga-Infante, S. Vaslin-Reimann, P. Fiscaro, A systematic approach to the accurate quantification of selenium in serum selenalbumin by HPLC-ICP-MS., *Anal. Chim. Acta.* 657 (2010) 100–7. doi:10.1016/j.aca.2009.10.037.
- [213] J.T. Deagen, J.A. Butler, B.A. Zachara, P.D. Whanger, Determination of the distribution of selenium between glutathione peroxidase, selenoprotein P, and albumin in plasma., *Anal. Biochem.* 208 (1993) 176–81. doi:10.1006/abio.1993.1025.

- [214] I. Harrison, D. Littlejohn, G.S. Fell, Distribution of selenium in human blood plasma and serum, *Analyst*. 121 (1996). doi:10.1039/an9962100189.
- [215] C. Sariego Muñiz, J.M. Marchante Gayón, J.I. García Alonso, A. Sanz-Medel, Speciation of essential elements in human serum using anion-exchange chromatography coupled to post-column isotope dilution analysis with double focusing ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 16 (2001). doi:10.1039/b100947h.
- [216] R.A. van den Berg, H.C.J. Hoefsloot, J.A. Westerhuis, A.K. Smilde, M.J. van der Werf, Centering, scaling, and transformations: Improving the biological information content of metabolomics data, *BMC Genomics*. 7 (2006). doi:10.1186/1471-2164-7-142.
- [217] D. Heber, R.T. Chlebowski, D.E. Ishibashi, J.N. Herrold, J.B. Block, Abnormalities in glucose and protein metabolism in noncachectic lung cancer patients, *Cancer Res.* 42 (1982) 4815–4819. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0020426260&partnerID=tZOtx3y1>.
- [218] I. Cepelak, S. Dodig, D. Romic, N. Ruljancic, S. Popovic-Grle, A. Malic, Enzyme Catalytic Activities in Chronic Obstructive Pulmonary Disease, *Arch. Med. Res.* 37 (2006) 624–629. doi:10.1016/j.arcmed.2006.01.004.
- [219] K. Kilk, A. Aug, A. Ottas, U. Soomets, S. Altraja, A. Altraja, Phenotyping of chronic obstructive pulmonary disease based on the integration of metabolomes and clinical characteristics, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018). doi:10.3390/ijms19030666.
- [220] K. Kahnert, T. Lucke, R.M. Huber, J. Behr, F. Biertz, A. Vogt, et al., Relationship of hyperlipidemia to comorbidities and lung function in COPD: Results of the COSYCONET cohort, *PLoS One*. 12 (2017). doi:10.1371/journal.pone.0177501.
- [221] D. Hao, M.O. Sarfaraz, F. Farshidfar, D.G. Bebb, C.Y. Lee, C.M. Card, et al., Temporal characterization of serum metabolite signatures in lung cancer patients undergoing treatment, *Metabolomics*. 12 (2016). doi:10.1007/s11306-016-0961-5.
- [222] N. Ballatori, S.M. Krance, S. Notenboom, S. Shi, K. Tieu, C.L. Hammond, Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases, *Biol. Chem.* 390 (2009) 191–214. doi:10.1515/BC.2009.033.
- [223] M.E. Monaco, Fatty acid metabolism in breast cancer subtypes, *Oncotarget*. 8 (2017) 29487–29500. doi:10.18632/oncotarget.15494.
- [224] L. Puchades-Carrasco, E. Jantus-Lewintre, C. Pérez-Rambla, F. García-García, R. Lucas, S. Calabuig, et al., Serum metabolomic profiling facilitates the non-invasive identification of metabolic biomarkers associated with the onset and progression of non-small cell lung cancer, *Oncotarget*. 7 (2016). doi:10.18632/oncotarget.7354.
- [225] M.O. Huff, S.L. Todd, A.L. Smith, J.T. Elpers, A.P. Smith, R.D. Murphy, et al.,

- Arsenite and cadmium activate MAPK/ERK via membrane estrogen receptors and g-protein coupled estrogen receptor signaling in human lung adenocarcinoma cells, *Toxicol. Sci.* 152 (2016) 62–71. doi:10.1093/toxsci/kfw064.
- [226] Y. Wang, J. Fang, S.S. Leonard, K.M.K. Rao, Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species, *Free Radic. Biol. Med.* (2004). doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.03.010.
- [227] M. Le, O. Rathje, A. Levina, P.A. Lay, High cytotoxicity of vanadium(IV) complexes with 1,10-phenanthroline and related ligands is due to decomposition in cell culture medium, *J. Biol. Inorg. Chem.* 22 (2017) 663–672. doi:10.1007/s00775-017-1453-4.
- [228] J.D. Aguirre, V.C. Culotta, Battles with iron: Manganese in oxidative stress protection, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 13541–13548. doi:10.1074/jbc.R111.312181.
- [229] K. Zabłocka-Słowińska, S. Płaczkowska, A. Prescha, K. Pawełczyk, I. Porębska, M. Kosacka, et al., Serum and whole blood Zn, Cu and Mn profiles and their relation to redox status in lung cancer patients, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 45 (2018) 78–84. doi:10.1016/j.jtemb.2017.09.024.
- [230] P. Sarita, G.J.N. Raju, M.R. Kumar, A.S. Pradeep, S.B. Reddy, Analysis of blood serum of lung cancer patients using particle induced X-ray emission, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 297 (2013) 431–436. doi:10.1007/s10967-012-2398-2.
- [231] D. Armendariz, A. Vulpe, International symposium on trace elements in man and animals, 11 Th Int. Symp. Trace Elem. Man Anim. 113 (2003) 203E–282E.
- [232] G.F. Nordberg, A. Bernard, G.L. Diamond, J.H. Duffus, P. Illing, M. Nordberg, et al., Risk assessment of effects of cadmium on human health (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* 90 (2018) 755–808. doi:10.1515/pac-2016-0910.
- [233] P. Richter, O. Faroon, R.S. Pappas, Cadmium and cadmium/zinc ratios and tobacco-related morbidities, *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 14 (2017) 1–18. doi:10.3390/ijerph14101154.
- [234] C.B. Ambrosone, J.L. Freudenheim, P.A. Thompson, E. Bowman, J.E. Vena, J.R. Marshall, et al., Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer, *Cancer Res.* 59 (1999) 602–606.
- [235] K. Mitrunen, P. Sillanpää, V. Kataja, M. Eskelinen, V.-M. Kosma, S. Benhamou, et al., Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and breast cancer risk, *Carcinogenesis.* 22 (2001) 827–829.
- [236] M. Bergman, M. Ahnström, P.P. Wegman, S. Wingren, Polymorphism in the manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene and risk of breast cancer in young women, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 131 (2005) 439–444. doi:10.1007/s00432-004-0663-7.
- [237] N. Wiernsperger, J. Rapin, Trace elements in glucometabolic disorders: An update, *Diabetol. Metab. Syndr.* 2 (2010). doi:10.1186/1758-5996-2-70.

- 
- [238] Nève J, Methods in determination of selenium states, *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 5 (n.d.) 1–17.
- [239] C.K. Moscow JA, Schmidt L, Ingram DT, Gnarra J, Johnson B, Loss of heterozygosity of the human cytosolic glutathione peroxidase I gene in lung cancer, *Carcinogenesis.* 15 (1994) 2769–2773.
- [240] Q.-C. Chen, X.-L. Ding, S.-F. Zhu, L. Su, D.-M. Cai, L. Chen, et al., Common SEP15 polymorphisms and susceptibility to cancer: A systematic review and meta-analysis, *Transl. Cancer Res.* 6 (2017) 886–893. doi:10.21037/tcr.2017.08.16.