

DIFERENCIAS EN LOS METABOLITOS DE SUDOR SEGÚN EL ESTADIO DIAGNÓSTICO EN CÁNCER DE PULMÓN ESCAMOSO.

S. Martín Bote¹, M. Arenas de Larriva¹, M. Entrenas Castillo¹, N. Feu Collado¹, N. Pascual Martínez¹, R. Lama Martínez^{1,2}, B. Jurado Gámez^{1,2}.

¹UGC-Neumología. Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba.

²Universidad de Córdoba.

Proyecto financiado con Beca Fundación Neumosur 10/2016

Resumen

Objetivo: determinar si la metabolómica aplicada a una muestra de sudor permite diferenciar la concentración relativa de ciertos metabolitos en pacientes con cáncer de pulmón en estadio inicial (I - II) respecto a estadios avanzados (III - IV).

Pacientes y métodos: fueron incluidos 21 pacientes diagnosticados de cáncer escamoso de pulmón en un hospital universitario. Para la inducción del sudor se utilizaron discos de Pilogel® y la recolección mediante dispositivo Macroduct® conservando la muestra a -80 °C. Para el análisis metabolómico se utilizó un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución (LC - QTOF) provisto de fuente de ionización por electrospray. Los datos se procesaron con el software *MassHunter Workstation* y se realizó análisis de cambio (FC, *Fold Change Analysis*) para detectar las diferencias de concentración relativa de metabolitos entre los diferentes estadios tumorales.

Resultados: se estudiaron 21 muestras de sudor pertenecientes a 9 pacientes en estadio I - II y 12 en estadio III - IV. En una lista preferente de 16 compuestos que incluyeron diversos aminoácidos, azúcares, ácidos carboxílicos y ácidos grasos, no se observaron cambios significativos según la extensión tumoral. El análisis de cambio mostró que una trihexosa (FC: -2,175) fue el compuesto con diferencias significativas de concentración relativa en las muestras de sudor según los dos estadios tumoral comparados.

Conclusión: en muestras de sudor de pacientes con carcinoma escamoso de pulmón la huella metabolómica se mantiene relativamente estable con escasas diferencias en la concentración relativa de metabolitos, únicamente se observó un cambio significativo en una trihexosa en estadios de cáncer de pulmón inicial y avanzado.

Palabras clave: cáncer de pulmón, espectrometría de masas, metabolómica, sudor

METABOLITE DIFFERENCES IN SWEAT ACCORDING TO DIAGNOSTIC STAGE IN SQUAMOUS-CELL LUNG CANCER

Abstract:

Objective: To determine whether applying metabolomics to a sweat sample allows different metabolite concentrations to be differentiated in patients with early-stage lung cancer (stages I-II) compared to advanced stages (III-IV).

Patients and methods: 21 patients diagnosed with squamous-cell lung cancer in a university hospital were included. Pilogel® discs were used to induce sweat, which was collected using the Macroduct® system, storing the samples at

-80 °C. For the metabolomic analysis, a liquid chromatograph was used, attached to a high-resolution mass spectrometer (LC - QTOF) supplied with electrospray ionization. The data was processed using the *MassHunter Workstation* software and a fold change analysis (FC) was done to detect differences in metabolite concentrations between different tumor stages.

Results: 21 sweat samples from 9 stage I-II patients and 12 stage III-IV patients were studied. In a list of 16 compounds that included several amino acids, sugars, carboxylic acids and fatty acids, no significant changes were observed according to tumor extension. The change analysis showed that a trihexose (FC: -2.175) was the compound with significant concentration differences in sweat samples according to the two tumor stages compared.

Conclusion: In sweat samples from patients with squamous-cell lung cancer, metabolomic markers remain relatively stable with slight differences in metabolite concentrations, only observing a significant change in a trihexose between early and advanced stages of lung cancer.

Keywords: lung cancer, mass spectrometry, metabolomics, sweat.

Recibido: 28.09.2018. Aceptado: 19.06.2019

Dr. Bernabé Jurado Gámez

bjg01co@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Recientemente se ha publicado el informe GLOBOCAN 2018, en él se evalúa la incidencia y mortalidad del cáncer en el mundo. En ambos sexos, el cáncer de pulmón es la neoplasia más frecuente diagnosticada (11,6% del total de casos) y la principal causa de muerte por cáncer (18,4% del total)¹. Cuando se diagnostica en una etapa temprana operable, la tasa de supervivencia a los 5 años del cáncer de pulmón aumenta por encima del 50%². Sin embargo, únicamente una minoría de casos son tratados en un estadio poco avanzado con posibilidades aumentadas de efectuar un tratamiento con intención curativa³. Por tanto, la supervivencia del cáncer de pulmón depende del estadio TNM (tumor, número de adenopatías y metástasis) en el momento del diagnóstico³. Así, la supervivencia a 5 años tras cirugía radical es del 54 - 80%, 38 - 65% y 30 - 50% en pacientes con estadios Ia, Ib y II, respectivamente⁴.

En los últimos años, la utilización de la TAC de baja radiación ha mostrado un aumento en la supervivencia⁵, por lo que su aplicación ha sido recomendada dentro de un programa de cribado de cáncer de pulmón por diversas sociedades científicas⁶. No obstante, la gran mayoría de los nódulos detectados finalmente resultan falsos positivos⁵, lo que denota la dificultad para determinar si un nódulo de pequeño tamaño presenta malignidad. En estos casos, se recomienda un seguimiento estrecho para detectar los casos de cáncer de pulmón en etapas tempranas cuando las tasas de curación son sustancialmente mejores⁷. Un reciente estudio retrospectivo analizó el manejo clínico de pacientes con nódulos pulmonares de pequeño tamaño (8 - 20 mm) El resultado mostró una amplia variación en el manejo clínico y un alto número de procedimientos invasivos evitables⁸. Por otra parte, a pesar del avance en las nuevas líneas terapéuticas la supervivencia no ha cambiado significativamente y sólo el 17,7% de todos los pacientes con cáncer de pulmón permanecen vivos después del ≥ 5 años del diagnóstico². Por tanto, desde el punto de vista científico es interesante conocer la existencia de biomarcadores que puedan ayudar a distinguir malignidad-benignidad e informar si una mayor carga tumoral se correlaciona con cambios en el perfil metabólico. El crecimiento de las células cancerosas requiere una cantidad mayor de energía y este aspecto puede tener repercusión en las rutas metabólicas⁹, lo que determina que la metabólica tenga capacidad de obtener biomarcadores con utilidad diagnóstica¹⁰,¹¹. En esta línea, el sudor es una muestra no invasiva

cuya potencialidad en el campo tumoral ha sido explorada por nuestro grupo^{12, 13}. Se asume que en pacientes con cáncer de pulmón, el grado de extensión tumoral puede influir en la excreción de metabolitos en el sudor. El presente estudio tiene el objetivo de evaluar si un modelo metabólico aplicado a muestras de sudor diferencia entre cáncer escamoso de pulmón en estadio inicial respecto a un estadio avanzado.

PACIENTES Y MÉTODOS

Pacientes: para evitar introducir una potencial variabilidad por la inclusión de diferentes estirpes histológicas, se incluyeron 21 muestras de sudor procedentes de pacientes con cáncer escamoso de pulmón. El sistema de clasificación TNM se basó en la extensión anatómica de la enfermedad, determinada clínica e histo-patológicamente siguiendo la 8ª edición de clasificación del cáncer de pulmón¹⁴. Con esta clasificación, 9 enfermos fueron clasificados según estadios I - II y 12 en estadios III - IV. Presentaban una edad <75 años, un volumen de muestra de sudor mayor de 15 μ L, y estaban diagnosticados de cáncer escamoso de pulmón mediante las pruebas complementarias establecidas en las guías de práctica clínica^{3, 15}. Fueron excluidos los pacientes con neoplasia extrapulmonar en los últimos 5 años o enfermedad grave de órgano con repercusión negativa en el pronóstico a corto plazo.

El proyecto de investigación fue aprobado por el Comité de Ética e investigación de Córdoba (acta nº 254, ref. 3227) Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado previo a la participación en el estudio.

La recolección y almacenamiento de la muestra del sudor, así como los instrumentos y tratamientos de la muestra han sido descritos previamente (*Rev Esp Pat Torac, 2018*). Brevemente, el sudor se recogió mediante técnica estandarizada y la muestra se mantuvo a -80 °C. Se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta presión *Agilent 1200 LC Series* acoplado a un espectrómetro de masas híbrido de alta resolución *Agilent 6540 UHD QTOF*, equipado con una fuente de ionización por electrospray. Las muestras de sudor se diluyeron con ácido fórmico al 0,1% y se introdujeron, por duplicado, en el inyector automático del LC para su análisis.

Método. Análisis LC-QTOF MS/MS y procesamiento de datos: para la separación cromatográfica se utilizó una columna analítica C18 de fase inversa, termostaticada a 25 °C. Los parámetros de la fuente de ionización por electrospray fueron empleadas en ionización negativa y positiva. Los espectros de masa exacta

en modo de barrido MS y MS/MS se adquirieron en el rango de m/z 60 – 1.100. Durante los análisis se realizó calibración interna continua mediante el uso de las señales en m/z en polaridad positiva y negativa. Las muestras se inyectaron en modo de adquisición de barrido completo y, posteriormente, en modo de adquisición auto MS/MS, con una lista preferente de 16 compuestos previamente identificados y que presentaron diferencias significativas entre pacientes con cáncer de pulmón e individuos con factor de riesgo (fumadores)¹³.

En el procesamiento de los datos obtenidos por LC-QTOF se empleó el software *Mass Hunter Workstation* y para el tratamiento de datos por extracción de entidades moleculares se tuvieron en cuenta todos los iones con >500 cuentas, carga simple y distribución isotópica. Para cada muestra, los archivos de datos se crearon en formato cef y se exportaron al paquete de software *Mass Profiler Professional* para su procesado. Se aseguró la representatividad de la matriz de datos utilizando un filtro por frecuencia para retener en la matriz solo las entidades moleculares detectadas en un porcentaje de $\geq 75\%$ de muestras por grupo. Las diferencias de concentración relativa en los metabolitos entre grupos de pacientes con cáncer de pulmón en estadio precoz (CP I-II) y estadio avanzado (CP III - IV) se realizó mediante un análisis de cambio (FC, *Fold Change Analysis*).

RESULTADOS

Los datos basales de los sujetos con cáncer escamoso de pulmón se muestran en la tabla 1. En relación a la localización radiológica del tumor, en 11 casos afectó al pulmón derecho (5 al lóbulo superior derecho, 1 al lóbulo medio y 5 al inferior derecho) y 10 al pulmón izquierdo (7 casos, 78%, al lóbulo superior izquierdo y 3 al lóbulo inferior izquierdo). De los 21 sujetos con cáncer escamoso de pulmón, 9 fueron clasificados en estadio precoz (I - II) y 12 en avanzado (III - IV) de los que 6 presentaban metástasis (estadio IV).

El resultado del análisis de cambio entre el grupo de pacientes con cáncer escamoso de pulmón en estadio precoz respecto a los pacientes con cáncer de pulmón avanzado se expresa en la tabla 2. Los resultados son similares en ambos grupos y una trihexosa fue el único compuesto con cambio de concentración significativo entre sujetos con neoplasia inicial y sujetos con neoplasia avanzada (FC: -2,175).

La figura 1 resume los compuestos con mayores diferencias en concentración relativa (FC >1,3) entre sujetos con CP en estadio I - II y estadio II - IV.

Tabla 1. Características de los sujetos incluidos en el estudio. Datos expresados como mediana y rango intercuartílico.

Variables	Sujetos con cáncer de pulmón (n = 21)
Edad, años	66 (61 - 71)
Sexo (hombres), n (%)	17 (61 - 71)
IMC, kg/m ²	26 (22 - 31)
Tabaquismo, ICAT	55 (30 - 80)
EPOC, n (%)	12 (57%)
FEV1, (%)	65 (35 - 80)
FEV1/FVC	0,67 (0,55 - 0,80)
PaO ₂ , mm Hg	66 (53 - 87)
PaCO ₂ , mm Hg	44 (38 - 47)
Estadio I-II, n	9
Estadio IA3, n	1
Estadio IB, n	2
Estadio IIA, n	3
Estadio IIB, n	3
Estadio III-IV, n	12
Estadio IIIA, n	2
Estadio IIIB, n	2
Estadio IIIC, n	2
Estadio IVA, n	4
Estadio IVB, n	2

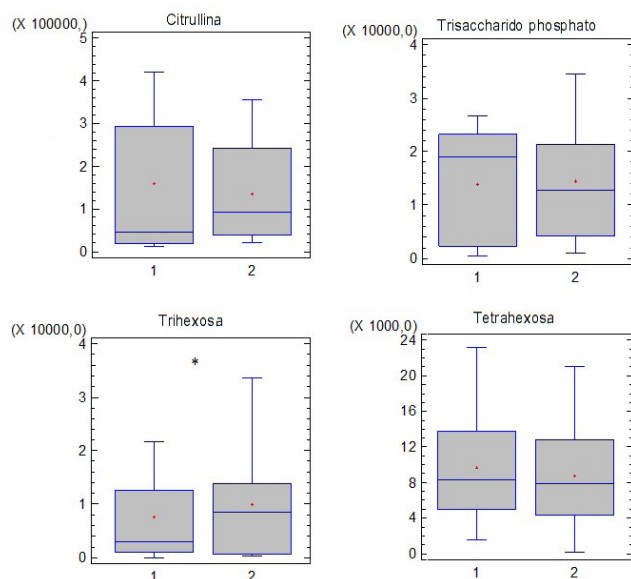
IMC: Índice de masa corporal; ICAT: Índice de consumo acumulado de tabaco; EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica; FEV1: Volumen espiratorio forzado en el primer segundo; FVC: Capacidad vital forzada.

Tabla 2. Resultados obtenidos mediante análisis de cambio para comparar la concentración relativa de los metabolitos de interés en los grupos del estudio.

Compuestos	Estadio III-IV vs I-II
Citrulina	1,387
Trisacárido-fosfato	1,358
Fenilalanina	-1,210
Ácido nonanodioico	-1,217
Lípido sulfónico	-1,223
Trihexosa	2,175
Histidina	1,011
Taurina	-1,173
Ácido urocánico	-1,193
Ácido mucónico	-1,295
Ácido subérico	-1,107
MG(22:2)	-1,044
Triptófano	-1,242
Tetrahexosa	-1,423
GluVal	-1,030
Gamma-GluLeu	-1,041

Figura 1.

Resultado de la aplicación del método para encontrar diferencias de metabolitos (análisis de cambio >1,3) entre estadios precoces y avanzados en cáncer de pulmón.



1: Estadio I-II; 2: Estadio III-IV.

DISCUSIÓN

Nuestro estudio compara muestras de sudor, según el grado de extensión de la enfermedad, procedentes de pacientes con cáncer escamoso de pulmón. La concentración relativa de determinados metabolitos fue similar en los estadios inicial y avanzado, a excepción de una trihexosa en la que se observó un cambio significativo entre los dos grupos de pacientes.

En un trabajo reciente en el que se compararon muestras de sudor de pacientes con cáncer de pulmón respecto a los de un grupo control fueron identificados aminoácidos, azúcares, ácidos carboxílicos y ácidos grasos que mostraron diferencias significativas entre ambos grupos¹³. Algunos de los mecanismos propuestos para explicar estos cambios metabólicos son la distinta respuesta de la célula tumoral debida a inflamación peritumoral y al diferente metabolismo de las células cancerígenas, este último relacionado con el efecto *Warburg* y que revela un aumento en la glicolisis y una disminución de la fosforilación oxidativa^{15,16}.

La metabolómica está siendo aplicada en pacientes con cáncer de pulmón estudiando distintas muestras con finalidad de aumentar la probabilidad diagnóstica¹⁷⁻¹⁹, si bien la muestra más utilizada ha sido suero. Chen *et al.*²⁰, compararon muestras séricas de 30 sujetos sin enfermedad médica grave (grupo control) y de 30 pacientes con cáncer de pulmón, antes y tras intervención quirúrgica. En comparación con algunos biomarcadores diagnósticos tradicionales, esto es CEA y CYFRA 21-1, se demostró que la glicerofosfo-N-araquidonoil etanolamina (GpAEA) y la esfingosina mejoraron la capacidad diagnóstica en los pacientes con neoplasia pulmonar. No obstante, no se estudiaron las potenciales diferencias en compuestos entre estadios tumorales. Igualmente, se han descrito variaciones significativas en las concentraciones de metabolitos en plasma^{21, 22} y en orina en pacientes con cáncer de pulmón en estadio inicial^{23, 24}. Recientemente se han reportado diferencias en los compuestos metabólicos entre sujetos sanos y pacientes con cáncer de pulmón, y en este último grupo las diferencias según la extensión tumoral¹⁹. Sin embargo, este trabajo fue realizado en suero, muestra más compleja que el sudor y con mayor grado de variabilidad en los compuestos metabólicos¹². En nuestro estudio, en pacientes con cáncer escamoso de pulmón, la concentración relativa de los metabolitos en el sudor es similar en estadios iniciales y avanzados, lo

que sugiere que existen vías metabólicas comunes con independencia de la extensión tumoral.

El sudor es un biofluido con potencial aplicabilidad en la monitorización de determinados parámetros biológicos en tiempo real y, por tanto, en la monitorización y el diagnóstico personalizado^{25, 26}. Además, es una muestra no invasiva que expresa un menor número de metabolitos¹², en los que se pueden identificar compuestos que expresen huellas metabólicas asociadas a cáncer de pulmón. Nuestro grupo ha obtenido un panel compuesto por cinco metabolitos con un 80% de especificidad y un 79% de sensibilidad y que puede aportar un valor clínico relevante en el cribado de cáncer de pulmón¹³.

En el presente trabajo, teniendo en cuenta 16 compuestos diferenciales, se observaron escasos cambios relacionados con el estadio tumoral, salvo una trihexosa, lo que sugiere que el sudor puede informar sobre cambios sistémicos asociados al tumor y no secundarios al grado de extensión. Este hallazgo no ha sido previamente descrito en metabolómica aplicada al sudor. Por otra parte, la estabilidad en los compuestos metabólicos, la menor variabilidad y un menor número de metabolitos puede representar una ventaja adicional de esta muestra.

Nuestro estudio presenta las siguientes limitaciones. Es una investigación preliminar con un número relativamente pequeño de muestra, aunque con una metodología robusta que pone de manifiesto una limitada variabilidad metabólica según el estadio tumoral. También hay que subrayar que el trabajo se ha realizado en cáncer escamoso de pulmón con la finalidad de evitar diferencias atribuibles a distintas estirpes tumorales y, por tanto, no generalizable a otras estirpes histológicas.

En conclusión, nuestro estudio demuestra que la huella metabólica en sudor de pacientes con cáncer escamoso de pulmón se mantiene relativamente estable en distintos estadios de la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Al departamento de Química Analítica, especialmente a la Prof. Dra. María Dolores Luque de Castro y al Prof. Dr. Feliciano Priego Capote. Universidad de Córdoba. IMIBIC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN. Estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Ca Cancer J Clin.* 2018; 0: 1-31.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017; 67: 7-30.
3. Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL et al. Non-Small Cell Lung Cancer, Version 5.2017. *J Natl Compr Canc Netw.* 2017; 15: 504-535.
4. Scottish Intercollegiate Guidelines Network (SIGN). Management of lung cancer. Edinburgh: SIGN; 2014. (SIGN publication no. 137). 2014. [consultado 05-09-2018]. Disponible en: <http://www.sign.ac.uk>
5. Aberle DR, Adams AM, Berg CD et al. The National Lung Screening Trial Team. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med.* 2011; 365: 395-409.
6. Moyer VA, LeFevre ML, Siu AL et al. U.S. Preventive Services Task Force. Screening for lung cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med* 2014; 160: 330-338.
7. Gould MK, Donington J, Lynch WR et al. Evaluation of individuals with pulmonary nodules: when is it lung cancer?: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest.* 2013; 143(Suppl 5): e93S-e120S.
8. Tanner NT, Aggarwal J, Gould MK et al. Management of pulmonary nodules by community pulmonologists: A multicenter observational study. *Chest.* 2015; 148: 1405-1414.
9. Shingyoji M, Iizasa T, Higashiyama M et al. The significance and robustness of a plasma free amino acid (PFAA) profile-based multiplex function for detecting lung cancer. *BMC*

- Cancer. 2013; 13:77 doi: 10.1186/1471-2407-13-77.
10. Peralbo-Molina A, Calderón-Santiago M, Jurado-Gómez B et al. Exhaled breath condensate to discriminate individuals with different smoking habits by GC-TOF/MS. *Sci Rep*. 2017 May 3; 7(1): 1421.
 11. Peralbo-Molina A, Calderón-Santiago M, Priego-Capote F et al. Metabolomics analysis of exhaled breath condensate for discrimination between lung cancer patients and risk factor individuals. *J Breath Res*. 2016 Feb 11; 10(1): 016011.
 12. Calderón-Santiago M, Priego Capote F, Jurado-Gómez B et al. Optimization study for metabolomics analysis of human sweat by liquid chromatography–tandem mass spectrometry in high resolution mode. *J Chromatogr A*. 2014; 1333: 70–8.
 13. Calderón-Santiago M, Priego-Capote F, Turck N et al. Human sweat metabolomics for lung cancer screening. *Anal Bioanal Chem*. 2015; 407: 5381–92.
 14. Goldstrow p, Chansky K, Crowley J et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for revision of the TNM Stage Groupings in the forthcoming (eight) edition of the TNM classification for lung cancer 2015; 11: 39-51.
 15. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009; 324: 1029–33.
 16. Deberardinis, RJ, Sayed N, Ditsworth D et al. Brick by brick: Metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin Genet Dev*. 2008, 18, 54–61.
 17. Peralbo-Molina A, Calderón-Santiago M, Priego-Capote F et al. Identification of metabolomics panels for potential lung cancer screening by analysis of exhaled breath condensate. *J Breath Res*. 2016; 23; 10: 026002.
 18. Cameron SJ, Lewis KE, Beckmann M et al. The metabolomic detection of lung cancer biomarkers in sputum. *Lung Cancer*. 2016; 94: 88–95.
 19. Puchades-Carrasco L, Jantus-Lewintre E, Pérez-Rambla C 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*. 2016; 11: 12904–16.
 20. Chen Y, Ma Z, Min L et al. Biomarker identification and pathway analysis by serum metabolomics of lung cancer. *Bio Med Res Int*. 2015; 2015: 183624.
 21. Wen T, Gao L, Wen Z et al. Exploratory investigation of plasma metabolomics in human lung adenocarcinoma. *Mol Biosyst*. 2013; 9: 2370–8.
 22. Rocha CM, Carrola J, Barros AS et al. Metabolic signatures of lung cancer in biofluids: NMR-based metabolomics of blood plasma. *J Proteome Res*. 2011; 10: 4314–24.
 23. Carrola J, Rocha CM, Barros AS et al. Metabolic signatures of lung cancer in biofluids: NMR-based metabolomics of urine. *J Proteome Res*. 2011; 10: 221–30.
 24. Wu Q, Wang Y, Gu X et al. Urinary metabolomic study of non-small cell lung carcinoma based on ultra high performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Sep Sci*. 2014; 37: 1728–35.
 25. Mena-Bravo A, Luque de Castro MD. Sweat: a sample with limited present applications and promising future in metabolomics. *J Pharm Biomed Anal*. 2014; 90: 139–147.
 26. Heikenfeld J. Technological leap for sweat sensing. *Nature* 2016; 529: 475–6.