

TÍTULO: Comparación de compuestos metabólicos en muestras de sudor entre pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica y cáncer de pulmón.

Autores: M. Entrenas Castillo¹, M. Arenas de Larriva¹, S. Martín Bote¹, A. Palomares Muriana ¹, M.A. Martín Pérez¹, F. García Gil¹, N. Feu Collado¹, B. Jurado Gámez ¹.

¹Servicio de Neumología. Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba.

Título abreviado: La metabolómica aplicada a muestras de sudor presenta diferencias de concentración relativa de metabolitos entre sujetos con EPOC respecto a pacientes con cáncer epidermoide de pulmón en estadios iniciales.

Resumen: objetivo. Evaluar en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica respecto a pacientes con cáncer epidermoide de pulmón en estadio inicial (CP I-II) si en el metaboloma del sudor existen diferencias en los compuestos.

Metodología: Se incluyeron 11 pacientes con EPOC y 9 pacientes con CP I-II. El sudor se recogió siguiendo una técnica estandarizada y la muestra fué congelada a -80°C hasta el análisis metabolómico, para lo que se utilizó un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución (LC-QTOF) con ionización por electrospray. Se realizó un análisis de cambio (AC) para detectar las diferencias de concentración relativa de metabolitos entre grupos.

Resultados. Las características basales de los sujetos incluidos en los dos grupos fueron similares. En la clínica destaca que un 67% de los enfermos con CP I-II (67%) no manifestaron síntomas atribuibles al tumor. El análisis metabolómico mostró que en el análisis de cambio una tetrahexosa presentó diferencias entre el grupo de enfermos con EPOC y con CP I-II (AC: - 4,021), igual tendencia se observó en un trisacárido fosfato (AC: -1,741) y en un lípido sulfónico (AC: -1,920).

Conclusión: En muestras de sudor, el análisis de cambio muestra metabolitos con potencialidad para diferenciar entre pacientes EPOC y con CP I-II. Este resultado puede tener aplicabilidad en el cribado del cáncer de pulmón.

Palabras Clave: Cáncer de pulmón; Enfermedad pulmonar obstructiva crónica; espectrometría de masas; metabolómica; sudor.

INTRODUCCIÓN

La principal causa de muerte por neoplasia en los países desarrollados es el cáncer de pulmón (CP)¹. El consumo de tabaco ha incrementado la incidencia del CP, sobre todo en la mujer, y está influyendo negativamente en la expectativa de vida².

En la supervivencia del CP influye, principalmente, el estadio tumoral en el momento del diagnóstico. En más de la mitad de los enfermos el diagnóstico se realiza en estadios avanzados cuando existen escasa probabilidad de curación¹, de tal forma que a los cinco años la tasa de supervivencia continúa siendo inferior al 15%.

Los programas de cribado han mejorado la supervivencia del cáncer de mama, próstata y colon³. Sin embargo, en el CP el cribado mediante estudio del esputo y radiografía de tórax no han disminuido la mortalidad⁴. En los últimos años destaca la aportación de programas basados en la tomografía axial computarizada de tórax (TAC) de baja radiación frente a la radiografía de tórax que han demostrado un descenso de mortalidad relativa del 20%⁵. No obstante, es controvertida la

aplicabilidad clínica debido a la alta tasa de falsos positivos y al elevado coste de la TAC. Por tanto, es importante lograr un modelo de predicción que favorezca la viabilidad de esta técnica⁶.⁷ La supervivencia del CP, como se ha comentado anteriormente, depende del estadio y las pautas terapéuticas están asociadas a la clasificación TNM (tumor, número de adenopatías y metástasis), aunque es indudable el valor que añade la biología molecular para dirigir nuevas líneas terapéuticas⁸.

Las células cancerosas necesitan una cantidad mayor de energía que las células normales, siendo el sistema para la producción y consumo de energía también diferentes⁹. Por consiguiente, entre las células neoplásicas y no tumorales existen diferencias metabólicas que pueden ser detectadas mediante estudio metabolómico para conseguir biomarcadores diagnósticos^{10, 11}. En el cribado de enfermedades existe un importante desarrollo de métodos basados en el estudio de muestras no invasivas. El sudor es un biofluido de fácil obtención y cuya aplicación en el área tumoral ha sido descrita por nuestro grupo^{11, 12}. El tabaco es la principal causa de cáncer de pulmón y de enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Se han descrito estudios que relacionan la existencia de EPOC y CP¹³. Se ha observado una mayor incidencia de CP en pacientes con EPOC y el fenotipo enfisema se relacionó de forma independiente con el riesgo para desarrollar CP¹⁴. En este contexto, se postula que en los pacientes con EPOC la excreción de metabolitos en el sudor puede identificar compuestos diferenciales respecto a los pacientes con CP. Para evitar una variabilidad debido a distintas estirpes cito-histológicas, en el presente estudio se incluirán a pacientes con CP epidermoide. En esta línea, se diseña un estudio con el objetivo de evaluar si en un modelo metabolómico se observan diferencias en la concentración relativa de los compuestos entre pacientes con EPOC y CP epidermoide en estadio inicial (CP I-II).

PACIENTES Y MÉTODOS

Sujetos:

Estudio prospectivo de pacientes estudiados en el Servicio de Neumología del Hospital Universitario Reina Sofía.

El grupo con CP epidermoide fue diagnosticado mediante las pruebas complementarias establecidas en las guías de práctica clínica¹⁴. En el grupo con EPOC fueron incluidos sujetos en seguimiento en la consulta monográfica de EPOC, todos fueron fumadores o exfumadores de menos de 15 años, un consumo acumulado de 30 o más paquetes/año, en estabilidad clínica, sin sintomatología sugestiva de proceso neoplásico ni lesiones sospechosas de malignidad en la radiografía de tórax, y un seguimiento clínico y radiológico de al menos 1 año. En caso contrario se realizó TAC para despistaje de CP.

En ambos grupos fueron excluidos los sujetos con edad mayor a 75 años pacientes, antecedente de neoplasia en los últimos 5 años, diagnóstico de enfermedad grave con pronóstico vital inferior a 6 meses y aquellos sujetos en los que el volumen de muestra de sudor fue inferior a 15 μ L.

Recolección de la muestra:

El sudor se recogió en ayunas utilizando la técnica de Gibson y Cooke con discos de Pilogel[®] y la recolección mediante el dispositivo Macroduct[®] (*Wescor, Utah, USA*) durante 15 min, posteriormente se transfirió a un micro-Eppendorf y se almacenó a -80° C hasta su análisis.

Instrumentos y aparatos:

Se utilizaron como reactivos el ácido fórmico y acetonitrilo (ACN) para espectrometría de masas (*Scharlab, Barcelona, España*) y agua desionizada ($18 \text{ m}\Omega \cdot \text{cm}$) producida por un sistema de purificación de agua Millipore Milli-Q utilizadas para las fases móviles cromatográficas.

Se empleó 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 (*Santa Clara, CA, EEUU*). Las muestras de sudor (10 μ L) se diluyeron 1:2 (v/v) con ácido fórmico al 0.1%. La mezcla se agitó en un vortex durante 1 min y se colocó en el inyector automático del LC para su análisis. Todas las muestras se prepararon por duplicado.

Análisis LC-QTOF MS/MS:

La separación cromatográfica se realizó usando una columna analítica C18 de fase inversa (*Teknokroma, Barcelona*), termostata a 25° C. La fuente de ionización se utilizó en modo negativo y positivo. El instrumento se calibró y ajustó de acuerdo con los procedimientos recomendados por el fabricante. La adquisición de datos en modos MS y MS/MS se realizó en ambas polaridades. Posteriormente se realizó la calibración interna continua durante los análisis en polaridad positiva y en polaridad negativa. Inicialmente las muestras se inyectaron en modo de adquisición de barrido completo (2 réplicas/muestra), posteriormente en modo de adquisición auto MS/MS con una lista preferente de 16 compuestos identificados en un estudio previo⁹. El número de precursores seleccionados por ciclo fue 2, con una ventana de exclusión de 0,3 min después de 2 selecciones consecutivas del mismo precursor.

Procesamiento de datos y análisis estadístico:

Se utilizó el software MassHunter Workstation (*versión 3.01, Qualitative Analysis, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU*) para procesar todos los datos obtenidos por LC-QTOF en modo barrido completo. Los archivos de datos se crearon en formato .cef para cada muestra y se

exportaron al paquete de software Mass Profiler Professional para su procesado (*versión 2.2, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.*). Para el alineamiento se compararon iterativamente *m/z* y tiempo de retención para todas las MFs de cada muestra con las muestras restantes, previa normalización por transformación logarítmica y escalado de cada variable restando a cada valor su mediana. Finalmente, la representatividad de la matriz de datos se aseguró aplicando un filtro por frecuencia para retener en la matriz de datos solo las MFs detectadas en un porcentaje de muestras de cada grupo del 75%. Para detectar diferencias de concentración relativa de los metabolitos entre el grupo con EPOC y grupo con CP I-II se realizó un análisis de cambio (AC).

RESULTADOS

Se incluyeron 21 muestras de sudor en este estudio, 12 de ellas procedentes de sujetos con EPOC y 9 de pacientes con CP I-II. En la tabla 1 se muestran las características basales de los dos grupos, siendo los resultados similares en ambos grupos. Hay que subrayar que 6 de los 9 pacientes con CP (67%) el estudio se inició por un hallazgo casual en la radiología simple o TAC realizados por otros motivos y en ausencia de sintomatología asociada a CP.

Las diferencias entre los metabolitos de los pacientes con EPOC y CP I-II mediante el análisis de cambio se exponen en la tabla 2. En tres compuestos se observaron diferencias de cambio entre sujetos con EPOC respecto a pacientes con CP I-II. Como se observa en la figura 1, el compuesto con mayor diferencia en concentración relativa fue una tetrahexosa que presentó (AC: -4,021), igual comportamiento se objetivó, en menor medida, con un lípido sulfónico, con identificación no confirmada (AC: -1,920) y en un trisacárido fosfato (AC: -1,741).

DISCUSIÓN

La metabolómica de última generación se está convirtiendo en una tecnología emergente para estudiar la biología de sistemas y la expresión metabólica en presencia de enfermedad ¹⁶. El resultado de nuestro estudio muestra que la concentración relativa de un conjunto de metabolitos fue diferente en pacientes con EPOC y CP en estadios precoces, y la tetrahexosa es el metabolito con mayor potencial de discriminación. Otros metabolitos con diferencias fueron compuestos aminoácidos, azúcares, ácidos carboxílicos y ácidos grasos. Este hallazgo podría relacionarse con la influencia en el metabolismo de las células cancerígenas, respuesta inmune a las células neoplásicas o a la inflamación subyacente, aunque este aspecto no fue estudiado en nuestra investigación. No obstante, las células tumorales emplean diversas vías metabólicas para obtener energía lo que podría explicar las diferencias en la concentración de compuestos relacionados con la glicólisis y el ciclo del ácido tricarbóxico⁹.

El estudio de biomarcadores en aire exhalado está siendo ampliamente utilizada debido a la potencial aplicabilidad en la práctica clínica¹⁷. El condensado de aire exhalado (EBC, *exhaled breath condensate*) ofrece un perfil de componentes, tanto volátiles como no volátiles, que presenta un alto valor para el desarrollo de modelos de cribado¹⁸, y que ha demostrado la existencia de diferencias en la expresión de los metabolitos en el EBC según el hábito tabáquico¹⁹. En la EPOC los metabolitos representan la mayor parte de las sustancias observadas en el condensado del aire exhalado²⁰, así como en la sangre periférica²¹. Por tanto, existen conocimiento suficiente para realizar un perfil de pacientes con EPOC basado en la metabolómica. En este sentido, se ha demostrado su potencial utilidad para distinguir entre sujetos con cáncer de pulmón respecto a dos grupos, uno formado por sujetos fumadores activos y exfumadores y otro formado por sujetos no fumadores y sin patología respiratoria²². Por tanto, los componentes volátiles y no volátiles del condensado de aire exhalado (EBC) son cada vez más útiles en la investigación de la EPOC²³, y para distinguir entre EPOC y otras enfermedades respiratorias²⁴. En esta línea, nuestro grupo ha descrito la potencialidad del sudor para diferenciar entre sujetos con CP y un grupo control. En 41 pacientes con CP y un grupo control de 55 sujetos sanos, un modelo basado en la discriminación mediante PLS-DA clasificó a los pacientes con CP de los individuos control y demostró que los metabolitos identificados pueden ser válidos para construir un modelo de predicción con una especificidad del 80% y una sensibilidad del 79%; por tanto una tasa de falsos positivos y negativos alrededor de 20%¹².

La aplicación de la metabolómica en muestras de sudor es un campo emergente²⁵, aunque escasamente utilizado en patología respiratoria. Recientemente el sudor ha sido estudiado en 32 pacientes con tuberculosis activa, 27 con enfermedades distintas de la tuberculosis y 24 sujetos sanos. Se detectaron veintiséis proteínas exclusivamente en el sudor de enfermos con TB activa demostrando que puede ser un método viable en la identificación de biomarcadores para detectar TB activa²⁶.

Sin embargo, en nuestro conocimiento, nuestro trabajo es el primero que compara compuestos metabólicos en sudor entre pacientes con EPOC y CP. Las diferencias encontradas apuntan a la existencia de distintos mecanismos subyacentes, diferentes entre ambas enfermedades y, por tanto, en la expresión metabólica. Los compuestos metabólicos detectados en el sudor podrían ser de utilidad para distinguir un subgrupo de pacientes con EPOC con mayor riesgo para padecer CP y priorizar la realización de una TAC de tórax. El sudor tiene una característica importante debido a que existen un menor número de metabolitos y facilita el hallazgo de compuestos que expresen huellas metabólicas con capacidad predictiva asociadas al CP^{11, 12}. Este aspecto es relevante ya que más de la mitad de los enfermos con CP en estadios I-II (67%) no tuvieron sintomatología atribuible al tumor; lo que pone de manifiesto la potencialidad de algunos metabolitos

(tetrahexosa, trisacárido-fosfato y lípido sulfónico) para discriminar entre sujetos EPOC con riesgo de padecer CP y pacientes con CP en estadio inicial.

Nuestra investigación tiene actualmente las siguientes limitaciones. (i) Es una primera aproximación con un número de muestras pequeño y, por tanto, la comparación del AC entre grupos debe realizarse con cautela, aunque es evidente la diferencia en el metaboloma de los dos grupos; (ii) Únicamente se incluyeron pacientes con CP de tipo epidermoide, ya que es una de las estirpes histológicas más frecuente en nuestro medio; (iii) Los datos presentados proceden de un único hospital y podrían no ser totalmente reproducibles en otros centros.

En conclusión, el presente estudio aporta mayor conocimiento sobre la importancia del metaboloma del sudor para discriminar entre un grupo de pacientes con EPOC y otro con CP en estadios iniciales. Los hallazgos podrían ser útiles para seleccionar la indicación de la TAC en programas de cribado. No obstante, son datos preliminares que implica la necesidad de realizar un estudio con mayor número de muestras para validar estos resultados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015; 65:87-108.
2. Gènova-Maleras R, Catalá-López F, de Larrea-Baz NF et al. The burden of premature mortality in Spain using standard expected years of life lost: a population-based study. *BMC Public Health.* 2011; 11:787 doi:10.1186/1471-2458-11-787.
3. Brenner DE, Normolle DP. Biomarkers for cancer risk, early detection, and prognosis: the validation conundrum. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007; 16:1918–20.
4. Manser RL, Irving LB, Byrnes G et al. Screening for lung cancer: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. *Thorax.* 2003; 58:784–9.
5. 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. Sanchez-Salcedo P, Wilson DO, de-Torres JP et al. Improving selection criteria for lung cancer screening. The potential role of emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;191:924-31.
7. de-Torres JP, Wilson DO, Sanchez-Salcedo P, et al. Lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Development and validation of the COPD lung cancer screening score. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015; 191:285-91.
8. Kelsey KT, Wiencke JK. Immunomethylomics: A novel cancer risk prediction tool. *Ann Am Thorac Soc.* 2018;15(Suppl 2): S76-S80.
9. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009; 324:1029–33.

10. 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.
11. 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.
12. Calderón-Santiago M, Priego-Capote F, Turck N et al. Human sweat metabolomics for lung cancer screening. *Anal Bioanal Chem*. 2015; 407:5381-92.
13. De Torres JP, Marín JM, Casanova C et al. Lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Incidence and predicting factors. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011; 184:913–9.
14. de-Torres JP, Wilson DO, Sanchez-Salcedo P et al. Lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Development and validation of the COPD lung cancer screening score. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015; 191:285-91.
15. Villar Álvarez F, Muguruza Trueba I, Belda Sanchis J et al. Recommendations of the Spanish Society of Pneumology and Thoracic Surgery on the diagnosis and treatment of non-small-cell lung cancer. *Arch Bronconeumol*. 2016;52(Supl 1):2-62.
16. Yu L, Li K, Zhang X. Next-generation metabolomics in lung cancer diagnosis, treatment and precision medicine: mini review. *Oncotarget*. 2017; 8:115774-115786.
17. Horváth I, Barnes PJ, Loukides S et al. A European Respiratory Society technical standard: exhaled biomarkers in lung disease. *Eur Respir J*. 2017;49(4). pii: 1600965.
18. Peralbo-Molina A, Calderón-Santiago M, Priego-Capote F et al. *Anal Chim Acta*. 2015; 887:118-126.
19. 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;7(1):1421.
20. Santini G, Mores N, Penas A et al. Electronic nose and exhaled breath NMR-based metabolomics applications in airways disease. *Curr Top Med Chem*. 2016; 16:1610-30.
21. Chen Q, Deeb RS, Ma Y et al. Serum metabolite biomarkers discriminate healthy smokers from COPD smokers. *PLoS One*. 2015;10(12): e0143937.
22. 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; 10(1):016011.
23. Kilk K, Aug A, Ottas A et al. Phenotyping of Chronic Obstructive Pulmonary Disease based on the integration of metabolomes and clinical characteristics. *Int J Mol Sci*. 2018;19(3). pii: E666.
24. Zabek A, Stanimirova I, Deja S et al. Fusion of the 1h nmr data of serum, urine and exhaled breath condensate in order to discriminate chronic obstructive pulmonary disease and obstructive sleep apnea syndrome. *Metabolomics* 2015, 11, 1563–1574.

25. Gao W, Emaminejad S, Nyein HYY et al. Fully integrated wearable sensor arrays for multiplexed in situ perspiration analysis. *Nature*. 2016; 529:509-514.
26. Adewole OO, Erhabor GE, Adewole TO et al. Proteomic profiling of eccrine sweat reveals its potential as a diagnostic biofluid for active tuberculosis. *Proteomics Clin Appl*. 2016;10:547-53.

Tabla 1.

Características de los sujetos incluidos en el estudio. Datos expresados como mediana y rango intercuartílico y comparación estadística mediante U Mann-Witney o *Chi* cuadrado.

Variab les	EPOC	Cáncer Pulmón I-II	Valor p
Edad, años	61 (55-69)	64 (61-70)	0,377
IMC, Kg/m ²	31 (26-35)	25 (22-30)	0,091
Hombres, n (%)	9 (75)	7 (78)	0,903
Tabaquismo, paquetes/año	35 (26-45)	40 (30-80)	0,101
FEV1/FVC	0,63 (0,58-0,66)	0,64 (0,57-0,78)	0,742
FEV1, (%)	66 (49-74)	65 (39-80)	0,871
SpO ₂ (FiO ₂ = 0,21 (%))	94 /93-96)	94 (92-96)	0,891
PaO ₂ , mm Hg	70 (62-82)	68 (55-86)	0,771
PaCO ₂ , mm Hg	42 (38-45)	41 (36-43)	0,694

IMC: índice de masas corporal; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; FEV1: Flujo 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 dos grupos del estudio.

Compuestos	Pacientes con EPOC vs CP- I-II
Fenilalanina	-1,050
Citrulina	1,017
Histidina	1,191
Taurina	-1,052
Trisacárido-fosfato	-1,741
Ácido nonanodioico	1,564
Lípido sulfónico	-1,920
Trihexosa	-1,161
MG(22:2)	1,280
Ácido subérico	1,391
Ácido urocánico	-1,490
Ácido mucónico	-1,501

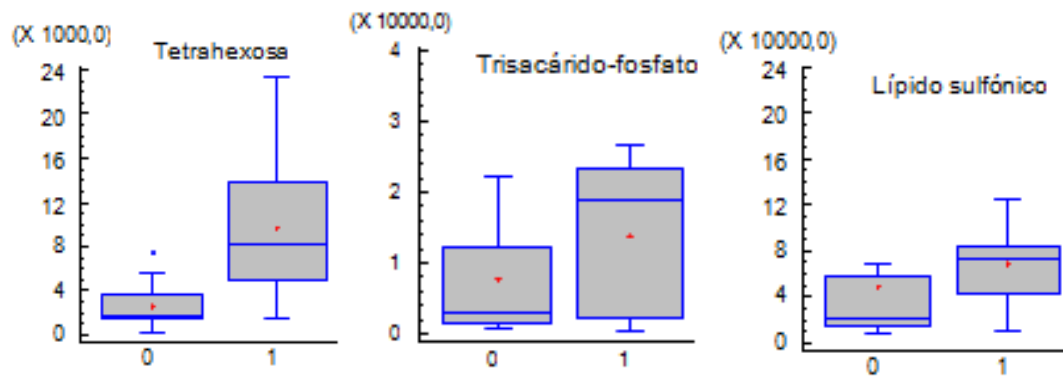
GluVal	-1,122
gamma-GluLeu	1,529
Triptófano	-1,134
Tetrahexosa	-4,021

En negrita se expresan los cambios más importantes en concentración relativa estableciendo el límite de cambio en 1,7.

FIGURAS.

Figura 1.

Metabolitos que presentaron mayores diferencias entre los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica y cáncer de pulmón.



0 = Grupo con enfermedad pulmonar obstructiva crónica; 1 = Grupo con cáncer de pulmón en estadio precoz (I-II).