

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

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

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

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

### Resumen

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

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

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

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

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

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

#### Abstract

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

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

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

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

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

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

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

Antonio Pereira Vega  
apv01h@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las enfermedades de mayor relevancia en el mundo por su incidencia, prevalencia y mortalidad. De todos los tipos de cáncer, el de pulmón (CP) representa del 15 - 20% de todas las neoplasias, por lo que se ha convertido en un problema sanitario de gran magnitud. Es una de las 10 causas más comunes de muerte por neoplasia en nuestro medio<sup>1</sup>, siendo la primera causa de muerte por tumores en hombres y la tercera en mujeres (20.755 hombres y 3.452 mujeres en 2010, según datos del INE)<sup>2</sup>.

Desafortunadamente, un 75% de los pacientes con esta enfermedad son diagnosticados en un estadio avanzado por la ausencia de síntomas en el inicio, lo que ensombrece el pronóstico en gran medida. A pesar de los recientes avances terapéuticos en este campo, las tasas de supervivencia a los cinco años no alcanzan el 16% y el 5% en estadios avanzados<sup>3</sup>. Por tanto, su prevención basada en la disminución de los factores de riesgo, especialmente el tabaco, y el diagnóstico precoz del CP, son las herramientas fundamentales para reducir su mortalidad.

Técnicas como la radiografía de tórax, la endoscopia de fluorescencia y la TC espiral de baja dosis han sido aplicadas para el diagnóstico precoz del CP, sin mejoría de la supervivencia en el uso de ninguno de ellos, a excepción del TC espiral de baja dosis<sup>4</sup>, que ha demostrado superioridad con respecto al cribado con radiografía de tórax<sup>5</sup>. En estudios posteriores se han confirmado los beneficios del cribado con TC espiral de bajas dosis con respecto a otros métodos<sup>6,7</sup>. A pesar de estos datos, el coste del TC espiral de baja dosis, la radiación recibida y los posibles falsos positivos, son aspectos a considerar, como señalan Ruano-Ravina *et al.*<sup>8</sup>.

Existe una información ampliamente detallada en la literatura acerca del tabaco como factor de riesgo para la aparición de CP, considerándose el consumo de éste como la principal causa evitable de cáncer. Además de aumentar la predisposición a padecer diversos tipos de tumores, entre ellos el CP, varios estudios han demostrado que el tabaco disminuye la supervivencia y la calidad de vida. También se relaciona con el diagnóstico de procesos cancerosos en estadios más avanzados y a edades más jóvenes, con una disminución en el cumplimiento terapéutico, disminución de la calidad de vida y mayor riesgo de desarrollar un segundo cáncer. Comparando entre fumadores y no fumadores, los primeros presentan 23 veces más probabilidades de desarrollar patología cancerígena que los no fumadores: los porcentajes de muertes atribuidas al hábito tabáquico en pacien-

tes con CP son del 90% para varones y 80% para mujeres<sup>9</sup>.

En cuanto a los mecanismos fisiopatológicos del tabaco, se conoce que los efectos de la nicotina, a través de la activación de receptores nicotínicos y beta adrenérgicos (causados principalmente por NNK -4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-), conducen a la activación de diferentes vías, que favorecen el incremento de la angiogénesis y producción de factores de crecimiento tumoral, migración, proliferación e invasión de células tumorales, entre otros efectos. La nicotina y sus metabolitos pueden promover la progresión del tumor a través de la modulación de señales oncogénicas en los tejidos, tanto cancerosos como no cancerosos<sup>10</sup>. Un ejemplo de ello es su acción sobre la actividad de la isoenzima 1A1 del citocromo P450, que aumenta varias veces en el cáncer de pulmón debido al consumo de tabaco<sup>11</sup>, e incluso se ha relacionado con el paso del *Polycyclic aromatic Hydrocarbon* (PHA) a metabolitos activos, lo que podría participar en la carcinogénesis directamente<sup>12</sup>. El conocimiento de las bases fisiopatológicas del tabaco es de gran importancia a día de hoy, ya que se está potenciando la búsqueda de biomarcadores (BM) en diferentes muestras biológicas que puedan relacionarse con la exposición a los efectos de la nicotina, y en segundo lugar, con el aumento del riesgo de desarrollo de CP.

En nuestro trabajo se valoran, mediante el uso de técnicas metabolómicas de alta resolución en muestras de suero, posibles diferencias en los perfiles metabolómicos de pacientes con CP fumadores y controles sanos no fumadores, de una forma más amplia a la expuesta en la literatura hasta el momento (centrada mayormente en los metabolitos derivados de la nicotina). Una vez establecida la discriminación entre ambos grupos a estudio, según sus perfiles metabolómicos, pretendemos determinar la influencia de la carga tabáquica en dichos perfiles. El hallazgo de los metabolitos causantes de las posibles diferencias, permitiría analizar la participación del tabaco como factor de riesgo en el cáncer de pulmón y, en un futuro, facilitar la caracterización de biomarcadores precoces para este proceso neoplásico al conseguir discriminar cuales son aquellos metabolitos que se alteran en sujetos con historia de tabaquismo y que posteriormente desarrollan cáncer.

## METODOLOGÍA

Población y muestras: las características epidemiológicas de los grupos a estudio fueron las siguientes: de los 12 pacientes reclutados con diagnóstico final

de CP, el 75% fueron varones, con una edad media de  $62 \pm 2$  años. Todos los integrantes de este grupo presentaban historia de tabaquismo (50% fumadores activos en el momento del diagnóstico y otro 50%, ex fumadores, aquellos que abandonaron el hábito tabáquico durante al menos 6 meses previos a la encuesta). En cuanto a las estirpes histológicas, 6 de los casos correspondían a adenocarcinoma, y el 50% de éstos fueron diagnosticados en un estadio precoz (estadio I y II). De los cuatro casos con diagnóstico de carcinoma epidermoide de pulmón, el 50% presentaba datos de enfermedad extendida (estadio III y IV). Del resto de pacientes incluidos en el estudio, un caso de cáncer de pulmón de células grandes y otro de cáncer de pulmón de células pequeñas, ambos en estadios avanzados. Cabe destacar la presencia de un elevado porcentaje de pacientes con HTA (66,6%) como comorbilidad asociada. Solamente un caso de CP presentaba diagnóstico previo de EPOC. En la tabla 1 se recogen las características clínicas y epidemiológicas principales de ambos grupos.

**Tabla 1. Características generales de la población a estudio**

	Cáncer de pulmón (n=12)	Control sano (n=9)
<b>Sexo (H/M)</b>	8/4	2/7
<b>Edad media</b>	$63 \pm 2$	$62 \pm 2$
<b>Comorbilidad</b>	HTA (66,6%), DM (41,6%)	HTA (44,4%), DM (11%)
<b>Tabaquismo</b>		
- Fumador	6 (4H/2M)	-
- Ex fumador	6 (4H/2M)	-
- Nunca fumador	-	9
<b>Carga tabáquica</b>		
- Moderada (< 35p/a)	6	-
- Elevada (>70p/a)	6	-
<b>Histología</b>		
- Adenocarcinoma	6 (5H/1M)	-
- Epidermoide	4 (1H/3M)	-
- CP células grandes	1(1H/0M)	-
- CPCP	1(1H/0M)	-
<b>Estadios CP</b>		
- I (a y b)	1	-
- II (a y b)	4	-
- III (a y b)	4	-
- IV	3	-

Para el estudio dividimos a los pacientes con CP en dos grupos, según su carga tabáquica (CT): carga tabáquica moderada (CT <35), entre los que se incluyen 4 adenocarcinomas, 1 carcinoma epidermoide

y 1 carcinoma de células grandes; y carga tabáquica elevada (CT >70), 2 adenocarcinoma, 3 epidermoide, 1 carcinoma de células pequeñas.

Las muestras de suero de los pacientes con sospecha de CP y posterior confirmación histológica fueron recogidas en la sala de Endoscopia Respiratoria del Hospital Juan Ramón Jiménez, mediante punción venosa de la región antero-cubital, después de 8 horas de ayuno<sup>13</sup> y almacenadas en tubos BD Vacutainer SST II con gel separador y sistema de vacío *Advance*. Se mantuvieron durante 30 minutos a 4°C, protegidas de la luz para permitir la retracción del coágulo<sup>14</sup>. Después de la centrifugación (a 4.000 rpm durante 10 minutos)<sup>15</sup> se dividieron en alícuotas en tubos *Eppendorf*, y se congelaron a -80 °C hasta su análisis. Con igual procedimiento, se obtuvieron las muestras de suero de los nueve sujetos sanos reclutados en el Hospital de día del Hospital Juan Ramón Jiménez, donde acudían por otras causas (intervenciones de cirugía menor, en su mayoría oftalmológicas).

Todos los integrantes del estudio firmaron el consentimiento informado, el cual fue aprobado por el Comité de Investigación y Ensayos Clínicos (CEI) de nuestro Hospital.

Tratamiento de las muestras de suero y disolventes: el tratamiento de las muestras consistió en la adición de una mezcla de disolventes alcohólicos para la precipitación de proteínas y extracción de metabolitos polares, concretamente a 100 µl de suero se añadieron 400 µl de una mezcla de 1:1 metanol/etanol en un tubo *Eppendorf* y se agitó durante 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se secó bajo corriente de nitrógeno y se reconstituyó con 100 µl de 80:20 metanol-agua. Para el análisis por espectrometría de masas por electro-spray, se añadió ácido fórmico al 0,1% a los extractos, para el modo de ionización positivo. En el caso de la ionización negativa, no fue necesaria la adición de ningún reactivo específico.

Los extractos se analizaron mediante infusión directa en un espectrómetro de masas de alta resolución (DI-ESI-QTOF-MS). Los perfiles metabólicos obtenidos se sometieron a análisis estadístico multivariante (PCA, PLS-DA). La identificación de los metabolitos de interés se realizó mediante experiencias MS/MS. Análisis estadístico: se utilizó el software *Markerview™* (*Applied Biosystems*) para transformar y filtrar los resultados de la espectrometría de masas, con el fin de reducir los valores m/z e intensidades de los picos en matrices de datos de dos dimensiones. Estos datos se procesaron con el software *SIMCA-P™* (versión 11.5, publicado por *Umetrics AB, Umea, Suecia*). Se realizaron análisis estadísticos multivariantes, entre ellos el análisis de componentes principales

(PCA) y el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), con el fin de diferenciar entre los grupos del estudio (pacientes con CP y diferente carga tabáquica y controles sanos) y encontrar las variables (metabolitos) más influyentes que provocan dicha discriminación.

## RESULTADOS

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

El análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) mostró una clara separación de los diferentes grupos de estudio (Figura 1). La componente t1 separa el grupo CS de los dos grupos CP, siendo la componente t2 la que separa los grupos CP de diferente carga tabáquica, indicando la existencia de variables (metabolitos) que provocan la discriminación entre los mismos. Se aprecia, en definitiva, una diferenciación entre los 3 grupos: CS, CP con moderada CT y CP con elevada CT, con clara influencia de la carga tabáquica presente en cada uno de ellos. En la figura 2 se muestra el diagrama "loading plot" que representa una nube de puntos, en la que cada punto corresponde a un metabolito en concreto. Aquellos que se encuentran en los extremos son lo que influyen de forma significativa en la separación entre los pacientes con CP con carga tabáquica elevada y los controles sanos y, por tanto, son aquellos metabolitos

que provocan la discriminación entre los mismos.

Los metabolitos causantes de esta discriminación, entre controles sanos y pacientes con CP con diferente carga tabáquica, se muestran en la tabla 2. Los niveles de glutatión, indicativos de situación de estrés oxidativo en la célula, se encuentran disminuidos en pacientes con CP fumadores con respecto al grupo de sujetos sanos, observándose también que, cuanto mayor sea la carga tabáquica, menor es el nivel detectado de este metabolito. Con el resto de metabolitos observados ocurre justo lo contrario, es decir, sus niveles aumentan en CP y el aumento es más evidente a mayor exposición al tabaco. Este es el caso de la creatina, derivado de los aminoácidos, muy parecida a ellos en cuanto a su estructura molecular y que constituye una fuente inmediata y directa para la producción de ATP; carnitina (C4, C10 y C12), encargados del transporte de los ácidos grasos de cadena larga desde el citosol a la matriz mitocondrial para la beta-oxidación; fosfolípidos de membrana, involucrados en alteraciones de la proliferación celular e invasión de células cancerosas y, por último, el ácido picolínico, derivado sustitutivo de la piridina y la valina, aminoácido esencial implicado en muchos procesos metabólicos (es un producto en la vía de síntesis de acetil-CoA). Los niveles de valina, como se aprecia en el diagrama de barras de la figura 3, difieren de forma clara entre el grupo con CP y CT moderada y los pacientes con CP y CT elevada.

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

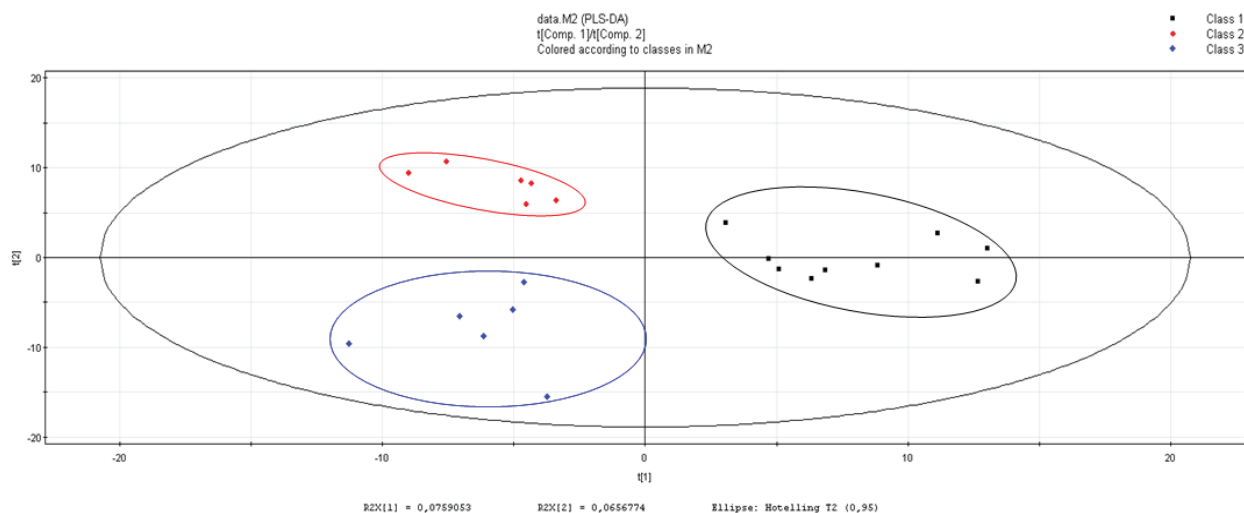


Figura 1. Perfil metabolómico de los tres grupos a estudio: CP (CT >70), CP (CT <35) y CS.

Cada una de las señales corresponde con un sujeto determinado, ubicado cada uno de ellos en la gráfica según su perfil metabolómico. Existe una clara discriminación entre los tres grupos. En negro (clase 1) CS; Rojo (Clase 2) CP con CT >70 paq/año; y en Azul (Clase 3) CP con CT <35 paq/año.



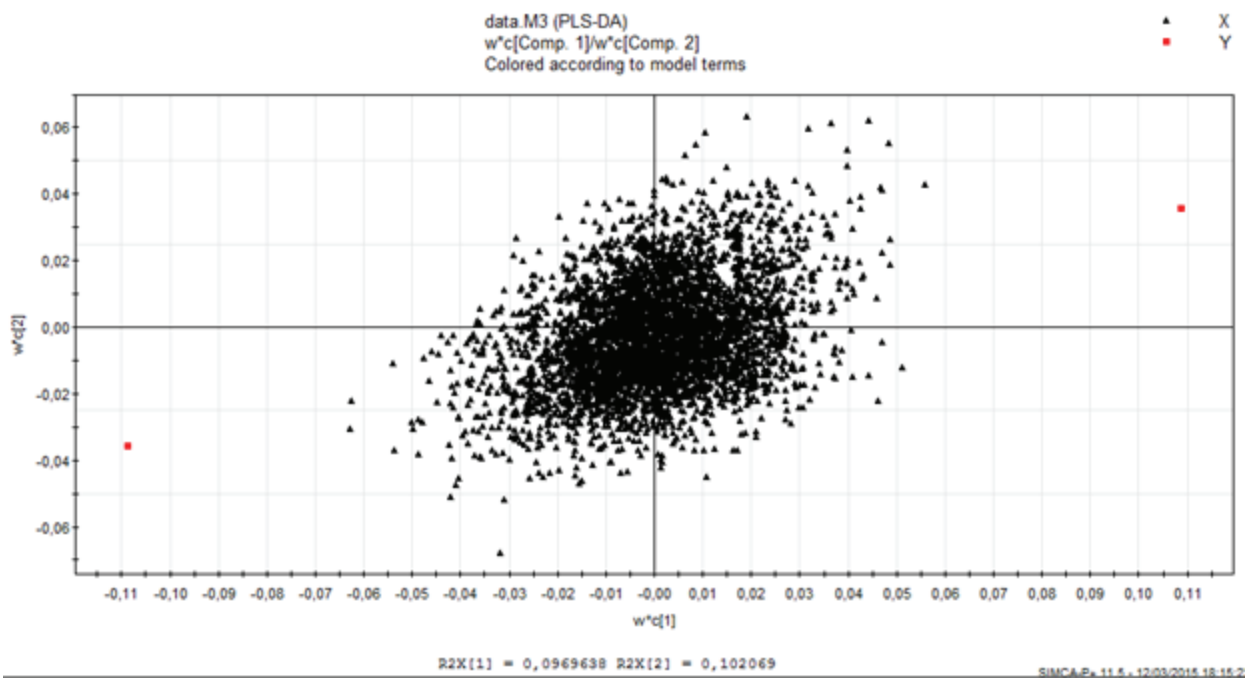


Figura 2. Diagrama “Loading”, correspondiente a la comparación del grupo CP (CT >70) frente a CS.

Tabla 2. Metabolitos encontrados en el estudio con su m/z correspondiente en el espectro de masa

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

Car: Carnitina; GSH: Glutación; PL: Fosfolípido de membrana. (N.S.: No significativo)

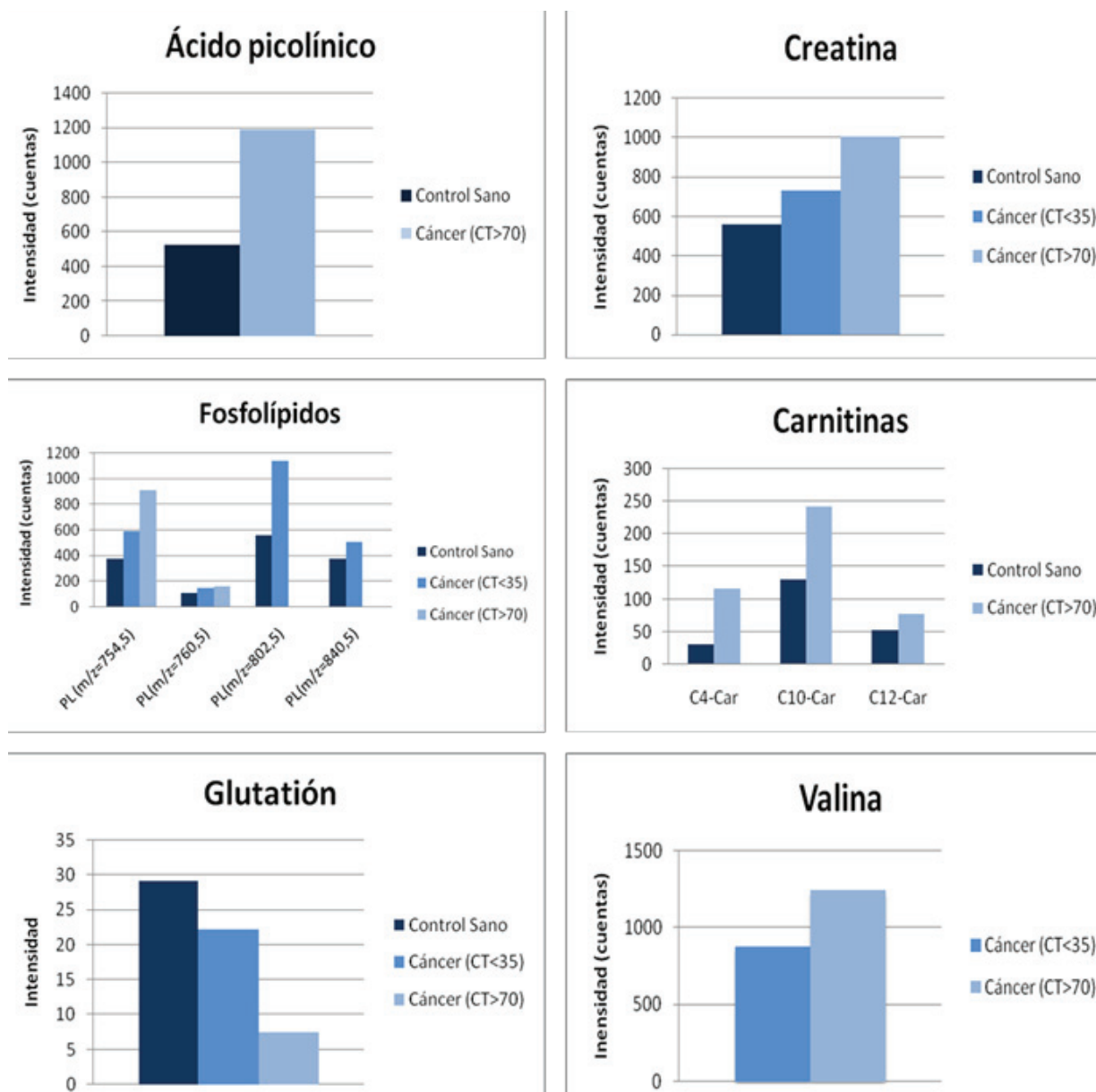


Figura 3. Niveles de los distintos metabolitos obtenidos en el estudio.

## DISCUSIÓN

El tabaco ha sido ampliamente estudiado por su relación establecida con diferentes procesos patológicos, entre ellos el CP. Se considera una fuente de oxidantes exógenos que conducen, cuando el hábito es continuado, a una inflamación crónica de la vía aérea con acumulación y activación de leucocitos y polimorfonucleares, que conllevan un aumento de los niveles de Metabolitos Reactivos del Oxígeno (ROMs) y de óxido nítrico. Un balance negativo entre los mecanismos antioxidantes (como la enzima superóxido dismutasa), encargados de la protección del tejido pulmonar y los ROMs, puede conducir a

un aumento del estrés oxidativo en el tejido pulmonar. Medir los ROMs puede resultar útil para comprobar el daño producido a nivel pulmonar, pero resulta complicado debido a su corta vida media<sup>16</sup>.

El estudio de los metabolitos intermediarios de la nicotina y otros componentes del tabaco constituye otra vía utilizada para comprobar el daño ocasionado por éste. Existen múltiples publicaciones enfocadas al estudio del papel de la nicotina y sus derivados, nitrosaminas específicas del tabaco o hidrocarburos aromáticos policíclicos entre otros, que pretenden en primer lugar aclarar el papel de estas sustancias, men-

cionadas en la fisiopatogenia del cáncer en pacientes expuestos al humo del tabaco<sup>17, 18</sup>. Para esto, la metabólica está jugando un papel muy importante en los últimos años. Uno de los estudios más relevantes, por el gran tamaño muestral, es el realizado por Xu *et al.*<sup>19</sup>, aunque no incluyen entre los grupos a estudio pacientes con CP. En él comparan los perfiles metabólicos de sujetos fumadores con no fumadores o ex fumadores, encontrando diferencias significativas entre los tres grupos y poniendo de manifiesto que en la evaluación tras el cese del hábito tabáquico, gran parte de los metabolitos encontrados vuelven a sus niveles normales.

El tipo de muestra procesada en los estudios metabólicos ha sido diversa. Las muestras de orina se han utilizado en numerosos estudios, como el de Hetch *et al.*<sup>20</sup>, que evalúa el riesgo de cáncer en fumadores con respecto a no fumadores, determinando que ciertos metabolitos, como el 4(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL), derivado de nitrosaminas específicas del tabaco; el r-1,t-2,3,c-4-tetrahydroxy-1,2,3,4-tetrahydrophenanthrene (Phet), derivado de hidrocarburos aromáticos policíclicos; N<sup>2</sup>-nitrosonornicotina (NNN), también derivado de nitrosaminas específicas del tabaco, y la cotinina (derivado de la nicotina), se relacionan con un riesgo aumentado de cáncer. Otros estudios, como el de Camella *et al.*<sup>21</sup>, también en orina, y el de Yuan *et al.*<sup>22</sup>, evalúan el riesgo de CP en pacientes fumadores y continúan encontrando elevados algunos de los metabolitos mencionados por Hecht *et al.*, como el NNAL, Phet y la cotinina en este tipo de tumor. Además, asocian el NNN con un mayor riesgo para el cáncer de esófago específicamente. También en muestras de orina, pero con el estudio de compuestos orgánicos volátiles (Volatile Organic Compounds, VOC) Yuan *et al.*<sup>23</sup>, en 2012 hacen una comparación entre los resultados mencionados anteriormente y los metabolitos del ácido mercaptopurínico, presentes en las muestras analizadas de sujetos fumadores, concluyendo que presentan menor importancia como factor de riesgo para el CP, en comparación con el PAH (Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos) y las nitrosaminas específicas del tabaco, como el NNK (4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone). Otros autores proponen como marcadores de tabaquismo a nivel metabólico cotinina, nicotina-N<sup>2</sup>-óxido, y trans-3'-hidroxicotinina, metabolitos de la nicotina que aumentaban sus niveles en fumadores con respecto a ex fumadores o nunca fumadores<sup>24</sup>.

Todos los trabajos mencionados están enfocados al estudio de vías ya conocidas y relacionadas con el

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

Hemos observado que ciertos metabolitos en las muestras de suero incluidas en el análisis varían su expresión entre los diferentes grupos de estudio, como se ha comentado anteriormente. En el caso del glutatión, sus niveles disminuyen en los grupos de cáncer de pulmón con respecto a sujetos sanos (se ha encontrado una disminución de los niveles de este metabolito en pacientes con CPNCP y mutación de KRAS, presente en el 20 - 25% de este tipo de tumores<sup>25</sup>). El descenso fue mayor a mayor carga tabáquica. Se trata de un tripéptido no proteico, que contiene un enlace peptídico inusual entre el grupo amino de la cisteína y el carboxilo de la cadena lateral del glutamato (en el estudio publicado por Hori *et al.*<sup>13</sup>, la cisteína modifica sus niveles en CP, influenciados por la exposición al tabaco). En su síntesis también interviene la glicina (disminuida en pacientes con adenocarcinoma, en comparación con sujetos sanos según algunos estudios<sup>26</sup>). El glutatión -con acción antiradical libre y peróxidos-, constituye una defensa celular antioxidante que protege contra los ROS (especies reactivas del oxígeno). Alteraciones en el mecanismo antioxidante conllevan daño a nivel de proteínas, ácidos grasos poliinsaturados y de ADN, fomentando así la carcinogénesis<sup>27</sup>. Los restantes metabolitos muestran una presencia elevada: valina, aminoácido esencial (es uno de los 20 aminoácidos codificadores para el ADN) cuyos niveles se han visto alterados en procesos neoplásicos, concretamente en muestras de tejido pulmonar de pacientes con CP, en los que sus niveles están aumentados<sup>13</sup>. Ácido picolínico, producto intermediario en la degradación del triptófano, sin relación hasta el momento con el CP, aunque sabemos que está involucrado en el metabolismo energético celular, modificado en procesos neoplásicos. Otros metabolitos sobreexpresados en nuestro estudio han sido: algunos fosfolípidos de membrana, carnitina y la creatina. Todos ellos han sido relacionados con rutas previamente conocidas en el proceso del cáncer, involucrados principalmente en el metabolismo energético y estrés oxidativo a nivel celular. En el caso de fosfolípidos, existen múltiples estudios en los que ponen de manifiesto

la relación con patologías cancerosas, además de relacionarse con variaciones en la expresión de varios subtipos, en función de la exposición a humo de tabaco<sup>18,19</sup>. La carnitina, sintetizada a partir de los aminoácidos lisina y metionina, está involucrada en el metabolismo energético, encargada del transporte de los ácidos grasos, lo que sugiere un metabolismo lipídico anormal en pacientes con cáncer de pulmón<sup>28</sup>. En cuanto a la exposición a los efectos de tabaco, no existen datos en la literatura, hasta el momento, sobre este metabolito. La creatina, también relacionada con el CP, y relacionada incluso con los diferentes estadios de la enfermedad, ha sido estudiada y comparada con otras enfermedades pulmonares con severa afectación del metabolismo en general, como la EPOC, sin encontrar alteraciones atribuidas a esta patología ni relación con el hábito tabáquico, por lo que podría suponer una posible diana como biomarcador para el CP, a falta de más estudios para confirmar<sup>24,29</sup>.

El estudio se ha realizado sobre muestras de suero, lo que presenta una gran ventaja al permitir caracterizar mayor número de metabolitos que en el plasma, aunque en este último la reproducibilidad es mayor, por la mayor estabilidad de este fluido. Sí es importante mencionar que el suero supone una mejor matriz de biomarcadores con respecto a otro tipo de muestras, como la orina, porque no depende de la excreción renal<sup>17,30</sup>.

Hasta el momento, todos los metabolitos encontrados relacionados con CP y tabaco han sido, en su mayoría, en muestras diferentes a suero, como se ha comentado previamente, y todos ellos relacionados directamente con la nicotina y nitrosaminas específicas del tabaco (las que con mayor evidencia se han relacionado con CP han sido el NNK y PAH). Nosotros realizamos un estudio piloto sobre muestras de suero de pacientes con cáncer de pulmón expuestos al humo de tabaco y evaluamos el espectro metabolómico de una forma global y no dirigido a metabolitos concretos, previamente seleccionados, lo que plantea una visión mucho más amplia del problema a analizar y no está condicionado por los resultados de estudios previos. Este enfoque, evaluar la influencia del humo de tabaco en los perfiles metabolómicos de pacientes con CP, es novedoso. Por otra parte, el tamaño muestral no sería comparable a otros estudios en los que la aplicación de técnicas metabolómicas va dirigida a la detección de metabolitos previamente seleccionados. Con todo ello, hemos observado que la concentración de determinados metabolitos varía en pacientes con diagnóstico de CP con respecto a sanos y cuáles de ellos podrían estar influenciados por el consumo

de tabaco, y en qué medida, destacando algunos metabolitos, como el glutatión o la creatina, los cuales pueden relacionarse con distintos mecanismos patológicos propios de esta enfermedad.

## CONCLUSIONES

El presente estudio metabolómico permite diferenciar claramente, aunque no es nuestro objetivo principal, entre sujetos sanos y pacientes con cáncer de pulmón. Así mismo, se han identificado posibles biomarcadores para el diagnóstico de CP, los cuales pueden relacionarse con distintos mecanismos patológicos propios de esta enfermedad. Además, estas alteraciones están influenciadas por la carga tabáquica de los pacientes incluidos en el estudio, lo que remarca la importancia del tabaquismo como factor de riesgo primario en el desarrollo del CP.

Es importante señalar que nuestro estudio piloto presenta algunas limitaciones. Respecto al tamaño muestral, aunque hay otros estudios con mayor número de sujetos o muestras analizadas, ya hemos comentado que no son comparables, pues nuestro estudio no va dirigido a la búsqueda de metabolitos específicos. No se han analizado en este trabajo otros grupos de estudio que podrían ser de interés (sujetos fumadores sin patología neoplásica conocida y con carga tabáquica similar, aumentar el tamaño muestral, para que permita diferenciar claramente por tipo y estadiaje del CP...). Estos son algunos de los planteamientos diseñados para futuras investigaciones por nuestro grupo. Por último, comentar algunas dificultades asociadas a los estudios metabolómicos (dieta, toma de fármacos y otros factores), muy difíciles de controlar a pesar del estricto protocolo desarrollado al respecto.

A pesar de lo comentado, pensamos que los hallazgos presentados en este estudio son novedosos y de gran importancia, al poner de manifiesto la utilidad de técnicas metabolómicas de alta resolución en el análisis global de los perfiles metabolómicos de pacientes con cáncer de pulmón e historia de tabaquismo en muestras de suero, y no dirigida a metabolitos específicos, lo que amplía el campo de búsqueda de posibles biomarcadores relacionados con esta enfermedad.

## AGRADECIMIENTOS

Belén Callejón Leblic agradece al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por la concesión de un contrato pre-doctoral de formación del profesorado universitario FPU13/03615.



## BIBLIOGRAFÍA

- Lozano R, Naghavi M, Foreman K et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012; 380: 2095–128.
- Escuín JS de C. Registro del Grupo Cooperativo de Cáncer de Pulmón-II de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica. Estudio descriptivo. *Arch Bronconeumol*. 2013; 49 (11): 462–7.
- Siegel R, Ward E, Brawley O et al. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61 (4): 212–36.
- Xiang D, Zhang B, Doll D et al. Lung cancer screening: from imaging to biomarker. *Biomark Res*. 2013;1(1):4.
- Aberle D, Adams A, Berg C. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med*. 2011; 365 (5): 395–409.
- Manser R, Lethaby A, Irving LB et al. Screening for lung cancer. *Cochrane database Syst Rev*. 2013; 6: CD001991.
- Humphrey LL, Deffebach M, Pappas M et al. Screening for lung cancer with low-dose computed tomography: a systematic review to update the US Preventive services task force recommendation. *Ann Intern Med*. 2013; 159: 411–20.
- Ruano-Ravina A, Pérez Ríos M, Fernández-Villar A. Cribado de cáncer de pulmón con tomografía computarizada de baja dosis después del National Lung Screening Trial. El debate continúa abierto. *Arch Bronconeumol*. 2013; 49 (4): 158–65.
- Bryant A, Cerfolio RJ. Differences in epidemiology, histology, and survival between cigarette smokers and never-smokers who develop non-small cell lung cancer. *Chest*. 2007; 132 (1): 185–92.
- Warren G, Singh A. Nicotine and lung cancer. *J Carcinog*. 2013; 12:1.
- El Sadeck N, Ibrahim BM, Alassal M. Cytochrome P450-isoenzyme 1A1 in susceptibility to tobacco-related lung cancer. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*. 2014; 22 (3): 315–8.
- Tekpli X, Zienolddiny S, Skaug V et al. DNA methylation of the CYP1A1 enhancer is associated with smoking-induced genetic alterations in human lung. *Int J Cancer*. 2012; 131 (7): 1509–16.
- Hori S, Nishiumi S, Kobayashi K et al. A metabolomic approach to lung cancer. *Lung Cancer*. Elsevier Ireland Ltd; 2011; 74 (2): 284–92.
- Yin P, Peter A, Franken H et al. Preanalytical aspects and sample quality assessment in metabolomics studies of human blood. *Clin Chem*. 2013; 59 (5): 833–45.
- Barri T, Dragsted LO. UPLC-ESI-QTOF/MS and multivariate data analysis for blood plasma and serum metabolomics: Effect of experimental artefacts and anticoagulant. *Anal Chim Acta*. 2013; 768 (1): 118–28.
- Okur HK, Yuksel M, Lacin T et al. Detection of reactive oxygen metabolites in malignant and adjacent normal tissues of patients with lung cancer. *World J Surg Oncol*. 2013;11:9.
- Hsu PC, Zhou B, Zhao Y et al. Feasibility of identifying the tobacco-related global metabolome in blood by UPLC-QTOF-MS. *J Proteome Res*. 2013; 12 (2): 679–91.
- Cruickshank-Quinn CI, Mahaffey S, Justice MJ et al. Transient and persistent metabolomic changes in plasma following chronic cigarette smoke exposure in a mouse model. *PLoS One*. 2014;9(7):e101855.
- Xu T, Holzapfel C, Dong X et al. Effects of smoking and smoking cessation on human serum metabolite profile: results from the KORA cohort study. *BMC Med*. BioMed Central Ltd; 2013; 11 (1): 60.
- Hecht SS, Murphy SE, Stepanov I et al. Tobacco smoke biomarkers and cancer risk among male smokers in the Shanghai Cohort Study. *Cancer Lett*. 2013;334(1):34-8.
- Carmella SG, Ming X, Olvera N et al. High throughput liquid and gas chromatography-tandem mass spectrometry assays for tobacco-specific nitrosamine and polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites associated with lung cancer in smokers. *Chem Res Toxicol*. 2013; 26 (8): 1209–17.
- Yuan JM, Butler LM, Stepanov I et al. Urinary tobacco smoke-constituent biomarkers for assessing risk of lung cancer. *Cancer Res*. 2014; 74 (2): 401–11.
- Yuan J-M. Urinary tobacco smoke-constituent biomarkers for assessing risk of lung cancer. *Changes*. 2012; 29 (6): 997–1003.
- Mathé Ewy A, Patterson AD, Haznadar M. Non-invasive urinary metabolomic profiling identifies diagnostic and prognostic markers in lung cancer. *Cancer Res*. 2014; 72 (12): 3259–70.
- Brunelli L, Caiola E, Marabese M et al. Capturing the metabolomic diversity of KRAS mutants in non-small-cell lung cancer cells. *Oncotarget*. 2014;5(13):4722-31.
- Wen T, Gao L, Wen Z et al. Exploratory investigation of plasma metabolomics in human lung adenocarcinoma. *Mol Biosyst*. 2013; 9: 2370–8.
- Kalluri U, Naiker M, Myers M. Cell culture metabolomics in the diagnosis of lung cancer-the influence of cell culture conditions. *J Breath Res*. 2014;8(2):027109.
- Li Y, Song X, Zhao X et al. Serum metabolic profiling study of lung cancer using ultra high performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. Elsevier B.V.; 2014; 966: 147–53.
- Deja S, Porebska I, Kowal A et al. Metabolomics provide new insights on lung cancer staging and discrimination from chronic obstructive pulmonary disease. *J Pharm Biomed Anal*. 2014; 100: 369–80.
- Yu Z, Kastenmüller G, He Y et al. Differences between human plasma and serum metabolite profiles. *PLoS One*. 2011;6(7):e21230.