

## BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES METABOLÓMICOS PARA LA DETECCIÓN PRECOZ DE CÁNCER DE PULMÓN EN POBLACIÓN DE RIESGO

A. Pereira Vega<sup>1</sup>, B. Callejón Leblic<sup>2</sup>, S. García Garrido<sup>3</sup>, L. Padrón Fraysse<sup>1</sup>, J.L. Gómez Ariza<sup>2</sup>, T. García Barrera<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Servicio de Neumología del Hospital Juan Ramón Jiménez de Huelva.

<sup>2</sup>Departamento de Química Analítica de la Universidad de Huelva.

<sup>3</sup>Técnico de apoyo a la investigación de la Fundación Andaluza Beturia para la Investigación en Salud (FABIS). Hospital Juan Ramón Jiménez de Huelva.

### RESUMEN

**Introducción:** El cáncer de pulmón (CP) es el que provoca mayor mortalidad, debido principalmente a su diagnóstico tardío, en el que la supervivencia es baja.

**Objetivos:** Identificar biomarcadores (BM) de utilidad clínica para el diagnóstico precoz de CP en una población de riesgo mediante el análisis metabolómico (MB) de muestras sanguíneas.

**Material y método:** Se han seleccionado muestras de suero de 30 pacientes con CP y 30 pacientes con EPOC (especialmente enfisematosos). El estudio metabolómico se realizó empleando la espectrometría de masas de alta resolución de analizador híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo mediante la infusión directa de las muestras con fuente de electrospray.

**Resultados:** El análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) mostró una clara discriminación entre los 2 grupos (CP y EPOC). Se identificaron 35 metabolitos alterados en CP con respecto al grupo EPOC, incluyendo aminoácidos, ácidos grasos, carnitinas y lisofosfolípidos. La ruta metabólica más afectada fue el metabolismo de la alanina, aspartato y glutamina y el análisis de curvas ROC mostró que 11 de los 35 metabolitos alterados en CP presentaban un valor de área bajo la curva (AUC) mayor a 0,7 (treonina, creatinina, ornitina, glutamato, fenilalanina, arginina, tirosina, pentoilcarnitina, ácido palmítico, LPC (18 : 2), LPC (18 : 1), LPC (20 : 4) que podrían utilizarse como BM de CP y considerarse relevantes en su progresión.

### Conclusiones:

- 1.- Se han identificado 11 metabolitos que podrían ser BM de cáncer de pulmón.
- 2.- Estos metabolitos se relacionan con vías metabólicas previamente relacionadas con el CP.
- 3.- Estos BM obtenidos podrían utilizarse como screening de CP en población de riesgo.

**Palabras clave:** cáncer de pulmón, metabolómica, metabolitos, diagnóstico precoz, EPOC.

### ABSTRACT

**Introduction:** Lung cancer (LC) causes the greatest mortality, primarily due to its late diagnosis, for which survival rates are low.

**Objectives:** To identify clinically useful biomarkers (BM) for the early diagnosis of LC in a high-risk population using metabolic analysis and blood samples.

**Material and methods:** Serum samples were selected from 30 patients with LC and 30 patients with COPD (especially those with emphysema). The metabolic study was carried out using hybrid quadrupole/time-of-flight analyzer high-resolution mass spectrometry by directly infusing the samples with an electrospray source.

**Results:** The partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA) showed a clear discrimination between the two groups (LC and COPD). 35 altered metabolites were identified in LC with respect to the COPD group, including amino acids, fatty acids, carnitines and lysophospholipids. The most commonly affected metabolic pathway was the metabolism of alanine, aspartate and glutamine and the ROC curve analysis showed that 11 of the 35 metabolites altered in LC showed an area under the curve (AUC) above 0.7 (threonine, creatinine, ornithine, glutamate, phenylalanine, arginine, tyrosine, pentanoylcarnitine, palmitoleic acid, LPC [18:2], LPC [18:1], LPC [20:4]) which could be used as BM in LC and considered relevant in disease progression.

### Conclusions:

1. 11 metabolites have been identified that could be BM in lung cancer.
2. These metabolites are related to metabolic pathways previously associated with LC.
3. These BM obtained could be used for LC screening in the high-risk population.

**Keywords:** lung cancer, metabolomic, metabolites, early diagnosis, COPD.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón (CP) es una de las neoplasias con mayor incidencia mundial y la de mayor mortalidad<sup>1, 2</sup> representando entre 15 y el 20% de todas las neoplasias. Las publicaciones recientes sugieren la presencia de unos 20 millones de casos en el mundo en el año 2020.

La mortalidad del CP al año del diagnóstico es cercana al 60%, 75% a los dos años y un 94% a los 5 años<sup>3</sup>. Una de las causas de su alta mortalidad es la frecuencia con la que se diagnostica en fases avanzadas de la enfermedad, con escasas posibilidades de tratamiento. Cuando se diagnostica precozmente (estadios I y II) la supervivencia a los 5 años puede ser superior al 60% mientras que si se diagnostica en estadios avanzados (estadios III y IV) la supervivencia a los 5 años no supera el 5%.

Para intentar reducir la mortalidad se han sugerido diferentes estrategias: prevención a partir de diferentes medidas de control del tabaquismo, diagnóstico precoz, tratamientos personalizados y nuevas terapéuticas (inmunoterapia)

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), fundamentalmente el enfisema, es un factor de riesgo para el desarrollo del CP. González y De Torres<sup>4</sup> describieron que los pacientes con enfisema demostrado por TAC de tórax tenían 3 veces más riesgo de padecer CP que aquellos sin enfisema, independientemente de la presencia de EPOC. Existe controversia en cuanto a la severidad del enfisema y su relación con el CP, encontrándose una relación no lineal en los estudios realizados y solo en aquellos que lo determinan visualmente. Actualmente se considera el enfisema radiológico como uno de los más potentes biomarcadores (BM) asociados al riesgo de desarrollar CP.

El CP muestra un periodo de inicio biológico denominado "Fase No Detectable" en la que coexisten diferentes alteraciones en las vías metabólicas celulares (reducción de la apoptosis, alteraciones inmunológicas o aumento de la capacidad de angiogénesis). A esta fase le sigue una segunda, denominada "Preclínica", en la que se podría detectar el CP mediante técnicas como el TAC de baja dosis. Se continúa por la denominada "Fase Clínica", en la que ya aparecen los síntomas principales del CP. El objetivo fundamental del uso de BM se centra en obtener el diagnóstico de CP en las dos primeras fases, antes de que los síntomas del paciente y la evolución de la enfermedad hagan mucho más difícil el éxito del tratamiento. (Figura 1)

Los elevados valores de incidencia y mortalidad así como la iniciativa de estas estrategias nos motivan a iniciar propuestas, especialmente en el segundo apartado (diagnóstico precoz) que mejoren las perspectivas de esta patología y que podrían ser de utilidad en estudios de screening en población de riesgo de padecer CP, como

los pacientes con enfisema.

Los métodos más utilizados para el diagnóstico precoz del CP han sido la radiografía de tórax seriada, la citología de esputo y algunos biomarcadores clásicos. En ningún caso se ha demostrado su eficacia, especialmente para propiciar su uso con finalidad poblacional. Recientemente se han incorporado nuevos procedimientos que abren nuevas perspectivas, no solo clínicas sino también epidemiológicas. En el primer caso, la inmunofluorescencia realizada durante la endoscopia<sup>5</sup>, permite visualizar zonas de metaplasia o displasia escamosa en el epitelio bronquial, sugestivas de carcinoma "in situ".

En el segundo caso, el TAC de baja dosis representa una ventana de oportunidad que abre nuevas e interesantes perspectivas<sup>6, 7</sup>. Diversos estudios muestran una disminución de la mortalidad realizando screening diagnóstico con TAC de baja dosis en población de riesgo de CP (pacientes mayores de 50 años y con tabaquismo acumulado >20 paquetes/año). Sin embargo, la posibilidad de falsos positivos, con la carga psicológica que puede suponer para el paciente, las toracotomías realizadas en lesiones benignas, y su coste e irradiación acumulada pueden limitar su uso<sup>8</sup>. Los datos deben analizarse a la luz de la realidad económica y social de cada país antes de recomendar amplias campañas de cribado en la población.

Las vías metabólicas implicadas en el desarrollo del CP dejan huellas biológicas que pueden ser trazadas precozmente con interés diagnóstico, pronóstico o terapéutico. Un buen BM debería ser altamente sensible y específico, con buenos valores predictivos positivo y negativo, alcanzable de forma incruenta, reproducible y barato. La dificultad en alcanzar todas estas premisas retrasa la aparición de un buen BM en CP. En la **Tabla 1** se detallan los diferentes biomarcadores que hasta el momento han demostrado relación con el diagnóstico de CP. Muchos de ellos se utilizan actualmente en el seguimiento de los pacientes.

Las denominadas metodologías "ómicas" ofrecen una nueva perspectiva desde donde abordar este arduo problema del diagnóstico precoz en CP. Dentro de las ciencias ómicas se incluyen principalmente la genómica, transcriptómica, proteómica y metabólica, aunque actualmente están apareciendo nuevas ómicas específicas como por ejemplo la metalómica o la ionómica. La genómica está teniendo relevancia en la búsqueda de mutaciones génicas (EGFR, ALK, PDL-1) que pueden predecir pronóstico y respuesta a diversos tratamientos inmunoterápicos. La metabólica se está aplicando, entre otros aspectos, en la búsqueda de nuevos biomarcadores.

La metabolómica utiliza los cambios que se producen en los metabolitos de un individuo frente a un estímulo o determinados factores genéticos o ambientales. La metabolómica permite la identificación de moléculas de pequeño tamaño (metabolitos) mediante técnicas de alta resolución. El seguimiento de estos metabolitos puede llevar a determinadas alteraciones en el metabolismo celular que identifiquen a individuos afectados por ciertos procesos frente a una vía metabólica normal<sup>9</sup>. Entre las ciencias ómicas, la metabolómica es la que tiene mayor relación con el fenotipo (consecuencia de la interacción entre lo genético y lo ambiental), hecho que tiene una especial relevancia en el CP, donde los factores ambientales (fundamentalmente el tabaco), tienen una gran importancia al incidir en una base genética determinada.

Las técnicas metabolómicas más utilizadas en la actualidad se basan en la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (MS), siendo esta última una técnica de análisis con mayor resolución. Además, la MS puede incorporar instrumentaciones mediante acoplamiento al espectrómetro que favorecen aún más la resolución del analizador y por tanto mejoran los análisis y los estudios metabolómicos. Entre ellas se encuentran la cromatografía líquida de alta resolución o ultra alta resolución (HPLC-MS o UPLC-MS), la cromatografía de gases (GC-MS) o la infusión directa (DI-MS). En diferentes estudios se propone utilizar simultáneamente estas técnicas para valorar un mayor número de metabolitos y obtener mejores resultados<sup>10</sup>.

Hasta la fecha, se han empleado diversos tipos de muestras biológicas para realizar estudios metabolómicos en CP:

a.- Espudo<sup>11</sup>: puede obtenerse fácilmente y se ha utilizado ampliamente en el estudio de enfermedades respiratorias. Sin embargo su baja sensibilidad lo ha ido descartando para estos propósitos.

b.- Sangre<sup>12</sup>: ya sea en forma de suero, plasma o sangre total, es la muestra más utilizada en metabolómica. La limitación principal radica en separar las moléculas no relacionadas con el tumor.

c.- Orina<sup>13</sup>: Su análisis metabolómico requiere un tratamiento previo de la muestra para eliminar las sales contenidas en la orina que dificultan la medición de los metabolitos.

d.- Tejido pulmonar: según algunos autores<sup>14</sup> es la muestra ideal para detectar metabolitos específicos dada su elevada concentración. No obstante deben obtenerse las muestras por medios cruentos, lo que limita su utilidad como cribado.

e.- Lavado bronquioalveolar (BAL)<sup>10, 15</sup>: de iguales características que el anterior y con necesidad de

broncoscopia.

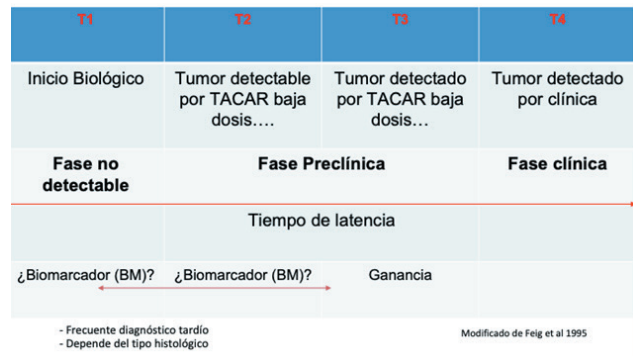
f.- Sudor: algunos estudios<sup>16</sup> han probado su eficacia, aunque su metodología esta poco estandarizada.

g.- Aire exhalado: puede obtenerse fácilmente de forma simple o condensada. Sin embargo, su uso en el estudio de BM esta poco estandarizado<sup>17</sup>.

Las aportaciones metabolómicas han supuesto un nuevo avance en el diagnóstico precoz del CP. La identificación de "perfiles metabolómicos" puede dar lugar a conocer algunos aspectos del genoma y de las vías metabólicas más características de esta patología e introducir estos resultados en el diagnóstico, pronóstico y valoración de la respuesta terapéutica. Así pues, los resultados obtenidos por diversos autores<sup>10 - 18</sup> podrían abrir un camino de esperanza en esta patología tan prevalente, dando lugar a que sus hallazgos puedan utilizarse el ámbito clínico.

Nuestro trabajo describe la búsqueda de BMs del CP en población de riesgo, como son por ejemplo los pacientes con EPOC (fundamentalmente enfisemas). Para ello hemos desarrollado una técnica metabolómica basada en la espectrometría de masas de alta resolución para aplicarla a muestras de suero de pacientes con CP, EPOC y pacientes sanos. Los resultados obtenidos han permitido identificar un grupo de metabolitos con comportamiento diferente en las poblaciones de estudio, que pudieran servir como potenciales BM el CP en población de riesgo.

Figura 1. Historia natural del cáncer de pulmón (Modificado de Feig et al. 1995)



**Tabla 1.** Biomarcadores “clásicos” relacionados con el cáncer de pulmón.

	Predomina en:
<b>Antígeno carcinoma embrionario (CEA)</b>	Predomina en cáncer de pulmón de células no células pequeñas (CPNCP). Mayores concentraciones en los adenocarcinomas pero su especificidad es relativa.
<b>Enolasa Neuronoespecífica (NSE)</b>	Característico del cáncer de pulmón de células
<b>Citoqueratina Cyfra 21.1</b>	Predomina en los CPNCP, carcinomas
<b>Ca 15.3</b>	Predomina en los CPNCP, fundamentalmente
<b>Antígeno asociado a los carcinomas</b>	Predomina en cáncer de pulmón de no células
<b>ProGRP</b>	Cáncer de pulmón de células pequeñas. Alta
<b>Ca 125</b>	Adenocarcinomas y carcinomas de células
<b>Ca 19.9</b>	Adenocarcinomas y carcinomas de células
<b>Cromogranina A</b>	Cáncer de pulmón de células pequeñas.
<b>Un índice CEA/Cyfra &lt; 3</b>	Orienta a carcinoma escamoso (valorar solicitar SCC).
<b>Panel de 6 marcadores (CEA, NSE, Cyfra 21.1, Ca 15.3, SCC y ProGRP)</b>	Aumenta claramente la sensibilidad y especificidad respecto a los marcadores por separado.

## MATERIAL Y MÉTODO

**Población incluida en el estudio:** la población de estudio se dividió en 2 grupos: 30 pacientes diagnosticados de EPOC, fundamentalmente tipo enfisema y con tabaquismo acumulado >20 paquetes-año, y 30 pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón.

Se analizaron muestras de suero sanguíneo, extraídas a partir de la sangre de cada paciente. En los ensayos metabólicos es importante estandarizar los protocolos de recogida de muestras para evitar cambios metabólicos no asociados al efecto que se desea estudiar CP. Para ello, la recogida se realizó siempre en la misma franja horaria (por la mañana), tras ayuno de 8 horas y con el protocolo diseñado para tal fin con el objetivo de obtener muestras no hemolizadas.

**Recogida de muestras sanguíneas:** la extracción sanguínea se realizó según una modificación de la técnica de Bruce<sup>19</sup>. Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción venosa de la región antecubital, recogiendo en tubos Vacutainer BD SST II Advance con gel separador y sistema de vacío, previamente enfriados en nevera (2 - 8 °C), y palometa BD Vacutainer Safety-Lok de 21G. Una vez obtenidas las muestras, se deja que se forme al coágulo a temperatura ambiente durante 30 - 60 minutos, protegidas de la luz (la refrigeración inmediata puede retardar la producción del coágulo e incrementar la posibilidad de hemólisis) y, si no se pueden centrifugar inmediatamente, se guardan en nevera a 2 - 8°C. Posteriormente, las muestras se centrifugan a 4.000 rpm durante 10 minutos a 4°C para separar el suero de la masa eritrocitaria. El suero se divide en alícuotas en tubos Eppendorf y se almacenan en frío. Las muestras recogidas se codifican según el número de identificación (ID) del paciente, el cual solo está disponible para el IP y los investigadores implicados en su procesamiento. En las muestras sanguíneas se comprobó la no existencia de hemólisis: (índice de hemólisis <20).

**Conservación:** tras la recogida y procesamiento, se realizó la identificación y clasificación de las muestras y posteriormente se conservaron a -80 °C en varias alícuotas por caso hasta su envío.

**Traslado de las muestras al Departamento de Química Analítica de la Universidad de Huelva (UHU):** Se trasladaron dichas muestras mediante mensajería empleando nieve carbónica para su conservación. Se han conservado en el ultracongelador de la UHU a -80 °C hasta que se procedió a su análisis.

**Técnicas metabólicas empleadas:** el análisis metabólico de las muestras de suero se realizó en el Laboratorio de Análisis Medioambiental y Bioanálisis (FQM-141) de la Universidad de Huelva.

Antes del análisis, las muestras de suero fueron sometidas a la extracción de los metabolitos. Para ello se realizó una extracción secuencial en dos pasos de los metabolitos polares y apolares del suero. El primer paso consistió en la adición de una mezcla polar MeOH:EtOH (1:1 v/v) para precipitar las proteínas. Tras centrifugación a 4.000 rpm, 4°C y durante 15 minutos, el sobrenadante fue recogido para su análisis. El segundo paso consistió en la extracción de metabolitos del pellet resultante mediante la adición de la mezcla apolar CHCl<sub>3</sub>: MeOH (2:1 v/v). Tras centrifugación a 10.000 rpm, 4°C y 15 minutos el sobrenadante fue recogido para su análisis. Los extractos recogidos en el primero y segundo paso fueron llevados a sequedad con una corriente de nitrógeno y resuspendidos en MeOH: H<sub>2</sub>O (8:2 v/v) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH (6:4 v/v) respectivamente.

El análisis de los extractos polar y apolar se llevó a cabo mediante la infusión directa de los mismos a un espectrómetro híbrido de cuadrupolo-tiempo de vuelo empleando una fuente de electrospray (DI-ESI-QTOF-MS) Para el análisis en modo positivo del extracto polar fue necesaria la adición de 0,1% de ácido fórmico a las muestras. Para el extracto apolar se añadió formiato amónico. No fue necesario la adición de ningún reactivo para el análisis en modo negativo.

Tras los análisis se obtuvieron los diferentes espectros de masas de los extractos polares y apolares en modo de ionización positivo y negativo. Los espectros fueron tratados estadísticamente para evaluar las posibles diferencias en los perfiles metabólicos de cada grupo de estudio e identificar metabolitos específicos que pudieran servir como BM del CP.

**Variables y análisis estadístico:** las variables dependientes del análisis fueron los diferentes iones m/z (metabolitos) de los espectros de masas pertenecientes a las dos poblaciones de estudio (CP y EPOC). Dado el elevado número de metabolitos detectados los resultados obtenidos se procesaron estadísticamente mediante técnicas de análisis multivariante como el

análisis de componentes principales (PCA) y el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). Estas herramientas estadísticas se emplearon para la búsqueda de metabolitos diferenciadores entre los grupos con afectación pulmonar (CP y EPOC). Los metabolitos fueron identificados empleando bases de datos y espectrometría de masas en tándem a través de los correspondientes análisis MS-MS.

El estudio se realizó según los principios de la declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Juan Ramón Jiménez de Huelva.

**RESULTADOS**

1.- *Características clínicas de los pacientes:* las características clínicas de los pacientes se muestran en la **Tabla 2**.

2.- *Comparación de los perfiles metabólicos:* los espectros de masas resultantes del análisis por DI-ESI-QTOF-MS de las muestras de suero de del grupo CP se muestran en la **Figura 2**. Los espectros de masas de las muestras de suero de los pacientes con EPOC son similares a los del CP. Todos los espectros polares y apolares obtenidos en modo positivo y negativo fueron sometidos a análisis multivariante PCA para evaluar la distribución de las muestras y PLS-DA para clasificar a los grupos de estudio y buscar los metabolitos que provocan esta clasificación. La **Figura 3** representa los 2 análisis PLS-DA de la comparación entre CP y EPOC. En las gráficas PLS-DA cada punto representa a un sujeto (o la muestra de un sujeto) y la localización en la gráfica es consecuencia de su perfil metabólico global, específico y único de su espectrometría de masas. Las gráficas muestran una clara discriminación entre los distintos grupos de estudio.

3.- *Metabolitos causales de las diferencias encontradas entre perfiles:* el PLS-DA permitió determinar los metabolitos que causan la discriminación entre los grupos de estudio. Además permite reconocer si el metabolito alterado está sobre-expresado o inhibido en la enfermedad. Para la confirmación de la identidad de los metabolitos se emplearon técnicas de fragmentación MS-MS y bases de datos disponibles en la red como Metlin o HMDB. Así pues, se han podido identificar un total de 35 metabolitos alterados (**Tabla 3**) que sugieren la discriminación entre pacientes con EPOC (enfisema) y pacientes con CP, incluyendo aminoácidos, ácidos grasos, carnitinas y lisofosfolípidos.

4.- *Vías metabólicas:* para la evaluación de las rutas metabólicas afectadas por el CP se utilizó la herramienta MetaboAnalyst 3.0 disponible en Internet (www.metaboanalyst.com). Los datos evaluados fueron los metabolitos alterados en CP con respecto al grupo EPOC.

Los resultados mostraron la alteración de vías metabólicas claramente relacionadas con el cáncer de pulmón como el metabolismo de los glicerofosfolípidos, ciclo de Krebs, metabolismo de alanina, aspartato y glutamato, ciclo de la urea y metabolismo de la glicina, serina y treonina. Las vías metabólicas más alteradas se pueden apreciar en la **Figura 4**.

5.- *Curvas ROC:* la evaluación de la sensibilidad y especificidad de los metabolitos alterados en CP respecto a la población de riesgo de EPOC se llevó a cabo mediante la construcción de las curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*). Los resultados del área bajo la curva (AUC) son indicativos de la especificidad y sensibilidad del metabolito para la enfermedad. Un valor de AUC mayor a 0,7 es considerado de utilidad clínica. Nuestros resultados mostraron que 11 de los metabolitos alterados presentaron valores de AUC >0,70 (treonina, creatinina, ornitina, glutamato, fenilalanina, arginina, tirosina, pantoilcarnitina, ácido palmitoleico, LPC (18:2), LPC (18:1), LPC (20:4), que podrían utilizarse como BM de CP y considerarse relevantes en su progresión en una población de riesgo como pacientes diagnosticados de EPOC. La **Figura 5** muestra las curvas ROC de diferentes metabolitos alterados en CP con mejores resultados de AUC.

**Tabla 2.** Características clínicas de los pacientes.

Características	CP (n=30)	EPOC (n=30)
Edad (años)	67 ± 12	66 ± 9
Sexo (H/M)	25/5	25/5
<b>Histología</b>		
-CPNCP	26	
-CPCP	4	
<b>Estadaje</b>		
-II	8	
-III	8	
-IV	14	
<b>Bronquitis Crónica</b>		12
<b>Enfisema</b>		18
<b>Hábito de fumar fumador</b>		
-Fumadores	7	11
-Exfumadores	20	16
-No fumadores	3	3
<b>Comorbilidades</b>		
-HTA (%)	59	33
-Asma	6	3
-DM	25	17

CP: Cáncer de Pulmón. EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. CPNCP: Cáncer Pulmonar No Células Pequeñas. CPCP: Cáncer Pulmonar de Células Pequeñas. HTA: Hipertensión Arterial. DM: Diabetes Mellitus.

**Tabla 3.** Metabolitos alterados en suero de pacientes con cáncer de pulmón con respecto a pacientes EPOC.

Metabolitos	m/z	VIP	p_ANOVA	Extracto	Modo
Ácido acético	59.033	1,1	0,006	Polar	Negativo
Treonina	1.200.587	1,8	0,0002	Polar	Positivo
Ácido aspártico	132.015	1,6	0,002	Polar	Negativo
Creatina	1.320.911	1,6	0,0002	Polar	Positivo
Ornitina	1.331.057	1,6	0,0003	Polar	Positivo
Adenina	1.360.521	1,9	0,0012	Polar	Positivo
Glutamato	1.480.348	1,1	0,0002	Polar	Positivo
Carnitina	1.621.146	2	0,005	Polar	Positivo
Fenilalanina	1.660.905	2,1	0,0015	Polar	Positivo
Arginina	1.760.667	1,1	0,004	Apolar	Positivo
Tirosina	1.820.363	1,6	0,0006	Polar	Positivo
Acetil-carnitina	2.040.872	1,9	0,02	Apolar	Positivo
Propionil-carnitina	2.181.110	1,4	0,046	Apolar	Positivo
Ácido miristoléico	225.206	1,1	0,009	Polar	Negativo
Butiril-carnitina	2.321.453	1,8	0,026	Apolar	Positivo
Pentoil-carnitina	2.461.167	2,3	0,008	Polar	Positivo
Palmitoleic acid	253.004	1,3	0,02	Polar	Negativo
Hydroxipentoil-carnitina	2.642.364	1,6	0,0004	Polar	Positivo
Ácido oleico	281.236	1	0,002	Polar	Negativo
Glicerofosfolina	2.961.171	2	0,026	Apolar	Positivo
Glutati6n	3.081.507	1,6	0,004	Polar	Positivo
Ácido docohexaenoico	327.219	1,2	0,006	Polar	Negativo
LPC(18:2)	5.203.522	1,2	0,0002	Polar	Positivo
LPC(18:1)	5.223.623	1	0,0002	Polar	Positivo
LPC(20:4)	5.443.493	1,2	0,0005	Polar	Positivo
TAG(16:0/16:0/18:2)	9.488.061	1	0,026	Apolar	Positivo
TAG(18:3/18:2/18:2)	9.948.122	1,3	0,022	Apolar	Positivo
TAG(18:1/18:1/22:6)	10.487.861	1,3	0,029	Apolar	Positivo

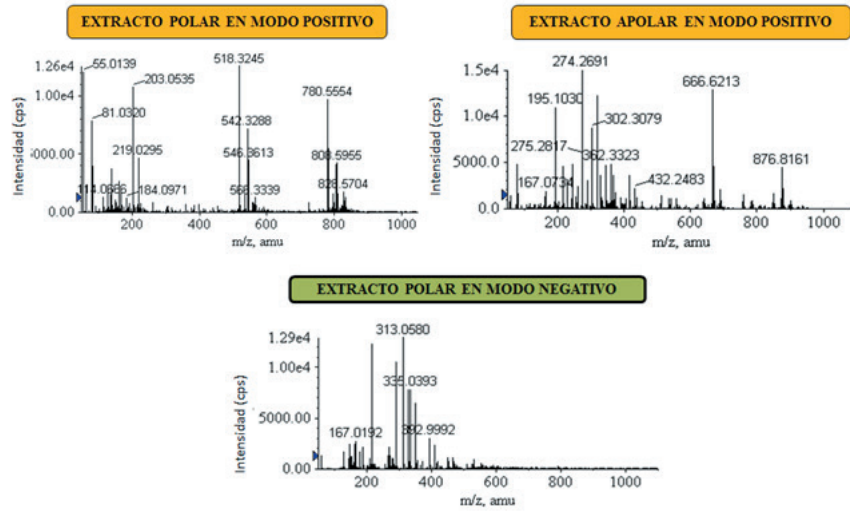
EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Cr6nica; m/z: masa/carga; VIP: parámetro relacionado con la importancia del metabolito en la clasificaci6n PLS-DA; valor p-ANOVA: valor significativo; Extracto: tipo de extracto (polar o apolar); Modo: modo de ionizaci6n (positivo y negativo); LPC: lisofosfolina; TAG: triacilglic6ridos.

**Tabla 4.** Comportamiento de los 11 metabolitos alterados en CP con respecto al grupo EPOC con valores AUC mayores a 0,7.

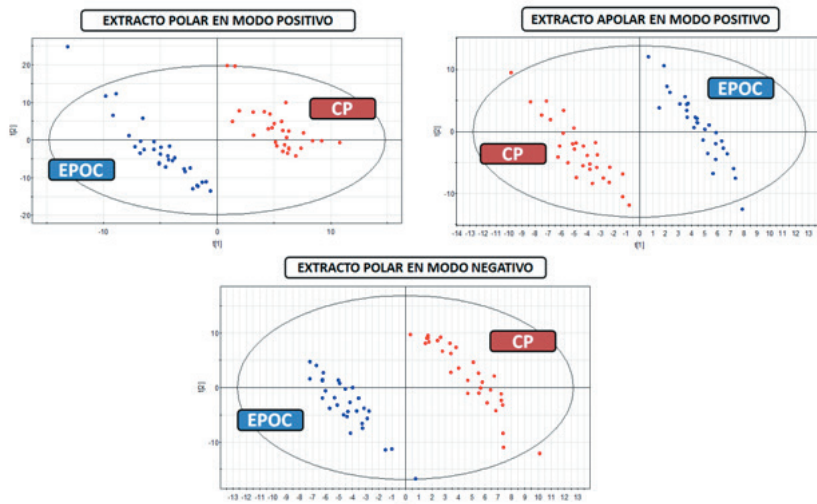
Metabolitos	FC	AUC	Comportamiento
<b>Aminoácidos:</b>			
Treonina	1,51	0,75	↑
Creatina	1,45	0,73	↑
Ornitina	1,42	0,76	↑
Glutamato	1,43	0,76	↑
Arginina	1,31	0,74	↑
Tirosina	0,61	0,75	↓
<b>Carnitinas:</b>			
Pentoil-carnitina	2,55	0,75	↑
Hydroxipentoil-carnitina	2,06	0,73	↑
<b>Lisofosfolípidos:</b>			
LPC(18:2)	0,69	0,72	↓
LPC(18:1)	0,69	0,78	↓
LPC(20:4)	0,65	0,72	↓

CP: Cáncer de pulm6n. EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Cr6nica. Fold Change: FC. AUC: Área Bajo de la Curva. Comportamiento: Relaci6n del cambio en los niveles de CP frente a los EPOC ( : Aumento; : Disminuci6n). LPC: Lisofosfolina.

**Figura 2.** Perfiles metabolómicos (espectrografía “tipo”) del grupo cáncer de pulmón para el extracto polar y apolar positivo y el extracto polar negativo.

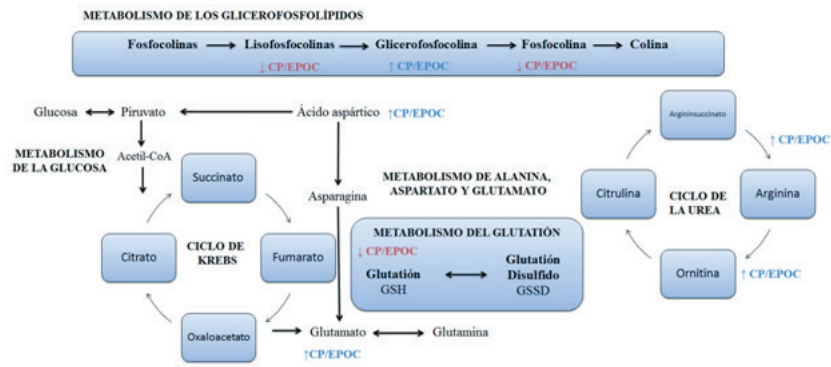


**Figura 3.** Gráficas PLS-DA, resultantes de la comparación CP y EPOC. Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), en extractos polares y apolares de muestras de suero de CP (puntos rojos) y EPOC (puntos azules).



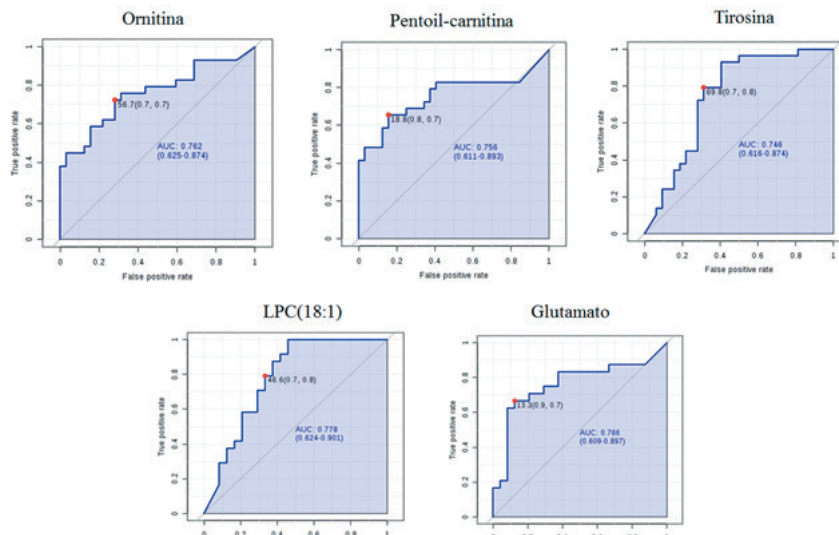
CP: Cáncer de Pulmón. EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.

Figura 4. Principales rutas metabólicas alteradas en CP respecto al grupo EPOC.



CP: Cáncer de Pulmón. EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.

Figura 5. Curvas ROC de los metabolitos con mejor valor AUC. (Ornitina, pentoil-carnitina, tirosina, LPC (18:1) y glutamato).



ROC: Receiver Operating Characteristic. AUC: Área Bajo la Curva. LPC: Lisofosfolina. True/ False positive rate: Tasa de Verdadero/ Falso positivos.

## DISCUSIÓN

En el estudio actual se ha realizado un enfoque metabólico para investigar metabolitos alterados en suero de pacientes con cáncer de pulmón y su relación metabólica con la EPOC, una enfermedad que se considera, especialmente el enfisema, factor de riesgo de desarrollo del CP. El hallazgo de posibles diferencias entre ambas entidades podría ayudar a “predecir” la aparición de un cáncer de pulmón en el seguimiento de una cohorte de pacientes con riesgo de padecer CP, como son los pacientes con enfisema, mediante estudios metabólicos.

Se identificaron 35 metabolitos alterados entre los

grupos CP y EPOC (Tabla 3), incluyendo aminoácidos, ácidos grasos, carnitinas y lisofosfolípidos. De todos ellos, 11 metabolitos presentaron valores de AUC mayores a 0,7 (treonina, creatinina, ornitina, glutamato, fenilalanina, arginina, tirosina, pentoilcarnitina, ácido palmítico, LPC (18:2), LPC (18:1), LPC (20:4), pudiendo ser posibles BM de utilidad clínica en el CP. Por otra parte, el análisis de rutas metabólicas mostró el metabolismo de la alanina, aspartato y glutamina como el más afectado en el CP.

Algunos autores han demostrado el papel importante de los aminoácidos en la carcinogénesis<sup>20,21</sup>. Sin embargo, es difícil establecer si los cambios de los aminoácidos están



directamente relacionados con la detección de CP o son marcadores del estado nutricional, porque la desnutrición y la caquexia son otros factores que afectan a los perfiles de aminoácidos en pacientes con cáncer. En nuestro estudio hemos encontrado niveles elevados de glutamato y treonina en pacientes con CP, el primero se considera un aminoácido importante relacionado con el metabolismo energético y podría explicar los altos niveles séricos de glutamato en el grupo CP<sup>22</sup>. Estos resultados concuerdan con los de otros autores<sup>23</sup>. La alteración en treonina podría reflejar la regulación positiva del metabolismo de la glicina, la serina y la treonina que se han descrito como característica metabólica de las células iniciadoras de tumores de CPNCP<sup>24</sup>. Se han encontrado niveles bajos de tirosina en el grupo CP<sup>25</sup> en el suero del CPNCP en estadio temprano. La disminución de aminoácidos puede estar relacionada con la alta demanda de estos metabolitos durante el desarrollo del tumor. El aumento de carnitina y acilcarnitinas encontrado por algunos autores<sup>24</sup> en pacientes con CP sugiere un aumento en la demanda de energía.

Los fosfolípidos y lisofosfolípidos son componentes principales de las membranas celulares involucradas en muchas funciones biológicas y sus niveles están elevados en varios tipos de cáncer<sup>26</sup>. Sin embargo, nuestro estudio mostró la disminución de LPC (18:2), LPC (18:1) y LPC (20:4) en los pacientes de CP con respecto al grupo EPOC. Por otra parte, el aumento de los triacilglicéridos TAG (16:0/16:0/18:2), TAG (18:3/18:2/18:2) y TAG (18:1/18:1/22:6) sugirió alteraciones en el metabolismo de los glicerofosfolípidos.

Escasos trabajos han estudiado la relación metabólica entre el CP y la EPOC<sup>22</sup> por lo que existen pocas evidencias metabólicas entre ambas enfermedades. Un metabolito que informa sobre el daño oxidativo causado por una enfermedad es el glutatión. Nuestros resultados mostraron la disminución del glutatión en CP con respecto al grupo EPOC. El glutatión desempeña un papel importante en muchos procesos celulares, incluida la diferenciación celular, la proliferación y la apoptosis, y como resultado, las alteraciones en la homeostasis del glutatión están implicadas en la progresión de una serie de enfermedades humanas como el CP y la EPOC<sup>27</sup>. Debido a la continua proliferación de células cancerosas, se ha demostrado que el agotamiento de glutatión induce o potencia la apoptosis.

Además, la comparación entre enfermedades mostró una disminución significativa en el CP de fenilalanina y tirosina<sup>25</sup>. Algunos autores han encontrado niveles bajos

de fenilalanina en pacientes con CP (28) y niveles altos en EPOC<sup>29</sup>.

Por otra parte, la alteración del ácido oleico y el palmitoleico en CP indicó perturbaciones en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos. La  $\beta$ -oxidación desempeña un papel fundamental en la proliferación, migración e invasión de las células cancerosas. La desregulación del metabolismo de los ácidos grasos se reconoce como una transformación maligna en muchos cánceres diferentes<sup>30</sup> y su aumento de la síntesis se ha observado en una multitud de cánceres y está fuertemente correlacionado con un mal pronóstico en muchos casos. Por otro lado, otros autores han encontrado niveles aumentados de ácido oleico y palmitoleico en mujeres con EPOC.

Así pues, las diferencias metabolómicas encontradas entre el CP y la EPOC podrían ayudar a predecir la aparición del CP en el seguimiento de una cohorte de pacientes con riesgo de padecer esta enfermedad, como son los pacientes con enfisema.

Finalmente quisiéramos reseñar que diversos estudios han aportado posibles biomarcadores metabolómicos de cáncer de pulmón. Las técnicas metabolómicas utilizadas han sido diversas (espectrometría de masas, cromatografía, RNM...) y los metabolitos obtenidos, aunque muchos de ellos son similares, no concuerdan en su totalidad. Pensamos que la metodología BIG DATA podría ser un instrumento fundamental para integrar los resultados.

Los datos integrados y analizados por BIG DATA de biomarcadores convencionales y los detectados por las nuevas técnicas ómicas (genómica, transcriptómica, proteómica, metalómica y metabolómica) mejorarán claramente la capacidad de detección precoz de CP y su aplicación en los estudios de screening.

**Limitaciones:** aunque el tamaño muestral (30 pacientes con CP y 30 EPOC) podría parecer escaso, para los estudios metabolómicos es suficiente para conseguir el objetivo planteado: seleccionar BM para diferenciar entre ambos grupos. De todas formas, pensamos validar nuestros resultados en un tamaño muestral superior (Beca Neumosur 2018 y Beca SEPAR 2018). A pesar de la protocolización del proyecto y de los análisis parciales para evitar sesgos (controles por edad, sexo, tabaquismo, enfermedades previas, fármacos,...) hay otros posibles factores (dieta, peso...) que pueden influir en el perfil metabolómico y en metabolitos específicos y que son muy difíciles de controlar. De todas formas, como hemos

indicado, los resultados se podrán validar en estudios futuros planteados por nuestro grupo.

## CONCLUSIONES

En este trabajo se ha realizado el estudio metabolómico de muestras de suero de 60 pacientes (30 con CP y 30 con EPOC), con el objetivo de encontrar metabolitos alterados en CP capaz de servir como BM precoces de la enfermedad en poblaciones de riesgo como son los pacientes con EPOC. Para ello se ha desarrollado una metodología basada en la espectrometría de masas de alta resolución (DI-ESI-QTOF-MS) que ha permitido la clasificación de los grupos de estudio CP y EPOC mediante el análisis PLS-DA y la identificación de 35 metabolitos alterados en CP. El análisis de las curvas ROC de los 35 metabolitos alterados mostró que 11 de ellos presentaban valores de AUC >0,7 (treonina, creatinina, ornitina, glutamato, fenilalanina, arginina, tirosina, pantoilcarnitina, ácido palmitoleico, LPC (18:2), LPC (18:1) y LPC (20:4) Así pues, estos 11 metabolitos podrían servir como BM de diagnóstico precoz o seguimiento del CP en poblaciones susceptibles de desarrollar esta enfermedad, como son los pacientes con enfisema.

## AGRADECIMIENTOS

A Antonio Pereira González por su ayuda en la redacción del artículo, base de su trabajo fin de grado (TFG). Los autores agradecen su contribución a las BECAS NEUMOSUR 2015.9, Beca SEPAR 091/2016, Beca del Ministerio de Economía de España (CTM-2015-67902-C2-1-P), Beca de la Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Tecnología de la Junta de Andalucía P12-FQM-0442, Beca predoctoral del Ministerio de Educación FPU13/03615 y la Beca FEDER (UNHU13-1E-1611 y UNHU 15-CE-3140).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Parker, Mark S. Lung Cancer Epidemiology. Lung Cancer Screening. 2018. Pag 1-5. ISBN 978-1-62623-513-7.
2. Nagasaka M, Lehman A, Chlebowski R et al. COPD and lung cancer incidence in the Women's Health Initiative Observational Study: A brief report. Lung Cancer 2020; 141: 78-81.
3. 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.
4. González J y de Torres JP. Cáncer de pulmón y enfisema. Archivos de Bronconeumología 2017; 53b (2): 47-48.
5. Seijo LM, de Torres JP, Lozano MD et al. Diagnostic Yield of Electromagnetic Navigation Bronchoscopy Is Highly Dependent on the Presence of a Bronchus Sign on CT Imaging. Results From a Prospective Study. Chest 2010; 138(6): 1.316-132
6. The National Lung Screening Trial Research Team. Reduced lung cancer mortality with low-dose computed tomography screening. New Engl J Med. 2011; 365: 395-409.
7. The National Lung Screening Trial Research Team (NLST). Lung Cancer Incidence and Mortality with Extended Follow-up in the National Lung Screening Trial. Journal of Thoracic Oncology. October 2019; 14(10): 1.732-1.742.
8. Ruano-Ravina A, Pérez-Ríos M, Casan Clará P et al. Low-dose CT for lung cancer screening. Lancet Oncology 2018; 19:132-133.
9. Hammoudi N, Ahmed KB, García-Prieto C et al. Metabolic alterations in cancer cells and therapeutic implications. Chin J Cancer. 2011; 30 (8): 508-525.
10. Callejón-Leblic B, García-Barrera T, Grávalos-Guzmán J et al. Metabolomic Profiling of Potential Lung Cancer Biomarkers using Bronchoalveolar Lavage Fluid and the integrated Direct Infusion / Gas Chromatography mass Spectrometry Platform. Journal of Proteomic 2016; 145: 197-206.
11. Cameron, S. Lewis, K. E. Beckmann, M et al. The metabolomic detection of lung cancer biomarkers in sputum. Lung Cancer 2016; 94: 88-95.
12. Yin P, Peter A, Franken H et al. Preanalytical Aspects and Sample Quality Assessment in Metabolomics Studies of Human Blood. Clinical Chemistry 2013; 59(5): 833-845.
13. Matsumura K, Opiekun M, Oka H et al. Urinary Volatile Compounds as Biomarkers for Lung Cancer: A Proof of Principle Study Using Odor Signatures in Mouse Models of Lung Cancer. PLoS ONE 2010; 27(5): e8819. doi:10.1371/journal.pone.0008819.
14. Brown MV, McDunn JE, Smith EM et al. Cancer detection and biopsy classification using concurrent histopathological and metabolomic analysis of core biopsies. Genome Medicine 2012; 4: 33.

15. Callejón Leblic B, García-Barrera T, Pereira-Vega A et al. 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* 2019; 163: 122-129.
16. Calderón-Santiago M, Priego-Capote F, Turck Net al. Human sweat metabolomics for lung cancer screening. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2015; 407: 5.381–5.392.
17. Chen X, Xu F, Wang Yet al. A study of the volatile organic compounds exhaled by lung cancer cells in Vitro for breath diagnosis. *Cancer* 2007; 110: 835–844.
18. Callejón-Leblic B, Pereira-Vega A, Vázquez-Gandullo E et al. Study of the metabolomic relationship between lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease based on direct infusion mass spectrometry. *Biochimie* 2019; 157: 111-122.
19. Bruce SJ, Antti PH, Cloarec O et al. Evaluation of a protocol for metabolic profiling studies on human blood plasma by combined ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry: From extraction to data analysis. *Analytical Biochemistry* 2008; 372 (2): 237-249.
20. Klupczynska, P. Derezi nski, W. Dyszkiewicz, K et al. Evaluation of serum amino acid profiles' utility in non-small cell lung cancer detection in Polish population, *Lung Canc.* 2016;100;71-76.
21. J. Ni, L. Xu, W. Li et al. Simultaneous determination of thirteen kinds of amino acid and eight kinds of acylcarnitine in human serum by LcMS/MS and its application to measure the serum concentration of lung cancer patients, *Biomed. Chromatogr.* 2016; 30; 1.796-1.806.
22. L. Puchades-Carrasco, E. Jantus-Lewintre, C. P erez-Rambla et al. Serum metabolomic profiling facilitates the noninvasive identification of metabolic biomarkers associated with the onset and progression of non-small cell lung cancer, *Oncotarget* 2016; 7; 12.904-12.916,
23. J.-M. Hu, H.-T. Sun, Serum proton NMR metabolomics analysis of human lung cancer following microwave ablation, *Radiat Oncol* 2018; 12; 13(1): 40. doi: 10.1186/s13014-018-0982-5.
24. W.C. Zhang, S.-C. Ng, H. Yang et al. Glycine decarboxylase activity drives non-small cell lung cancer tumor-initiating cells and tumorigenesis, *Cell* 2012; 148; 259-272.
25. A. Klupczynska, P. Derezi nski, T.J. Garrett et al. Study of early stage non-small-cell lung cancer using Orbitrap-based global serum metabolomics, *J. Canc. Res. Clin. Oncol.* 2017; 143; 649-659.
26. T.A. Lagace, N.D. Ridgway. The role of phospholipids in the biological activity and structure of the endoplasmic reticulum, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 2013: 1.833; 2.499-2.510.
27. N. Ballatori, S.M. Krance, S. Notenboom et al. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases, *Biol. Chem.* 2009; 390; 191-214.
28. Y. Chen, Z. Ma, A. Li 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. Canc. Res. Clin. Oncol.* 2015: 141; 705-718.
29. S. Deja, I. Porebska, A. Kowal et al. Metabolomics provide new insights on lung cancer staging and discrimination from chronic obstructive pulmonary disease, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 2014: 100; 369-380.
30. M.E. Monaco, Fatty acid metabolism in breast cancer subtypes, *Oncotarget* 2017; 8; 29.487-29.500.