ESTUDIO METABOLÓMICO EN EL SUDOR. APORTACIÓN DIAGNÓSTICA EN EL CÁNCER DE PULMÓN

B. Jurado Gámez[1, 2], M. Calderón Santiago[3], A. Salvatierra Velázquez[2, 4], L. Caballero Ballesteros[2], A. Alvárez Kindelán[2, 4], M. Arenas de Larriva[1, 2], F. Priego Capote[2, 3], M.D. Luque de Castro[2, 3].

[1]Servicio de Neumología. Hospital Universitario Reina Sofía. IMIBIC. Universidad de Córdoba. [2]Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC). [3]Departamento de Química Analítica. Universidad de Córdoba. [4]Servicio de Cirugía Torácica y Trasplante Pulmonar. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba.

Proyecto de Investigación financiado por Fundación Neumosur 20/2011.

Resumen

Objetivos: detectar si existen compuestos en el sudor con potencialidad diagnóstica en el cáncer de pulmón (CP).

Métodos: estudio observacional, de cohortes, realizado en un Hospital Universitario. Los sujetos fueron adscritos a grupo con CP, grupo sin CP y sin factor de riesgo (no fumadores) y grupo sin CP y con factor de riesgo (consumo > 20 paquetes/año). Fueron excluidos sujetos > 80 años, existencia de enfermedad grave de órgano, neoplasia extrapulmonar o tratamiento previo con citostáticos.

La muestra de sudor se conservó a –80 ºC. Para su análisis se trasvasó cuantitativamente a viales del automuestreador para extracción en fase sólida y retener los componentes de interés. Tras eliminar la matriz de la muestra, los compuestos se eluyeron al instrumento analítico, utilizando la fase móvil cromatográfica. En esta etapa se aplicó el diseño quimiométrico más adecuado en cada caso.

Resultados: se incluyeron 96 sujetos. Con las muestras de sudor de cada uno de los 3 subgrupos se formó un pool, que se inyectó 10 veces consecutivas en el cromatógrafo de líquidos acoplado al espectrómetro de masas en tandem (LC-MS/MS). Se observó discriminación entre los tres subgrupos mediante el análisis por componentes principales del perfil de metabolitos detectado por LC-MS/MS y demostró la capacidad para clasificar los pacientes con CP de los individuos control, con y sin factor de riesgo.

Conclusión: el estudio del sudor abre un campo de investigación novedoso y con importante aplicabilidad clínica, ya que este modelo podría convertirse en una herramienta diagnóstica no invasiva en el CP.

Palabras clave: cáncer de pulmón; metabolómica, sudor.

METABOLOMIC STUDY ON THE SWEAT. DIAGNOSTIC CONTRIBUTION IN LUNG CANCER

Abstract

Aims: to detect the presence of sweat compounds with potential diagnostic of lung cancer (LC).

Methods: observational cohort study in a University Hospital. The participants were assigned in a group with LC, a group without LC and without risk factor (non-smoking) and a group without LC and with risk factor (tobacco consumption > 20 package/year). The subjects > 80 years old, severe lung organ disease, extrapulmonary neoplasia or cytostatic pre-treatment were excluded.

The sweat sample was stored at -80ºC. For analysis, it was transferred into autosampler vials for solid phased extraction (SPE) in order to keep the interesting compounds. After removing the sample matrix, the compounds were eluted to the analytical instrument using the chromatographic mobile phase. At this stage, the most suitable chemometric design was applied in each case.

Results: the population consisted of 96 subjects. A pool establish by the three subgroups sweat samples was injected ten times and row in the liquid chromatograph coupled to mass spectrometer (LC-MS/MS).

In was noticed a discrimination between the three subgroups by analyzing the main compounds in metabolite profile, detected by LC-MS/MS. This proved the ability to distinguish patients with LC from control subjects with and without risk factor.

Conclusions: the sweat study open up a novel research field with an important clinical relevance, because this model could become a non invasive diagnostic tool in the LC.

Key words: lung cancer; metabolomics; sweat.

Recibido: 12 de marzo de 2014. Aceptado: 19 de septiembre de 2014.

Bernabé Jurado Gámez
b.jurado.gamez.@neumosur.net

INTRODUCCIÓN

A escala mundial, el cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por neoplasia en el hombre y está aumentando significativamente entre las mujeres, de tal forma que, actualmente, es la cuarta causa de mortalidad por neoplasia[1, 2]. A pesar de los avances en el diagnóstico y en el tratamiento quirúrgico y quimioterápico, la supervivencia a los 5 años continúa siendo muy baja[3]. Desgraciadamente, el diagnóstico se realiza en estadios avanzados y la resección quirúrgica sólo es posible en un porcentaje bajo de casos[4].

Hasta la fecha, hay poca evidencia de la utilidad del cribado diagnóstico para reducir la mortalidad. El esputo y la radiografía de tórax no han logrado disminuirla[5]. No obstante, recientemente se ha comparado, en una muestra amplia de personas con riesgo de padecer cáncer de pulmón, una técnica de cribado mediante tomografía axial computerizada (TAC), de baja radiación frente a la radiografía de tórax[6]. El estudio aportó una reducción en la mortalidad relativa por cáncer de pulmón del 20% en el grupo en el que se realizó la TAC. Sin embargo, la tasa de lesiones sugestivas de malignidad y los falsos positivos son elevados y, además, el coste anual del programa es muy alto y no exento de posibles efectos secundarios debidos a la radiación. Por tanto, es razonable la investigación en otras áreas y, en los últimos años, el estudio de muestras biológicas de carácter no invasivo tiene un fuerte desarrollo. En esta línea, se ha descrito la detección de compuestos orgánicos volátiles liberados por enfermos de cáncer en el concentrado del aire exhalado. Un estudio publicado en 2006 mostró el uso de perros entrenados para la detección en estadios muy tempranos de cáncer de pulmón y de mama[7], con una elevada especificidad y sensibilidad. Sin embargo, aunque el sudor se utiliza desde hace muchos años para el diagnóstico de la fibrosis quística[8], no se han realizado otros avances en patología respiratoria utilizando esta muestra. En el área de las disciplinas conocidas genéricamente como "ómicas", existe un interés creciente por muestras biológicas obtenidas de forma no invasiva, y la metabolómica es la más apropiada para el estudio de los compuestos excretados en el sudor. La mejora constante de la instrumentación analítica y el desarrollo de métodos basados en ellas han posibilitado la identificación y cuantificación de compuestos en muy baja concentración. En base a estos antecedentes, en el presente trabajo se postula que en el sudor se pueden detectar compuestos con potencialidad diagnóstica en el cáncer de pulmón.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se diseñó un estudio observacional, de primera aproximación, realizado en el Hospital Universitario Reina Sofía y en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba.

La población la constituyeron 96 sujetos, que fueron estudiados para valorar, en una primera aproximación, la validez del sudor como muestra con potencial contenido de biomarcadores de cáncer de pulmón. Con la finalidad de establecer los criterios de inclusión y exclusión, a los sujetos se les realizó una historia clínica, examen físico completo y las exploraciones complementarias para descartar o confirmar la existencia de cáncer de pulmón. La inclusión en el grupo de sujetos sin cáncer de pulmón y nunca fumadores requirió la ausencia de síntomas sugestivos de proceso neoplásico y una radiografía de tórax sin hallazgos patológicos. La inclusión en el grupo sin cáncer de pulmón y con factor de riesgo (consumo de tabaco > 20 paquetes/año) exigió que el sujeto estuviese en estabilidad clínica, sin sintomatología sugestiva de proceso neoplásico ni lesiones sospechosas de malignidad en la radiografía de tórax. Se consideró ausencia de síntomas sugestivos de malignidad, alguno de los siguientes:

1. Expectoración hemoptoica.
2. Tos de nueva aparición o cambio en sus características
3. Dolor torácico de > 4 semanas de evolución; aparición de disnea o aumento significativo de la misma.
4. Pérdida no explicada de peso > 5% del peso total en los últimos 3 meses.

Si se observaron algunos de estos síntomas o anormalidades en la radiografía, se efectuó tomografía axial computerizada TAC y/o fibrobroncoscopia, cuyo resultado fue negativo para cáncer de pulmón. En estos dos grupos sin cáncer de pulmón se realizó un seguimiento clínico de 1 año, para comprobar que no hubo cambio clínico ni radiológico. En el grupo con cáncer de pulmón, se realizaron las exploraciones necesarias para concluir con un diagnóstico inequívoco de cáncer de pulmón. Estas incluyeron: fibrobroncoscopia, punción aspiración con aguja, mediastinoscopia (cuando estuvo indicado), tomografía de emisión de positrones (PET) y PET-TAC. Fueron excluidos pacientes con edad superior a 80 años, coexistencia de neoplasia extrapulmonar o tratamiento con citostáticos en los últimos 5 años, enfermedad grave de órgano con repercusión negativa en el pronóstico incluyendo: insuficiencia cardíaca grado IV de la

NYHA, hepatopatía crónica avanzada (estadio funcional MELD >12) e insuficiencia renal estadio 5 en tratamiento sustitutivo (hemodiálisis o diálisis peritoneal).

Tras concluir el estudio clínico, según se ha explicado anteriormente, se clasificaron los sujetos en uno de los tres grupos siguientes; grupo con cáncer de pulmón, grupo sin cáncer de pulmón y sin factor de riesgo y grupo sin cáncer de pulmón y con factor de riesgo.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético y de Investigación de Córdoba y todos los individuos firmaron el consentimiento informado para participar en el estudio.

Recogida y procesamiento del sudor: la estimulación de la sudoración se realizó por métodos electroquímicos basados en la técnica de Gibson y Cooke[8]. La recolección se llevó a cabo mediante el sistema Macroduct®. La muestra de sudor se conservó a –80ºC hasta su análisis.

Tras descongelar la muestra, se trasvasó cuantitativamente a viales del automuestreador de un sistema automático de extracción en fase sólida, para retener los componentes de interés utilizando el sorbente adecuado: polar o no polar, dependiendo de la naturaleza de los analitos. Para detectar las moléculas en el espectrómetro de masas, se procedió a ionizarla aplicando un voltaje para que, en función de la ionización, la molécula adquiriera una carga positiva o negativa. Dado que hay compuestos con mayor facilidad para ionizarse en positivo y otros en modo negativo, las muestras fueron analizadas en ambas polaridades.

Una vez retenidos y eliminada la matriz de la muestra, los compuestos se eluyeron directamente al instrumento analítico, utilizando la fase móvil cromatográfica para arrastrarlos de forma cuantitativa. Cada familia de compuestos se eluyó al instrumento adecuado. La optimización de esta etapa (sorbentes, naturaleza y volumen de la disolución de lavado y naturaleza y volumen del eluyente) se realizó mediante el diseño quimiométrico más adecuado en cada caso[9, 10].

Análisis estadístico: se describen los datos utilizando medias y desviaciones estándar y, en su caso, mediana y rango intercuartílico para variables continuas, mientras que las variables categóricas se expresan como frecuencias y porcentajes. La comparación de variables continuas entre los tres grupos se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Todas las comparaciones realizadas fueron bilaterales, considerando valores estadísticamente significativos una $p < 0,05$.

RESULTADOS

Se incluyeron 96 sujetos, con una edad media de 59 ± 10 años, de los cuales 25 eran mujeres y 71 hombres, sin observarse diferencias entre grupos (tabla 1), excepción hecha de la edad entre el grupo con cáncer de pulmón y el grupo sin factor de riesgo para cáncer de pulmón ($p = 0,018$).

La estirpe histológica de los 41 casos de cáncer de pulmón fueron en 7 de ellos un carcinoma microcítico, en 21 sujetos un carcinoma escamoso, en 8 un adenocarcinoma, en 2 casos un carcinoma de células grandes y en 3 sujetos fue posible establecer el diagnóstico de malignidad, aunque sin establecer con seguridad la estirpe histológica. La recogida de la muestra de sudor se efectuó en la etapa clínica del diagnóstico, por tanto, en ningún caso se administró tratamiento citostático y la medicación fue para el control de los síntomas, ocasionalmente paracetamol o codeina, o bien fármacos por patología concomitante, caso de estatinas, antihipertensivos, etc, sin observar diferencias en ambos grupos.

Las muestras de los 96 invididuos se emplearon para hacer un pool de cada grupo, de forma que los componentes metabólicos debidos al individuo queden diluidos y no influyan en el estudio global de los perfiles. A continuación, cada pool se inyectó 10 veces consecutivas en el cromatógrafo de líquidos acoplado al espectrómetro de masas, usando el automuestreador del que dispone.

En la figura 1 se observa discriminación entre los tres grupos considerados en este estudio mediante la técnica de análisis por componentes principales (PCA). Esta es utilizada para reducir la dimensionalidad de los datos del perfil de metabolitos detectado por cromatografía de líquidos, acoplada a espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS) en modo de ionización negativo. Así, los individuos diagnosticados con cáncer aparecen a la derecha de la gráfica bidimensional, mientras que los otros dos grupos de invididuos que componen la población control se separan a lo largo de la componente 2 (PC2). Por tanto, la variabilidad asociada al diagnóstico de cáncer de pulmón está recogida en la componente 1 (PC1), que representa un 28,2% de la variabilidad total, mientras que la diferenciación entre los dos grupos de individuos control y, por tanto, asociada al hábito de fumar, se recoge en la PC2, que explica un 17,4% de la variabilidad total. Es, por tanto, evidente que existe una discriminación entre individuos en base al diagnóstico del cáncer de pulmón entre sanos y enfermos y que se identifica como la principal fuente de variabilidad en la población estudiada.

La figura 2 muestra el mismo tipo de estudio, pero

utilizando LC–MS/MS en modo de ionización positivo. El hecho de utilizar dos modos de ionización en espectrometría de masas, viene justificado por obtener información complementaria, debido a la existencia de metabolitos que se detectan mejor con ionización positiva o con ionización negativa y permite maximizar el número de metabolitos detectados en sudor y obtener una visión más completa del metaboloma de sudor. Como puede observarse en este nuevo análisis PCA también se discrimina entre individuos con cáncer de pulmón e individuos control, aunque en este caso la separación entre ambos grupos de individuos control, fumadores y no fumadores, es más clara que en el caso de ionización negativa.

Tabla 1: Características demográficas de los grupos estudiados. Datos expresados en media y desviación estándar.

Variables	Grupo con cáncer de pulmón (n = 41)	Grupo con factor de riesgo (n = 24)	Grupo sin factor de riesgo (n = 31)	p
Edad, años	62 ± 10,9	56 ± 11,8	54 ± 7,3	NS *
Hombres, %	78 %	70 %	70 %	NS
IMC, (kg/m²)	27 ± 4,3	28 ± 3,7	27 ± 4,5	NS
EPOC, %	34%	37%	0	NS **

IMC: índice de masa corporal. * El análisis post hoc mostró diferencias significativas en la edad de los pacientes con cáncer y el grupo control sin factor de riesgo y ** entre grupos con cáncer de pulmón y con factor de riesgo, respecto al grupo sin factor de riesgo ($p < 0,05$).

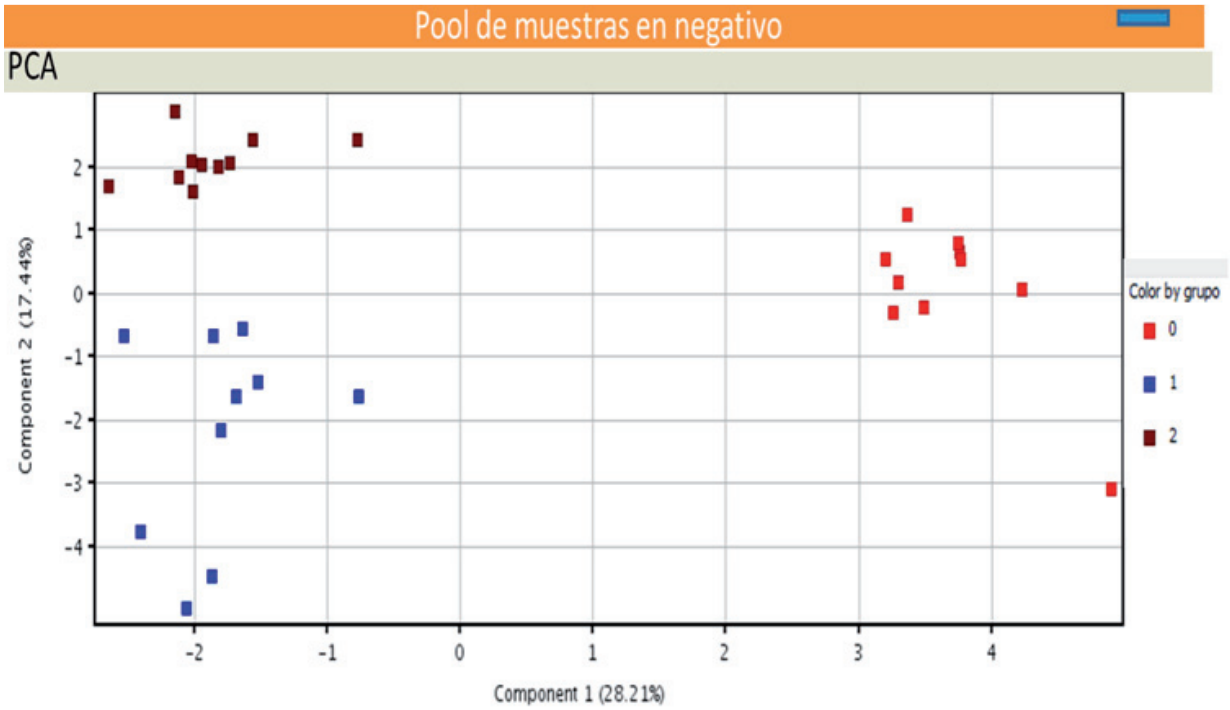

Figura 1. Análisis por componentes principales (PCA) del perfil de metabolitos detectado en modo de ionización negativo en las muestras de sudor.

Código de color:
Rojo (individuos con cáncer de pulmón);
marrón (individuos sanos y no fumadores);
azul (individuos sanos y fumadores)

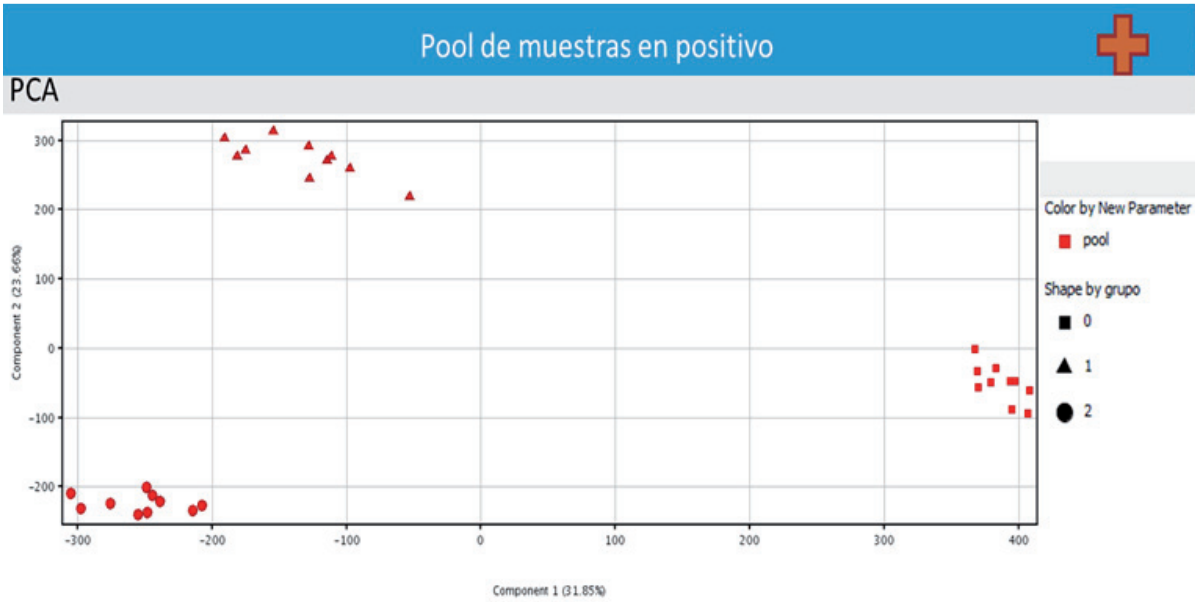

Figura 2. Análisis por componentes principales (PCA) del perfil de metabolitos detectado en modo de ionización positivo en las muestras de sudor.

Símbolos:
Cuadrado (individuos con cáncer de pulmón);
triángulo (individuos sanos y fumadores);
círculo (individuos sanos y fumadores).

DISCUSIÓN

El presente estudio expone la potencialidad en la estrategia global del manejo del cáncer de pulmón que tiene el estudio metabolómico del sudor. Este hallazgo es novedoso y relevante desde el punto de vista clínico, ya que demuestra la validez del estudio metabolómico del sudor y la posible aplicación futura en el cribado del cáncer de pulmón.

En España, en una revisión sobre la mortalidad por cáncer, la tendencia mostró que el CP continua siendo la primera causa de muerte en la población masculina y la tendencia es ascendente en la población femenina[3]. Igualmente, en Europa, la supervivencia global a los 5 años, expresada en tasas absolutas, se encuentra aún por debajo del 15%[1, 2]. No obstante, la tasa de supervivencia relativa a los 5 años varía notablemente, según el estadio en el momento del diagnóstico[11], siendo de 49%, 16% y 2% para los pacientes con enfermedad en estadio local, regional y a distancia, respectivamente[12]. El estudio Epicli-CP-2003 mostró que únicamente al 14,8% de todos los pacientes diagnosticados se les puedo realizar resección quirúrgica[4]. También es reflejo del retraso diagnóstico el hecho de que, en un 29,8% de los pacientes con cáncer de pulmón, el tratamiento únicamente fue paliativo[13].

El diagnóstico precoz del cáncer de pulmón es la mejor estrategia para aumentar la supervivencia. Los programas de cribado han demostrado su validez en el cáncer de mama, próstata y cáncer de colon, con aplicación de test clínicos capaces de detectar precozmente la enfermedad[14]. Uno de los problemas del cribado ha sido la falta de efectividad de los programas basados en análisis del esputo y radiografía de tórax[15]. Sin embargo, en los últimos años, se han aportado avances significativos con la TAC de baja radiación. En un estudio multicéntrico, se ha demostrado disminución de la mortalidad mediante TAC seriados frente a control radiográfico[6]. No obstante, la población diana es muy elevada, por lo que un programa de detección anual con TAC sería muy costoso y difícilmente sostenible. En consecuencia, es previsible que en el futuro sea necesario seleccionar la muestra a la que pueda aplicarse estás técnicas de imagen. En este aspecto, en base a los resultados de nuestro estudio, se puede establecer que existen diferencias en la composición y niveles de metabolitos detectados en sudor entre individuos con o sin cáncer de pulmón. El diagnóstico del cáncer de pulmón se identi-

fica como la principal fuente de variabilidad presente en la población en estudio, descartándose el hábito de fumar como origen de la misma, puesto que los individuos control sin cáncer de pulmón, no fumadores y fumadores, también fueron separados de los individuos con cáncer de pulmón por el mismo componente principal (PC1). Estas diferencias a nivel de metabolismo suponen un aspecto de interés para el desarrollo de una herramienta que permita establecer y validar un modelo de discriminación de individuos con cáncer de pulmón.

No obstante, hay que tener en cuenta que nuestros resultados son aplicables a nuestra población y en el futuro conviene validar estos datos en una muestra de sujetos más amplia. Por otra parte, como se expresa en resultados, el tratamiento de los pacientes fue sintomático, ocasionalmente analgésicos y antitusígenos, y no está demostrado que estos fármacos tengan una vía de excreción a través del sudor ni se identificaron en el análisis metabolómico compuestos específicos relacionados con ellos. Por tanto, debemos reseñar que la posibilidad de que pudieran influir en el resultado es muy improbable.

El sudor ha sido utilizado para el diagnóstico de fibrosis quística desde hace años, aunque en nuestro conocimiento ningún grupo ha aportado resultados en cáncer de pulmón que permitirán abrir un campo novedoso en la investigación con importante aplicabilidad clínica. De tal forma, que este modelo podría convertirse en una herramienta de indudable ayuda en el diagnóstico de esta enfermedad Así, el desarrollo de una herramienta de análisis metabolómico podría mejorar la capacidad de predicción de las herramientas de diagnóstico actuales que, por su carácter invasivo, coste y complejidad, no pueden ser aplicadas en el cribado de toda la población en riesgo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Debevec L, Debeljak A. Outcomes of unselected routinely lung cancer patients. Lung Cancer 2008; 59: 140–1.
2. Verdecchia A, Francisci S, Brenner H et al; EUROCARE-4 Working Group. Recent cancer survival in Europe: a 2000-02 period analysis of EUROCARE-4 data. Lancet Oncol 2007; 8: 784–96.
3. Cabanes A, Vidal E, Aragonés N et al. Cancer mortality trends in Spain: 1980-2007. Ann Oncol 2010; 21 (Suppl 3): 14-20.
4. Sánchez de Cos J, Miravet L, Abal J et al. The Epicli CP-2003 study: A multicenter epidemiological and clinical study of lung cancer in Spain. Arch Bronconeumol 2006; 42: 446–52.
5. 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.
6. Aberle DR, Adams AM, Berg CD et al. National Lung Screening Trial Research Team. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. N Eng J Med 2011; 365: 395-409.
7. McCulloch M, Jezierski T, Broffman M et al. Diagnostic accuracy of canine scent detection in early- and late-stage lung and breast cancers. Integr Cancer Ther 2006; 5: 30–9.
8. Barrio MI, García G, Gartner S; Grupo de Trabajo de Fibrosis Quística. Protocol for the diagnosis and follow up of patients with cystic fibrosis. An Pediatr 2009; 71: 250-64.
9. Ferreiro C, Mata JM, Priego F et al. Automated method for targeting analysis of prostanoids in human serum by on-line solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry in selected reaction monitoring. J Chromatogr A 2011; 1218: 2848-55.
10. León Z, Ferreiro C, Priego F et al. Targeting metabolomics analysis of the sunscreen agent 2-ethylhexyl 4-(N,N-dimethylamino) benzoate in human urine by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry with liquid chromatography-time-of-flight/mass spectrometry confirmation. J Chromatogr A 2011; 1218: 3013-21.
11. Mountain C. Revisions in the international system for staging lung cancer. Chest 1997; 111: 1710–17.
12. Ries L, Eisner M, Kosary C, eds.: Cancer Statistics Review, 1975-2002. Bethesda, Md: National Cancer Institute, 2005. Disponible en http://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2007/index.html. Fecha consulta Febrero, 2014.
13. de Cos JS, Miravet L, Abal J et al. Lung cancer survival in Spain: a prospective, multiregional study. Lung Cancer 2008; 59: 246–54.
14. Brenner DE, Normolle DP. Biomarkers for cancer risk, early detection, and prognosis: the validation conundrum. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2007; 16: 1918–20.
15. Manser R, Lethaby A, Irving LB et al. Screening for lung cancer. Cochrane Database Syst Rev. 2013 Jun 21; 6: CD001991. doi: 10.1002/14651858.CD001991.pub3.