



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



PRINCIPE FELIPE  
CENTRO DE INVESTIGACION



Instituto de  
Investigación  
Sanitaria La Fe

Universitat Politècnica de València - ETSIAMN

Unidad Mixta de Metabolómica Clínica, CIPF - IIS La Fe

# Caracterización del perfil metabolómico asociado a la metástasis ganglionar en pacientes con melanoma mediante $^1\text{H}$ -RMN

Paula Martínez Fernández de Cordova

Grado de Biotecnología 2017 – 2018

Convocatoria 7<sup>a</sup> Julio 2018, Valencia

**Dirección:** Dra. Leonor Puchades Carrasco

**Tutorización:** Dra. María José Bañuls

## Título

---

### **Caracterización del perfil metabólico asociado a la metástasis ganglionar en pacientes con melanoma mediante $^1\text{H}$ -RMN**

## Resumen

---

Entre las enfermedades oncológicas, que actualmente constituyen la principal causa de muerte en el mundo, el cáncer de piel conforma el grupo más frecuente. En particular el melanoma destaca por su potencial metastásico. A pesar de contabilizar menos del 5% de los casos, causa la gran mayoría de las muertes de este tipo de neoplasmas malignos, representando su forma más letal. En las etapas más tempranas, un tratamiento curativo es posible mediante resección quirúrgica. No obstante, la extensión del tumor primario conlleva un alto riesgo de invasión de los ganglios linfáticos regionales y de una posterior diseminación sistémica de difícil manejo clínico. Es por ello que la estadificación de los pacientes en función del grado de afectación nodular es un importante factor pronóstico. En este contexto, un conocimiento más profundo sobre los cambios biológicos relacionados con la metástasis ganglionar podría aportar información clínicamente relevante para el control de esta patología. El presente trabajo forma parte de un proyecto de colaboración internacional dirigido a la caracterización del perfil metabólico asociado a la progresión de la metástasis ganglionar en pacientes con melanoma mediante  $^1\text{H}$ -RMN. Se realizó un estudio metabólico preliminar sobre 12 muestras de exudado linfático a través de análisis estadísticos multi- y univariantes, contribuyendo a un mejor conocimiento de los procesos biológicos asociados a la enfermedad y a su desarrollo. Los resultados obtenidos sugieren la existencia de determinados cambios metabólicos correlacionados con la presencia de un mayor número de metástasis nodulares, que podrían estar implicados en la propensión invasiva del melanoma. Las nociones que aporta el presente estudio apoyan y contribuyen a profundizar en la investigación, para posibilitar la identificación de biomarcadores con valor pronóstico de manera no invasiva en futuras etapas del proyecto.

## Palabras Clave

---

Melanoma, Metástasis, Nódulos linfáticos, Metabólica,  $^1\text{H}$ -RMN.

## Title

---

# **<sup>1</sup>H-NMR characterization of the metabolomic profile related to ganglionic metastasis in melanoma patients**

## Abstract

---

Among oncological diseases, which currently constitute the main cause of death in the world, skin cancer is the most frequent group. In particular, melanoma stands out for its metastatic potential. Despite accounting for less than 5% of cases, it causes the great majority of deaths from this type of malignant neoplasms, representing its most lethal form. In its earliest stages, a curative treatment is possible by surgical resection. However, the extension of the primary tumor carries a high risk of invasion of the regional lymph nodes and of a subsequent systemic dissemination hardly clinically manageable. Patient staging according to the degree of nodular involvement is in consequence an important prognostic factor. In this context, a deeper knowledge about the biological changes related to the lymph node metastasis could provide clinically relevant information for the control of the pathology. The present work is part of an international collaboration project aimed at characterizing the metabolomic profile associated with the progression of ganglionic metastasis in patients with melanoma using <sup>1</sup>H-NMR. A preliminary metabolomic study was carried out on 12 samples of lymphatic exudate through multivariate and univariate statistical analysis, contributing to a better knowledge of the biological processes associated with the disease and its development. The results obtained point to the existence of certain metabolic changes correlated with the presence of a greater number of nodular metastases, which could be involved in the invasive propensity of melanoma. The notions provided by this study support and contribute to deepen the research, in order to enable the non-invasive identification of biomarkers with prognostic value in future stages of the project.

## Key words

---

Melanoma, Metastasis, Lymph Nodes, Metabolomics, <sup>1</sup>H-RMN.

## Datos del trabajo de fin de grado

---

**Alumno/a:** Dña. Paula Martínez Fernández de Cordova

**Lugar de realización:** Unidad Mixta de Metabolómica Clínica, Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) - Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe)

**Fecha:** Julio, 2018

**Localidad:** Valencia

**Titulación:** Grado de Biotecnología

**Director/a:** Dra. Leonor Puchades Carrasco, Unidad Mixta de Metabolómica Clínica (CIPF - IIS La Fe)

**Tutor/a:** Prof. Dra. María José Bañuls, Departamento de Química de la Universitat Politècnica de València (UPV).

# Índices

<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1. Melanoma .....	1
1.1.1. Cáncer .....	1
1.1.2. Cáncer de piel y melanoma .....	1
1.1.3. Metástasis .....	1
1.1.4. Pronóstico .....	2
1.2. Metabolómica <sup>1</sup> H-RMN .....	4
1.2.1. Biología de sistemas .....	4
1.2.2. Metabolómica .....	5
1.2.3. Flujo de trabajo de un estudio metabolómico .....	6
<b>2. Objetivos</b> .....	13
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	14
3.1. Muestreo .....	14
3.2. Adquisición de los datos .....	15
3.3. Análisis estadístico .....	16
3.4. Interpretación biológica de los resultados .....	18
<b>4. Resultados y discusión</b> .....	19
4.1. Adquisición de los datos .....	19
4.2. Análisis estadístico .....	21
4.2.1. Análisis multivariante .....	21
4.2.2. Análisis univariante .....	26
4.3. Interpretación biológica de los resultados .....	27
<b>5. Conclusiones</b> .....	37
<b>6. Referencias</b> .....	38

## Índice de tablas y figuras

---

### Índice de tablas

---

<b>Tabla 1.</b> Clasificación AJCC de pacientes de melanoma según el número de nódulos linfáticos metastásicos y el tipo de diseminación. ....	4
<b>Tabla 2.</b> Información clínica asociada a los pacientes incluidos en el estudio. ....	19
<b>Tabla 3.</b> Modelos OPLS analizados. ....	23
<b>Tabla 4.</b> Metabolitos relevantes en la discriminación de los modelos OPLS. ....	25

### Índice de figuras

---

<b>Figura 1.</b> Metástasis ganglionar desde el tumor primario de melanoma a través de los vasos linfáticos. Imagen adaptada de P.A.T.E. BOARD (2018). ....	2
<b>Figura 2.</b> Esquema general del flujo seguido para realizar un estudio de metabolómica por <sup>1</sup> H- RMN. Imagen adaptada de Beckonert <i>et al.</i> (2007). ....	6
<b>Figura 3.</b> Conjunto de espectros <sup>1</sup> H-RMN 1D de exudado linfático representativos de las secuencias de pulsos CPMG (rojo) y NOESY (azul). ....	20
<b>Figura 4.</b> Análisis no supervisado mediante PCA (gráficos <i>Score Scatter</i> y T <sup>2</sup> de Hotelling) de las 11 muestras incluidas en el estudio. Las componentes principales separan las muestras en grupos distintos a los esperados en el estudio. Las elipses indican las agrupaciones de las muestras (elipse superior, muestras contaminadas por EDTA; elipse inferior, muestras no contaminadas). ....	22
<b>Figura 5.</b> Superposición de espectros <sup>1</sup> H-RMN 1D CPMG de exudado linfático representativos de la contaminación por EDTA ( $\delta_1 = 2,51 - 2,59$ ppm; $\delta_2 = 2,66 - 2,72$ ppm; $\delta_3 = 3,04 - 3,24$ ppm; $\delta_4 = 3,55 - 3,68$ ppm) no deseada (rojo) y su ausencia (verde). ....	23
<b>Figura 6.</b> Análisis supervisado mediante modelos OPLS entre 1) los grupos creados en función del número de nódulos metastásicos y 2) los grupos de la clasificación AJCC. Gráficos <i>Score Scatter</i> y T <sup>2</sup> de Hotelling. La componente 1 separa las muestras en función del grado de afectación nodular. ....	24
<b>Figura 7.</b> Representación del coeficiente de correlación entre la variable intensidad de los metabolitos identificados en el análisis multivariante y la variable 1) número de nódulos metastásicos o 2) clasificación AJCC. (*) indica una correlación estadísticamente significativa ( $p\text{-value} < 0,05$ ). ....	27

**Figura 8.** Análisis de enriquecimiento funcional. Principales rutas metabólicas en las que están implicados los metabolitos relevantes obtenidos en el análisis multivariante. *P-value* < 0,05 indica una alteración significativa. .... 28

**Figura 9.** Mutaciones oncogénicas (Tap73 o p53) incrementan la glutaminólisis, provocando aumento de la síntesis de glutatión (GSH) que reduce el estrés oxidativo provocado por las especies reactivas de oxígeno (ROS), y la síntesis de  $\alpha$ -cetoglutarato que alimenta el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA). TAp73 impulsa la conversión de glutamina / glutamato mediante la inducción de la expresión de la glutaminasa-2 (GLS-2), empujando así la ruta biosintética de la serina, mientras que reprime las ROS intracelulares por inhibición de la expresión de la subunidad 4 de la isoforma 1 de la citocromo C oxidasa (COX4i1). La vía de síntesis de serina utiliza el 3P-piruvato proveniente de un intermedio glucolítico, y el glutamato proveniente de la glutaminólisis, que se convierten mediante la fosfoserina aminotransferasa 1 (PSAT-1) y la fosfoserina fosfatasa (PSPH) en serina y  $\alpha$ -cetoglutarato. La activación dependiente de p53 de p21 induce la detención transitoria del ciclo celular, bloqueando el flujo hacia las purinas y favoreciendo de esta forma la síntesis de GSH. Imagen adaptada de Amelio *et al.* (2014). .... 30

**Figura 10.** El metabolismo de un carbono como integrador de distintas rutas metabólicas. Las fuentes de nutrientes que implican aminoácidos (en azul) se importan o se sintetizan de novo (como la betaína), y alimentan el metabolismo de carbono. Dicho metabolismo está compuesto por dos unidades modulares que comprenden el ciclo de folato y el ciclo de metionina. Los nutrientes se procesan a través de estos ciclos metabólicos y se pueden generar múltiples salidas (en rojo), incluidos nucleótidos, poder de reducción y sustratos para reacciones de metilación. NADPH, Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida; NADP<sup>+</sup>, Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada. Imagen adaptada de Locasale (2013). .... 33

**Figura 11.** La activación de la ruta del folato, implicada en metabolismo de un carbono, amortigua el estrés oxidativo y promueve la supervivencia en células con metástasis de melanoma. En el tumor subcutáneo primario, el nivel de ROS se mantiene controlado. El metabolismo del folato es una ruta antioxidante que está involucrada en el mantenimiento del estado redox de las células. Dentro del tumor, se alcanza un equilibrio entre la muerte celular inducida por daño oxidativo y la supervivencia. Tanto en las células de melanoma circulantes (CMC), como en los nódulos metastásicos, las células se ven sometidas a un alto nivel de ROS que reduce la supervivencia. Aquellas células que sobreviven muestran una activación de la ruta del folato, que provoca una mayor producción de NADPH. Este NADPH es utilizado para reducir el glutatión oxidado (GSSG) en glutatión (GSH). Un alto nivel de GSH

## Índice de tablas y figuras

---

puede reducir el  $H_2O_2$ , protegiendo así las células de los daños oxidativos. Imagen adaptada de Piskounova *et al.* (2015). ..... 35

## Abreviaturas

---

$\delta$	Desplazamiento químico
1D	Monodimensional
$^1\text{H}$ - RMN	RMN de protón
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i> Sociedad Americana contra el Cancer
BMRB	<i>Biological Magnetic Resonance Data Bank</i> Banco de Datos de Resonancia Magnética Biológica Espectroscopia de Efecto Overhauser Nuclear
CIPF	Centro de Investigación Príncipe Felipe
CMC	Células de Melanoma Circulantes
CNIO	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
COX4i1	<i>Cytochrome C Oxidase Subunit 4 Isoform 1</i> Subunidad 4 de la Isoforma 1 de la Citocromo C Oxidasa
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> Ácido Etilendiaminotetraacético
EM	Espectrometría de Masas
FASN	<i>Fatty Acid Synthase</i> Ácido Graso Sintasa
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos
GLS- 2	Glutaminasa - 2
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación disulfuro
HMDB	<i>Human Metabolome Data Base</i> Base de Datos del Metaboloma Humano
Hz	Hercios
IIS La Fe	Instituto de Investigaciones Sanitarias de La Fe

## Abreviaturas

---

MMP	Matrix Metalloproteinases Metaloproteasas de Matriz
MSEA	<i>Metabolite Set Enrichment Analysis</i> Análisis de Enriquecimiento Funcional
MTHFD1	Metilentetrahidrofolato Reductasa Deshidrogenasa 1
NAD <sup>+</sup>	Nicotin Adenin Dinucleótido oxidado
NADH	Nicotin Adenin Dinucleótido reducido
NADP <sup>+</sup>	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate oxidized</i> Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato oxidada
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate reduced</i> Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato reducida
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
OPLS	<i>Orthogonal Partial Least Squares</i> Proyección Ortogonal a Estructuras Latentes
Par	Pareto
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> Análisis de Componentes Principales
PCs	<i>Principal Components</i> Componentes Principales
PLS	<i>Partial Least Squares</i> Regresión de Mínimos Cuadrados Parciales
PPM	Partes Por Millón
PSAT-1	<i>Phosphoserine Aminotransferase 1</i> Fosfoserina Aminotransferasa 1
PSPH	<i>Phosphoserine Phosphatase</i> Fosfoserina Fosfatasa
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>

## Abreviaturas

---

	Especies Reactivas de Oxígeno
SHMT1	Serina Hidroximetil Transferasa 1
SMPDB	<i>Small Molecule Pathway Database</i>
	Base de Datos de Rutas de Moléculas Pequeñas
TCA	<i>Tricarboxylic Acid cycle</i>
	ciclo de Ácidos Tricarboxílicos
THF	Tetrahidrofolato
TSP	3-Trimetilsilil Propionato
UV	<i>Unit Variance</i>
	Varianza Unitaria
VIP	<i>Variable Importance for the Projection</i>
	Importancia de la Variable en la Proyección

# 1. Introducción

## Introducción

---

### 1.1. Melanoma

#### 1.1.1. Cáncer

En la actualidad, el cáncer representa la principal causa de muerte en el mundo. Se trata de una patología heterogénea que agrupa enfermedades muy diferentes respecto a su etiología y a sus manifestaciones clínicas. La carcinogénesis origina estas enfermedades, y consiste en la transformación de células sanas en células tumorales, que comienzan a dividirse sin control, proliferan de manera anormal y adquieren la capacidad de invadir otros tejidos (SEOM, 2017). Este proceso incluye múltiples cambios genéticos, y se caracteriza por la alteración del metabolismo celular y del microambiente tumoral (Wishart *et al.*, 2016).

#### 1.1.2. Cáncer de piel y melanoma

El cáncer de piel representa el grupo más común de neoplasmas malignos (Apalla *et al.*, 2017). Existen muchos tipos de cáncer de piel, pero más del 90% se pueden agrupar en cáncer cutáneo no melanoma y melanoma. El primero engloba a su vez dos tipos frecuentes de cáncer, denominados carcinoma basocelular, proveniente de las células basales, y carcinoma espinocelular, originado en las células espinosas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018). El melanoma cutáneo, que surge de los melanocitos de la epidermis, es el tipo más común de melanoma, representando hasta el 91% de todos los casos. Su incidencia aumenta cada año entre la población mundial, especialmente en pacientes menores de 35 años (Verykiou, 2014) (Ribero *et al.*, 2016). Sus principales causas son la predisposición genética y el daño irreparable del ADN debido a factores ambientales, esencialmente la radiación UV (Isola *et al.*, 2016). Existe por tanto una variación considerable en su incidencia entre países, que se atribuye a diferencias en el fenotipo cutáneo y en la exposición al sol (Ali *et al.*, 2013).

#### 1.1.3. Metástasis

A pesar de que el melanoma constituye menos del 5% de los casos de cáncer de piel, se trata de la forma más letal de este tipo de tumores, causando más del 80% de las muertes. La principal razón es su propensión metastásica, que se refleja en la agresiva invasividad de las células de melanoma en el tejido adyacente incluso cuando el tumor primario es significativamente pequeño. El

## Introducción

comportamiento invasivo de estas células parece ser remanente de su origen en la cresta neural, rasgo que distingue al melanoma del resto de cánceres de piel derivados del epitelio.

El proceso de metástasis se inicia cuando las células del melanoma se desprenden del tumor primario e invaden el tejido circundante. La metástasis a los nódulos linfáticos representa generalmente el primer paso importante en la progresión del melanoma y se da cuando el tumor primario excede un cierto grosor (entorno a los 4 mm) y alcanza los vasos linfáticos (Figura 1). Este proceso es crucial para su diseminación sistémica, provocando con frecuencia la formación de tumores secundarios distantes (Gorantla y Kirkwood, 2014).

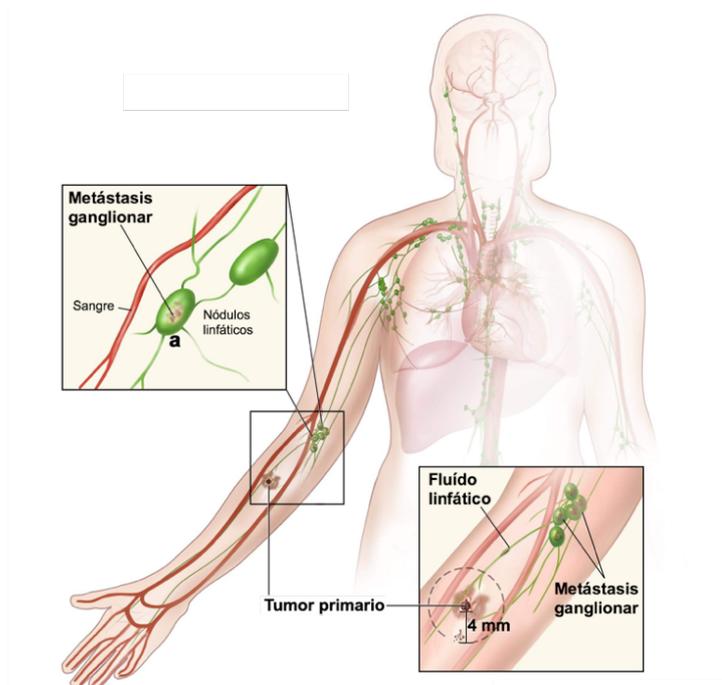


Figura 1. Metástasis ganglionar desde el tumor primario de melanoma a través de los vasos linfáticos. Imagen adaptada de P.A.T.E. BOARD (2018).

### 1.1.4. Pronóstico

En sus primeras etapas es posible erradicar el tumor primario, siendo actualmente la resección quirúrgica el único tratamiento potencialmente curativo para el melanoma maligno (Geisler *et al.*, 2013). En caso de una detección temprana, la tasa de supervivencia a 5 años sobrepasa el 98% (Kim *et al.*, 2017). No obstante, si el melanoma se ha diseminado a otros sitios, incluidos los ganglios linfáticos, los pulmones, el hígado, o el cerebro, se vuelve refractario a las terapias existentes y su pronóstico empeora drásticamente.

## Introducción

---

Todos los pacientes diagnosticados con un melanoma invasivo tienen riesgo de desarrollar metástasis ganglionar, que aumenta con el grosor del tumor. Su incidencia es del 10% en pacientes con tumores primarios de 1-2 mm de grosor, y de más del 30% para las lesiones primarias de 3-4 mm. Las implicaciones pronósticas de estas etapas más avanzadas varían en función de la carga tumoral nodal, tanto en términos de cantidad de ganglios linfáticos implicados, como de diseminación microscópica o macroscópica (Ali *et al.*, 2013). En todo caso, sus tasas de supervivencia a 5 años se ven reducidas en un 40-50% en comparación con aquellos pacientes que no presentan metástasis ganglionar. El empobrecimiento del pronóstico se debe en gran medida al riesgo incrementado de desarrollar una diseminación sistémica, alcanzando tasas de más del 50%. Una vez se da la metástasis a distancia, la mediana de supervivencia se encuentra entre los 6 y 10 meses, y la tasa de supervivencia global a 3 años no supera el 15% (Eigner *et al.*, 2017).

La estadificación en función de la afectación de los nódulos linfáticos regionales representa el factor pronóstico más importante en los pacientes con tumores primarios de tamaño superior a 4 mm (Ribero *et al.*, 2016). Esta clasificación proporciona información prospectiva de la evolución de grupos clínicos y permite asignar los tratamientos más eficaces en función del avance de la enfermedad.

Los criterios estándares de estadificación actuales se basan en la clasificación *TNM Staging System* del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), reconocida a nivel mundial como una importante herramienta para predecir los resultados de los pacientes diagnosticados con melanoma. (Ali *et al.*, 2013). Este sistema emplea la extensión del tumor primario (T), el grado de diseminación a los ganglios linfáticos (N) y la presencia de metástasis (M) (Edge y American Joint Committee on Cancer, 2010).

Según la clasificación AJCC que evalúa los nódulos linfáticos regionales:

- NX describe aquellos pacientes en los que no es posible evaluar los ganglios regionales (por ejemplo, por disección quirúrgica previa).
- N0 es empleado cuando no se detectaron metástasis regionales.
- N1 - 3 caracterizan metástasis regionales basándose en la cantidad de ganglios metastásicos implicados. Vienen acompañados de la indicación "a" o "b", según si la diseminación es microscópica o macroscópica, respectivamente (Tabla 1).

## Introducción

---

Tabla 1. Clasificación AJCC de pacientes de melanoma según el número de nódulos linfáticos metastásicos y el tipo de diseminación.

Número de nódulos linfáticos metastásicos	Grupo AJCC
1	N1 <sup>a</sup> <sub>b</sub>
2 ó 3	N2 <sup>a</sup> <sub>b</sub>
> 3	N3

a, microscópica; b, macroscópica.

A pesar de la importancia de la afectación de los nódulos linfáticos en la progresión del melanoma, pocos estudios se han centrado en caracterizar este proceso. Entre ellos, la mayoría están dirigidos a la identificación de patrones de cambios genéticos conocidos y dependen de biopsias de tejido ganglionar (Gos *et al.*, 2014). La disección de los nódulos linfáticos se asocia a una alta morbilidad, particularmente por complicaciones de la herida, incluida su infección, desglose, e incluso formación de seroma y linfedema (Davis *et al.*, 2011). Una técnica no invasiva, rápida y precisa, capaz de evaluar la progresión de la enfermedad y proporcionar información sobre los procesos metabólicos que intervienen en la afectación de los nódulos linfáticos regionales sería de gran interés clínico.

### 1.2. Metabolómica <sup>1</sup>H-RMN

#### 1.2.1. Biología de Sistemas

La Biología de Sistemas aplica un enfoque multidisciplinar a los sistemas biológicos, integrando información del funcionamiento e interacción de todos los componentes celulares (proteínas, genes, metabolitos, etc.).

La realización de estudios “ómicos” (transcriptómicos, proteómicos o metabolómicos) posee un gran potencial para la caracterización de patologías y el descubrimiento de biomarcadores de utilidad clínica que permitan la detección temprana del cáncer, así como la monitorización de la progresión de la enfermedad.

Puesto que uno de los cambios más importantes derivado del proceso de carcinogénesis es la alteración del metabolismo celular, provocando cambios significativos en los niveles de los

metabolitos, la metabolómica constituye una potente herramienta para obtener una visión holística del sistema biológico y sus alteraciones en el desarrollo del melanoma.

### 1.2.2. Metabolómica

La metabolómica es un enfoque emergente en el campo de la Biología de Sistemas, centrándose en el estudio del metaboloma de un sistema biológico. Este enfoque evalúa todos los compuestos de bajo peso molecular (metabolitos) presentes en una muestra biológica en un determinado momento (Puchades-Carrasco y Pineda-Lucena, 2015). Puesto que representa el producto final del genoma, transcriptoma y proteoma, las alteraciones en su composición representan las perturbaciones dinámicas del sistema biológico y son el reflejo del fenotipo molecular.

Gracias al desarrollo de nuevas herramientas bioinformáticas aplicadas al análisis de los datos metabólicos, junto con un mejor conocimiento del metaboloma humano y el desarrollo de bases de datos específicas, la metabolómica se ha aplicado ampliamente como una nueva herramienta de diagnóstico y pronóstico en estudios clínicos y biomédicos (Bujak *et al.*, 2015). Los estudios metabolómicos permiten determinar la correlación existente entre las variaciones de concentración de ciertos metabolitos en una muestra biológica y una determinada condición patológica, como puede ser la presencia de una enfermedad o su progresión (Puchades-Carrasco y Pineda-Lucena, 2015).

El estudio de los perfiles metabólicos de distintos biofluidos (principalmente suero, plasma, orina y saliva) ofrece la posibilidad de evaluar de manera dinámica y mínimamente invasiva la condición patológica gracias a distintas técnicas analíticas. Debido a la diversidad fisicoquímica del metaboloma y la complejidad de los sistemas biológicos, ninguna plataforma analítica individual es capaz de identificar todos los metabolitos presentes en los biofluidos complejos. Por lo tanto, diversas plataformas analíticas se utilizan comúnmente en estudios metabolómicos, siendo la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (EM) las principales técnicas utilizadas.

Por una parte, la RMN es una técnica espectroscópica basada en la absorción de radiación electromagnética por núcleos atómicos magnéticamente activos según su entorno químico y electrónico. La RMN de protón ( $^1\text{H}$ -RMN), que depende de las propiedades magnéticas de dicho núcleo, es una plataforma idónea para el análisis de muestras clínicas debido a su alta reproducibilidad, la posibilidad de reutilización de la muestra, ya que es una técnica no destructiva, y su capacidad de cuantificar los niveles de distintos metabolitos (Puchades-Carrasco *et al.*, 2015).

## Introducción

El perfil metabólico de RMN se ha utilizado ampliamente para estudiar el melanoma primario *in vivo* e *in vitro* (Wang *et al.*, 2014). Sin embargo en muestras complejas se dan fenómenos de superposición de señales espectrales que pueden limitar la cuantificación y la identificación. Esto puede ser especialmente problemático en suero o plasma, muestras donde las altas concentraciones de lípidos y proteínas pueden interferir en las resonancias de las moléculas pequeñas que podrían ser analitos de interés. La principal ventaja de los métodos basados en la EM frente al  $^1\text{H}$ -RMN es su elevada sensibilidad (Barding *et al.*, 2012). Esta técnica analítica consiste en la ionización de los átomos, que son separados por su relación masa/carga ( $m/z$ ), para finalmente ser detectados y registrados (Gómez y González, 2010). Su limitación frente al RMN se basa en una menor reproducibilidad y capacidad de cuantificación, mayor complejidad de preparación, y obtención de gran cantidad de información que complica el procesado de los datos analíticos. Por todo ello, el RMN y la EM con sus distintas ventajas e inconvenientes, son técnicas complementarias que se combinan en la investigación metabólica.

El presente estudio se centra en la  $^1\text{H}$ -RMN como primera etapa de un proyecto de investigación mayor que pretende integrar ambas plataformas.

### 1.2.3. Flujo de trabajo en un estudio metabólico

El esquema general de trabajo de un estudio metabólico por  $^1\text{H}$ -RMN puede resumirse en la etapas mostradas en la Figura 2.

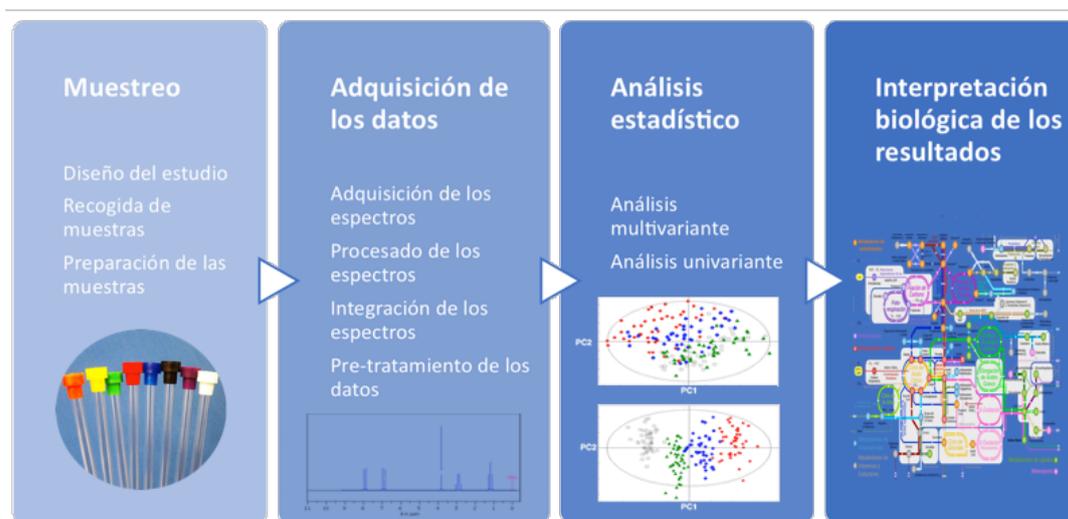


Figura 2. Esquema general del flujo seguido para realizar un estudio de metabolómica por  $^1\text{H}$ -RMN. Imagen adaptada de Beckonert *et al.* (2007).

## Introducción

---

### Diseño del estudio

En los estudios de metabolómica clínica es esencial contar con un diseño experimental apropiado, adaptado a la situación clínica a estudiar y acorde con los objetivos que se pretenden alcanzar. Entre los aspectos a tener en cuenta se encuentran: i) los criterios de inclusión de sujetos en el estudio, el tamaño muestral, y la información clínica asociada a cada paciente, ii) los grupos de estudio, iii) el tipo de muestra biológica, iv) la estandarización de los protocolos (recogida y procesado de las muestras, adquisición de los experimentos de RMN, etc.) (Puchades-Carrasco *et al.*, 2015).

### Recogida de las muestras

La recogida de muestras es una etapa que debe llevarse a cabo según protocolos estándares para garantizar la reproducibilidad del estudio, disminuir la variabilidad entre muestras no relacionada con la variable de estudio y reducir el riesgo de contaminación. Las condiciones de recogida deben además mantener la estabilidad del biofluido a analizar (Beckonert *et al.*, 2007).

### Preparación de las muestras

La preparación de las muestras tiene como objetivo el acondicionamiento del biofluido para facilitar su análisis mediante la técnica seleccionada. El procedimiento debe adaptarse a las propiedades físico-químicas que presentan los diferentes tipos de biofluidos. Para atender a estas necesidades debe cumplir ciertos requisitos. En el caso de la RMN, la preparación de las muestras debe ser sencilla y reproducible, siempre asegurando una mínima variabilidad entre muestras (p. ej., debidas al pH) y una buena calidad espectral (resolución y sensibilidad) (Beckonert *et al.*, 2007).

### Adquisición de los espectros

El primer paso en la adquisición de los espectros de RMN es optimizar el proceso mediante el correcto ajuste y calibrado de los parámetros del equipo. De esta manera, es posible mantener constantes las condiciones de adquisición, reduciendo la variabilidad entre experimentos y por tanto garantizando la reproducibilidad (Hendriks *et al.*, 2011). Entre los parámetros más importantes

## Introducción

---

destacan la temperatura, la sintonía de la sonda (*wobb*), la homogeneidad (*shimming*) del campo magnético, y otros parámetros específicos del experimento.

También es necesario adecuar las secuencias de pulsos a las características particulares de las muestras del estudio y los compuestos que se pretenden medir. Por un lado, el agua presente en los biofluidos interfiere en el análisis del resto de señales del espectro. Es necesario minimizar este efecto irradiando de forma continua la señal del agua para que sus  $^1\text{H}$  no contribuyan a la señal observada. Por otro lado el metaboloma de las muestras presenta una mezcla muy diversa de compuestos, con grandes diferencias de concentración y por tanto de intensidad espectral. Las señales de mayor intensidad pueden solaparse con señales de compuestos minoritarios, ocultándolos y dificultando su análisis. Es por ello que dependiendo de composición de la muestra, podría ser necesaria una corrección de dicho efecto.

En metabolómica es frecuente emplear experimentos de RMN monodimensional (1D) de protón, en el que las secuencias de pulso más utilizadas son:

- 1D *nuclear Overhauser enhancement spectroscopy* (NOESY). Esta secuencia mejora la supresión de la señal del agua, la fase y la línea base. Proporciona un método simple, altamente reproducible y robusto para la adquisición de espectros de RMN de alta calidad en soluciones acuosas (Le Guennec *et al.*, 2017).
- 1D *Carr-Purcell-Meiboom-Gill* (CPMG). Esta secuencia permite la eliminación de las señales de proteínas y lipoproteínas, moléculas de alto peso molecular que experimentan una relajación transversal muy rápida, dando lugar a señales anchas en el espectro. Esta secuencia es la más utilizada para el análisis de muestras de plasma y suero, ya que contienen un alto nivel de proteínas, mejorando la resolución de señales de bajo peso molecular (Le Guennec *et al.*, 2017).

### Procesado de los espectros

Tras adquirir los experimentos de RMN, se aplican distintos procedimientos de procesado automático de datos que permiten reducir la variabilidad entre muestras para obtener información comparable entre los distintos espectros. Este procesado incluye la corrección de la fase y la línea base del espectro, la identificación de señales de exclusión, y el alineamiento de señales respecto a una señal de referencia (Puchades-Carrasco, 2014).

### Integración de los espectros

Un paso importante antes de realizar el análisis estadístico es el denominado *binning* o *bucketing*. El objetivo es reducir de forma significativa la complejidad de los datos, subdividiendo e integrando el espectro en pequeñas regiones conocidas como *bins* o *buckets*. Los *buckets* pueden ser de tamaño constante (*Simple Rectangular Buckets*) o de tamaño variable (*Variable Size Buckets*) según los desplazamientos químicos de las señales de cada metabolito. Este paso se realiza de forma automática mediante la utilización de herramientas informáticas específicas (Puchades-Carrasco *et al.*, 2015). Al integrar los espectros se obtiene el valor del área correspondiente al intervalo determinado, y por tanto proporcional a la concentración en la muestra del metabolito en cuestión.

### Pre-tratamiento de los datos

El pre-tratamiento de los datos consiste habitualmente en dos procedimientos: normalización y escalado. La normalización tiene como objetivo corregir la variabilidad existente entre las distintas muestras del estudio que podría interferir en el análisis posterior. Este proceso resulta necesario en muestras donde la concentración total difiere entre individuos debido a variaciones en el volumen, tamaño de la muestra, factor de dilución etc., o para corregir diferencias técnicas entre los distintos espectros incluidos en el análisis. Existen diferentes tipos de normalización, siendo la normalización respecto al área total del espectro uno de los más utilizados, en la cual la intensidad de cada *bucket* es dividida por la integral del espectro completo. No obstante, dependiendo del tipo de biofluido puede ser conveniente aplicar métodos más específicos, como es la normalización por cociente probabilístico o la normalización en función de la concentración de creatinina que actuaría como patrón interno.

Por otra parte, también pueden existir grandes diferencias en la magnitud de las variaciones de las distintas variables (*buckets*) del espectro en la comparación entre los grupos de estudio por lo que sería necesario aplicar el procedimiento de escalado (Craig *et al.*, 2006). Existen varios tipos de normalización y escalado, por lo que dependiendo de las características de las muestras analizadas será necesario un pre-tratamiento distinto de los datos (Puchades-Carrasco, 2014). Los métodos de escalado más utilizados en los estudios de metabolómica son:

- Varianza Unitaria (UV): Emplea la desviación estándar de cada variable como factor de escalado. Este método otorga a cada variable el mismo peso en la totalidad del espectro,

independientemente de la intensidad de la señal en el espectro original. Es por tanto posible introducir variabilidad en las muestras debida a errores instrumentales y/o metodológicos.

- Pareto (Par): Emplea la raíz cuadrada de la desviación estándar de cada variable como factor de escalado. De esta forma se reducen las diferencias entre las variables de distinta intensidad, manteniendo una distribución en el peso de las variables similar a la de los datos originales.

El análisis estadístico multivariante se realiza sobre los datos obtenidos tras este proceso.

### Análisis estadístico multivariante

El objetivo del análisis estadístico multivariante es reducir la dimensionalidad de los datos, puesto que al evaluar la información contenida en los espectros de RMN de mezclas complejas, el número de variables es muy elevado. La selección de estas variables se obtiene gracias a modelizaciones matemáticas no supervisadas y supervisadas.

En primer lugar se emplean métodos de análisis no supervisado para realizar una primera exploración de los datos y permiten evaluar la variabilidad entre muestras (observaciones) sin conocer su pertenencia a un grupo determinado. El método más frecuentemente utilizado es el análisis de componentes principales (PCA), puesto que permite observar de manera gráfica la distribución de las muestras en función de la variabilidad de los datos (Dunn *et al.*, 2011). El objetivo es la reducción de variables perdiendo la mínima cantidad de información posible, y la identificación de tendencias en los datos que permitan evaluar su variabilidad.

Posteriormente se aplican métodos de análisis supervisado que utilizan información sobre la clasificación de las muestras. Estos estudios permiten seleccionar las variables con mayor capacidad de discriminación entre los grupos de muestras estudiadas. Entre los modelos de análisis supervisado, destacan el análisis discriminante por mínimos cuadrados (PLS) y su modificación con corrección ortogonal (OPLS) (Mirsaeidi, 2015) (Puchades-Carrasco *et al.*, 2015). Dos parámetros permiten evaluar estos modelos: la bondad de ajuste ( $R^2$ ) y la capacidad predictiva ( $Q^2$ ).

En los estudios de metabolómica se considera que un modelo discriminante tiene una capacidad predictiva correcta cuando  $Q^2$  sobrepasa 0,5 y la diferencia entre ambos parámetros es inferior a 0,2-0,3 (Muñoz, 2015). Cuando la relación entre  $R^2$  y  $Q^2$  no se mantiene el modelo podría

## Introducción

---

estar sobreajustado por lo que no es posible validar la calidad y fiabilidad de los resultados obtenidos (Westerhuis *et al.*, 2008). En este contexto, el test de permutación permite comparar los parámetros del modelo a evaluar con los de nuevos modelos aleatorios, generados según clasificaciones distintas a la original. El modelo se encuentra correctamente validado cuando los parámetros  $R^2$  y  $Q^2$  generados en estos nuevos modelos son muy inferiores a los del modelo original. La ordenada en el origen para la recta de regresión entre los distintos valores de  $R^2$  debe situarse entre 0,3-0,4, y el de la recta de regresión de  $Q^2$  debe ser inferior a 0,05 (Puchades-Carrasco, 2014).

### Selección de los metabolitos relevantes

La selección de los metabolitos relevantes se realiza en base a su importancia en la discriminación entre grupos en los modelos generados en el análisis supervisado. El análisis de los valores de *Variable Importance for the Projection* (VIP) asociados a cada variable incluida en los modelos permite identificar los *buckets* más importantes, trazando regiones específicas del espectro correspondientes a señales de metabolitos característicos. Se impone como criterio de selección un determinado valor de VIP umbral a partir del cual los *buckets* son considerados relevantes.

### Asignación de los metabolitos relevantes

Los *buckets* de mayor valor de VIP son asignados en los espectros RMN a señales correspondientes a metabolitos determinados. Para determinar su correspondencia se realizan búsquedas en bases de datos de acceso público (*Human Metabolome Data Base* (HMDB), *Biological Magnetic Resonance Data Bank* (BMRB), etc.) (Puchades-Carrasco *et al.* 2015) o en la literatura disponible para ese tipo de biofluidos (Stretch *et al.*, 2005) (Lean *et al.*, 2003). Su identificación también es posible empleando espectros obtenidos a partir de compuestos patrón o de manera automática gracias a algoritmos específicos como Chenomx NMR Suite v.8.1 (Chenomx Inc, Canadá) (Weljie *et al.*, 2006).

### Integración de los metabolitos relevantes

## Introducción

---

Tras evaluar las variaciones en los niveles de los metabolitos de interés en el estudio, se integran las señales correspondientes utilizando *buckets* de tamaño variable (*Variable Size Buckets*) según el desplazamiento químico específico de sus señales.

### Análisis estadístico univariante

El análisis estadístico univariante permite confirmar la relevancia estadística de las diferencias en los niveles de concentración de los metabolitos entre los grupos de estudio, identificadas a partir del análisis multivariante. El test estadístico más pertinente varía según las características de los datos y el objetivo del análisis. Criterios como el tamaño muestral y la distribución de las variables, en términos de normalidad, homogeneidad de varianzas e independencia, condicionan la elección de métodos paramétricos o no paramétricos.

Los tests más frecuentes para evaluar una correlación entre dos variables son los de Pearson y Spearman. Pearson constituye una prueba paramétrica que evalúa una relación lineal entre dos variables continuas. Sin embargo, en caso de requerir un método no paramétrico, Spearman permite evaluar una relación monótona entre dos variables continuas u ordinales.

Diversos tests permiten verificar si es posible asumir la normalidad de los datos, requisito indispensable para la utilización de métodos paramétricos. Su uso es recomendable puesto que tienen mayor potencia estadística. En caso contrario, son más aconsejables los métodos no paramétricos.

### Interpretación biológica de los resultados

Tras la identificación de los metabolitos que permiten definir un patrón característico de cada grupo de estudio, y una vez confirmada su relevancia estadística, es necesaria la interpretación biológica de los resultados. Este paso permite la caracterización de los procesos patológicos estudiados.

Entre las herramientas disponibles para este propósito, destacan las bases de datos como HMDB, que proporcionan posibles rutas metabólicas en las que podrían estar implicados los distintos metabolitos identificados. Integrando la información obtenida con la literatura relativa a la patología en cuestión, es posible identificar posibles mecanismos de regulación que podrían estar alterados en su progresión.

## 2. Objetivos

## Objetivos

---

## Objetivos

---

El presente estudio se enmarca en un proyecto de colaboración internacional coordinado por el grupo de Metástasis y Microentorno del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) (Madrid, España) liderado por el Dr. H. Peinado y la Unidad Mixta de Metabolómica Clínica del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) – Instituto de Investigaciones Sanitarias de La Fe (IIS La Fe) dirigida por el Dr. Antonio Pineda-Lucena. Dicho proyecto tiene como objetivo profundizar en el conocimiento de la metástasis nodular en pacientes con melanoma a través de su perfil metabolómico. El diseño del estudio metabolómico comprende la combinación de las técnicas complementarias  $^1\text{H}$ -RMN y EM para describir y contextualizar los cambios metabólicos asociados a dicha condición patológica.

Como primera aproximación del proyecto, este estudio se centra en el examen del perfil metabolómico mediante  $^1\text{H}$ -RMN de muestras de exudado linfático de pacientes diagnosticados con melanoma. El grupo de Metástasis y Microentorno del CNIO lleva a cabo la recogida y preparación de las muestras mientras que la Unidad Mixta de Metabolómica Clínica del CIPF – IIS La Fe realiza el análisis por  $^1\text{H}$ -RMN y la estadística asociada para interpretar biológicamente los resultados obtenidos.

Los objetivos específicos incluidos en este trabajo son:

- 1) Caracterización del perfil metabólico en exudado linfático de pacientes con diferentes estadios de metástasis ganglionar de melanoma.
- 2) Identificación de las vías metabólicas en las que intervienen los metabolitos alterados en el estudio.
- 3) Interpretación de los cambios observados en el perfil metabolómico de pacientes con metástasis nodular en el contexto biológico de la enfermedad.

## Objetivos

---

# 3. Materiales y métodos



### 3.1. Muestreo

#### Diseño del estudio

El estudio incluye una población de mujeres y hombres pacientes de melanoma con metástasis de los ganglios linfáticos de diferente grado, reclutados en distintos hospitales por el grupo del Dr. Hector Peinado en el contexto de un proyecto internacional.

Los pacientes fueron estadificados según el número de nódulos metastásicos que poseen y según su pertenencia a un grupo de la clasificación AJCC. En total 12 individuos participaron en el estudio, de acuerdo a criterios de inclusión que comprenden la presencia de melanoma invasivo, afectación ganglionar, y ausencia de cáncer previo. El exudado linfático fue el biofluido de elección para realizar el estudio. Se recogieron los datos clínicos e información sobre el procesamiento de las muestras definidos en los protocolos del estudio.

#### Recogida de las muestras

El procedimiento de recogida de muestras se llevó a cabo por el grupo del Dr. Hector Peinado en el CNIO, siempre tras la obtención del consentimiento informado de los pacientes, de acuerdo con los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki y con la aprobación de los Comités Éticos de Investigación de los centros que participaron en el estudio.

La recogida de las muestras de exudado linfático (1-2 mL) se llevó a cabo por linfadenectomía tras la resección quirúrgica del tumor primario. El biofluido se extrajo mediante el procedimiento de aspiración con aguja fina (*Fine-Needle Aspiration*) directamente desde el drenaje linfático. A continuación, las muestras se transfirieron a tubos de recogida libres de anticoagulantes y de cualquier otro aditivo. Se centrifugaron durante 20 minutos a 3500-3700 x *g* a temperatura ambiente utilizando un rotor de cubeta oscilante. El sobrenadante (fluido linfático) se transfirió a un nuevo tubo de recolección, se alicuotó, e inmediatamente se congeló a - 80 °C hasta su análisis por RMN.

#### Preparación de las muestras

Tras descongelar las muestras en hielo, 400  $\mu$ L del biofluido se mezclaron con 100  $\mu$ L de la solución tampón (75 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,4, 5 mM 3-Trimetilsilil Propionato (TSP), 0,04%  $\text{NaN}_3$ ) preparada en 100%  $\text{D}_2\text{O}$ . Finalmente, para su análisis por RMN fueron transferidas a tubos de 5 mm.

### 3.2. Adquisición de los datos

#### Adquisición de los espectros

Antes de proceder a la adquisición de los espectros se llevó a cabo la optimización y calibración de todos los parámetros críticos en este tipo de estudios. Para cada una de las 12 muestras se adquirieron dos sets de experimentos estándar correspondientes a las secuencias de pulsos 1D NOESY y CPMG. La adquisición se realizó a 310 K empleando un espectrómetro Bruker Avance II 600 MHz equipado con una criosonda TCI de 5mm, y siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante del equipo para estudios de metabolómica con muestras biológicas (Bruker BioSpin, Alemania). Se aplicó un pulso de 25 Hz para mejorar la supresión de la señal residual del agua.

#### Procesado de los espectros

Los distintos procedimientos de procesado de datos se aplicaron empleando el software TopSpin v.3.2 (Bruker Biospin, Alemania). El comando "apk0.noe" permitió la corrección automática de la fase y la línea base de los experimentos monodimensionales. El alineamiento de las señales del conjunto de espectros se realizó en referencia al valor de desplazamiento químico de la señal correspondiente al grupo metilo de la alanina ( $\delta=1,47$  ppm).

#### Integración de los espectros

Se integró la región del espectro comprendida entre 0,46 y 8,62 ppm, excluyendo la región de la señal residual del agua ( $\delta = 4,39 - 5,03$  ppm). Se subdividieron los espectros en *buckets* de 0,01 ppm

## Materiales y métodos

---

(*Simple Rectangular Buckets*) empleando el programa AMIX v.3.9.7 (Analysis of MIXtures, Bruker BioSpin, Alemania) y según el tipo de integración “Suma de Intensidades Absolutas”.

### Pre-tratamiento de los datos

El pretratamiento de los datos se realizó mediante un procedimiento de escalado a través del programa SIMCA-P v.14.1 (Umetrics AB, Suecia) aplicando los métodos de “UV” y “PARETO”.

### 3.3. Análisis estadístico

#### Análisis estadístico multivariante

El análisis estadístico multivariante se llevó a cabo empleando el software SIMCA-P v.14.1 (Umetrics AB, Suecia). Se generaron modelos no supervisados PCA, a partir de los cuales se representaron los gráficos *Score Scatter* y  $T_2$  de Hotelling. Tras la identificación de posibles *outliers* y agrupaciones en las muestras, y la revisión de sus respectivos espectros  $^1\text{H-RMN 1D CPMG}$  (TopSpin v.3.2), se decidió en cada caso de manera justificada la inclusión o exclusión de cada una de ellas. Una vez obtenida una visión general, se procedió al análisis supervisado de las muestras mediante los modelos discriminantes OPLS. Se establecieron comparaciones con las 2 variables del estudio (clasificación AJCC y clasificación según el número de nódulos metastásicos) asignando un valor continuo a cada grupo. A partir de los datos normalizados según los métodos de escalado UV y PARETO, se obtuvieron un total de 4 modelos. Los valores de  $R^2$  y  $Q^2$  se calcularon a partir de los modelos OPLS generados y fueron validados mediante el test de permutación ( $n=100$ , siendo  $n$  el número de permutaciones).

#### Selección de los metabolitos relevantes

Se generaron las listas VIP correspondientes a cada modelo gracias al software SIMCA-P v.14.1. El criterio impuesto para seleccionar aquellas señales de mayor relevancia en la discriminación de los distintos modelos OPLS estudiados fue un valor VIP superior a 1,5.

### Asignación de los metabolitos relevantes

La asignación de las señales seleccionadas se llevó a cabo empleando información disponible en bases de datos especializadas en metabolómica (HMDB y BMRB), la biblioteca *Spectral database* (SBASE) (Bruker Biospin, Alemania), información recogida en la bibliografía sobre la asignación de metabolitos en muestras de exudado linfático, y espectros RMN de compuestos patrón de metabolitos adquiridos previamente en el laboratorio. Por otra parte el software Chenomx NMR Suite v.8.1 (Chenomx Inc, Canadá), que contiene algoritmos específicos, facilitó la identificación de metabolitos de manera automática.

### Integración de los metabolitos relevantes

El siguiente paso consistió en la integración específica de todas las señales de los metabolitos que resultaron relevantes en el análisis multivariante empleando el módulo *Variable Size Bucketing* en AMIX v.3.9.7 (Bruker Biospin, Alemania).

Posteriormente se seleccionó la señal del espectro más representativa del comportamiento de cada metabolito. Para este propósito se tomaron como criterios la reproducibilidad de la señal (menor solapamiento con otras señales de espectro) y la coherencia en el sentido de la variación en las distintas señales.

### Análisis estadístico univariante

El análisis estadístico univariante consistió en una prueba de correlación entre las intensidades de los metabolitos y el grado de afectación nodular, evaluado tanto por el número de nódulos metastásicos como por la clasificación AJCC. Mediante el software R se calcularon los coeficientes de correlación de Spearman. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos valores correspondientes a un *p-value* < 0,05 (intervalo de confianza de 95%). La variación se representó gráficamente mediante diagramas de barras, empleando el programa GraphPad Prism v.5.03 (GraphPad Software, EE.UU).

### 3.4. Interpretación biológica de los resultados

Finalmente se llevó a cabo la interpretación biológica de las variaciones metabólicas estadísticamente significativas asociadas al aumento del grado de afectación nodular. Para ello, se realizó una extensa búsqueda en bases de datos (HMDB, y *Small Molecule Pathway Database* (SMPDB)) y en bibliografía adicional con el fin de interpretar la alteración de estos metabolitos en el contexto de metastásis nodular en pacientes con melanoma. A través de la plataforma MetaboAnalystse realizó un análisis de enriquecimiento funcional (MSEA) para determinar las principales rutas metabólicas potencialmente alteradas a partir de los metabolitos identificados (Xia y Wishart, 2011).



# 4. Resultados y discusión



## Resultados y discusión

### 4.1. Adquisición de los datos

Las variables clínicas de los 12 pacientes incluidos en el estudio se muestran en la Tabla 2. Los grupos se designan según la clasificación AJCC, teniendo en cuenta el número de nódulos linfáticos metastásicos que presentaba cada paciente y según si la diseminación era considerada microscópica o macroscópica.

Tabla 2. Información clínica asociada a los pacientes incluidos en el estudio.

Número de muestra	Grupo AJCC	Número de nódulos linfáticos metastásicos	Estado durante el seguimiento
1	N3	4	SEE
2	N1b	1	SEE
3	N2a	3	SEE
4	N1a	1	SEE
5	N2	ND	SEE
6	N2b	2	SEE
7	N1a	1	SEE
8	N1a	1	SEE
9	N2a	2	SEE
10	N1a	1	SEE
11	N2a	2	SEE
12	N3	18	Metástasis hepática

ND: No disponible, SEE: Sin Evidencia de Enfermedad

Entre las variables clínicas cabe destacar la ausencia de información en cuanto al número de nódulos metastásicos de la muestra 5. Esta muestra sólo pudo ser incluida por tanto en los análisis que toman como variable la clasificación AJCC. Por otra parte, la revisión de las variables clínicas permitió observar que la muestra 12 presenta un número de nódulos linfáticos metastásicos muy elevado en comparación con el resto. Dicho número está en todo caso comprendido entre 1 y 4 a

## Resultados y discusión

excepción de dicha muestra, que alcanza los 18 nódulos. El paciente en cuestión presenta un estado muy avanzado de la enfermedad y el comportamiento de la muestra obtenida podría deberse a otras condiciones patológicas asociadas. En el seguimiento posterior del paciente se identificó metástasis hepática, por lo que es probable que este factor esté influyendo en los resultados obtenidos. Finalmente se decidió excluir la muestra 12 y se continuó el análisis con el resto de muestras.

Gracias a un correcto proceso de recogida de las muestras de acuerdo a los protocolos establecidos y a una adecuada preparación, se obtuvieron espectros de buena calidad para todos los grupos.

Como se describió anteriormente, para cada muestra de exudado linfático se adquirieron dos sets de experimentos estándar correspondientes a las secuencias de pulsos 1D NOESY y CPMG, cada uno con sus ventajas e inconvenientes. En la Figura 3 se muestran para una misma muestra dos espectros representativos de cada set de experimentos.

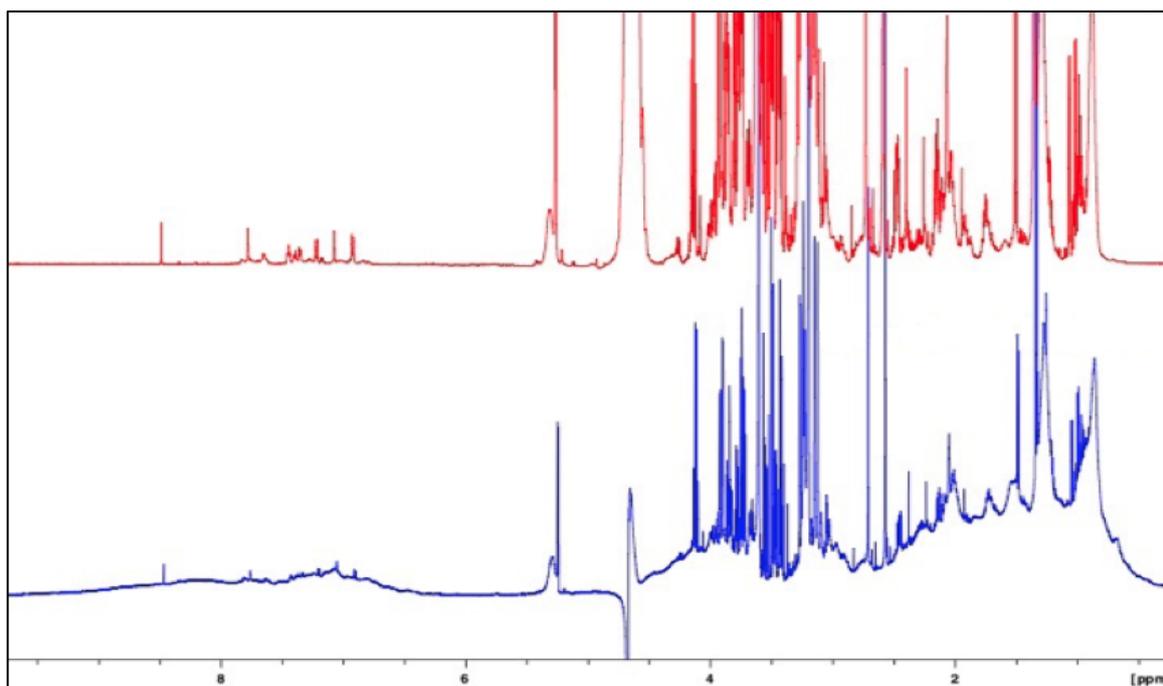


Figura 3. Conjunto de espectros  $^1\text{H}$ -RMN 1D de exudado linfático representativos de las secuencias de pulsos CPMG (rojo) y NOESY (azul).

Las muestras fueron extraídas del sistema linfático, cuyas funciones principales incluyen: i) el mantenimiento de la homeostasis fluida mediante la eliminación de la linfa rica en proteínas del espacio extracelular entre los tejidos y su retorno al torrente sanguíneo y ii) la absorción de grasa en los órganos gastrointestinales (Escobedo y Oliver, 2017). Es por ello que este biofluido presenta

señales correspondientes a metabolitos de alto peso molecular, como lípidos y proteínas de gran tamaño que se superponen al resto de señales dificultando la identificación y cuantificación de metabolitos de menor peso molecular localizados en regiones próximas en el espectro. La principal ventaja del CPMG frente a NOESY reside en la eliminación de estas señales, por lo que observamos en los espectros una mejora en la resolución. Utilizamos en consecuencia el set de experimentos 1D CPMG para el análisis estadístico multivariante al presentar señales de mayor calidad para ser integradas.

### 4.2. Análisis estadístico

#### 4.2.1. Análisis multivariante

##### Análisis no supervisado

En primer lugar se lleva a cabo el análisis no supervisado de los datos, a través de los modelos PCA generados, como estudio exploratorio de la variabilidad entre muestras.

Este análisis permitió:

- Identificar la presencia de agrupaciones debidas a otras variables clínicas o instrumentales que pudiesen interferir con el análisis.
- Identificar las muestras con un comportamiento distinto (*outliers*) al resto de muestras del estudio.

Los gráficos  $T_2$  de Hotelling, que determinan aquellas muestras que se encuentran fuera del intervalo de confianza del 95% en el modelo no supervisado PCA (Figura 4), permitieron confirmar la ausencia de *outliers*.

El análisis del modelo PCA incluyendo todas las muestras, permitió observar agrupaciones debidas a variables distintas a los grupos del estudio. Las muestras separadas por la componente principal 1, que explica la mayor parte de la variabilidad (33,4%), no corresponden a una separación en función del grado de afectación nodular, tal y como se muestra en la Figura 4. Las variables que contribuían a dicha agrupación en el modelo multivariante fueron analizadas pero no fue posible identificar la fuente de tal variabilidad. Por otra parte la componente 2, que explica el 23,2% de la variabilidad, parecía separar las muestras en función de la variable de estudio.

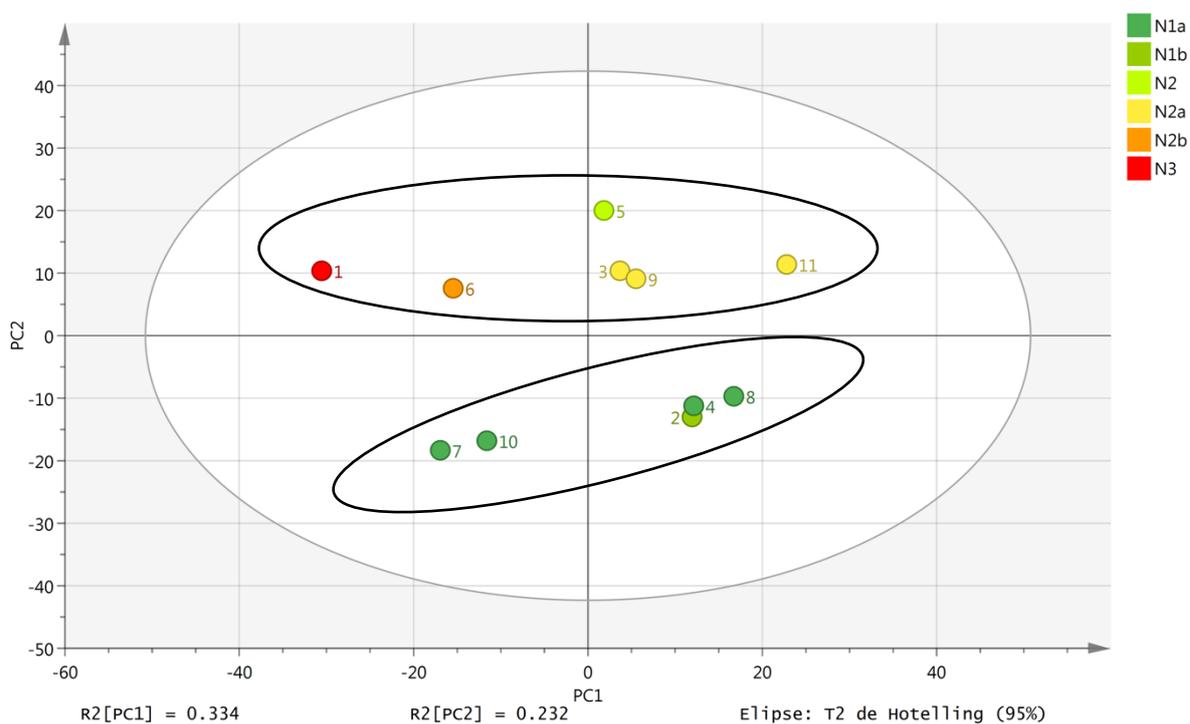


Figura 4. Análisis no supervisado mediante PCA (gráficos *Score Scatter* y T2 de Hotelling) de las 11 muestras incluidas en el estudio. Las componentes principales separan las muestras en grupos distintos a los esperados en el estudio. Las elipses indican las agrupaciones de las muestras (elipse superior, muestras contaminadas por EDTA; elipse inferior, muestras no contaminadas).

No obstante, tras revisar los espectros 1D CPMG de la totalidad de las muestras (Figura 5), fue posible identificar los *buckets* de mayor relevancia en la componente 2. Dichas regiones corresponden a la presencia de señales de EDTA ( $\delta_1 = 2.51 - 2.59$  ppm;  $\delta_2 = 2.66 - 2.72$  ppm;  $\delta_3 = 3.04 - 3.24$  ppm;  $\delta_4 = 3.55 - 3.68$  ppm) en la mitad de las muestras. Las muestras contaminadas correspondieron con aquellas de mayor afectación nodular, por lo que la componente 2 discriminaba por la variabilidad introducida por el EDTA y no por la variable de estudio.

Esta contaminación podría estar relacionada con la presencia del anticoagulante en los tubos de recolección durante la recogida de las muestras, en contradicción con los protocolos establecidos. La intensidad de estas señales en el espectro afecta a la de las señales localizadas en regiones próximas en el espectro. Debido al reducido número de muestras, no es posible descartar aquellas que están contaminadas, por lo que se decidió excluir las regiones correspondientes a las señales de EDTA en todos los espectros.

## Resultados y discusión

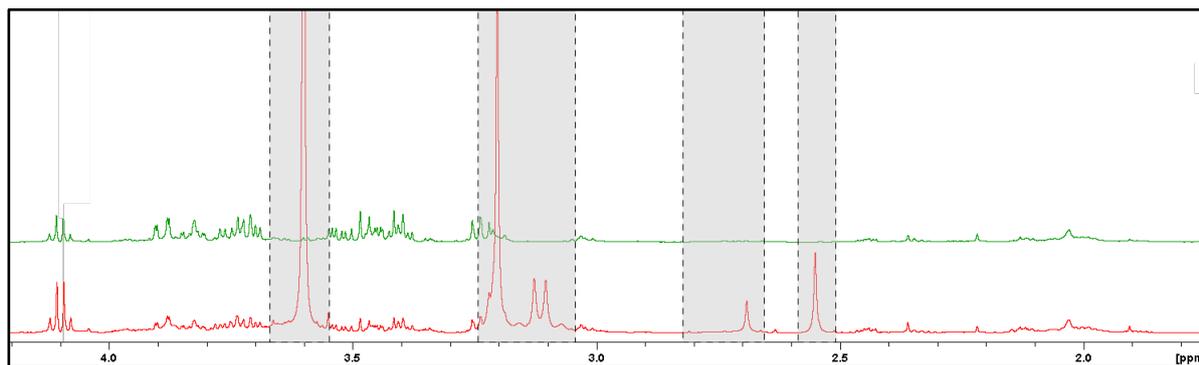


Figura 5. Superposición de espectros  $^1\text{H}$ -RMN 1D CPMG de exudado linfático representativos de la contaminación por EDTA ( $\delta_1 = 2,51 - 2,59$  ppm;  $\delta_2 = 2,66 - 2,72$  ppm;  $\delta_3 = 3,04 - 3,24$  ppm;  $\delta_4 = 3,55 - 3,68$  ppm) no deseada (rojo) y su ausencia (verde).

La identificación y análisis de *outliers* y/o tendencias es muy importante en los estudios de metabolómica ya que pueden representar fuentes de heterogeneidad no deseadas e interferir en los resultados. Una vez se ha realizado el análisis exploratorio de la variabilidad se lleva a cabo el análisis supervisado de los resultados con toda la información disponible.

### Análisis supervisado

El análisis supervisado se llevó a cabo a través de los modelos OPLS respecto a los datos con el método de escalado UV, puesto que presentaban mejores valores de ajuste y capacidad predictiva. Las comparaciones finalmente obtenidas son mostradas en la Tabla 3, que incluye sus respectivos valores de  $R^2$  y  $Q^2$ .

Tabla 3. Modelos OPLS analizados.

Modelo OPLS	Número de muestras	$R^2$	$Q^2$
Variable clasificación AJCC	11	0,945	0,647
Variable número de nódulos metastásicos	10	1	0,9

Los modelos generados presentaron valores de  $R^2$  y  $Q^2$  muy elevados, lo que refleja un alto ajuste del modelo (es decir, que el modelo describe correctamente las muestras) y una elevada

## Resultados y discusión

capacidad de predicción (el modelo es capaz de predecir la clasificación de nuevas muestras). Los gráficos *Score Scatter* de estos modelos se pueden observar en la Figura 6.

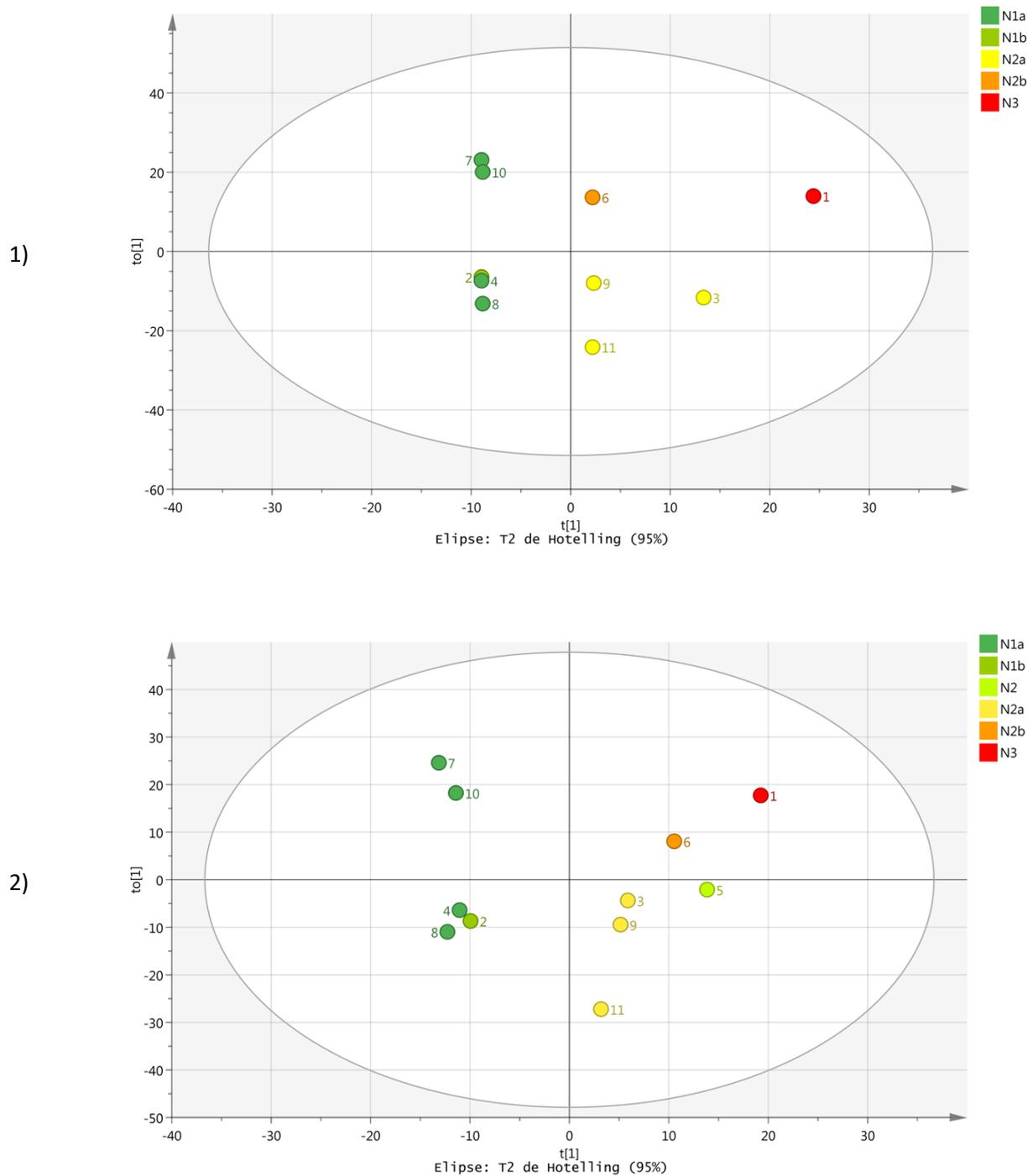


Figura 6. Análisis supervisado mediante modelos OPLS entre 1) los grupos creados en función del número de nódulos metastásicos y 2) los grupos de la clasificación AJCC. Gráficos *Score Scatter* y T<sup>2</sup> de Hotelling. La componente 1 separa las muestras en función del grado de afectación nodular.

### Selección de los metabolitos relevantes

El análisis de las listas VIP de los modelos OPLS estudiados llevó a la selección de *buckets* con un valor de VIP > 1,5, 124 provenientes de la clasificación AJCC y 137 de la clasificación por número de nódulos metastásicos. 103 *buckets* resultaron ser comunes a ambas listas, representando el 83% y el 75% respectivamente de cada VIP *List*. Las dos clasificaciones comparten mucha información en común por lo que no es posible asumir que sean complementarias. La pertenencia a un grupo de la clasificación AJCC se determina en parte por el número de nódulos metastásicos, a los que se añade la información del tipo de diseminación (micrometastásica o macrometastásica), pero se pierde información del número exacto de ganglios implicados. Ambas variables no son independientes, pero aportan información la una sobre la otra, por lo que es necesario tener en cuenta los resultados obtenidos en conjunto.

Una vez generada una lista común, la revisión de la VIP *List* del total de 261 variables seleccionadas permitió la identificación de *buckets* repetidos o correspondientes a línea base en el espectro que debían ser descartados. Finalmente un total de 85 variables resultaron relevantes en la discriminación de los modelos OPLS.

### Asignación de los metabolitos relevantes

La revisión de los espectros permitió relacionar los *buckets* obtenidos con 31 señales determinadas, que a través del programa Chenomx fueron asociadas a metabolitos compatibles con dicho desplazamiento químico. Gracias a compuestos patrón adquiridos por el laboratorio y a las bases de datos HMDB y BMRB, y la biblioteca SBASE (Bruker Biospin, Alemania), se asignaron 14 posibles metabolitos (Tabla 4) y se determinaron todas sus señales para ser integradas (46 señales).

Tabla 4. Metabolitos relevantes en la discriminación de los modelos OPLS.

<b>Metabolitos</b>	<b>Naturaleza</b>
Fenilalanina	Aminoácidos
Glutamato	
Glutamina	
Prolina	

## Resultados y discusión

---

Tirosina	
Serina	
Metionina	
Ácido acético	Ácidos orgánicos
Ácido butírico	
Ácido fórmico	
Ácidos grasos (=CH-CH <sub>2</sub> -CH=)	
Glucose	Monosacárido
Trimetilamina	Amina simple
GSH	Tripéptido
GSH, Glutati6n	

Los metabolitos identificados son intermediarios metab6licos de diferente naturaleza. Entre los resultados obtenidos destaca la gran cantidad de amino6cidos y 6cidos org6nicos. El estudio de EM en futuras etapas del proyecto podr3a permitir el an6lisis de un mayor n6mero de compuestos.

### Integraci6n de los metabolitos relevantes

Se integr6 un total de 46 se1ales seg6n los desplazamientos qu3micos espec3ficos de cada una de ellas por *Variable Size Bucketing*. A pesar de integrar todas las regiones correspondientes a cada uno de los 14 metabolitos, se descartaron aquellas que estaban solapadas con otros compuestos cercanos en el espectro y por tanto ten3an un comportamiento distinto al resto. Finalmente se seleccion6 la m6s representativa para cada uno, obteniendo 14 se1ales que presentaban buena calidad.

#### 4.2.2. An6lisis estad3stico univariante

Debido al reducido tama1o muestral (n6mero de muestras < 30) no es posible asumir una distribuci6n normal de los datos. Se realiz6 la prueba de Anderson-Darling para cada una de las se1ales

## Resultados y discusión

y los resultados indicaron que para el intervalo de confianza del 95% se debía rechazar la hipótesis nula de que los datos provienen de una población distribuida normalmente. Es por tanto que se decidió emplear una prueba no paramétrica. La correlación entre la intensidad de las señales de los metabolitos y el grado de afectación nodular, evaluado por una parte por el número de nódulos metastásicos, y por otra parte por el estadio de la clasificación AJCC, fue determinada a través de la prueba no paramétrica de Spearson. Los coeficientes de correlación de cada metabolito identificado en el análisis estadístico multivariante vienen representados en diagrama de barras en la Figura 7 acompañados de su significancia estadística.

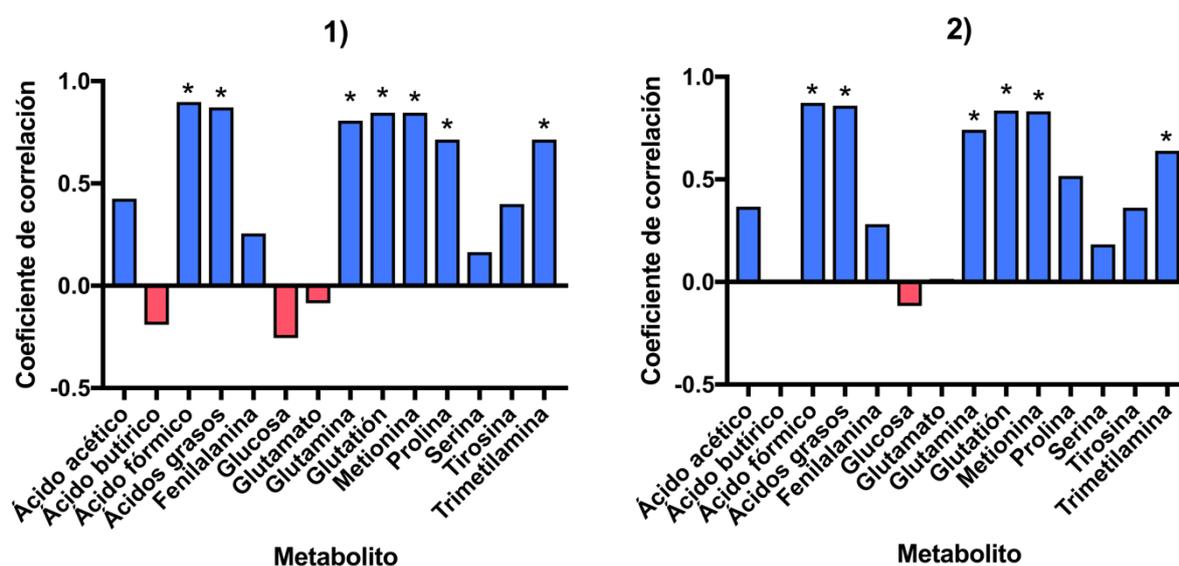


Figura 7. Representación del coeficiente de correlación entre la variable intensidad de los metabolitos identificados en el análisis multivariante y la variable 1) número de nódulos metastásicos o 2) clasificación AJCC. Las barras azules corresponden a correlaciones positivas y las barras rojas corresponden a correlaciones negativas. (\*) indica una correlación estadísticamente significativa ( $p\text{-value} < 0,05$ ).

El coeficiente de correlación de Spearson resultó significativo y de signo positivo para 7 metabolitos (prolina, formato, trimetilamina, metionina, glutamina, ácidos grasos (=CH-CH<sub>2</sub>-CH=), glutatió (GSH)).

### 4.3. Interpretación biológica de los resultados

## Resultados y discusión

La metabolómica basada en RMN ha sido empleada ampliamente para caracterizar los cambios metabólicos implicados en el melanoma primario *in vivo* e *in vitro* (Wang *et al.*, 2014). No obstante, una atención drásticamente menor ha sido prestada hacia los tumores secundarios. En particular la metástasis nodular, a pesar de su importancia pronóstica, no ha sido explorada en profundidad en la actualidad. Por lo que nos consta, se trata del primer estudio que caracteriza el perfil metabolómico de la metástasis ganglionar en exudado linfático. La utilización de dicho biofluido es muy novedosa y permite una visión nueva sobre este tipo de tumor.

El MSEA llevado a cabo sobre los metabolitos identificados como relevantes en la progresión de la enfermedad mediante el análisis multivariante es representado en la Figura 8. A pesar de que no todos ellos resultaron significativamente aumentados o disminuidos de manera aislada, es posible que a nivel de ruta metabólica sí que haya una alteración significativa, que corresponde a la obtención de un *p-value* inferior a 0,05. El MSEA permite determinar rutas metabólicas potencialmente alteradas en el desarrollo de la metástasis, sin embargo no permite analizar en qué sentido ni en qué paso de la ruta.

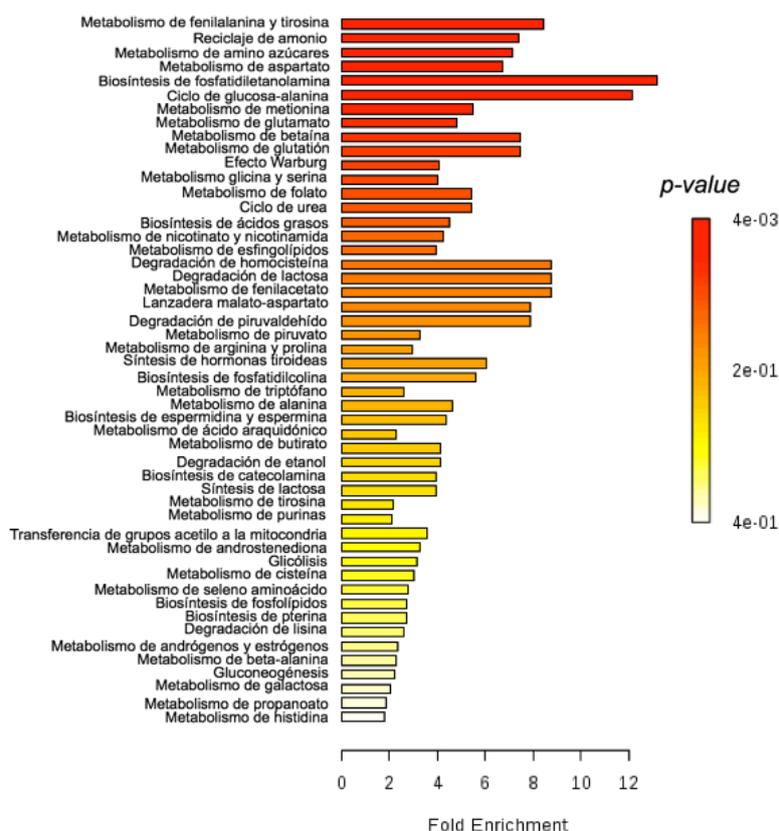


Figura 8. Análisis de enriquecimiento funcional. Principales rutas metabólicas en las que están implicados los metabolitos relevantes obtenidos en el análisis multivariante. *P-value* < 0,05 indica una alteración significativa.

## Resultados y discusión

---

Las células cancerosas se someten a una reprogramación metabólica específica para mantener el crecimiento y la proliferación celular. Además de un gran requerimiento energético, las células cancerosas también acumulan metabolitos para la construcción de nuevos componentes celulares, incluidos ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, así como cofactores importantes para el mantenimiento del estado de oxido-reducción celular (Amelio *et al.*, 2014).

Al igual que muchos otros tipos de cáncer, la mayoría de las células de melanoma que proliferan rápidamente metabolizan la glucosa en lactato independientemente de los niveles de oxígeno, un proceso conocido como glucólisis aeróbica o el "efecto Warburg", en honor a Otto Warburg, quien describió por primera vez la propensión de las células tumorales para utilizar preferentemente la glucólisis (Warburg *et al.*, 1927). En células tumorales en proliferación, este metabolismo puede suministrar el ATP y el resto de los materiales necesarios para la supervivencia y proliferación. El análisis de enriquecimiento funcional muestra que las células de melanoma tienen alterada esta ruta metabólica (Figura 8).

Los resultados obtenidos a partir de los perfiles metabólicos analizados permiten observar una acumulación significativa de ciertos aminoácidos (glutamina, metionina y prolina). El MSEA revela que los metabolismos de fenilalanina y tirosina, aspartato, metionina, glutamato, glicina y serina están alterados significativamente.

Estudios previos demostraron que los niveles de aminoácidos son más altos en varios tejidos tumorales, incluidos los cánceres de pulmón, colon y estómago, en comparación con los tejidos normales (Kim *et al.*, 2017). Esta observación podría coincidir con la reprogramación del metabolismo de ciertos aminoácidos para cubrir el incremento de la necesidad de producir estructuras celulares debido a la rápida proliferación.

Otra posibilidad es que los aminoácidos sean importados desde el exterior de las células. La principal fuente de aminoácidos son los productos degradados de la matriz extracelular, especialmente aquellos degradados por metaloproteasas de matriz (MMP). Su absorción está mediada por transportadores de aminoácidos, altamente regulados positivamente en células cancerígenas para satisfacer la gran demanda de estos metabolitos (Fischer *et al.*, 2018). El exudado linfático, vía de transporte de proteínas desde los tejidos, podría acumular aminoácidos debido al aumento de este tránsito.

## Resultados y discusión

Sin embargo, los distintos aminoácidos alterados podrían estar asociados a otros procesos metabólicos. Entre ellos, la glutamina resultó regulada positivamente en diversos estudios de metabolómica basada en RMN de protón sobre biopsias de melanoma primario y metástasis nodulares (Bourne *et al.*, 2005) (Dobrota *et al.*, 1995).

Este hecho podría coincidir con la alteración en células metastásicas del metabolismo del glutamato según el MSEA, en el que la glutamina está estrechamente implicada. Varios estudios evidencian que ciertas alteraciones oncogénicas en las células cancerosas reprograman el metabolismo de la glutamina para permitir una absorción incrementada y favorecer su metabolización (Figura 9) (Yang *et al.*, 2017).

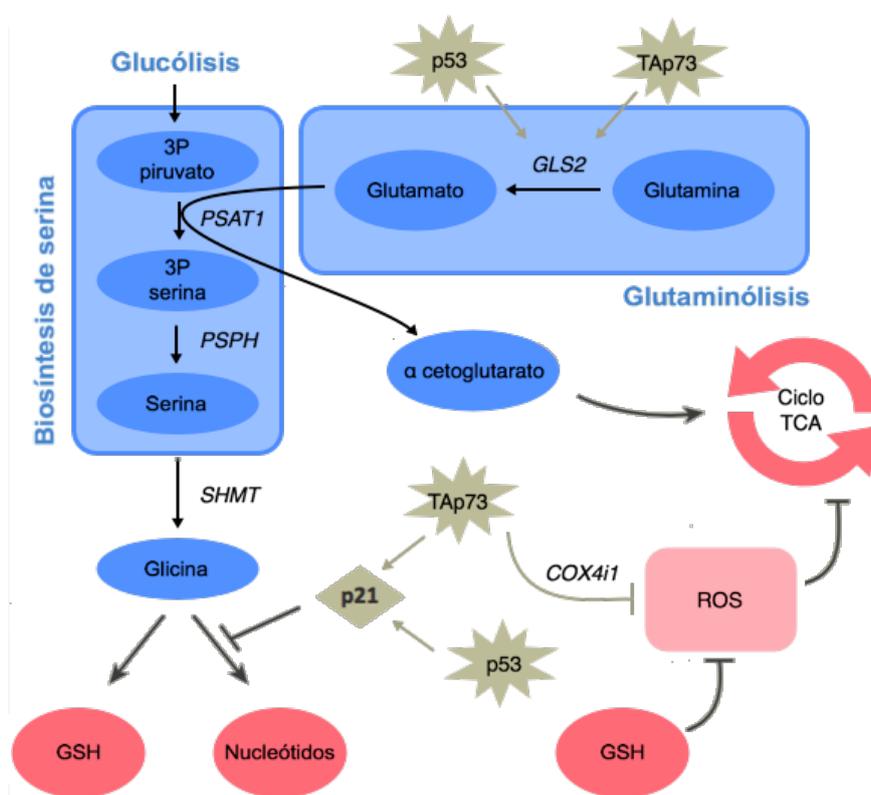


Figura 9. Mutaciones oncogénicas (Tap73 o p53) incrementan la glutaminólisis, provocando aumento de la síntesis de glutatión (GSH) que reduce el estrés oxidativo provocado por las especies reactivas de oxígeno (ROS), y la síntesis de  $\alpha$ -cetoglutarato que alimenta el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). TAp73 impulsa la conversión de glutamina / glutamato mediante la inducción de la expresión de la glutaminasa-2 (GLS-2), empujando así la ruta biosintética de la serina, mientras que reprime las ROS intracelulares por inhibición de la expresión de la subunidad 4 de la isoforma 1 de la citocromo C oxidasa (COX4i1). La vía de síntesis de serina utiliza el 3P-piruvato proveniente de un intermedio glucolítico, y el glutamato proveniente de la glutaminólisis, que se convierten mediante la fosfoserina aminotransferasa 1 (PSAT-1) y la fosfoserina fosfatasa (PSPH) en serina y  $\alpha$ -cetoglutarato. La activación dependiente de p53 de p21 induce la detención transitoria del ciclo celular, bloqueando el flujo hacia las purinas y favoreciendo de esta forma la síntesis de GSH. Imagen adaptada de Amelio *et al.* (2014).

## Resultados y discusión

---

Las células metastásicas dependen en mayor medida de la glutaminólisis para permitir su rápido crecimiento como fuente de energía alternativa, carbono y nitrógeno (Bourne *et al.*, 2005) (Ramachandran y Yeow, 2017). La glutamina proporciona precursores críticos para aminoácidos no esenciales, nucleótidos y lípidos que permiten su supervivencia, proliferación y mantenimiento del estado redox. Muchas células cancerosas se ven sometidas a una reprogración metabólica que las vuelve dependientes de la anaplerosis de la glutamina, que proporciona  $\alpha$ -cetoglutarato para alimentar el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA).

El MSEA muestra que el metabolismo Serina/Glicina, favorecido por la glutaminólisis e implicado en la generación del antioxidante GSH y de purinas, está significativamente alterado durante la progresión de la metastásis en el presente estudio. Dicha alteración podría ser debida a una activación de la ruta metabólica para asegurar la supervivencia celular.

En individuos sanos, los músculos esqueléticos son los mayores productores de glutamina. En presencia de tumores, se demostró una depleción de glutamina muscular y una pérdida de peso, mostrando una movilización desde dicho órgano (Yang *et al.*, 2017). Puesto que las células metastásicas aumentan su dependencia hacia dicho aminoácido, es posible que el aumento de glutamina en el exudado linfático durante la progresión de la metástasis esté asociado a su transporte desde los músculos hasta los nódulos linfáticos.

El presente estudio revela también el incremento significativo de ácidos grasos de grupo funcional  $=CH-CH_2-CH=$  con la gravedad de la metástasis ganglionar. Este hecho puede ser interpretado de diversas formas. Por una parte, un aumento de los ácidos grasos ha sido observado en melanoma en distintos estudios. Entre ellos un estudio de  $^1H$  RMN realizado en muestras obtenidas de tejido tumoral reveló la importancia del metabolismo lipídico en la progresión de la enfermedad (Fedele *et al.* 2013). En él se describe que las células tumorales estimulan la movilización de los lípidos (lipólisis) de depósitos y tejidos, provocando caquexia e hiperlipidemia. La pérdida de tejido adiposo observada en pacientes con cáncer que desarrollan caquexia era asociada a un aumento de la concentración plasmática de glicerol y de los ácidos grasos libres, indicando un aumento de la lipólisis y disminución de la lipogénesis en el tejido periférico. Puesto que el exudado linfático entre sus funciones cumple con el transporte lipídico, es posible que los resultados obtenidos en el presente estudio coincidan con estos hechos.

Es también posible que estos metabolitos provengan de una síntesis incrementada de ácidos grasos. De hecho, su ruta biosintética se ve significativamente alterada durante la progresión de la

## Resultados y discusión

---

metástasis nodular según los resultados del MSEA del presente estudio. Los ácidos grasos forman la base estructural de las membranas celulares y orgánicas, por lo que las células proliferativas requieren un gran suministro para formar estas estructuras.

Estudios anteriores demuestran que en muchos tipos de tumores, incluido el melanoma, el factor de transcripción de la ácido graso sintasa (FASN) que cataliza el paso limitante de la velocidad de la síntesis endógena de ácidos grasos, está activado constitutivamente (Saab *et al.*, 2017). Se cree que el aumento de FASN proporciona una ventaja para la supervivencia de las células tumorales promoviendo un "fenotipo lipogénico", puesto que éstas contienen niveles más altos de fosfolípidos que las células normales. Estos metabolitos promueven la proliferación celular y la transducción de señales. La alteración de la composición de fosfolípidos ayuda a las células cancerosas en la invasión, metástasis y expresión de receptores a factores de crecimiento (Ramachandran y Yeow 2017). Scott *et al.* (2011) determinaron que la ruta de síntesis de ácidos grasos resultaba crítica para la proliferación de células de melanoma.

Los lípidos pueden también proporcionar una ventaja energética. La oxidación de ácidos grasos parece desempeñar un papel importante en la promoción de la progresión del melanoma. Los estudios en otros tipos de tumores han demostrado que pueden proporcionar un refuerzo de ATP para las células tumorales cuando sea necesario en condiciones de depleción de nutrientes (Fischer *et al.*, 2018). El proceso de metástasis es muy exigente, por lo que una  $\beta$ -oxidación altamente eficiente podría proporcionar una mayor probabilidad de supervivencia a las células lejos del tumor primario (Fischer *et al.*, 2018).

Por todo ello, es posible que la correlación positiva observada entre los niveles de ácidos grasos ( $=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$ ) y la metástasis ganglionar se deba a las ventajas que proporcionan estos metabolitos para la proliferación y supervivencia.

Por otra parte, otro metabolito destacado por el presente estudio ha sido la trimetilamina, molécula que forma la colina. Múltiples estudios de  $^1\text{H}$  RMN han revelado un aumento significativo de compuestos derivados de colina en distintos biofluidos e incluso en linfa (Stretch *et al.*, 2005) (Lean *et al.*, 2003). La correlación positiva significativa obtenida podría ser debida al aumento de este tipo de compuestos en el exudado linfático.

En algunos contextos, se ha encontrado que el metabolismo de la colina aumenta durante la progresión del tumor. Es por ello que la colina fue aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) como biomarcador de neoplasia maligna avanzada (Locasale,

## Resultados y discusión

2013). Este metabolito forma la base de la fosfocolina, precursor y un producto de degradación del principal componente de la membrana, la fosfatidilcolina. Por lo que estos resultados serían consistentes con la hipótesis del aumento de ácidos grasos para formar el fenotipo lipogénico de las células tumorales.

El metabolismo de la colina está estrechamente relacionado con el metabolismo de un carbono (Figura 10). Este metabolismo requiere serina, metionina y betaína derivada de colina para alimentar el ciclo. El aumento significativo de los niveles de metionina y colina observado en el presente estudio podría por tanto estar relacionada con una activación del metabolismo de un carbono, que constituye una importante vía metabólica de la que dependen la síntesis de proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y otros cofactores. El ciclo de folato acoplado al ciclo de metionina constituyen esta ruta bicíclica que circula unidades de carbono (Locasale, 2013).

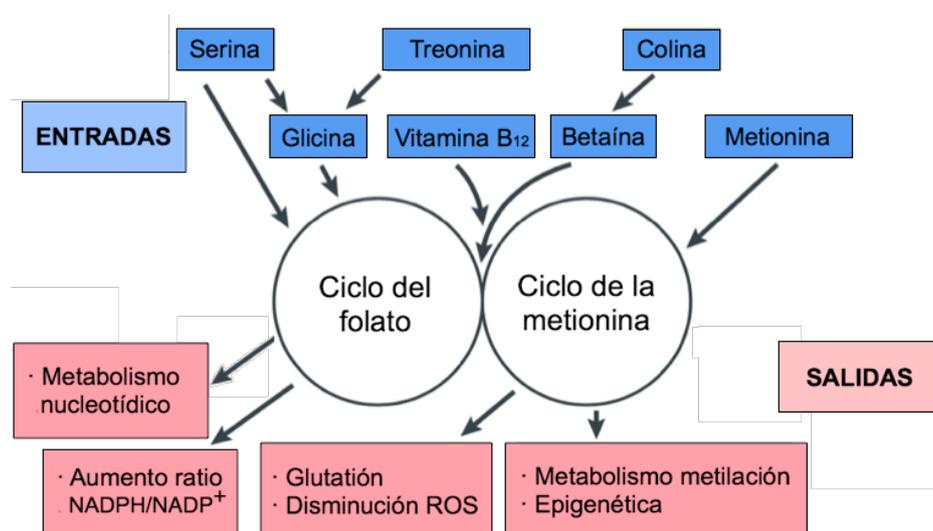


Figura 10. El metabolismo de un carbono como integrador de distintas rutas metabólicas. Las fuentes de nutrientes que implican aminoácidos (en azul) se importan o se sintetizan de novo (como la betaína), y alimentan el metabolismo de carbono. Dicho metabolismo está compuesto por dos unidades modulares que comprenden el ciclo de folato y el ciclo de metionina. Los nutrientes se procesan a través de estos ciclos metabólicos y se pueden generar múltiples salidas (en rojo), incluidos nucleótidos, poder de reducción y sustratos para reacciones de metilación. NADPH, Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida; NADP<sup>+</sup>, Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada. Imagen adaptada de Locasale (2013).

En esta vía, la serina se convierte en glicina a través de la serina hidroximetil-transferasa (SHMT1) en una reacción que también metila el tetrahidrofolato (THF) en 5,10-metilentetrahidrofolato. La metilentetrahidrofolato reductasa deshidrogenasa 1 (MTHFD1)

## Resultados y discusión

---

posteriormente cataliza una serie de tres reacciones, la primera de las cuales produce nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH) a partir de su versión oxidada (NADP<sup>+</sup>) para su uso en reacciones de oxido-reducción (Amelio *et al.*, 2014).

A lo largo de la progresión tumoral, y en particular al comienzo de la metástasis, las células de melanoma deben ajustar y fortalecer sus defensas antioxidantes para sobrevivir a las condiciones de estrés oxidativo a las que son sometidas debido al incremento de ROS. Estas especies son formadas por mutaciones oncogénicas, vías de señalización aberrantes, proliferación no regulada e hipoxia (DeBerardinis y Chandel, 2016). Si bien los niveles mínimos de ROS en realidad son beneficiosos para las células tumorales al estimular la proliferación e inducir mutaciones, un exceso de ROS puede provocar daños y eventualmente apoptosis, a través de la oxidación de proteínas ADN y lípidos (DeBerardinis y Chandel, 2016).

Las células tumorales aumentan su dependencia de la glutatión peroxidasa para controlar el estrés oxidativo. Esta proteína utiliza GSH para convertir peróxidos en agua. La glutatión reductasa necesita NADPH para restaurar el glutatión desde su estado oxidado GSSG, convirtiendo a este metabolito en un componente crítico del equilibrio redox en las células de melanoma (Locasale, 2013).

Al comienzo de la tumorigénesis, la ruta de la pentosa-fosfato suministra la mayoría del NADPH utilizado por esta enzima, suficiente para controlar el estrés oxidativo provocado la intensa proliferación (Cazes y Ronai, 2016). Sin embargo, el papel del metabolismo de un carbono se vuelve cada vez más importante a medida que progresa la tumorigénesis y comienza el proceso de metástasis, la glucosa escasea y la hipoxia se convierte en una fuente más significativa de ROS (DeBerardinis y Chandel, 2016). Una publicación relativamente reciente (Piskounova *et al.*, 2015) demostró que las células del melanoma pueden reprogramar este metabolismo para el tratamiento de ROS deletéreas durante la metástasis (Figura 11). El estudio mostró de forma complementaria, que la inhibición de esta ruta evitaba la formación de metástasis a distancia sin afectar el crecimiento tumoral subcutáneo, demostrando la importancia de este metabolismo en la propensión metastásica del melanoma.

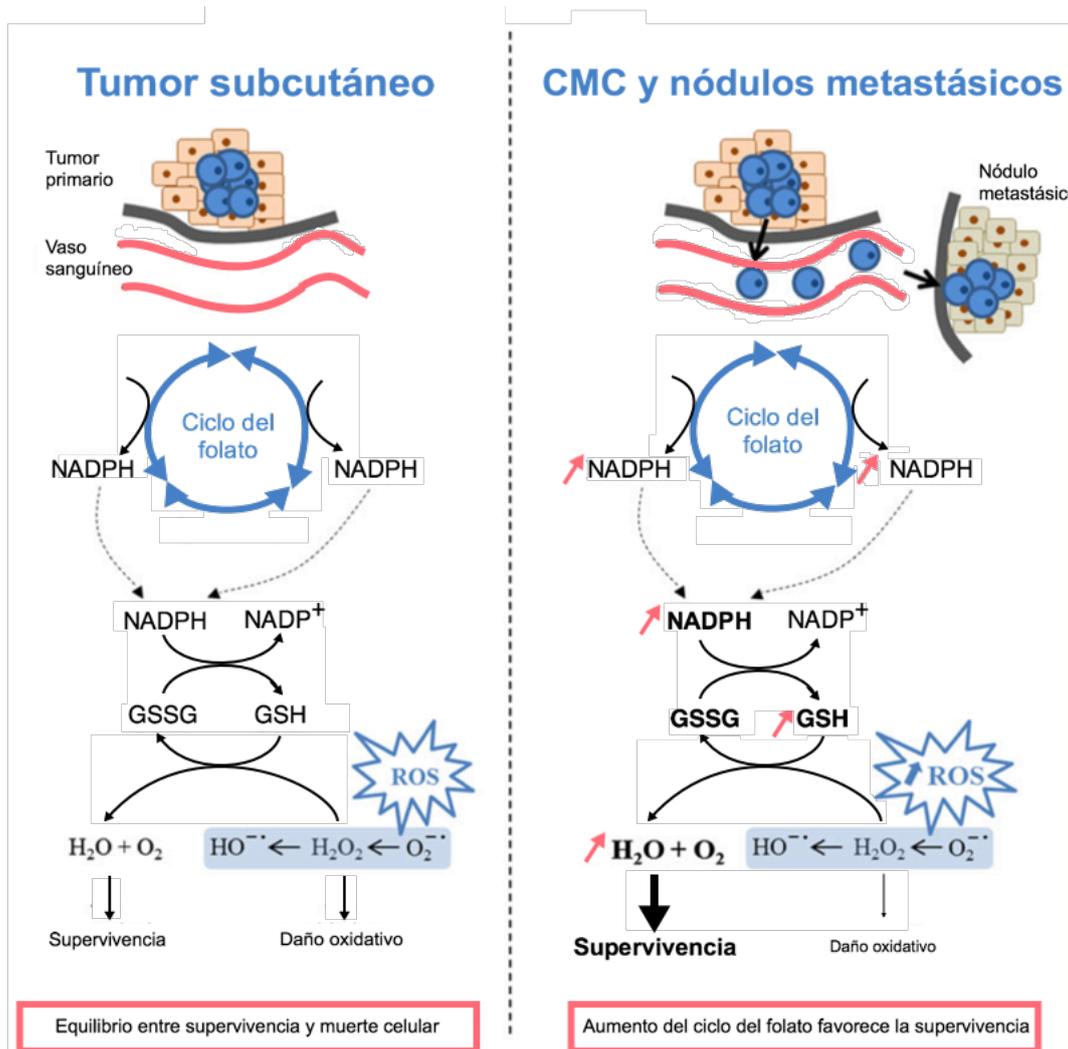


Figura 11. La activación de la ruta del folato, implicada en metabolismo de un carbono, amortigua el estrés oxidativo y promueve la supervivencia en células con metástasis de melanoma. En el tumor subcutáneo primario, el nivel de ROS se mantiene controlado. El metabolismo del folato es una ruta antioxidante que está involucrada en el mantenimiento del estado redox de las células. Dentro del tumor, se alcanza un equilibrio entre la muerte celular inducida por daño oxidativo y la supervivencia. Tanto en las células de melanoma circulantes (CMC), como en los nódulos metastásicos, las células se ven sometidas a un alto nivel de ROS que reduce la supervivencia. Aquellas células que sobreviven muestran una activación de la ruta del folato, que provoca una mayor producción de NADPH. Este NADPH es utilizado para reducir el glutatión oxidado (GSSG) en glutatión (GSH). Un alto nivel de GSH puede reducir el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, protegiendo así las células de los daños oxidativos. Imagen adaptada de Piskounova *et al.* (2015).

Las rutas de la metionina y del folato, componentes de dicho metabolismo resultan significativamente alteradas según el MSEA. El análisis también reveló que otros metabolismos involucrados como el de betaína, glutatión y glicina/serina, estaban alterados. El presente estudio

## Resultados y discusión

---

revela la correlación positiva de GSH con el grado de afectación nodular, que podría ser debido a la activación del metabolismo de un carbono, cuyo producto final es dicho metabolito.

Por último la prolina, aminoácido regulado positivamente en la progresión de la metástasis nodular según los resultados obtenidos, podría estar también relacionada con el mantenimiento del estado redox. Estudios anteriores afirmaban que las células de melanoma sintetizan este aminoácido en un grado significativamente mayor que los melanocitos (Scott *et al.*, 2011). En tejidos normales, la prolina puede ser sintetizada a partir de 2 aminoácidos diferentes: desde glutamato, empleando Nicotin Adenin Dinucleótido reducido (NADH), o desde arginina, consumiendo NADPH. No obstante, los melanomas no expresan la arginina sintetasa por lo que dependen del glutamato para sintetizar la prolina. Trabajos realizados en este tipo de cáncer indican que las células de melanoma sintetizan dicho aminoácido a través de este metabolismo, reponiendo el suministro celular de Nicotin Adenin Dinucleótido oxidado (NAD<sup>+</sup>) para su uso en la glucólisis, y preservando al mismo tiempo NADPH necesario para las reacciones anabólicas y para controlar el estrés oxidativo (Fischer GM *et al.*, 2018). Los resultados obtenidos podrían estar asociados a la activación de esta ruta metabólica.

De manera global, los resultados obtenidos están en coherencia con estudios previos realizados en el contexto de la condición patológica. Las alteraciones metabólicas que sugiere el presente estudio son comunes entre las enfermedades oncológicas y proporcionan ventajas para la supervivencia y proliferación de las células tumorales tanto en el tumor primario como para su metástasis. Análisis posteriores son necesarios en futuras etapas del proyecto de investigación para confirmar y validar los cambios metabólicos identificados.

# 5. Conclusiones

## Conclusiones

---

## Conclusiones

---

El presente estudio demuestra que la metabolómica por  $^1\text{H}$ -RMN constituye una herramienta con potencial y mínimamente invasiva para la caracterización del perfil metabolómico de la metástasis ganglionar en pacientes con melanoma. Se ha podido confirmar la correlación positiva entre los niveles de formato, glutamina, ácidos grasos ( $=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$ ), GSH, prolina, metionina, y trimetilamina y el grado de afectación nodular. El análisis de la firma metabólica ha permitido relacionar alteraciones en los niveles de dichos metabolitos con la información conocida sobre la fisiopatología de la enfermedad, identificando de esta forma los cambios metabólicos potencialmente implicados en la progresión de la enfermedad y la metástasis. Existe una correlación entre la propensión metastásica del melanoma y la reprogramación de su metabolismo, que le confiere ventajas para la supervivencia de las células lejos del tumor primario. Los resultados obtenidos podrían estar relacionados con la alteración de la composición lipídica de las células tumorales, la acumulación de metabolitos para proveer energía y estructuras que permitan la rápida proliferación, y el mantenimiento del estado redox de las células para su supervivencia a las condiciones de estrés oxidativo a las que son sometidas en su metástasis.

Las nociones obtenidas en el presente estudio permiten profundizar el conocimiento de la propensión metastásica del melanoma a pesar de sus limitaciones. La continuación del proyecto de investigación mediante estudios de espectrometría de masas o lipidómica, así como una ampliación del tamaño muestral, podría permitir una caracterización más precisa.

La metabolómica por  $^1\text{H}$ -RMN es ampliamente utilizada para identificación de nuevos biomarcadores con valor pronóstico y predictivo de forma mínimamente invasiva. El presente estudio apoya y ayuda la investigación en este campo para explorar el potencial de las firmas metabólicas en la práctica clínica.

## Conclusiones

---

# 6. Referencias

## Referencias

---

1. ALI, Z.; YOUSAF, N. AND LARKIN, J., 2013. Melanoma epidemiology, biology and prognosis. *EJC supplements*, 11(2), p.81.
2. AMELIO, I.; CUTRUZZOLÁ, F.; ANTONOV, A.; AGOSTINI, M. AND MELINO, G., 2014. Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends in biochemical sciences*, 39(4), pp.191-198.
3. AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018. *Cancer facts & figures*, Atlanta, Georgia, visto el 25 de Mayo de 2018. <https://www.cancer.org/es>
4. APALLA, Z.; LALLAS, A.; SOTIRIOU, E.; LAZARIDOU, E. AND IOANNIDES, D., 2017. Epidemiological trends in skin cancer. *Dermatology practical & conceptual*, 7(2), p.1.
5. BARDING JR, G.A.; BÉNI, S.; FUKAO, T.; BAILEY-SERRES, J. AND LARIVE, C.K., 2012. Comparison of GC-MS and NMR for metabolite profiling of rice subjected to submergence stress. *Journal of Proteome Research*, 12(2), pp.898-909.
6. BECKONERT, O.; KEUN, H.C.; EBBELS, T.M.; BUNDY, J.; HOLMES, E.; LINDON, J.C. AND NICHOLSON, J.K., 2007. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature protocols*, 2(11), p.2692.
7. BOURNE, R.M.; STANWELL, P.; STRETCH, J.R.; SCOLYER, R.A.; THOMPSON, J.F.; MOUNTFORD, C.E. AND LEAN, C.L., 2005. In vivo and ex vivo proton MR spectroscopy of primary and secondary melanoma. *European journal of radiology*, 53(3), pp.506-513.
8. BUJAK, R.; STRUCK-LEWICKA, W.; MARKUSZEWSKI, M.J. AND KALISZAN, R., 2015. Metabolomics for laboratory diagnostics. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 113, pp.108-120.
9. CAZES, A. AND RONAI, Z.E.A., 2016. Metabolism in melanoma metastasis. *Pigment cell & melanoma research*, 29(2), pp.118-119.
10. CRAIG, A.; CLOAREC, O.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J.K. AND LINDON, J.C., 2006. Scaling and normalization effects in NMR spectroscopic metabonomic data sets. *Analytical chemistry*, 78(7), pp.2262-2267.
11. DAVIS, P.G.; SERPELL, J.W.; KELLY, J.W. AND PAUL, E., 2011. Axillary lymph node dissection for malignant melanoma. *ANZ journal of surgery*, 81(6), pp.462-466.
12. DEBERARDINIS, R.J. AND CHANDEL, N.S., 2016. Fundamentals of cancer metabolism. *Science advances*, 2(5), p.e1600200.
13. DOBROTA, D.; PEC, J.; PEC, M.; SALON, F.; LIPTAJ, T.; PRÓNAYOVÁ, N.; KASPAROVÁ, S. AND DOBIÁS, J., 1995. Study of malignant melanoma using <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Bratislavské lekarske listy*, 96(3), pp.134-136.
14. DUNN, W.B.; BROADHURST, D.I.; ATHERTON, H.J.; GOODACRE, R. AND GRIFFIN, J.L., 2011. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chemical Society Reviews*, 40(1), pp.387-426.
15. EDGE, S.B. AND AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER, 2010. *AJCC cancer staging handbook: from the AJCC cancer staging manual* (Vol. 2010, p. 718). New York: Springer.
16. EIGNER, K.; FILIK, Y.; MARK, F.; SCHÜTZ, B.; KLAMBAUER, G.; MORIGGL, R.; HENGSTSCHLÄGER, M.; STANGL, H.; MIKULA, M. AND RÖHRL, C., 2017. The unfolded protein response impacts melanoma progression by enhancing FGF expression and can be antagonized by a chemical chaperone. *Scientific reports*, 7(1), p.17498.
17. ESCOBEDO, N. AND OLIVER, G., 2017. The lymphatic vasculature: its role in adipose metabolism and obesity. *Cell metabolism*.

18. FEDELE, T.A.; GALDOS-RIVEROS, A.C.; E MELO, H.J.D.F.; MAGALHÃES, A. AND MARIA, D.A., 2013. Prognostic relationship of metabolic profile obtained of melanoma B16F10. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 67(2), pp.146-156.
19. FISCHER, G.M.; VASHISHT GOPAL, Y.N.; MCQUADE, J.L.; PENG, W.; DEBERARDINIS, R.J. AND DAVIES, M.A., 2018. Metabolic strategies of melanoma cells: Mechanisms, interactions with the tumor microenvironment, and therapeutic implications. *Pigment cell & melanoma research*, 31(1), pp.11-30.
20. GEISLER, J.; BACHMANN, I.M.; NYAKAS, M.; HELSING, P.; FJØSNE, H.E.; MAEHLE, L.O.; AAMDAL, S.; EIDE, N.A.; SVENDSEN, H.L.; STRAUME, O. AND ROBSAHM, T.E., 2013. Malignant melanoma--diagnosis, treatment and follow-up in Norway. *Tidsskrift for den Norske laegeforening: tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke*, 133(20), pp.2154-2159.
21. GÓMEZ, M.C.M. AND GONZÁLEZ, M.B., 2010. Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*.
22. GORANTLA, V.C. AND KIRKWOOD, J.M., 2014. State of melanoma: an historic overview of a field in transition. *Hematology/Oncology Clinics*, 28(3), pp.415-435.
23. GOS, A.; JURKOWSKA, M.; VAN AKKOOI, A.; ROBERT, C.; KOSELA-PATERCZYK, H.; KOLJENOVIC, S.; KAMSUKOM, N.; MICHEJ, W.; JEZIORSKI, A.; PLUTA, P. AND VERHOEF, C., 2014. Molecular characterization and patient outcome of melanoma nodal metastases and an unknown primary site. *Annals of surgical oncology*, 21(13), pp.4317-4323.
24. HENDRIKS, M.M.; VAN EEUWIJK, F.A.; JELLEMA, R.H.; WESTERHUIS, J.A.; REIJMERS, T.H.; HOEFSLOOT, H.C. AND SMILDE, A.K., 2011. Data-processing strategies for metabolomics studies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(10), pp.1685-1698.
25. ISOLA, A.L.; EDDY, K. AND CHEN, S., 2016. Biology, therapy and implications of tumor exosomes in the progression of melanoma. *Cancers*, 8(12), p.110.
26. KIM, H.Y.; LEE, H.; KIM, S.H.; JIN, H.; BAE, J. AND CHOI, H.K., 2017. Discovery of potential biomarkers in human melanoma cells with different metastatic potential by metabolic and lipidomic profiling. *Scientific Reports*, 7(1), p.8864.
27. LE GUENNEC, A.; TAYYARI, F. AND EDISON, A.S., 2017. Alternatives to Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy Presat and Carr–Purcell–Meiboom–Gill Presat for NMR-Based Metabolomics. *Analytical chemistry*, 89(17), pp.8582-8588.
28. LEAN, C.L.; BOURNE, R.; THOMPSON, J.F.; SCOLYER, R.A.; STRETCH, J.; LI, L.X.L.; RUSSELL, P. AND MOUNTFORD, C., 2003. Rapid detection of metastatic melanoma in lymph nodes using proton magnetic resonance spectroscopy of fine needle aspiration biopsy specimens. *Melanoma research*, 13(3), pp.259-261.
29. LOCASALE, J.W., 2013. Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nature Reviews Cancer*, 13(8), p.572.
30. MIRSAEIDI, M.; BANOEI, M.M.; WINSTON, B.W. AND SCHRAUFNAGEL, D.E., 2015. Metabolomics: applications and promise in mycobacterial disease. *Annals of the American Thoracic Society*, 12(9), pp.1278-1287.
31. MUÑOZ, S.V., 2015. *Identificación no invasiva de biomarcadores de endometriosis mediante metabólica por RMN* (Doctoral dissertation, Universitat de València, Facultat de Ciències Biològiques).
32. P.A.T.E. BOARD, 2018. *Melanoma Treatment (PDQ®)*. In PDQ Cancer Information Summaries. National Cancer Institute, US, visto el 2 de Julio 2018. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66034/table/CDR0000062917\\_\\_359/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66034/table/CDR0000062917__359/)
33. PISKOUNOVA, E.; AGATHOCLEOUS, M.; MURPHY, M.M.; HU, Z.; HUDDLESTUN, S.E.; ZHAO, Z.; LEITCH, A.M.; JOHNSON, T.M.; DEBERARDINIS, R.J. AND MORRISON, S.J., 2015. Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. *Nature*, 527(7577), p.186.

34. PUCHADES CARRASCO, L., 2014. Aplicaciones de la RMN a la identificación de nuevos biomarcadores de utilidad clínica en oncología.
35. PUCHADES-CARRASCO, L.; PALOMINO-SCHÄTZLEIN, M.; PÉREZ-RAMBLA, C. AND PINEDA-LUCENA, A., 2015. Bioinformatics tools for the analysis of NMR metabolomics studies focused on the identification of clinically relevant biomarkers. *Briefings in bioinformatics*, 17(3), pp.541-552.
36. PUCHADES-CARRASCO, L. AND PINEDA-LUCENA, A., 2015. Metabolomics in pharmaceutical research and development. *Current opinion in biotechnology*, 35, pp.73-77.
37. RAMACHANDRAN, G.K. AND YEOW, C.H., 2017. Proton NMR characterization of intact primary and metastatic melanoma cells in 2D & 3D cultures. *Biological research*, 50(1), p.12.
38. RIBERO, S.; GLASS, D. AND BATAILLE, V., 2016. Genetic epidemiology of melanoma. *European Journal of Dermatology*, 26(4), pp.335-339.
39. SAAB, J.; SANTOS-ZABALA, M.L.; LODA, M.; STACK, E.C. AND HOLLMANN, T.J., 2018. Fatty Acid Synthase and Acetyl-CoA Carboxylase Are Expressed in Nodal Metastatic Melanoma But Not in Benign Intracapsular Nodal Nevi. *The American Journal of Dermatopathology*, 40(4), pp.259-264.
40. SCOTT, D.A.; RICHARDSON, A.D.; FILIPP, F.V.; KNUTZEN, C.A.; CHIANG, G.G.; ZE'EV, A.R.; OSTERMAN, A.L. AND SMITH, J.W., 2011. Comparative metabolic flux profiling of melanoma cell lines: beyond the Warburg effect. *Journal of Biological Chemistry*, pp.jbc-M111.
41. SEOM, 2017. *Info Cáncer*, Madrid, España, visto el 15 may 2018. <https://www.seom.org/es/inicio>
42. STRETCH, J.R.; SOMORJAI, R.; BOURNE, R.; HSIAO, E.; SCOLYER, R.A.; DOLENKO, B.; THOMPSON, J.F.; MOUNTFORD, C.E. AND LEAN, C.L., 2005. Melanoma metastases in regional lymph nodes are accurately detected by proton magnetic resonance spectroscopy of fine-needle aspirate biopsy samples. *Annals of surgical oncology*, 12(11), pp.943-949.
43. VERYKIOU, S.; ELLIS, R.A. AND LOVAT, P.E., 2014, January. Established and emerging biomarkers in cutaneous malignant melanoma. In *Healthcare* (Vol. 2, No. 1, pp. 60-73). Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
44. WANG, X.; HU, M.; FENG, J.; LIU, M. AND HU, J.Z., 2014. <sup>1</sup>H NMR metabolomics study of metastatic melanoma in C57BL/6J mouse spleen. *Metabolomics*, 10(6), pp.1129-1144.
45. WARBURG, O.; WIND, F. AND NEGELEIN, E., 1927. The metabolism of tumors in the body. *The Journal of general physiology*, 8(6), p.519.
46. WELJIE, A.M.; NEWTON, J.; MERCIER, P.; CARLSON, E. AND SLUPSKY, C.M., 2006. Targeted profiling: quantitative analysis of <sup>1</sup>H NMR metabolomics data. *Analytical chemistry*, 78(13), pp.4430-4442.
47. WESTERHUIS, J.A.; HOEFSLOOT, H.C.; SMIT, S.; VIS, D.J.; SMILDE, A.K.; VAN VELZEN, E.J.; VAN DUIJNHOFEN, J.P. AND VAN DORSTEN, F.A., 2008. Assessment of PLS-DA cross validation. *Metabolomics*, 4(1), pp.81-89.
48. WISHART, D.S.; MANDAL, R.; STANISLAUS, A. AND RAMIREZ-GAONA, M., 2016. Cancer metabolomics and the human metabolome database. *Metabolites*, 6(1), p.10.
49. XIA, J. AND WISHART, D.S., 2011. Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. *Nature protocols*, 6(6), p.743.
50. YANG, L.; VENNETI, S. AND NAGRATH, D., 2017. Glutaminolysis: a hallmark of cancer metabolism. *Annual review of biomedical engineering*, 19, pp.163-194.