



DIVERSOS METALES PUEDEN SER BIOMARCADORES PRECOCES DE CÁNCER DE PULMÓN

A. Pereira-Vega¹, B. Callejón-Leblic^{2,3}, L.A. Padrón Fraysse¹, S. García Garrido⁴, B.E. Urizar Catalán¹, V.M. Ignacio Barrios¹, L. Marín Barrera¹, J.L. Gómez Ariza^{2,3}, T. García Barrera^{2,3}.

¹ Servicio de Neumología y Alergia. Hospital Universitario Juan Ramón Jiménez (HURJ) de Huelva.

² Departamento de Química, Facultad de Ciencias Experimentales, Univ. de Huelva, Campus de El Carmen, 21007, Huelva, España.

³ Centro de Investigación en Recursos Naturales, Salud y Medio Ambiente (RENSMA). Universidad de Huelva.

⁴ Fundación Andaluza Beturia para la Investigación en Salud (FABIS). 4ª planta (HURJ) Ronda Norte s/n 21005. Huelva.

No hay conflictos que declarar.

Resumen:

Fundamento y objetivos: el cáncer de pulmón (CP) es el que provoca mayor mortalidad, especialmente por su frecuente diagnóstico tardío, con menos posibilidades de curación. En el inicio del proceso carcinogénico, previo al diagnóstico clínico, los oligoelementos (metales o metaloides), desempeñan un papel importante al activar o inhibir las reacciones enzimáticas y las metaloproteínas. El objetivo de nuestro estudio es analizar la utilidad de diversos metales como biomarcadores (BM) precoces de CP, obtenidos en muestras de suero, orina, y lavado broncoalveolar (LBA)

Material y métodos: hemos analizado las concentraciones totales, incluyendo fracciones de alto y bajo peso molecular, de 11 metales en muestras de suero, orina y LBA de pacientes CP, controles sanos (CS) y pacientes con patología respiratoria no cáncer (NCP) empleando una técnica de análisis basada en un plasma de acoplamiento inductivo-espectrometría de masas (ICP-QQQ-MS)

Resultados: obtuvimos una clara discriminación entre los grupos en las tres muestras analizadas. Hemos obtenido metales sobreexpresados o reducidos en el CP que podrían utilizarse como BM. La concentración de vanadio (V) y cromo (Cr) en suero es claramente mayor en pacientes con CP. Hemos demostrado que varios metales (V, Cr y cobre), relacionados con procesos metabólicos alterados en CP como estrés oxidativo y homeostasis, y/o sus relaciones podrían ser buenos BM de CP.

Conclusiones: diversos metales, y sus relaciones y correlaciones, en la población estudiada diferencian claramente a los pacientes con cáncer de pulmón de los CS y NCP y parecen ser buenos biomarcadores en el diagnóstico precoz del cáncer de pulmón.

Palabras clave: cáncer de pulmón, metales, biomarcadores, diagnóstico precoz, espectrometría de masas.

DIFFERENT METALS CAN BE EARLY BIOMARKERS FOR LUNG CANCER X

Abstract: Background and objectives: Lung cancer (LC) has the highest mortality rate, especially due to its late diagnosis, with a lower chance of recovery. At the start of the carcinogenic process, before a clinical diagnosis, trace elements (metals or metalloids) play an important role by activating or inhibiting enzymatic reactions and metalloproteins. The objective of our study is to analyze the utility of different metals as early biomarkers (BM) for LC which are obtained in serum, urine and bronchoalveolar lavage (BAL) samples.

Material and methods: We analyzed the total concentrations, including fractions of high and low molecular weight, of 11 metals in serum, urine and BAL samples from patients with LC, healthy controls (HC) and patients with non-cancerous respiratory pathology (NCP) using an analysis technique based on inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-QQQ-MS).

Results: We obtained a clear discrimination between groups for the three samples analyzed. We obtained overexpressed or reduced metals in LC that could be used as BM. The concentration of vanadium (V) and chromium (Cr) in serum is clearly higher in patients with LC. We have shown that several metals (V, Cr and copper) related to the altered metabolic processes in LC such as oxidative stress and homeostasis and/or their connections could be good BM for LC.

Conclusions: in the population studied, several metals and their connections and correlations were clearly differentiated in the patients with lung cancer compared to the HC and NCP groups and they appear to be good biomarkers for the early diagnosis of lung cancer.

Keywords: lung cancer, metals, biomarkers, early diagnosis, mass spectrometry.

Recibido: 02.05.2019. Aceptado: 04.07.2019

Dr. Antonio Pereira-Vega
apv01h@gmail.com

INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón es el que provoca mayor mortalidad a nivel mundial¹. Una de las causas de su elevada mortalidad es su frecuente diagnóstico tardío, en etapas avanzadas de la enfermedad, donde la posibilidad de curación se reduce drásticamente. La supervivencia a los 5 años² es del 65% en los estadios precoces (I y II) y del 5% en estadios avanzados (III y IV)

En la historia natural del cáncer de pulmón (Figura 1) el tiempo de latencia sigue este camino: tras su inicio biológico (células sin control con capacidad de inhibición de la muerte celular, alteración inmunológica y de la capacidad de la angiogénesis), existe una fase no detectable clínicamente en la que se producen en las células cancerosas una serie de alteraciones en las vías metabólicas habituales. Como consecuencia de ello, se producen una serie de sustancias (proteínas, metabolitos u oligoelementos) que hipotéticamente podrían diferenciar, de forma cualitativa o cuantitativa, a los pacientes con cáncer pulmonar de las personas sanas o pacientes con otras patologías pulmonares diferentes al CP. Estas sustancias, podrían ser biomarcadores (BM) precoces del cáncer de pulmón.

Desde hace años se han intentado buscar BM que puedan detectar precozmente el CP. Los BM clásicos habitualmente son proteínas sanguíneas que se producen a mayor nivel en las células cancerosas que en las células sanas. Estos BM, por separado tienen actualmente un valor limitado para el diagnóstico precoz del CP, aunque parecen ser útiles como factor pronóstico o de respuesta a un tratamiento específico. Sin embargo, recientes trabajos³ utilizando un panel de 6 BM (CEA, NSE, Ca 15.3, Cyfra 21.1, Ag asociado al tumor de células escamosas y el péptido relacionado con la progastrina) parecen tener mayor utilidad para el diagnóstico precoz de CP que cada BM utilizado individualmente, aumentando claramente su sensibilidad y especificidad.

Las ciencias ómicas han permitido iniciar un campo muy atractivo en la búsqueda de nuevos BM de utilidad en el diagnóstico precoz de CP. De esta forma, mediante técnicas analíticas avanzadas, la metabolómica ha permitido obtener metabolitos que en un futuro inminente podrán ser BM precoces de CP^{4, 5}. En este sentido, queremos resaltar que la metabolómica se relaciona claramente con el fenotipo (consecuencia de la interacción entre la genética y el ambiente) y, en el caso del cáncer de pulmón, como todos sabemos, la influencia

del ambiente (fundamentalmente el tabaco) en su patogenia es crucial⁶.

Los oligoelementos (metales y metaloides que se encuentran en el cuerpo en dosis infinitesimales) son esenciales para la homeostasis humana regular y juegan “roles” significativos en los sistemas biológicos que participan en muchos procesos celulares. Estos metales esenciales (Co, Mo, Se, Fe y Zn), son cruciales para la función de numerosas enzimas requeridas para procesos bioquímicos fundamentales⁷. La deficiencia o el exceso de cualquiera de ellos pueden provocar enfermedades, efectos tóxicos nocivos, inflamación y cáncer⁸. Es importante destacar que un exceso de metales esenciales, como hierro y cobre, a menudo se asocia con carcinogénesis y enfermedad metastásica. Como consecuencia, sus niveles deben ser cuidadosamente equilibrados para mantener un estado homeostático dentro del cuerpo⁹. Por otro lado, ciertos elementos no esenciales también pueden tener implicaciones importantes en la salud humana. De esta manera, la exposición ambiental a arsénico, cadmio, plomo y níquel tiene consecuencias cancerígenas⁸ debido a la activación de las vías de señalización oncogénica¹⁰, el estrés oxidativo o la inhibición del sistema de reparación del ADN por Ni. Muchos de estos metales no esenciales también pueden alterar la función de algunas enzimas, como es el caso de la interacción competitiva de zinc y cadmio debido a su similar estructura atómica. Esto puede tener efectos dramáticos en enzimas que contienen zinc y que están involucradas en importantes procesos biológicos que conducen a la aparición del cáncer. Muchos metales también contribuyen a la progresión del cáncer y las metástasis¹¹. Por tanto, el estudio de los niveles de los metales en diversos biofluidos (suero, orina y LBA) y tejidos humanos, puede proporcionar información interesante sobre los cambios que ocurren durante los procesos biológicos involucrados en el inicio y la progresión de enfermedades como el cáncer de pulmón.

Por otro lado, aunque rara vez se informa en los estudios, también se ha demostrado la relevancia de las relaciones entre los metales y su homeostasis. La relación Cu/Zn fue claramente diferente en los pacientes con CP, respecto a sujetos sanos, en suero¹² y derrame pleural¹³. Diversos autores han analizado las concentraciones de oligoelementos esenciales y no esenciales en muestras biológicas humanas de pacientes con cáncer de pulmón, como suero¹², plasma¹⁴, orina¹⁵, derrame pleural¹³ o cabello¹⁶. Además, hay varios artículos que describen el análisis de metales en el fluido de LBA¹⁷, pero no están relacionados con pacientes

con cáncer de pulmón. Al respecto, queremos resaltar que no hay estudios previos que analicen metales en el LBA de pacientes con CP, muestra en estrecha interacción con el tejido pulmonar y más representativa del estado pulmonar que otros biofluidos periféricos como la sangre o la orina.

Por último, queremos resaltar dos aspectos relevantes:

1.- La novedosa técnica analítica aplicada en nuestro estudio: la precipitación de proteínas mediante un método no desnaturizante (NDPP), que diferencia las fracciones de alta (HMM) y baja (LMM) masa molecular, seguida del análisis por plasma de acoplamiento inductivo-espectrometría de masas equipado con triple cuadrupolo (ICP-QQQ-MS)

2.- El análisis de la homeostasis de los metales utilizando sus proporciones y correlaciones, un hecho muy poco estudiado y que a nuestro criterio tiene gran relevancia.

El objetivo de nuestro estudio es analizar la utilidad de diversos metales como biomarcadores precoces de CP, obtenidos en muestras de suero, orina, y por primera vez, en LBA.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este trabajo se determinó la concentración total y las concentraciones de las fracciones de HMM y LMM de 11 metales (V, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Se, Mo, Cd, y Pb) en 87 muestras de suero y orina y 55 muestras de LBA de pacientes con CP y controles (sanos -CS- o con patología respiratoria no cáncer -NCP-) empleando un plasma de acoplamiento inductivo y espectrometría de masas equipada con un triple cuadrupolo (ICP-QQQ-MS). El tratamiento de muestras empleados para el análisis elemental se describe en el artículo de Callejón-Leblic *et al.*¹⁸ En resumen, para la determinación del contenido total de metal en suero, orina y LBA, las muestras se diluyeron cinco veces con agua ultrapura y se le adicionó 0,1 mg L⁻¹ de rodio como patrón interno.

El tratamiento para el fraccionamiento de las muestras de suero se basó en una precipitación de proteínas, en condiciones no desnaturizantes, mediante la adición de 600 µl de acetona a 300 µl de suero, seguida de agitación por vórtex durante 5 minutos y centrifugación a 10.000 rpm, a 4°C durante 15 minutos, para la separación de la fracción HMM (pellet) y LMM (sobrenadante) El sobrenadante se llevó a sequedad bajo una corriente de nitrógeno y se reconstituyó en 1 ml de agua ultrapura con 0,1 mg L⁻¹ de Rh como patrón interno.

Por otro lado, el precipitado fue sometido a digestión ácida asistida por microondas para la determinación de metales en la fracción de HMM. Para ello, el precipitado fue introducido en un recipiente de microondas junto con 500 ml de un mezcla que contiene ácido nítrico y peróxido de hidrógeno (4:1 v/v). La mineralización se llevó a cabo a 400 W, incrementando la temperatura a 150°C en 10 min. Finalmente, los extractos se diluyeron hasta 3 mL con agua ultrapura, con 0,1 mg L⁻¹ de Rh. Antes del análisis por ICP-QQQ-MS todas las muestras fueron filtradas empleando filtros de PTFE de 0,45 mm.

Para el análisis elemental, fue necesario el uso de helio como gas de colisión para la mayoría de metales a excepción de selenio, que se empleó hidrógeno con 40 % de oxígeno.

Los resultados fueron sometidos a diferentes análisis estadísticos. Por un lado, se realizó el test U de Mann Whitney de comparación por parejas para encontrar diferencias significativas en las concentraciones de metales entre CP, NCP y CS. Además, se aplicó el test de Spearman para conocer las posibles correlaciones entre los metales alterados en CP. Por otro lado, se utilizó el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales, (PLS-DA) para determinar, a través de la variable VIP, qué metales eran más influyentes en la clasificación de los grupos. Finalmente, el área bajo la curva (AUC) de la característica del operador receptor (ROC) se usó para determinar la especificidad y la sensibilidad de los metales alterados en relación con la enfermedad para discriminar a los pacientes CP de los sujetos control.

El estudio se realizó en concordancia con los principios contenidos en la Declaración de Helsinki y fue aprobado previamente por los Comités de Ética e Investigación del Hospital Universitarios Juan Ramón Jiménez y la Universidad de Huelva. A todos los pacientes, antes de iniciar el estudio, se les aportó la hoja de información al paciente y posteriormente firmaron el consentimiento informado.

RESULTADOS

1.- Clasificación de los grupos de estudio utilizando las concentraciones de metales en suero y fracciones de suero, orina y LBA.

Para establecer una clasificación de los grupos de estudio sobre la base de las concentraciones de los metales obtenidos, se realizó un análisis estadístico discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). Además, la importancia de cada variable (concentraciones de metales y

relaciones entre metales) de cada biofluido (suero total, fracciones de HMM y LMM, orina y LBA) en la clasificación (valor VIP, importancia variable en la proyección) se usó en conjunto con otros criterios (ver la siguiente sección) para la selección de biomarcadores para el diagnóstico de cáncer de pulmón.

PLS-DA es un método supervisado que proporciona modelos estadísticos que permiten visualizar agrupaciones y tendencias entre diferentes grupos de muestras a través de la representación de gráficos de puntuación. La Figura 2 muestra una clara discriminación entre los diferentes grupos analizados (CP, CS y NCP) en cada una de las diferentes muestras analizadas (suero total y sus fracciones de HMM y LMM, orina y LBA). Se observa una clara separación de los grupos, indicando que hay metales cuyas concentraciones están claramente alteradas en el CP, o bien que cuando se excede una concentración umbral, se induce el cáncer de pulmón.

2.- Determinación de la concentración de los metales en las distintas comparaciones realizadas entre los grupos de estudio.

En la Figura 3 se muestra la comparación de la concentración de los metales analizados (en suero y sus fracciones de metales de HMM y LMM, orina y LBA) al realizar las diferentes comparaciones entre grupos de estudio (CP, CS y NCP).

Con estos gráficos (*Loading Plot*) se puede apreciar si la concentración de un determinado metal está sobreexpresada o inhibida en un grupo determinado. Por ejemplo: en la Figura 3.A se compara la concentración de los distintos metales en la fracción de HMM en suero en los pacientes con CP y los CS. Los metales agrupados en el lado izquierdo del gráfico representan los metales sobreexpresados en el CP mientras que los que están en el lado opuesto están inhibidos. Por lo tanto, la concentración de vanadio y cromo en los metales de HMM del suero es mayor en pacientes con cáncer de pulmón.

3.- Concentraciones de metales y propuesta de biomarcadores de cáncer de pulmón.

Las Tablas 2-4 muestran la concentración de los metales en el suero y fracciones séricas, orina y LBA, respectivamente, así como los valores VIP (importancia de la variable en la proyección), valor p (Prueba U de Mann-Whitney), Fold change (relación de CP/CS o CP/NCP) y AUC (valor del "área debajo de la curva", ROC "característica operativa del receptor") Sólo los metales o relaciones entre metales que tienen un valor VIP mayor que 1, Fold change inferior a 0,5 o superior a

2, valor de $p < 0,05$ y $AUC > 0,75$ se incluyen en las tablas para seleccionar los biomarcadores de cáncer de pulmón.

La concentración de metales y sus fracciones (HMM y LMM) para pacientes con CP y CS en muestras de suero se resumen en la Tabla 2. Los niveles totales de vanadio en suero, vanadio y cromo en la fracción HMM de suero y cobre en la fracción de LMM de suero fueron estadísticamente diferentes entre CP y CS y todos ellos aumentaron en pacientes con CP de 2 a 5 veces (V-HMM). En nuestro estudio, el principal metal alterado en la orina de pacientes con CP es el cadmio (Tabla 3). Por otro lado, los pacientes con cáncer de pulmón tienen concentraciones 1,5 veces más altas de manganeso que los controles en el líquido de lavado broncoalveolar (Tabla 4)

4.- Dishomeostasis de metales en el cáncer de pulmón.

La homeostasis es una propiedad de los organismos que consiste en su capacidad de mantener una condición interna estable compensando los cambios en su entorno mediante el intercambio regulado de materia y energía con el exterior (metabolismo). Se trata de una forma de equilibrio dinámico que se hace posible gracias a una red de sistemas de control realimentados que constituyen los mecanismos de autoregulación de los seres vivos. En el cáncer de pulmón se produce un desequilibrio (dishomeostasis) en los niveles de diversos metales que se puede observar en suero, orina y LBA (Tablas 2 - 4)

Además, las concentraciones de los metales se analizaron más a fondo para obtener relaciones entre ellos con el fin de comprender sus interrelaciones. Esos "ratios" muestran cambios significativos entre los grupos estudiados (Tablas 2 - 4) en los tres tipos de muestras analizadas. Las siguientes relaciones entre los metales resultaron ser BM importantes para el CP en suero (V / Mn, V / Pb, V / Zn, Cr / Pb), orina (Cr / Cd, Mn / Cd, V / Cd, Co / Cd, Cd / Pb) y LBA (V / Cu). Los resultados obtenidos muestran claras interacciones de V con Mn, Pb y Zn, Cr con Pb en suero, Cd con Cr, Mn, V, Co y Pb en orina y V con Cu en LBA.

5.- Correlaciones entre los metales en los pacientes con cáncer de pulmón.

La Tabla 5 muestra los coeficientes de correlación de Spearman calculados para evaluar la interdependencia de los metales en el organismo y la posible existencia de una homeostasis interconectada. En este sentido, los niveles de Cr, Mn, Fe, Pb, V, Zn, Co y Se en las diferentes muestras analizadas presentan un coeficiente

de correlación entre ellos superior a 0,5, lo que indica una posible ruta metabólica común para su regulación biológica. Entre estos elementos, Cr, Mn y V también muestran desequilibrios significativos en el análisis (Tabla 2). Por otro lado, las interrelaciones entre Cr y Pb (orina) y V y Pb (LBA) también fueron importantes. Otros elementos que están interconectados solo por el coeficiente de correlación ($>0,5$) en el LBA son Zn y Se.

Tabla 1: Características clínicas de los pacientes (CP y NCP) y controles sanos.

Muestras	Características	CP	NCP	CS
SUERO y ORINA	Número de muestras	n=48	-	n=39
	Edad (años)	65 ± 11	-	58 ± 14
	Sexo (H/M)	39/9	-	17/22
	Histología			
	CPCG	42	-	-
	CPCP	6	-	-
	Hábitos tabáquicos			
	Fumadores	11	-	0
	Exfumadores	32	-	22
	No fumadores	5	-	17
	Comorbilidades			
	HTA (%)	59	-	48
	Asma (%)	6	-	0
	DM (%)	25	-	28
	LBA	Número de muestras	n=24	n=31
Edad (años)		65 ± 13	54 ± 14	-
Sexo (H/M)		20/04	27/04	-
Histología				
CPCG		22	-	-
CPCP		2	-	-
DILD		-	11	-
Hemotipsis		-	5	-
Bronquiectasis		-	5	-
NPS		-	3	-
Otros*		-	7	-
Hábitos tabáquicos				
Fumadores		4	11	-
Exfumadores		20	16	-
No fumadores		-	3	-
Comorbilidades				
HTA (%)	79	33	-	
Asma (%)	8	3	-	
DM (%)	33	17	-	

CP: Cáncer de pulmón, NCP: Control no cáncer, CS: Control sano, H: hombre, M: mujer, CPCG: Cáncer de pulmón de células grandes, CPCP: Cáncer de pulmón de células pequeñas, NPS: Nódulo pulmonar solitario, HTA: Hipertensión arterial, DM: Diabetes Mellitus. * Contusión pulmonar.

Tabla 2. Concentración de los elementos ($\mu\text{g g}^{-1}$) en muestras de sueros (TOTAL) y fracciones séricas (HMM y LMM).

	V (TOTAL)	V (HMM)	Cr (HMM)	Cu (LMM)	V/Mn	V/Pb	V/Zn	Cr/Pb
Concentración media en CS	0,05	0,04	0,39	33,33	0,02	0,03	0,00004	0,35
aSEM en CS	0,02	0,02	0,17	2,78	0,01	0,01	0,00002	0,14
Concentración media en CP	0,18	0,19	0,83	76,29	0,08	0,14	0,00164	0,96
bSEM en CP	0,04	0,05	0,12	2,58	0,01	0,02	0,00004	0,19
Fold Change (CP/CS)	3,77	5,03	2,11	2,29	3,55	4,27	4,10	2,79
VIP	1,82	1,72	1,89	2,08	1,427	1,472	1,50	1,641
p (Mann Whitney)	0,000039	0,000007	0,000003	0,000000	0,000033	0,000015	0,000048	0,000026
AUC	0,76	0,78	0,78	0,92	0,77	0,76	0,76	0,76

a Error estándar de la media (n=39), a Error estándar de la media(n=48),

Fold changes (Cáncer de pulmón vs Control sano), Importancia de la variable en la proyección (VIP), p (Comparación estadística del test U de Whitney) y valores AUC de las curvas ROC.

Tabla 3. Concentración de los elementos ($\mu\text{g g}^{-1}$) en muestras de orina (TOTAL).

	Cd	Cr/Cd	Mn/Cd	V/Cd	Co/Cd	Cd/Pb
Concentración media en CS	0,67	6,38	10,62	3,83	1,56	0,09
aSEM en CS	0,07	1,47	1,66	0,73	0,24	0,01
Concentración media en CP	1,55	2,33	3,95	1,6	0,42	0,23
bSEM en CP	0,21	0,47	0,48	1,43	0,05	0,03
Fold Change (CP/CS)	2,32	0,37	0,37	0,42	0,27	2,47
VIP	1,703	1,813	2,07	1,484	1,897	1,574
p (Mann Whitney)	0,000014	0,000006	0,000002	0,000021	0	0,000955
AUC	0,79	0,76	0,77	0,75	0,81	0,74

aError estándar de la media (n=39), aError estándar de la media(n=48),

Fold changes (Cáncer de pulmón vs Control sano), Importancia de la variable en la proyección (VIP), p (Comparación estadística del test U de Whitney) y valores AUC de las curvas ROC.

Tabla 4. Concentración de los elementos ($\mu\text{g g}^{-1}$) en muestras LBA (TOTAL)

	Mn	V/Cu
Concentración media en NCP	0,46	1,03
aSEM en CNP	0,06	0,10
Concentración media en CP	0,69	0,51
bSEM en CP	0,09	0,11
Fold Change (CP/NCP)	1,51	0,49
VIP	1,29	1,22
p (Mann Whitney)	0,003	0,02
AUC	0,75	0,76

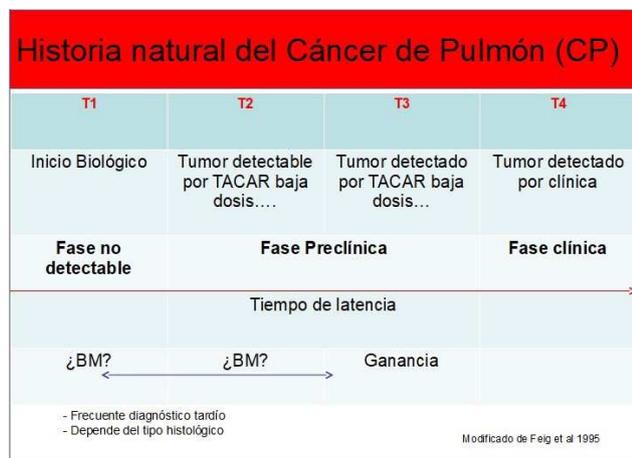
aError estándar de la media (n=31), aError estándar de la media(n=24),

Fold changes (Cáncer de pulmón vs Control sano), Importancia de la variable en la proyección (VIP), p (Comparación estadística del test U de Whitney) y valores AUC de las curvas ROC.

Tabla 5. Correlaciones entre metales y fracciones en los diferentes biofluidos (p<0,05)

Test Spearman	Coefficiente de correlación (r)
SUERO	
V-total	Cr-total (r=0,62), Cr-HMM (r=0,58)
V-HMM	Cr-total (r=0,62), Cr-HMM (r=0,59)
Mn-total	Zn-HMM (r=0,5), Zn-total (r=0,44)
Zn-total	Mn-HMM (r=0,34)
ORINA	
Cr	Mn (r=0,58), Fe (r=0,58), Pb(0,63)
Mn	Fe (r= 0,7), Pb (r=0,58)
Fe	Pb (r=0,53)
LBA	
V-total	Pb(r=0,5)
Cr-total	Zn(r=0,55), Se (r=0,52)
Mn-total	Cu(r=0,56)
Co-total	Cu(r=0,55), Mo(r=0,53)
Zn-total	Cr(r=0,55), Se(r=0,68)
Se-total	Zn(r=0,68)

Figura 1.- Historia natural del cáncer de pulmón



Biomarcadores y TACAR: Tomografía Computarizada de alta resolución

Figura 2. PLS-DA de A) suero total, B) fracción HMM, C) fracción LMM, D) orina, E) LBA. Puntos rojos: CP, puntos negros: CS, puntos verdes: NCP.

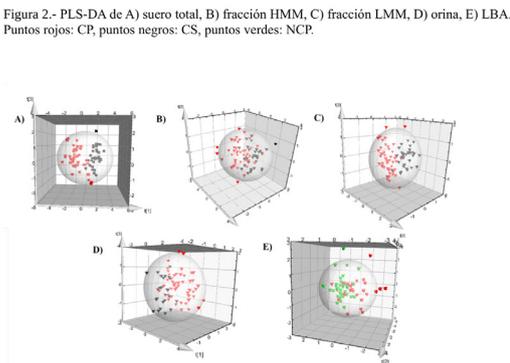
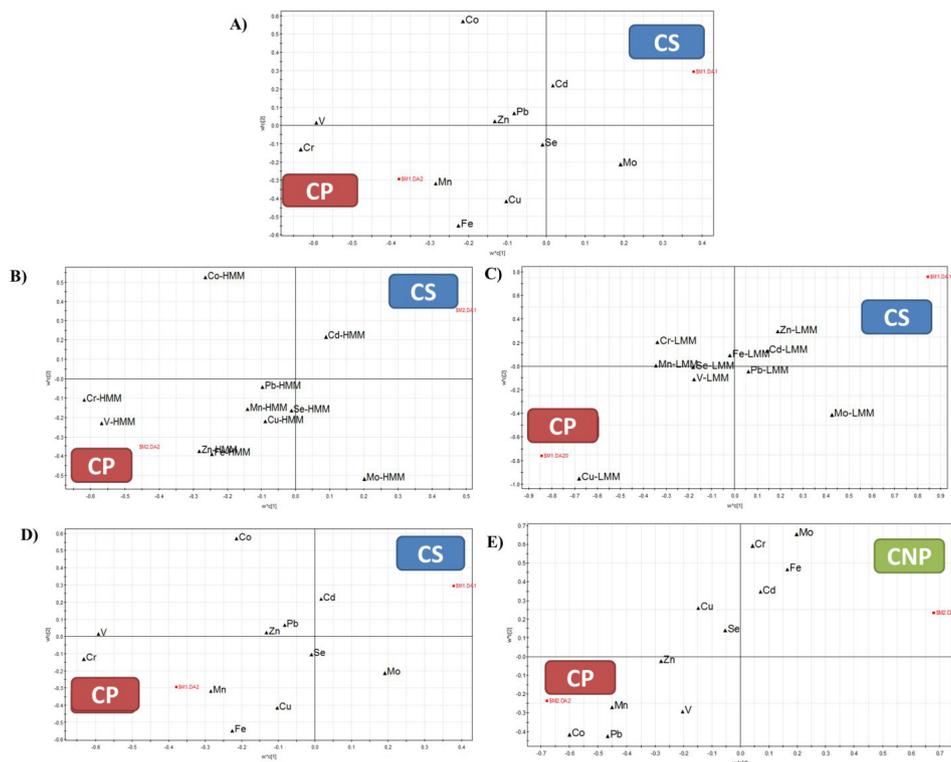


Figura 3. Loading Plots de A) Suero total, B) Fracción de suero HMM, C) Fracción de suero LMM, D) Orina y E) LBA.



DISCUSIÓN

Los biomarcadores son sustancias (proteínas, metabolitos, oligoelementos -metales-, partículas ADN) producidas por el tejido tumoral y que se pueden detectar en tejidos o fluidos corporales (sangre, orina, sudor, aire exhalado, LBA...). Estas sustancias “idealmente” podrían ser producidas solo por el tumor, por lo que su detección tendría valor diagnóstico y su especificidad sería máxima, o se podrían producir, como es lo habitual, por células tumorales y células normales. En este último caso, el distinto nivel de producción es lo que diferenciaría el origen de la muestra (tumoral o sano)

La utilidad de los BM es diversa:

a).- Pueden tener un valor diagnóstico, especialmente dirigido a su diagnóstico precoz, y fundamentalmente analizados en poblaciones de riesgo de padecer el cáncer, con el objetivo de realizar un screening y/o seleccionar la realización de determinadas pruebas (Por ejemplo, un TAC de baja dosis en el caso del CP)

b).- Valor pronóstico.

c).- Predecir la respuesta al tratamiento (Por ejemplo, el hallazgo de la mutación en el gen EGFR)

d).- Valor en el seguimiento (especialmente en pacientes con marcadores positivos pretratamiento) para detectar recurrencias.

e).- Valor en el estudio de la fisiopatología del cáncer en su origen (Por ejemplo analizando las vías metabólicas que se pueden alterar en el inicio biológico de la enfermedad tumoral).

Así mismo, las características de un BM ideal (especialmente en el “screening”) podrían resumirse en las siguientes:

- Alta Sensibilidad y Especificidad.
- Buenos valores predictivos (VPP y VPN)
- Prueba no cruenta.
- Reproducible.
- De bajo coste (costo/efectiva)
- Que esté avalada por estudios clínicos.

En nuestro estudio hemos analizado, mediante técnicas analíticas de última generación, diversos metales en muestras de suero, orina y LBA. Nuestros objetivos han sido, por una parte, valorar su utilidad en el diagnóstico precoz del CP (muestras de suero y orina, ambas de fácil obtención) y por otra,

aportar datos en el estudio de su fisiopatogenia en la fase biológica del CP (Figura 1) Esto último, se realizaría especialmente con las muestras de LBA, muestra que a priori podría aportar información relevante al estar en estrecha relación con el tejido pulmonar y ser más representativa del estado inicial en el proceso carcinogénico que otras muestras periféricas como la sangre o la orina. Otro aspecto que queremos reseñar es su coste/efectividad, una vez que se disponen de los medios instrumentales propios de un laboratorio de Química Analítica de entidad.

Centrándonos en el papel de los metales como posibles BM de CP, en la aparición y el desarrollo del cáncer de pulmón, los cambios en la presencia de algunos metales y el perfil de sus formas químicas en los fluidos y tejidos biológicos pueden reflejar el estado de la nutrición y el metabolismo humano. Dichos metales pueden ayudar a conocer los factores que contribuyen a su inicio y podrán utilizarse para su posible diagnóstico precoz. Hay dos puntos de vista diferentes para relacionar el comportamiento de los metales en el organismo durante el proceso carcinogénico: la alteración de la forma química natural del elemento esencial en el metabolismo, debido a la aparición y progresión del cáncer, y la consideración de los elementos involucrados en el proceso carcinogénico como consecuencia de su alta exposición.

Por otro lado, los efectos de los metales en la salud generalmente se evalúan por su concentración y los diferentes estudios se centran en la estimación del estado de deficiencia, en el caso de elementos esenciales, o en episodios no equilibrados, en los que el exceso de un elemento afecta a la función del otro. Sin embargo, la importancia de la forma química de los metales en la biología es bien conocida. Los metales pueden estar presentes principalmente como iones lábiles o en complejos con ligandos de baja masa molecular, o en forma de metaloproteínas. Esta diferencia entre las especies de baja y de alta masa molecular es muy importante, ya que finalmente afecta a la actividad biológica o al potencial toxicológico del elemento y su movilidad a través de diferentes compartimentos biológicos. Las técnicas analíticas aplicadas en nuestro estudio diferencian estas dos fracciones (LMM y HMM) aportando un valor adicional a nuestras conclusiones.

En nuestro estudio hemos utilizado una novedosa técnica analítica, la precipitación de proteínas no desnaturizante (NDPP), que diferencia los metales en sus fracciones de alta y baja masa molecular, seguida de la espectrometría

de masas triple cuádruplo (ICP-QQQ-MS). Al respecto, queremos resaltar su superioridad respecto a las utilizadas previamente (la espectroscopia de absorción atómica (AAS)¹⁹, la emisión de rayos X inducida por partículas²⁰, la fluorescencia de rayos X de dispersión de energía de energía, la espectroscopia de emisión atómica de plasma acoplado inductivo (AES)¹⁵ o espectrometría de masas de plasma acoplado inductivo (ICP-MS)^{13, 14, 16, 17}, especialmente al disminuir las interferencias entre metales y en la mayor capacidad de detección del Selenio, un metal de importancia en la carcinogénesis. No existen antecedentes sobre el uso de ICP-QQQ-MS para el análisis de suero, orina y LBA de pacientes con CP.

Al analizar los metales en las muestras de **suero**, nuestros resultados muestran que la concentración de **vanadio** fue 3,77 y 5,03 veces mayor en pacientes con CP, en suero y en la fracción HMM de suero, respectivamente. Hay muy poca información sobre el papel del vanadio en el cuerpo. Lin *et al.* (2009) analizaron el vanadio en plasma de mujeres con CP y no se encontraron diferencias significativas entre el cáncer y los grupos control, hecho que también se ha concluido por otros autores²¹. Por otra parte, algunos autores han reportado las propiedades anticancerígenas del vanadio y demostraron que los complejos de estos metales se han utilizado como medicamentos en el tratamiento de varios cánceres, tales como cáncer de pulmón. Sin embargo, otros autores han demostrado la influencia de compuestos de vanadio en la citotoxicidad de algunos ligandos en células cultivadas de cáncer de pulmón humano²². El **romo** se asocia con la glucosa y el metabolismo de los lípidos, síntesis de proteínas y otras funciones fisiológicas importantes. La forma hexavalente del cromo y sus compuestos son carcinógenos pulmonares bien establecidos y su exposición crónica en células epiteliales humanas normales son capaces de inducir la transformación en células malignas, primera etapa de la carcinogénesis²³. En nuestro trabajo el cromo es 2,11 veces mayor en el HMM de suero de pacientes con CP. Se ha reportado un incremento de la concentración de **cobre** en pacientes con CP y su concentración se relaciona con el estado y la localización del cáncer^{12, 14, 21}. En este estudio, la concentración de cobre en la fracción LMM de suero (complejos de cobre lábiles) es 2,29 veces más alto que en el grupo control.

Cobre, zinc y manganeso regulan los niveles y actividades de los antioxidantes, especialmente enzimáticos, y el estado redox perturbado puede ser crítico para la carcinogénesis pulmonar. Estos

metales son cofactores o iones estabilizando la estructura molecular de la superóxido dismutasa (SOD), un antioxidante endógeno²⁴.

En nuestro estudio, al analizar las muestras de **orina**, el **cadmio** estaba claramente elevado en los pacientes con CP. El cadmio es reconocido como un carcinógeno humano, especialmente en estudios ocupacionales de cáncer de pulmón²⁵. Se han propuesto los niveles de cadmio en orina, suero y sangre de los fumadores como un marcador para el desarrollo y progresión de las enfermedades pulmonares²⁶ y también se ha encontrado un aumento en la orina de pacientes con cáncer¹⁵.

Respecto al análisis de las muestras de **lavado broncoalveolar**, los pacientes con CP mostraron unas concentraciones 1,5 veces mayores de **manganeso** (Mn) que los controles. La enzima Manganese Superóxido dismutasa (Mn-SOD), como eliminador de radicales superóxido en las mitocondrias, puede tener un papel importante como antioxidante en la prevención del desarrollo del cáncer pulmonar y se considera que la Mn-SOD es de importancia crítica para la defensa antioxidante²⁷. Lin *et al.*²⁸ encontraron, al igual que en nuestro estudio, niveles más altos de Mn en el grupo CP pero su estudio se realizó en muestras de suero. Algunos autores han reportado niveles disminuidos de manganeso en LBA de pacientes con enfermedades pulmonares difusas¹⁹ pero no hay antecedentes sobre la concentración de manganeso en muestras LBA en pacientes con CP.

En nuestro estudio describimos el hallazgo de diferentes niveles de metales en las muestras de suero, orina y LBA en una población de sujetos sanos y pacientes con cáncer de pulmón. Estos metales podrían participar en la génesis de dicho CP. Sin embargo, para poder hacer tal afirmación debemos profundizar en la relación causal entre estos metales y la carcinogénesis mediante nuevos estudios con un diseño diferente al actual.

Respecto a las **relaciones entre los metales**, los resultados obtenidos en nuestro trabajo muestran claras interacciones de V con Mn, Pb y Zn, Cr con Pb en suero, Cd con Cr, Mn, V, Co y Pb en orina y V con Cu en LBA. Varios artículos describen la interacciones entre Cu y Zn, concluyendo que un cociente Cu/Zn alto es común en el suero de pacientes con CP^{12, 13, 21} pero en nuestro estudio no hemos encontrado que esta interacción sea significativa utilizando VIP, valor de "p" ni el área bajo la curva (AUC) La relación entre Cd y Zn también se ha encontrado que es diferente entre fumadores y no fumadores y también es diferente en fumadores para varias enfermedades y cánceres.

Por otro lado, las relaciones entre metales que se muestran son significativamente diferentes en pacientes con CP y controles sanos. Al respecto, no se han descrito previamente estas relaciones en el CP utilizando valores altos de VIP, área bajo la curva (AUC) y valor de significación (p).

Otros elementos que están **interconectados** solo por el coeficiente de correlación (>0,5) en el LBA son Zn y Se. Las propiedades antioxidantes del Selenio son bien conocidas y las alteraciones en este metal se relacionan con el estrés oxidativo. En nuestro trabajo, el Selenio tenía una correlación positiva con el Zn en las muestras de LBA, el cual está implicado en desordenes glucometabólicos²⁹. El cobalto y el cobre también tienen una correlación positiva en el LBA. La función del cobalto en el cuerpo se relaciona con ser un cofactor de la vitamina B12, pero en la forma de complejo lábil puede generar radicales de oxígeno, de igual forma que el Cu y Fe³⁰. Estas correlaciones no se han descrito previamente.

CONCLUSIONES

En el presente artículo hemos mostrado en la población estudiada que los contenidos de metales en suero, orina y, por primera vez, en LBA pueden usarse para distinguir personas sanas y pacientes con cáncer de pulmón. De esta forma, se han descrito por primera vez algunos metales que podrían servir de biomarcadores en suero (V y Cr en la fracción de alta masa molecular y Cu en la fracción de baja masa molecular), orina (Cd) y LBA (Mn). Por otro lado, teniendo en cuenta la complejidad de los sistemas biológicos, algunos efectos importantes pueden ser causados por la interacción de más de dos elementos, pero tales interacciones rara vez se han aportado en estudios previos. En relación con esto, diversas relaciones entre metales en suero (V / Mn, V / Pb, V / Zn, Cr / Pb), orina (Cr / Cd, Mn / Cd, V / Cd, Co / Cd, Cd / Pb) y LBA (V / Cu) de pacientes con CP, han demostrado ser potenciales biomarcadores, reflejando la dishomeostasis de los metales en las fases tempranas de la carcinogénesis.

Estos hallazgos han sido posibles por la utilización de un potente método analítico descrito por primera vez para el estudio de metales en biofluidos humanos comparando pacientes con cáncer y personas sanas, la precipitación de proteínas desnaturizantes seguido de la espectrometría de masas de triple cuadrupolo ICP-MS. La metodología se ha combinado con un enfoque basado en el uso de valores VIP, valor p <0,05 y área bajo la curva ROC (AUC) >0,75

para proponer los biomarcadores de metales más importantes de cáncer de pulmón.

Aunque nuestros resultados permiten diferenciar ambas poblaciones según los niveles de determinados metales en suero, orina y LBA con un área bajo la curva $>0,75$, lo que sugiere que podrían ser inicialmente buenos biomarcadores, son necesarios futuros estudios para poder trasladar nuestros resultados a la práctica clínica. En estos nuevos estudios, entre otros aspectos, se tienen que comprobar los resultados obtenidos en una población más amplia para poder extrapolarnos a la población general, comprobar la validez de los hallazgos en estudios longitudinales y finalmente, desarrollar ensayos clínicos de validez diagnóstica. En este sentido, nuestro grupo de investigación está desarrollando nuevos proyectos que analizan de manera gradual estos aspectos.

Agradecimientos: Becas Neumosur (8/2012 y 9/2015) y SEPAR (124/2012 y 091/2016) Convocatorias competitivas del Ministerio de Economía, Innovación y Ciencia y Empleo a nivel nacional (CTM 2015-67902-C2-1) y regional (Gobierno de Andalucía: P12-FQM-0442) Belén Callejón-Leblic agradece al Ministerio de Educación la beca predoctoral FPU13/03615. Finalmente los autores agradecen a los Fondos Feder de la Comunidad Económica Europea (CEE) por la ayuda a los proyectos: UNHU 13-1E-1611 y UNHU 15-CE-3140.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cancer statistics originally published by the National Cancer Institute (NIH). Actualizado el 8 de marzo de 2018.
2. Statistics adapted from the publication of the American Society Against Cancer (American Cancer Society, ACS); Cancer facts and figures (Cancer Facts and Figures) 2018, and the ACS website.
3. R. Molina. Marrades RM, Augé JM et al. Assessment of a Combinend Panel of Six Serum Tumor Markers for Lung Cancer. *AJRCCM* 2016; 193 (4): 427-437.
4. Callejón-Leblic, B., Gómez-Ariza, J.L., Pereira-Vega, A et al. Metabolomic study of serum, urine and bronchoalveolar lavage fluid based on gas chromatography mass spectrometry to delve into the pathology of lung cancer. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2019; 163: 122-129.
5. B. Callejón-Leblic, Antonio Pereira-Vega, Eva Vázquez Gandullo et al. Study of the metabolomic relationship between lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease based on direct infusion mass spectrometry. *Biochimie* 2019; 157: 111-122.
6. E. Vázquez Gandullo, B. Callejón Leblic, A. Pereira Vega. Perfiles metabolómicos de sujetos sanos y con cáncer de pulmón. Influencia de la carga tabáquica. *Rev Esp Patol Torac* 2016; 28 (1): 38-46
7. W. Maret. The Metals in the Biological Periodic System of the Elements: Concepts and Conjectures. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, 17, 1–8.
8. H. S. Kim, Y. J. Kim, Y. R. Seo, An overview of carcinogenic heavy metal: molecular toxicity mechanism and prevention. *J. Cancer Prev.*, 2015, 20, 232–240.
9. D. S. Kalinowski, C. Stefani, S. Toyokuni, T et al. Redox cycling metals: Pedaling their roles in metabolism and their use in the development of novel therapeutics *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.*, 2016, 1863, 727–748.
10. M. O. Huff, S. L. Todd, A. L. Smith et al. Arsenite and Cadmium Activate MAPK/ERK via Membrane Estrogen Receptors and G-Protein Coupled Estrogen Receptor Signaling in Human Lung Adenocarcinoma Cells. *Toxicol. Sci.*, 2016, 152, 62–71.
11. L. Fouani, S. V. Menezes, M. Paulson, D.R et al. Metals and metastasis: use of the role of metals in cancer metastasis to develop new anti-metastatic agents. *Pharmacol. Res.*, 2017, 115, 275–287.
12. K. Zabłocka-Słowińska, S. Placzkowska, A. Prescha, K et al. Serum and whole blood Zn, Cu and Mn profiles and their relationship with the redox state in patients with lung cancer., *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2018, 45, 78–84.

13. K.-Y. Lee, P.-H. Feng, H.-C. Chuang et al. Trace Elements in Pleural Effusion Correlates with Smokers with Lung Cancer. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2017, 182, 14–20.
14. J. Y. Kim, H. B. Lim and M. H. Moon, Online Miniaturized Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for Metalloprotein Analysis of Plasma from Patients with Lung Cancer. *Anal. Chem.*, 2016, 88, 10198–10205.
15. C. Tan, H. Chen, T. Wu. Classification models for the detection of lung cancer according to the distribution of nine elements of urine samples. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2011, 142, 18–28.
16. Y. Benderli Cihan, S. O. zturk Yildirim. A discriminant analysis of trace elements in the hair of the scalp of healthy controls and patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) in stage III. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2011, 144, 272–294.
17. P. Censi, P. Zuddas, L. A. Randazzo et al. Source and Nature of Inhaled Atmospheric Dust from Trace Element Analyses of Human Bronchial Fluids. *Enviro. Sci. Technol* 2011; 45: 6262-6267.
18. Callejón-Leblic, B., Gómez-Ariza, J.L., Pereira-Vega et al. Metal dyshomeostasis based biomarkers of lung cancer using human biofluids *Metallomics*, 2018; 10: 1444-1451.
19. E. Bargagli, F. Monaci, N. Bianchi et al. Analysis of Trace Elements in Bronchoalveolar Lavage of Patients with Diffuse Lung Diseases. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2008, 124, 225–235.
20. Suzuki K., Yamaya Y., Kanzawa N et al. 2008. Tracing and status of the main elements in the bronchoalveolar lavage fluid in dogs with or without bronchopneumonia, *Biol. Trace Elem. Res.* 124: 92–96
21. P. Sarita, G. J. N. Raju, M. R. Kumar, A et al. Analysis of blood serum of lung cancer patients using particle induced X-ray emission. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 2013, 297, 431–436.
22. M. Le, O. Rathje, A. Levina et al. The high cytotoxicity of the vanadium (IV) complexes with 1,10-phenanthroline and related ligands is due to the decomposition in the cell culture medium. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2017, 22, 663–672.
23. M. Clementino, X. Shi, Z. Zhang. Oxidative stress and metabolic reprogramming in the Carcinogenesis of Cr (VI). *Curr. Opin. Toxicol.*, 2018, 8, 20–27.
24. J. D. Aguirre, V.C. Culotta. Battles with Iron: Manganese in Oxidative Stress Protection. *J. Biol. Chem.*, 2012, 287, 13541–13548.
25. G. F. Nordberg, A. Bernard, G. L. Diamond et al. Risk assessment of effects of cadmium on human health (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, 2018, 90, 755–808
26. P. Richter, O. Faroon, R.S. Pappas. Cadmium and Cadmium/Zinc Ratios and Tobacco-Related Morbidities. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2017, 14, 1–18
27. V.L. Kinnula, J.D. Crapo. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2003, 167, 1600–1619
28. L.L. Zhang, F.S. Wei, G.P. Wu. In 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, iCBBE 2009, 2009
29. N. Wiernsperger, J. Rabin. Trace elements in glucometabolic disorders: an update. *Diabetol. Metab. Syndr.*, 2010, 2, 70.
30. R. Gonzalez-Dominguez, T. Garcia-Barrera, J.L. Gomez-Ariza. Characterization of metal profiles in serum during the progression of Alzheimer's disease. *Metallomics*, 2014; 6: 292-300.