



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Detección de biomarcadores para el diagnóstico de cáncer de páncreas mediante estudios volatolómicos de muestras de orina

Autor/es

JAVIER BLÁZQUEZ MARTÍN

Director/es

MARÍA TERESA TENA VÁZQUEZ DE LA TORRE y MARÍA PILAR MARTÍNEZ MORAL

Facultad

Facultad de Ciencia y Tecnología

Titulación

Grado en Química

Departamento

QUÍMICA

Curso académico

2020-21



Detección de biomarcadores para el diagnóstico de cáncer de páncreas mediante estudios volatolómicos de muestras de orina, de JAVIER BLÁZQUEZ MARTÍN

(publicada por la Universidad de La Rioja) se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.



**UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA**

Facultad de Ciencia y Tecnología

Grado en Química

**Detección de biomarcadores para el diagnóstico de
cáncer de páncreas mediante estudios
volatológicos de muestras de orina**

**“Biomarker detection for diagnosis of pancreatic
cancer by volatologic studies in urine samples”**

Autor:

Javier Blázquez Martín

Tutoras:

María Teresa Tena Vázquez de la Torre

María Pilar Martínez Moral

Curso 2020 - 2021

ÍNDICE

ABREVIACIONES	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
1.- OBJETIVOS.....	6
2.- INTRODUCCIÓN.....	7
3.- EXPERIMENTAL.....	15
3.1.- Patrones y reactivos.....	15
3.2.- Muestras	15
3.3.- Patrón interno.....	15
3.4.- Instrumento	16
3.5.- Preparación de las muestras y proceso de extracción.....	16
3.6.- Determinación de creatinina	16
3.7.- Software	17
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1.- Identificación de compuestos orgánicos volátiles en orina.....	18
4.2.- Estudio de estabilidad de las muestras de orina	22
4.3.- Optimización del proceso de extracción HS-SPME.....	23
4.3.1.- Tipo de fibra	23
4.3.2.- Volumen de muestra.....	25
4.3.3.- Adición de ácido, base o sal	26
4.3.4.- Digestión con β -glucoronidasa.....	28
4.3.5.- Temperatura de extracción.....	29
4.3.6.- Tiempo de extracción.....	30
4.4.- Repetibilidad y precisión intermedia	31
4.5.- Variabilidad interindividuos	32
4.6.- Análisis de creatinina	33
4.7.- Identificación de biomarcadores	35
4.8.- Comparación entre muestras de suero y orina	41
5.- CONCLUSIONES	42
6.- BIBLIOGRAFÍA.....	44

ABREVIACIONES

- ACUR: *Analytical Chemistry at University of La Rioja* / Química Analítica en la Universidad de La Rioja
- ANOVA: *Analysis of variance* / Análisis de la varianza
- AUC: *Area under the curve* / Área bajo la curva
- CAR: Carboxen
- DVB: Divinilbenceno
- IDH: Índice de desarrollo humano
- FAIMS: *High field asymmetric waveform ion mobility spectrometry* / Espectrometría de movilidad iónica de forma de onda asimétrica de campo alto
- GC: *Gas chromatography* / Cromatografía de gases
- HPLC: *High performance liquid chromatography* / Cromatografía líquida de alta eficacia
- HS: *Head space* / Espacio de cabeza
- IC: Intervalo de confianza
- IMS: *Ion-mobility spectrometry* / Espectrometría de movilidad iónica
- MS: *Mass spectrometry* / Espectrometría de masas
- NIST: *National Institute of Standards and Technology* / Instituto Nacional de Estándares y Tecnología
- PA: Poliacrilato
- PCA: *Principal components analysis* / Análisis de componentes principales
- PDMS: Polidimetilsiloxano
- ROC: *Receiver operating characteristics* / Característica operativa del receptor
- SIFT: *Selected Ion Flow Tube*
- SPME: *Solid phase microextraction* / Microextracción en fase sólida
- TOF: *Time of flight* / Tiempo de vuelo
- VOC(s): *Volatile organic compound(s)* / Compuesto(s) orgánico(s) volátil(es)

RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. La detección temprana de cáncer permite abordar la enfermedad en sus estados iniciales, disponiendo de más opciones de tratamientos y mejorando la esperanza de vida del paciente. Sin embargo, para determinados tipos de cáncer no existen métodos de diagnóstico precoz. Por este motivo, el cáncer de páncreas se encuentra entre los tipos de cáncer con peor tasa de supervivencia, con una tasa de supervivencia a 5 años del 9% (Rawla, Sunkara and Gaduputi, 2019).

En este trabajo de fin de grado se expone la optimización y aplicación de un método de análisis de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) en orina mediante HS-SPME-GC/MS, para la detección e identificación de posibles biomarcadores para el diagnóstico de cáncer de páncreas.

El trabajo comenzó con una identificación tentativa de los VOCs presentes en orina por comparación con la biblioteca espectral NIST, seguido de un estudio de estabilidad de muestras. Se estudiaron las variables relacionadas con la preparación de la muestra y la extracción HS-SPME con el objetivo de encontrar las condiciones que permiten la detección de un mayor número de VOCs con mayor sensibilidad. Durante la optimización del método se estudiaron la fibra de extracción, el volumen de muestra, la adición de ácido, sal o base, la digestión con β -glucuronidasa, la temperatura de extracción y el tiempo de extracción.

Para conocer la variabilidad del método, se estudió la repetibilidad y la precisión intermedia, así como la variabilidad interindividuo y la posible correlación entre la señal de los VOCs y la concentración de creatinina, usando una selección de VOCs representativos.

Finalmente, se demostró la aplicabilidad del método realizando un estudio preliminar control-caso de cáncer de páncreas en el que se analizaron 5 muestras de pacientes y 5 muestras de controles. Se encontraron 5 VOCs capaces, mediante análisis de componentes principales, de discriminar entre ambos grupos.

Este trabajo surge como estudio complementario al que se realiza en el grupo de investigación *Analytical Chemistry at University of La Rioja* (ACUR) para la detección de posibles biomarcadores para el diagnóstico de cáncer de páncreas en muestras de suero sanguíneo, aludiendo a la presencia de VOCs tanto en muestras de suero como de orina.

ABSTRACT

Cancer is one of main mortality causes worldwide. Early detection of cancer is crucial for the efficient treatment with broader pharmaceutical options and improving the prognosis of the disease. However, no early diagnostic tools are available for certain kind of cancer. For these reasons pancreatic cancer is within the cancer kind with worst survival rate, with a 5-year survival rate of 9% (Rawla, Sunkara and Gaduputi, 2019).

In this end-of-degree project it is presented the optimization and application of an extraction method for the analysis of volatile organic compounds (VOCs) in urine performed by HS-SPME-GC/MS, for the detection and identification of suitable biomarkers for the diagnosis of pancreatic cancer.

This work started with a tentative identification of VOCs present in urine by spectral comparison using NIST library, followed by a sample stability study. With the goal of getting the greatest number of VOCs signals and best sensitivity, the variables related with sample preparation and HS-SPME extraction were studied. The method optimization involved the study of SPME fiber, sample volume, addition of acid, base, or salt, β -glucuronidase digestion, extraction temperature and extraction time.

The method's variability was studied by the evaluation of the repeatability and intermediate precision, as well as interpersonal variability and a possible correlation between VOCs' signal area and creatinine concentration, using a selection of representative VOCs.

Finally, the applicability of the method was shown in a preliminary pancreatic cancer control-case study involving the analysis of 5 control and 5 pancreatic cancer urine samples. 5 VOCs were found to be able, by principal components analysis, of differentiating between the groups.

This work surged as a complementary study of the one carried on by the Analytical Chemistry at University of La Rioja (ACUR) research group for the detection of possible biomarkers for pancreatic cancer diagnosis in blood serum, referring to the presence of VOCs both in serum and urine.

1.- OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es el desarrollo de un método analítico basado en HS-SPME-GC/MS que permita la evaluación del perfil volatolómico de la orina; y la aplicación de este método en el estudio de muestras de pacientes y controles para encontrar posibles biomarcadores que permitan la detección temprana del cáncer de páncreas.

Los objetivos específicos propuestos a llevar a cabo para el desarrollo del estudio son los siguientes:

- Realizar una búsqueda bibliográfica y de información estadística sobre el proyecto.
- Identificar, tentativamente, las señales obtenidas de los perfiles volatolómicos mediante la comparación de espectros de masas con librerías espectrales.
- Optimizar el método HS-SPME-GC/MS para la obtención de perfiles volatolómicos en orina. Las diferentes variables a estudiar son: tipo de fibra de extracción, volumen de muestra, adición de sal, ácido o base a la muestra, pH y tiempo de digestión con β -glucuronidasa, temperatura de extracción y tiempo de extracción.
- Validar el método propuesto.
- Comprobar la variabilidad natural de VOCs entre individuos.
- Evaluar la variabilidad natural de la concentración de VOCs producida por la dilución, a través de la cuantificación de creatinina.
- Analizar y comparar muestras de controles sanos y muestras de pacientes de cáncer de páncreas. Evaluar las diferencias estadísticamente significativas y proponer candidatos a biomarcadores de cáncer de páncreas en orina.
- Comparar los perfiles volatolómicos obtenidos para orina y para suero. Comprobar las diferencias en número e intensidad de las señales, y en los VOCs presentes.

2.- INTRODUCCIÓN

El cáncer es, sin duda, uno de los mayores retos a los que la sociedad se enfrenta. Según estudios, en 2018, el cáncer fue, en hasta 177 países, una de las tres principales causas de muerte prematura entre las edades de 30 y 70 años y, si se mantiene la tendencia actual, el cáncer será la primera causa en la mayoría de ellos (Bray et al., 2021). Además, se espera que el número de nuevos casos diagnosticados de cáncer aumente hasta 20,3 millones a nivel mundial en 2030, con el número de muertes subiendo hasta 7,6 millones (Bray et al., 2012).

En la Figura 1. se muestra el número estimado de nuevos diagnósticos de cáncer en 2020. Podemos observar que los tipos de cáncer más comunes a nivel global son cáncer de mama, de pulmón, colorrectal, de próstata y de estómago.

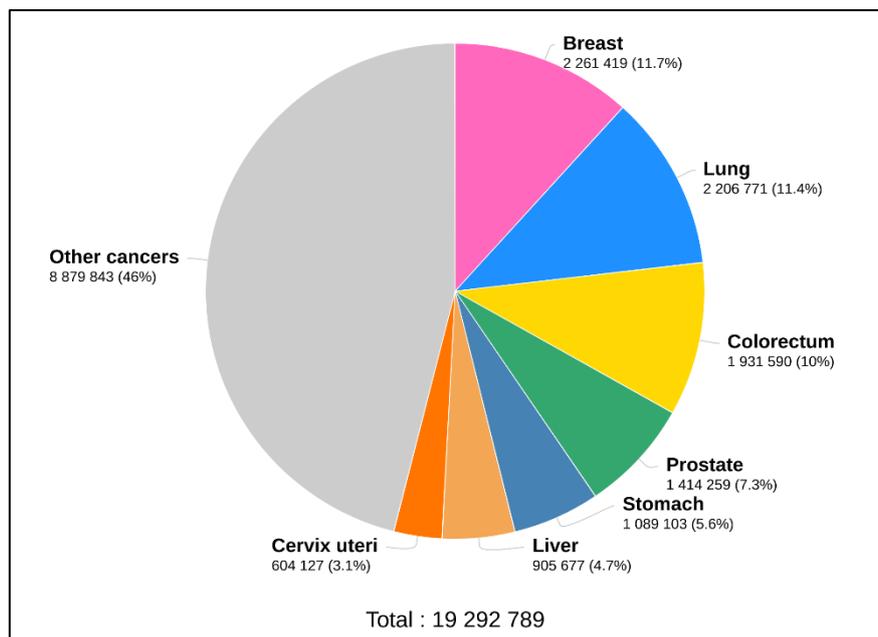


Figura 1. Número estimado de nuevos casos de cáncer en 2020, a nivel mundial, para ambos sexos y a todas las edades. Fuente: GLOBOCAN 2020, International Agency for Research on Cancer.

El cáncer de páncreas se sitúa en el puesto 14 en cuanto a número de nuevos casos anuales, y séptimo en número de muertes (Sung et al., 2021). Si bien el incremento se ha decelerado, ambas cifras han ido aumentando a lo largo de los años, lo que se refleja en la Figura 2., en la que se muestran el número de nuevos casos y muertes y el porcentaje que representan en el total de casos y muertes de todos los tipos de cáncer a nivel mundial.

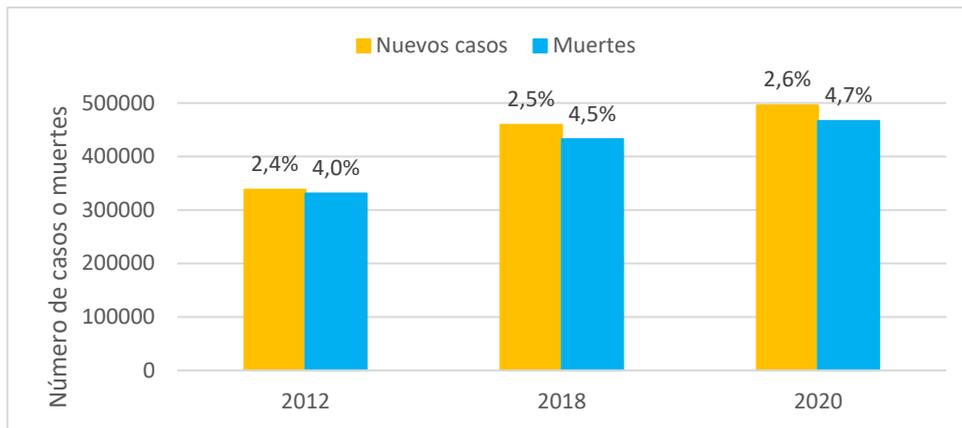


Figura 2. Relación de nuevos casos y muertes por cáncer de páncreas y su porcentaje sobre el total de nuevos casos y muertes por cáncer en los años 2012, 2018 y 2020, a nivel mundial. Fuente: elaboración propia a partir de los datos de (Sung et al., 2021), (Bray et al., 2018), (Ilic and Ilic, 2016), (Torre et al., 2015)

Los datos demuestran que la incidencia del cáncer de páncreas es mayor en hombres que en mujeres. También afecta más en edades más avanzadas, con casi el 90% de los casos diagnosticados y las muertes ocurridas una vez cumplidos los 55 años (The Global Cancer Observatory, 2020). El máximo de incidencia según la edad ocurre en edades superiores a los 70 años (Ilic and Ilic, 2016). Este tipo de cáncer es más frecuente en países con mayor índice de desarrollo humano, con los países con IDH muy alto contabilizando mayor número de casos y muertes que el resto de países (The Global Cancer Observatory, 2020). Se espera, además, que la incidencia y la mortalidad aumenten en 77,7 y 79,9%, respectivamente entre 2018 y 2040 (Rawla, Sunkara and Gaduputi, 2019).

La ausencia de síntomas en las primeras etapas del cáncer de páncreas y la no disponibilidad de técnicas de diagnóstico específicas complican su detección, la cual suele ocurrir en el estadio IV del cáncer, cuando la cirugía para eliminar el tumor es muy complicada. Además, los diferentes tratamientos disponibles son limitados y poco efectivos. Por ello, el cáncer de páncreas tiene una tasa de supervivencia muy baja, del 9% tras 5 años del diagnóstico (Rawla, Sunkara and Gaduputi, 2019).

Los síntomas que produce el cáncer de páncreas no son específicos de la enfermedad. La ictericia, dolor abdominal o de espalda, pérdida de peso y de apetito, náuseas y vómitos, crecimiento de vesícula biliar o hígado por acumulación de bilis, trombos sanguíneos o la diabetes son algunos de los síntomas que puede sufrir un paciente de cáncer de páncreas (Wyant et al., n.d.).

El diagnóstico también presenta limitaciones. Entre las diferentes formas de diagnóstico se encuentran las pruebas de imagen (tomografía computarizada, resonancia magnética, ultrasonidos, colangiopancreatografía, tomografía de emisión de positrones, angiografía), las pruebas de funcionamiento de hígado (análisis de bilirrubina en sangre) o la detección de biomarcadores tumorales (antígeno carbohidrato 19-9 (CA 19-9) o antígeno carcinoembrionario (CEA), ninguno de los dos específicos para el cáncer de páncreas) (Wyant et al., n.d.). Para todas ellas, es necesaria una posterior biopsia como prueba de confirmación.

Por ello, es de vital importancia la investigación tanto para encontrar nuevos tratamientos que curen o palien los síntomas del cáncer de páncreas, así como encaminada a desarrollar nuevas

técnicas y métodos que permitan su diagnóstico precoz. Este trabajo se centra en la segunda parte, con el desarrollo y optimización de un método para la extracción y detección de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) en orina, que permitan encontrar biomarcadores que puedan ser utilizados para el diagnóstico de cáncer de páncreas.

La metabolómica es la rama de la ciencia basada en el estudio de los metabolitos, moléculas pequeñas y de bajo peso molecular que son productos finales de las rutas metabólicas que suceden dentro de un organismo. Esta ciencia busca detectar, cuantificar y mostrar las estructuras de los metabolitos presentes en diferentes matrices biológicas. A diferencia de la genómica y proteómica, ciencias basadas en el estudio del genoma y las proteínas, la metabolómica se encuentra con una gran desventaja, ya que los metabolitos presentan una gran variedad de estructuras y propiedades físicas y químicas. Por ello, los metabolitos suelen clasificarse en grupos según sus características, de manera que se puedan desarrollar metodologías óptimas para cada grupo.

Uno de estos grupos son los compuestos orgánicos volátiles (VOCs), que son aquellos metabolitos que presentan una alta volatilidad. La volatolómica es la rama de la metabolómica que se encarga de estudio de los VOCs. Estas moléculas pueden ser utilizadas como biomarcadores, ya que pueden ser específicos para distintas enfermedades (metabólicas, genéticas, infecciosas y cancerosas) (Jalal et al., 2018). La presencia o ausencia y la concentración de los VOCs pueden permitir el diagnóstico, seguimiento y control de dichas enfermedades.

Los VOCs pueden ser detectados en diferentes matrices biológicas, por métodos de extracción de muestra invasivos (sangre, suero sanguíneo, plasma, fluidos intersticiales) como no invasivos (orina, saliva, sudor, aliento, heces, lágrimas, leche materna, etc.) (Jalal et al., 2018).

Tabla 1. Relación de distintas matrices biológicas y el número y grupos de VOCs identificados en ellas. Fuente: elaboración propia a partir de (de Lacy Costello et al., 2014), (Liu et al., 2014)

Matriz	N.º de VOCs	Grupos de VOCs mayoritarios (de mayor a menor proporción del total de VOCs identificados)
Sangre	154	Alcoholes, compuestos halogenados, clorobifenilos, hidrocarburos, furanos y éteres
Fluido pleural	36	Cetonas, aldehídos, alcoholes, hidrocarburos, terpenoides, derivados del benceno, fenoles, ésteres, otros
Orina	279	Furanos y éteres, cetonas, compuestos nitrogenados, alcoholes, compuestos sulfurados, hidrocarburos, aldehídos
Saliva	359	Hidrocarburos, cetonas, alcoholes, aldehídos, ésteres, ácidos orgánicos
Secreciones de la piel	532	Hidrocarburos, alcoholes, ésteres, ácidos orgánicos, compuestos nitrogenados, furanos y éteres, cetonas
Aliento	872	Hidrocarburos, furanos y éteres, compuestos nitrogenados, cetonas
Heces	381	Hidrocarburos, alcoholes, cetonas, furanos y éteres, ésteres, compuestos nitrogenados, compuestos sulfurados
Leche materna	256	Hidrocarburos, ácidos orgánicos, ésteres, alcoholes, compuestos nitrogenados, furanos y éteres

En la Tabla 1. se incluyen, para diferentes muestras biológicas, el número de VOCs identificados y los grupos de VOCs mayoritarios detectados en cada una de ellas. Las familias de VOCs mayoritarias más comunes son hidrocarburos (en 8 muestras), alcoholes (en 7 muestras), y cetonas, y éteres y furanos (en 6 muestras).

El potencial de la volatolómica como herramienta para el descubrimiento de biomarcadores que permiten diferenciar pacientes de cáncer de individuos sanos ha sido puesto de manifiesto por varios autores. En la Tabla 2. se incluyen ejemplos de diferentes VOCs que han sido propuestos a candidatos, o se utilizan como biomarcadores para la detección de diversos tipos de cáncer, en distintas matrices. GC/MS es la técnica de separación y detección más común para el análisis de VOCs, y la técnica de extracción más empleada es la microextracción en fase sólida (SPME).

Tabla 2. Relación de VOCs candidatos a biomarcadores en distintas matrices para distintos cánceres

Matriz	Tipo de cáncer	VOCs	Técnica	Referencia
Aliento	Pulmón	Propano, disulfuro de carbono, 2-propenal, etilbenceno y alcohol isopropílico	SPME-GC-TOF/MS	(Rudnicka et al., 2011)
Fluido pleural	Pulmón	Ciclohexanona, 2-etil-1-hexanol, 2-fenil-2-propanol, 1,2,4,5-tetrametilbenceno, longifoleno	HS-SPME-GC/MS	(Liu et al., 2014)
Bilis	Páncreas	Acetaldehído, acetona, benceno, disulfuro de carbono, pentano y trimetilamina	HS-SIFT-MS	(Navaneethan et al., 2014)
Bilis	Colangiocarcinoma	Etanol, acrilonitrilo, acetonitrilo, acetaldehído, benceno, disulfuro de carbono, sulfuro de dimetilo, 2-propanolol	HS-SIFT-MS	(Navaneethan et al., 2015)
Orina	Colorrectal	Citrato, putrescina, miristato, p-cresol, hipurato, 2-aminobutirato	GC-TOF/MS	(Cheng et al., 2011)
Aliento	Cabeza y cuello	Etanol, acrilonitrilo, undecano	GC/MS	(Gruber et al., 2014)
Orina	Próstata	2,6-dimetil-7-octen-2-ol, pentanal, 3-octanona y 2-octanona	HS-SPME-GC/MS	(Khalid et al., 2015)
Aliento	Pulmón	2-butanona, benzaldehído. 2,3-dbutanodiona, 1-propanol, 3-hidroxi-2-butanona, 3-butin-1-ol, 2-metilbutano, 2-metilbuteno, acetofenona, 1-ciclopenteno, sulfuro de metilo y propilo, tetrametilurea, n-pentanal, 1-metil-1,3-ciclopentadieno, 2,3-dimetil-2-butanol, 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina, 3,7-dimetilundecano, ciclobutilbenceno, acetato de butilo, etilenimina y n-undecano. Sets de 4, 15 y 21 (en orden de aparición)	SPME-GC/MS	(Bajtarevic et al., 2009)

Tabla 2.Cont. Relación de VOCs candidatos a biomarcadores en distintas matrices para distintos cánceres

Matriz	Tipo de cáncer	VOCs	Técnica	Referencia
Cultivos de células de cáncer de pulmón	Pulmón	2,3,3-trimetilpentano, 2,3,5-trimetilhexano, 2,4-dimetilheptano, 4-metiloctano (concentración aumenta en presencia de células de cáncer). Metacroleína, 2-metilpropanal, metil tert-butil éter, 3-metilbutanal, acetato de n-butilo, acetaldehído, acetonitrilo, acroleína, 2-butanona, etil tert-butil éter, 2-metil-2-butenal, hexanal (concentración disminuye en presencia de células de cáncer)	GC/MS	(Filipiak et al., 2008)
Aliento	Pulmón	Sulfuro de dimetilo, 1,4-pentadieno, acetato de etilo, metilciclopentano, 2-propanol, isobutano y 2,4-dimetilheptano	SPME-GC/MS	(Rudnicka et al., 2014)
Cultivos de tejido estomacal	Gástrico	Ratios cetónicos de 1-propanol y disulfuro de carbono. Cetonas, butano, etanol, 1-propanol y disulfuro de carbono. Puede que butano y disulfuro de carbono provengan de bacterias	SPME-GC/MS	(Buszewski et al., 2008)
Aliento	Colorrectal	Red neuronal probabilística. Nonanal, 4-metil-2-pentanona, decanal, 2-metilbutano, 1,2-pentadieno, 2-metilpentano, 3-metilpentano, metilciclopentano, ciclohexano, metilciclohexano, 1,3-dimetilbenceno, 4-metiloctano, 1,4-dimetilbenceno, 4-metilundecano, trimetildecano	GC/MS	(Altomare et al., 2012)
Suero de pacientes pre- y post-cigruía de extracción	Colorrectal	l-valina, 5-oxo-l-prolina, l-deoxiglucosa, l-tirosina, d-turanosa, d-maltosa, ácido hexadecanoico, ácido araquidónico	GC/MS	(Ma et al., 2009)
Aliento	Mama	2,5,6-trimetiloctano, 1,4-dimetoxi-2,3-butanodiol y ciclohexanona	SPME-GC/MS	(Wang et al., 2014)
Sangre	Colorrectal	Carbamato de fenilo y metilo, etilhexanol y 6-t-butil-2,2,9,9-tetrametil-2,5-dimetilenciclohexano	HS-SPME-GC/MS	(Wang et al., 2013)
Plasma sanguíneo	Carcinoma hepatocelular	Ácido glutámico, valina, leucina, isoleucina, α -tocoferol, colesterol, ácido cítrico, ácido láctico y sorbosa	GC/MS	(Nezami Ranjbar et al., 2015)

Además de las ya expuestas, se han descrito otras técnicas para el estudio de VOCs como biomarcadores, como diferentes tipos de biosensores (quimiorresistentes, ópticos, piezoeléctricos, electroquímicos) (Jalal et al., 2018). También, específicamente para el estudio de cáncer de páncreas mediante el análisis de muestras de orina, se han presentado otras técnicas, como la espectrometría de movilidad iónica de forma de onda asimétrica de campo alto (FAIMS) (Nissinen et al., 2018), la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de movilidad iónica (GC/IMS) o la cromatografía de gases con tiempo de vuelo acoplada a

espectrometría de masas (GC-TOF-MS), con la que se identificaron 3 posibles biomarcadores, 2,6-dimetiloctano, nonanal y 4-etil-1,2-dimetilbenceno, para la discriminación entre individuos sanos y pacientes de adenocarcinoma pancreático ductal (Daulton et al., 2021).

La técnica utilizada en este estudio ha sido la microextracción en fase sólida en espacio de cabeza (HS-SPME) con cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), que no ha sido utilizada previamente con el mismo fin. Se presenta como la técnica más indicada para la volatolómica de muestras biológicas, ya que facilita la preparación de la muestra y no solo ofrece un perfil volatolómico, sino también información para la identificación de los VOCs por comparación de espectros de masas obtenidos con bibliotecas espectrales.

La microextracción en fase sólida (SPME) es una técnica de extracción que no utiliza disolventes. Consiste en introducir una fibra metálica recubierta de uno o varios polímeros, o bien en el seno de una matriz gaseosa o líquida (inmersión directa), o bien en el espacio de cabeza (*head space*, HS) dentro de un recipiente que contenga una matriz líquida o sólida. De esta manera, los analitos de interés se adsorben a la fibra, que luego se introduce en el inyector para someterla a un proceso de desorción para liberar los analitos e introducirlos en el cromatógrafo.

La SPME se utiliza acoplada a cromatografía de gases o HPLC; los analitos están en fase líquida o gaseosa. Para esta metodología de extracción, se pueden optimizar las siguientes variables: la fibra de extracción, el volumen de muestra, el pH, la agitación de la muestra, el tiempo de extracción y la temperatura de extracción. Además, la modificación de la solubilidad de los VOCs en la matriz de origen (efecto *salting out*) también puede ser optimizada.

En la Tabla 3. se incluyen diferentes tipos de analitos y qué polímeros son adecuados para su extracción y análisis mediante cromatografía de gases (GC).

Tabla 3. Relación de grupos de analitos y polímeros recomendados. Fuente: elaboración propia a partir de (Supelco, n.d.)

Tipo de analito	Rango de paso molecular	Polímero
Gases y compuestos de bajo peso molecular	30 - 225	CAR/PDMS
Volátiles	60 - 275	PDMS
Volátiles, aminas y compuestos nitroaromáticos	50 - 300	PDMS/DVB
Semivolátiles polares	80 - 300	PA
Compuestos no polares de alto peso molecular	125 - 600	PDMS
Semivolátiles no polares	80 - 500	PDMS
Alcoholes y compuestos polares	40 - 275	Carbowax/DVB
Aromas: volátiles y semivolátiles (C3-C20)	40 - 275	DVB/CAR/PDMS
Trazas	40 - 275	DVB/CAR/PDMS

Estudios previos (Hontañón et al., 2019) y en desarrollo en el grupo de investigación ACUR indican la existencia de VOCs en suero que se presentan como biomarcadores potenciales para el diagnóstico de cáncer de páncreas. Si bien los resultados preliminares en suero son prometedores, esta matriz biológica presenta una serie de desventajas. La obtención de esta muestra es invasiva, ya que se requiere una extracción de sangre del paciente, lo que también limita el volumen total de muestra y la frecuencia con la que se puede recoger. Además, este proceso debe realizarse por personal cualificado. Otra limitación que presenta el suero es que no se extrae directamente, sino que se debe realizar una coagulación de la sangre y un centrifugado para separar el suero de la parte celular y el fibrinógeno.

La orina, en cambio, es una muestra biológica que presenta más conveniencias en su obtención, ya que no es un proceso invasivo, no necesita personal cualificado para su recolección, el volumen disponible es mucho mayor, y no requiere de un pretratamiento para su obtención. Durante el trabajo con muestras de orina puede ser necesario considerar posibles efectos de su dilución o la presencia de β -glucuronidos formados previamente a la excreción.

La dilución de la orina puede afectar a la concentración de los VOCs, lo que puede alterar los resultados de los estudios. Este problema se puede solventar relacionando la concentración de VOCs presentes en las muestras con la concentración de creatinina, un metabolito que se produce y excreta por el cuerpo de manera constante (De Jesús et al., 2020). Así, habría que introducir un factor de corrección de dilución a los datos obtenidos en el análisis.

Los β -glucuronidos son derivados de xenobióticos y endobióticos lipofílicos que precisan de una reacción química que los vuelvan más hidrófilos, de manera que puedan ser excretados por la orina (Wagenstaller and Buettner, 2013). Es posible que algunos VOCs hayan sido excretados en forma de β -glucuronidos, por lo que se puede llevar a cabo una derivatización con β -glucuronidasa para liberar los VOCs.

Este trabajo se centra en el desarrollo y optimización de un método para el estudio volatolómico en orina. Incluye una identificación tentativa de VOCs, un estudio de estabilidad de muestras, y la optimización y validación del método propuesto. Además, se realizaron estudios de variabilidad interindividuo y por análisis de creatinina, una búsqueda de biomarcadores comparando muestras de pacientes y controles, y una comparación entre resultados obtenidos en orina y en suero para comprobar si se encuentran los mismos VOCs en ambas matrices, o si aparecen nuevos biomarcadores en orina. El método propuesto se utilizó para llevar a cabo un estudio piloto control-caso de cáncer de páncreas. Los datos obtenidos para controles y pacientes fueron comparados y tratados estadísticamente.

El tratamiento estadístico se divide en 3 etapas. En la primera, se realiza una prueba de la t de Student entre las señales de pacientes y las señales de controles; el p-valor nos indica si existen diferencias significativas entre las señales de cada grupo.

La segunda etapa es la evaluación del área bajo la curva (AUC) que generan las curvas ROC (receiver operating characteristics). Las curvas ROC son utilizadas en el ámbito biomédico ya que muestran de manera visual la capacidad de diagnóstico de un modelo de clasificación binaria. En este caso, el modelo predice si el individuo tiene cáncer de páncreas o no.

Los gráficos ROC son representaciones de la sensibilidad (el número de positivos verdaderos, en tanto por uno) frente a 1 - especificidad (el número de falsos positivos, en tanto por uno). La curva ROC muestra los intercambios relativos entre positivos verdaderos y falsos positivos para diferentes predictores. El predictor adecuado será aquel que se aleje más de la línea diagonal

que une los puntos (0,0) y (1,1) del gráfico, y será el que mayores sensibilidades y especificidades obtenga.

Un predictor perfecto es aquel que consigue una sensibilidad y una especificidad del 100%, es decir, se encuentra en el punto (0,1) del gráfico. Esta curva ROC arrojaría un AUC de 1 (área total del gráfico). Para un predictor no perfecto, cuanto mayor sea el AUC, mayor será su capacidad de diagnóstico (Fawcett, 2006).

La tercera etapa consiste en un análisis de componentes principales (PCA, *principal components analysis*). Para este estudio, obtendremos una matriz de datos de dimensión $m \times n$, donde m es el número de variables, en este caso, VOCs que presentan diferencias significativas entre las señales de pacientes y controles, y n el número total de pacientes y controles. Es posible que algunas de las variables estén correlacionadas, y se produzca aporte de información redundante. El PCA nos permite sustituir estas variables por un número menor de estas, llamadas componentes principales, cuya correlación es mucho menor (es decir, son más independientes) sin incurrir en pérdida de información. Así pues, seleccionando las componentes principales que mayor varianza original acumulada expliquen, se pueden realizar representaciones de datos mucho más sencillas que no podrían ser posibles utilizando las variables originales (Grané, n.d.).

Este trabajo, en el que se optimiza la metodología analítica para el estudio volatolómico de orina, es una fase preliminar de un estudio cuyo objetivo es la identificación de biomarcadores de cáncer de páncreas que se desarrolla en la Universidad de La Rioja en colaboración con el Centro de Investigación Biomédica de La Rioja y el Hospital San Pedro. Futuras etapas del proyecto abarcarán ensayos clínicos control-caso en cáncer de páncreas incluyendo un número elevado de muestras, la evaluación de la progresión de la enfermedad, estudios de respuesta a tratamientos o nuevos medicamentos mediante el estudio de los biomarcadores encontrados en orina y, posteriormente, el desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico que permitan la detección de cáncer de páncreas.

3.- EXPERIMENTAL

3.1.- Patrones y reactivos

Los estándares internos utilizados han sido 1,4-diclorobenceno-d₄ (CAS 3855-82-1, 2000µg/ml en metanol) y etilbenceno-d₁₀ (CAS 25837-05-2, 2000µg/ml en metanol). También se han requerido metanol para cromatografía líquida, ácido clorhídrico 0,5M, hidróxido sódico 0,5M, cloruro de sodio 0,5M, agua destilada, acetato de amonio, ácido acético glacial y β-glucoronidasa (mayor que 100.000 unidades/ml).

3.2.- Muestras

Se utilizaron muestras de orina de personas sanas para la optimización del proceso de extracción y la identificación de compuestos orgánicos volátiles (VOCs). Para ello, se recogieron 21 muestras de voluntarios sanos de diferente edad (desde 2 a 87 años) y sexo (48% masculino) que se usaron para la identificación de los VOCs presentes en orina, para estudiar el efecto de la dilución con la concentración y para establecer la repetibilidad y precisión intermedia.

Para la identificación de biomarcadores en orina y la comparación entre suero sanguíneo y orina se recogieron 5 parejas de muestras (orina y suero) de pacientes enfermos y 4 parejas de muestras de controles. Las muestras fueron recogidas en el Hospital San Pedro, tras su aprobación por el Comité de Ética de Investigación con medicamentos de La Rioja (CEImLar).

Las muestras se conservaron congeladas a una temperatura de -20°C. Previamente, las muestras fueron alicuotadas para reducir el número de ciclos de descongelación y congelación que sufren para la preparación de viales para análisis. Antes del análisis las muestras se descongelan a temperatura ambiente.

Además, a lo largo de la experimentación se fueron incluyendo blancos del proceso, que contenían la disolución de estándares internos añadida en cada muestra, además de otros reactivos que se pudieran haber añadido a estas.

3.3.- Patrón interno

Los patrones internos utilizados en este estudio fueron el 1,4-diclorobenceno y el etilbenceno deuterados. Estos compuestos eluyen a diferentes tiempos de retención (9,4 y 22,8 minutos para nuestras condiciones cromatográficas). El etilbenceno se emplea principalmente en la industria petroquímica, y es detectable en sangre, aliento y heces (Human Metabolome Database, n.d.). El 1,4-diclorobenceno es un desodorante e insecticida utilizado en el control de polillas (Gervais et al., 2010), y no debería encontrarse en las muestras en condiciones normales.

De las disoluciones comerciales (de 2000µg/ml en metanol), se prepara una disolución de concentración 1µg/ml de cada patrón interno en metanol. El vial que contiene esta disolución se conserva a una temperatura de -20°C. La disolución se atemperó antes de cada uso, y se añadieron 25µl a cada muestra y blanco de proceso.

Para este trabajo, los patrones internos no se utilizaron para una cuantificación de posibles VOCs presentes en orina (correspondería a una segunda fase de estudio). Su labor será funcionar como prueba de control, ya que las posibles variaciones de sus señales nos indicarán si el equipo

y el método funcionan correctamente o, si por el contrario, hay problemas instrumentales y/o de conservación.

3.4.- Instrumento

Las muestras de orina fueron analizadas en un cromatógrafo de gases Varian CP3800 acoplado a un espectrómetro de masas Varian Saturn 2200, equipado además a un automuestreador Combipal que permitió la extracción HS-SPME en línea.

Se utilizó la columna capilar ZB-35 Phenomenex (30m, 0,25mm i.d., 0,25µm de 35% difenil-65% dimetilsiloxano)

3.5.- Preparación de las muestras y proceso de extracción

En primer lugar, se atemperan las muestras, los patrones internos y los reactivos. Después se añaden los volúmenes correspondientes de cada uno de ellos y, una vez están listos los viales, o bien se colocan en la bandeja del cromatógrafo para su análisis, o se conservan a 4°C en el frigorífico hasta su análisis.

Las siguientes fibras (Supelco) fueron utilizadas en la extracción HS-SPME: fibras metálicas recubiertas de polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS/DVB) de 65µm de espesor, de divinilbenceno-carboxen-polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) de 50/30µm, y de carboxen-polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) de 85µm y una fibra de sílica fundida recubierta de poliacrilato(PA) de 85µm.

Las condiciones de extracción fueron las siguientes: se añaden 500µl de orina en un vial de 20ml y se somete a pre-incubación durante 1 min a 50°C y 250 rpm de agitación. Después, se introduce la fibra en el vial y se mantiene a 50°C durante 20 min para la adsorción de compuestos. La desorción se realiza a 250°C durante 30 s. Finalmente, la fibra se somete a un proceso de *bake out* a 270°C durante 15 min para asegurar la total desorción y evitar la contaminación cruzada.

La desorción se realizó en un inyector operado en modo *splitless* durante un minuto. Se mantuvo una ratio de división de 1/50 hasta el final del análisis.

La separación cromatográfica se realizó con el horno programado con la siguiente rampa de temperaturas: 40°C durante 15 minutos, incrementándose a 100°C a razón de 5°C/min. Esta temperatura se mantiene 1 min y se incrementa, a razón de 25°C/min, hasta 250°C, temperatura que se mantiene durante 2 min.

El gas portador fue helio, con un flujo constante de 1ml/min, con un inserto de 0,8mm (i.d.). La detección del espectro de masas se realizó en modo *full scan* entre las razones de masa-carga de 40 y 300 Da, con un tiempo de escaneo de 0,8 s/escaneo y con ionización electrónica.

3.6.- Determinación de creatinina

La concentración de creatinina fue medida por el laboratorio del Hospital San Pedro por el método de Jaffé. Es un método espectrofotométrico basado en la reacción de la creatinina con picrato de sodio en medio alcalino, en la que se forma un complejo que absorbe a 520nm. El espectrofotómetro es el modelo Cobas 2000 (Roche Diagnostics).

3.7.- Software

El software MS Workstation (Varian/Agilent) fue usado para adquirir e integrar las señales de los VOCs. La deconvolución e identificación de las señales se realizó con MassHunter (Agilent). Se usó Excel y Origin para la elaboración de gráficas y comparación de medias. Para el análisis estadístico de los datos del estudio control-caso (curvas ROC y PCA) se usó IBM SPSS.

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- Identificación de compuestos orgánicos volátiles en orina

La identificación de VOCs en orina realizada en este estudio es tentativa, ya que los nombres de los compuestos se obtuvieron por comparación de los espectros de masas con librerías espectrales. Esta comparación fue posible con el uso del software MassHunter, que permite una traducción y deconvolución de los cromatogramas obtenidos, así como una búsqueda comparativa de compuestos con espectros de masas de referencia, almacenados en una biblioteca del *National Institute of Standards and Technology* (NIST).

El criterio para seleccionar los picos a identificar fue el siguiente. Primero, se revisaron los cromatogramas y se apuntaron los tiempos de retención de cada pico candidato, el cual no debía aparecer en el cromatograma de los patrones internos. A continuación, estos cromatogramas se traducen y deconvolucionan con el software MassHunter. Con él, se revisan los espectros de masas de todos los picos y se anota el posible compuesto, los iones de cuantificación que se utilizarán para la obtención de áreas de cada uno y el porcentaje de concordancia entre los espectros del compuesto detectado y el de la biblioteca NIST.

En cromatografía, es común que en los cromatogramas se encuentren picos no resueltos o solapados debido a la coelución de analitos. Esto conlleva que la detección de iones de varios analitos ocurra a la vez o en intervalos de tiempo muy pequeños, produciendo señales no resueltas que, a siempre vista, se atribuirían a un solo analito.

La deconvolución es un proceso mediante el cual se separan las componentes m/z que forman las señales del cromatograma, de forma que el software pueda reconocer similitudes entre las variaciones de cada componente, y así agruparlas para identificar si la señal global se debe a uno o más analitos.

En nuestro estudio se encontraron varios casos en los que la deconvolución nos permitía identificar más de un compuesto para una sola señal. En la Figura 3. se presenta un ejemplo del proceso de la deconvolución.

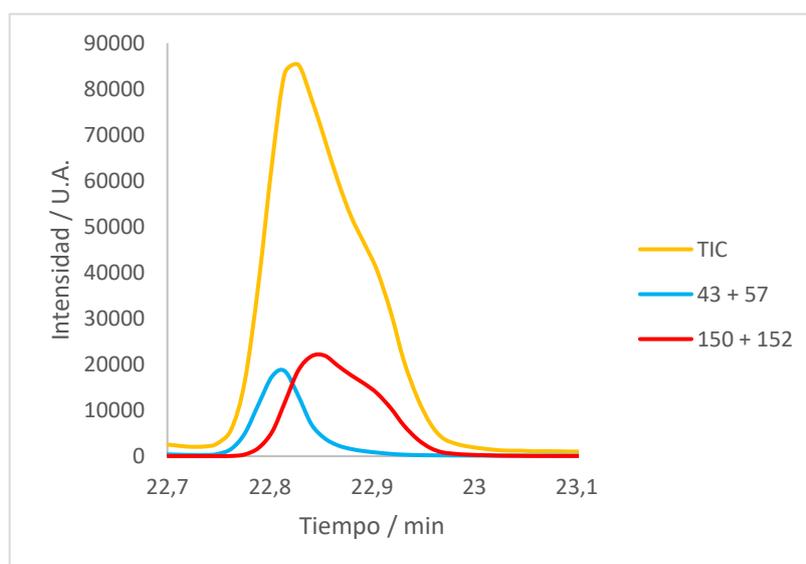


Figura 3. Fragmento de los cromatogramas en torno a la señal a 22,8 minutos. TIC, m/z 43 + 57 y m/z 150 + 152

En torno al minuto 22,8 solo es apreciable una sola señal para el TIC (*total ion chromatograph*). Este se asignaría al 1,4-diclorobenceno-d₄, uno de los estándares internos, del que conocemos su tiempo de retención por el análisis de blancos de proceso. Sin embargo, aplicada la deconvolución, se observó que la señal se debía a dos VOCs, cuyas dos relaciones de masa/carga mayoritarias fueron 43 y 57 (VOC 22,8A, identificado tentativamente como 2,3,3,4-tetrametilpentano) y 150 y 152 (VOC 22,8B, identificado como 1,4-diclorobenceno-d₄).

En la Tabla 4. se incluyen los 70 compuestos identificados en orina, así como el código que se les asigna, los iones de cuantificación utilizados y el porcentaje de concordancia.

Para los VOCs de códigos 1,8, 3,4A y 32,1 solo se incluye un ión de cuantificación, ya que los espectros de masas no mostraban iones secundarios de intensidades apreciables.

Para el VOC 9,4 no se incluye el porcentaje de concordancia. Este VOC es uno de los patrones internos (etilbenceno-d₁₀) y, a pesar de que se obtienen los iones esperados en el tiempo de retención obtenido por los blancos de proceso, el software no es capaz de reconocerlo.

El VOC 10,1 es identificado como etilbenceno por el software. Sin embargo, la identificación como etilbenceno aparece en tres picos (VOCs 9,8, 10,1 y 12,8), que presentan también los mismos iones. Una revisión de la literatura permitió identificar estos compuestos como etilbenceno (VOC 9,8), m-xileno y p-xileno (coeluyen en el VOC 10,1) y o-xileno (VOC 12,8) (Ezquerro et al., 2004).

A partir de los VOCs la Tabla 4., se seleccionó una lista de 14 VOCs representativos distribuidos a lo largo del tiempo total de análisis. Estos serán utilizados para evaluar la estabilidad de muestras, las etapas de la optimización, en el estudio de repetibilidad y precisión intermedia, en el estudio de variabilidad interindividuo y en el análisis de creatinina. Esta selección se incluye en la Tabla 5.

Tabla 4. Relación de VOCs identificados en orina mediante comparación con la librería NIST

VOC	Compuesto	m/z iones de cuantificación		Concordancia, %
		1	2	
1,6	1-metoxi-2-propanol	45	47	57,80
1,8	Ácido isocianico	43	-	88,63
2,2	3-metilfurano	53	82	87,92
3,4A	2-pentanona	43	-	88,68
3,4B	2,5-dimetilfurano	95	96	93,26
4,9	Disulfuro de dimetilo	79	94	83,40
5,3	2-metilbutanoato de metilo	57	88	90,31
6,0	2-etil-5-metilfurano	95	110	90,34
6,4	2,3,5-trimetilfurano	109	110	93,38
6,7	Hexanal	44	56	92,77
8,1	3-heptanona	57	85	78,02
8,4	3-pentanona	57	86	85,46
8,6	1-(2-metil-1-ciclopenten-1-il)-etanona	109	124	83,70
9,4	Etilbenceno-d ₁₀	98	116	-
9,8	Etilbenceno	91	106	95,60
10,1	m-xileno + p-xileno	91	106	-
11,0	4-heptanona	43	71	87,90
12,8	o-xileno	91	106	95,16
13,5	2-metoxitiofeno	99	114	87,21
16,4	4-metilen-1-(1-metiletil)-biciclo[3,1,0]hex-2-eno	91	92	85,58
17,4	1-metoxi-1-metilbenceno	121	122	98,10
17,8	2-eteniltetrahidro-2,6,6-trimetil-2H-pirano	43	67	74,40
19,8	3-metil-4-metilen-biciclo[3,2,1]oct-2-eno	91	119	79,91
20,0	α-felandreno	91	93	87,69
20,5	3-metilvalerato de mirtenilo	91	119	77,69
20,7	α-terpineno	93	121	84,40
21,3	D-Limoneno	67	93	86,71
21,6	3-metil-2-oxopentanoato de metilo	41	57	82,24
21,7	Trisulfuro de dimetilo	45	126	95,83
22,1	Diacetato de fenacilideno	77	126	94,11
22,2	p-cumeno	91	119	94,21
22,4	Eucaliptol	43	81	69,91
22,8A	2,3,3,4-tetrametilpentano	43	57	88,58
22,8B	1,4-diclorobenceno-d ₄	150	152	90,84
23,3	γ-terpineno	91	93	95,45
24,3	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	55	59	90,20
24,6	(+)-4-careno	93	121	92,43
24,8	3,7-dimetil-3-octanol	69	73	91,71

Tabla 4.Cont. Relación de VOCs identificados en orina mediante comparación con la librería NIST

VOC	Compuesto	m/z iones de cuantificación		Concordancia, %
		1	2	
25,6	Linalool	71	93	93,86
25,7	o-isopropeniltolueno	117	132	96,08
26,1A	(E)-2-nonen-1-ol	41	57	89,80
26,1B	Linaloato de metilo	55	93	67,39
26,4	p-cresol	107	108	91,72
26,5	1-pentilciclohexeno	67	81	77,06
26,9A	1-(benzoiloxi)-2,5-pirrolidindiona	77	105	90,23
26,9B	3,8-dimetil-1,5-ciclooctadieno	67	82	69,11
27,1	o-tolueno de 4-cianofenilo	91	119	92,37
27,3	E,E-2,6-dimetil-1,3,5,7-octatetraeno	91	119	88,23
27,4	2-metoxifenol	109	124	91,87
27,8	(3Z, 5E)-13,5-undecatrieno	77	79	89,17
28,1	Etil-fosfonofluoridato de 3-metilciclohexilo	81	113	76,65
28,3	L-mentona	55	139	88,55
28,4A	Levomentol	81	95	95,55
28,4B	Succinato de 2-metilpent-3-ilo y but-3-en-1-ilo	85	155	69,30
28,7	2-etil-5-propilciclopentanona	84	112	59,39
29,1A	1,2,3,4-tetrahidro-1,1,6-trimetil-naftaleno	159	174	94,99
29,1B	Acetato de 4-terpinenilo	93	121	82,91
29,5	α,α -4-trimetilbencenmetanol	43	135	74,12
30,3	Ácido nonanoico	60	73	83,43
30,6	2,6,10,10-tetrametil-1-oxaspiro[4,5]dec-6-eno	96	138	91,90
31,2	1,1,5-trimetil-1,2-dihidronaftaleno	142	157	80,21
31,3	α -cedreno	67	119	78,08
32,1	2-(bromometil)-2-adamantanol	151	-	82,88
32,2	2,4-di-tert-butilfenol	191	206	91,33
32,3A	Noscapina	205	220	69,48
32,3B	Nerolidol	41	69	81,98
32,5	4-isopropil-6-metil-1-metilen-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno	142	157	89,01
33,1	N,2-dimetil-5-bencimidazolcarboxamida	159	189	53,90
33,3A	1,6-dimetil-4-(1-metiletil)-naftaleno	183	198	87,47
33,3B	2-[(2-etoxi-3,4-dimetil-2-ciclohexen-1-iliden)metil]furano	189	217	78,00

Tabla 5. Relación de VOC's representativos

VOC	Compuesto	Ión Cuantificación	
		1	2
1,6	1-metoxi-2-propanol	45	47
3,4A	2-pentanona	43	-
6,4	2,3,5-trimetilfurano	110	109
11,0	4-heptanona	43	71
13,5	2-metoxitiofeno	114	99
16,4	4-metilen-1-(1-metiletil)-biciclo[3,1,0]hex-2-eno	91	92
19,8	3-metil-4-metilen-biciclo[3,2,1]oct-2-eno	91	119
22,1	Diacetato de fenacilideno	105	77
24,8	3,7-dimetil-3-octanol	73	69
26,9A	1-(benzoiloxi)-2,5-pirrolidindiona	105	77
27,8	(3Z, 5E)-13,5-undecatrieno	79	77
29,1A	1,2,3,4-tetrahidro-1,1,6-trimetil-naftaleno	159	174
31,2	1,1,5-trimetil-1,2-dihidronaftaleno	157	142
32,5	4-isopropil-6-metil-1-metilen-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno	157	142

4.2.- Estudio de estabilidad de las muestras de orina

Dada la naturaleza de las muestras y los analitos que contienen, es importante conocer cuánto tiempo pueden pasar las muestras preparadas fuera de las condiciones de conservación.

Por convenio, las muestras biológicas se conservan refrigeradas (4-8°C) o congeladas (hasta -80°C) (Rubio et al., n.d.) (Sociedad Española de Oncología Médica, 2011). Por la disponibilidad en el laboratorio, las muestras se conservan a -20°C, y los viales preparados a 4°C. Con este estudio, se quiere responder a la pregunta de cuánto tiempo pueden permanecer los viales preparados en el frigorífico.

Las muestras para el estudio se han preparado 1 hora, 24 horas y 5 días antes del análisis, habiéndose añadido 250µl de ácido clorhídrico y 25µl de la disolución de patrón interno y conservadas a 4°C hasta el momento del análisis.

En la Figura 4. se representan las áreas medias normalizadas, con las barras de error representando los valores máximo y mínimo de las dos réplicas realizadas para cada uno de los tiempos de descongelación, para los VOCs representativos.

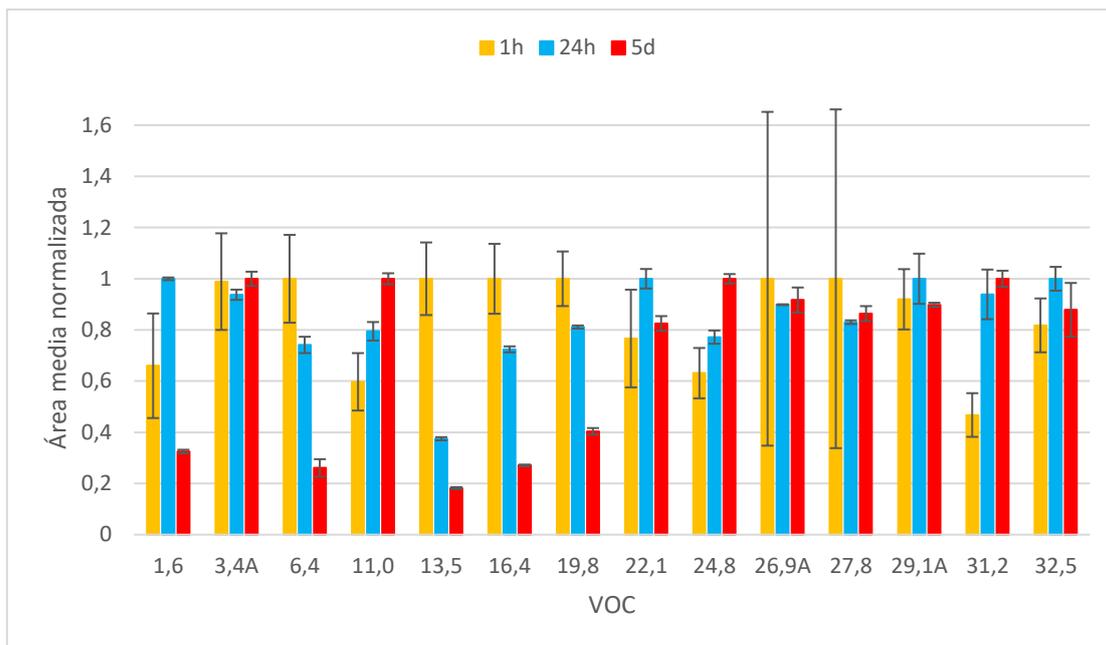


Figura 4. Influencia del tiempo de descongelación antes del análisis en la señal obtenida para los VOCs seleccionados.

A raíz de los resultados, podemos decir que la estabilidad de los compuestos representativos es diferente. Sí que se observa una tendencia de 6 VOCs en la que las áreas se mantienen estables en los mismos valores. Para otros 4 VOCs, el área disminuye según aumenta el tiempo de conservación.

Para favorecer la detección de los VOCs a los niveles presentes originalmente en la muestra, se decidió que la mejor opción era preparar las muestras justo antes del análisis, minimizando el tiempo de conservación.

4.3.- Optimización del proceso de extracción HS-SPME

La optimización del tratamiento de muestra y el método de extracción de los VOCs presentes en la orina se optimizó con el fin de encontrar las condiciones que permitan una detección del mayor número de compuestos y mejor sensibilidad. Se estudiaron las variables que afectan a la HS-SPME: tipo de fibra, volumen de orina, adición de modificadores del pH o la fuerza iónica, temperatura y tiempo de extracción. Se evaluó también la digestión con β -glucuronidasa como etapa previa a la extracción.

4.3.1.- Tipo de fibra

Debido a la gran variedad de compuestos y de sus propiedades, es de vital importancia encontrar una fibra cuyas características no solo nos permitan extraer el máximo número de VOCs candidatos a biomarcadores posible, sino también extraer la mayor cantidad posible de cada VOC.

Por ello, se realizaron pruebas con las siguientes fibras de diferente polaridad: PDMS, PDMS/DVB, PA y DVB/CAR/PDMS. Esta última fibra fue la seleccionada previamente para el mismo análisis con muestras de suero sanguíneo (Hontañón et al., 2019).

De la comparación visual de los cromatogramas se obtuvo que, de manera general, los provenientes de la fibra de DVB/CAR/PDMS eran los que más señales tenían. En la Figura 5. aparece una ampliación de la representación de un cromatograma de cada fibra. Se observa lo previamente mencionado sobre el número de señales, aunque la fibra de DVB/CAR/PDMS no sea la que obtenga mayores áreas de pico en todos los casos.

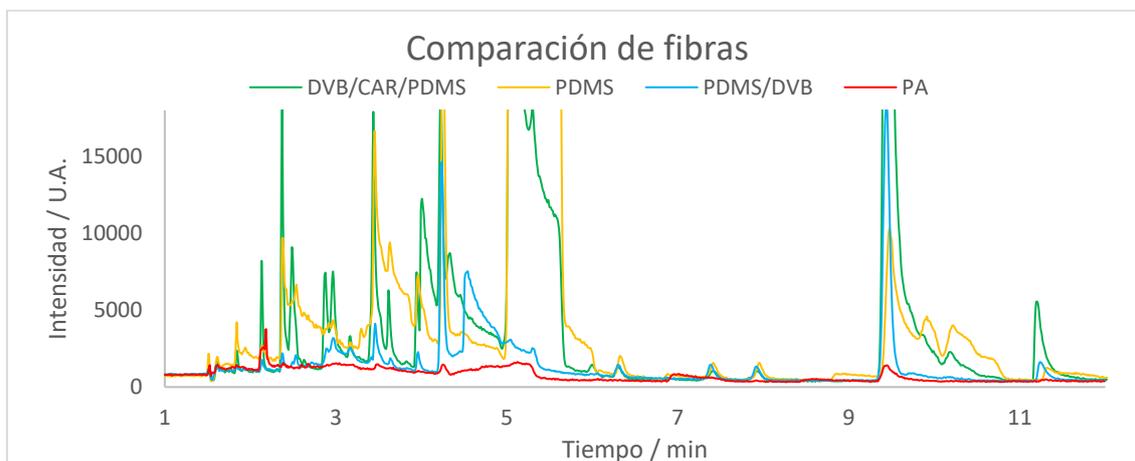


Figura 5. Fragmentos de los cromatogramas obtenidos en la HS-SPME de VOCs de orina usando diferentes fibras.

Posteriormente, se realizó una comprobación de la elección de fibra a partir de la selección de VOCs representativos. En la figura 6. aparecen los valores del área media normalizada obtenidos con cada fibra para los VOCs seleccionados; las barras de error indican los valores mínimo y máximo.

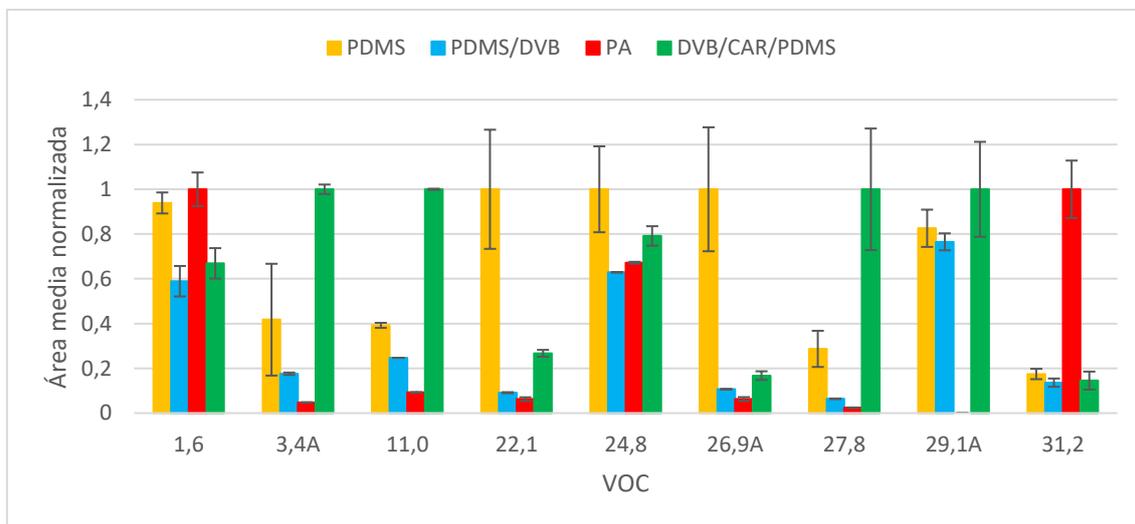


Figura 6. Influencia del tipo de fibra en la extracción de VOCs mediante HS-SPME.

Para los VOCs 6,4, 13,5, 16,4, 19,8 y 32,5 no se pudo obtener señales, así como tampoco para el pico de código 29,1A con la fibra PA. Podemos observar que, para 5 de los 11 VOCs detectados, la señal es mayor para la fibra DVB/CAR/PDMS. La siguiente fibra que mayores áreas medias da es la fibra PDMS, con 4 de 11 VOCs.

4.3.2.- Volumen de muestra

Dada la naturaleza de las muestras, es necesario realizar un estudio del volumen de muestra que se añade en el vial para el análisis. Hay dos factores críticos a tener en cuenta: la disponibilidad de muestra y la afinidad de los analitos por la fibra.

La obtención de muestras de orina es más sencilla y rápida que la obtención de muestras de suero sanguíneo. Además, la cantidad de muestra que se puede obtener es mayor, por lo que el volumen disponible para gasto en cada análisis no es tan limitado.

Sin embargo, un aumento de volumen para el análisis ha de controlarse ya que, si el volumen de la alícuota es muy grande, no se extraerán todos los analitos presentes en la muestra, ya que se satura la fibra de extracción. Esto último no es deseable, ya que puede afectar de manera desigual a los VOCs en función de la afinidad de estos por la fibra.

Se han probado 4 volúmenes de muestra distintos: 250, 500, 1000 y 2000 μ l. El primer volumen, de 250 μ l, fue el seleccionado previamente para el mismo análisis en muestras de suero sanguíneo (Hontañón et al., 2019).

Por la comparación visual de cromatogramas, se observó, en general, que el área de pico aumentaba hasta 500-1000 μ l, manteniéndose estable o bajando al aumentar el volumen. Este hecho se puede comprobar con la Figura 7., que es una ampliación de la comparación de cromatogramas. Por ello, se escogieron 500 μ l como volumen óptimo.

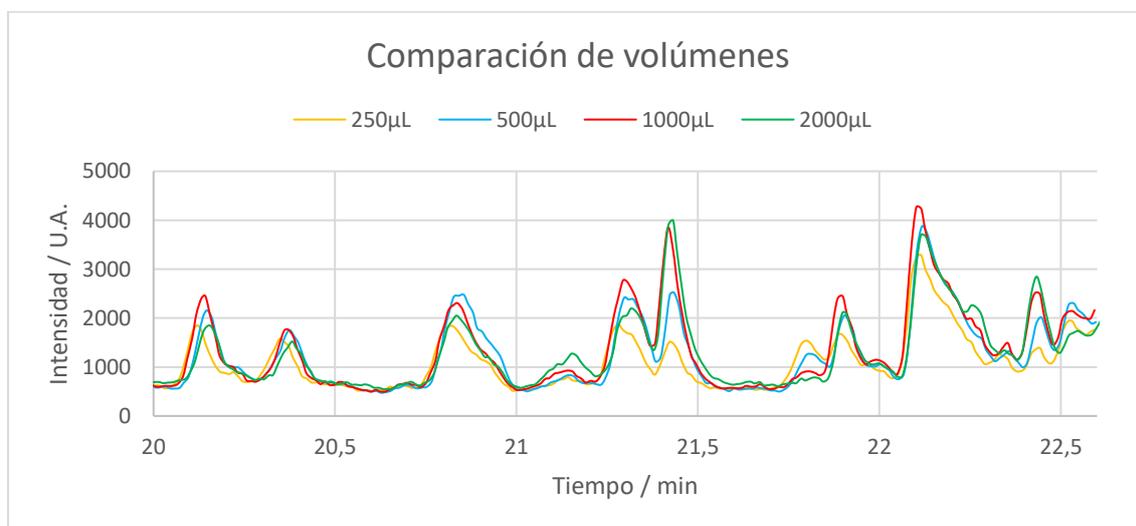


Figura 7. Fragmentos de cromatogramas obtenidos en la HS-SPME de VOCs de orina usando diferentes volúmenes de muestra.

Posteriormente, se realizó una comprobación de la elección del volumen a partir de la selección de VOCs representativos. En la Figura 8. aparecen los valores del área media normalizada para cada volumen de los picos seleccionados; las barras de error indican los valores mínimo y máximo.

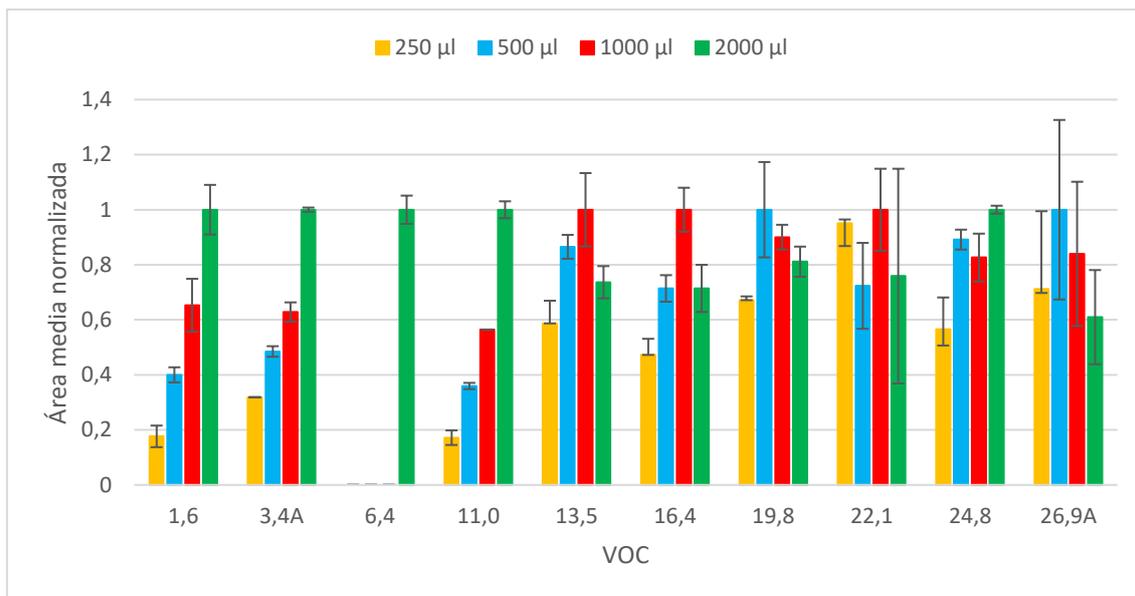


Figura 8. Influencia del volumen de muestra en la extracción de VOCs de orina mediante HS-SPME.

Para el VOC 6,4 solo se obtuvo un resultado para el volumen de 2000µl. Para el resto de VOCs, a excepción de los VOCs 1,6, 3,4A y 11,0, se observa la tendencia ya comentada, en la que el área crece hasta 500-1000µl, y después se mantiene o se reduce.

4.3.3.- Adición de ácido, base o sal

La volatilidad de los compuestos se puede modificar con la adición de ácido, base o sal, de manera que obtengamos un aumento en el número de compuestos extraíbles, así como en su cantidad. La volatilidad de compuestos ácidos se aumenta a pH ácido y la de compuestos básicos a pH básico. La adición de sal aumenta la fuerza iónica y favorece la extracción por efecto *salting out*.

Para realizar este estudio, se añadieron 250µl de las disoluciones de ácido clorhídrico 0,5M, hidróxido de sodio 0,5M y cloruro de sodio 0,5M a 500µl de orina antes de la extracción. Para considerar los efectos de dilución que pueda tener la adición de estas disoluciones, se incluyó en el estudio el análisis de muestra con el mismo volumen (250µl) de agua ultrapura.

En la Figura 9. podemos observar un fragmento de la comparación de cromatogramas de las adiciones. Se observa que la adición de ácido clorhídrico reporta mayor número de picos y áreas mayores, hecho que se repite a lo largo del cromatograma. Por ello, se determinó que la adición de ácido permitía una mejor extracción.

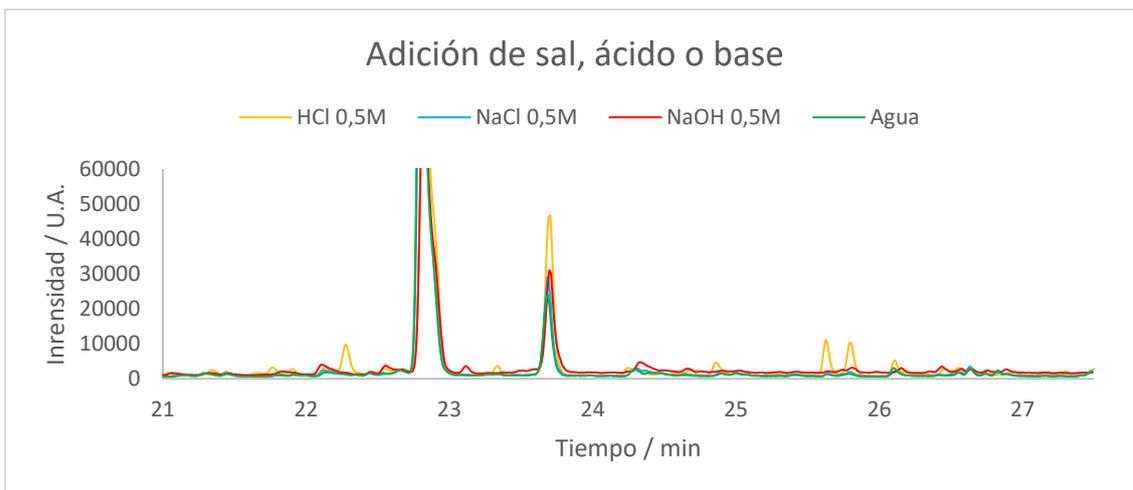


Figura 9. Fragmentos de cromatogramas obtenidos en la HS-SPME de VOCs de orina adicionando diferentes reactivos: HCl, NaCl y NaOH.

La tendencia explicada anteriormente queda patente en la Figura 10., en la que se muestran las áreas medias normalizadas, con las barras representando los valores mínimo y máximo de las dos réplicas. A parte de no obtenerse valores para los VOCs 6,4, 16,4 y 19,8 para las adiciones de base, sal y agua, se observa un claro aumento de área con la adición de ácido clorhídrico.

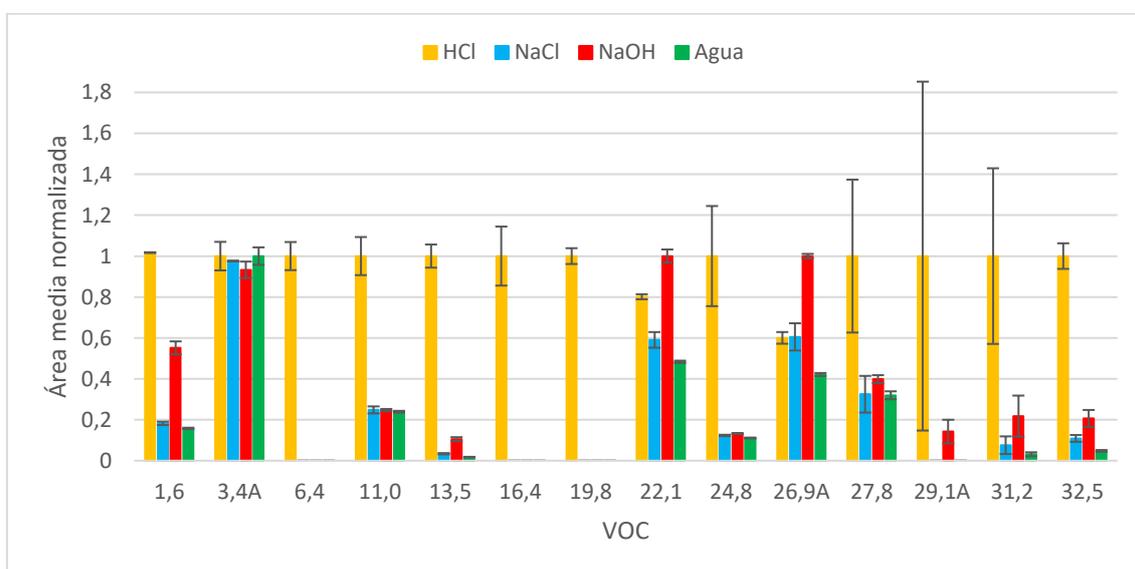


Figura 10. Influencia de la adición de HCl, NaCl y NaOH en la extracción de VOCs de orina mediante HS-SPME

A raíz de estos resultados, se decide añadir 250µl de ácido clorhídrico a todas las muestras preparadas, tanto a las que contienen orina como a los blancos de proceso.

Además, por el aumento del número de señales producido por la adición de medio ácido, se decidió repetir la identificación tentativa de compuestos que se había realizado previamente al inicio del estudio de optimización.

4.3.4.- Digestión con β -glucuronidasa

En seres humanos, el medio físico a través del cual se produce la excreción es el agua. Dada su polaridad, es necesario que los compuestos que se excretan tengan una cierta polaridad o sean hidrofílicos, de manera que puedan ser disueltos.

En el cuerpo, de manera natural, se produce una derivatización enzimática que transforma ciertos compuestos en especies químicas más polares. Este proceso se denomina glucuronidación, en el que se forman glucorónidos, solubles en agua, por acción de las glucoroniltransferasas.

En este caso, es posible que algún compuesto candidato a biomarcador haya sufrido dicha transformación, con el consecuente aumento de su hidrofilia y reducción de su volatilidad. Por ello, es interesante realizar una derivatización con β -glucuronidasa, de manera que rompamos los glucorónidos presentes en las muestras y podamos extraer los VOCs de interés.

Para encontrar las condiciones óptimas de la derivatización, se han estudiado dos parámetros distintos: el pH y el tiempo de incubación. Para el pH, los niveles estudiados fueron 4,5, 5,0 y 6,0. Para el tiempo de incubación, 2h y 1 día, ambos a 40°C.

Para realizar este estudio, se añadió 1ml de las disoluciones tampón de diferentes pH (que ya contenían la enzima) a 500 μ l de orina, de manera que el contenido final de enzima en las muestras fuera de 300 unidades. De igual manera, se prepararon blancos de proceso, con la adición del buffer. Una vez transcurrida la reacción enzimática y antes del análisis se añadieron 250 μ l de ácido clorhídrico.

En la Figura 11. se muestran las áreas medias normalizadas obtenidas con las diferentes condiciones de digestión enzimática para la selección de VOCs representativos. Las barras de error muestran el valor máximo y mínimo de las dos réplicas realizadas para cada una de las condiciones.

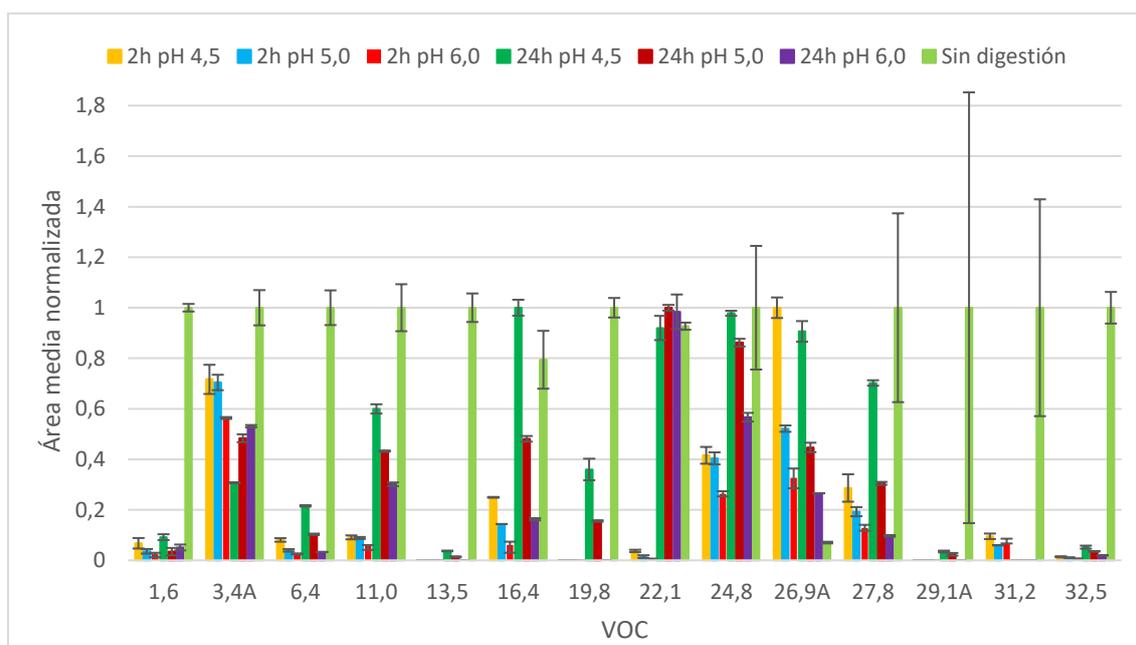


Figura 11.- Influencia de las diferentes condiciones de tiempo y pH de la reacción de digestión con β -glucuronidasa en la extracción de VOCs de orina mediante HS-SPME.

Observamos que, para la mayoría de VOCs, la condición óptima es no someter las muestras a un proceso de digestión enzimática. Si además atendemos a los cromatogramas obtenidos, se observa una característica importante: las posibles nuevas señales que aparecen en los cromatogramas de las muestras también aparecen en los cromatogramas de blancos de proceso, por lo que, lejos de conseguirse una mejora, con el proceso de digestión enzimática se introducen nuevas señales que pueden interferir en el análisis. En la Figura 12. observamos una ampliación de la comparación de los cromatogramas de blanco y muestra.

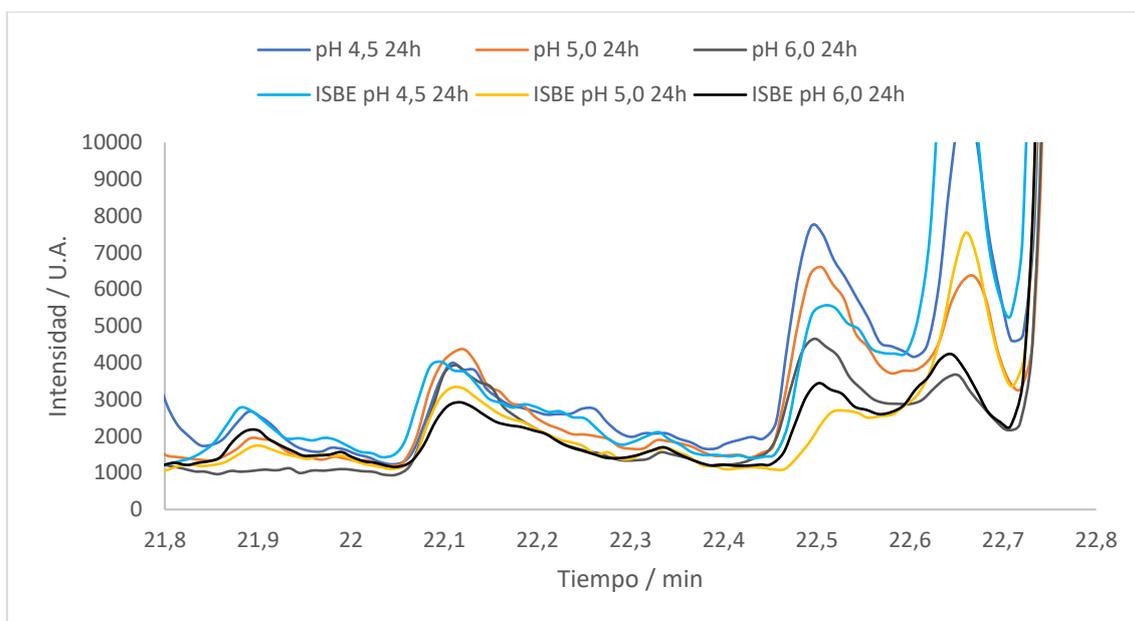


Figura 12. Fragmentos de cromatogramas obtenidos en la HS-SPME de VOCs de orina para diferentes pH de digestión durante 24 horas

4.3.5.- Temperatura de extracción

Previo al proceso de extracción, el vial que contiene la muestra es sometido a un calentamiento a una determinada temperatura, mientras es agitada. En esta etapa los VOCs pasan al espacio de cabeza, estableciéndose un equilibrio entre la muestra y el espacio de cabeza. Después, la fibra se introduce en el espacio de cabeza y se equilibra con ambas fases a esa misma temperatura pero sin agitación.

Es necesario realizar una optimización de la temperatura de extracción, ya que necesitamos que sea lo suficientemente alta para permitir una volatilización óptima de los VOCs sin incurrir en la degradación térmica de ellos.

La extracción se llevó a cabo por duplicado a dos niveles de temperatura: 50 y 70°C.

En la Figura 13. están representadas las áreas medias normalizadas para la selección de VOCs representativos (las barras de error representan los valores mínimo y máximo de las áreas normalizadas). Se observa que, para la primera mitad del análisis, es decir, para aquellos compuestos más volátiles, la extracción es mejor a 50°. Para los VOCs de la segunda mitad, que corresponden a compuestos menos volátiles, la temperatura óptima es de 70°C.

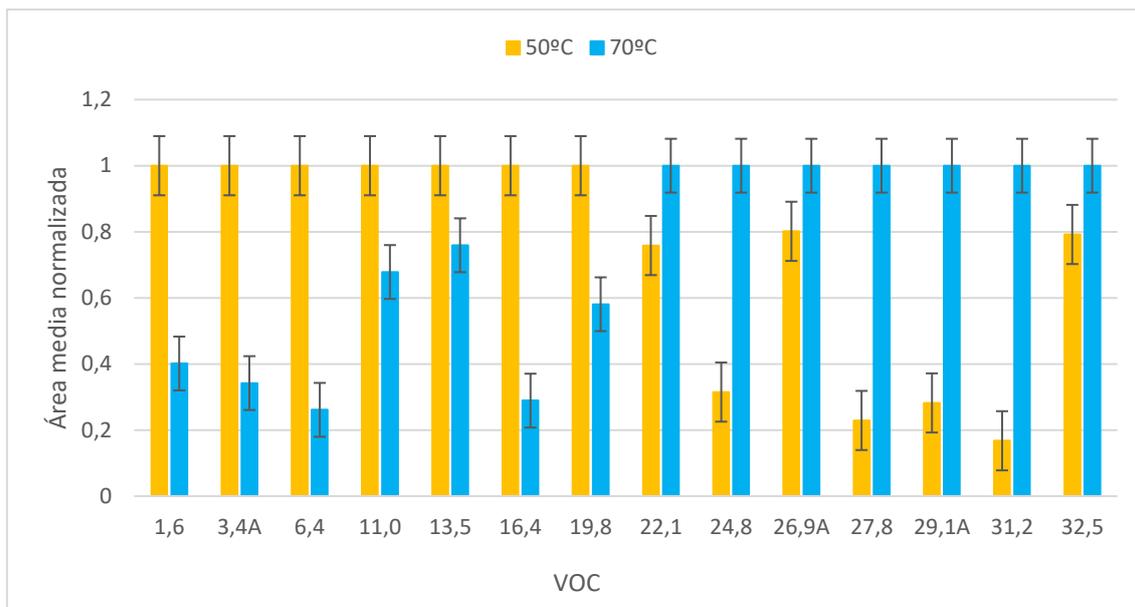


Figura 13. Influencia de la temperatura en la extracción de VOCs de orina mediante HS-SPME.

Finalmente, se decidió escoger la temperatura de 50°C, la cual aparece como la óptima para la extracción de los compuestos más volátiles, que son los que mayor interés tienen para el estudio.

4.3.6.- Tiempo de extracción

El tiempo de extracción es el tiempo que la fibra se mantiene dentro del vial una vez se ha producido el equilibrio entre la muestra y el espacio de cabeza. Es importante estudiar este parámetro, ya que debe ser suficiente tiempo para permitir que se alcance el equilibrio de distribución entre las tres fases (orina, espacio de cabeza y fibra), sin llegar a ser un tiempo excesivo que alargue sin razón el experimento.

El tiempo de extracción se estudió por duplicado a tres niveles: 10, 20 y 40 minutos.

En la Figura 14. se muestran las áreas medias relativas obtenidas de los cromatogramas para la selección de compuestos representativos. Las barras de error representan los valores máximo y mínimo obtenidos.

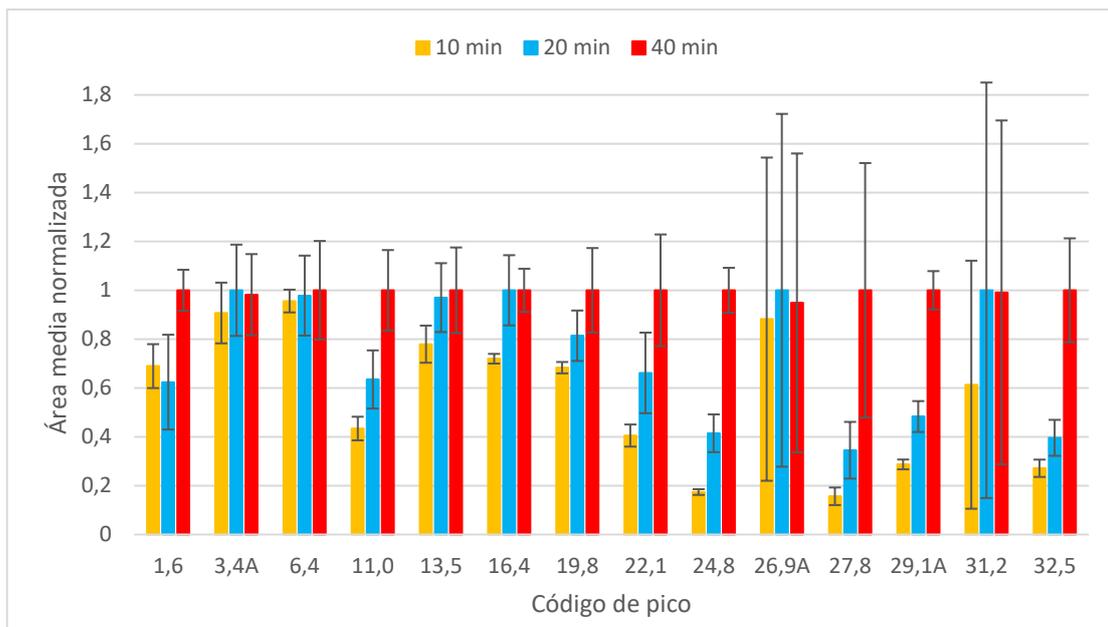


Figura 14. Influencia del tiempo en la extracción de VOCs de orina mediante HS-SPME

Se observa que el equilibrio se alcanza más rápido para los compuestos más volátiles (en 20 min) mientras que la extracción no se completa en este tiempo para los menos volátiles, que necesitan 40 min para obtener la señal máxima. Para estos últimos compuestos la reproducibilidad es menor como muestran las barras de error.

Con estos datos, se decidió fijar el tiempo de extracción de 20 minutos, que es el mismo que se ha utilizado en los experimentos anteriores.

4.4.- Repetibilidad y precisión intermedia

Para validar el método que se ha desarrollado, se ha realizado un estudio de repetibilidad y precisión intermedia con la selección de VOCs representativos. La muestra utilizada para este estudio fue el *pool* de muestras, una mezcla de alícuotas (2ml) de las 21 muestras de voluntarios recogidas.

La repetibilidad indica la variabilidad entre un grupo de muestras analizadas por el mismo analista, en el mismo equipo, en un mismo día. La precisión intermedia indica la variabilidad entre un grupo de muestras realizadas por el mismo analista, en el mismo equipo, pero a lo largo de días distintos (en nuestro caso, 4 días).

Los viales para el análisis se prepararon añadiendo 500µl de muestra de orina, 250µl de ácido clorhídrico y 25µl de disolución de estándar interno, con los blancos de proceso preparados igualmente sin la adición de muestra. Se realizaron 4 réplicas durante 4 días, y los resultados de repetibilidad y precisión intermedia fueron calculados con ANOVA.

Los resultados de este estudio aparecen en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados del estudio de repetibilidad y precisión intermedia

VOC	Repetibilidad (%)	Precisión intermedia (%)
1,6	10	23
3,4A	5	30
6,4	6	15
11,0	6	23
13,5	8	32
16,4	8	13
19,8	9	5
22,1	11	8
24,8	10	26
26,9A	12	24
27,8	17	26
29,1A	7	11
31,2	15	26
32,5	14	15

Como se observa en la Tabla 6., la repetibilidad es inferior o igual al 15% para todos los VOCs menos uno. Los valores de precisión intermedia aumentan algo más, encontrándose entre el rango de 10 y 30% todos menos dos.

4.5.- Variabilidad interindividuos

El volatoloma de cada individuo puede ser diferente por diversas razones. La dieta, la realización de deporte, el historial clínico, incluso la hora en la que se recoge la muestra son factores que pueden influir en el perfil volatolómico. Por ello, es importante conocer el grado de variabilidad que pueden tener los volatolomas de distintos individuos.

Para ello, se recogieron las áreas de las señales de los VOCs representativos para cada uno de los voluntarios que donaron sus muestras y se calculó la desviación estándar relativa de cada VOC. Los datos los podemos encontrar en la Tabla 7.

Tabla 7.- Variabilidad de los VOCs representativos

VOC	Sr (%)	VOC	Sr (%)
1,6	69	22,1	126
3,4A	89	24,8	96
6,4	290	26,9A	62
11,0	100	27,8	106
13,5	55	29,1A	123
16,4	144	31,2	174
19,8	154	32,5	61

La frecuencia de detección de los VOCs representativos fue del 100% en todos los casos. Como podemos observar, el rango de va desde un mínimo de variabilidad de 55% (VOC 13,5) hasta un máximo de variabilidad del 290% (VOC 6,4).

4.6.- Análisis de creatinina

La creatinina es un compuesto orgánico producto de la degradación de la creatina que se excreta a través de la orina. La característica de interés de la creatinina para este estudio es que se produce y excreta con una concentración más o menos constante. Si se realiza una cuantificación de la creatinina, podemos conocer el grado de dilución de la orina.

Aplicándolo a nuestro estudio, podemos comprobar si existe una correlación entre la concentración de creatinina y la concentración de VOCs, que es proporcional al área de las señales obtenidas en los cromatogramas. En caso afirmativo, sería de interés establecer un factor que corrija el efecto de la dilución.

En la Tabla 8. se muestra la concentración de creatinina de las muestras de los 21 voluntarios.

Tabla 8. Concentración de creatinina en las muestras de voluntarios

Individuo	C. Creatinina (mg/dL)	Individuo	C. Creatinina (mg/dL)
OC 1	132,5	OC 12	150,9
OC 2	111	OC 13	96,6
OC 3	87,3	OC 14	75,2
OC 4	52,4	OC 15	61,8
OC 5	197,5	OC 16	171,3
OC 6	172,4	OC 17	18,8
OC 7	158,9	OC 18	57,2
OC 8	162,7	OC 19	45,7
OC 9	230,5	OC 20	65,4
OC 10	195,6	OC 21	51,6
OC 11	98,5		

Para comprobar si existe una correlación podemos representar, para cada VOC, la concentración de creatinina y el área de señal del pico de cada voluntario, y calcular el coeficiente de Pearson y el p-valor del ajuste lineal por mínimos cuadrados. En la Tabla 9. se recogen los coeficientes de Pearson (R), que determinarán el signo de la correlación y su intensidad, y los p-valores, que indican la significación de la correlación, de los ajustes lineales para cada VOC.

Tabla 9.- Relación de coeficientes de Pearson y p-valores para los ajustes lineales

VOC	R	p-valor	VOC	R	p-valor
1,6	-0,16384	0,47791	22,1	-0,34444	0,12626
3,4A	-0,29211	0,19882	24,8	-0,24925	0,27591
6,4	-0,28787	0,20572	26,9A	-0,40485	0,06869
11,0	-0,25285	0,2688	27,8	-0,2009	0,38254
13,5	-0,1854	0,42105	29,1A	-0,52393	0,01477
16,4	0,06535	0,77839	31,2	-0,26254	0,25024
19,8	0,0541	0,81584	32,5	-0,22324	0,33069

Si bien la tendencia esperada es que el área de señal aumentara con la concentración de creatinina, los valores del coeficiente de Pearson nos indican que la correlación, aparte de no ser una correlación lineal fuerte, es negativa: el área de señal disminuye según aumenta la concentración de creatinina (excepto para los VOCs 16,4 y 19,8).

En la Figura 15. se representan los valores de concentración de creatinina, las áreas medias de señal y el ajuste lineal para el VOC 1,6. Como se ve, la dispersión de los puntos indica que no existe una correlación ni lineal, ni positiva, como cabría esperar. El resto de VOCs presentaron una tendencia similar.

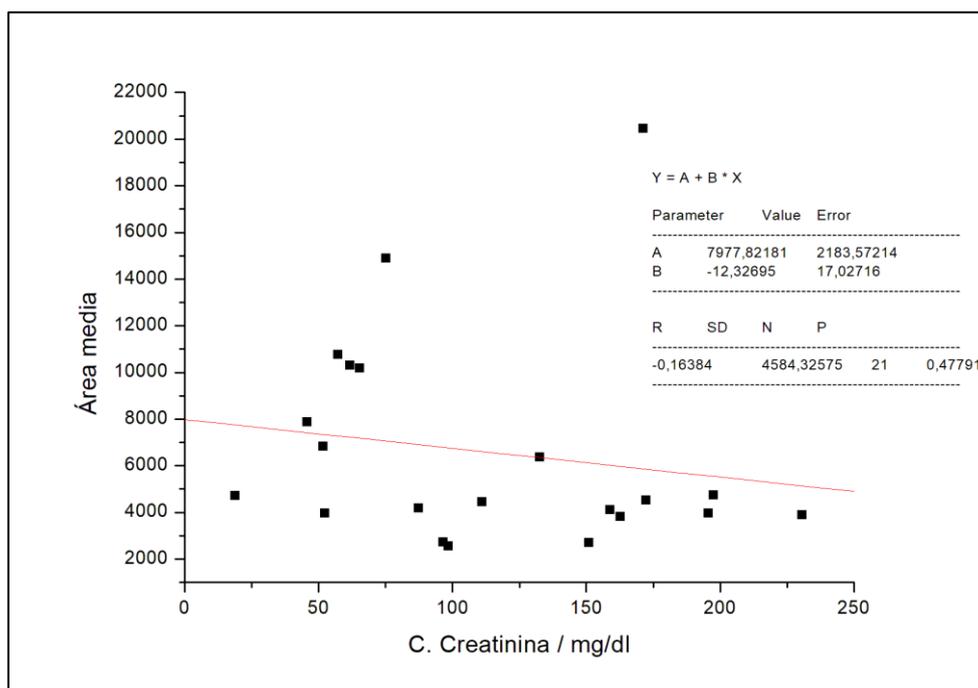


Figura 15. Área media de pico frente a concentración de creatinina para el VOC 1,6.

Además, los p-valores, todos por encima del límite de 0,05 (menos para el VOC 29,1A), dan cuenta de que esta baja correlación no es significativa. Atendiendo a los coeficientes de Pearson y a los p-valores, se puede concluir que no es necesario añadir un factor de corrección debido a la dilución a las áreas de los picos.

4.7.- Identificación de biomarcadores

La identificación de biomarcadores potenciales para cáncer de páncreas se comenzó comparando los cromatogramas obtenidos del análisis de muestras de orina de pacientes y controles. El número de muestras disponibles fue limitado (5 parejas de muestra de paciente-control), pero se siguen recogiendo muestras para ampliar el estudio. Se seleccionaron los VOCs que mostraban el mismo espectro en pacientes y controles, y que presentaban diferencias en el área de las señales obtenidas para pacientes y controles. El total de VOCs seleccionados fue de 33.

Se realizaron los siguientes tratamientos estadísticos:

- 1- Ensayo de la t de Student para comparar valores medios entre enfermos y controles sanos.
- 2- Curvas ROC.
- 3- Análisis de componentes principales (PCA).

El primer estudio estadístico consistió en comparar la media de las áreas de cada uno de los 33 VOCs obtenida para cada grupo (enfermos y controles sanos) mediante un ensayo de la t de Student. El p-valor obtenido nos sirve para comprobar si había diferencias estadísticamente significativas entre las áreas de los diferentes VOCs obtenidas para las muestras de pacientes y controles. En la Tabla 10. se muestran los 33 VOCs seleccionados y el p-valor del test de la t de Student realizado.

De los 33 VOCs seleccionados, solo tres VOCs, el α -terpineno (20,7), el γ -terpineno (23,3) y el 1,2,3,4-tetrahidro-1,1,6-trimetil-naftaleno (29,1A) muestran una diferencia significativa (p-valor inferior a 0,05) entre las áreas de pacientes y las áreas de controles. Otros dos VOCs, m-xileno + p-xileno (10,1) y el p-cumeno (22,2) muestran un p-valor inferior a 0,1, muy cercano al límite de significación de 0,05 (0,0898 y 0,0522, respectivamente).

Cabe destacar que, para estos VOCs, las áreas de las señales eran mayores en los análisis de controles que en los de pacientes, a excepción del VOC m-xileno + p-xileno. De entre estos compuestos que presentan diferencias entre los grupos, los VOCs m-xileno y p-xileno se habían propuesto previamente como candidatos a biomarcadores para el cáncer colorrectal en muestras de aliento (Altomare et al., 2012). En la Figura 16. se representan las estructuras moleculares de estos 6 VOCs.

Tabla 10. Comparación de los valores medios de los 33 VOCs en pacientes y controles sanos.

VOC	Área media Controles	IC 95% Área Media Controles	Área media Pacientes	IC 95% Área Media Pacientes	p-valor
1,6	2036	2035 - 2037	1660	530 - 2791	0,4371
1,8	4233	1097 - 7369	18571	0 - 73263	0,2755
3,4	5065	209 - 9921	5952	0 - 15739	0,7259
3,4B	4332	0 - 15061	1655	0 - 4729	0,3148
4,9	2259	0 - 4808	2418	0 - 7072	0,8968
6,4	748	16 - 1479	958	0 - 3438	0,7258
6,7	2336	0 - 5255	1292	0 - 4225	0,2917
9,9	2270	925 - 3616	2953	1101 - 4806	0,2189
10,1	9832	5296 - 14367	13511	6288 - 20733	0,0898
11,0	36821	0 - 90312	38231	0 - 121035	0,9506
12,8	4217	2475 - 5960	5361	2494 - 8229	0,1659
13,5	3013	834 - 5193	4765	0 - 10985	0,2686
17,4	829	0 - 2056	980	20546	0,6773
20,7	579	131 - 1028	174	29 - 318	0,0049
21,3	291	0 - 629	251	0 - 553	0,7044
21,7	3247	0 - 7625	2841	248 - 5433	0,7303
22,2	2274	456 - 4091	1084	0 - 2551	0,0522
23,3	762	31 - 1492	191	0 - 414	0,0103
24,3	1661	0 - 3399	1017	0 - 2104	0,4302
24,6	287	0 - 634	185	0 - 513	0,3649
24,8	3895	0 - 16645	684	0 - 1791	0,2943
25,6	2569	0 - 6059	2915	0 - 8321	0,8159
25,7	1666	450 - 2883	3373	0 - 11593	0,3851
26,5	389	0 - 909	335	0 - 946	0,7728
27,3	225	110 - 339	190	135 - 246	0,3088
27,4	252	0 - 556	314	0 - 964	0,7057
28,1	290	0 - 1018	563	0 - 2335	0,5424
28,3	181	0 - 398	252	0 - 547	0,4146
28,4B	339	0 - 1111	750	0 - 3180	0,4911
29,1A	1130	681 - 1579	593	0 - 1462	0,0395
30,6	1676	0 - 5034	1659	0 - 6514	0,9902
33,1	1311	0 - 3684	722	0 - 1473	0,3215
33,3B	1289	0 - 3679	707	78 - 1336	0,3230

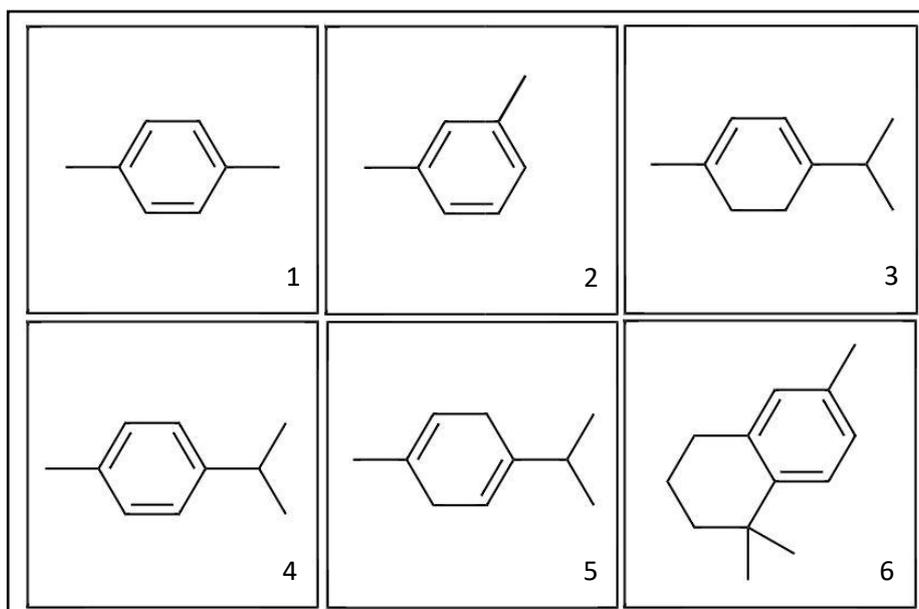


Figura 16. Estructuras moleculares de *p*-xileno [1] y *m*-xileno [2] (VOC 10,1), α -terpineno [3] (VOC 20,7), *p*-cumeno [4] (VOC 22,2), γ -terpineno [5] (VOC 22,2) y 1,2,3,4-tetrahidro-1,1,6-trimetilnaftaleno [6].

En segundo lugar, se realizaron las curvas ROC de los 33 VOCs seleccionados para realizar un cribado en el que observar qué VOCs proporcionan una mayor área bajo la curva (AUC: *area under the curve*). Cuanto más se acerque el valor de AUC a 1, mejor será el predictor del caso, y mayor sensibilidad y especificidad tendrá. Los resultados de AUC aparecen en la Tabla 11.

Tabla 11. Relación de AUC para los 33 VOCs seleccionados

VOC	AUC	VOC	AUC
1,6	0,640	23,3	1,000
1,8	0,440	24,3	0,680
3,4	0,520	24,6	0,720
3,4B	0,720	24,8	0,640
4,9	0,560	25,6	0,360
6,4	0,640	25,7	0,480
6,7	0,760	26,5	0,480
9,9	0,200	27,3	0,760
10,1	0,160	27,4	0,480
11,0	0,640	28,1	0,480
12,8	0,280	28,3	0,400
13,5	0,400	28,4B	0,480
17,4	0,400	29,1A	0,840
20,7	1,000	30,6	0,480
21,3	0,520	33,1	0,560
21,7	0,500	33,3B	0,560
22,2	0,880		

Dos VOCs, α -terpineno (20,7) y γ -terpineno (23,3), cuyos p-valores de la prueba de la t son inferiores a 0,05, obtienen un AUC de 1,000, indicando que el modelo predictivo para cada uno sería perfecto. Para p-cumeno (VOC 22,2) y 1,2,3,4-tetrahidro-1,1,6-trimetil-naftaleno (VOC 29,1A), con valores de p-valor de la prueba de la t de Student de 0,0522 y 0,0395), sus valores de AUC son también muy altos, con 0,880 y 0,840, respectivamente.

Un quinto VOC, el m-xileno + p-xileno (10,1), presenta el AUC más bajo de todos (0,160). Sin embargo, si invertimos los resultados, podemos construir un modelo predictor inverso con un AUC de 0,840 ($1 - 0,160$).

En las Figuras 17.a/b/c/d/e. observamos las curvas ROC de m-xileno + p-xileno (VOC 10,1), α -terpineno (VOC 20,7), p-cumeno (VOC 22,2), γ -terpineno (VOC 23,3) y 1,2,3,4-tetrahidro-1,1,6-trimetilnaftaleno (VOC 29,1A).

Para las curvas ROC de α -terpineno y γ -terpineno (VOCs 20,7 y 23,3) observamos que la sensibilidad y la especificidad pueden alcanzar los valores de 100%. Los puntos de corte que se utilizan como predictores para el área de los iones correspondientes para cada señal son 294,50 y 359,50, respectivamente. Por lo cual, los valores de área de señal por debajo de 294,50 (para el VOC 20,7) o 359,50 (para el VOC 23,3) indicarían que el individuo sufre cáncer de páncreas.

Para la curva ROC de m-xileno + p-xileno (VOC 10,1), se alcanza una sensibilidad del 80% con una especificidad del 80%. Para la curva ROC de p-cumeno (VOC 22,2) se alcanza una sensibilidad del 80% con una especificidad del 100%. Para la curva ROC de 1,2,3,4-tetrahidro-1,1,6-trimetilnaftaleno (VOC 29,1A) se observa que, para una sensibilidad del 100%, la especificidad alcanza valores del 60%. Los puntos de corte que se utilizan como predictores en el área de los iones correspondientes para cada señal son de 10785,00, 1207,50 y 1105,50. Por lo tanto, para cualquier área de señal superior a 10785,00 (para el VOC 10,1), o inferiores a 1207,50 y 1105,50 (para los VOCs 22,2 y 29,1A, respectivamente), el individuo sufriría cáncer de páncreas.

En la Tabla 12. se incluye un resumen de los parámetros obtenidos para los 5 VOCs mencionados.

Tabla 12. Parámetros de las curvas ROC

VOC	AUC	SD	IC al 95%	p-valor	Predictor
m-xileno + p-xileno (VOC 10,1)	0,840	0,133	0,580 – 1,000	0,076	10785,00
1-metil-4-(1metiletil)-1,3-ciclohexadieno (VOC 20,7)	1,000	0,000	1,000 – 1,000	0,009	294,50
p-cumeno (VOC 22,2)	0,880	0,122	0,640 – 1,000	0,047	1207,50
γ -terpineno (VOC 23,3)	1,000	0,000	1,000 – 1,000	0,009	359,50
1,2,3,4-tetrahidro-1,1,6-trimetil-naftaleno (VOC 29,1A)	0,840	0,133	0,580 – 1,000	0,076	1105,50

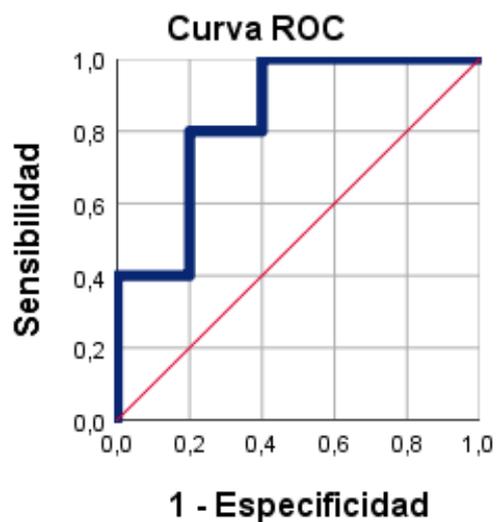


Figura 17.a. Curva ROC para el VOC 10,1

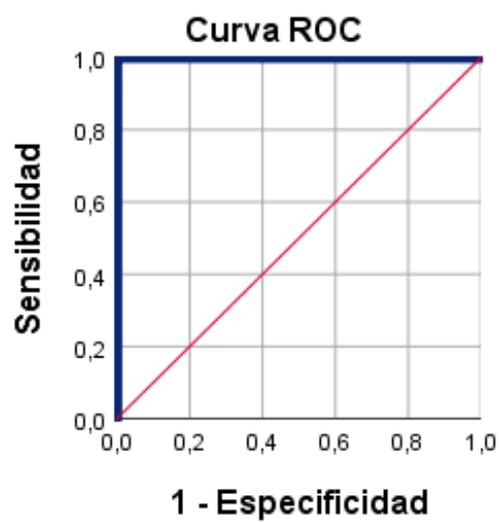


Figura 17.b. Curva ROC para el VOC 20,7

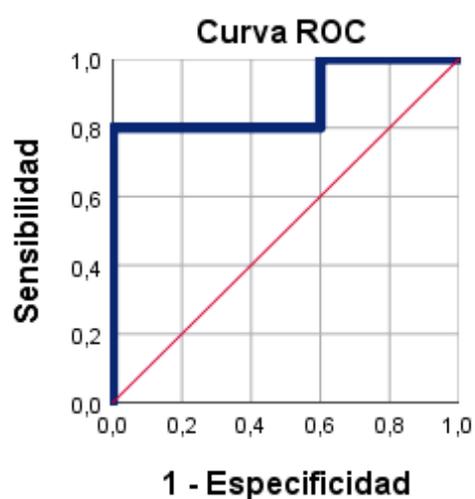


Figura 17.c. Curva ROC para el VOC 22,2

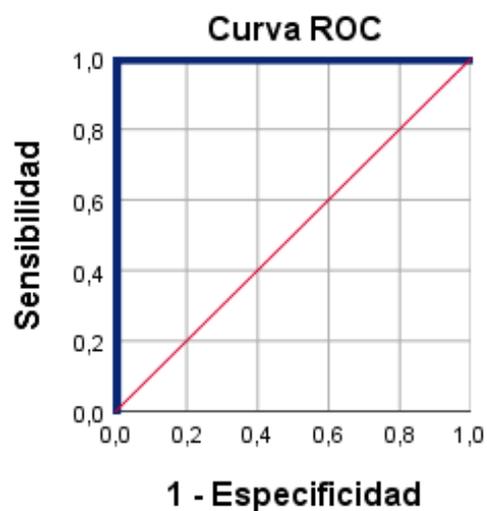


Figura 17.d. Curva ROC para el VOC 23,3

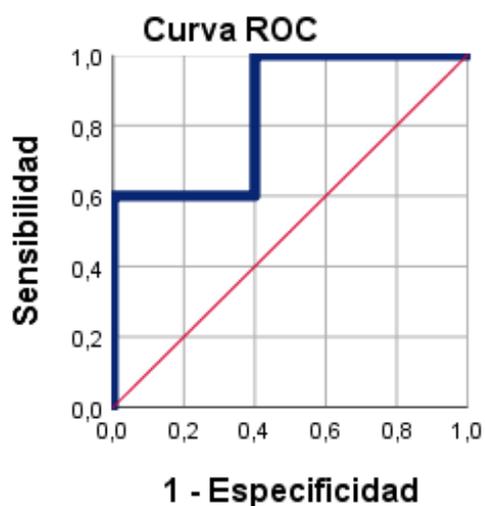


Figura 17.e. Curva ROC para el VOC 29,1A

Por último, se ha realizado un análisis de componentes principales (PCA) incluyendo los cinco VOCs ya mencionados. En la Figura 18. se observa el gráfico de varianza acumulada para las 4 componentes principales. Se obtuvo que las dos primeras componentes explicaban un 75% de la varianza.

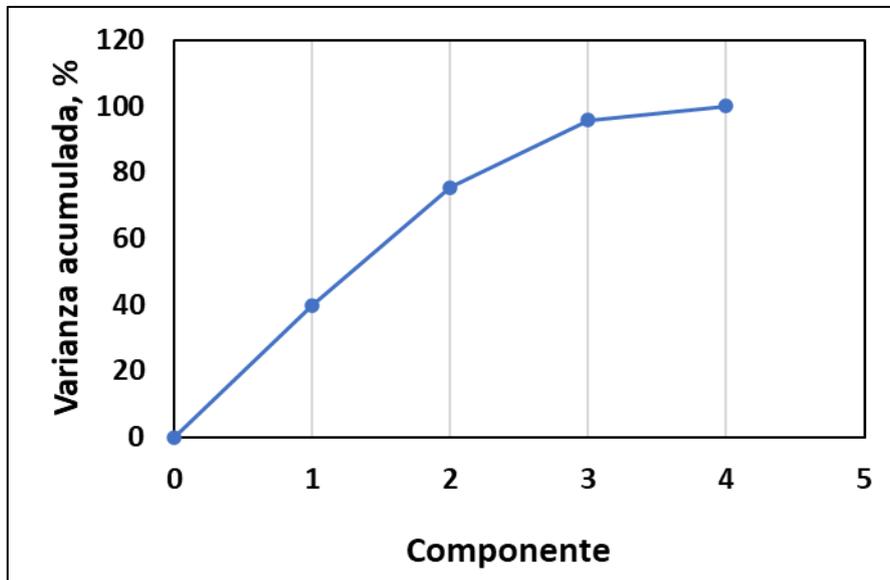


Figura 18. Gráfico de varianza acumulada para las 4 componentes principales.

En la Tabla 13. se incluyen los coeficientes para las tres primeras componentes principales de cada variable original. Y en la Figura 19. se incluye la representación de las muestras de pacientes y controles en función de las dos primeras componentes.

Tabla 13. Coeficientes para las componentes principales de cada variable original.

	Componente		
	1	2	3
VOC 10,1	-0,542	-0,244	0,804
VOC 20,7	0,872	-0,246	0,271
VOC 22,2	0,527	0,629	0,528
VOC 23,3	0,784	-0,576	-0,071
VOC 29,1A	0,208	0,629	-0,114

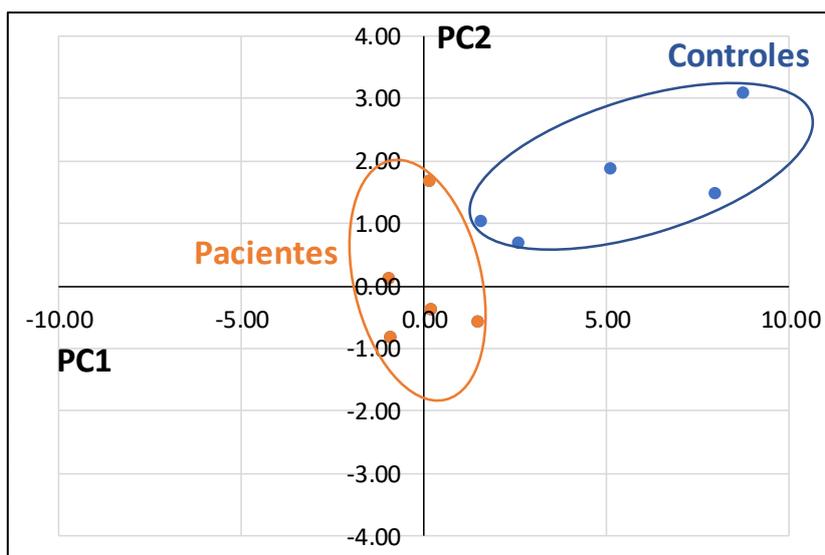


Figura 19. Representación de las dos primeras componentes principales para pacientes (N = 5) y controles (N = 5)

Observamos que estas dos componentes nos permiten discriminar entre controles (azul) y pacientes (naranja).

Con los análisis realizados en muestras de orina de pacientes de cáncer de páncreas (5 individuos) y controles (5 individuos) mediante curvas ROC y análisis de componentes principales se muestra la aplicabilidad del método desarrollado basado en la obtención del perfil volatológico de orina para encontrar candidatos a biomarcadores para el diagnóstico de cáncer de páncreas. Estos resultados son parte de un estudio preliminar, y la limitación del estudio viene dada por el número de muestras disponibles en el momento de la elaboración de este trabajo. Estos resultados deben ser confirmados mediante el análisis de orina de muestras poblacionales más numerosas, y validados por un análisis de muestras independiente.

4.8.- Comparación entre muestras de suero y orina

Como parte final al estudio realizado, se llevó a cabo una comparación entre los perfiles volatológicos obtenidos para pacientes y controles, entre muestras emparejadas de suero y orina.

Se encontró que los volatolomas de suero no solo presentaban un número mayor de señales, sino que también estas eran más intensas, lo que era de esperar ya que la orina es un filtrado de la sangre.

Además, también se encontraron 6 VOCs en común entre la orina y el suero. Son los siguientes: ácido isociánico (VOC 1,8), etilbenceno (VOC 9,8), m-xileno y p-xileno (VOC 10,1), o-xileno (VOC 12,8), trimetilbenceno (diferentes isómeros, no identificado previamente, a un tiempo de retención de 20,8 min) y o-isopropeniltolueno (VOC 25,7). Para todos (a excepción del VOC 1,8), la señal era más intensa en suero que en orina.

Se observó una tendencia similar en los VOCs candidatos a ser biomarcadores de cáncer de páncreas tanto en suero como en orina. Si bien las señales de interés no eran las mismas, la mayoría de VOCs que presentan diferencias significativas entre los grupos son regulados negativamente para los pacientes, es decir, la concentración de los VOCs es menor en pacientes que en controles.

5.- CONCLUSIONES

El cáncer de páncreas se presenta como un reto para la investigación, ya que la ausencia de síntomas en etapas tempranas, la falta de diagnósticos específicos y la poca disponibilidad y efectividad de los tratamientos hacen que sea una enfermedad cuya incidencia y mortalidad sean muy elevadas, con pronósticos de empeoramiento. Por ello, es necesario avanzar en dos direcciones a la vez: investigar en nuevos y más efectivos tratamientos, y mejorar las herramientas de diagnóstico.

Este trabajo de fin de grado se propuso como un estudio preliminar acerca de la presencia de VOCs en orina que pudieran ser candidatos a biomarcadores para la detección de cáncer de páncreas.

Para ello, se comenzó con una identificación de VOCs en orina, mediante la comparación de los espectros de masas de las señales de los cromatogramas con librerías espectrales. Se logró identificar 70 VOCs, de los cuales se tomó una selección de 14 VOCs representativos distribuidos en el tiempo de análisis.

En segundo lugar, se realizó un estudio de estabilidad de muestras, del que se concluyó que era mejor preparar las muestras justo antes del análisis, con un tiempo de conservación en frigorífico mínimo.

A continuación, se optimizó el método de extracción para la técnica HS-SPME-GC/MS, de manera que se obtuvieran perfiles volatolómicos con el mayor número de señales, con la mayor calidad e intensidad posible. Así, se obtuvo que las mejores condiciones eran utilizar una fibra de DVB/CAR/PDMS para la extracción, con un volumen de muestra de 500µl de orina, previa adición de 250µl de ácido clorhídrico 0,5M, y con temperatura y tiempos de extracción de 50°C y 20 minutos, respectivamente.

Seguidamente, se estudió la repetibilidad y precisión intermedia de la selección de VOCs representativos, obteniéndose valores inferiores al 15% (menos para un VOC) para la repetibilidad, y valores entre 5 y 30% para la precisión intermedia. También se calculó la variabilidad interindividuos de estos VOCs, con un rango del 54 al 290% de variabilidad entre los voluntarios.

Además, se realizó una cuantificación de creatinina para comprobar si existía una correlación entre su concentración y el área de señal de los VOCs representativos, y así demostrar si era necesario o no incluir un factor de corrección debido a la dilución de la orina. Los ajustes lineales y sus parámetros estadísticos mostraron que esta correlación era no significativa y negativa, por lo que se decidió no incluir dicho factor de corrección.

Del estudio de 33 VOCs con diferencias visuales entre las señales de controles y pacientes, se obtuvo que cinco de ellos, m-xileno y p-xileno (VOC 10,1), α -terpineno (VOC 20,7), p-cumeno (VOC 22,2), γ -terpineno (VOC 23,3) y 1,2,3,4-tetrahidro-1,1,6-trimetilnaftaleno (VOC 29,1A), presentaron diferencias significativas entre pacientes de cáncer de páncreas y voluntarios. El análisis de componentes principales dio muestra de que estos cinco VOCs eran capaces de discriminar entre pacientes y controles.

Finalmente, se compararon los perfiles volatolómicos de pacientes y controles para orina y suero, obteniéndose que el suero mostraba mayor número de señales y mayor intensidad de estas.

Los resultados de la comparación de pacientes y controles sanos son prometedores, pero están condicionados por el bajo número de muestras. La viabilidad de los biomarcadores propuestos debe ser confirmada en futuros estudios mediante el análisis de un número mayor de muestras y validada con un conjunto de muestras independientes. Una vez que se confirmen ciertos VOCs como biomarcadores de cáncer de páncreas, se adquirirían los estándares correspondientes para confirmar su identificación. También será necesario reevaluar las condiciones de extracción y detección seleccionadas y optimizarlas para el análisis cuantitativo de estos VOCs en orina que serviría como método para el diagnóstico de cáncer de páncreas.

6.- BIBLIOGRAFÍA

- Altomare, D.F., Di Lena, M., Porcelli, F., Trizio, L., Travaglio, E., Tutino, M., Dragonieri, S., Memeo, V. and de Gennaro, G. (2012). Exhaled volatile organic compounds identify patients with colorectal cancer. *British Journal of Surgery*, 100(1), pp.144–150.
- Bajtarevic, A., Ager, C., Pienz, M., Klieber, M., Schwarz, K., Ligor, M., Ligor, T., Filipiak, W., Denz, H., Fiegl, M., Hilbe, W., Weiss, W., Lukas, P., Jamnig, H., Hackl, M., Haidenberger, A., Buszewski, B., Miekisch, W., Schubert, J. and Amann, A. (2009). Noninvasive detection of lung cancer by analysis of exhaled breath. *BMC Cancer*, 9(1).
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A. and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA CANCER J CLIN*, 68(6), pp.394–424.
- Bray, F., Jemal, A., Grey, N., Ferlay, J. and Forman, D. (2012). Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. *The Lancet Oncology*, 13(8), pp.790–801.
- Bray, F., Laversanne, M., Weiderpass, E. and Soerjomataram, I. (2021). The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer*. [online] Available at:
<https://acsjournals-onlinelibrary-wiley-com.umbral.unirioja.es/doi/epdf/10.1002/cncr.33587>
[Accessed 5 Jul. 2021].
- Buszewski, B., Ulanowska, A., Ligor, T., Jackowski, M., Kłodzińska, E. and Szeliga, J. (2008). Identification of volatile organic compounds secreted from cancer tissues and bacterial cultures. *Journal of Chromatography B*, 868(1-2), pp.88–94.
- Cheng, Y., Xie, G., Chen, T., Qiu, Y., Zou, X., Zheng, M., Tan, B., Feng, B., Dong, T., He, P., Zhao, L., Zhao, A., Xu, L.X., Zhang, Y. and Jia, W. (2011). Distinct Urinary Metabolic Profile of Human Colorectal Cancer. *Journal of Proteome Research*, 11(2), pp.1354–1363.
- Daulton, E., Wicaksono, A.N., Tiele, A., Kocher, H.M., Debernardi, S., Crnogorac-Jurcevic, T. and Covington, J.A. (2021). Volatile organic compounds (VOCs) for the non-invasive detection of pancreatic cancer from urine. *Talanta*, 221, p.121604.
- De Jesús, V.R., Bhandari, D., Zhang, L., Reese, C., Capella, K., Tevis, D., Zhu, W., Del Valle-Pinero, A.Y., Lagaud, G., Chang, J.T., van Bommel, D., Kimmel, H.L., Sharma, E., Goniewicz, M.L., Hyland, A. and Blount, B.C. (2020). Urinary Biomarkers of Exposure to Volatile Organic Compounds from the Population Assessment of Tobacco and Health Study Wave 1 (2013–2014). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(15), p.5408.
- de Lacy Costello, B., Amann, A., Al-Kateb, H., Flynn, C., Filipiak, W., Khalid, T., Osborne, D. and Ratcliffe, N.M. (2014). A review of the volatiles from the healthy human body. *Journal of Breath Research*, 8(1), p.014001.

- Ezquerro, Ó., Ortiz, G., Pons, B. and Tena, M.T. (2004). Determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in soils by multiple headspace solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1035, pp.17–22.
- Fawcett, T. (2006). An introduction to ROC analysis. *Pattern Recognition Letters*, 27(8), pp.861–874.
- Filipiak, W., Sponring, A., Mikoviny, T., Ager, C., Schubert, J., Miekisch, W., Amann, A. and Troppmair, J. (2008). Release of volatile organic compounds (VOCs) from the lung cancer cell line CALU-1 in vitro. *Cancer Cell International*, 8(1), p.17.
- Gervais, J., Luukinen, B., Buhl, K. and Stone, D. (2010). Paradichlorobenzene General Fact Sheet. [online] npic.orst.edu. Available at:
<http://npic.orst.edu/factsheets/PDBgen.html>
[Accessed 6 Jul. 2021].
- Grané, A. (n.d.). Tema 4 Análisis de Componentes Principales. [online] . Available at:
http://halweb.uc3m.es/esp/Personal/personas/agrane/esp/cooperacion/proyecto_mozambique_archivos/alumnos/Tema4_ComponentesPrincipales_reducido.pdf
[Accessed 6 Jul. 2021].
- Gruber, M., Tisch, U., Jeries, R., Amal, H., Hakim, M., Ronen, O., Marshak, T., Zimmerman, D., Israel, O., Amiga, E., Doweck, I. and Haick, H. (2014). Analysis of exhaled breath for diagnosing head and neck squamous cell carcinoma: a feasibility study. *British Journal of Cancer*, 111(4), pp.790–798.
- Hontañón, A., Tena, M.T., Martín Carnicero, A., Larráyo, I.M., Samaniego, L., Martínez Moral, M.P., Zafra, R. and Martínez, A. (2019). SEARCHING FOR PREDICTIVE BIOMARKERS OF PANCREATIC CANCER IN SERUM VOLATOLOME. A PRELIMINARY STUDY. *Actualidad Analítica*.
- Jalal, A.H., Alam, F., Roychoudhury, S., Umasankar, Y., Pala, N. and Bhansali, S. (2018). Prospects and Challenges of Volatile Organic Compound Sensors in Human Healthcare. *ACS Sensors*, 3(7), pp.1246–1263.
- Khalid, T., Aggio, R., White, P., De Lacy Costello, B., Persad, R., Al-Kateb, H., Jones, P., Probert, C.S. and Ratcliffe, N. (2015). Urinary Volatile Organic Compounds for the Detection of Prostate Cancer. *PLoS ONE*, 10(11), pp.1–15.
- Liu, H., Wang, H., Li, C., Wang, L., Pan, Z. and Wang, L. (2014). Investigation of volatile organic metabolites in lung cancer pleural effusions by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 945-946(2014), pp.53–59.
- Ma, Y., Liu, W., Peng, J., Huang, L., Zhang, P., Zhao, X., Cheng, Y. and Qin, H. (2009). A pilot study of gas chromatograph/mass spectrometry-based serum metabolic profiling of colorectal cancer after operation. *Molecular Biology Reports*, 37(3), pp.1403–1411.

- Navaneethan, U., Parsi, M.A., Gutierrez, N.G., Bhatt, A., Venkatesh, P.G.K., Lourdasamy, D., Grove, D., Hammel, J.P., Jang, S., Sanaka, M.R., Stevens, T., Vargo, J.J. and Dweik, R.A. (2014). Volatile organic compounds in bile can diagnose malignant biliary strictures in the setting of pancreatic cancer: a preliminary observation. *Gastrointestinal Endoscopy*, 80(6), pp.1038–1045.
- Navaneethan, U., Parsi, M.A., Lourdasamy, V., Bhatt, A., Gutierrez, N.G., Grove, D., Sanaka, M.R., Hammel, J.P., Stevens, T., Vargo, J.J. and Dweik, R.A. (2015). Volatile organic compounds in bile for early diagnosis of cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis: a pilot study. *Gastrointestinal Endoscopy*, 81(4), pp.943-949.e1.
- Nezami Ranjbar, M.R., Luo, Y., Di Poto, C., Varghese, R.S., Ferrarini, A., Zhang, C., Sarhan, N.I., Soliman, H., Tadesse, M.G., Ziada, D.H., Roy, R. and Resson, H.W. (2015). GC-MS Based Plasma Metabolomics for Identification of Candidate Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma in Egyptian Cohort. *PLoS ONE*, 10(6), p.e0127299.
- Nissinen, S.I., Roine, A., Hokkinen, L., Karjalainen, M., Venäläinen, M., Helminen, H., Niemi, R., Lehtimäki, T., Rantanen, T. and Oksala, N. (2018). Detection of Pancreatic Cancer by Urine Volatile Organic Compound Analysis. *Anticancer Research*, 39(1), pp.73–79.
- Rawla, P., Sunkara, T. and Gaduputi, V. (2019). Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World Journal of Oncology*, 10(1), pp.10–27.
- Rubio, M., Estrada, O., Víctor, C. and González, J. (n.d.). Sociedad Española de Medicina Interna PROTOCOLOS TRATAMIENTO ANTIMICROBIANO DOMICILIARIO ENDOVENOSO (TADE) *Coordinadores*. [online] , pp.135–137. Available at:
<https://www.fesemi.org/sites/default/files/documentos/publicaciones/capitulo-10.pdf>
[Accessed 18 Jun. 2021].
- Rudnicka, J., Kowalkowski, T., Ligor, T. and Buszewski, B. (2011). Determination of volatile organic compounds as biomarkers of lung cancer by SPME–GC–TOF/MS and chemometrics. *Journal of Chromatography B*, 879(30), pp.3360–3366.
- Rudnicka, J., Walczak, M., Kowalkowski, T., Jezierski, T. and Buszewski, B. (2014). Determination of volatile organic compounds as potential markers of lung cancer by gas chromatography–mass spectrometry versus trained dogs. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 202, pp.615–621.
- Sigma Aldrich (n.d.). *Resolves Difficult Sample Matrix Problems*. [online] www.sigmaaldrich.com. Available at:
<https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/solid-phase-microextraction/spme-resolves>
[Accessed 6 Jul. 2021].
- Sociedad Española de Oncología Médica (2011). PROTOCOLOS DE OBTENCIÓN, CONSERVACIÓN Y ENVÍO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS. ESTUDIO TRASLACIONAL PROSPECTIVO DE

DETERMINACIÓN DE FACTORES PREDICTIVOS DE EFICACIA Y TOXICIDAD EN PACIENTES CON CÁNCER. [online], p.8. Available at:

https://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/GIT/Protocolos_obtencion_manipulacion_muestras.pdf

[Accessed 18 Jun. 2021].

- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. and Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA CANCER J CLIN*, 71(3).

- Supelco (n.d.). *SPME for GC Analysis*. [online] Sigma Aldrich. Available at:

<http://www.supelco.com.tw/C-01-SPME-Fiber.pdf>

[Accessed 6 Jul. 2021].

- The Global Cancer Observatory (2020). *Pancreas. GLOBOCAN 2020*. [online] <https://gco.iarc.fr>. Available at:

<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/13-Pancreas-fact-sheet.pdf>

[Accessed 5 Jul. 2021].

- Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J. and Jemal, A. (2015). GLOBAL CANCER STATISTICS, 2012. *CA CANCER J CLIN*, 65(2), pp.87–108.

- Wagenstaller, M. and Buettner, A. (2013). Quantitative Determination of Common Urinary Odorants and Their Glucuronide Conjugates in Human Urine. *Metabolites*, 3(3), pp.637–657.

- Wang, C., Li, P., Lian, A., Sun, B., Wang, X., Guo, L., Chi, C., Liu, S., Zhao, W., Luo, S., Guo, Z., Zhang, Y., Ke, C., Ye, G., Xu, G., Zhang, F. and Li, E. (2013). Blood volatile compounds as biomarkers for colorectal cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 15(2), pp.200–206.

- Wang, C., Sun, B., Guo, L., Wang, X., Ke, C., Liu, S., Zhao, W., Luo, S., Guo, Z., Zhang, Y., Xu, G. and Li, E. (2014). Volatile Organic Metabolites Identify Patients with Breast Cancer, Cyclomastopathy and Mammary Gland Fibroma. *Scientific Reports*, 4(1).

- World Health Organization (n.d.). *Global Cancer Observatory*. [online] [iarc.fr](https://gco.iarc.fr). Available at:

<https://gco.iarc.fr/today/home>

[Accessed 27 Jun. 2021].

- Wyant, T., Alteri, R., Kalidas, M., Ogoro, C., Lubejko, B., Eidsmoe, K., McDowell, S., Greene, B. and Delfin-Davis, R. (n.d.). *Pancreatic Cancer Early Detection, Diagnosis, and Staging*. [online] . Available at:

<https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8780.00.pdf>

[Accessed 4 Jul. 2021].