



Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Universitat de València

Programa de doctorado:
Biotecnología

**IDENTIFICACIÓN NO INVASIVA
DE BIOMARCADORES DE ENDOMETRIOSIS
MEDIANTE METABOLÓMICA POR RMN**

TESIS DOCTORAL presentada por:
Sara Vicente Muñoz

Dirigida por:
Antonio Pineda Lucena
Antonio Pellicer Martínez

Valencia, 2015



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

Antonio Pineda Lucena, Doctor en Ciencias Químicas, Investigador Jefe del Laboratorio de Bioquímica Estructural en el Centro de Investigación Príncipe Felipe.

INFORMA:

Que Sara Vicente Muñoz, Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación titulado **“IDENTIFICACIÓN NO INVASIVA DE BIOMARCADORES DE ENDOMETRIOSIS MEDIANTE METABOLÓMICA POR RMN”**. Revisado el presente trabajo, expresa su conformidad para su defensa ante el Tribunal designado para optar al grado de Doctor.

Valencia, 7 de Septiembre de 2015

Dr. Antonio Pineda Lucena
DNI: 30517484A



Antonio Pellicer Martínez, Catedrático del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

INFORMA:

Que Sara Vicente Muñoz, Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación titulado **"IDENTIFICACIÓN NO INVASIVA DE BIOMARCADORES DE ENDOMETRIOSIS MEDIANTE METABOLÓMICA POR RMN"**. Revisado el presente trabajo, expresa su conformidad para su defensa ante el Tribunal designado para optar al grado de Doctor.

Valencia, 7 de Septiembre de 2015

Prof. Antonio Pellicer Martínez
DNI: 19979620A

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis es el resultado de la colaboración y el esfuerzo de muchas personas. Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas que de alguna manera han contribuido a la elaboración de este trabajo.

En primer lugar, quería dar las gracias a mis directores de Tesis, el Dr. Antonio Pineda y el Prof. Antonio Pellicer, por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis, por su implicación y por las oportunidades que me han brindado durante este tiempo.

De forma muy especial quería dar las gracias al laboratorio de Bioquímica Estructural del CIPF por acogerme desde el primer día e integrarme como una más de su grupo. Antonio, gracias por tu confianza, por tu interés continuo en nuestra formación, por transmitirme tu capacidad de trabajo y entusiasmo y por enseñarme a trabajar con rigor y capacidad crítica. Gracias a mis compañeros de laboratorio por vuestra ayuda, por compartir conmigo vuestra experiencia y haberme aportado la mayor parte de los conocimientos adquiridos durante este tiempo. Leo, gracias por tu implicación y por estar ahí todos estos años. Sabes que una parte de esta tesis también es tuya.

Al Servicio de Ginecología y Reproducción del Hospital Universitario La Fe, especialmente al grupo de Endometriosis. Al Prof. Antonio Pellicer, al Dr. Vicente Payá y a todos los residentes que durante estos años han llevado a cabo la selección de los pacientes y la recogida de las muestras. Gracias por darme vuestra perspectiva clínica y opinión crítica en las reuniones de endometriosis.

Al Dr. Juan Gilabert, quien estuvo involucrado en el diseño del estudio, selección de las pacientes y optimización de la recogida de muestras para que este proyecto se pudiese llevar a cabo. A la Dra. Edurne Novella, quien también participó en el diseño y puesta a punto de este proyecto.

A la Dra. Ana Moreno del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital de Manises, por su colaboración e implicación en la recogida de muestras.

A la Dra. Silvia Mari por prestarme su ayuda con los análisis de GSD y por su disponibilidad para resolver cualquier duda que nos surgía. Por su tiempo y sus explicaciones.

A Paco García del laboratorio de Biología de Sistemas del CIPF, por su apoyo con la estadística y por estar dispuesto a ayudarnos con cualquier duda.

Al Dr. Eduard Gratacós y a su grupo de investigación en el departamento de Medicina Materno-Fetal BCNatal (Hospital Clínic-Hospital Sant Joan de Déu). La

colaboración con vuestro grupo y el trabajo llevado a cabo en vuestros proyectos ha enriquecido de forma muy significativa este estudio.

Al departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la UV. Especialmente a la Dra. Mercè Pamblanco. Merxe, gracias por tu apoyo incondicional, por tus consejos y por enseñarme que con trabajo todo se consigue. Ernest, compartí contigo y con Merxe mis primeros años en un laboratorio y la experiencia no pudo ser mejor. Gracias a los dos por seguir tan de cerca la evolución de esta tesis. Gracias también al Dr. Ismael Mingarro por aconsejarme que esta tesis era una buena elección y valía la pena apostar por ella.

A mis amigos. Raquel, Marta y Pedro, gracias por vuestro apoyo y por vuestra ayuda, incluso desde la distancia. Durante este tiempo hemos pasado por las mismas etapas y compartido las mismas dudas y eso ha hecho que todo se relativizara. Y por supuesto, gracias a vosotras chicas (María, Raquel, María P, María M), que aun no estando vinculadas directamente a este mundo os habéis interesado siempre por esta tesis. Gracias por los ánimos y por ayudarme a poner un poco de distancia organizando esas escapadas imprescindibles de desconexión.

Finalmente, quiero dar las gracias a mi familia. Mamá, tía gracias por vuestro apoyo, por vuestra comprensión y entrega incondicional. Gracias por interesaros cada día por mi trabajo y por vuestra preocupación para que todo saliera bien. Especialmente, gracias a mi tío por todo lo que me enseñó, por su generosidad y dedicación.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
I. INTRODUCCIÓN.....	7
1. ENDOMETRIOSIS	9
1.1 Definición	9
1.2 Epidemiología.....	10
1.3 Clasificación y estadiaje de la enfermedad	10
1.3.1 Localizaciones anatómicas	10
1.3.2 Formas clínicas de la endometriosis	11
1.3.3 Sistema de clasificación.....	11
1.4 Etiopatogenia	13
1.4.1 Teoría de la implantación	13
1.4.2 Metaplasia celómica	14
1.4.3 Teoría de la inducción	14
1.5 Factores de riesgo	17
1.5.1 Factores genéticos	17
1.5.2 Factores ambientales	18
1.5.3 Factores anatómicos y menstruales.....	18
1.6 Sintomatología	18
1.6.1 Dolor.....	18
1.6.2 Infertilidad	19
1.7 Diagnóstico.....	19
1.7.1 Examen físico.....	19
1.7.2 Técnicas de imagen	19
1.7.3 Pruebas bioquímicas	20
1.7.4 Laparoscopia	21
1.8 Tratamiento	21
2. APLICACIÓN DE LAS "ÓMICAS" EN ENDOMETRIOSIS.....	22
2.1 Introducción a las tecnologías "ómicas"	22
2.2 Tipos y aplicaciones de las tecnologías "ómicas"	22
2.2.1 Genómica.....	24
2.2.2 Transcriptómica.....	24
2.2.3 Proteómica	25
2.2.4 Metabolómica.....	26
2.3 Identificación de biomarcadores de endometriosis	28
2.3.1 Concepto de biomarcador	28
2.3.2 Tipos de biomarcadores.....	28
2.3.3 Características de los marcadores de endometriosis.....	29
3. METABOLÓMICA	30
3.1 El metaboloma.....	30
3.2 Aplicaciones de la metabolómica.....	31
3.3 Tipos de estudios metabolómicos	31
3.4 Plataformas analíticas	32

3.4.1	Espectrometría de Masas (EM)	32
3.4.2	Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	33
4.	RMN	34
4.1	Propiedades magnéticas de los núcleos	35
4.2	Características de un espectro de RMN.....	37
4.3	Adquisición de los espectros	39
4.4	Asignación de las señales del espectro.....	40
5.	ETAPAS DE UN ESTUDIO METABOLÓMICO POR RMN.....	40
5.1	Diseño experimental.....	41
5.2	Recogida y procesado de las muestras.....	42
5.2.1	Orina.....	42
5.2.2	Plasma.....	43
5.2.3	Tejido.....	43
5.3	Preparación de las muestras para RMN	44
5.4	Adquisición de los espectros de RMN	44
5.4.1	Experimentos 1D.....	44
5.4.2	Experimentos 2D.....	46
5.5	Pre-procesado de los espectros.....	46
5.6	Procesado de los datos.....	46
5.7	Asignación de los espectros	50
5.8	Análisis estadístico de los datos	50
5.8.1	Análisis estadístico multivariante	52
5.8.2	Análisis estadístico univariante	56
5.9	Interpretación biológica	56
II.	OBJETIVOS.....	59
III.	METODOLOGÍA	63
1.	DISEÑO EXPERIMENTAL	65
2.	RECOGIDA Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS	66
2.1	Orina.....	66
2.2	Plasma	66
2.3	Tejido.....	66
3.	PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA RMN	67
3.1	Orina.....	67
3.2	Plasma	67
3.3	Tejido.....	68
4.	ADQUISICIÓN DE LOS ESPECTROS DE RMN.....	68
4.1	Calibración y optimización del instrumento.....	68
4.2	Adquisición de los experimentos.....	69
4.2.1	Experimentos 1D.....	69
4.2.2	Experimentos 2D.....	70
5.	PRE-PROCESADO DE LOS ESPECTROS.....	70
6.	PROCESADO DE LOS DATOS	71
6.1	Bucketing.....	71

6.2	Normalización	71
6.3	Alineamiento	72
6.4	Deconvolución	73
7.	ASIGNACIÓN DE LOS ESPECTROS	76
8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	76
8.1	Análisis estadístico multivariante	76
8.2	Análisis estadístico univariante	77
IV.	RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL	79
1.	ESTUDIO DE ORINA	81
1.1	Diseño experimental.....	81
1.2	Perfil metabolómico de orina	82
1.3	Homogeneidad de las muestras y detección de <i>outliers</i>	84
1.4	Discriminación entre controles y pacientes con endometriosis.....	90
1.4.1	Análisis estadístico multivariante	90
1.4.2	Análisis estadístico univariante	92
1.5	Identificación y cuantificación de los metabolitos asociados a la endometriosis.....	93
1.6	Interpretación biológica	96
2.	ESTUDIO DE PLASMA	100
2.1	Diseño experimental.....	100
2.2	Perfil metabolómico de plasma	101
2.3	Homogeneidad de las muestras y detección de <i>outliers</i>	104
2.4	Discriminación entre controles y pacientes con endometriosis.....	114
2.4.1	Análisis estadístico multivariante	114
2.5	Identificación y cuantificación de los metabolitos asociados a la endometriosis.....	115
2.6	Interpretación biológica	120
3.	ESTUDIO DE TEJIDO.....	123
3.1	Caracterización metabólica del tejido endometriósico	123
3.2	Comparación de los perfiles metabólicos	129
4.	DISCUSIÓN GENERAL	138
V.	CONCLUSIONES	141
VI.	BIBLIOGRAFÍA	145
VII.	ANEXOS.....	159

ABREVIATURAS

δ	Desplazamiento químico
1D	Espectro monodimensional
¹ H-RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
2D	Espectro bidimensional
ASRM	<i>American Society for Reproductive Medicine</i> Sociedad Americana de Medicina Reproductiva
B ₁	Campo magnético oscilante
BMRB	<i>Biological Magnetic Resonance Data Bank</i> Banco de datos de Resonancia Magnética Biológica
B ₀	Campo magnético estático
CA-125	Antígeno cancerígeno 125
CoeffCS	<i>Regression coefficient centered and scaled</i> Coeficiente de regresión centrado y escalado
CoeffCScvSE	<i>Regression coefficient centered and scaled cross validated standard error</i> Error estándar del coeficiente de regresión tras la validación cruzada
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
DSS	3-(Trimethylsilyl)propane-1-sulfonic acid Ácido 3-(Trimetilsilil)-1-propano sulfónico
E2	Estradiol
EM	Espectrometría de masas
FCM	Fase del ciclo menstrual
FID	<i>Free induction decay</i> Decaimiento de inducción libre
GSD	<i>Global spectra deconvolution</i> Deconvolución global de los espectros
HMDB	<i>The Human Metabolome Database</i> Base de datos del Metaboloma Humano
HR-MAS	<i>High resolution-magic angle spinning</i> Resonancia magnética de ángulo mágico
HSQC	<i>2D ¹H-¹³C heteronuclear single quantum correlation spectroscopy</i> Espectroscopía de correlación heteronuclear de un único cuanto
IMC	Índice de masa corporal
J	Constante de acoplamiento
MHz	Megahercio
MRI	<i>Magnetic resonance imaging</i> Resonancia magnética de imagen
NK	<i>Natural killer</i> Células asesinas
NOESY	<i>Nuclear Overhauser effect spectroscopy</i> Espectroscopía de efecto Overhauser nuclear
NS	<i>Number of scans</i> Número de scans
OPLS-DA	<i>Orthogonal partial least square-discriminant analysis</i> Análisis discriminante de mínimos cuadrados con corrección ortogonal

PCA	<i>Principal component analysis</i> Análisis de componentes principales
PGE2	Prostaglandina E2
PLS-DA	<i>Partial least square-discriminant analysis</i> Análisis discriminante de mínimos cuadrados
PQN	<i>Probabilistic quotient normalization</i> Normalización con cocientes probabilísticos
RF	Radiofrecuencia
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> Especies reactivas del oxígeno
SW	<i>Spectral width</i> Anchura espectral
TD	<i>Time domain</i> Dominio tiempo
TF	Transformada de Fourier
TOCSY	<i>2D ¹H-¹H total correlation spectroscopy</i> Espectroscopía de correlación total
TSP	<i>3-trimethylsilyl propanoic acid</i> 3-trimetilsilil propionato
TMS	<i>Tetramethylsilane</i> Tetrametilsilano
TVS	<i>Transvaginal sonography</i> Ecografía transvaginal
UV	<i>Unite variance</i> Varianza unitaria
VIP	<i>Variable important in the projection</i> Variable importante en la proyección

I. INTRODUCCIÓN

1. ENDOMETRIOSIS

1.1 Definición

La **endometriosis** es una enfermedad ginecológica crónica, estrógeno dependiente, asociada a dolor pélvico e infertilidad. Se define por la presencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina (Giudice & Kao, 2004) y representa uno de los trastornos ginecológicos benignos más comunes. Se desconoce la prevalencia exacta de la endometriosis, pero se estima que oscila entre un 10% en mujeres en edad reproductiva y puede alcanzar hasta un 30-50% en mujeres con dolor pélvico y/o infertilidad (Giudice, 2010; May *et al.*, 2010).

El **endometrio** es un tejido complejo que se encuentra en constante remodelación (Giudice, 2012). El crecimiento del tejido endometrial fuera del útero (endometrio ectópico o lesión) tiene dependencia hormonal del ciclo menstrual, al igual que el endometrio eutópico (normal), produciéndose sangrado y desprendimiento del mismo con la menstruación (**Figura 1**).

Las lesiones, aunque son morfológica y biológicamente similares al endometrio eutópico, tienen la capacidad de crecer, infiltrar e incluso diseminarse de forma análoga al tejido tumoral. El sangrado cíclico induce una respuesta inflamatoria, con fibrosis y formación de endometriomas (Overton *et al.*, 2007) causando, en parte, los síntomas de la enfermedad.

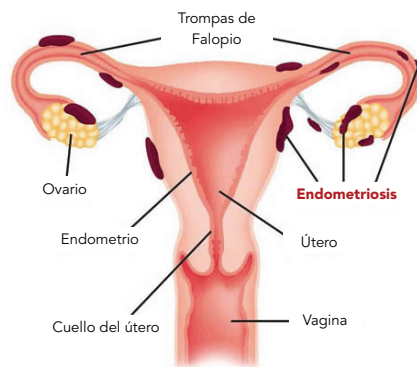


Figura 1: Aparato reproductor femenino. Localización eutópica y ectópica del tejido endometrial

La endometriosis, en el contexto de las enfermedades ginecológicas, se considera un desorden complejo, con etiología multifactorial (Janssen *et al.*, 2013). La presentación clínica de esta enfermedad abarca un amplio espectro de síntomas, encontrándose desde mujeres asintomáticas hasta formas graves y crónicas con dolores intensos y/o infertilidad, por lo que el diagnóstico basado únicamente en los síntomas es a menudo insuficiente y se requiere la visualización directa de las lesiones. No obstante, un mejor conocimiento de los mecanismos etiopatogénicos de la endometriosis permitiría un avance significativo en el diagnóstico, tratamiento y prevención de esta enfermedad.

1.2 Epidemiología

El conocimiento sobre la epidemiología de la endometriosis es limitado por la imposibilidad de diagnosticarla en la población general debido, principalmente, a razones éticas ya que actualmente es necesaria una intervención quirúrgica para confirmar visualmente la presencia de endometriosis.

Prevalencia:

La mayoría de los estudios epidemiológicos se realizan sobre grupos de pacientes seleccionadas, donde la prevalencia es muy variable en función del grupo de estudio (García Velasco & Botros Rizk, 2010):

- En mujeres sometidas a laparoscopia por infertilidad oscila entre 2.1% y 77.1%.
- En mujeres intervenidas mediante laparoscopia por dolor pélvico varía entre el 2.15% y el 83.6%.
- En mujeres sometidas a esterilización tubárica por laparoscopia fluctúa entre 1.4% y el 50%.

1.3 Clasificación y estadiaje de la enfermedad

1.3.1 Localizaciones anatómicas

Las localizaciones más frecuentes de la endometriosis son el peritoneo pélvico, los ovarios, ligamentos uterosacos y el fondo de saco de Douglas (Figura 2), aunque ocasionalmente puede afectar a cualquier otro órgano (vejiga, uréteres, recto, intestino, estómago, etc.) (Hoffman *et al.*, 2012).

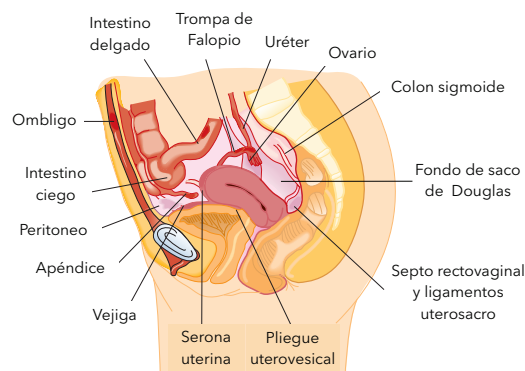


Figura 2: Localizaciones comunes de la endometriosis en abdomen y pelvis (adaptada de (Olive & Pritts, 2001))

La extensión y localización de la enfermedad es muy variable, observándose desde lesiones pequeñas y aisladas hasta grandes endometriomas ováricos con fibrosis y adherencias que causan importantes alteraciones en la anatomía pélvica de la mujer.

1.3.2 Formas clínicas de la endometriosis

En función de la localización del tejido endometrial ectópico, se distinguen tres tipos de endometriosis (Acién & Velasco, 2013; Bulum, 2009):

1. Endometriosis peritoneal superficial

Es la forma clínica más frecuente con lesiones superficiales en los ovarios y en la serosa peritoneal. Las lesiones pueden presentar diferentes aspectos: lesiones rojas (lesiones petequiales, hemorrágicas, etc.), lesiones blancas (áreas de cicatrización).

2. Endometriosis ovárica

La afección ovárica en forma de quistes también es frecuente. Estos quistes contienen un fluido de aspecto parecido al chocolate y suelen formar adherencias con el peritoneo de la fosa ovárica, las trompas y el intestino.

3. Endometriosis profunda

Constituye la forma más grave de la endometriosis, siendo a su vez la menos conocida y frecuente. Los focos de la endometriosis forman nódulos que infiltran más de 5 mm en el peritoneo subyacente. La fibrosis y/o posible invasión uretral, vesical e intestinal pueden causar daños renales irreversibles y/o obstrucciones intestinales graves.

Desde el punto de vista histológico los tres tipos de lesiones comparten rasgos comunes: presencia de estroma endometrial, sangrado crónico y signos de inflamación (Bulum, 2009). Además, pueden hallarse por separado o en combinación. La gravedad de la enfermedad se puede cuantificar según el número y tamaño de las lesiones aunque, en general, no existe correlación entre el tipo de enfermedad y la sintomatología.

1.3.3 Sistema de clasificación

En la actualidad, el estadiaje de la endometriosis se realiza según los criterios establecidos por la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (American Society for Reproductive Medicine, 1996) (**Figura 3**). Se basa en un

I. Introducción

sistema de puntuación en función de la localización de las lesiones, su diámetro, profundidad y densidad de las adherencias determinadas por laparoscopia, otorgando una serie de puntos en función de estos parámetros. De forma resumida, la enfermedad se clasifica en:

- Estadio I (mínima): implantes aislados y sin adherencias.
- Estadio II (leve): implantes superficiales menores de 5 cm adheridos o diseminados sobre la superficie del peritoneo y ovarios.
- Estadio III (moderada): implantes superficiales múltiples o invasivos. Adherencias alrededor de las trompas o periováricos, que pueden ser evidentes.
- Estadio IV (grave): implantes múltiples, superficiales y profundos que incluyen grandes endometriomas ováricos.



AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE
REVISED CLASSIFICATION OF ENDOMETRIOSIS

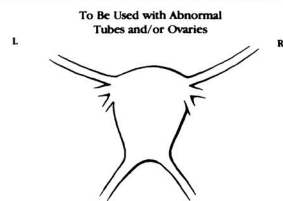
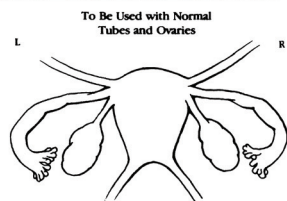
Patient's Name _____ Date _____
 Stage I (Minimal) - 1-5 Laparoscopy _____ Laparotomy _____ Photography _____
 Stage II (Mild) - 6-15 Recommended Treatment _____
 Stage III (Moderate) - 16-40
 Stage IV (Severe) - >40 Prognosis _____
 Total _____

PERITONEUM	ENDOMETRIOSIS	<1cm	1-3cm	>3cm
		Superficial	1	2
	Deep	2	4	6
OVARY	R Superficial	1	2	4
	Deep	4	16	20
	L Superficial	1	2	4
	Deep	4	16	20
POSTERIOR CULDESAC OBLITERATION		Partial	Complete	
		4	40	
OVARY	ADHESIONS	<1/3 Enclosure	1/3-2/3 Enclosure	>2/3 Enclosure
	R Filmy	1	2	4
	Dense	4	8	16
	L Filmy	1	2	4
	Dense	4	8	16
	TUBE	R Filmy	1	2
Dense		4*	8*	16
L Filmy		1	2	4
	Dense	4*	8*	16

*If the fimbriated end of the fallopian tube is completely enclosed, change the point assignment to 16.
 Denote appearance of superficial implant types as red (R), red-pink, flame-like, vesicular blots, clear vesicles, white (W), opacifications, peritoneal defects, yellow-brown, or black (B) black, hemosiderin deposits, blue). Denote percent of total described as R___%, W___% and B___%. Total should equal 100%.

Additional Endometriosis: _____

 Associated Pathology: _____



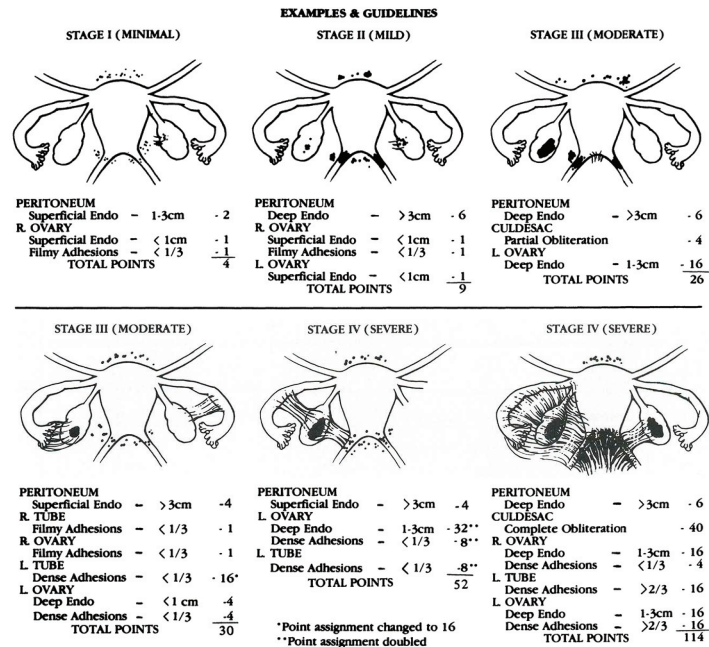


Figura 3: Sistema de clasificación de la endometriosis. Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM) (American Society for Reproductive Medicine, 1997)

Este sistema de clasificación presenta algunas limitaciones. Se trata de un sistema de puntuación arbitrario con escasa reproducibilidad que, por otro lado, no es capaz de correlacionar el estadio de la enfermedad con el tipo y/o gravedad de los síntomas y su pronóstico (Adamson, 2011).

1.4 Etiopatogenia

La etiología exacta de la endometriosis sigue siendo desconocida. Sin embargo, se han propuesto tres teorías que podrían explicar el origen de la endometriosis (Augoulea et al., 2012).

1.4.1 Teoría de la implantación

Actualmente, es la teoría más aceptada (Sampson, 1927) y propone la menstruación retrógrada como una de las principales causas de este desorden. Durante la menstruación, la mayor parte del tejido endometrial es expulsado a través del cuello uterino pero, parte de este tejido, puede retroceder a través de las trompas de Falopio y alcanzar la cavidad peritoneal (Figura 4). La presencia de la enfermedad en la cavidad pélvica ha sido atribuida a la

adhesión de estos fragmentos endometriales al epitelio del peritoneo, invadiéndolo y desarrollando actividad angiogénica, lo que le permite sobrevivir y crecer, dando lugar a una respuesta inflamatoria local (Giudice & Kao, 2004).

1.4.2 Metaplasia celómica

Esta teoría sugiere que el peritoneo es un tejido pluripotente y que la endometriosis se produce gracias a la transformación o metaplasia del tejido peritoneal en tejido endometriótico (Augoulea *et al.*, 2012). Debido a que tanto los ovarios como el progenitor del endometrio (conductos de Müller) derivan del epitelio celómico, el fenómeno de metaplasia podría explicar la endometriosis ovárica (Hoffman *et al.*, 2012).

1.4.3 Teoría de la inducción

Se considera una extensión de la teoría celómica y propone que uno o varios factores endógenos, bioquímicos o inmunológicos podrían inducir la diferenciación de células indiferenciadas en tejido endometrial (Vinatier *et al.*, 2001).

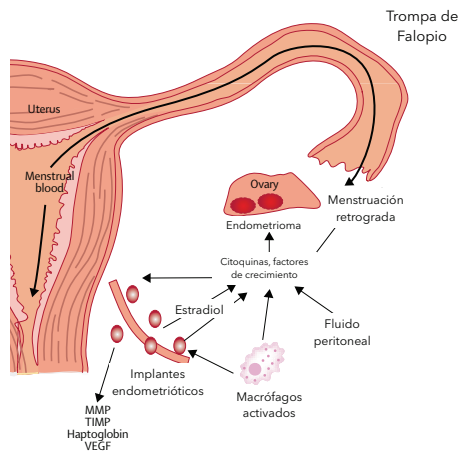


Figura 4: Teoría de la implantación. Principales efectores bioquímicos y celulares implicados en la patogénesis de la endometriosis (adaptada de (Giudice & Kao, 2004))

Estas tres teorías, que a priori parecen contradictorias, podrían ser complementarias. La transformación de los tejidos progenitores o el crecimiento de los restos mullerianos podría estar inducido por el tejido

endometrial que ha alcanzado la cavidad peritoneal a través de la menstruación retrógrada (Acien & Velasco, 2013).

Las teorías propuestas permiten justificar la localización de la mayoría de las lesiones endometriósicas. Sin embargo, todavía no es posible explicar por qué siendo la menstruación retrógrada un fenómeno casi universal, presente en el 76-90% de las mujeres (Sourial *et al.*, 2014), sólo en el 10% el tejido se implanta en una localización ectópica y desarrollan la enfermedad (Wu *et al.*, 2010). En este sentido, se ha propuesto que deben existir otros factores que estén contribuyendo a la implantación y desarrollo de la endometriosis.

Entre los factores etiológicos adicionales destacan:

1. Alteraciones hormonales

En las pacientes con endometriosis la respuesta inmune e inflamatoria, la angiogénesis y la apoptosis están alteradas favoreciendo la supervivencia y proliferación del tejido endometriósico (Bulum, 2009). Estos procesos patológicos son consecuencia de alteraciones en: a) la formación de estrógenos; b) la producción de prostaglandinas y c) la resistencia a la progesterona (Figura 5).

A. Formación de estrógenos

La endometriosis es un desorden estrógeno-dependiente donde la supervivencia celular y la inflamación son las responsables del dolor pélvico crónico y la infertilidad. Para ello, es indispensable que exista una expresión aberrante de estrógenos en las lesiones endometriósicas permitiendo la proliferación, especialmente durante la menstruación donde no hay producción ovárica de estrógenos (Reza Razzaghi *et al.*, 2012). En pacientes con endometriosis, se han descrito varias alteraciones en rutas relacionadas con el metabolismo del estradiol (E2) que conducen a un aumento en sus niveles provocando la proliferación del endometrio ectópico (Rizner, 2009).

B. Producción de prostaglandinas

Se han descrito dos bucles de retroalimentación positiva que mantiene los niveles de prostaglandina E2 (PGE2) elevados en el fluido peritoneal en presencia de endometriosis (Wu *et al.*, 2010):

1. La ruta PGE2 – COX2- PGE2 en los macrófagos peritoneales
2. La ruta PGE2 – E2- COX2- PGE2 en las lesiones endometriales

I. Introducción

El endometrio ectópico induce inflamación en la cavidad peritoneal lo que conduce a la formación de citoquinas proinflamatorias, tales como la interleuquina 1 β (IL-1 β), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y prostaglandina E2 (PGE2) producidas por los macrófagos o las propias lesiones a través de COX-2 (ciclooxigenasa-2). Los niveles altos de PGE2 suprimen la capacidad fagocítica de los macrófagos (inhibiendo la expresión de MMP-9 y CD36), reduciendo su capacidad de eliminar el tejido endometriósico (ruta 1) (Wu *et al.*, 2010). Por otro lado, la PGE2 es el estimulador más potente de los enzimas StAR y aromatasa, responsables de la síntesis "de novo" de E2, que a su vez estimula la producción de COX-2 y aromatasa, produciéndose una retroalimentación positiva, que lleva a una continua producción de E2 y PGE2 (ruta 2) (Rizner, 2009). Además, la PGE2 y el E2 también inducen la expresión de factores de crecimiento y angiogénicos (FGF-2, VEGF, FGF-9) que favorecen la migración del endotelio y proliferación celular del tejido endometriósico (Wu *et al.*, 2010) (Figura 5).

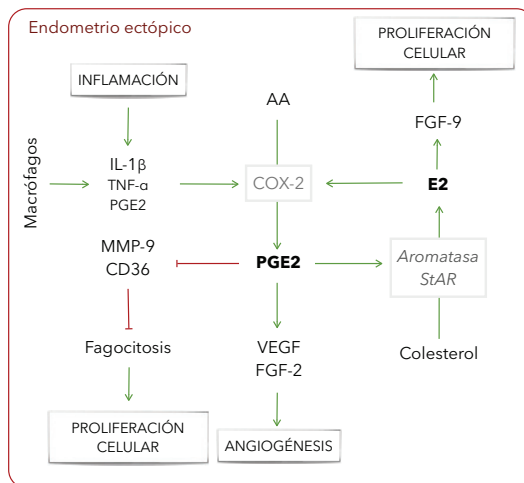


Figura 5: Mecanismos de acción de los estrógenos y las prostaglandinas en el desarrollo de la endometriosis. El endometrio ectópico induce inflamación en la cavidad peritoneal, favoreciendo la proliferación y angiogénesis en las lesiones. AA: ácido araquidónico; MMP-9: metaloproteinasa de matriz 9; CD36: receptor de superficie de macrófagos; FGF-2: factor de crecimiento de fibroblastos 2; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; StAR: proteína de fase aguda esteroideogénica (adaptada de (Rizner, 2009; Wu *et al.*, 2010))

C. Resistencia a la progesterona

En las lesiones endometriósicas, al igual que en el endometrio eutópico, se producen grandes cantidades de progesterona, pero los niveles de los receptores de progesterona (RP) son mucho más bajos (Bulum, 2009). La progesterona tiene efecto antiestrogénico, mediante su unión a los RP induce la conversión de E2 en estrona (menos estrogénica). En las lesiones endometriósicas, por el contrario, la progesterona no se une a su receptor y el E2 no se transforma en estrona (Bulum, 2009). En consecuencia, se acumula E2 y esto favorece la proliferación de las lesiones (Ación & Velasco, 2013).

2. Disfunción del sistema inmune

El progreso de la enfermedad podría estar favorecido, además, por dos factores relacionados con el sistema inmune (Acién & Velasco, 2013):

- A. Anomalías intrínsecas del endometrio eutópico que desarrollaría resistencia a ser eliminado por el sistema inmune peritoneal.
- B. Alteración en los macrófagos y las células NK (células asesinas) peritoneales, siendo así incapaces de destruir los implantes endometriósicos.

Durante el desarrollo de la endometriosis, la inflamación media el reclutamiento de células del sistema inmune, principalmente macrófagos y células NK, a la cavidad peritoneal. Idealmente, los macrófagos deberían fagocitar y eliminar los restos de células sanguíneas y tejido endometrial, pero en las pacientes con endometriosis un fallo en este proceso (Wu *et al.*, 2010), así como una supresión de la actividad citotóxica de las células NK frente a tejidos extraños (Hoffman *et al.*, 2012), favorece la implantación y proliferación del tejido endometriósico.

La inmunidad humoral también se ha visto alterada en pacientes con endometriosis. Se han identificado anticuerpos endometriales de la clase IgG indicando que la endometriosis podría ser, en parte, una enfermedad autoinmune lo que explicaría las bajas tasas de embarazos y fertilizaciones *in vitro* en presencia de endometriosis (Hoffman *et al.*, 2012).

1.5 Factores de riesgo

Entre los factores de predisposición a la endometriosis se encuentran los genéticos, medioambientales, anatómicos, etc., que contribuyen a la implantación, proliferación y descamación cíclica del endometrio ectópico con la consiguiente inflamación y fibrosis.

1.5.1 Factores genéticos

Se ha observado predisposición familiar en estudios con gemelos idénticos (García Velasco & Botros Rizk, 2010), aunque hasta la fecha no se han identificado genes específicamente relacionados con la enfermedad.

1.5.2 Factores ambientales

La exposición a dioxinas y compuestos bifenilos-policlorinados (PBC) se ha correlacionado de manera experimental con la endometriosis en monos *Rhesus*, pero no se ha podido apreciar ningún tipo de asociación en humanos (Hoffman *et al.*, 2012).

1.5.3 Factores anatómicos y menstruales

Una mayor exposición a cambios hormonales (menarquia precoz, menopausia tardía), acortamiento del ciclo menstrual, menstruaciones abundantes y reducido número de hijos incrementan significativamente el riesgo de endometriosis (Cramer & Missmer, 2002). Además, se ha descrito una relación inversa, aunque débil, entre la endometriosis y el índice de masa corporal (IMC). En este sentido, se ha especulado que esta asociación podría estar relacionada con un aumento en la tasa de ciclos anovulatorios, ciclos menstruales irregulares o alteraciones en el metabolismo andrógeno (García Velasco & Botros Rizk, 2010; Vitonis *et al.*, 2010).

1.6 Sintomatología

Los síntomas de la endometriosis son muy diversos, inespecíficos y comunes en la población general. Las manifestaciones clínicas abarcan un amplio espectro de síntomas, existiendo desde mujeres asintomáticas (30%) (Ación & Velasco, 2013) hasta formas graves y crónicas con dolor intenso y/o infertilidad asociada, que requieren varias intervenciones quirúrgicas.

1.6.1 Dolor

El síntoma principal y más frecuente es el dolor pélvico (cíclico o crónico), que adopta diferentes patrones: dismenorrea severa (menstruación dolorosa), dispareunia intensa (coito doloroso), dolor pélvico crónico, dolor limitado a la ovulación y/o disquecia (defecación dolorosa) (Bloski & Pierson, 2008). Al tratarse de una enfermedad estrógeno-dependiente, los síntomas son más intensos durante el periodo menstrual y mejoran durante la gestación y tras la menopausia.

Los mecanismos implicados en la aparición de dolor son la inflamación, la infiltración nerviosa y las adherencias, siendo las citoquinas proinflamatorias y

las prostaglandinas liberadas por las lesiones las principales responsables (Giudice & Kao, 2004).

1.6.2 Infertilidad

Se postula que el componente inflamatorio asociado a la endometriosis puede conducir a la formación de adherencias y cicatrices, alterar la permeabilidad de las trompas de Falopio, disminuir la receptividad endometrial y alterar la función reproductiva (Halis & Arici, 2004). La endometriosis también puede destruir el epitelio germinal, disminuyendo el número de ovocitos disponibles (Weiss *et al.*, 2009). A pesar de existir una clara asociación entre endometriosis e infertilidad, el mecanismo por el cual se produce es desconocido y la explicación de una asociación causa-efecto sigue siendo muy discutida.

1.7 Diagnóstico

El diagnóstico basado en la sintomatología resulta muy difícil debido al solapamiento con otros procesos ginecológicos y no ginecológicos (gastrointestinales y urogenitales) (Giudice, 2010), a la variabilidad e inespecificidad sintomática, o a la conciencia generalizada de considerar la menstruación un proceso doloroso. Además, no hay correlación entre la gravedad de la enfermedad y el tipo o intensidad de los síntomas (Fassbender *et al.*, 2013). La combinación de estos factores conduce a un retraso en el diagnóstico que se estima entre 8 y 12 años (Pugsley & Ballard, 2007) desde el inicio de los síntomas hasta el diagnóstico definitivo.

Las pautas clínicas y técnicas diagnósticas en las que se basa actualmente el diagnóstico son las siguientes:

1.7.1 Examen físico

La exploración física de la zona pélvica implica la inspección visual abdominal, vaginal y rectovaginal (Dunselman *et al.*, 2014).

1.7.2 Técnicas de imagen

A. Ecografía

La ecografía transvaginal (TVS) permite detectar endometriomas ováricos con una elevada precisión. Sin embargo, no es válida para diagnosticar implantes peritoneales y la endometriosis profunda (Moore *et al.*, 2002).

B. Resonancia Magnética de Imagen (RMI)

Permite identificar grandes focos de infiltración profunda y su extensión con gran precisión. La RMI no usa radiaciones ionizantes y el examen puede repetirse sin efectos nocivos. La mejora en la precisión de las imágenes podría contribuir de forma significativa a la detección temprana de la endometriosis.

1.7.3 Pruebas bioquímicas

En los últimos años, se han llevado a cabo numerosos estudios con el objetivo de encontrar un método de diagnóstico eficaz y no invasivo para la endometriosis. La mayoría de las aproximaciones y biomarcadores propuestos hasta el momento no poseen capacidad diagnóstica suficiente para ser trasladados a la práctica clínica y, además, muchos de ellos continúan siendo parcialmente invasivos.

El antígeno cancerígeno 125 (CA-125) ha sido el marcador tumoral más utilizado en el diagnóstico y seguimiento de las pacientes con endometriosis, pero su concentración sanguínea carece de sensibilidad suficiente para ser utilizado como biomarcador de endometriosis (Fassbender *et al.*, 2013; Kennedy *et al.*, 2005; Mol *et al.*, 1998).

En 2010, apareció una revisión con los biomarcadores propuestos durante los últimos 25 años para el diagnóstico de la endometriosis. En dicho trabajo, se identificaron más de 100 posibles biomarcadores entre los que se encontraban glicoproteínas, citoquinas inflamatorias y no inflamatorias, moléculas de adhesión y factores de crecimiento y angiogénicos. Sin embargo, ninguno de ellos ha sido validado como un método de diagnóstico no invasivo de la endometriosis (May *et al.*, 2010).

En un estudio posterior, se evaluaron un conjunto de 28 biomarcadores identificados en plasma (Vodolazkaia *et al.*, 2012). El análisis multivariante de 4 de estos biomarcadores (anexina V, VEGF, CA-125 y sICAM-I), permitió el diagnóstico de un grupo independiente de pacientes con endometriosis con una sensibilidad del 81-90% y especificidad del 63-81%. Estos resultados han de ser evaluados de forma prospectiva en pacientes con infertilidad y/o dolor sin evidencia ecográfica de presencia de endometriosis (Fassbender *et al.*, 2013; Vodolazkaia *et al.*, 2012).

Numerosos biomarcadores han sido investigados como potenciales herramientas de diagnóstico, muchos de ellos con resultados prometedores,

pero ninguno ha demostrado su validez para ser trasladado a la práctica clínica (Fassbender *et al.*, 2015; Fassbender *et al.*, 2013; May *et al.*, 2010). En este sentido, la introducción de las tecnologías "ómicas" ha supuesto un gran avance en la identificación de nuevos biomarcadores. Estas tecnologías han permitido el desarrollo de nuevas aproximaciones más fiables y eficientes en la búsqueda de marcadores biológicos.

1.7.4 Laparoscopia

El "patrón de oro" para el diagnóstico de la endometriosis es la visualización directa de las lesiones por laparoscopia, preferiblemente acompañado de la confirmación histológica de las biopsias (Giudice & Kao, 2004). Aunque gracias a la mejora de la técnica, el diagnóstico se produce en fases más tempranas de la enfermedad, la laparoscopia continúa siendo un procedimiento invasivo y costoso que conlleva riesgos asociados (daños en el intestino, vejiga, vasos sanguíneos, etc.) (García Velasco & Botros Rizk, 2010), por lo que no es un método apropiado para el diagnóstico y seguimiento de las pacientes una vez iniciado el tratamiento.

1.8 Tratamiento

En la actualidad, no existe un tratamiento curativo para la endometriosis (Sourial *et al.*, 2014) capaz de neutralizar los cuatro objetivos terapéuticos básicos: suprimir los síntomas, restaurar la fertilidad, eliminar las lesiones endometriósicas visibles y evitar la progresión de la enfermedad. Los tratamientos farmacológicos actuales, basados fundamentalmente en terapia hormonal y analgésicos, únicamente consiguen frenar de manera transitoria la progresión de la enfermedad (Balasch, 2003). La endometriosis es una enfermedad hormono-dependiente, es decir, las lesiones endometriósicas, de igual manera que el endometrio eutópico, responden a los esteroides ováricos, por tanto, la terapia hormonal es efectiva frente al dolor, pero no frente a la eliminación definitiva de la endometriosis.

Por otro lado, la intervención quirúrgica, además de posibilitar el diagnóstico definitivo de la enfermedad, permite la escisión completa de las lesiones, reduce la inflamación y mejora la fertilidad de las pacientes. La técnica más utilizada es la laparoscopia, pues permite la visualización directa de las lesiones con una reducida invasividad, mejor recuperación postquirúrgica y menor estancia hospitalaria.

2. APLICACIÓN DE LAS “ÓMICAS” EN ENDOMETRIOSIS

2.1 Introducción a las tecnologías “ómicas”

El desciframiento del Genoma Humano ha contribuido al desarrollo de las tecnologías de alto rendimiento denominadas “ómicas” (genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica, etc.), capaces de analizar y generar datos a gran escala con elevada precisión y resolución, y al consiguiente desarrollo de potentes técnicas computacionales para la evaluación e interpretación de los datos experimentales procedentes de este tipo de estudios.

La combinación de las diferentes tecnologías “ómicas” se ha definido como **Biología de Sistemas** y pretende proporcionar una visión global e integradora de los procesos biológicos (Horgan & Kenny, 2011) a partir de los datos procedentes de diferentes áreas del conocimiento.

En los últimos años, el rápido desarrollo de estas tecnologías ha facilitado el descubrimiento de nuevos **biomarcadores** de distintos tipos capaces de proporcionar información sobre la progresión/regresión de la enfermedad, mejorar el diagnóstico clínico o monitorizar la respuesta al tratamiento.

Los estudios “ómicos” además de proporcionar una visión holística de los sistemas biológicos y sus alteraciones en respuesta a la enfermedad, y facilitar el descubrimiento de biomarcadores de aplicación clínica, también contribuyen al conocimiento de los mecanismo moleculares implicados en la etiopatogenia de las enfermedades.

2.2 Tipos y aplicaciones de las tecnologías “ómicas”

Las distintas estrategias “ómicas” (**Figura 6**) proporcionan información complementaria sobre el sistema biológico a estudiar (Davis *et al.*, 2011). Cada una de estas aproximaciones aporta un tipo de información en función del tipo de molécula que estudian (genes, mensajeros, proteínas o metabolitos). Todas ellas presentan ventajas e inconvenientes, por lo que la elección de la estrategia a utilizar dependerá de la plataforma analítica y las características de la matriz biológica disponible, así como del diseño y objetivo del estudio.

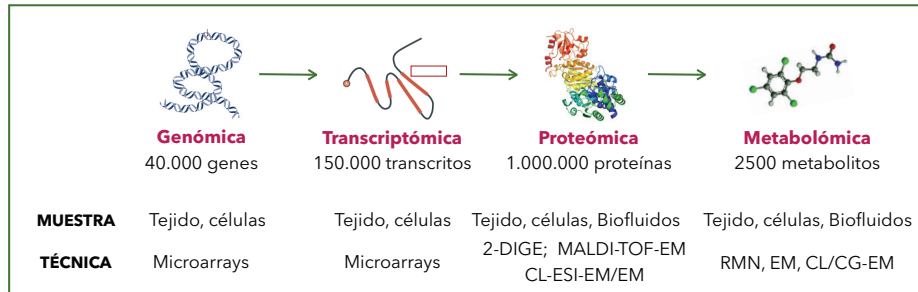


Figura 6: Comparación de las tecnologías "ómicas" (adaptada de (Davis et al., 2011))

La aplicación de las "ómicas" en el campo de la **medicina reproductiva**, denominada recientemente como reproductómica (Bellver et al., 2012) ha sido factible gracias al aumento de la sensibilidad y resolución de estas tecnologías (Hamamah et al., 2010). Algunas de las aplicaciones generales en este contexto han sido:

- Comprensión y caracterización de la receptividad endometrial (Diaz-Gimeno et al., 2011)
- Fisiopatología endometrial: ciclo menstrual e implantación (Dominguez et al.; Wallace et al., 2010)
- Endometriosis (Dutta et al., 2015; Vouk et al., 2012)
- Medicina materno-fetal y diagnóstico prenatal (Diaz et al., 2013; Fanos et al., 2013; Romero et al., 2006; Sanz-Cortes et al., 2013)
- Reproducción asistida e infertilidad: selección ovocitos (Sakkas, 2014)
- Cáncer ovárico, endometrial, etc. (Galazis et al., 2013; Garcia et al., 2011)

Concretamente, el uso de las tecnologías "ómicas" en el estudio de la **endometriosis** ha proporcionado una visión integradora de la enfermedad a través de una mejor comprensión de los mecanismos patogénicos subyacentes a la enfermedad. Ante la necesidad de reducir el tiempo de diagnóstico desde la aparición de los primeros síntomas, uno de los objetivos principales ha sido la identificación no invasiva de biomarcadores tempranos de la enfermedad. En este sentido, en los últimos años, se han llevado a cabo numerosos estudios con la finalidad de encontrar un método de diagnóstico eficaz mediante el análisis de tejido endometrial y biofluidos. Sin embargo, las aproximaciones y biomarcadores propuestos no poseen capacidad diagnóstica suficiente para ser trasladados a la práctica clínica.

2.2.1 Genómica

La genómica es el estudio sistemático del genoma de un organismo. El genoma humano contiene 3.2 billones de bases y se estima que entre 30.000-40.000 genes codifican para proteínas (Horgan & Kenny, 2011). La búsqueda de biomarcadores de tipo genético se basa en el análisis de alteraciones en la expresión o en la secuencia de genes, con el objetivo de identificar diferencias entre individuos sanos y aquellos afectados por la patología (GenomaEspaña & FUAM, 2010).

- **Estudios genómicos en endometriosis**

Se han llevado a cabo diversos estudios con el fin de establecer la posible relación entre determinadas variantes genéticas y el riesgo de desarrollar endometriosis. Las mayores contribuciones en la búsqueda de *loci* de riesgo se han conseguido gracias a los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) donde al menos 6 regiones genómicas han sido asociadas con esta enfermedad en diferentes poblaciones (Fung *et al.*, 2015). Sin embargo, se requieren estudios adicionales, basados en tamaños muestrales mayores, para confirmar los *loci* involucrados en la etiología de la enfermedad (Rahmioglu *et al.*, 2014).

2.2.2 Transcriptómica

Estudia los niveles de transcritos (ARNm) en una determinada población de células o tejido. El transcriptoma está constituido por el ARNm (ARN mensajero) total contenido en una célula u organismo. El transcriptoma, por tanto, refleja el nivel de expresión de los genes en un momento determinado y permite comparar perfiles de expresión génica en distintas situaciones.

- **Estudios transcriptómicos en endometriosis**

En los estudios transcriptómicos realizados en endometriosis se ha comparado el patrón de expresión génica del endometrio ectópico respecto al endometrio eutópico procedente de la misma paciente, así como el endometrio eutópico de mujeres con y sin endometriosis (Giudice, 2012). Los resultados muestran diferencias en el perfil transcriptómico, así como diversos procesos biológicos y rutas de señalización únicas en el endometrio ectópico *versus* el endometrio eutópico (Altmae *et al.*, 2014).

Recientemente, varios micro ARNs (miARNs), identificados en sangre periférica, han sido propuestos como posibles marcadores de endometriosis

(Tabla 1). Los miARN son secuencias no codificantes que regulan la expresión génica a nivel postranscripcional. La estabilidad de estas moléculas y la elevada correlación entre su expresión en tejido y suero hace que sean candidatos potenciales en la búsqueda de nuevos biomarcadores de diagnóstico y útiles para orientar las intervenciones terapéuticas de la endometriosis (Fassbender *et al.*, 2015; Gilabert-Estelles *et al.*, 2012).

2.2.3 Proteómica

La proteómica estudia el conjunto de las proteínas expresadas en una célula, tejido u organismo. Esta aproximación experimental permite la observación simultánea y la identificación de alteraciones en la expresión proteica como reflejo de la causa o consecuencia de una determinada enfermedad (Petricoin *et al.*, 2002).

- **Estudios proteómicos en endometriosis**

La proteómica es una de las técnicas de alto rendimiento más utilizadas en los estudios de endometriosis. Hasta la fecha, se han realizado varios estudios utilizando geles de electroforesis de dos dimensiones (2D-DIGE) para identificar diferencias entre el endometrio eutópico de mujeres con y sin endometriosis. Algunos de los resultados han sido confirmados mediante inmunohistoquímica o *western blotting*, aunque no todos los resultados han sido consistentes.

En los últimos años, los estudios proteómicos, mediante la combinación de diversas técnicas (SELDI-TOF/MS, MALDI-TOF/MS, HPLC-MS/MS, LC-MS/MS, 2D-DIGE/MS, etc.), han analizado tanto muestras de tejido endometrial como diversos tipos de biofluidos: plasma/suero (Dutta *et al.*, 2015; Fassbender *et al.*, 2012b; Zheng *et al.*, 2011), orina (Cho *et al.*, 2012; El-Kasti *et al.*, 2011; Tokushige *et al.*, 2011) y fluido endometrial (Ametzazurra *et al.*, 2009; Casado-Vela *et al.*, 2009), obteniéndose resultados prometedores sobre el perfil proteico de las pacientes con endometriosis (Tabla 1).

Aunque gracias a estos estudios se han producido numerosos avances en el estudio de la endometriosis, es necesario incrementar la reproducibilidad de estas técnicas y llevar a cabo estudios con un número mayor de muestras. El mayor reto en este tipo de estudios es validar los resultados en un grupo independientes de muestras (Fassbender *et al.*, 2013).

2.2.4 Metabolómica

La metabolómica se define como el estudio global de los metabolitos presentes en un muestra biológica en unas condiciones determinadas. A diferencia de las otras "ómicas", se estima que el número de metabolitos en cualquier sistema biológico varía entre 2000 y 3000 (**Figura 6**), lo que supone una reducción en la complejidad de los datos, simplifica el análisis y aumenta la probabilidad de detectar cambios significativos que reflejen el problema biológico a estudiar (Davis et al., 2011). Los metabolitos son el productos final de la expresión génica y proteica y, por tanto, el reflejo directo de la actividad bioquímica, lo que proporciona una herramienta capaz de medir el metabolismo celular y en consecuencia el fenotipo. En este sentido, la metabolómica se ha convertido en una potente aproximación para el diagnóstico clínico (Patti et al., 2012).

- **Estudios metabolómicos en endometriosis**

Hasta la fecha, sólo han aparecido tres estudios metabolómicos (**Tabla 1**) en el campo de la endometriosis. El primer estudio publicado (Vouk et al., 2012), realizado sobre muestras de plasma, fue un análisis dirigido en el que se identificaron en pacientes con endometriosis niveles elevados de éteres derivados de fosfolípidos y esfingomielinas. Posteriormente, Chaudhury y colaboradores empleando RMN (resonancia magnética nuclear) realizaron dos estudios (Dutta et al., 2012; Jana et al, 2013) en los que compararon muestras de suero procedentes de pacientes con endometriosis con respecto al grupo control. El análisis estadístico de los datos mostró diferencias significativas en un conjunto de 13 y 15 metabolitos, respectivamente (**Tabla 1**). Los resultados preliminares de ambos estudios sugerían un aumento en el metabolismo de la glucosa y defectos en el sistema respiratorio mitocondrial como posibles causas de la excesiva generación de ROS (especies reactivas del oxígeno) en presencia de endometriosis.

Tabla 1: Resultados más relevantes de los estudios “ómicos” realizados en endometriosis

	Plataforma tecnológica	Muestra biológica	Biomarcadores propuestos	Referencia
GENÓMICA	GWAS	Tejido	<i>CDKN2BAS, WNT4;</i>	(Uno <i>et al.</i> , 2010)
			<i>mir-148a, NFE2L3, HOXA11</i>	(Adachi <i>et al.</i> , 2010) (Painter <i>et al.</i> , 2011) (Nyholt <i>et al.</i> , 2012) (Albertsen <i>et al.</i> , 2013) (Rahmioglu <i>et al.</i> , 2014)
TRANSCRIPTÓMICA	Microarrays	Tejido Plasma	<i>miR135a/b;</i>	(Burney <i>et al.</i> , 2009) (Teague <i>et al.</i> , 2010)
			<i>miR-17-5p, miR-20a, miR-22;</i>	(Aghajanova & Giudice, 2011) (Petraacco <i>et al.</i> , 2011)
			<i>miR-16, miR-191, miR-195</i>	(Gilabert-Estelles <i>et al.</i> , 2012) (Jia <i>et al.</i> , 2013) (Suryawanshi <i>et al.</i> , 2013) (Mari-Alexandre <i>et al.</i> , 2015)
PROTEÓMICA	2D-DIGE/MS; SELDI-TOF/MS; MALDI TOF-TOF/MS; MALDI-TOF/MS; LC-MS/MS; HPLC-MS/MS	Tejido AE Plasma Suero Orina	<i>14-3-3; moesina;</i>	(Zhang <i>et al.</i> , 2006) (Fowler <i>et al.</i> , 2007)
			<i>Haptoglobina, SM-22α Rab37 Rho-GDIα;</i>	(Ten Have <i>et al.</i> , 2007) (Ametzazurra <i>et al.</i> , 2009)
			<i>VDBP</i>	(Chehna-Patel <i>et al.</i> , 2010) (Stephens <i>et al.</i> , 2010)
			<i>Cadena-β de fibrinógeno;</i>	(Kyama <i>et al.</i> , 2011) (Cho <i>et al.</i> , 2012)
			<i>Citoqueratina-19;</i>	(Fassbender <i>et al.</i> , 2012a) (El-Kasti <i>et al.</i> , 2011) (Zheng <i>et al.</i> , 2011)
			<i>CFB, CFH, ITIH4, IGKC, LRG1, APOL1, APOM, HP, IGKC y AIBG</i>	(Tokushige <i>et al.</i> , 2011) (Gajbhiye <i>et al.</i> , 2012) (Dutta <i>et al.</i> , 2015)
METABOLÓMICA	ESI-MS/MS	Plasma	Éteres de fosfolípidos y esfingomielinas	(Vouk <i>et al.</i> , 2012)
	RMN	Suero	+E: Lactato, 3HB, Ala, GPC, Val, Leu, Thr, 2HB, Lys, succinato. -E: Glucosa, Ile, Arg	(Dutta <i>et al.</i> , 2012)
			+E: Lactato, 2HB, Lys, piruvato, succinato, adipato, citrato, GPC. -E: Glucosa, Ala, creatina, Leu, Ile, Asn, Arg	(Jana <i>et al.</i> , 2013)

GWAS: *genome-wide association study*; 2D-DIGE: *two-dimensional-difference gel electrophoresis*; SELDI-TOF: *surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight*; MALDI-TOF: *matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight*; LC: *liquid chromatography*; HPLC: *high performance liquid chromatography*; MS: *mass spectrometry*;

RMN: resonancia magnética nuclear. AE: aspirado endometrial; VDBP: proteína de unión a vitamina D; +E: aumentado en endometriosis; -E: disminuido en endometriosis. 3HB: 3-hidroxibutirato, Ala: alanina; GPC: glicerofosocolina; Val: valina; Leu: leucina; Thr: treonina; 2HB: 2-hidroxibutirato; Lys: lisina; Ile: isoleucina; Arg: arginina; Asn: asparagina

2.3 Identificación de biomarcadores de endometriosis

2.3.1 Concepto de biomarcador

Un marcador biológico o biomarcador es una característica biológica que puede medirse de manera objetiva y que puede ser utilizada como indicador de un proceso biológico normal, de un proceso patológico, así como de la respuesta farmacológica a una intervención terapéutica (Buyse *et al.*, 2010).

El descubrimiento de un biomarcador incluye dos etapas fundamentales (GenomaEspaña & FUAM, 2010):

1. Etapa de identificación: se proponen las moléculas o genes candidatos a convertirse en biomarcadores. El objetivo es relacionar una característica objetiva con el estado de salud o enfermedad.
2. Etapa de validación: tiene por objeto determinar si existe una evidencia científica lo suficientemente sólida para su aplicación en la práctica clínica.

Las características fundamentales que debe presentar un test de diagnóstico basado en el uso de biomarcadores son: validez analítica y clínica, utilidad clínica y seguridad. Otras características importantes que añaden valor al test son la sencillez en la realización e interpretación del ensayo, la obtención rápida de resultados, mínima o nula invasividad y que la relación coste-beneficio sea lo más ajustada posible (GenomaEspaña & FUAM, 2010).

Una vez identificado el marcador o conjunto de marcadores, el siguiente paso es utilizar esta información para intentar desarrollar un test no invasivo de diagnóstico, pronóstico o de seguimiento del proceso biológico a estudiar.

2.3.2 Tipos de biomarcadores

Los biomarcadores moleculares, en función de su aplicación clínica, se pueden clasificar, principalmente, en cuatro tipos:

- **Biomarcadores con valor diagnóstico:** permiten identificar pacientes con una patología concreta, discriminando entre individuos sanos y enfermos.

Este grupo también incluiría los **biomarcadores de estratificación de pacientes**, capaces de proporcionar un diagnóstico más específico y diferenciar subgrupos de pacientes.

- **Biomarcadores con capacidad predictiva:** predicen el riesgo de desarrollar una enfermedad antes de la aparición de sus síntomas.
- **Biomarcadores con utilidad pronóstica:** proporcionan información sobre la causa probable y progresión de la enfermedad, pudiendo anticiparse a los posibles cambios durante el curso de la patología.
- **Biomarcadores de respuesta:** predicen la respuesta del paciente a un tratamiento concreto (Buyse *et al.*, 2010).

2.3.3 Características de los marcadores de endometriosis

Idealmente, un marcador o una combinación de marcadores, que pudiese/n medirse en biofluidos no invasivos (sangre, orina) (**Figura 7**) sería la forma más eficiente de reducir los riesgos inherentes al diagnóstico quirúrgico. Estos marcadores deberían cumplir los siguientes requisitos (Giudice, 2012):

- Alta sensibilidad y especificidad
- Buen valor pronóstico
- Diagnóstico temprano: las mujeres con estadios I-II podrían beneficiarse de un tratamiento laparoscópico temprano e iniciar antes el tratamiento de infertilidad, si se diese el caso
- No invasivo: un marcador no invasivo permitiría la detección rápida de la enfermedad y el seguimiento de la eficacia del tratamiento (**Figura 7**)

En general, la identificación de un biomarcador con estas características, principalmente de diagnóstico temprano y no invasivo, podría reducir el retraso en el diagnóstico, monitorizar el seguimiento de la enfermedad y una mejor evaluación pre-operativa de las mujeres con endometriosis (May *et al.*, 2010).

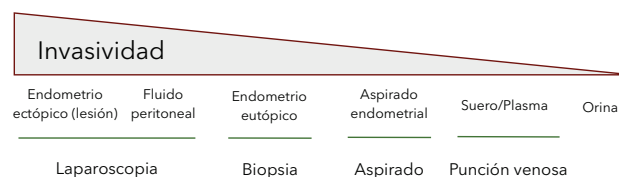


Figura 7: Muestras analizadas en la búsqueda de biomarcadores de endometriosis. (Adaptada de (Giudice, 2012))

I. Introducción

La identificación de biomarcadores de diagnóstico es una de las prioridades en la investigación de la endometriosis. Algunas de las limitaciones, hasta el momento, han sido:

1. La disparidad en el diseño de los estudios como consecuencia de la falta de consenso sobre el fenotipo de las mujeres con endometriosis (sintomáticas/asintomáticas, fértiles/infértiles, etc.) y los distintos criterios utilizados para seleccionar el grupo de mujeres utilizado como control.
2. La discrepancia entre los resultados de los estudios debido a la amplia gama de técnicas utilizadas, a las distintas estrategias seguidas en el reclutamiento de pacientes y recogida de muestras y al posible impacto de la fase del ciclo menstrual (FCM).
3. La imposibilidad de comparar estudios por la variabilidad en los tamaños muestrales, condicionado principalmente por el grupo control y la necesidad de descartar visualmente la presencia de endometriosis, la relativa subjetividad en el estadiaje de la enfermedad y la incompleta caracterización clínicas de las mujeres (FCM, tratamientos, etc.). Todos estos factores, además, limitan la reproducibilidad de los estudios.
4. La ausencia, en la mayoría de los estudios, de una validación externa con un grupo de muestras independientes (Fassbender *et al.*, 2013; Giudice, 2012; May *et al.*, 2010).

3. METABOLÓMICA

3.1 El metaboloma

Los **metabolitos** son moléculas de bajo peso molecular (<1500 Da) que resultan de la actividad celular. La presencia/ausencia o cambio relativo de un determinado compuesto puede ser un indicador directo de la actividad bioquímica de la célula u organismo en un momento determinado. Además, los metabolitos pueden ser reactivos, intermediarios o productos de la acción de varias enzimas, por lo que la caracterización del **perfil metabólico** de un determinado sistema proporciona una visión integrada de muchos procesos.

El **metaboloma**, considerado como el conjunto de metabolitos presentes en un sistema biológico en unas condiciones dadas, se utiliza, por tanto, en el diagnóstico clínico como reflejo de un estado patológico específico o de los factores de riesgo que predisponen a éste. El metaboloma se compone de los metabolitos originados en distintos procesos (Dunn *et al.*, 2011):

- Metabolitos endógenos: sintetizados y consumidos por el propio sistema biológico.
- Metabolitos exógenos: importados del exterior y metabolizados (fármacos, alimentos, etc.).
- Metabolitos microbianos: procedentes mayoritariamente de la microbiota intestinal.

La complejidad y tamaño del metaboloma es dependiente del organismo y del tipo de muestra (suero/plasma, orina, líquido cerebroespinal, líquido amniótico, saliva, extractos celulares/tisulares, etc.). A su vez, los metabolomas de ciertas muestras pueden estar interconectados. Por ejemplo, el suero/plasma y la orina son biofluidos que integran el metabolismo de varios órganos y el de la microbiota (Dunn *et al.*, 2011).

3.2 Aplicaciones de la metabolómica

La metabolómica complementa la información proporcionada por la bioquímica clásica, la biología molecular y la fisiología, dando lugar a una nueva visión de las rutas implicadas en los procesos biológicos (Vinayavekhin *et al.*, 2010). La metabolómica se emplea tanto para la identificación de biomarcadores como para intentar entender la etiología molecular de las enfermedades. Los datos derivados de un estudio metabolómico pueden ser analizados de diferentes maneras en función del objetivo del estudio.

Se han realizado estudios metabolómicos sobre una gran variedad de organismos (bacterias, levaduras, plantas, mamíferos, etc.) empleando distintos tipos de biofluidos, células o tejidos. Centrándonos en las aplicaciones biomédicas dirigidas al diagnóstico, los estudios realizados pueden dividirse en las siguientes áreas de investigación: enfermedades metabólicas (Abu Bakar *et al.*, 2015), cáncer (Puchades-Carrasco *et al.*, 2013; Slupsky *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010), enfermedades infecciosas (Dessi *et al.*, 2014; Sitole *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2015), cardiovasculares (Kordalewska & Markuszewski, 2015; Lewis *et al.*, 2008), desórdenes neurológicos (Dumas & Davidovic, 2013), y medicina reproductiva y ginecología (Fanos *et al.*, 2013; Murri *et al.*, 2014; Nel-Themaat & Nagy, 2011).

3.3 Tipos de estudios metabolómicos

En términos generales, se emplean dos estrategias en función del conocimiento previo sobre el problema biológico y el objetivo del estudio:

- **Análisis dirigido:** es el que se realiza cuando existe un conocimiento previo de los metabolitos implicados en el proceso biológico bajo estudio. Este enfoque permite escoger la técnica analítica más adecuada y optimizar el tratamiento/procesado de la muestra en función de la naturaleza y abundancia de los metabolitos a analizar. Estos estudios se centran en la detección y cuantificación de un número reducido de compuestos relacionados directamente con el problema biológico y proporcionan una medida o valor absoluto de la concentración de los metabolitos con una elevada especificidad y precisión (Dunn *et al.*, 2011; Patti *et al.*, 2012).
- **Análisis no dirigido o análisis del perfil metabólico:** se emplea cuando no se parte de una hipótesis sobre los mecanismos implicados o metabolitos alterados en un determinado sistema biológico. Con esta aproximación, en contraposición al enfoque anterior, el análisis no se restringe a un grupo seleccionado de compuestos, lo que se pretende es analizar simultáneamente tantos metabolitos como sea posible para obtener una visión global del problema de interés. En estos estudios, aunque se pueden obtener valores de concentración absolutos, generalmente, se calculan las concentraciones relativas de los metabolitos analizados y se analizan sus variaciones entre dos o más condiciones (Dunn *et al.*, 2011; Patti *et al.*, 2012).

3.4 Plataformas analíticas

Las principales plataformas analíticas utilizadas en metabolómica son la espectrometría de masas (EM) y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN). Ambas técnicas son adecuadas para el análisis metabólico pero tienen diferentes fortalezas y debilidades, por lo que pueden considerarse complementarias (Tabla 2).

3.4.1 Espectrometría de Masas (EM)

El funcionamiento de la EM se basa en la formación de especies iónicas con carga positiva o negativa a partir de la muestra biológica de interés, la separación de estos iones en función de su relación masa/carga (m/z) y la posterior detección de estos compuestos. Las etapas de separación y detección de los iones se realiza en condiciones de vacío con el fin de reducir las colisiones entre ión-ión, las cuales pueden influir en la resolución, precisión y sensibilidad del instrumento (Dunn *et al.*, 2011). Esta técnica se caracteriza por su gran sensibilidad, permitiendo la detección de metabolitos secundarios del orden de picomolar-fentomolar.

Las distintas modalidades de EM (Figura 8) se definen por las tecnología y condiciones empleadas en cada una de las etapas anteriormente descritas: ionización, separación y detección.

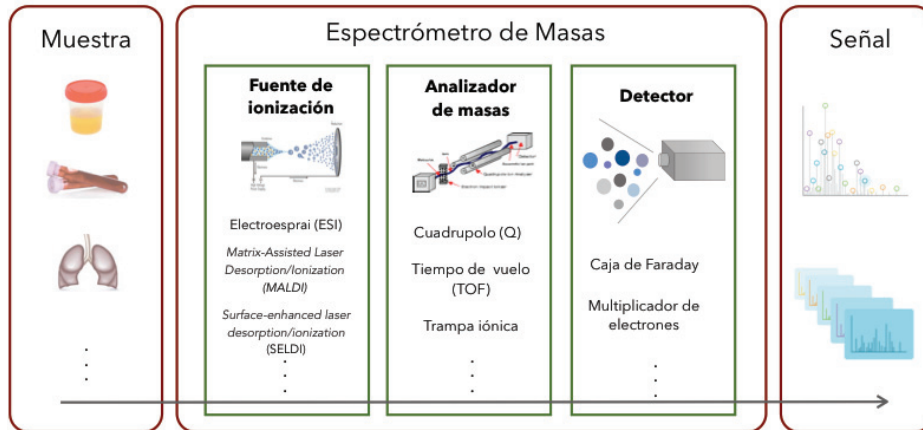


Figura 8: Tecnologías utilizadas en los estudios metabolómicos por EM para el análisis de muestras biológicas

La EM se emplea para el análisis de muestras sólidas (células o tejidos), líquidas y gaseosas, aunque previamente se requiere un pre-procesado de las muestras para la adecuada extracción y separación de los metabolitos. En la EM, durante la obtención del espectro, la muestra se destruye y no puede recuperarse. La interacción entre la muestra y el instrumento puede causar variaciones durante las medidas a corto-medio plazo, lo que reduce la reproducibilidad de la técnica. Todo ello hace necesario la utilización de controles de calidad durante las medidas.

3.4.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La espectroscopía de RMN es una potente herramienta analítica tradicionalmente utilizada en biología estructural, química orgánica/inorgánica y descubrimiento de fármacos (Emwas, 2015). Más recientemente, se está también empleando en estudios metabolómicos para la identificación y cuantificación de compuestos presentes en una muestra biológica.

La RMN tiene la capacidad de extraer información de forma no destructiva a partir de una gran variedad de muestras, desde tejido intacto, utilizando una sonda HR-MAS (*high resolution-magic angle spinning*), a extractos celulares o tisulares y biofluidos. El análisis, tanto de los biofluidos como del tejido intacto, puede realizarse directamente, sin la necesidad de separación o extracción

previa de los metabolitos. La principal ventaja de la RMN frente a la EM es la reproducibilidad.

Tabla 2: Ventajas y limitaciones de la RMN y la EM en relación con los estudios metabolómicos

	RMN	EM
Sensibilidad	Baja sensibilidad, del orden de micromolar (10^{-6})	Elevada sensibilidad, del orden de picomolar (10^{-12}) con técnicas estándar
Reproducibilidad	Muy alta	Moderada
Preparación muestras	Mínima: añadir tampón, D_2O y compuesto de referencia si se requiere	Necesaria la extracción o separación de los metabolitos mediante cromatografía
Volumen muestra	Normalmente 300-500 μL . Pueden analizarse 50 μL empleando capilares	Inferior a 100 μL
Recuperación muestra	No se destruye la muestra, puede ser recuperada, almacenada y reanalizada posteriormente	Técnica destructiva, no es posible recuperar la muestra
Análisis de tejido	Sí. Tejido intacto utilizando una sonda HR-MAS	No. Se requiere extracción previa de los metabolitos
Tiempo adquisición experimentos	5 min. Experimentos estándar 1D (1H -RMN)	10 min. UPLC-MS
Tipos de metabolitos detectados	Todos los metabolitos que posean un hidrógeno (1H) en su estructura, asumiendo concentraciones del orden 10^{-6}	Mayor cantidad y variedad de metabolitos. Se requiere extracción y separación cromatografía específica en función del tipo de metabolito a identificar
Identificación de metabolitos	Se combina la información de los experimentos 1D y 2D y las bases de datos. La identificación es más directa que con EM	Una vez conocida la masa y el tiempo de retención, se requiere un análisis adicional para conocer el patrón de fragmentación del compuesto

(Emwas *et al.*, 2013; Emwas, 2015)

4. RMN

La RMN es una técnica espectroscópica basada en las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos. Como cualquier otra técnica espectroscópica utiliza la radiación electromagnética para obtener información de la materia.

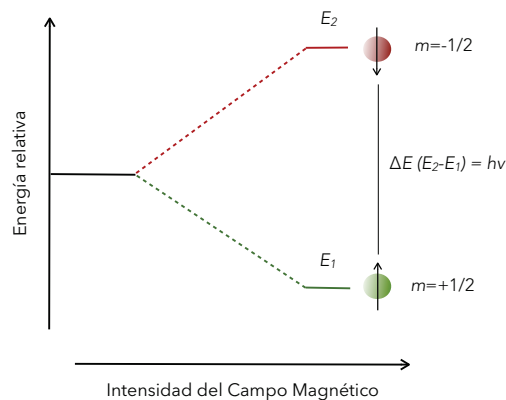
En las aplicaciones biomédicas de la RMN, el átomo de hidrógeno (^1H) es el núcleo comúnmente utilizado, por la ubicuidad de estos átomos en las moléculas orgánicas, por presentar una abundancia natural del 99,98% y por poseer las características químicas necesarias para ser detectado por RMN.

4.1 Propiedades magnéticas de los núcleos

Los núcleos atómicos poseen una propiedad llamada **espín**, caracterizada por el número cuántico de **espín nuclear** (l). El espín es una propiedad intrínseca de las partículas, al igual que la carga o la masa, que les permite girar sobre sí mismos creando un campo eléctrico y magnético. El espín se dice que está cuantizado, es decir, sólo puede adquirir determinados valores enteros o semienteros. Los núcleos magnéticamente activos son aquellos cuyo espín resultante es distinto de cero, es decir, aquellos átomos con un número impar de protones y/o neutrones. El caso más sencillo es el átomo de ^1H , formado por un único protón (+), cuyo valor de $l=1/2$.

Cada núcleo puede tener dos estados o **niveles de energía** (m). Los valores de m sólo pueden ser $m=+l$ o $m=-l$. Para el átomo de ^1H sus valores permitidos son: $m=+1/2$ y $m=-1/2$ (Keeler, 2005). En ausencia de un campo magnético, los estados del espín se distribuyen de forma aleatoria y son energéticamente equivalentes. En el interior de un campo magnético estático (imán) éstos se alinean en la misma dirección que el campo magnético (B_0) y se produce un desdoblamiento de los niveles de energía, dando lugar a dos configuraciones diferentes: los núcleos con espín positivo ($m=+1/2$) se orientarán paralelamente a B_0 (estado de mínima energía) y los núcleos con espín negativo ($m=-1/2$) se orientarán en sentido contrario a B_0 (estado de mayor energía). La diferencia de energía (ΔE) entre ambos estados será proporcional a la intensidad del campo magnético (**Figura 9**).

Figura 9: Desdoblamiento de los niveles de energía en presencia de un campo magnético externo. Las esferas representan los núcleos atómicos que están alineados de forma paralela (verde) o antiparalela (rojo) con el campo magnético. ΔE (E_2-E_1)= $h\nu$ (ΔE : incremento de energía; h : constante de Plank, ν : frecuencia (Hz))



I. Introducción

Al irradiar la muestra con un pulso de radiofrecuencia (RF) de 90° , también llamado campo magnético externo (B_1), el protón (^1H) que se encuentra en el estado de energía más bajo sufre una transición y pasa al estado de energía más alto absorbiendo un fotón cuya energía es precisamente la diferencia de energía entre los dos estados (ΔE). Cuando el pulso de RF cesa, la vuelta al equilibrio (relajación) se produce a través de la emisión del exceso de energía en forma de onda de RF llamada FID (*Free Induction Decay*) –dominio tiempo–, que posteriormente es procesada matemáticamente y transformada en una función de frecuencias, mediante la Transformada de Fourier (TF), adquiriendo el aspecto de un espectro de RMN. Por tanto, un espectro de RMN está constituido por la superposición de las frecuencias de todos los ^1H presentes en la muestra (Figura 10).

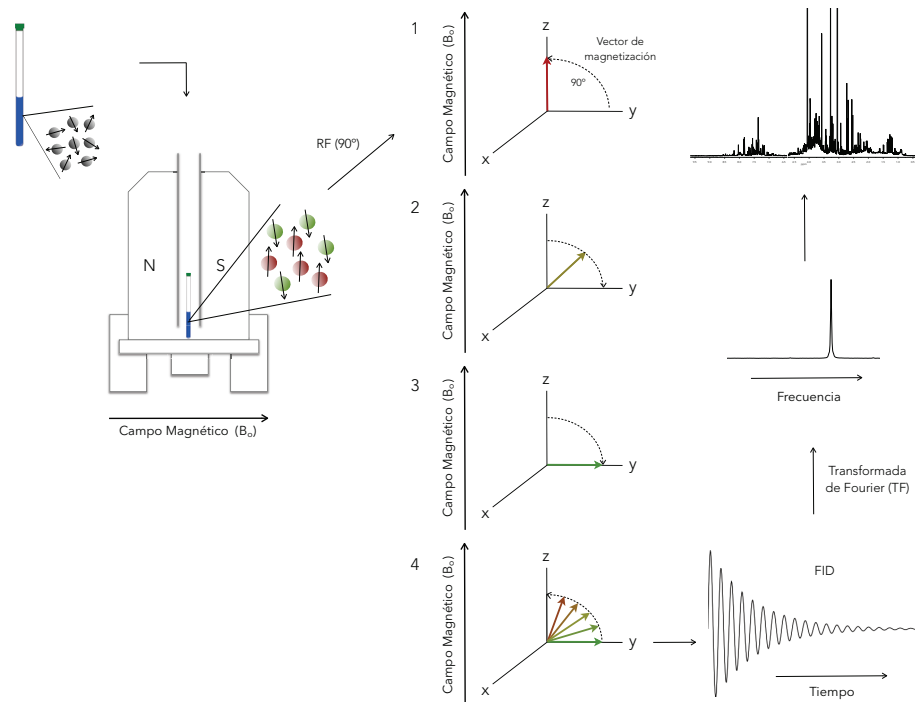


Figura 10: Esquema general de la adquisición de un espectro RMN. La RMN emplea pulsos de RF (90°) cortos caracterizados por su frecuencia, potencia y duración capaces de excitar múltiples frecuencias simultáneamente. Cuando el pulso cesa, los espines tienden a recuperar espontáneamente el estado inicial emitiendo el exceso de energía. Durante el regreso del sistema a la situación de equilibrio se emite una onda denominada FID, a la cual se aplica una función matemática (TF) que da lugar al espectro de RMN

4.2 Características de un espectro de RMN

Un espectro de RMN está definido por las siguientes características:

- Intensidad de las señales

La intensidad es proporcional al número de protones (^1H) que contribuyen a esa señal. Durante la adquisición de los experimentos uno de los principales objetivos es incrementar la sensibilidad de las medidas aumentando la relación señal/ruido (S/R) y esto se puede conseguir de diferentes formas (Bothwell & Griffin, 2011):

- A. Aumentando la intensidad del campo magnético: la diferencia de energía entre los dos estados es proporcional a la intensidad del campo magnético.
- B. Aumentando el tiempo de adquisición de los experimentos: la intensidad de la señal (S) aumenta repitiendo la medida (n acumulaciones).
- C. Minimizando la señal del disolvente: la reducción de la señal del agua se consigue irradiándola de forma continuada, para que los ^1H del agua no contribuyan a la magnetización.
- D. Reduciendo la temperatura: la diferencia de energía entre los estados de alta y baja energía de los espines aumenta y con esto la relación S/R.
- E. Utilizando volúmenes de muestras pequeños: se consiguen campos magnéticos más homogéneos, lo que mejora la resolución de las señales.

- Frecuencia o desplazamiento químico (δ):

La posición de una señal (desplazamiento químico) o la frecuencia (ν) de resonancia de un núcleo depende no sólo de campo magnético (B_0), sino también de su entorno químico (**Figura 11**). Por tanto, el entorno magnético de un núcleo está influido por los ^1H vecinos. El desplazamiento químico se expresa en partes por millón (ppm), utilizando el símbolo (δ) y se define como:

$$\delta \text{ (ppm)} = \frac{\nu_{\text{muestra}} - \nu_{\text{referencia}}}{\nu_{\text{referencia}}} \times 10^6$$

El desplazamiento químico en ppm, por tanto, es el mismo independientemente de la intensidad del campo magnético aplicado.

I. Introducción

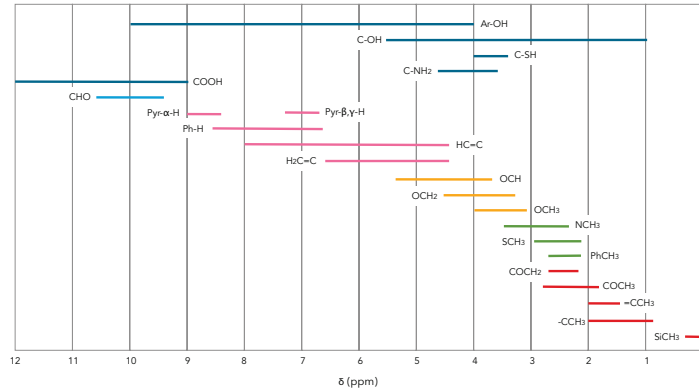


Figura 11: Rangos de los desplazamientos químicos de un espectro de protón (¹H)

- Tiempo de relajación

La relajación de los espines, tras la excitación por el pulso de RF (90°), varía entre 100 y 1000 ms. Esta señal de relajación es medida como un decaimiento de la intensidad de la señal (FID) y determina la anchura de la señal.

- Acoplamiento espín-espín

También conocido como acoplamiento indirecto. Este fenómeno provoca el desdoblamiento de las señales como consecuencia de la interacción magnética que existe entre ¹H de carbonos vecinos y la anchura se mide en Hz. La multiplicidad o número de picos de cada señal, sigue la regla $n+1$, siendo n el número de ¹H contiguos (Figura 12).

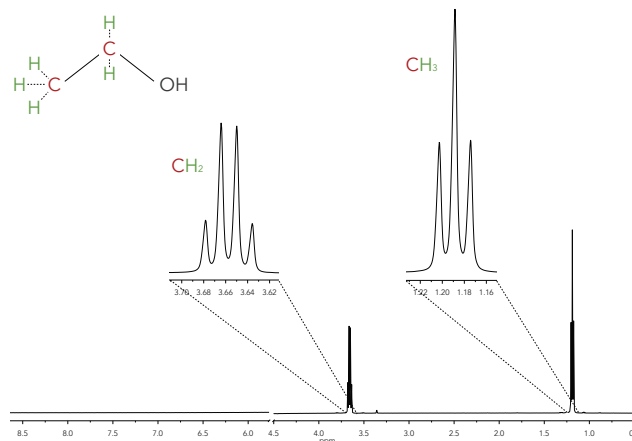


Figura 12: Espectro de RMN de la molécula de etanol (CH₃CH₂OH). Triplete: señal correspondiente al CH₃; cuatriplete: señal correspondiente al CH₂

4.3 Adquisición de los espectros

- Calibración de la temperatura

La calibración de la temperatura se realiza con una muestra de referencia. El tipo de muestra depende del rango de temperaturas a calibrar.

- Optimización de los parámetros adquisición

Para garantizar una adquisición óptima de los experimentos se requiere el ajuste y calibrado de determinados elementos del espectrómetro:

- Sintonía de la sonda (*wobb*): mediante el ajuste de los circuitos de la sonda se busca la frecuencia a la que ésta es más sensible.
- Estabilidad del campo magnético (*lock*): garantiza que la intensidad del campo magnético se mantenga constante durante todo el experimento.
- Homogeneidad del campo magnético (*shimming*): se realizan pequeños ajustes para aumentar la uniformidad del campo magnético y conseguir una mejor resolución espectral.
- Sistema de recepción de la señal: se ajusta la ganancia del receptor (RG) en función del tipo de muestra para optimizar la amplificación de la señal recibida.
- Parámetros del experimento: son específicos de cada tipo de experimento y se adecúan en función del tipo de muestra y la información que se quiera obtener (Tabla 3).

Tabla 3: Parámetros de adquisición de los experimentos ¹H-RMN

Parámetro	Descripción
TD (<i>Time Domain</i>)	Nº de puntos digitalizados para la adquisición de la FID. Normalmente: 16, 32 o 64K. A mayor TD, aumenta la resolución de la FID, pero a expensas del tiempo de adquisición
NS (Nº de Scans)	Nº de acumulaciones. A mayor número de adquisiciones mejora la relación señal/ruido
DS (Nº de Dummy Scans)	Tiempo necesario para que la muestra alcance el equilibrio. No se adquieren datos. Valores típicos 4 u 8
SW (Anchura Espectral)	Anchura de la ventana espectral. Normalmente 20 ppm son suficientes para capturar cualquier señal del ¹ H
P1 (µs) (Pulso 1)	Pulso de excitación de 90°. Su valor va a depender de la concentración de sales de la muestras. Pulsos demasiado largos pueden causar el calentamiento de la sonda
PL (dB) Nivel de potencia	Potencia del pulso de excitación

4.4 Asignación de las señales del espectro

La identificación de las señales de RMN es una de las partes más complicadas de estos estudios. La asignación de los picos del espectro se fundamenta, generalmente, en la posición de las señales (δ), su multiplicidad e intensidad relativa. La dificultad en la identificación de los compuestos deriva del solapamiento de las señales como consecuencia de la proximidad entre los desplazamientos químicos de las múltiples moléculas presentes en los espectros.

La asignación de los metabolitos puede ser confirmada utilizando varias estrategias. Una de las más utilizadas es la comparación con patrones de compuestos seleccionados cuyos espectros han sido adquiridos en las mismas condiciones experimentales (espectrómetro, pH, temperatura, etc.). Cuando no se tiene información previa, la estrategia más eficiente es la adquisición de experimentos bidimensionales (2D) homonucleares ^1H - ^1H TOCSY o heteronucleares ^1H - ^{13}C HSQC (Beckonert *et al.*, 2007). Estos experimentos requieren mayores tiempos de adquisición que los monodimensionales (1D), aumentan la resolución de las señales y muestran la conectividad entre ellas, es decir, permiten conocer qué señales pertenecen al mismo compuesto y facilitan la caracterización de su estructura molecular. La información proporcionada por los patrones y los experimentos 2D se complementa con la bibliografía disponible (Diaz *et al.*, 2013; Lindon *et al.*, 2010; Nicholson *et al.*, 1995; Salek *et al.*, 2007) y las bases de datos públicas, como HMDB (*Human Metabolome Data Base*) (Wishart *et al.*, 2013) y BRMB (*Biological Magnetic Resonance Bank*) (Ulrich *et al.*, 2008).

5. ETAPAS DE UN ESTUDIO METABOLÓMICO POR RMN

El esquema general de trabajo de un estudio metabolómico se divide en las siguientes etapas (Figura 13):

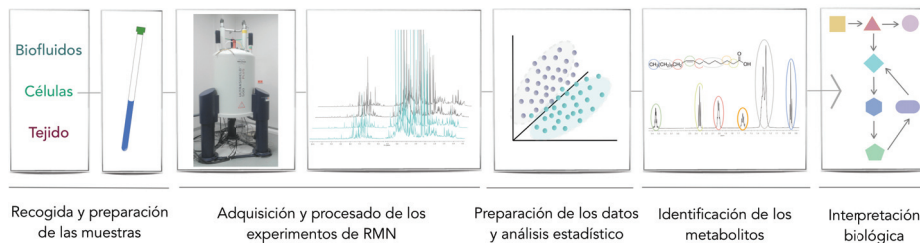


Figura 13: Esquema de trabajo de un estudio metabolómico por RMN

5.1 Diseño experimental

El diseño del estudio (selección de los casos/controles, tipo de muestra biológica, tamaño muestral, plataforma analítica, etc.) es clave para llevar a cabo un estudio metabólico. El diseño ha de adaptarse al problema biológico y al/los objetivo/s del estudio. En los estudios caso-control, los factores que contribuyen a la condición médica a estudio son evaluados por comparación con individuos que no presentan dicha condición (controles) pero que presentan características epidemiológicas similares.

En el caso de la endometriosis, una enfermedad multifactorial, en la que está implicado un tejido dinámico que responde a ciclos hormonales, hace que el diseño sea particularmente importante. Algunos de los aspectos a tener en cuenta son:

- A. **Estandarización de los protocolos:** necesario en todas las fases del estudio (recogida de muestras, procesamiento, transporte, almacenamiento y adquisición de los experimento) para garantizar la reproducibilidad en cada etapa y reducir la variabilidad no asociada al problema de interés.
- B. **Selección de los individuos (casos-controles):** se requiere una descripción precisa de los criterios de inclusión/exclusión, tanto de los casos como de los controles. Esto contribuirá a que los resultados entre los distintos estudios sean comparables permitiendo, además, su generalización y reproducibilidad (Wu *et al.*, 2013). Una de las limitaciones en los estudios de endometriosis es la inexactitud en la definición del fenotipo de las pacientes, problemática que se traslada también a la correcta selección de los controles. La gran variabilidad e inespecificidad de sus síntomas, los distintos subtipos anatómicos, la dependencia hormonal con el ciclo menstrual y la influencia de los tratamiento en la evolución de la enfermedad, puede conducir a la heterogeneidad intra-grupal provocando errores de clasificación y reducción en la sensibilidad y especificidad de los resultados.
- C. **Tamaño muestral:** el número de individuos incluidos en el estudio define la potencia estadística del estudio. En este caso, dada la necesidad de la confirmación visual de la presencia/ausencia de endometriosis mediante laparoscopia, el reclutamiento de controles sin ninguna patología asociada constituye uno de los mayores factores limitantes con respecto al tamaño muestral.

D. **Tipo de muestra biológica:** la elección dependerá de las características del problema biológico, disponibilidad y accesibilidad a las muestras y objetivo del estudio.

E. **Recopilación de información clínica:** implica la recogida de toda la información clínica relevante relacionada con los individuos incluidos en el estudio (edad, sexo, IMC, enfermedades, tratamiento, etc.) para su posterior análisis como potenciales factores de confusión.

5.2 Recogida y procesado de las muestras

Uno de los objetivos principales es inhibir la actividad metabólica de las muestras para preservar la información original en el momento exacto de su recogida. La estandarización de esta etapa garantiza su reproducibilidad, disminuye la variabilidad entre muestras y reduce el riesgo de contaminación.

En los estudios de metabolómica por RMN se analizan una gran variedad de muestras biológicas, entre los que se incluyen biofluidos, distintos tipos de líneas celulares, medios de cultivo y tejidos. Las muestras más utilizadas son el suero/plasma y la orina por su escasa o nula invasividad, aunque en función del problema biológico y el objetivo del estudio pueden emplearse otro tipo de muestras. Además, los protocolos de procesado y preparación de muestras han de adecuarse a las propiedades físico-químicas y a la composición de la matriz seleccionada para extraer el tipo de información que se desea analizar en cada caso.

Las muestras biológicas más utilizadas en los estudio de endometriosis han sido el tejido endometrial eutópico y ectópico, suero/plasma y orina. Aunque las muestras de endometrio podrían ser las más adecuadas para observar el reflejo de la enfermedad, no cabe duda que la mayor parte de la investigación, dirigida a la búsqueda de biomarcadores de diagnóstico, se centra en el análisis de biofluidos (sangre y orina) no invasivos y de fácil acceso para su posterior traslación como test de diagnóstico a la práctica clínica.

5.2.1 Orina

La orina representa un biofluido de elección cuando se trata de obtener muestras de forma no invasiva. Desde el punto de vista analítico requiere un menor pre-tratamiento que otros biofluidos por su menor complejidad en

cuanto al contenido proteico e interacción molecular, ventajas que la hacen especialmente adecuada para estudios metabolómicos.

La recogida se realiza directamente en un recipiente estéril y se añade un agente antimicrobiano para evitar el riesgo de contaminación. Se recomienda mantener en frío para mejorar la preservación de la muestras y minimizar su degradación.

5.2.2 Plasma

El plasma sanguíneo es el biofluido tradicionalmente utilizado en la búsqueda de biomarcadores. Se caracteriza por presentar un amplio rango de macromoléculas y, en este caso, el componente microbiano tiene menos importancia. En contraposición a lo que sucede en orina, los efectos de la degradación enzimática son más pronunciados y la manipulación de la muestra en frío adquiere una mayor importancia (Dunn *et al.*, 2011).

Durante la recogida de las muestras, el tiempo de coagulación, la temperatura de recogida, el tipo de tubo, la presencia/ausencia de agentes anticoagulantes, las condiciones de centrifugado (tiempo y velocidad), y el transporte y almacenamiento han de estar estandarizados y ser reproducibles durante todo el estudio. La elección del anticoagulante ha de realizarse teniendo en cuenta las posibles señales que puedan aparecer en los espectros de RMN y la posible oxidación de la muestra. Entre los diferentes tipos de anticoagulantes (EDTA, heparina, citrato), la heparina es el más utilizado en los estudios de metabolómica por RMN, por su escasa interferencia con la muestra (Beckonert *et al.*, 2007).

5.2.3 Tejido

La caracterización del perfil metabolómico de las muestras de tejido proporciona una potente herramienta para entender el metabolismo local y cómo las rutas bioquímicas podrían estar influenciadas por un determinado fenotipo, patología o estímulo externo. Este enfoque se considera, en la mayoría de los casos, una aproximación complementaria al análisis de los biofluidos, que permite confirmar y contextualizar las alteraciones metabólicas observadas en orina, plasma, etc.

Se requieren a partir de 30 mg de tejido. Es importante mantener el tejido descongelado el menor tiempo posible para evitar la actividad enzimática y la

degradación de la muestra. Es necesario eliminar la sangre que pueda contener el tejido mediante repetidos lavados (Dunn *et al.*, 2011). La manipulación y procesado de las muestras previo al almacenamiento ha de ser rápida.

5.3 Preparación de las muestras para RMN

El análisis de las muestras mediante RMN no requiere generalmente ningún pre-tratamiento, simplemente la adición de un disolvente (agua deuterada) o tampón, para minimizar las variaciones en los desplazamientos químicos en determinadas señales susceptibles a los cambios de pH, y un compuesto de referencia, normalmente 3-trimetilsilil propionato (TSP) (Beckonert *et al.*, 2007).

En los casos en los que el volumen de muestra es limitado y la concentración de metabolitos no muy elevada (p.ej., líquido amniótico o líquido cerebroespinal), las muestras pueden ser liofilizadas y reconstituidas posteriormente en el solvente correspondiente, siempre y cuando no se produzca pérdida de información por degradación o volatilización de metabolitos inestables (Lindon *et al.*, 2007). Las extracciones celulares o tisulares se realizan, habitualmente, utilizando disolventes orgánicos y agua obteniéndose dos fases: la fase acuosa, que contiene los metabolitos polares y la fase orgánica con los metabolitos apolares (p.ej., lípidos).

5.4 Adquisición de los espectros de RMN

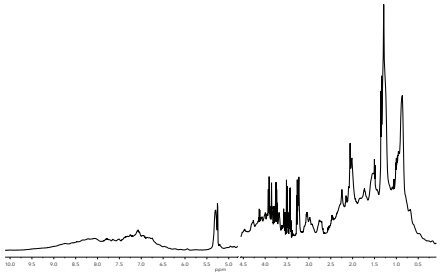
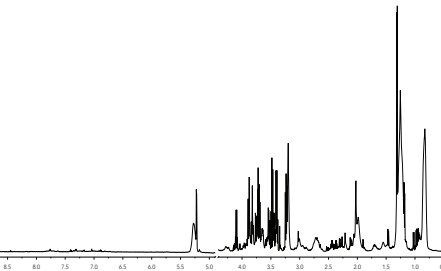

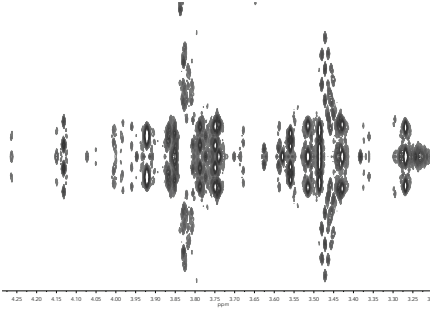
El tipo de experimento de RMN y las condiciones de adquisición están condicionadas por el tipo de muestra a analizar y la información que se quiere obtener.

5.4.1 Experimentos 1D

Los experimentos ^1H -RMN detectan todas las moléculas que contengan algún átomo de hidrógeno en su estructura. Uno de los principales obstáculos en la adquisición de los experimentos es la supresión del agua (disolvente). Se han desarrollado secuencias de pulsos específicas para reducir su contribución al espectro, así como para seleccionar el tipo de metabolitos que se desea observar en función de su peso molecular.

Las secuencias de pulsos más utilizadas en metabolómica son las siguientes (Tabla 4):

Tabla 4: Conjunto de experimentos ¹H-RMN empleados en los estudios metabolómicos

Secuencia de pulsos	Espectro de RMN
<p>NOESY (<i>Nuclear overhauser enhancement spectroscopy</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Detecta compuestos de alto y bajo peso molecular, dando lugar a espectros, generalmente complejos. - Proporciona una buena supresión del disolvente, obteniéndose espectros de alta calidad, adecuados para la cuantificación. 	
<p>CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Atenúa las señales anchas procedentes de moléculas de alto peso molecular (proteínas y lípidos) obteniéndose espectros simplificados con una mejor resolución de los metabolitos de bajo peso molecular. - Adecuados para muestras de suero/plasma, por su elevado contenido en proteínas y lipoproteínas. 	
<p>DIFUSIÓN</p> <ul style="list-style-type: none"> - Favorece la observación de las moléculas de mayor tamaño, suprimiendo las señales procedentes de moléculas pequeñas. - Experimento recomendable para muestras de plasma/suero por su contenido lipídico. - No ofrece información adicional en biofluidos como la orina, constituida mayoritariamente por moléculas pequeñas, donde las diferencias de difusión no son apreciables. 	
<p>J-RESUELTO</p> <ul style="list-style-type: none"> - Se trata de un experimento 2D homonuclear, que proporciona información sobre las constantes de acoplamiento (J), aumenta la resolución de las señales, reduce el solapamiento y facilita la asignación. - Al tratarse de un experimento 2D, la interpretación del espectro es más compleja. - No adecuado con fines cuantitativos. 	

(Gowda et al., 2008)

5.4.2 Experimentos 2D

Los experimentos 2D se realizan sobre un reducido número de muestras seleccionadas debido a que se requiere un tiempo de adquisición sensiblemente superior al de los experimentos 1D. Como se ha señalado anteriormente, se emplean, fundamentalmente, para la identificación de metabolitos, pues permiten aumentar la resolución de las señales y reducir el solapamiento presente en los experimentos 1D.

5.5 Pre-procesado de los espectros

Una vez adquiridos los espectros de RMN y previamente al análisis de los datos, los espectros han de ser pre-procesados, con el objetivo de reducir las variaciones no deseadas que puedan interferir en el posterior análisis de los datos (Lindon *et al.*, 2007). El pre-procesado incluye: a) la corrección de la fase y la línea base, para eliminar las posibles distorsiones que puedan afectar a la identificación y cuantificación de las señales y b) la calibración de los espectros, con respecto a un patrón interno (p. ej., TMS, DSS, TSP, etc.) que se añade a la muestra o bien utilizando un compuesto presente en la muestra (glucosa o alanina) para corregir las diferencias asociadas a la variabilidad intrínseca entre las muestras (diferencias de pH, concentración salina, etc.). Se trata de un método manual o semi-automático que realiza una corrección global del alineamiento entre los espectros.

5.6 Procesado de los datos

Segmentación de los espectros ("Bucketing"). Es una forma simple y automática de reducir e integrar la información contenida en los espectros. Consiste en subdividir los espectros en pequeñas regiones llamadas "*buckets*". Generalmente, se emplea una **anchura de bucket constante**, típicamente 0.04 ppm, aunque dependerá de las características de las señales del biofluido a estudiar. En determinadas etapas del análisis, para la integración de los espectros se utilizan *buckets* con **anchura variable** donde el tamaño del *bucket* se ajusta a la anchura de la señal que se desea analizar para evitar que un mismo pico esté contribuyendo a dos *buckets* diferentes. En este último caso, idealmente, las señales incluidas en un mismo *bucket* pertenecen a un mismo metabolito y su integración, en cierto modo, representa la concentración del metabolito en la muestra (**Figura 14**). En la mayoría de los estudios se combinan ambas estrategias de *bucketing*.

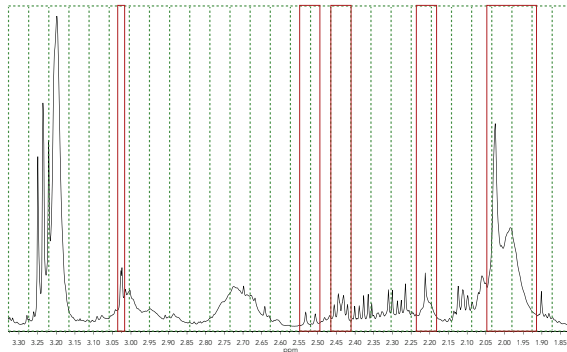


Figura 14: Métodos de "bucketing". En verde se muestra un procedimiento de bucketing de anchura constante. En rojo se observa la distribución de buckets obtenida empleando un método de bucketing de anchura variable, donde los límites de cada bucket definen una región correspondiente a un metabolito concreto

Al mismo tiempo que se define el tipo de *bucketing* que se va a emplear en la integración de los espectros, se lleva a cabo la exclusión de las regiones que no formarán parte del análisis. Estas zonas corresponden a señales del espectro cuya información no es reproducible, como la señal residual del agua, o en su defecto la señal del disolvente orgánico utilizado, así como la señal de la urea (p.ej., muestras de orina), por tratarse de un metabolito no cuantificable, ya que sus ^1H se encuentran en intercambio constante con los ^1H del agua. También suelen excluirse las regiones del espectro que no contienen señales correspondientes a metabolitos (línea base).

Como resultado del *bucketing* se obtiene una matriz de datos X ($N \times K$) formada por N filas, tantas como muestras se hayan incluido en el estudio y K columnas, equivalentes a los fragmentos (*buckets*) en los que se han dividido los espectros y que constituyen las variables que definen a cada uno de los espectros (Figura 15). En esta matriz quedan excluidas las regiones previamente descritas.

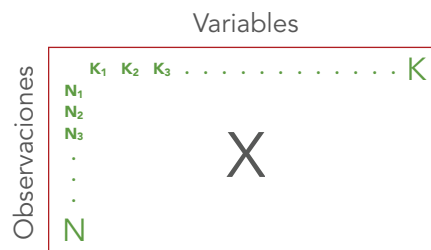


Figura 15: Matriz de Datos X ($N \times K$). N : número de muestras o espectros analizados, K : variables, definen las propiedades de cada una de las observaciones (adaptada de Eriksson, et al. 2006)

Alineamiento. La posición de las señales en el espectro (δ) es muy sensible al entorno químico de los núcleos (^1H). Su localización en el espectro se ve afectada por cambios de pH, temperatura, concentración salina, el disolvente y homogeneidad del campo (*shimming*), pudiéndose traducir en variaciones significativas en los desplazamientos químicos de las señales.

I. Introducción

Como se ha explicado anteriormente, durante el pre-procesado de los espectros se realiza un alineamiento global, calibrando los espectros con respecto a una señal de referencia. Dado que no todas las señales se ven afectadas de la misma manera, ni fluctúan o se desplazan en el mismo sentido, se han desarrollado distintos algoritmos que corrigen las pequeñas variaciones en la posición de los picos que puedan existir entre las muestras y conseguir un alineamiento óptimo. Estos algoritmos se pueden aplicar a todo el espectro o sólo a determinadas regiones de interés:

- Alineamiento global

Implica el alineamiento de toda la ventana espectral. Para ello, algunos de los algoritmos se basan en la selección de un espectro de referencia a partir del cual se alinean el resto de los espectros (Vu & Laukens, 2013). El espectro de referencia puede ser virtual (generado de forma artificial) o seleccionado entre el conjunto de los espectros.

- Alineamiento por regiones

Este método permite alinear regiones aisladas del espectro tomando como referencia un espectro representativo. El alineamiento de las regiones seleccionadas se lleva a cabo sin modificar la posición del resto de las señales del espectro.

Esta etapa del procesado es especialmente crítica debido a la complejidad de las muestras biológicas humanas (heterogeneidad en la composición, variabilidad en la dilución entre muestras, etc.). Pese a la robustez de los algoritmos empleados, se requiere el seguimiento del proceso y comprobación del resultado del alineamiento para detectar posibles errores y/o la introducción de artefactos.

Normalización. Tiene como objetivo compensar las diferencias de concentración entre las muestras, necesario en casos como la orina o en biofluidos en los que es difícil cuantificar el volumen de muestras analizadas (fluido cervico-vaginal, extractos de tejido, etc.) y menos crítico en las muestras de suero/plasma por tratarse de fluidos homeostáticos. Es uno de los pasos más importantes del procesado de datos, pues en estos estudios se pretende identificar cambios metabólicos relativos como consecuencia de una determinada condición independientemente del estado de dilución de la muestra. A menudo, las diferencias entre los grupos son pequeñas y sólo se hacen visibles tras una adecuada normalización (Dieterle *et al.*, 2006). Existen distintos métodos de normalización:

- Normalización integral

Es la normalización más utilizada. Asume que la concentración de cada uno de los metabolitos es función de la concentración global de la muestra y divide la intensidad de cada señal o región del espectro (*bucket*) entre la intensidad total del espectro (área total) (Webb-Robertson *et al.*, 2005).

- Normalización con cociente probabilístico (PQN)

Este método asume que las concentraciones individuales de un metabolito concreto sólo influye en parte del espectro, mientras que las variaciones en la concentración global de las muestras afectan a todo el espectro. Esta normalización emplea un factor de dilución específico para cada espectro que se calcula dividiendo el valor de cada una de las regiones del espectro (señal, *bucket*, etc.) con respecto a la correspondiente región en el espectro de referencia. El espectro de referencia puede ser un espectro seleccionado o bien la mediana del conjunto total de los espectros. Se trata de un método más exacto y robusto que la normalización respecto al área total (Dieterle *et al.*, 2006), especialmente recomendado para aquellas muestras que contienen señales puntuales muy intensas (metabolitos endógenos, fármacos, contaminación, etc.). En estos casos, la normalización integral influye negativamente en el posterior análisis estadístico.

Deconvolución. La detección y cuantificación de ciertos metabolitos se complica por la multiplicidad y el solapamiento de las señales. El objetivo de la deconvolución es dar solución a las dificultades asociadas al solapamiento y extraer la información contenida en los espectros superando la superposición de los picos y aumentando su resolución. Con este método se consigue reducir la dependencia de las señales tanto con la línea base como con el ruido, para así poder analizarlas de forma aislada. Para ello, se han desarrollado algoritmos que descomponen los espectros de forma automática y resuelven el problema del solapamiento de señales (Cobas *et al.*, 2008).

Los espectros sintéticos, derivados de la deconvolución de los espectros originales, poseen la misma información pero con una mayor resolución y, por tanto, un menor solapamiento entre las señales (**Figura 16**). La elección del nivel de resolución en estos espectros sintéticos es crítica, ha de ser un compromiso entre una buena resolución de los picos, que garantice su integración de forma aislada, y una separación excesiva que dificulte la localización de las señales en el espectro y su asignación.

I. Introducción

Este procedimiento es especialmente útil en los espectros de suero/plasma donde la abundancia de señales anchas (lípidos y lipoproteínas) acentúa el solapamiento de las señales y la dependencia de éstas con la línea base. La deconvolución en estas muestras consigue una mejora significativa de la resolución de los picos.

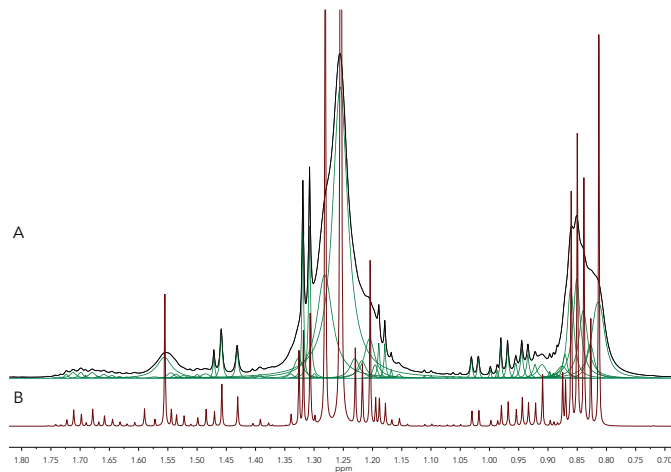


Figura 16: Deconvolución de un espectro de plasma. A) espectro original (negro), las trazas en verde representan el conjunto de picos obtenidos tras la deconvolución del espectro original; B) espectro sintético generado a partir del espectro original deconvolucionado aumentando la resolución de los picos

5.7 Asignación de los espectros

La identificación de los metabolitos presentes en los espectros se realiza teniendo en cuenta la localización (δ) y la multiplicidad de las señales. Como se ha indicado anteriormente, para la correcta caracterización de los compuestos, se combina la información proporcionada por los experimentos de RMN (1D, 2D), patrones de metabolitos seleccionados, bases de datos públicas (HMDB, BMRB, etc.), así como la bibliografía disponible sobre la composición química de la muestra biológica de interés.

5.8 Análisis estadístico de los datos

La complejidad de los datos metabolómicos requiere el uso de herramientas estadísticas y bioinformáticas específicas capaces de extraer la información biológicamente relevante a partir de los experimentos adquiridos. La forma más eficiente es la utilización de la quimiometría que engloba técnicas de

reconocimiento de patrones reduciendo la dimensionalidad (complejidad) de los datos y el análisis multivariante (Davis et al., 2011). Estas técnicas permiten:

1. Evaluar la homogeneidad de los datos en términos de *outliers*, subgrupos y tendencias.
2. Visualizar diferencias y relaciones entre muestras y variables.
3. Determinar si existen diferencias entre los grupos.
4. Identificar qué variables metabólicas están asociadas al problema biológico y cómo influyen en éste.
5. Caracterizar los metabolitos asociados a este efecto.

Antes de llevar a cabo la modelización de los datos y el posterior análisis estadístico multivariante se requiere el pre-tratamiento de los datos. Las variables (K) presentan distintos rangos de magnitud, las variables con mayores magnitudes tienen varianzas mayores y viceversa. Por tanto, para que las regiones del espectro con distinto rango de intensidad sean comparables entre sí y contribuyan de la misma manera al modelo, las diferencias entre ambos tipos de variables han de ser estandarizadas o escaladas (Eriksson et al., 2006b). A diferencia de la **normalización**, que se realiza a nivel de muestras o espectros, el **escalado** se realiza a nivel de variables (*buckets* o regiones del espectro). El escalado implica dividir cada variable entre una función relacionada con la desviación estándar. Los dos tipos más utilizados son (Stenlund, 2011):

- **Varianza unitaria (UV)**: se divide cada variable entre su desviación estándar, implica que a todas las variables se les da exactamente la misma importancia. El inconveniente de este método es que se le da el mismo peso a las variables informativas que a las no informativas (ruido), lo que puede introducir la variabilidad no deseada en el análisis.
- **Pareto**: se divide cada variable entre la raíz cuadrada de su desviación estándar. Con este método se reducen las diferencias entre las variables más grandes y más pequeñas manteniéndose la estructura original de los datos. Este escalado es sensible a las variaciones grandes.

Con ambos métodos se consigue la normalización entre variables, pero cada uno de ellos tiene un efecto diferente sobre el conjunto de los datos. Cuando no se dispone de información previa sobre el tipo de señales relevantes en la discriminación entre los grupos, se recomienda evaluar ambos tipos de escalado y seleccionar aquel método que permita visualizar mejor las diferencias entre los grupos de estudio.

5.8.1 Análisis estadístico multivariante

Este tipo de modelización matemática estudia varias variables simultáneamente y se utiliza tanto para evaluar como para predecir la relación entre observaciones y variables. Los datos son analizados con el objetivo de predecir una respuesta con la mayor precisión posible. Se distinguen dos tipos de aproximaciones:

1. Reconocimiento de patrones: análisis no supervisado

El análisis de componentes principales (PCA) es un método matemático de reducción de variables que pretende simplificar la variabilidad contenida en la matriz de datos X . Este método permite identificar tendencias o patrones en los datos, tales como subgrupos o *outliers*, representarlos gráficamente y observar cómo se distribuyen las muestras en función de la similitudes o diferencias de sus espectros.

En este análisis, dadas N observaciones y K variables, donde $K \gg N$, los datos originales se transforman en una combinación lineal de variables no correlacionadas entre sí (no redundantes) denominadas componentes principales (PCs). No todos los PCs contienen la misma información. Las nuevas variables se van construyendo según el orden de importancia en cuanto a la variabilidad de información que recogen del conjunto de muestras. Con esto se consigue reducir la dimensionalidad de los datos, facilitando su interpretación. Habitualmente, este análisis se realiza por grupos (p.ej., casos vs controles) y se conservan sólo aquellos componentes que recogen la mayor parte de la variabilidad (Marín, 2011).

- Interpretación PCA:

Las coordenadas de las muestras en el espacio se denominan *scores* (T) y las nuevas variables (combinación lineal de las originales) *loadings* (P) (Wehrens, 2011). De esta manera:

- El **Score plot**: contienen la información sobre las filas (muestras) de la matriz original (X), donde cada punto corresponde a una observación, y resume la relación existente entre ellas.
- El **Loading plot**: contiene la información sobre las columnas (variables). En este caso, cada punto representa una de las regiones del espectro y su distribución explica la relación existente entre ellas.

El *loading plot* permite interpretar la distribución espacial de las muestras en el *score plot* e identificar las variables responsables de los patrones observados.

Ambos gráficos son complementarios y superponibles, lo que significa que la posición de las muestras en el *score plot* está determinada por las variables situadas en la misma posición en el *loading plot* (Eriksson et al., 2006b).

- **Identificación de *outliers***

El PCA, además, permite identificar los *outliers*. Conceptualmente, son observaciones que no se ajustan al modelo de PCs. Estos pueden ser extremos o moderados:

- ***Outliers* extremos:** son muestras con valores atípicos situadas fuera del intervalo de confianza del 95%. Es posible identificarlos en el *score plot* con la ayuda del gráfico T^2 de Hotelling. Éste último es la generalización multivariante del test de la t-Student y permite identificar las muestras que cumplen la normalidad multivariante.
- ***Outliers* moderados:** son muestras que no se ajustan al modelo en términos de residuos, aparecen situados fuera del límite crítico del 0.05 representado en el gráfico DmodX (*distance to the model in the X-data*) (Eriksson et al., 2006b).

2. Análisis discriminante: análisis supervisado

El análisis discriminante, también conocido como reconocimiento supervisado de patrones, tiene por objeto proporcionar un modelo que discrimine entre dos clases con capacidad de predicción (Wehrens, 2011). Es decir, se persigue construir una regla de decisión que clasifique una observación nueva a uno de los grupos definidos con un cierto riesgo asociado. Se puede considerar un análisis de regresión donde la variable dependiente es categórica (p.ej., 0, control; 1, caso) y las variables independientes son continuas (intensidad de las señales espectrales). Con este análisis se pretenden encontrar las relaciones lineales entre las variables continuas que mejor discriminen los grupos de estudio (Marín, 2011).

Los algoritmos utilizados en este tipo de análisis son (Eriksson et al., 2006b):

- **PLS-DA (*Partial Least Squares-Discriminant Analysis*):** el objetivo es encontrar un modelo que separe en dos clases las observaciones en función de sus K -variables. Este método permite minimizar la posible variabilidad existente dentro de cada grupo y mejorar, por tanto, la separación entre los grupos objeto de estudio. La construcción del modelo se realiza a partir de un conjunto de muestras de las que se conoce previamente a qué clase pertenecen (caso-control).

- **OPLS-DA** (*Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis*): es una modificación del modelo PLS-DA basada en una mejor visualización e interpretación de los datos. Esta implementación se consigue separando en dos partes la variación observada, la relacionada linealmente con Y (variable de interés), denominada predictiva, y la no relacionada con Y, la ortogonal (Figura 17). Este modelo es análogo al PLS-DA, pero concentra toda la información discriminante en el primer componente (predictivo).

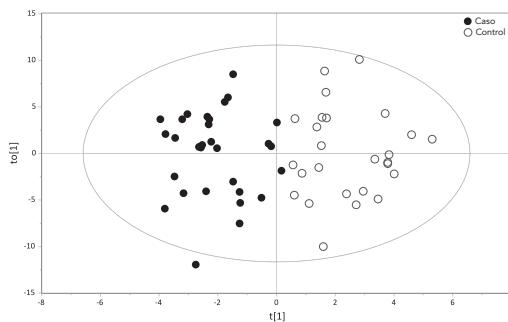


Figura 17: Representación de un modelo OPLS-DA. El primer componente (eje X) contiene la información predictiva o directamente relacionada con la variable respuesta (p.ej., caso-control) y la información no relacionada con la respuesta aparece en el componente ortogonal (eje Y)

El número de componentes de los modelos PLS-DA/OPLS-DA se selecciona utilizando el criterio de la validación cruzada interna (Eriksson et al., 2006a). Los datos se dividen en un número determinado de sub-grupos (normalmente 7) de forma aleatoria y se construye el modelo excluyendo cada vez uno de los subgrupos y utilizándolo posteriormente como test de validación. En base a este procedimiento se calculan los valores de R^2Y y Q^2 , parámetros que definen al modelo discriminante. R^2Y es una medida cuantitativa de la bondad de ajuste del modelo y Q^2 representa la capacidad de predicción del modelo tras las 7 rondas de validación cruzada. Ambos valores oscilan entre 0 y 1, el valor de R^2Y es siempre superior al de Q^2 . La calidad de los modelos es directamente proporcional a los valores de R^2Y y de Q^2 . En los estudios metabólicos se considera que un modelo discriminante es de buena calidad cuando $Q^2 > 0.5$ y la diferencia entre ambos parámetros no es superior a 0.2 – 0.3 (Eriksson et al., 2006b). Estos modelos, además, proporciona un listado con las K -variables empleadas en el modelo y su correspondiente valor de **VIP** (*Variable Important in the Projection*). Se considera que los descriptores con valores superiores de VIP ($VIP > 1$), son los que contribuyen en mayor medida a las discriminación entre los grupos de estudio.

Uno de los problemas habituales en el análisis multivariante (PLS-DA, OPLS-DA) es el sobreajuste (*overfitting*) (Saccenti et al., 2013). En los modelos con sobreajuste, el sistema encuentra una combinación de variables capaces de discriminar los grupos de estudio, pero no es generalizable a un conjunto

externo de muestras. Este “problema de dimensionalidad” (Vinaixa *et al.*, 2012) es común en los estudios metabolómicos, ya que con frecuencia el número de variables es significativamente superior al número de observaciones y parte de estas variables son redundantes e irrelevantes. En estos casos se utiliza la selección de variables como estrategia para eliminar o reducir este sobreajuste.

La **selección de variables** se ha descrito como una importante herramienta en la búsqueda de biomarcadores (Hendriks *et al.*, 2011). El objetivo es reducir el número de variables independientes (*buckets*), seleccionando únicamente aquellas que contribuyen de forma significativa a la discriminación entre los grupos y excluyendo las variables redundantes y no informativas (Quintás *et al.*, 2011). Con esta estrategia se pretende, además, incrementar la capacidad de predicción de los modelos y mejorar su interpretación. Se puede llevar a cabo siguiendo diferentes estrategias basadas en la información proporcionada por los propios modelos multivariantes (VIPs, coeficientes de regresión, etc.) (Diaz *et al.*, 2013).

Finalmente, dada la complejidad de los métodos supervisados de clasificación, es necesaria la validación de los mismos para evaluar la calidad y fiabilidad de los resultados obtenidos. Uno de los métodos de validación empleados es el **test de permutación** que permite determinar si la clasificación de las muestras en sus correspondientes grupos es significativamente mejor que cualquier otra clasificación arbitraria realizada de forma aleatoria. Para ello, la clase (caso/control) de cada una de las muestras se permuta aleatoriamente y se construye el correspondiente modelo PLS-DA y este proceso se repite n veces. Se espera que los valores permutados de bondad de ajuste (R^2Y) y capacidad de predicción (Q^2) de los modelos generados de forma aleatoria sean significativamente inferiores a los del modelo real. La validación del modelo se considera correcta cuando los valores permutados de R^2Y y Q^2 no sean superiores a 0.3–0.4 y 0.05, respectivamente (Eriksson *et al.*, 2006b). Por otro lado, este test de permutación permite, además, identificar fácilmente cuando un modelo está sobreajustado, presentado una tendencia como la observada en la **Figura 18**, donde el valor permutado de R^2Y es prácticamente igual al valor del modelo original.

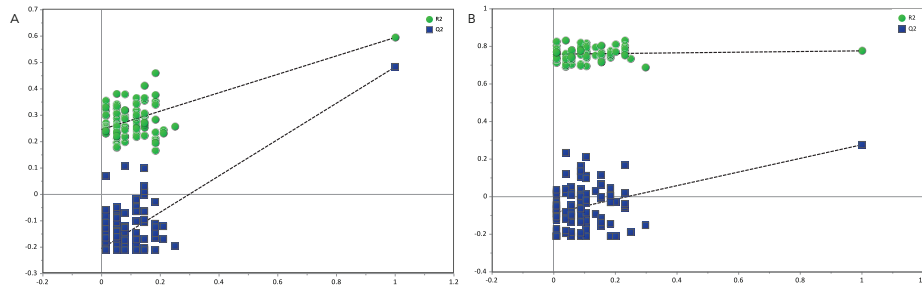


Figura 18: Test de permutación. A) test de permutación procedente de un modelo multivariante de buena calidad donde la clasificación de las muestras en las clases es significativamente mejor que cualquier otra clasificación de las mismas muestras al azar; B) test de permutación procedente de un modelo con sobreajuste donde el valor de R^2Y no se ajusta a los valores recomendados. En ambos casos, se realizaron 100 permutaciones

5.8.2 Análisis estadístico univariante

Empleados para identificar diferencias significativas en una determinada variable entre dos grupos. Generalmente, se postula una hipótesis nula (H_0) que establece que no existen diferencias entre los dos grupos y se define una frontera de decisión, denominada nivel de significación (α), para determinar si los datos son compatibles con la H_0 . Si el p -valor calculado se encuentra por debajo del valor límite establecido (p.ej., $\alpha=0.05$), se rechaza la hipótesis nula y se asume que existen diferencias significativas entre ambos grupos para esa variable concreta. La elección de un método paramétrico ó no paramétrico, basado en el cálculo de rangos, depende del tamaño muestral y de si los datos cumplen los supuestos de normalidad, homogeneidad de varianzas e independencia. Cuando se dispone de un tamaño muestral pequeño y los datos no cumplen estos requisitos se opta por un test no paramétrico (p.ej., test de la U de Mann-Whitney). Con tamaños muestrales grandes ($n>50$) se asume que los datos se ajustan a una distribución normal y directamente se emplean métodos paramétricos.

5.9 Interpretación biológica

Una vez identificados los compuestos que difieren significativamente entre los grupos de estudio, se lleva a cabo la interpretación biológica de los resultados. En esta última etapa, se pretende integrar la información proporcionada por el perfil metabolómico y la que se dispone del problema biológico.

En primer lugar, a partir de los metabolitos identificados como relevantes se realiza una búsqueda general de las rutas metabólicas en las que participan

dicho compuestos y los posibles mecanismos de regulación que podrían estar alterados. A continuación, y de forma más concreta, se intenta buscar una explicación que justifique las alteraciones observadas en el contexto de la enfermedad o sistema biológico objeto de estudio.

En esta parte del estudio se combina tanto la información proporcionada por las bases de datos sobre la función biológica y rutas en las que participan los metabolitos, como la bibliografía disponible sobre el problema de interés o el papel que juegan de dichos compuestos en el metabolismo.

II. OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La endometriosis es una enfermedad ginecológica caracterizada por la implantación ectópica de tejido endometrial con la consiguiente respuesta inflamatoria. El desarrollo de la endometriosis ha sido asociado a alteraciones en el sistema inmune, angiogénesis y apoptosis, procesos que favorecen la supervivencia y proliferación de las lesiones.

Teniendo en cuenta que el metaboloma es un reflejo directo del fenotipo, se hipotetiza que las mujeres con endometriosis presentarán una firma metabólica característica que las diferencie de aquellas que no poseen la enfermedad. En este sentido, se propone la metabolómica por RMN como herramienta no invasiva para la identificación de alteraciones metabólicas asociadas a esta patología.

OBJETIVOS

1. Identificación de biomarcadores metabólicos no invasivos de endometriosis

- 1.1 Caracterizar metabólicamente la orina de mujeres con endometriosis y compararla con la de un grupo control.
- 1.2 Evaluar el perfil metabolómico de plasma procedente de pacientes con endometriosis para la identificación de alteraciones metabólicas en relación con la de un grupo control.
- 1.3 Profundizar en los mecanismos moleculares implicados en la aparición de la enfermedad a través del análisis de las rutas biológicas responsables de la firma metabólica de la endometriosis.

2. Caracterización metabólica de tejidos asociados a la endometriosis

- 2.1 Optimización de los protocolos de recogida y procesamiento de muestras de tejido endometrial eutópico y ectópico, así como de peritoneo sano para su análisis por RMN.
- 2.2 Comparación y análisis cualitativo de los perfiles metabólicos de los tejidos relacionados con la endometriosis en presencia y ausencia de la enfermedad.

III. METODOLOGÍA

1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El estudio incluyó una población de mujeres comprendida entre 18 y 45 años reclutadas por el Hospital Universitario La Fe (HULF) (Valencia) entre noviembre de 2009 y diciembre de 2012. El grupo de **pacientes con endometriosis** estuvo constituido por mujeres con esterilidad de origen conocido o desconocido, dismenorrea, coitalgias o cualquier otro síntoma que hiciera sospechar de la existencia de endometriosis, así como ecografías que demostraran la presencia de endometriomas. El **grupo control** incluía mujeres de la población general, con edades y características clínicas similares al grupo de pacientes, que iban a ser sometidas a una esterilización tubárica. En ambos casos se confirmó visualmente, mediante laparoscopia, la presencia o ausencia de la enfermedad.

Las mujeres con otros desórdenes ginecológicos o con historia previa de endometriosis fueron excluidas del estudio. Solamente se realizó la intervención laparoscópica a aquellas mujeres que cumplían los criterios de inclusión y exclusión definidos para este estudio (**Tabla 5**). En las pacientes con diagnóstico positivo de endometriosis, el estadio de la enfermedad fue determinado empleando el sistema de clasificación de la ASRM (American Society for Reproductive Medicine, 1997).

Tabla 5: Criterios de inclusión/exclusión de las mujeres incluidas en el estudio

	Pacientes con endometriosis	Grupo control
CRITERIOS DE INCLUSIÓN	-Nuevo diagnóstico de endometriosis por laparoscopia -Lesiones endometriósicas activas	-Ausencia de endometriosis, confirmado por laparoscopia
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	-Historia previa de endometriosis: enfermedad recurrente -Otra enfermedad ginecológica (fibromas, otros quistes ováricos, enfermedad inflamatoria pélvica, patología endocavitaria o patología oncológica) o no ginecológica -Administración de anticonceptivos u otro fármaco un mes antes de la intervención laparoscópica	

Se recopilaron, además, datos clínicos y epidemiológicos relevantes para su posterior evaluación como potenciales factores de confusión: edad, FCM, índice de masa corporal (IMC), hábitos tabáquicos, enfermedades crónicas, tratamientos, etc.

2. RECOGIDA Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

Todas las muestras biológicas (orina, plasma y tejido) analizadas en este estudio se recogieron previo consentimiento informado, y de acuerdo con los requisitos establecidos en la Declaración de Helsinki, tras la aprobación del Comité Ético del HULF. Los biofluidos se recogieron en condiciones de ayuno y previamente a la inducción anestésica. Las distintas muestras de tejido (endometrio eutópico, endometrio ectópico y peritoneo sano) se obtuvieron durante la cirugía laparoscópica. Tanto las muestras de biofluidos, como los tejidos, se procesaron y almacenaron siguiendo los protocolos descritos para estudios de metabolómica por RMN (Beckonert *et al.*, 2007).

2.1 Orina

Las muestras de orina (10 mL) se recogieron en tubos sin aditivos (BD, vacutainer, no aditive) a los que se añadió NaN_3 (azida sódica) al 0.05%. Seguidamente, las muestras fueron congeladas rápidamente en nitrógeno líquido y almacenadas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis por RMN.

2.2 Plasma

La recogida de las muestras de sangre se realizó en tubos de litio-heparina (BD vacutainer, Li-heparin) hasta completar el vacío. Tras homogeneizar suavemente, las muestras se centrifugaron a 1600 g , durante 15 min a $4\text{ }^\circ\text{C}$. El sobrenadante (1-1.5 mL) se transfirió cuidadosamente a un nuevo tubo evitando la hemólisis y la resuspensión de la fracción celular. El plasma obtenido se congeló en nitrógeno líquido y se conservó $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis por RMN.

2.3 Tejido

Se recogieron los siguientes tipos de tejido:

- Endometrio eutópico: se obtuvo mediante cánulas de aspiración endometrial (Pipelle, Gynotec).
- Endometrio ectópico: las lesiones endometriósicas se escindieron de la superficie peritoneal mediante sección en frío para evitar el daño térmico del tejido.
- Peritoneo sano: se obtuvo seccionando en frío una región sana del peritoneo, con la precaución de que no estuviese afectada por los implantes endometriósicos en el caso de las pacientes con endometriosis.

En todos los casos, las muestras fueron inmediatamente lavadas con suero salino, congeladas rápidamente en nitrógeno líquido y posteriormente almacenadas a -80 °C.

- **Extractos tisulares**

Las muestras de tejido se trituraron en un mortero manteniéndolas siempre congeladas con nitrógeno líquido. El polvo de tejido obtenido se pesó y se realizó la extracción de los metabolitos con solventes orgánicos metanol:agua:cloroformo (CH₃OH:H₂O:CHCl₃) siguiendo el protocolo recomendado (Beckonert *et al.*, 2007). Por cada 100 mg de tejido se añadieron 400 µL de CH₃OH (99.85%) y 0.85 µL de H₂O y se homogeneizó con vórtex. Se adicionaron 200 µL de CHCl₃ (99%) y se homogeneizó de nuevo con vórtex. Seguidamente, se añadieron 200 µL de CHCl₃ y 200 µL de H₂O y se volvió a homogeneizar. Finalmente, la mezcla se mantuvo en hielo durante 15 min y se centrifugó a 1000 g durante 15 min a 4 °C para separar las diferentes fases. La parte superior, que contenía la fracción de CH₃OH:H₂O con los metabolitos hidrofílicos (fase polar), se liofilizó y el *pellet* obtenido se conservó a -80 °C. La interfase con las proteínas y restos celulares se desechó. La parte inferior con la fracción de CHCl₃ y los metabolitos lipofílicos (fase no-polar) se evaporó en speed-vac a temperatura ambiente y el *pellet* se almacenó a -80 °C.

3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA RMN

De acuerdo con los protocolos desarrollados para este tipo de estudios (Dona *et al.*, 2014) las muestras se prepararon de la siguiente manera:

3.1 Orina

Las muestras de orina se descongelaron a temperatura ambiente y tras homogeneizarlas suavemente, 700 µL del volumen total se centrifugaron a temperatura ambiente durante 10 min a 6000 g. Se recogieron 540 µL del sobrenadante y se añadieron 60 µL de una solución tampón pH 7,4 (1.5 M KH₂PO₄, 0.1% TSP, 0.05% NaN₃) preparada en 100% D₂O (agua deuterada). Finalmente, se transfirieron 550 µL de la mezcla a un tubo de RMN de 5 mm de diámetro.

3.2 Plasma

Las muestras de plasmas se descongelaron en hielo. A continuación, a 300 µL de plasma se añadieron 300 µL de una solución tampón pH 7.4 (75 mM Na₂HPO₄, 5 mM TSP, 0.04% NaN₃) preparada en 90% H₂O y 10% D₂O.

3.3 Tejido

- **Extractos tisulares**

- Fase acuosa: se añadieron 580 μL de tampón fosfato sódico pH 7.4 (100 mM Na_2HPO_4 , 0.1 mM TSP) preparado en D_2O . Se resuspendió el *pellet* cuidadosamente y se centrifugó a 12 000 g durante 5 min a temperatura ambiente. Para su análisis por RMN, se transfirieron 550 μL del sobrenadante a un tubo de 5 mm.
- Fase orgánica: se disolvió el *pellet* en 600 μL de cloroformo deuterado (CDCl_3) que contenía 0.03% de tetrametilsilano (TMS). Se resuspendió suavemente y se transfirió a un tubo de RMN de 5 mm.

- **Tejido intacto**

La manipulación del tejido se realizó en frío. Las muestras se lavaron con D_2O y, a continuación, se introdujo un fragmento de tejido dentro del rotor y se añadieron 20 μL de D_2O y 1 mM de TSP.

4. ADQUISICIÓN DE LOS ESPECTROS DE RMN

4.1 Calibración y optimización del instrumento

Previamente a la adquisición de los experimentos se llevó a cabo la calibración de los espectrómetros (500 MHz y 600 MHz) y la optimización de los parámetros de adquisición para cada tipo de muestra según los protocolos definidos por el fabricante del espectrómetro (Bruker, BioSpin), todo ello empleando el software TopSpin (Bruker, BioSpin).

1. Calibración de la temperatura con una muestra de CH_3OD (metanol deuterado) al 99.8% previamente a la adquisición de los experimentos.
2. Optimización de los parámetros de adquisición con una muestra de sacarosa en 90% H_2O y 10% D_2O (2 mM sacarosa, 0.5 mM DSS, 2 mM NaN_3).

El protocolo incluye los siguientes pasos:

- A. Homogenización del campo magnético, mediante el ajuste de los *shims*, hasta conseguir que la anchura de la señal del TSP sea inferior a 0.7 Hz y supresión de la señal del agua para obtener una señal simétrica.
- B. Selección del solvente en función de la preparación de la muestra. En este caso $\text{H}_2\text{O}+\text{D}_2\text{O}$.

3. Optimización de estos mismos parámetros con la muestra de interés hasta conseguir la calidad de los espectros recomendada para estudios de metabolómica: línea base plana, buena corrección de fase, señal del TSP simétrica y con una anchura <1Hz, señal del agua simétrica, con una anchura <100 Hz, garantizando su reproducibilidad en cada una de las muestras.

4.2 Adquisición de los experimentos

4.2.1 Experimentos 1D

Las condiciones de adquisición fueron adaptadas en función del biofluido como se detalla en la **Tabla 6**. Las muestras de **orina** se adquirieron en un espectrómetro Bruker (Bruker, BioSpin) de 500 MHz equipado con una sonda TBI de banda ancha de 5 mm y una sonda g-HR-MAS en el caso del **tejido intacto**. Las muestras de **plasma** y los **extractos de tejido** se midieron en un espectrómetro de 600 MHz con una criosonda TCI de 5 mm. Independientemente del espectrómetro utilizado y del tipo de muestra biológica, previamente a la adquisición de los experimentos, se comprobó la estabilidad de la temperatura. Además, en el caso de las muestras de orina (500 MHz), se requirió el soporte de una unidad de temperatura externa para mantener la temperatura estable a 300 K durante la adquisición de los experimentos.

Tabla 6: Parámetros de adquisición de los espectros ¹H-RMN CPMG

1D CPMG	Biofluido		Tejido	
	Orina	Plasma	Fase acuosa	Fase orgánica
Parámetros de adquisición				
Espectrómetro	500.13 MHz	600.13 MHz	600.13 MHz	600.13 MHz
Temperatura (K)	300	310	310	310
TD	64k	72k	72k	72k
NS	16	32	4	16
DS	4	4	128	128
SW (ppm)	20	20	20	14
LB (Hz)	1.00	1.00	1.00	0.30
D1 (s)	4	4	4	4
P1 (μs)	12-13	11-12	12-15	8-9
RG	90.5	80.6	automático	automático

K: grados Kelvin; TD: dominio tiempo; NS: número de *scans*; DS: *dummy scans*; SW: anchura espectral; LB: ensanchamiento de línea; D1: periodo de repetición del experimento; P1: pulso de 90°; RG: ganancia del receptor

La secuencia de comandos que se utilizó durante la adquisición de los experimentos incluía: ajuste de la sintonía de la sonda, estabilización y

II. Metodología

homogenización del campo magnético, cálculo automático del pulso de 90° (P1) para cada muestra, transformación y pre-procesado automático de los espectros.

4.2.2 Experimentos 2D

Se adquirieron, además, dos tipos de experimentos 2D (^1H - ^1H TOCSY y ^1H - ^{13}C HSQC) para determinadas muestras seleccionadas, así como para algunos de los patrones, con el fin de mejorar la asignación de los espectros e identificar los metabolitos desconocidos (Tabla 7).

Tabla 7: Parámetros de adquisición de los experimentos 2D

Parámetros de adquisición		Biofluido			
		Orina		Plasma	
		F2 (^1H)	F1 (^1H)	F2 (^1H)	F1 (^1H)
Espectrómetro		500.13 MHz		600.13 MHz	
Temperatura (K)		300		310	
^1H - ^1H TOCSY	TD	2048	256	2048	256
	NS	64-160		64-128	
	DS	16		8	
	SW (ppm)	12	12	12	12
	D1 (s)	1.5		1.5	
	P1 (μs)	12-13		11-12	
		F2 (^1H)	F1 (^{13}C)	F2 (^1H)	F1 (^{13}C)
^1H - ^{13}C HSQC	TD	2048	256	2048	256
	NS	64		120	
	DS	64		16	
	SW (ppm)	14	160	12	165
	D1 (s)	1.5		1.5	
	P1 (μs)	12-13		11-12	

K: grados Kelvin; TD: dominio tiempo; NS: número de *scans*; DS: *dummy scans*; SW: anchura espectral; LB: ensanchamiento de línea; D1: periodo de repetición del experimento; P1: pulso de 90°; RG: ganancia del receptor

5. PRE-PROCESADO DE LOS ESPECTROS

Como se ha mencionado anteriormente, los espectros fueron transformados y pre-procesados de forma automática. Previamente a la transformación de los espectros, cada FID fue multiplicada por una función de apodización de ensanchamiento de señal (lb) de 1 Hz. Tras la transformación de los espectros, se corrigió la fase y la línea base utilizando el software TopSpin 3.0 (Bruker,

BioSpin). Posteriormente, los espectros fueron referenciados de forma automática con respecto a la señal del TSP (0.00 ppm) en el caso de las muestras de orina y con respecto al grupo CH₃ de la alanina (1.47 ppm) y de forma manual en las muestras de plasma (Figura 19).

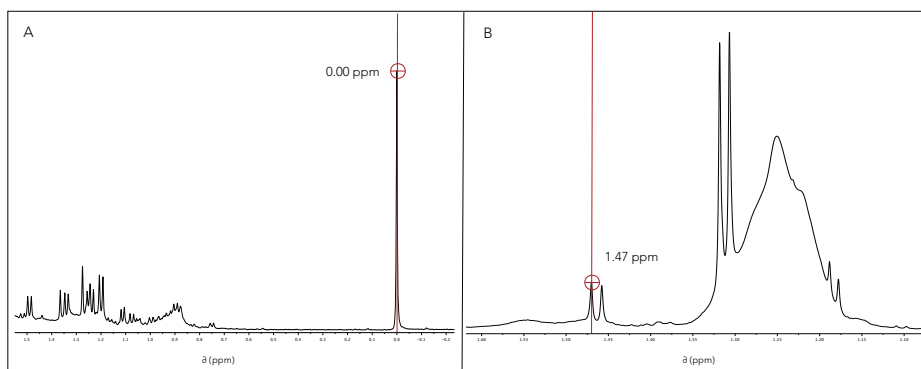


Figura 19: Calibración de los espectros ¹H-RMN CPMG. A) espectro de una muestra de orina referenciada a la señal del TSP (0.00 ppm); B) espectro de una muestra de plasma referenciada a la señal de la alanina (1.47 ppm)

6. PROCESADO DE LOS DATOS

El análisis de los perfiles de orina y plasma y la posterior comparación entre grupos (endometriosis y controles) se realizó a partir de los experimentos ¹H-RMN CPMG.

6.1 Bucketing

La subdivisión e integración de los espectros de orina y plasma se realizó en AMIX (Bruker, BioSpin). En el análisis de los datos de ambos estudios se combinó un *bucketing* de anchura constante y variable. En cada caso, el tipo de procedimiento y las singularidades del *bucketing* se adaptaron a las características de las señales de los espectros y al objetivo del análisis. En todos los casos, el tipo de integración seleccionado fue suma absoluta de intensidades, de manera que el valor de cada región correspondía al área de los picos incluidos en esa región en valor absoluto.

6.2 Normalización

A. Normalización integral

Normalización utilizada en las muestras de **plasma**. Con este procedimiento se dividió cada uno de los *buckets* (0.01 ppm) del espectro entre el área total

de su correspondiente espectro. La normalización se realizó de forma automática en AMIX (Bruker, BioSpin).

B. PQN

Normalización aplicada en los espectros de **orina**. Se emplearon factores de normalización específicos para cada muestra. El cálculo de los cocientes y la posterior normalización de los espectros se realizó en Excel (Excel 2011, v. 14.0.0) siguiendo las indicaciones descritas en el trabajo de Dieterle y colaboradores (Dieterle *et al.*, 2006). El protocolo de normalización PQN se puede resumir en:

1. Selección o cálculo del espectro de referencia. En este caso, el espectro de referencia se definió como la mediana de los espectros del grupo control.
2. Cálculo de los factores de normalización para cada muestras. Cada uno de los *buckets* del espectro se divide entre el correspondiente *bucket* del espectro de referencia y se calcula la mediana de los cocientes anteriores obteniéndose un factor de normalización específico para cada muestra.
3. Normalización del espectro original con respecto al cociente calculado en el paso anterior. En cada una de las muestras, se divide cada *bucket* del espectro entre el factor calculado para esa muestra.

6.3 Alineamiento

A. Alineamiento global: "SPEAQ"

Los espectros de **orina** fueron alineados utilizando el paquete de R (RStudio, v. 0.98.1062) "SPEAQ" (Vu *et al.*, 2011) que incluye el algoritmo de alineamiento CluPa (*Hierarchical Cluster-based Peak Alignment*). Para ello, se utilizó una matriz de datos con una anchura de *bucket* de 0.001 ppm (6532 regiones). Este método incluye tres pasos:

1. Identificación de los picos (*peak picking*): se define un valor para el ruido y se identifican como señales los picos con intensidades por encima de este valor.
2. Selección del espectro de referencia: espectro utilizado como patrón a partir del cual se alinean el resto de espectros. El algoritmo selecciona aquel espectro que tiene mayor número de picos comunes al resto de espectros.
3. Alineamiento de los picos: los picos se alinean siguiendo el criterio de máxima verosimilitud.

Finalmente, se genera una tabla de datos con las mismas dimensiones que la

matriz introducida donde todos los espectros se encuentran alineados con respecto al espectro de referencia.

B. Alineamiento por regiones: alineamiento gráfico

En los espectros de **plasma** se utilizó la herramienta de alineamiento gráfico disponible en MNova (MestRe Nova, v 8.1.2). Partiendo del conjunto de espectros superpuestos, se seleccionaron gráficamente las regiones de interés y se alinearon de forma automática con respecto al espectro de referencia, sin afectar al desplazamiento de las otras señales del espectro.

6.4 Deconvolución

Los espectros de **plasma** se deconvolucionaron utilizando el método GSD (*global spectra deconvolution*) de MNova (MestReNova, v8.1.2). Con este algoritmo se identificaron y resolvieron todos los espectros en el conjunto de picos que los componen. El resultado es un espectro con picos aislados y completamente caracterizados: desplazamiento químico, anchura de pico, altura, área, etc. (Cobas et al., 2011). La deconvolución de los espectros consta de los siguientes pasos:

- Superposición de todos los espectros.
- Detección de los picos (*peak picking*).
- Selección y ajuste de los parámetros de la deconvolución.
- Deconvolución automática y simultánea de todos los espectros.
- Obtención de los espectros sintéticos con anchura de línea uniforme y resolución de 1 Hz.

En este caso, la normalización de las regiones integradas a partir de los espectros deconvolucionados se realizó con respecto al área total de los espectros deconvolucionados (sumatorio de las intensidades obtenidas tras la deconvolución), pues el área total de un espectro deconvolucionado es mayor que el correspondiente área del espectro original (sumatorio de las intensidades antes de la deconvolución).

En la **Tabla 8** se resumen los métodos de procesado empleados en cada biofluido. El protocolo se adaptó a las características de los espectros, el tipo de datos y el objetivo del estudio:

II. Metodología

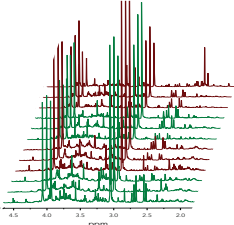
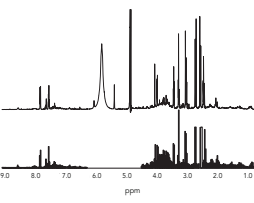
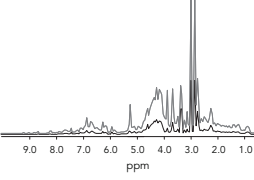
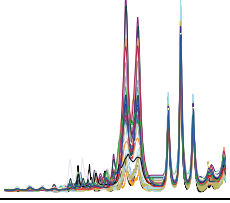
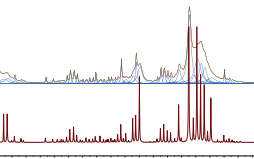
- Protocolo de procesamiento de los espectros de **orina**

En primer lugar, se realizó un **bucketing** de 0.001 ppm (AMIX, Bruker BioSpin) sobre los datos crudos (espectros sin normalizar), obteniéndose la matriz de datos "A". A continuación, se realizó un **alineamiento** global de los espectros empleando el algoritmo "SPEAQ" (RStudio) y seguidamente los espectros alineados se **normalizaron** con PQN. Finalmente, la matriz de datos "A" (0.001 ppm) se transformó en una matriz con una **anchura de bucket** de 0.01 ppm (matriz de datos "B"), utilizando el algoritmo "ChemoSpec" (R Studio software), con la que se llevó a cabo el análisis estadístico de los datos.

- Protocolo de procesamiento de los espectros de **plasma**

Los espectros de plasma fueron subdivididos empleando un **bucketing** de 0.01 ppm y **normalizados** respecto al área total (AMIX, Bruker BioSpin). Con la matriz de datos resultante se llevó a cabo el análisis estadístico multivariante. A continuación, con el fin de resolver el problema del solapamiento de señales, a partir de los datos crudos se realizó un **alineamiento** gráfico de los espectros en MNova (MestReNova v8.1.2) para su posterior **deconvolución** mediante el algoritmo GSD (MestReNova v8.1.2). Los espectros sintéticos derivados de la deconvolución se normalizaron respecto al área total y se llevó a cabo el análisis estadístico de las regiones de interés.

Tabla 8: Resumen de las etapas del procesado de datos en orina y plasma

	ORINA	PLASMA
Espectros ¹H-RMN 	Espectros: CPMG Nº de muestras: n=81 - Endometriosis: n=45 - Controles: n=36	Espectros: CPMG Nº de muestras: n=96 - Endometriosis: n=58 - Controles: n=38
Bucketing 	Región integrada: 9.30 – 0.50 ppm Anchura de bucket: 0.01 ppm Regiones excluidas: 6.50-4.32 (agua+urea) 9.26-9.15 (línea base) Tipo de integración: Suma absoluta de intensidades	Región integrada: 8.46 – 0.60 ppm Anchura de bucket: 0.01 ppm Regiones excluidas: 5.15-4.32 (agua) 6.86-5.35 (urea) Tipo de integración: Suma absoluta de intensidades
Normalización 	PQN (Probabilistic quotient normalization)	Integral o área total
Alineamiento 	Alineamiento global de los espectros: algoritmo SPEAQ (R, software)	Alineamiento de regiones seleccionadas (MNova) (MestReNova v8.1.2)
Deconvolución 	-	Deconvolución global de los espectros: algoritmo GSD (MNova) (MestReNova v8.1.2)

7. ASIGNACIÓN DE LOS ESPECTROS

La identificación de los metabolitos de cada tipo de muestra analizada (orina, plasma y tejido) se realizó utilizando el software AMIX (*Analysis of MIXtures*, versión 3.9.7; Bruker BioSpin) en combinación con las bases de datos HMDB, BMRB y BBIORFCODE 2.0.0 (Bruker, BioSpin), así como con la información disponible en la literatura (Diaz *et al.*, 2013; Lindon *et al.*, 2010). Adicionalmente, se adquirieron espectros 2D (^1H - ^1H TOCSY y ^1H - ^{13}C HSQC) de un conjunto de muestras seleccionadas para facilitar la identificación de los metabolitos (Beckonert *et al.*, 2007).

Se adquirieron también los espectros de algunos patrones para completar la asignación de las moléculas no disponibles en las bases de datos e identificar señales correspondientes a fármacos y otros compuestos (p.ej., desinfectantes, lubricantes, etc.) que hubiesen podido estar en contacto con las muestras durante su recogida. Para la caracterización de los metabolitos orgánicos presentes en plasma y en las fases no-polares de los extractos de tejido, se adquirieron los espectros de RMN de un determinado conjunto de compuestos lipídicos representativos de diferentes familias.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

8.1 Análisis estadístico multivariante

El análisis estadístico multivariante se llevó a cabo empleando SIMCA (Umetrics, v 13.0.2). Previamente al análisis estadístico de los datos, los espectros fueron escalados utilizando UV para las muestras de **orina** y Pareto para las de **plasma**.

Análisis no supervisado

A partir de los modelos de PCA se llevó a cabo:

- **Identificación de outliers:** la identificación de los *outliers* se realizó por grupos con la ayuda de las herramientas disponibles en SIMCA (gráficos T^2 de Hotelling y DModX) y la inspección visual de los espectros.
- **Evaluación de factores de confusión:** las muestras se etiquetaron en función de las variables de interés (edad, FCM, estadio de la enfermedad, etc.) para observar si la distribución de las muestras en el *score plot* estaba condicionada por algunas de estas variables.

Análisis supervisado

La optimización y validación interna de los modelos discriminantes de OPLS-DA se realizó mediante:

- **Selección de variables:** se utilizaron los coeficientes de regresión (CoeffCS) y sus correspondientes errores estándar obtenidos tras la validación cruzada (CoeffCScvSE). Se mantuvieron sólo aquellas variables cuya relación CoeffCS/CoeffCScvSE fuese superior a 1 (Diaz et al., 2013).
- **Test de permutación:** se calculó a partir del PLS-DA con un número de componentes equivalentes a su correspondiente OPLS-DA, utilizando 100 iteraciones para cada uno de los modelos.

8.2 Análisis estadístico univariante

La cuantificación relativa de los metabolitos identificados como relevantes se realizó utilizando un *bucketing* de anchura variable. En primer lugar, tanto en los espectros de orina como en los de plasma, las regiones de interés se definieron gráficamente en AMIX (Bruker BioSpin). Una vez delimitadas las señales a integrar, sobre una matriz de datos de 0.001 ppm con la normalización requerida para cada biofluido, se sumaron en Excel (Excel 2011, v. 14.0.0) el conjunto de *buckets* de 0.001 ppm que definían las señales seleccionadas. En el caso de los espectros sintéticos de plasma obtenidos tras la deconvolución, la integración de los metabolitos se realizó con la herramienta de integración disponible en MNova (MestReNova v8.1.2).

El análisis estadístico univariante se llevó a cabo con el programa SPSS (*SPSS statistics*, v 17.0). Se empleó el test no paramétrico para dos muestras independientes U de Mann-Whitney, en el que un p -valor $< \alpha=0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

IV. RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

1. ESTUDIO DE ORINA

Uno de los principales retos en el estudio de la endometriosis es el desarrollo de métodos de diagnóstico tempranos y no invasivos. Sin embargo, ninguno de los biomarcadores propuestos hasta el momento ha permitido un avance significativo en este sentido (Fassbender *et al.*, 2013; May *et al.*, 2010). Este trabajo constituye el primer estudio dirigido a la identificación de biomarcadores de endometriosis a través del análisis global del perfil metabolómico de orina por RMN.

La caracterización metabolómica de los perfiles de orina es particularmente interesante debido a su naturaleza no invasiva (Gamagedara *et al.*, 2012). El análisis de este biofluido es extremadamente complejo por el elevado número de metabolitos que contiene y la variabilidad interindividual de este tipo de muestras. En este sentido, se requiere la aplicación de métodos estadísticos robustos capaces de discriminar los cambios asociados al problema biológico de interés de las variaciones aleatorias (Zhang *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos indican que las pacientes con endometriosis presentan una firma metabólica característica que las diferencia de las mujeres del grupo control. La identificación de estas alteraciones en orina ha permitido profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la aparición de esta patología, información que podrían ser utilizada para el desarrollo de un método de diagnóstico no invasivo de la enfermedad.

1.1 Diseño experimental

El estudio metabolómico de orina incluyó 81 muestras, 36 procedentes del grupo control y 45 de pacientes con endometriosis (**Tabla 9**). Todas las muestras fueron recogidas previamente a la intervención laparoscópica y analizadas por ¹H RMN de acuerdo a los protocolos descritos.

Tabla 9: Características clínicas de las mujeres incluidas en el estudio metabólico de orina

	Grupo control (n=36)	Pacientes con endometriosis (n=45)
Edad		
Media ± DE (años)	35.47 ± 5.15	32.29 ± 6.59
FCM		
Fase folicular (días 1-14)	30	30
Fase luteal (días 15-28)	6	15
Estadio de la enfermedad		
Mínima/leve (I-II)	-	6
Moderada/grave (III-IV)	-	39

N: tamaño muestral; DE: desviación estándar; FCM: fase del ciclo menstrual

1.2 Perfil metabólico de orina

Las muestras de orina se analizaron en un espectrómetro de 500 MHz, obteniéndose espectros de buena calidad para la mayoría de las muestras. El perfil metabólico de este biofluido se caracteriza por presentar una gran cantidad de señales con distinto grado de solapamiento, que corresponden a una gran variedad de analitos de peso molecular pequeño (Kok *et al.*, 2010) pertenecientes a distintas familias químicas (compuestos nitrogenados, amino ácidos, ácidos orgánicos, azúcares simples, xenobióticos, compuestos no metabolizados, etc.). En particular, en los espectros de orina, predominan las señales correspondientes a la urea, creatinina, trimetilamina-N-óxido (TMAO), dimetilamina (DMA), hipurato y ácido cítrico, entre otros (Figura 20).

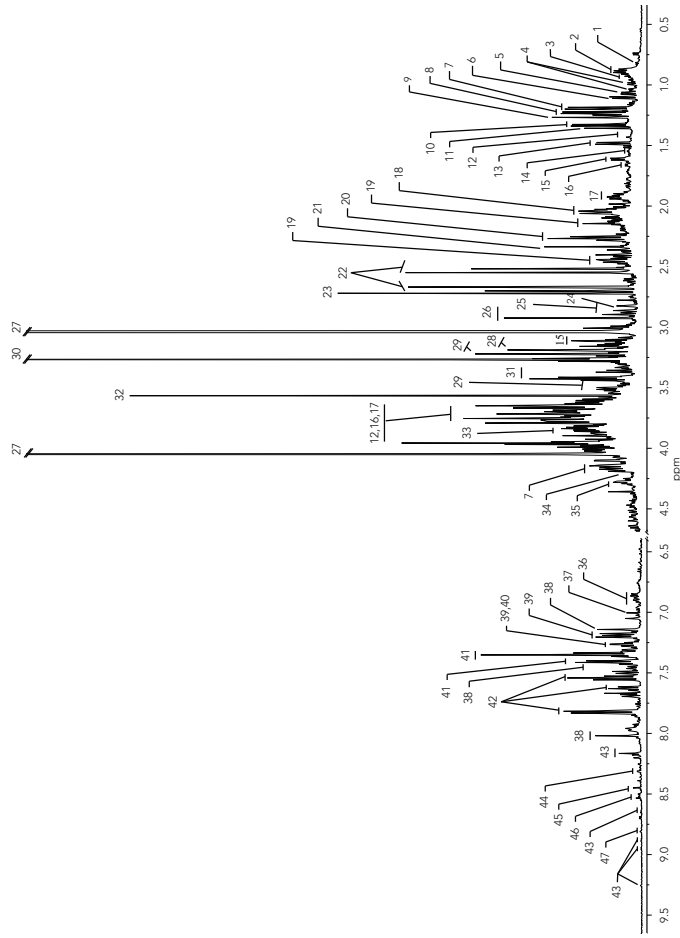


Figura 20: Asignación de un espectro representativo $^1\text{H-RMN CPMG}$ procedente de una paciente con endometriosis. La región del espectro correspondiente a las señales de la urea y el agua ha sido excluida del espectro. Metabolitos asignados: 1, 2-hidroxi-isovalerato; 2, butirato/etilmalonato; 3, leucina/isooleucina; 4, valina; 5, isobutirato/2-metilglutarato; 6, fucosa; 7, 3-hidroxi-butarato/3-aminoisobutirato; 8, metilmalonato; 9, 3-hidroxiisovalerato; 10, treonina; 11, 2-hidroxiisobutirato; 12, lisina; 13, alanina; 14, adipato; 15, citrulina; 16, arginina; 17, ornitina; 18, grupos N-acetil; 19, glutamina; 20, 2-hidroxi-glutarato; 21, piruvato; 22, citrato; 23, dimetilamina; 24, metilguanidina; 25, asparagina; 26, trimetilamina; 27, creatinina; 28, colina; 29, glicero-fosfocolina; 30, trimetilamina-N-óxido; 31, taurina; 32, glicina; 33, serina; 34, guanidinosuccinato; 35, pseudouridina; 36, 3,4-dihidroximandelato; 37, 3-metilhistidina; 38, histidina; 39, indoxil sulfato; 40, triptófano; 41, fenilalanina/fenilacetilglicina; 42, hipurato; 43, 1-metilnicotinamida; 44, N¹-Metil-2-piridona-5-carboxiamida; 45, formato; 46, N¹-metil-4-piridona-5-carboxiamida; 47, trigonelina

1.3 Homogeneidad de las muestras y detección de *outliers*

Tras la adquisición de los experimentos, los espectros de orina se alinearon utilizando una matriz de datos rectangular de 0.001 ppm y se normalizaron con PQN. Posteriormente, se transformó en una matriz con una anchura de *bucket* 0.01 ppm con el fin de facilitar el análisis estadístico de los datos.

En primer lugar, se realizó un análisis exploratorio de la variabilidad de las muestras incluidas en el estudio mediante la combinación de métodos no supervisados de reconocimientos de patrones (PCA) y la inspección visual de los espectros ¹H-RMN CPMG. Este análisis permitió:

- A. Identificar aquellas muestras que presentaban perfiles metabólicos inusuales. Tras el análisis en profundidad de sus espectros y la justificación de su comportamiento, estas muestras fueron definidas como ***outliers*** y excluidas del estudio.
- B. Evaluar la **homogeneidad** de las muestras incluidas en cada uno de los grupos, así como su distribución global, con el fin de identificar si existía alguna tendencia o agrupación debida a otras variables clínicas o instrumentales que pudieran interferir en el análisis.

Durante el análisis, se identificaron varias muestras, procedentes tanto del grupo control como del grupo de pacientes con endometriosis que presentaban un conjunto de señales cuya localización en el espectro y, especialmente, su intensidad indicaban que podían corresponder a algún tipo de contaminación (**Figura 21**).

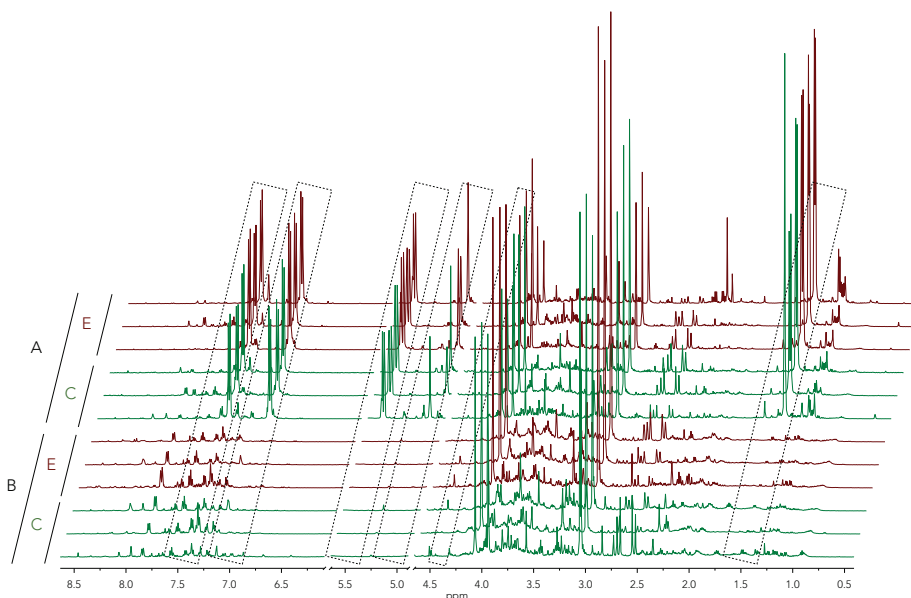


Figura 21: Conjunto de espectros ^1H -RMN CPMG de orina representativos de cada uno de los grupos de estudio. A) espectros con contaminación; B) espectros sin contaminación. Rojo: pacientes con endometriosis (E); verde: grupo control (C). En los rectángulos se han encuadrado las señales correspondientes a la contaminación

Tras la evaluación de los perfiles de RMN de todas las potenciales fuentes de contaminación con las que muestras pudieran haber estado en contacto desde su recogida (lubricante, povidona, sonda urinaria, botes y tubos de recogida, analgésicos, enema, fosfatos, azida sódica, etc.) se determinó que la contaminación procedía de la sonda. Las señales únicamente aparecían en las muestras que habían sido recogidas de este modo y estaba ausente en las que fueron recogidas directamente en bote (**Figura 22**). No fue posible identificar el compuesto responsable de estas señales. Una vez determinada la fuente de contaminación, se excluyeron del estudio todas las muestras que presentaban dichas señales y se continuó el estudio con el resto de muestras ($n=81$).

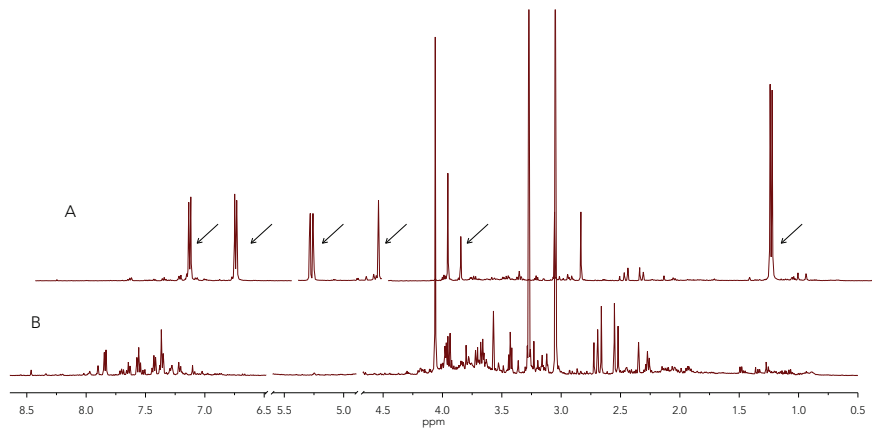


Figura 22: Comparación de los espectros ^1H -RMN CPMG de orina de una misma paciente de endometriosis. A) muestra recogida a través de sonda; B) muestra recogida directamente en bote. Las flechas indican las señales de la contaminación

A. Identificación de outliers

- Grupo endometriosis

El análisis del *score plot* y el gráfico T^2 de Hotelling permitió la identificación de dos outliers extremos (E26 y E31) (Figura 23). Al inspeccionar visualmente los espectros ^1H -RMN CPMG se observó que la muestra E26 presentaba señales correspondientes al etanol y la E31 se trataba de una muestra muy diluida. En este último caso, la información clínica correspondiente a esta muestra indicaba que se trataba de la segunda orina de la mañana, lo que podría justificar la baja concentración de metabolitos en esta muestra respecto al resto de su grupo. Las diferencias de dilución entre las muestras se compensan generalmente mediante la normalización de los espectros. En casos extremos, donde las señales son muy poco intensas, no siempre es posible compensar este efecto, pues la normalización aumenta tanto la intensidad de las señales como la del ruido, adquiriendo más relevancia las regiones de línea base donde hay ausencia de señales.

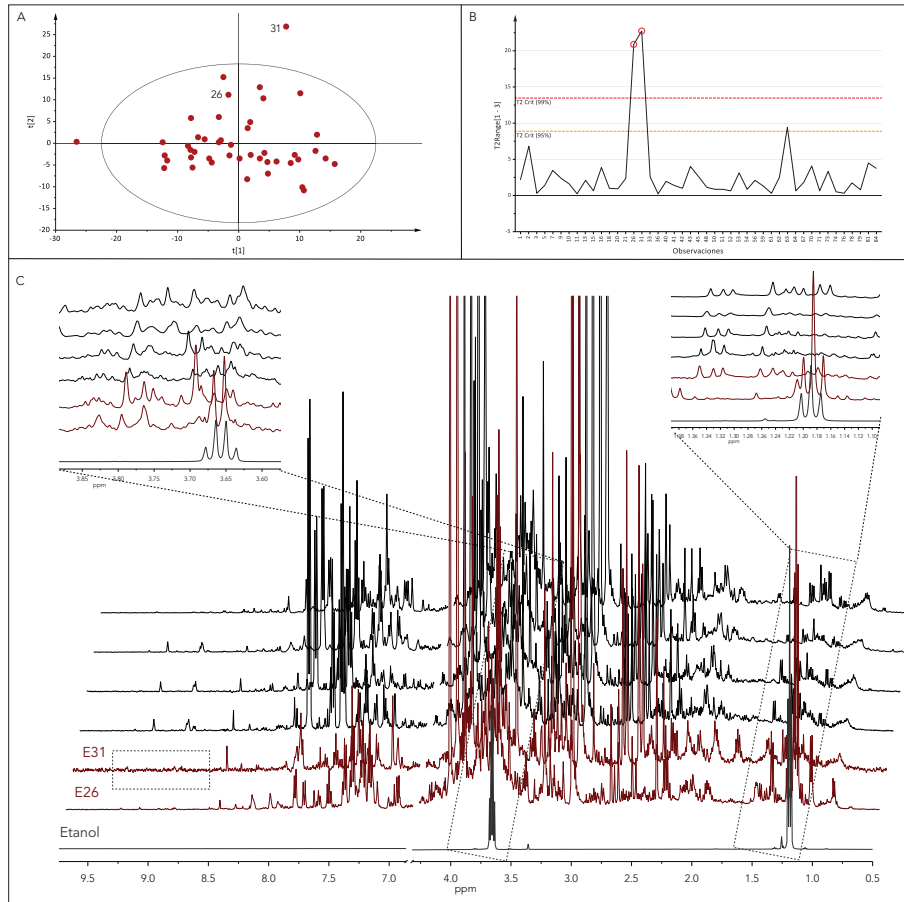


Figura 23: Identificación de *outliers* del grupo de pacientes con endometriosis mediante análisis no supervisado de PCA. A) *score plot* del grupo de pacientes de endometriosis ($n=45$); B) gráfico T^2 de Hotelling donde se identifican las muestras E26 y E31 como *outliers*, ambas superan el límite del 99%; C) comparación de los espectros $^1\text{H-RMN}$ CPMG de las muestras E26 y E31 (rojo), donde se resaltan las regiones del espectro responsables de su comportamiento como *outliers*, con respecto a otras muestras representativas de su grupo (negro) y el espectro de una muestra de etanol adquirido en las mismas condiciones (gris)

- Grupo control

En el grupo control se identificaron también dos *outliers* (C28 y C77). La muestra C28, pese a tratarse de una observación que se encontraba dentro de los límites de la normalidad definidos por la elipse del *score plot*, durante la inspección visual de los espectros se observaron las mismas señales, previamente identificadas en la muestra E26, correspondientes al etanol. La muestra C77, situada fuera del intervalo de confianza del 99% en el gráfico T^2 de Hotelling, presentaba un perfil inusual caracterizado por la presencia de

III. Resultados y desarrollo argumental

manitol (3.90–3.70 ppm), comúnmente utilizado como diurético, ausencia de citrato (2.75–2.50 ppm) y diversas señales en la región 1.65–1.40 ppm no identificadas (Figura 24).

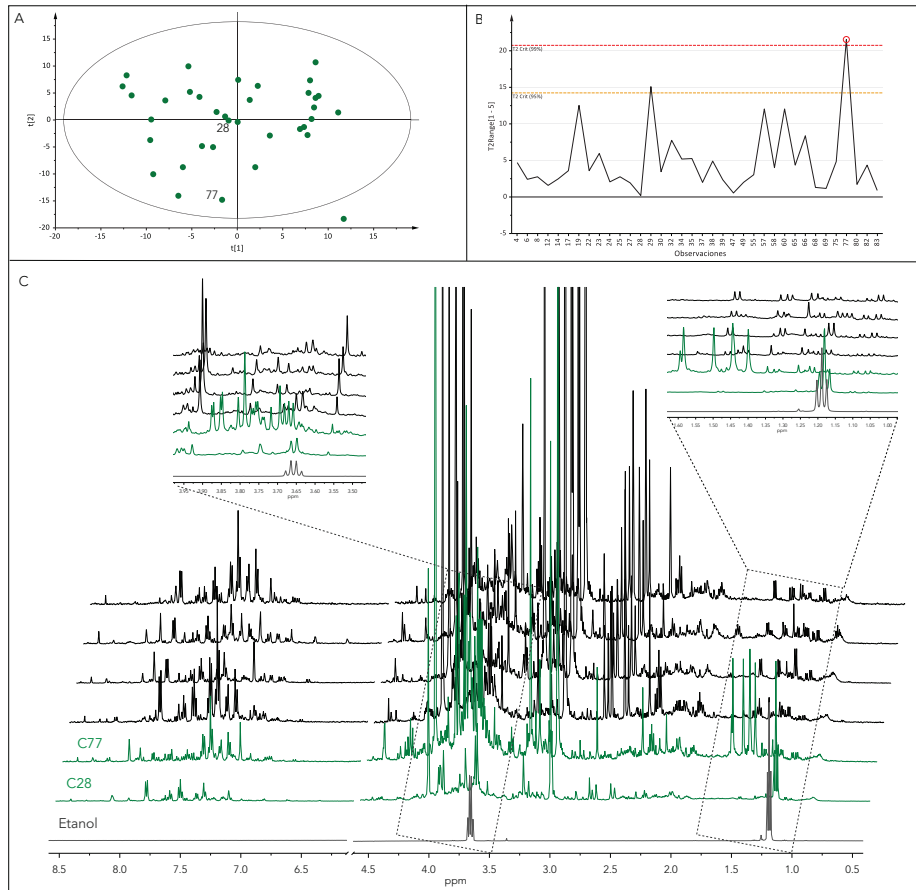


Figura 24: Identificación de *outliers* del grupo control mediante análisis no supervisado de PCA. A) score plot del grupo control (n=36); B) gráfico T^2 de Hotelling donde se identifica la muestra C77 como *outlier* extremo; C) comparación de los espectros de ^1H -RMN CPMG de las muestras identificadas C28 y C77 (verde), donde se resaltan regiones del espectro responsables de su comportamiento como *outliers*, con respecto a un conjunto de muestras representativas de su grupo (negro) y el espectro de una muestra de etanol adquirido en las mismas condiciones (gris)

Tras la eliminación de las muestras anteriormente mencionadas, se observaron otras muestras que estaban fuera del intervalo de confianza del 95% en el gráfico T^2 de Hotelling. Estas muestras no fueron excluidas del modelo, pues no existía justificación técnica o clínica que permitiera su eliminación como *outliers*.

B. Homogeneidad muestral

Mediante el análisis no supervisado de PCA también se evaluó el potencial impacto de las diferentes variables clínicas (FCM, IMC, estadio de la enfermedad, etc.) e instrumentales (día de adquisición de los experimentos, etc.) sobre la distribución de las muestras. Como se observa en la **Figura 25**, el análisis de PCA de todas las muestras (n=77), tras la exclusión justificada de los *outliers* identificados, no evidenció ningún patrón o agrupación en función de estos descriptores que pudiera interferir en el posterior análisis supervisado entre controles y pacientes con endometriosis.

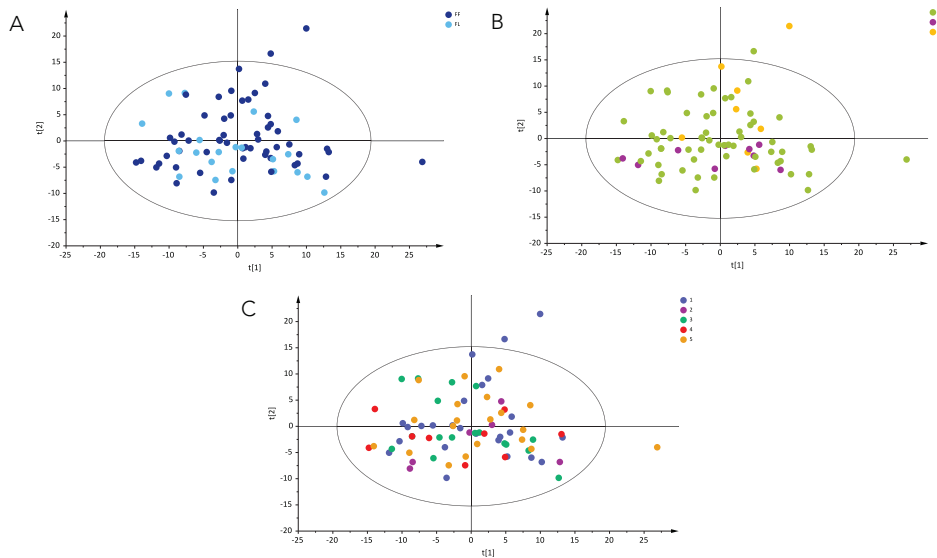


Figura 25: Análisis no supervisado mediante PCA de todas las muestras incluidas en el estudio. Las muestras han sido coloreadas en función de las distintas variables a evaluar. A) FCM: FF, fase folicular; FL, fase luteal; B) IMC: 1, peso normal (18.50-25.00); 2, sobrepeso (>25.00); 3, obesidad (>30.00); C) día de adquisición de los experimentos de RMN

Además, en el grupo de pacientes con endometriosis, se trató de identificar si las muestras se agrupaban en función del estadio de la enfermedad en el que habían sido clasificadas en el momento del diagnóstico. Aunque el número de pacientes en estadios tempranos era muy limitado (n=6), como se muestra en la **Figura 26**, estas muestras no presentaban un comportamiento diferente con respecto a las muestras en estadios avanzados (III/IV), observándose una distribución homogénea de las muestras en el espacio.

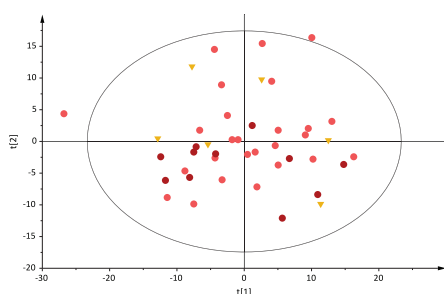


Figura 26: Análisis no supervisado mediante PCA de las pacientes con endometriosis. Las muestras han sido coloreadas en función del estadio de la enfermedad

1.4 Discriminación entre controles y pacientes con endometriosis

1.4.1 Análisis estadístico multivariante

En primer lugar, se empleó un análisis estadístico multivariante para la comparación de los 77 perfiles de RMN incluidos en este estudio. Como método de clasificación se utilizó un **OPLS-DA**, método supervisado, donde previamente se definió la clase (Control – Endometriosis) a la que pertenecían cada una de las muestras. El modelo construido reveló una baja capacidad de discriminación entre el grupo control y las pacientes con endometriosis (R^2Y : 0.710; Q^2 : 0.098) (Figura 27). El valor de Q^2 reflejaba que el modelo presenta una baja capacidad de predicción.

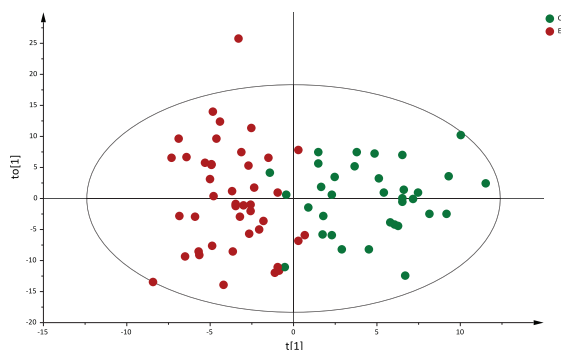


Figura 27: Análisis estadístico supervisado. Score plot del modelo OPLS-DA obtenido de la comparación de los espectros ^1H -RMN CPMG procedentes del grupo de pacientes con endometriosis (rojo) y del grupo control (verde)

Con el fin de mejorar la calidad del modelo y su capacidad de predicción se llevó a cabo una **selección de variables**. Como criterio de decisión para identificar qué variables o regiones del espectro estaban contribuyendo en mayor medida a la discriminación entre ambos grupos se empleó la relación

entre los coeficientes de regresión y sus correspondientes errores estándar (CoeffCS/CoeffCScvSE). Aplicando esta estrategia se seleccionaron un total de 298 variables (45.64%), las cuales presentaban un cociente >1 , y fueron utilizadas para construir un nuevo modelo OPLS-DA. El resto de las regiones del espectro fueron excluidas, considerándolas variables no informativas con una nula o baja capacidad discriminatoria. Tras la selección de variables, en el nuevo modelo OPLS-DA construido, se consiguió incrementar los valores de R^2Y : 0.783 y Q^2 : 0.536 (Figura 28).

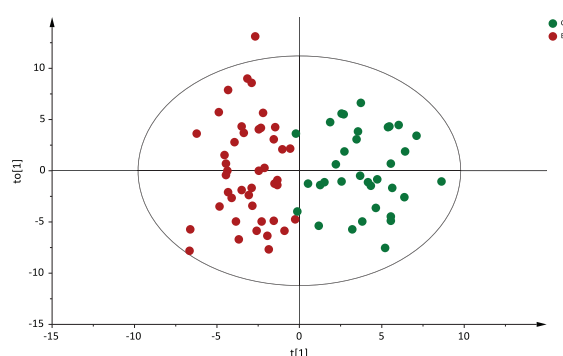


Figura 28: Análisis estadístico supervisado realizado tras la selección de variables. Score plot del modelo OPLS-DA obtenido de la comparación de los espectros 1H -RMN CPMG procedentes del grupo de pacientes con endometriosis (rojo) y del grupo control (verde) excluyendo las variables identificadas como no relevantes en la discriminación entre ambos grupos de muestras

La validación interna de este modelo se llevó a cabo mediante un **test de permutación**. Al comparar los valores de R^2Y y Q^2 permutados con respecto a los valores reales del modelo se observó como el valor de la Q^2 se ajustaba a las recomendaciones para este tipo de análisis obteniéndose un valor inferior a 0.05, y el valor de R^2Y superaba los valores de 0.3-0.4 aconsejables, indicando que el modelo obtenido estaba sobreajustado lo que reducía su capacidad de predicción (Figura 29).

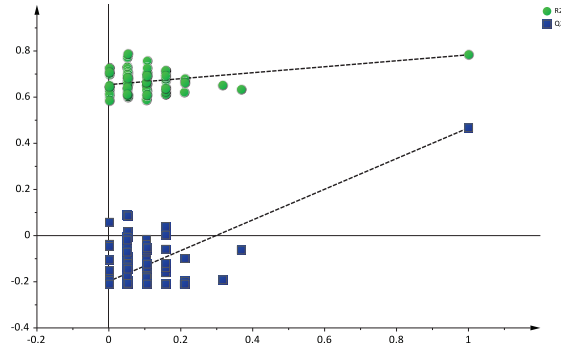


Figura 29: Validación interna mediante el test de permutación. Resultado del test de permutación obtenido a partir del modelo PLS-DA con un número de componentes equivalentes al modelo OPLS-DA empleando 100 permutaciones aleatorias. El eje Y representa los valores de R^2Y (verde) y Q^2 (azul) para cada uno de los 100 modelos permutados con respecto a los valores del modelo original, mientras que el eje X muestra los coeficientes de correlación entre los modelos permutados y el modelo original

1.4.2 Análisis estadístico univariante

El sobreajuste identificado en los modelos supervisados de OPLS-DA limitaba la generalización de los resultados, por lo que el análisis se continuó con una estrategia univariante donde se analizaron de forma individualizada cada una de las regiones en las que estaban divididos los espectros.

En primer lugar, se evaluaron todas las regiones (653 *buckets*) que componían la matriz de datos de 0.01 ppm, encontrándose que sólo 79 de ellas presentaban diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de muestras (p -valor < 0.05). Estas 79 regiones espectrales fueron consideradas, por tanto, variables relevantes en la discriminación y utilizadas como punto de partida para identificar los metabolitos alterados en presencia de la patología.

Posteriormente, se realizó un análisis equivalente entre las mujeres del grupo control y las pacientes con endometriosis en cada una de las fases del ciclo. Se compararon, por un lado, las 56 muestras recogidas durante la fase folicular (28 controles y 28 mujeres con endometriosis) y, por otro lado, las 21 muestras restantes recogidas en fase luteal (6 controles y 15 mujeres con endometriosis). Este análisis permitió la identificación de 52 y 66 regiones estadísticamente significativas (p -valor < 0.05), respectivamente, que estaban contribuyendo a la discriminación entre controles y pacientes con endometriosis en cada una de las fases menstruales.

Finalmente, se llevó a cabo un análisis similar para comparar los perfiles metabólicos de orina de las pacientes con endometriosis en estadios tempranos (I/II) con respecto al grupo control. La mayor parte de las muestras incluidas en este estudio procedían de mujeres diagnosticadas en estadios avanzados (III/IV) lo que limitaba la generalización de los resultados a las etapas tempranas de la enfermedad, debido al reducido tamaño muestral evaluado. La comparación entre las mujeres del grupo control (n=34) y las pacientes con endometriosis I/II (n=6) reveló 40 regiones estadísticamente significativas entre ambos grupos de muestras.

1.5 Identificación y cuantificación de los metabolitos asociados a la endometriosis

A partir de las regiones del espectro identificada en el análisis anterior, como responsables de la discriminación entre los distintos grupos de muestras, se llevo a cabo la integración y cuantificación de las variaciones metabólicas asociadas a la endometriosis.

En primer lugar, partiendo de las 79 regiones identificadas como relevantes en la comparación global entre controles (n=34) y pacientes con endometriosis (n=43), se integraron las señales incluidas en dichas regiones empleando una estrategia de anchura de *bucket* variable. El análisis estadístico univariante evidenció la existencia de diferencias de concentración estadísticamente significativas (p -valor < 0.05) en 10 metabolitos. Se observó que la orina de pacientes con endometriosis presentaba niveles elevados, en relación a las controles, de *N*¹-metil-piridona-5-carboxiamida (4-Py), guanidinosuccinato, creatinina, taurina, valina, 2-hidroxi-isovalerato, y de un compuesto desconocido (U2) y niveles reducidos de la región correspondiente a la lisina y otros dos metabolitos de identidad desconocida, U1 y U6 (Tabla 10).

Tabla 10: Variaciones de los metabolitos estadísticamente significativos en la comparación de las pacientes con endometriosis con respecto al grupo control

Pacientes con endometriosis (n=43) vs. Grupo control (n=34)				
δ ¹ H (ppm) ^a	Metabolito	Multiplicidad	p-valor ^b	% Variación ^c
8.5565-8.5005	4-Py	m	0.011	47.72
6.9985-6.9695	U1	d	0.041	-32.36
4.2415-4.2285	Guanidinosuccinato	m	0.012	14.31
4.0855-4.0625	Creatinina	s	0.018	12.63
3.4565-3.4195	Taurina	t	0.002	28.62
3.4185-3.4115	U2	s	0.009	18.16
1.4745-1.4465	Lisina	m	0.002	-18.57
1.4455-1.4315	U6	s	0.010	-16.86
1.0585-1.0375	Valina	d	0.011	2.59
0.8385-0.8145	2-hidroxi-isovalerato	d	0.014	11.87

^arango de desplazamientos químicos de las regiones del espectro integradas; ^bp-valor calculado mediante el test de la U de Mann-Whitney; ^cvariaciones relativas en la intensidad de los metabolitos de las pacientes con endometriosis con respecto al grupo control. 4-Py: N¹-metil-4-piridona-5-carboxiamida; Ui: metabolito desconocido. Multiplicidad (s: singlete; d: doblete; t: triplete; m: multiplete)

El análisis realizado sobre el conjunto de muestras recogidas durante la fase folicular (28 controles y 28 mujeres con endometriosis) reveló 7 metabolitos estadísticamente significativos. En esta FCM, la orina de pacientes con endometriosis se caracteriza por la presencia de concentraciones elevadas de 4-Py, taurina, 2-hidroxi-isovalerato, valina y U2, y la disminución en los niveles de lisina y U4 con respecto al grupo control. Por otro lado, el análisis realizado sobre las pacientes con endometriosis en fase luteal mostró alteraciones estadísticamente significativas en las concentraciones de 10 metabolitos con respecto a las mujeres control en esta misma fase. Las concentraciones de pseudouridina, creatinina, taurina, glicerofosfocolina (GPC), U2 y U3, estaban significativamente elevadas en presencia de endometriosis, mientras que los niveles de lisina, treonina, fucosa y U5, estaban disminuidos con respecto al grupo control (Tabla 11).

Finalmente, el análisis de las 40 regiones identificadas en la discriminación entre controles y pacientes de endometriosis en estadios tempranos condujo a la identificación de 4 metabolitos estadísticamente significativos (p-valor < 0.05). El perfil metabolómico de orina de las pacientes en estadios tempranos se caracteriza por presentar niveles elevados de valina y 2-hidroxi-isovalerato y reducidos de lisina y U6. Las variaciones observadas en estos metabolitos seguían la misma tendencia que en la comparación general de todas las pacientes con endometriosis con respecto al grupo control.

Tabla 11: Variaciones de los metabolitos estadísticamente significativos en cada una de las FCM

$\delta^1\text{H}$ (ppm) ^a	Fase folicular: Pacientes con endometriosis (n=28) vs. Grupo control (n=28)				Fase luteal: Pacientes con endometriosis (n=15) vs. Grupo control (n=6)				
	Metabolito	Multiplicidad	p-valor ^b	% Variación ^c	$\delta^1\text{H}$ (ppm) ^a	Metabolito	Multiplicidad	p-valor ^b	% Variación ^c
8.5565-8.5005	4-Py	m	0.011	41.47	4.3065-4.2725	Pseudouridina	t	0.013	23.16
3.4565-3.4195	Taurina	t	0.037	23.58	4.0855-4.0625	Creatinina	s	0.043	26.78
3.4185-3.4115	U2	s	0.027	18.18	3.4565-3.4195	Taurina	t	0.008	75.70
					3.4185-3.4115	U2	s	0.036	47.64
					3.2365-3.2275	GPC	s	0.016	150.22
2.2035-2.1735	U4	d	0.037	-23.02	2.7905-2.7725	U3	s	0.016	174.09
1.4745-1.4465	Lisina	m	0.025	-17.72	1.8045-1.7675	U5	m	0.036	-9.57
					1.4745-1.4465	Lisina	m	0.036	-18.67
					1.3535-1.3215	Treonina	d	0.011	-37.92
1.0585-1.0375	Valina	d	0.017	2.39	1.1225-1.0975	Fucosa	d	0.016	-50.30
0.8385-0.8145	2-hidroxi-isovalerato	d	0.005	15.52					

^arango de desplazamientos químicos de las regiones del espectro integradas; ^bp-valor calculado mediante el test de la U de Mann-Whitney; ^cvariaciones relativas en la intensidad de los metabolitos de los pacientes con endometriosis con respecto al grupo control. 4-Py: N¹-metil-4-piridona-5-carboxiamida; GPC: glicerofosfocolina; U: metabolito desconocido. Multiplicidad (s: singlete; d: doblete; t: triplete; m: multiplete)

1.6 Interpretación biológica

La comparación multivariable de los perfiles de orina dio lugar a modelos donde se observaba discriminación entre ambos grupos de muestras. La validación interna de los modelos de OPLS-DA evidenció la presencia de sobreajuste, lo que reducía la capacidad predictiva del modelo. En consecuencia, el análisis se prosiguió empleando una aproximación univariante. La principal ventaja del análisis estadístico univariante frente a los métodos multivariante es la facilidad de su aplicación y de la interpretación de sus resultados (Vinaixa *et al.*, 2012). Los resultados derivados de este análisis muestran que el perfil metabolómico de las muestras de orina de las pacientes con endometriosis presenta una firma metabólica característica que las diferencia de las mujeres del grupo control. La comparación de los perfiles de ambos grupos mostró que la orina procedente de mujeres con endometriosis se caracteriza por concentraciones elevadas de 4-Py, guanidinosuccinato, creatinina, taurina, valina, 2-hidroxi-isovalerato y U2, y la disminución en las concentraciones de lisina, U1 y U6.

La **taurina** es un metabolito importante implicado en osmorregulación y cuya concentración está aumentada en distintos tumores (Chun *et al.*, 2009; El-Sayed *et al.*, 2002; Gamagedara *et al.*, 2012). El incremento en los niveles de taurina podría, por tanto, estar asociado a una actividad proliferativa relativamente elevada, a la densidad celular o tumoral (Griffin & Shockcor, 2004) o a la presencia de lesiones endometriósicas en el caso de las pacientes analizadas en este estudio. La endometriosis es una enfermedad benigna cuyas lesiones se comparan a menudo con las tumorales (Scully, 1987) ya que pueden aparecer de forma local o distal, tienen capacidad de adherirse a otros tejidos, invadirlos y causar daño (Munksgaard & Blaakaer, 2011). Siguiendo con la analogía de los procesos neoplásicos, el aumento en los niveles de **valina**, identificados en este estudio, también ha sido observado en la orina de pacientes de cáncer gástrico donde se encontraron niveles de valina más elevados de lo normal (Fan *et al.*, 2012), fenómeno que parece estar relacionado con el metabolismo específico de aminoácidos de cadena ramificada en las células tumorales. Además, esta observación es coherente con los resultados de un estudio metabolómico previo realizado en suero de pacientes con endometriosis (Dutta *et al.*, 2012).

La endometriosis se define como una enfermedad multifactorial que desencadena una respuesta inflamatoria en la cavidad peritoneal (Rizner, 2009; Van Langendonck *et al.*, 2002) y donde el estrés oxidativo ha sido propuesto

como uno de los principales mecanismos responsables de la fisiopatología de esta enfermedad (Gupta *et al.*, 2006; Van Langendonck *et al.*, 2002). El estrés oxidativo, a través de especies reactivas del oxígeno (ROS), induce una reacción inflamatoria localizada activando los leucocitos primarios, liberando citoquinas, factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y otros factores de crecimiento y angiogénicos que contribuyen a la supervivencia del endometrio ectópico (Rizner, 2009). Los radicales del oxígeno, además, median la conversión de argininosuccinato a **guanidinosuccinato**, un compuesto que ha sido asociado con la supresión de las células NK (Taes *et al.*, 2008). Curiosamente, se sabe que las pacientes con endometriosis presentan una inmunidad celular defectuosa caracterizada por un fallo en las células NK para destruir las células endometriales autólogas, contribuyendo a su supervivencia y a la implantación ectópica del tejido endometrial (Kyama *et al.*, 2003). En este contexto, cabe destacar que la taurina ha sido descrita como un importante antioxidante para proteger las células, incluyendo los leucocitos procedentes del estrés oxidativo (Marcinkiewicz & Kontny, 2014), lo que explicaría las elevadas concentraciones de este compuesto en tejidos sometidos a estrés oxidativo. El transportador de taurina (TauT) media la entrada de taurina en los tejidos. Los niveles de TauT son sensibles a concentración y disminuyen en presencia de altas concentraciones de taurina, favoreciendo su excreción a través de la orina (Wojcik *et al.*, 2010) y explicándose así nuestra observación.

La respuesta inflamatoria se relaciona también con el hipermetabolismo, lo que implica un incremento en el consumo de oxígeno y el gasto de energía (Druml *et al.*, 2001). Por tanto, la inflamación regularía la demanda de energía produciéndose un aumento en la degradación de las grasas y una tendencia hacia la cetoacidosis y la acidosis láctica (Mickiewicz *et al.*, 2013), lo que podría explicar el aumento en la excreción de **2-hidroxi-isovalerato** en las pacientes con endometriosis. Además, la inflamación estimula el metabolismo proteico, un proceso caracterizado por una reducción en la concentración de los aminoácidos plasmáticos (Suliman *et al.*, 2005). Entre ellos, se ha observado que los niveles de **lisina** se encuentran disminuidos cuando se comparan pacientes con y sin inflamación (Suliman *et al.*, 2005). Esta observación es coherente con la disminución en los niveles de lisina observados en las pacientes con endometriosis.

El análisis estadístico univariante también reveló variaciones significativas en los niveles de **4-Py** entre las mujeres del grupo control y las pacientes con endometriosis. Este metabolito, así como el 2-Py (*N*¹-metil-2-piridona-5-carboxiamida), también identificado en los espectros de orina, es el producto

final del metabolismo del NAD (nicotidamida adenina dinucleótido) (Rutkowski *et al.*, 2007). La relación entre el 2-Py, el 4-Py y el estrés oxidativo todavía no está clara, aunque es posible que la inhibición de la poli-(ADP-ribosa) polimerasa (PARP1) por 2-Py y 4-Py pueda estar jugando un papel clave en este proceso (Rutkowski *et al.*, 2003). Además, se ha observado una correlación entre las concentraciones séricas de 2-Py, así como de 4-Py y nicotidamina, y los niveles de **creatinina** (Rutkowski *et al.*, 2003).

El análisis metabolómico de las muestras de orina en las distintas fases del ciclo reveló también diferencias significativas entre las pacientes con endometriosis y el grupo control. El incremento en los niveles de **GPC** detectado en las pacientes con endometriosis en fase luteal coincide con los resultados de un estudio metabolómico anterior (Jana *et al.*, 2013). El GPC y los ácidos grasos se liberan gracias a la acción consecutiva de dos enzimas, la fosfolipasa A2 (PLA2) y la lisofosfolipasa, sobre los fosfolípidos (Milkevitch *et al.*, 2005). La PLA2 es un enzima activado por citoquinas (Newton *et al.*, 1997) implicada en inflamación. Otros estudios previos en los que se analizaron muestras de tejido endometrial eutópico y ectópico reportaron un aumento en la actividad de este enzima tanto en la endometriosis ovárica como en la peritoneal (Burney, 2013). La alteración en las concentraciones de **treonina** también había sido descrita previamente en pacientes con endometriosis (Dutta *et al.*, 2012). La disminución en los niveles de orina de este aminoácido, observada en este estudio, podría explicarse por la activación del metabolismo de las proteínas en los procesos inflamatorios (Suliman *et al.*, 2005).

Las citoquinas inflamatorias, como la interleuquina-6 (IL-6), producidas por las lesiones endometriósicas, alteran de forma significativa los patrones de glicosilación de las proteínas de fase aguda (Piva *et al.*, 2003), proteínas del sistema inmune innato que actúan en respuesta al daño tisular y a procesos inflamatorios. La **fucosa** es una hexosa implicada en diferentes reacciones de glicosilación, que está presente en elevadas concentraciones sanguíneas en determinadas enfermedades malignas (cáncer de mama, cánceres ginecológicos, leucemia, cáncer de pulmón de célula pequeña), así como en algunos desórdenes benignos (Manjula *et al.*, 2010). La alteración en los niveles de fucosa concuerda con otros estudios (Berkes *et al.*, 2013; Piva *et al.*, 2003) donde se sugiere que la inflamación alteraría los patrones de fucosilación de las proteínas de la fase aguda y podría relacionarse con la disminución de este metabolito en las pacientes con endometriosis. Por otro lado, el aumento de los niveles de **pseudouridina** observado en las mujeres con endometriosis durante la fase luteal también ha sido observado en otras situaciones

patológicas (Rasmuson & Björk, 1995). La excreción de la pseudouridina no parece ser específica de ninguna condición maligna. Se ha descrito como un reflejo del recambio del ARN y podría ser considerado como un marcador de la actividad de la enfermedad (Rasmuson & Björk, 1995).

En general, los resultados obtenidos están de acuerdo con trabajos previos (Carvalho *et al.*, 2012; Dutta *et al.*, 2012; Jana *et al.*, 2013) y muestran cómo los metabolitos implicados en inflamación, estrés oxidativo y la respuesta inmune están relacionados con la presencia de endometriosis. Como se ha descrito anteriormente, la menstruación retrógrada y la presencia de endometrio ectópico en la cavidad peritoneal se asocia a una sobreproducción de prostaglandinas, citoquinas y quemoquinas, favoreciendo el crecimiento de las lesiones endometriósicas y promoviendo la angiogénesis (Vercellini *et al.*, 2014). Por tanto, los procesos asociados con la proliferación y supervivencia celular podrían estar jugando un papel crítico en el inicio, progresión y mantenimiento de la endometriosis.

En resumen, este estudio demuestra que el análisis por RMN de las muestras de orina constituye una herramienta no invasiva para la caracterización del perfil metabólico asociado a la endometriosis. Los resultados de este estudio, además, proporcionan información de gran utilidad para lograr una mejor comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a este proceso patológico. En estudios futuros será necesario validar los resultados empleando un mayor número de muestras, principalmente en los estadios tempranos (I/II) de la enfermedad. La firma metabólica de las mujeres en estadios iniciales constituiría el punto de partida para la identificación y validación de biomarcadores de diagnóstico temprano.

2. ESTUDIO DE PLASMA

El suero/plasma ha sido una de las matrices biológicas más utilizadas en los estudios dirigidos a la búsqueda de marcadores en el contexto de la medicina reproductiva y la ginecología (Banerjee *et al.*, 2014; Ueda *et al.*, 2010). Concretamente, en el caso de la endometriosis, como se recoge en la **Tabla 1**, han sido numerosos los estudios realizados empleando esta estrategia. En este sentido, se han propuesto como posibles biomarcadores de la endometriosis distintos tipos de glicoproteínas, citoquinas, hormonas, factores de crecimiento y angiogénicos, etc. A pesar de los esfuerzos realizados, en la actualidad, no existe ningún biomarcador o conjunto de biomarcadores que haya sido validado para su uso clínico como test diagnóstico para la endometriosis (Fassbender *et al.*, 2013).

La caracterización del perfil metabólico del plasma de pacientes con endometriosis podría contribuir no sólo al diagnóstico no invasivo de la enfermedad, sino también a proporcionar una nueva perspectiva sobre los procesos biológicos implicados en la endometriosis. Frente a la nula invasividad de las muestras de orina, el metaboloma del plasma sanguíneo tiene la ventaja de ser más estable. El perfil metabólico de la orina es el resultado de la interacción entre el metabolismo endógeno y la microbiota, sensible a la exposición a toxinas, fármacos o alteraciones medioambientales, lo que se traduce en una gran variabilidad interindividual.

2.1 Diseño experimental

El estudio realizado con muestras de plasma incluyó 96 voluntarias (58 pacientes con endometriosis y 38 controles). Las características clínicas y epidemiológicas de las mujeres incluidas en este estudio se describen en la **Tabla 12**.

Tabla 12: Caracterización clínica de las mujeres incluidas en el estudio metabolómico de plasma

	Grupo control (n=38)	Pacientes con endometriosis (n=58)
Edad		
Media ± DE (años)	34.84 ± 5.44	31.76 ± 6.39
FCM		
Fase folicular (días 1-14)	34	44
Fase luteal (días 15-28)	4	14
IMC (Kg/m²)		
Peso bajo (<18.50)	-	1
Peso normal (18.50-25.00)	25	54
Sobrepeso (>25.00)	5	2
Obesidad (>30.00)	8	1
Media ± DE (años)	24.80 ± 4.62	21.76 ± 2.70
Estadio de la enfermedad		
Mínima/Leve (I-II)	-	6
Moderada/Grave (III-IV)	-	52

n: tamaño muestral; DE: desviación estándar; FCM: fase del ciclo menstrual; IMC: índice de masa corporal

2.2 Perfil metabolómico de plasma

Los espectros de RMN de las muestras de plasma se adquirieron en un espectrómetro de 600 MHz de acuerdo con los protocolos descritos anteriormente, alternando muestras de ambos grupos de forma aleatoria y empleando una temperatura constante. Los perfiles de estas muestras, como se ha descrito previamente (Beckonert *et al.*, 2007), se caracterizan por su contenido en componentes de alto y bajo peso molecular lo que genera una amplia gama de picos con distintas anchuras, como se observa en la **Figura 30**. Estos espectros están dominados, principalmente, por señales anchas (proteínas y lipoproteínas) y las señales más finas (metabolitos de bajo peso molecular) se superponen sobre las anteriores. En los espectros de plasma se pueden distinguir distintos tipos de metabolitos, incluyendo carbohidratos, ácidos orgánicos, aminoácidos y lípidos.

El análisis de este tipo de espectros presenta dos grandes desafíos. Por un lado, minimizar la interferencia procedente de proteínas y lípidos presentes en estas muestras y, por otro, reducir la complejidad de los espectros, como consecuencia del solapamiento de señales, para tratar de cuantificar los metabolitos de forma individualizada (Nagana Gowda *et al.*, 2015).

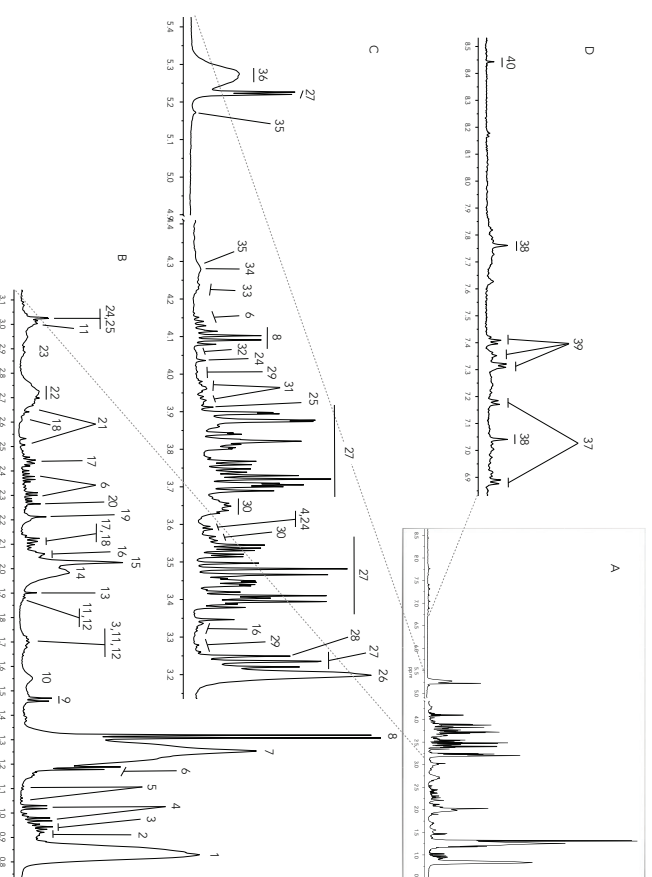


Figura 30: Asignación de un espectro representativo $^1\text{H-RMN CPMG}$ procedente del grupo de pacientes con endometriosis. La región del espectro correspondiente a las señales de la urea y el agua ha sido excluida del espectro. A) espectro completo; B, C, D) ampliaciones del espectro de plasma correspondientes a las regiones 0,7 – 3,10 ppm, 3,20 – 5,40 ppm y 6,90 – 8,50 ppm, respectivamente. Metabolitos asignados: 1, lipoproteínas: HDL, LDL, VLDL ($-\text{CH}_2$); 2, isoleucina; 3, leucina; 4, valina; 5, fucosa; 6, 3-hidroxibutirato; 7, lipoproteínas: HDL, LDL, VLDL ($-\text{CH}_2$); 8, lactato; 9, alanina; 10, ácidos grasos ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{CO}$); 11, lisina; 12, arginina; 13, acetato; 14, ácidos grasos insaturados ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$); 15, grupos N-acetilo (NAC); 16, prolina; 17, glutamina; 18, metionina; 19, ácidos grasos ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{CO}$); 20, acetoacetato; 21, citrato; 22, ácido grasos poliinsaturados ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$); 23, asparagina; 24, creatina; 25, creatina; 26, metabolitos de la colina (colina, fosocolina, glicerofosocolina); 27, glucosa; 28, trimetilamina-N-óxido (TMAO); 29, mioinositol; 30, glicerol; 31, serina; 32, colina; 33, treonina; 34, glicerofosocolina (GPC); 35, glicerol; 36, ácidos grasos ($-\text{CH}=\text{CH}-$); 37, tirosina; 38, histidina; 39, fenilalanina; 40, formato

Teniendo en cuenta la naturaleza de la muestra, se realizó un análisis exhaustivo del contenido no-polar mediante la adquisición de espectros de patrones lipídicos pertenecientes a distintas familias (**Figura 31**). Se seleccionaron un conjunto de compuestos con distinto grado de complejidad (longitud de la cadena lateral, insaturaciones, etc.) de las familias de lípidos más representativas identificadas en el metaboloma sanguíneo (Psychogios *et al.*, 2011).

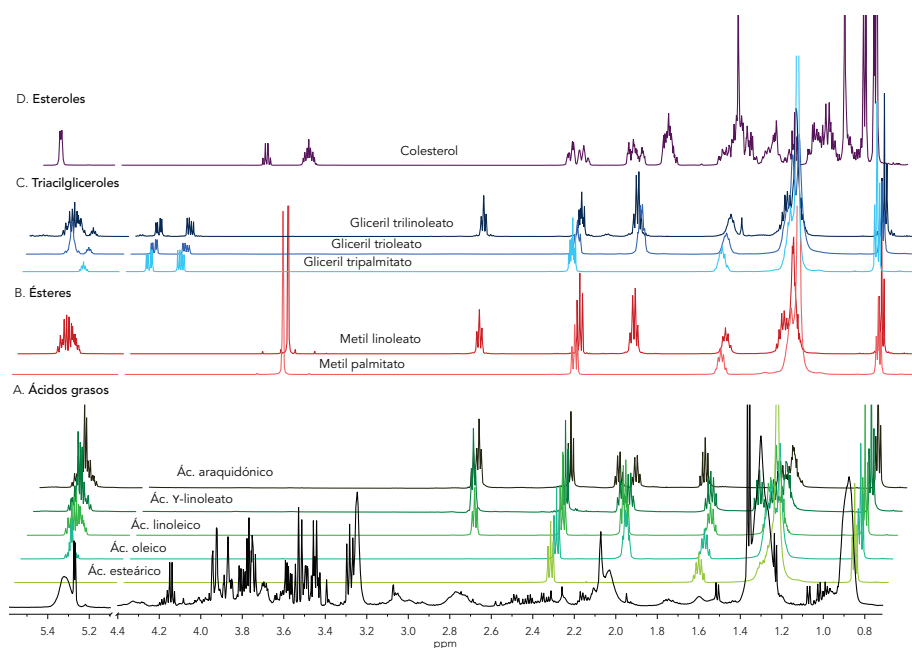


Figura 31: Espectros ^1H -RMN CPMG de los patrones lipídicos representativos de cuatro familias de lípidos adquiridos a 500 MHz. Superposición de los espectros de los distintos tipos de lípidos (A: ácidos grasos; B: ésteres; C: triacilglicéridos; D: esteroides) sobre un espectro representativo de plasma (negro)

La asignación detallada de cada uno de los patrones, como se muestra en la **Figura 32**, permitió la caracterización de las señales correspondientes a los metabolitos de naturaleza lipídica presentes en las muestras de plasma.

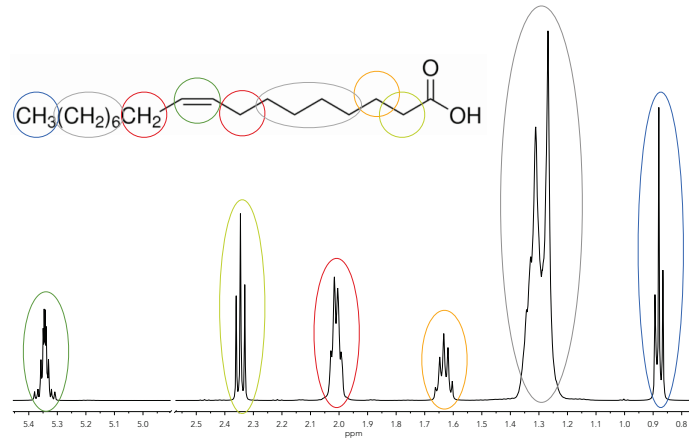


Figura 32: Asignación del espectro ^1H -RMN CPMG correspondiente al ácido oleico. El código de colores muestra los distintos ^1H que contribuyen a cada una de las señales del espectro

2.3 Homogeneidad de las muestras y detección de outliers

El análisis estadístico de los perfiles de plasma se llevó a cabo utilizando una matriz de datos construida a partir de los experimentos ^1H -RMN CPMG obtenidos para cada una de las muestras.

La descripción clínica de las mujeres (Tabla 12) permitió la identificación de diferencias relevantes en algunas de las características epidemiológicas entre ambos grupos, principalmente, con respecto al IMC. En este sentido, cabe destacar que el 34.21% (13/38) de las mujeres incluidas en el grupo control presentaban sobrepeso u obesidad frente al 5.17% (3/58) de las pacientes con endometriosis. Además, se observaron diferencias estadísticamente significativas no sólo entre los IMC (p -valor =0.001) de ambos grupos, sino también entre sus edades (p -valor =0.027). Estudios previos ya habían descrito esta distribución sesgada en los IMC entre casos y controles (Berkes *et al.*, 2013; Vouk *et al.*, 2012). Concretamente, en el conjunto de voluntarias incluidas en el estudio de Vouk y colaboradores, se observó que el 53.85% de las mujeres del grupo control presentaban sobrepeso u obesidad frente al 7.50% de las pacientes con endometriosis.

La distribución de IMC observada en este estudio podría conducir a diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles no asociadas, necesariamente, a la presencia/ausencia de endometriosis debido a diversos factores. En primer lugar, a la relación que existe entre la obesidad/IMC y el

contenido de lípidos en sangre (aumento de los niveles de lisofosfatidilcolina y disminución en los niveles de los éteres de fosfolípidos) (Pietilainen *et al.*, 2007). En segundo lugar, al impacto de las señales lipídicas en los espectros de plasma (**Figura 34**). Finalmente, a la asociación inversa que se ha descrito entre el riesgo de sufrir endometriosis y el IMC (Vitonis *et al.*, 2010). Sin embargo, estos hechos no permite descartar que la endometriosis no esté teniendo un efecto sobre el perfil lipídico de estas pacientes.

Por tanto, con el fin de evaluar la posible influencia de las diferencias clínicas en los perfiles metabólicos y, por tanto, en la discriminación entre mujeres con y sin endometriosis, se decidió analizar algunas de las señales lipídicas en ambos grupos de muestras. Se integraron 7 de las regiones más representativas (**Figura 33**) y se compararon sus niveles en ambos grupos de mujeres para confirmar si las diferencias en los IMC se reflejaba en el perfil lipídico de las muestras de plasma.

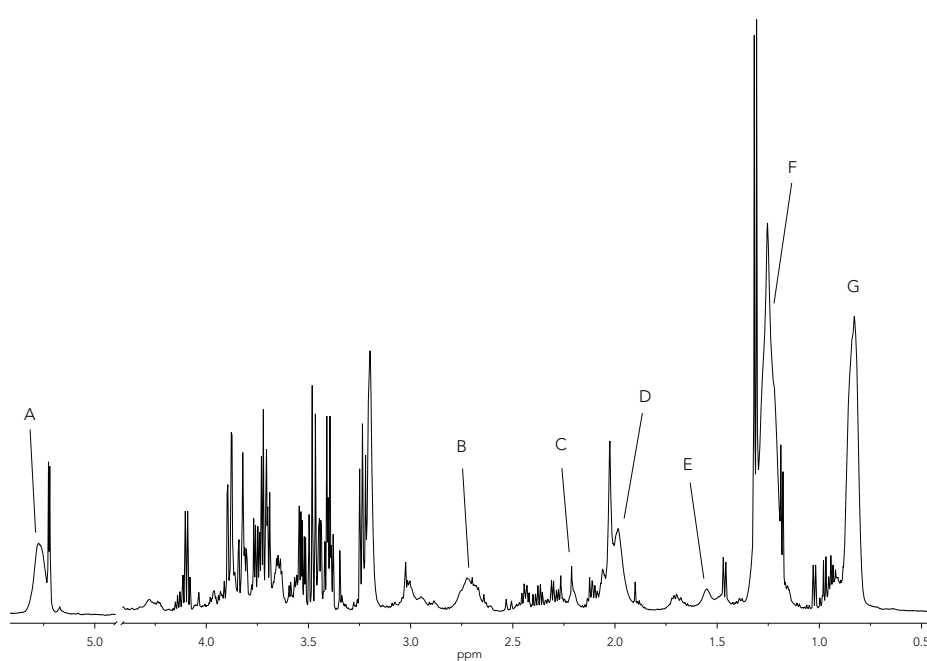


Figura 33. Asignación de las regiones lipídicas más representativas de los espectros de plasma. A) grupos $(-\text{CH}_3)_n$ de las lipoproteínas: HDL, LDL, VLDL; B) grupos $(-\text{CH}_2)_n$ de las lipoproteínas: HDL, LDL, VLDL; C) ácidos grasos $(-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CO}-)$; D) ácidos grasos insaturados: 18:1 (n-6) $(-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_n)$; E) ácidos grasos $(-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CO}-)$; F) ácidos grasos poliinsaturado 18:2 (n-6), 20:4 (n-6), 22:6 (n-3) $[(-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH})_4-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_n]$; G) lípido olefínico $(-\text{CH}=\text{CH}-)$

III. Resultados y desarrollo argumental

La **Tabla 13A** muestra los resultados de la comparación del contenido lipídico entre ambos grupos de muestras, donde se observan diferencias estadísticamente significativas en dos de las regiones lipídicas integradas. Esta misma comparación se realizó empleando únicamente el conjunto de pacientes con endometriosis y mujeres del grupo control que cumplían el criterio de inclusión: IMC normales (≤ 25) y edad ≤ 40 años (**Tabla 13B**), definido previamente en otros estudios de endometriosis con este mismo objetivo (Berkes *et al.*, 2013; Dutta *et al.*, 2012; Jana *et al.*, 2013). En este segundo caso, las diferencias significativas entre los IMC desaparecían y se reducían, en general, las diferencias en las regiones lipídicas analizadas. Por tanto, al igualar los IMC entre ambos grupos, aumentaba la probabilidad de que las potenciales diferencias que se identificaran entre las mujeres con y sin endometriosis no estuviesen asociadas a la diferente distribución en los IMC.

Tabla 13: Comparación de las regiones lipídicas de las pacientes con endometriosis respecto a las controles

	A. Pacientes con endometriosis (n=58) vs. Grupo control (n=34)				B. Pacientes con endometriosis (n=50) vs. Grupo control (n=23)			
	Endometriosis (X ± DE)	Controles (X ± DE)	p-valor ^a	% variación ^b	Endometriosis (X ± DE)	Controles (X ± DE)	p-valor ^a	% variación ^b
Edad	31.76±6.39	34.84±5.44	0.027*	-8.85	31.06±5.52	34.30±5.04	0.016*	-9.46
IMC	21.77±2.70	24.80±4.62	0.001*	-12.25	21.15±1.55	21.99±1.69	0.058	-3.84
A	0.0279±0.0038	0.0288±0.0053	0.330	-3.32	0.0279±0.0035	0.0280±0.0061	0.748	-0.321
B	0.0141±0.0017	0.0139±0.0021	0.669	1.21	0.0141±0.0016	0.0138±0.0025	0.593	2.14
C	0.0095±0.0029	0.0115±0.0045	0.023*	-17.64	0.0095±0.0027	0.0113±0.0042	0.101	-15.93
D	0.0373±0.0031	0.0381±0.0030	0.093	-2.01	0.0375±0.0030	0.0373±0.0031	0.821	0.50
E	0.0104±0.0033	0.0128±0.0047	0.005*	-18.51	0.0103±0.0031	0.0124±0.0044	0.033*	-16.61
F	0.1888±0.0311	0.2034±0.0406	0.063	-7.17	0.1884±0.0296	0.1957±0.0344	0.361	-3.74
G	0.1253±0.0092	0.1216±0.0060	0.068	2.99	0.1254±0.0086	0.1193±0.0091	0.017*	5.12

X: media; DE: desviación estándar; n: tamaño muestral; IMC: índice de masa corporal; ^ap-valor calculado mediante el test de la U de Mann-Whitney; ^bvariaciones relativas en la intensidad de los metabolitos de las pacientes con endometriosis con respecto al grupo control; A-G: regiones lipídicas de los espectros de plasma asignadas en la figura 33

III. Resultados y desarrollo argumental

El análisis se prosiguió con las 73 mujeres (controles, $n=23$; endometriosis, $n=50$) que cumplían el criterio clínico definido ($IMC \leq 25$ y $edad \leq 40$). En este conjunto de muestras se llevó a cabo un análisis exploratorio, a través de la inspección visual de los espectros 1H -RMN CPMG y un análisis no supervisado de PCA, para evaluar la variabilidad presente en cada uno de los grupos de estudio. El análisis consistió en:

- A. La caracterización de las regiones del espectro que tenían un mayor impacto en la **distribución** de las muestras en el espacio, combinando la información proporcionada por los *score plots* y sus correspondientes *loading plots*.
- B. La identificación de los **outliers**, utilizando los gráficos de T^2 de Hotelling y DModX que definen los **outliers** extremos y moderados, respectivamente. Para ello, se inspeccionaron todos los componentes relevantes de cada gráfico de PCA.
- C. La evaluación de la **homogeneidad** de cada uno de los grupos. Se analizó el posible impacto de las distintas variables clínicas en los perfiles de plasma para descartar la existencia de tendencias debidas a alguna variable distinta a la considerada (presencia/ausencia de endometriosis).

A. Variabilidad muestral

En ambos grupos el *loading plot* muestra cómo las regiones del espectro correspondientes al lactato y las regiones lipídicas (grupos $-CH_2$ y $-CH_3$ de las lipoproteínas) son las responsables de la mayor parte de la variabilidad entre las muestras. El escalado de los espectros con Pareto hace que estas señales, las más intensas y variables del espectro, sean las más influyentes en la distribución de las muestras en el espacio (**Figura 34**). Tras evaluar varios métodos de escalado, se observó que con Pareto la discriminación entre los grupos (análisis supervisado) era ligeramente mejor.

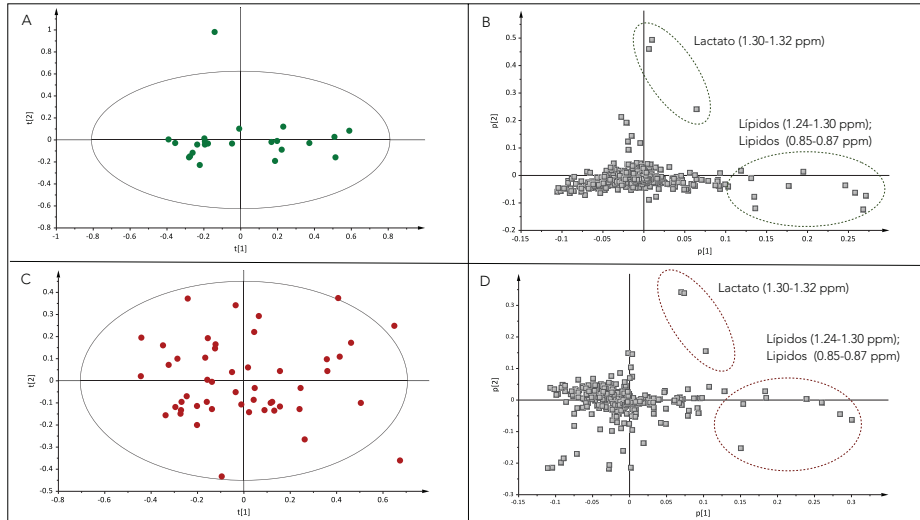


Figura 34: Análisis no supervisado de PCA de las mujeres con y sin endometriosis. A) *score plot* y B) *loading plot* del grupo control; C) *score plot* y D) *loading plot* del grupo de pacientes con endometriosis

B. Identificación de outliers

- Grupo Endometriosis

En el grupo de pacientes con endometriosis se identificaron varias muestras que se encontraban fuera del intervalo de confianza del 95% definido por la elipse del *score plot* (Figura 35). A diferencia de lo que se observó en relación con las muestras de orina, en este caso, no existía ninguna razón clínica, contaminación o error instrumental durante la adquisición que justificara la exclusión de estas muestras del estudio como *outliers*.

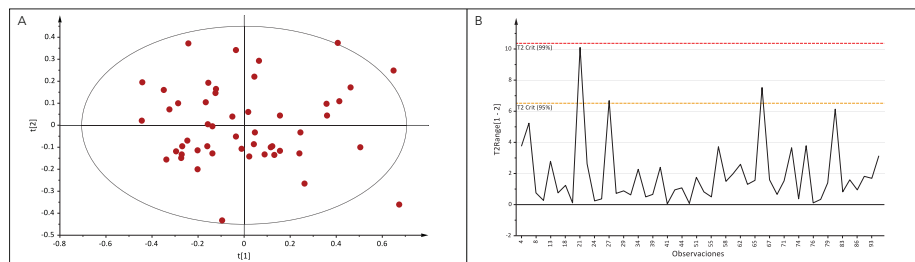


Figura 35: Identificación de *outliers* del grupo de pacientes con endometriosis mediante análisis no supervisado de PCA. A) *score plot* del grupo de pacientes con endometriosis (n=50); B) gráfico T^2 de Hotelling donde se observan varias muestras fuera del intervalo de confianza al 95%, pero sin que exista justificación clínica ni de otro tipo para ser excluidas como *outliers*

- Grupo Control

La inspección de los gráficos T^2 de Hotelling y DModX, correspondientes a los distintos componentes principales del modelo, permitió identificar distintos tipos de *outliers* (Figura 36). En todos los casos, la identificación de las señales responsables del comportamiento anómalo de estas muestras permitió su exclusión justificada del estudio. Las señales de la muestra C85 pudieron ser explicadas con los resultados de la bioquímica de sangre realizada antes de la cirugía. En el caso de las muestras C10 y C46, las señales correspondían a una contaminación descrita previamente en suero (Tabla 14).

Además, como se observa en el *score plot* y en el gráfico T^2 de Hotelling (Figura 36), la muestra C69 también aparecía fuera del límite del 95% debido a que presentaba niveles elevados de lactato. Sin embargo, no se encontró ninguna razón clínica o error instrumental que justificara la exclusión de esta muestra y se consideró que estos niveles de lactato podrían formar parte de la variabilidad presente en la población general.

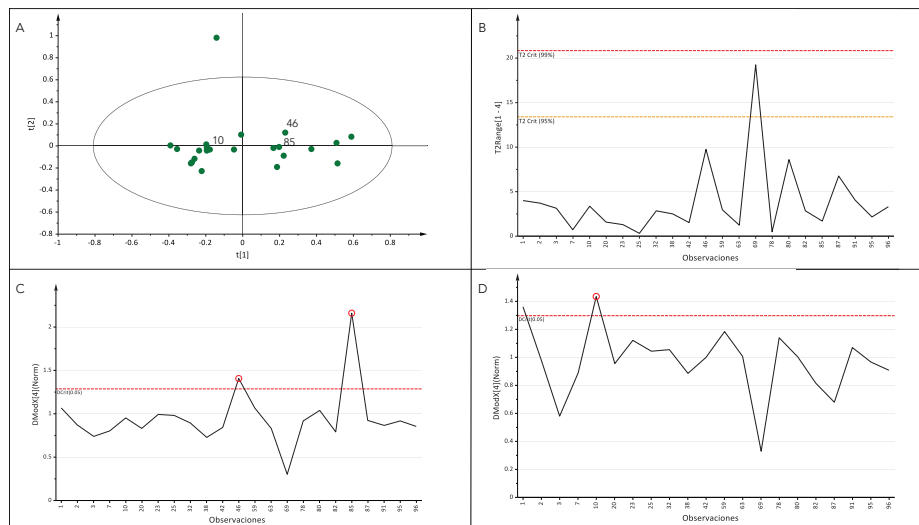


Figura 36: Identificación de *outliers* del grupo de mujeres incluidas en el grupo control mediante análisis no supervisado de PCA. A) *score plot* del grupo control (n=23); B) gráfico T^2 de Hotelling donde aparece la muestra C69 como *outlier* extremo aunque no se pudo justificar su eliminación; C y D) gráficos DModX donde se aparecen las muestras C46, C85 y C10 como *outliers* moderados

Control C85: Los niveles elevados de N-acetil-glutamato (Figura 37) responden probablemente a la alteración de las transaminasas observada en la analítica de sangre (Tabla 14). El N-acetil-glutamato es un aminoácido acetilado sintetizado a partir del glutamato y el acetil-CoA por el enzima N-acetil-glutamato sintasa

(NAGS) (Acetil-CoA + L-glutamato \leftrightarrow CoA + N-acetil-L-glutamato). La transaminasas AST (aspartato aminotransferasa) y ALT (alanina aminotransferasa) catalizan las siguientes reacciones: aspartato + α -cetoglutarato \leftrightarrow oxalacetato + glutamato y alanina + α -cetoglutarato \leftrightarrow piruvato + glutamato, respectivamente, lo que justificaría la producción de glutamato y su posterior transformación en N-acetil-glutamato identificado en el espectro de RMN.

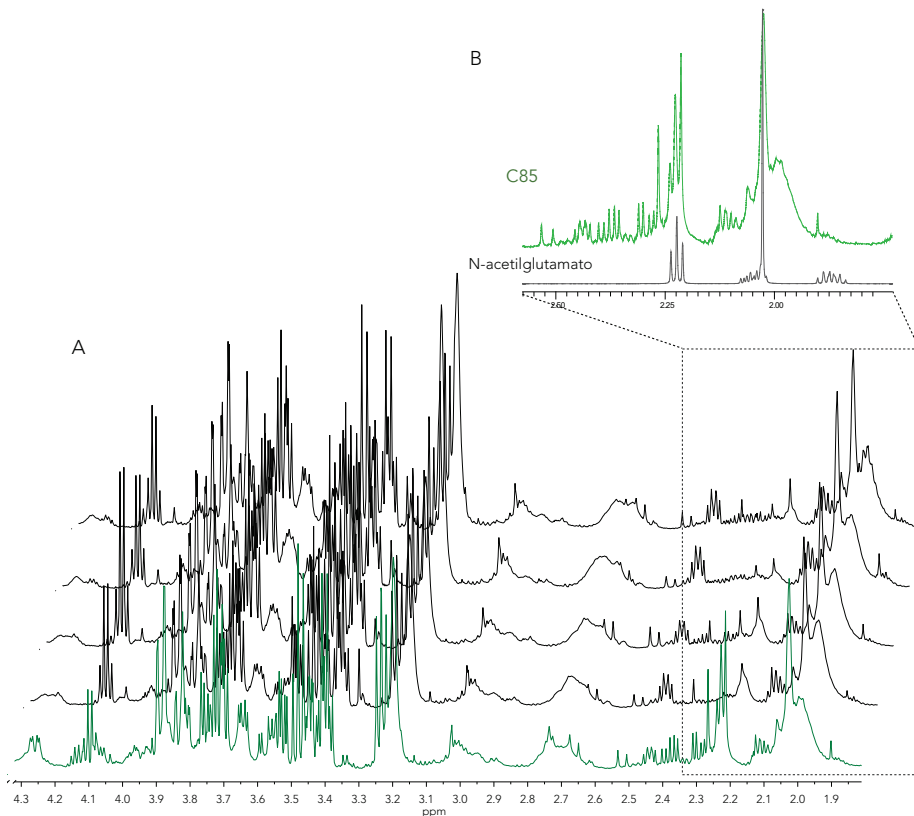


Figura 37: Espectro ^1H -RMN CPMG de la muestra C85 identificada como *outlier* en el grupo control. A) comparación de la muestra C85 (verde), donde se indican las señales responsables de su comportamiento anómalo, con respecto a un conjunto de muestras representativas de su grupo (negro); B) superposición del patrón de N-acetil-glutamato (gris) sobre el espectro de la muestra C85 (verde)

Controles C10 y C46: los espectros de ambas muestras presentaban señales correspondientes al propilenglicol, compuesto minoritario descrito en suero con concentraciones similares a las de metabolitos como la creatina o el acetato (Figura 30) (Psychogios *et al.*, 2011). El estudio de Psychogios y

III. Resultados y desarrollo argumental

colaboradores describe concentraciones elevadas de este compuesto como una contaminación exógena. Se trata de un compuesto ampliamente utilizado como disolvente en la industria farmacéutica, en cosméticos, alimentos, etc. La intensidad de las señales observada en los espectros de estas dos muestras (Figura 38) sería compatible con una contaminación, probablemente producida durante la recogida de las muestras.

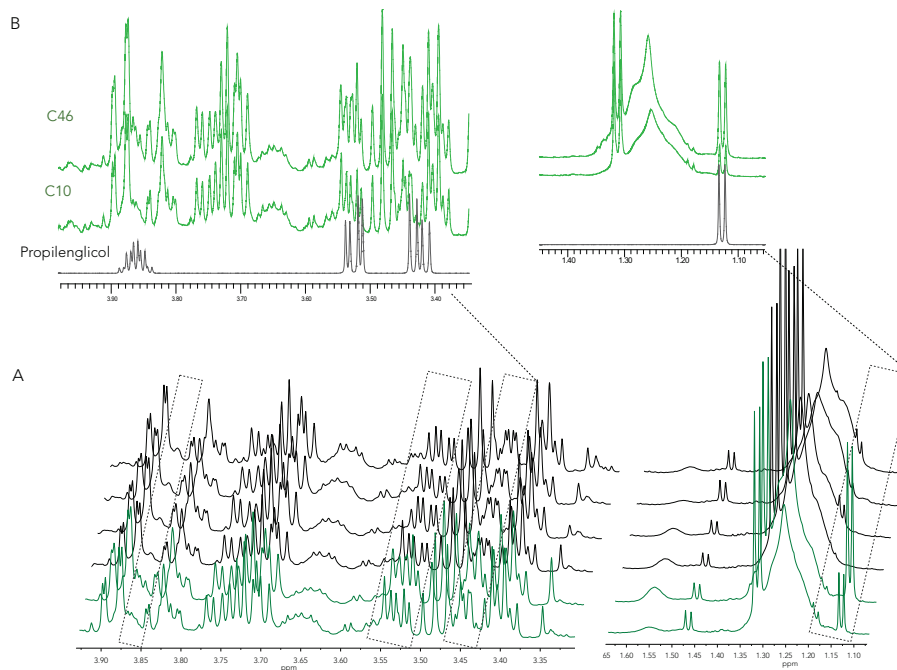


Figura 38: Espectros ^1H -RMN CPMG de las muestras C10 y C46 identificadas como *outliers* en el grupo control. A) comparación de las muestras C10 y C46 (verde), donde se indican las señales responsables de su comportamiento anómalo, con respecto a un conjunto de muestras representativas de su grupo (negro); B) superposición del patrón de propilenglicol (gris) sobre los espectros de ambas muestras (verde)

Tabla 14: Resumen muestras excluidas en el grupo control como *outliers*

Muestra	Tipo de <i>outlier</i>	Metabolitos	Justificación del perfil identificado
C85	Moderado	N-acetil-glutamato elevado	AST/GOT [0-31]: 44* ALT/GPT [0-31]: 49* GGT [7-32]: 128* FA [7-32]: 114*
C46, C10	Moderado	propilenglicol: contaminación	(Psychogios et al., 2011)

ICM: índice de masa corporal; TAG: triacilglicéridos, CT: colesterol total; AST/GOT: aspartato aminotransferasa/glutamato-oxalacetato transaminasa; ALT/GPT: alanina

aminotransferasa/glutamato-piruvato transaminasa; GGT: γ -glutamil transpeptidasa; FA: fosfatasa alcalina; * valores que se encuentran fuera del rango considerado como normal

C. Homogeneidad muestral

Tras la exclusión de los *outliers*, se evaluó el posible efecto de otras variables clínicas (FCM, estadio de la enfermedad, etc.) e instrumentales (día de adquisición de los experimentos, etc.) en la distribución de las muestras siguiendo el mismo procedimiento que en el estudio de orina. El análisis de PCA (Figura 39) no reveló ninguna tendencia o subgrupo que respondiera a las variables evaluadas.

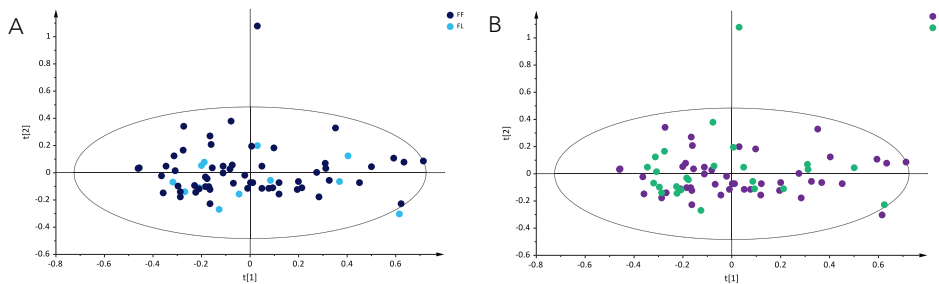


Figura 39: Análisis no supervisado mediante PCA de todas las muestras incluidas en el estudio. Las muestras han sido coloreadas en función de distintas variables. A) FCM: FF, fase folicular; FL, fase luteal; B) día de adquisición de los experimentos de RMN

De forma análoga a lo que sucedía en el estudio de orina, en el grupo de pacientes con endometriosis, los estadios tempranos de la enfermedad sólo estaban representados por 6 pacientes. En la Figura 40 se observa como las muestras de plasma procedentes de pacientes en estadios tempranos (II) y avanzados (III/IV) se distribuyen de forma homogénea en el *score plot*, no observándose ninguna agrupación debido al estadio de la enfermedad.

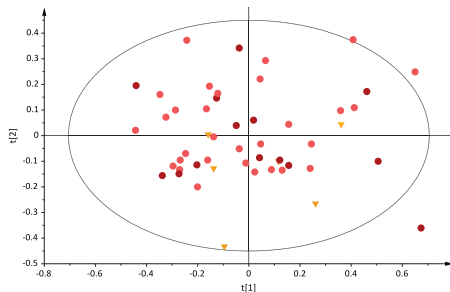


Figura 40: Análisis no supervisado mediante PCA de las pacientes de endometriosis. Las muestras han sido coloreadas en función del estadio de la enfermedad

2.4 Discriminación entre controles y pacientes con endometriosis

2.4.1 Análisis estadístico multivariante

Una vez finalizado el análisis no supervisado, se llevó a cabo el análisis discriminante entre ambos grupos de muestras (controles, $n=20$; pacientes con endometriosis, $n=50$) utilizando el método supervisado OPLS-DA. El modelo resultante, tras la comparación de los perfiles $^1\text{H-RMN CPMG}$ de ambos grupos, mostró una baja capacidad discriminante, con unos valores de $R^2Y=0.268$ y $Q^2=0.137$ (Figura 41).

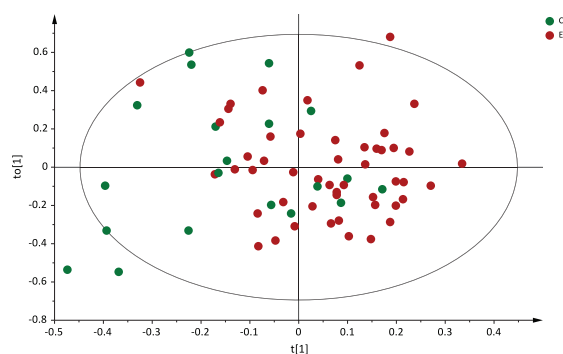


Figura 41: Análisis estadístico supervisado. Score plot del modelo OPLS-DA obtenido de la comparación de los espectros $^1\text{H-RMN CPMG}$ procedentes del grupo de pacientes con endometriosis (rojo) y del grupo control (verde)

Teniendo en cuenta la baja capacidad discriminante del modelo obtenido, se realizó una selección de variables, con el fin de conservar únicamente las variables relevantes en la separación entre ambos grupos de muestras. Para ello, se utilizó la misma estrategia que en el estudio de orina y se seleccionaron sólo aquellas variables o regiones del espectro cuya relación $\text{CoeffCS}/\text{CoeffCSvSE} > 1$. En este nuevo modelo OPLS-DA, construido con el 41.34% de las variables, sólo se consiguió incrementar ligeramente los valores de R^2Y y Q^2 ($R^2Y = 0.283$ y $Q^2 = 0.187$). Sin embargo, a diferencia de lo que sucedía en el análisis multivariante de orina, el test de permutación no reveló sobreajuste en el modelo, y los valores de R^2Y y Q^2 obtenidos tras las 100 permutaciones se ajustaban a los límites recomendados (Figura 42).

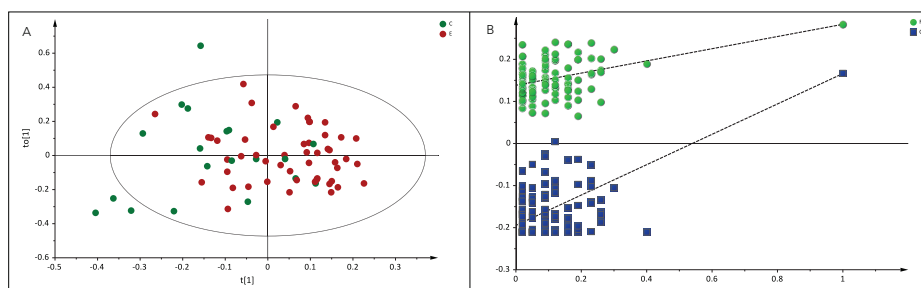


Figura 42: Análisis estadístico supervisado y validación interna tras la selección de variables. A) modelo OPLS-DA obtenido de la comparación de los espectros $^1\text{H-RMN CPMG}$ procedentes del grupo de pacientes con endometriosis (rojo) y controles (verde) excluyendo las variables identificadas como no relevantes en la discriminación entre ambos grupos; B) test de permutación (100 permutaciones aleatorias) obtenido a partir del modelo PLS-DA con un número de componentes equivalentes al modelo OPLS-DA. El eje Y representa los valores de R^2Y (verde) y Q^2 (azul) para cada uno de los 100 modelos permutados con respecto a los valores del modelo original y el eje X muestra los coeficientes de correlación entre los modelos permutados y el modelo original

2.5 Identificación y cuantificación de los metabolitos asociados a la endometriosis

El análisis estadístico multivariante, al igual que en orina, no permitió la obtención de modelos fiables capaces de discriminar entre las pacientes con endometriosis y las mujeres del grupo control. La identificación de los metabolitos que diferían significativamente entre ambos grupos se llevo a cabo mediante una aproximación univariante que incluyó dos etapas. La primera consistió en la integración de todas las señales presentes en el espectro empleando un *bucketing* de anchura variable. En la segunda parte de análisis, se deconvolucionaron los espectros para resolver el problema de solapamiento de señales e integrar de forma aislada los metabolitos de interés.

I. *Bucketing* de anchura variable de todo el espectro

La integración de todo el espectro se realizó utilizando un *bucketing* de anchura variable. Se seleccionaron un total de 52 regiones que fueron integradas y normalizadas respecto a la intensidad total del espectro en AMIX (Bruker, BioSpin). El p -valor correspondiente a cada metabolito se determinó utilizando el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney (Tabla 15).

III. Resultados y desarrollo argumental

Tabla 15: Variaciones de los metabolitos basadas en *bucketing* variable

Pacientes con endometriosis (n=50) vs. Grupo control (n=20)				
δ ¹ H (ppm) ^a	Metabolito	Multiplicidad	p-valor ^b	% variación ^c
8.4495-8.4375	Formato	s	0.384	3.62
8.1895-8.1605	U1	d	0.668	-1.56
7.4305-7.3905	Fenilalanina	t	0.897	-1.58
7.0515-7.0305	Histidina	s	0.897	0.00
6.8955-6.8695	Tirosina	d	0.825	-2.00
5.3465-5.2315	Ác. grasos (-CH=CH-)	m	0.959	-1.57
5.2005-5.1555	Glicerol	m	0.056	-26.70
4.3055-4.2645	Glicerol/GPC	m	0.207	7.16
4.2465-4.2045	Treonina	m	0.533	-3.86
4.1225-4.0735	Lactato	q	0.356	-14.61
4.0715-4.0425	Mioinositol/Lípido	t	0.073	-21.97
3.9695-3.9555	Serina	m	0.550	5.16
3.9155-3.9075	Creatina	s	0.059	11.02
3.8475-3.7955	Glucosa	m	0.866	1.18
3.6595-3.6215	Glicerol	m	0.050	7.31
3.6045-3.5815	Valina/GPC	d	0.025*	9.45
3.3545-3.3415	U2	s	0.435	10.62
3.3405-3.3205	Prolina	m	0.398	5.30
3.2555-3.2405	TMAO/Glucosa	s	0.247	5.00
3.2145-3.1665	Metabolitos de la colina	m	0.004*	14.22
3.1405-3.1295	U3	s	0.507	-27.04
3.0595-3.0365	U4	d	0.237	5.29
3.0355-3.0205	Creatina/Creatinina	s	0.370	4.48
3.0195-2.9875	Lisina	t	0.067	7.07
2.9645-2.9155	U5	m	0.079	8.94
2.9145-2.8635	U6	m	0.073	10.66
2.8155-2.7815	U7	m	0.135	-45.84
2.7815-2.6945	Ác.grasos (-CH=CH-CH ₂ -CH=CH-)	m	0.716	1.78
2.6235-2.5965	Metionina	t	0.073	12.41
2.5395-2.5005	Citrato	d	0.927	2.38
2.4635-2.4155	Glutamina	m	0.172	5.01
2.3595-2.3515	Piruvato	s	0.687	-15.10
2.3145-2.2955	3-hidroxiacetato	d	0.176	22.45
2.2715-2.2595	Acetoacetato	s	0.304	16.31
2.2415-2.1645	Ác. grasos (-CH ₂ -CH ₂ CO)	m	0.227	-12.08
2.1425-2.0815	Glutamato/Glutamina	m	0.304	3.21
2.0455-2.0145	NAC	m	0.232	-2.34
2.0135-1.9065	Ác. grasos (-CH ₂ -CH ₂ -CH=CH-)	m	0.311	-1.05
1.9055-1.8955	Acetato	s	0.668	0.95
1.8935-1.8585	Arginina/Lisina	m	0.181	5.53
1.7475-1.6525	Leucina/Arginina/Lisina	m	0.189	6.22
1.6055-1.5165	Ác. grasos (-CH ₂ -CH ₂ CO)	m	0.081	-13.77
1.4765-1.4515	Alanina	d	0.128	6.18
1.2995-1.1925	Lipoprot.: HDL, LDL, VLDL (-CH ₂) _n	m	0.413	-3.75

1.0665-1.0425	Fucosa	d	0.056	9.36
1.0395-1.0085	Valina	d	0.002*	16.28
1.0045-0.9845	Isoleucina	d	0.011*	11.17
0.9595-0.9265	Leucina/Isoleucina	t	0.027*	7.54
0.8925-0.7725	Lipoprot.: HDL, LDL, VLDL (-CH ₃)	m	0.034*	4.82
0.6925-0.6615	U8	m	0.237	-8.46
0.6606-0.6125	Colesterol	m	0.122	8.21

^arango de desplazamientos químicos de las regiones del espectro integradas; ^bp-valor calculado mediante el test de la U de Mann-Whitney; ^cvariaciones relativas en la intensidad de los metabolitos de las pacientes con endometriosis respecto a las mujeres del grupo control. GPC: glicerosfocolina, NAC: grupos N-acetilo; Ui: metabolito desconocido. Multiplicidad (s: singlete; d: doblete; t: triplete; m: multiplete)

Como se muestra en la **Figura 43**, en prácticamente todas las regiones identificadas como relevantes (p -valor <0.05) en la discriminación entre controles y pacientes con endometriosis existe solapamiento de varios metabolitos. Mediante la deconvolución de los espectros se trató de extraer la información contenida en estas regiones y analizar las señales de forma aislada para identificar qué metabolitos estaban contribuyendo a las diferencias entre ambos grupos.

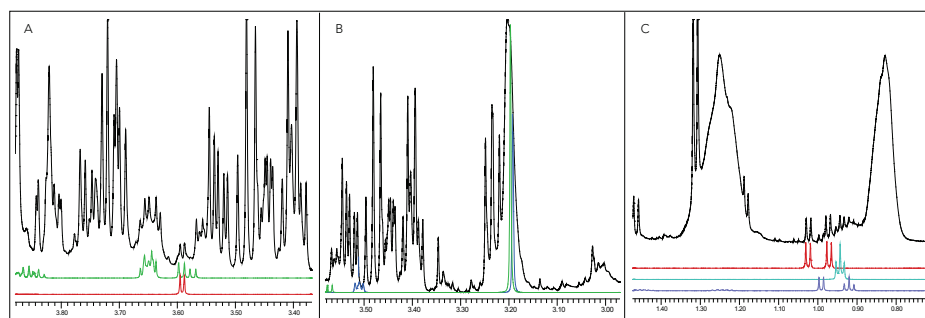


Figura 43: Regiones estadísticamente significativas con solapamiento de señales. Superposición de un espectro ¹H-RMN CPMG representativo de plasma (negro) con los patrones de los metabolitos identificados en las regiones significativas. A) región 3.6045-3.5815 ppm: valina (rojo), GPC (verde); B) región 3.2145-3.1665 ppm: GPC (verde), colina (azul); C) región 1.039-0.9265 ppm: valina (rojo), leucina (azul), isoleucina (morado)

II. Análisis de los espectros deconvolucionados

La descomposición de los espectros se llevó a cabo mediante el algoritmo GSD de MNova (MestReNova v8.1.2). Tras el alineamiento y deconvolución de los espectros, sólo se integraron aquellas señales que presentaban un buen alineamiento y estaban completamente aisladas del resto de metabolitos.

III. Resultados y desarrollo argumental

Las señales integradas se normalizaron respecto al área total de su correspondiente espectro deconvolucionando y se analizaron mediante estadística univariante utilizando el test de la U de Mann-Whitney. Los metabolitos con *p*-valores <0.05 fueron considerados estadísticamente significativos entre ambos grupos de muestras (Tabla 16).

Tabla 16: Variaciones de los metabolitos basadas en los espectros deconvolucionados

Pacientes con endometriosis (n=50) vs. Grupo control (n=20)				
δ ¹ H (ppm) ^a	Metabolito	Multiplicidad	<i>p</i> -valor ^b	% variación ^c
8.446-8.439	Formato	s	0.156	13.19
8.184-8.162	U1	d	0.576	-28.90
7.428-7.397	Fenilalanina	t	0.979	-0.06
7.190-7.180	Tirosina	s	0.765	1.04
7.045-7.039	Histidina	s	0.726	-1.34
5.229-5.216	Glucosa	d	0.845	-1.30
4.144-4.124	3-hidroxi butirato	m	0.075	41.06
4.117-4.077	Lactato	q	0.281	-17.13
4.040-4.031	Creatinina	s	0.031*	-11.11
3.945-3.937	Serina	m	0.835	-3.06
3.915-3.909	Creatina	s	0.069	19.98
3.847-3.798	Glucosa	m	0.755	3.32
3.598-3.585	Valina/GPC	d	0.003*	20.28
3.307-3.298	Prolina	m	0.507	0.59
3.290-3.285	Mioinositol	t	0.677	2.27
3.210-3.179	Metabolitos de la colina	m	0.005*	12.93
2.536-2.529	Citrato	s	0.835	1.97
2.268-2.262	Acetoacetato	s	0.237	22.51
2.139-2.082	Glutamina	m	0.483	3.17
2.028-2.020	NAC	s	0.475	5.68
1.905-1.898	Acetato	s	0.391	7.07
1.895-1.876	Lisina/Arginina	m	0.047*	16.50
1.744-1.729	U3	m	0.073	22.52
1.475-1.454	Alanina	d	0.247	5.83
1.426-1.410	U4	d	0.164	-17.43
1.408-1.388	U5	t	0.391	12.10
1.065-1.046	Fucosa	d	0.006*	20.20
1.001-0.984	Isoleucina	d	0.135	11.40
0.983-0.966	Valina	d	0.003*	18.99
0.958-0.941	Leucina	t	0.311	6.17

^arango de desplazamientos químicos de las regiones del espectro integradas; ^b*p*-valor calculado mediante el test de la U de Mann-Whitney; ^cvariaciones relativas en la intensidad de los metabolitos de las pacientes con endometriosis respecto a las mujeres del grupo control. NAC: grupos N-acetilo; Ui: metabolito desconocido. Multiplicidad (s: singlete; d: doblete; t: triplete; m: multiplote)

Se observó que el plasma procedente de pacientes con endometriosis, en relación al grupo control, presentaba niveles elevados de valina, fucosa, metabolitos derivados de la colina y la región correspondiente a la lisina y arginina, así como niveles reducidos de creatinina (Tabla 16).

La deconvolución supuso un aumento significativo de la complejidad de los espectros al revelar las señales solapadas en el espectro original pero, al mismo tiempo, permitió obtener una mayor resolución, aislando los picos y evitando la influencia de las regiones próximas (Figura 44).

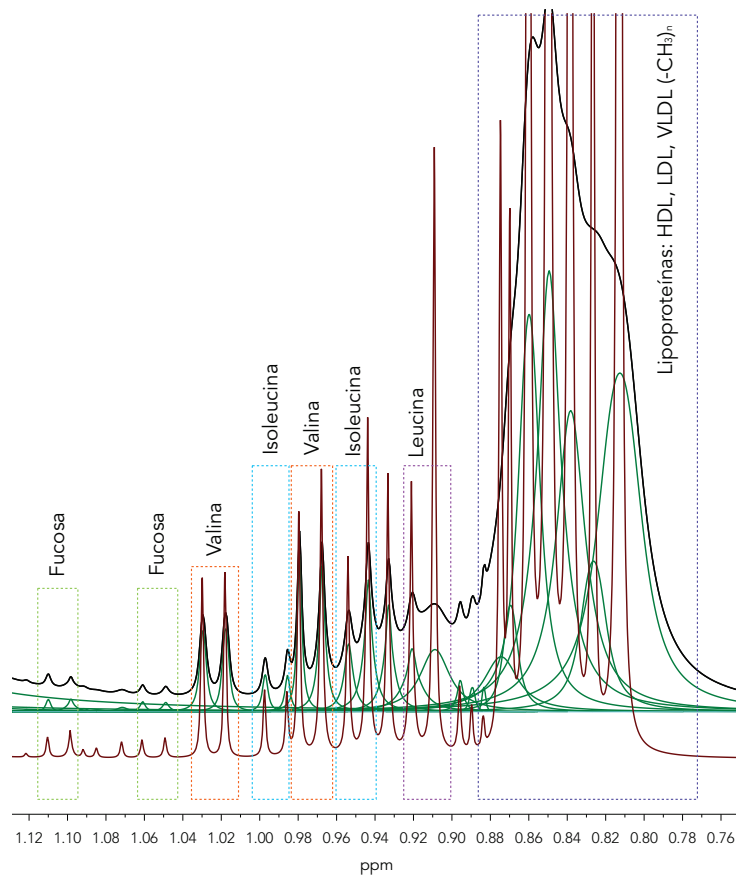


Figura 44: Región representativa de un espectro de plasma $^1\text{H-RMN}$ CPMG deconvolucionado. El algoritmo GSD descompone el espectro en el conjunto de picos que lo componen generando un espectro sintético (rojo) con resolución de 1 Hz. La región entre 1.12 -0.90 ppm permite la integración aislada de la fucosa, valina, isoleucina y leucina

En términos generales, este análisis de deconvolución permitió:

1. Verificar la significancia de algunas de las regiones identificadas previamente a la descomposición de los espectros: valina, metabolitos que contienen colina, región de la lisina/arginina.
2. Evidenciar algún posible falso positivo, es decir, metabolitos que habían sido identificados como significativos entre controles y endometriosis, previamente a la deconvolución, pero que al aumentar la resolución de los espectros y analizarlos de forma aislada dejaron de serlo: leucina e isoleucina.
3. Descubrir algún posible falso negativo, es decir, señales que por estar solapadas con otros metabolitos no se identificaron como significativas pero que, al ser analizadas separadamente, presentaban diferencias estadísticamente significativas (p -valor < 0.05) entre ambos grupos: fucosa, creatinina.

Por tanto, este segundo análisis no se restringió a las regiones identificadas como significativas en el análisis de *bucketing* variable, sino que se intentaron descomponer todas aquellas regiones en las que el solapamiento entre metabolitos pudiera estar enmascarando diferencias relevantes entre ambos grupos.

2.6 Interpretación biológica

En la actualidad existen muy pocos estudios que relacionen la endometriosis con alteraciones en los niveles de metabolitos específicos. Solamente tres de ellos, dos en suero y uno en plasma, han estado dirigidos a la identificación de un grupo relativamente grande de metabolitos relacionados con la endometriosis (Dutta *et al.*, 2012; Jana *et al.*, 2013; Vouk *et al.*, 2012).

Los resultados de este estudio metabolómico revelan que las pacientes con endometriosis presentan una firma metabólica específica caracterizada por niveles aumentados de metabolitos que contienen colina (MCCs), fucosa, valina, la región correspondiente a la lisina/arginina y los grupos CH_3 procedentes de las lipoproteínas, así como una disminución en los niveles de creatinina.

Tal y como se ha expuesto anteriormente, la endometriosis es un proceso inflamatorio caracterizado por la capacidad del tejido endometrial de crecer, infiltrar y diseminarse de forma similar al tejido tumoral. Un estudio previo (Berkes *et al.*, 2013; Manjula *et al.*, 2010) estableció un paralelismo entre el

cáncer y la endometriosis y propuso que la glicosilación, un proceso implicado en la comunicación celular, respuesta inmune, inflamación y progresión tumoral (Berkes *et al.*, 2013; Manjula *et al.*, 2010), también podría estar jugando un papel importante en la patogénesis y progresión de la endometriosis. Así, Berkes y colaboradores (Berkes *et al.*, 2013; Manjula *et al.*, 2010) en su estudio encontraron alteraciones en el glicoma del plasma de pacientes con endometriosis que conectarían ambos procesos. Esto explicaría los elevados niveles de **fucosa** presentes en las muestra de plasma de las pacientes con endometriosis con respecto al grupo control. Nuestros resultados concuerdan con los reportados en otros estudios donde se ha observado que las concentraciones séricas de fucosa están aumentadas tanto en cáncer (cáncer de mama, cánceres ginecológicos, leucemia, etc.), como en enfermedades benignas (Manjula *et al.*, 2010). La causa de los niveles altos de fucosa en suero ha sido atribuida a la liberación de glicoproteínas como consecuencia de la destrucción tisular o de la síntesis local por parte de las células tumorales (Manjula *et al.*, 2010; Shetty *et al.*, 2013).

Entre los metabolitos que contienen colina (**MCCs**) se encuentran la colina, la fosfocolina y la glicerofosfocolina (GPC) (Griffin *et al.*, 2001), constituyentes clave de las membranas celulares. Estos compuestos proceden de la degradación de los fosfolípidos de colina por la acción consecutiva de varios enzimas: la fosfolipasa D (PLD), que produce colina y ácido fosfatídico, y la fosfolipasa A1 y A2 (PLA1 y PLA2), que producen ácidos grasos libres y glicerofosfocolina (GPC) (Gibellini & Smith, 2010). El incremento en los niveles de los MCCs observados en las pacientes con endometriosis estaría justificado, por un lado, por los resultados de un estudio metabólico previo realizado en suero (Jana *et al.*, 2013), y por otro, por los hallazgos de varios grupos relativos a la expresión y actividad del enzima PLA2 en estas pacientes. En uno de esos trabajos se observó que la actividad de este enzima estaba aumentada en el fluido peritoneal de las pacientes con endometriosis (Sano *et al.*, 1994). Posteriormente, se demostró que la PLA2 era el gen más sobreexpresado en el endometrio ectópico en comparación con el endometrio eutópico (Eyster *et al.*, 2007). La sobreexpresión de PLA2 en endometrio ectópico también ha sido observada por el grupo de Vouk y colaboradores (Vouk *et al.*, 2011) que recientemente ha publicado un estudio donde se sugiere que la endometriosis podría estar asociada a niveles altos de esfingomielina y fosfatidilcolina (Vouk *et al.*, 2012) y proponen el bloqueo específico de la ruta de la PLA2 como posible diana terapéutica.

III. Resultados y desarrollo argumental

Nuestro estudio confirma otra observación previamente realizada por Dutta y colaboradores ((Dutta *et al.*, 2012). En este estudio metabólico, se observó que las pacientes con endometriosis presentaban niveles altos de **valina** con respecto a las mujeres del grupo control. Dada la analogía que se establece entre la endometriosis y los procesos tumorales (Somigliana *et al.*, 2006), el aumento en los niveles de este aminoácido parece estar relacionado con el metabolismo específico de aminoácidos de cadena ramificada en las células tumorales (Fan *et al.*, 2012).

Con respecto al perfil lipídico de las muestras de plasma, estudios anteriores han descrito que las pacientes con endometriosis presentan un perfil lipídico desfavorable caracterizado por niveles elevados de lipoproteínas, fundamentalmente, lipoproteínas de baja densidad (LDL), en comparación con las mujeres del grupo control (Melo *et al.*, 2010). La inflamación y el estrés oxidativo, procesos etiopatogénicos comunes a la aterosclerosis, han sido postulados como los mecanismos responsables de estas alteraciones. En nuestro estudio observamos niveles significativamente superiores en la región del espectro correspondientes a los grupos CH₃ de las **lipoproteínas (Tabla 15)** en las pacientes con endometriosis. Sería necesario un análisis más exhaustivo del metabolismo lipídico en estas mujeres con el fin de identificar el tipo de lipoproteínas que están alteradas y evaluar posteriormente el grado de compatibilidad de dicho perfil con los estudios publicados y la relación inversa que se ha observado entre la endometriosis y el IMC.

3. ESTUDIO DE TEJIDO

3.1 Caracterización metabólica del tejido endometriósico

De forma complementaria al análisis de los biofluidos se recogieron distintas muestras de tejido en ambos grupos de estudio: aspirado endometrial (endometrio eutópico), implante peritoneal (endometrio ectópico o lesión endometriósica) y peritoneo sano.

El objetivo de este estudio fue la caracterización de los perfiles metabólicos de los distintos tipos de tejidos relacionados con la enfermedad y la comparación de dichos perfiles en cada uno de los grupos de estudio. La identificación de diferencias entre las mujeres con endometriosis respecto al grupo control podría ser de gran utilidad para establecer correlaciones entre el metabolismo tisular y las alteraciones previamente descritas en el análisis de los biofluidos.

La mayoría de los espectros de RMN se adquirieron en un espectrómetro de 600 MHz, previa extracción de los metabolitos polares y apolares, dando lugar a las correspondientes fases acuosas y orgánicas, respectivamente. En algunos casos, se analizó el tejido intacto utilizando un espectrómetro de 500 MHz equipado con una sonda HR-MAS (Figura 45).

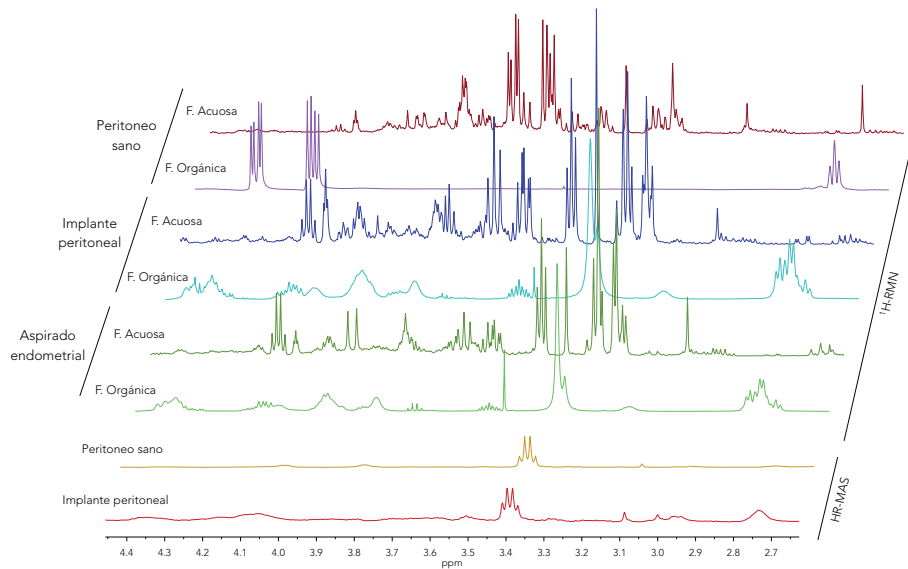


Figura 45: Espectros ^1H -NMR representativos de todas las muestras de tejido analizadas

III. Resultados y desarrollo argumental

En primer lugar, tras la adquisición y procesado de los espectros, se llevó a cabo la asignación de cada uno de los tejidos. De manera general, las señales identificadas en las **fases acuosas** corresponden a metabolitos hidrosolubles, mayoritariamente aminoácidos (valina, leucina, isoleucina, glutamato, lisina, etc.), ácidos orgánicos (formato, lactato, succinato, etc.), azúcares y nucleótidos. Por otro lado, las **fases orgánicas** dan lugar a espectros dominados por señales anchas, localizadas entre 0.80 y 6.00 ppm, correspondientes a diferentes metabolitos lipídicos como colesterol libre y esterificado, triacilglicéridos, fosfolípidos y ácidos grasos.

El análisis por RMN proporcionó en todos los casos espectros de alta calidad, lo que permitió el análisis detallado de ambas fases en los dos tipos de tejido estudiados: tejido endometrial y tejido peritoneal.

Tejido endometrial: se analizó tanto el aspirado endometrial (endometrio eutéopico), obtenido directamente del útero, como las lesiones endometriósicas (endometrio ectópico), localizadas concretamente en la cavidad peritoneal, es decir, implantes peritoneales (**Figura 46 y 47**).

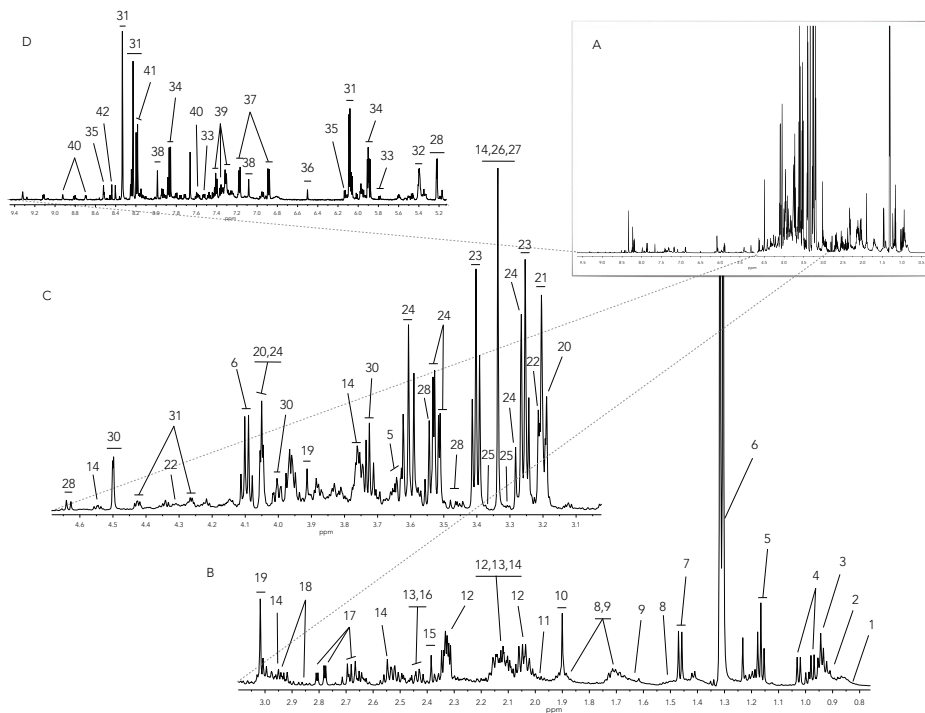


Figura 46: Asignación de un espectro ^1H -RMN CPMG representativo de la fase acuosa de una lesión endometriósica. La región del espectro correspondiente a la señal del agua ha sido

excluida del espectro. A) espectro completo; B, C, D) ampliaciones del espectro. Metabolitos asignados: 1, 2-hidroxi-isovalerato; 2, leucina; 3, isoleucina; 4, valina; 5, etanol; 6, lactato; 7, alanina; 8, lisina; 9, arginina; 10, acetato; 11, prolina; 12, glutamato; 13, glutamina; 14, glutatión; 15, succinato; 16, carnitina; 17, aspartato; 18, asparagina; 19, creatina; 20, colina; 21, fosfocolina; 22, glicerofosfocolina; 23, taurina; 24, mioinositol; 25, prolina; 26, escilo-inositol; 27, metanol; 28, glucosa; 29, glicina; 30, ascorbato; 31, inosina; 32, glucógeno; 33, uracilo; 34, uridina; 35, ADP; 36, fumarato; 37, tirosina; 38, histidina; 39, fenilalanina; 40, nicotinurato; 41, hipoxantina; 42, formato

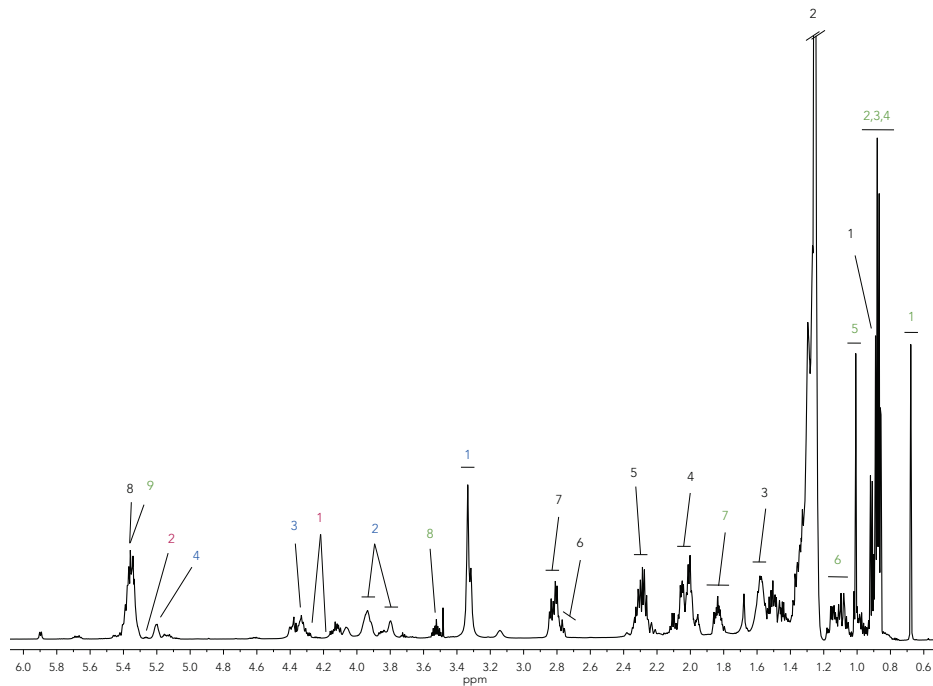
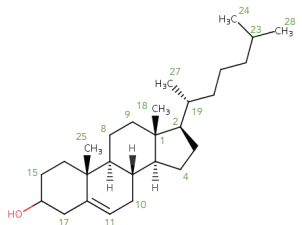
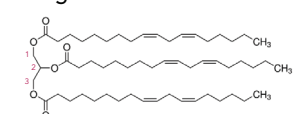
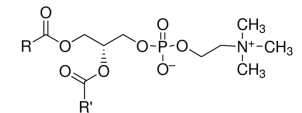
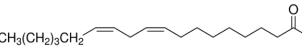


Figura 47: Asignación de un espectro ^1H -RMN CPMG representativo de la fase orgánica de una lesión endometriósica. Los lípidos mayoritarios presentes en el tejido endometrial son esteroides como el colesterol (verde), triacilglicerol (gliceril tripalmitato, gliceril trioleato, gliceril trilinoleato, etc.) (rojo), fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, etc.) (azul) y ácidos grasos (ác. esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, etc.) (negro)

En la **Tabla 17** se detallan las señales más relevantes del colesterol y los grupos funcionales específicos de cada familia lipídica identificada. Los grupos funcionales comunes a los distintos tipos de lípidos, grupos metilo ($-\text{CH}_3$) y metileno ($-\text{CH}_2$), han sido clasificados de forma genérica como residuos de ácidos grasos (Kostara *et al.*, 2010; Subramanian *et al.*, 2008; Wishart *et al.*, 2013).

III. Resultados y desarrollo argumental

Tabla 17: Características químicas y espectroscópicas de las señales identificadas en los extractos orgánicos de las lesiones endometriósicas

Lípidos	N°	Asignación	Multiplicidad
	1	-C ₁₈ H ₃	s
	2	-C ₂₈ H ₃	d
	3	-C ₂₄ H ₃	d
	4	-C ₂₇ H ₃	d
	5	-C ₂₅ H ₃	s
	6	-C ₄ H ₂ -C ₅ H ₂ ; C ₂₁ H ₂ -C ₂₂ H ₂	m
	7	-C ₉ H ₂ -C ₁₀ H ₂	m
	8	-C ₁₅ H ₂	m
	9	=C ₁₁ H	dd
	1	C ₁ H ₂ ; C ₃ H ₂ del glicerol	dd
	2	C ₂ H del glicerol	m
	1	N ⁺ (CH ₃) ₃	s
	2	CH ₂ OR-CHOR'-CH ₂ -X	m
	3	CH ₂ OR-CHOR'-CH ₂ -X	m
	4	CH ₂ OR-CHOR'-CH ₂ -X	m
	1	-CH ₃	t
	2	-CH ₂	m
	3	-COO-CH ₂ -CH ₂	m
	4	-CH ₂ -CH ₂ -CH=CH-	m
	5	-COO-CH ₂ -CH ₂	m
	6	-CH=CH-CH ₂ -CH=CH-	m
	7	(-CH=CH-CH ₂ -CH=CH-)n (n>1)	m
	8	-CH=CH-	m

Multiplicidad: s, singlete; d, doblete; t, triplete; m: multiplete; dd: doble doblete

Peritoneo sano: se analizó también el peritoneo sano por ser el tejido diana donde se localiza el endometrio ectópico (Figura 48 y 49).

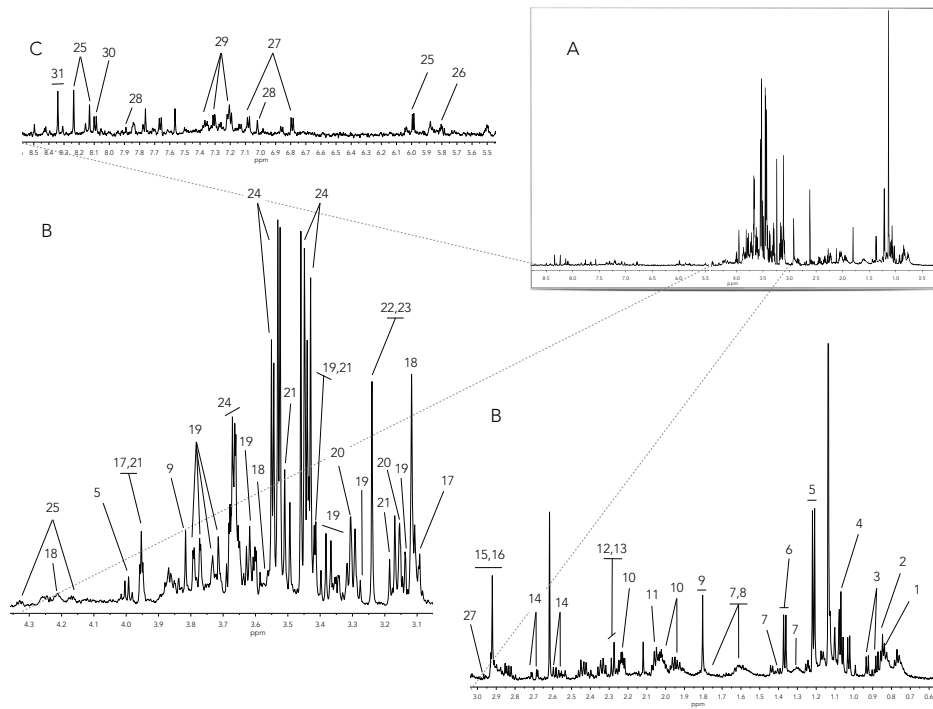


Figura 48: Asignación de un espectro ^1H -RMN CPMG representativo de las fase acuosa de una muestra de peritoneo sano procedente de una paciente con endometriosis. La región del espectro correspondiente a las señales del agua ha sido excluida del espectro. 1: isoleucina; 2: leucina; 3: valina; 4: etanol; 5: lactato; 6: alanina; 7: lisina; 8: arginina; 9: acetato; 10: glutamato; 11: glutamina; 12: piruvato; 13: succinato; 14: aspartato; 15: creatina; 16: creatinina; 17: colina; 18: glicerofosocolina; 19: glucosa; 20: taurina; 21: mioinositol; 22: esciloinositol; 23: metanol; 24: glicerol; 25: inosina; 26: uridina; 27: tirosina; 28: histidina; 29: fenilalanina; 30: hipoxantina; 31: formato

III. Resultados y desarrollo argumental

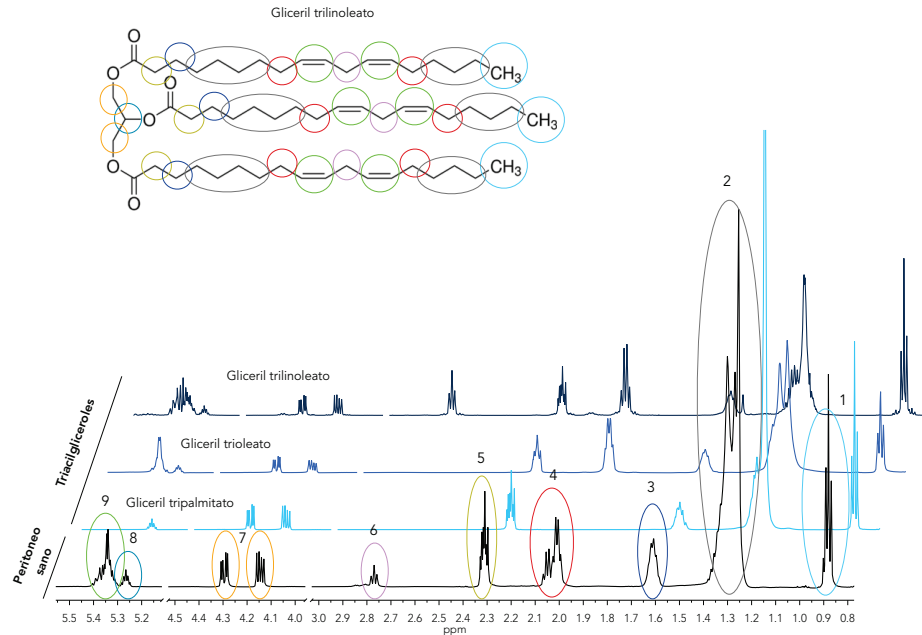
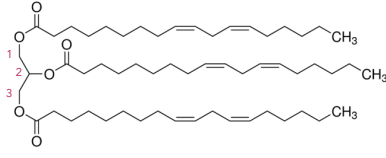


Figura 49: Espectro ^1H -RMN CPMG representativo de la fase orgánica del peritoneo sano procedente de una paciente con endometriosis. Superposición de un espectro representativo de plasma (negro) con los espectros de tres triacilglicéridos de distinta longitud y grado de insaturación. La asignación de los principales señales identificados se resume en la Tabla 18. El código de colores muestra los distintos ^1H presentes en los triacilglicéridos (p.ej., gliceril trilinoleato) que contribuyen a cada una de las señales del espectro

Como se observa en la **Figura 49**, a diferencia de lo observado en la fase orgánica de las muestras de tejido endometrial, el extracto no-polar del peritoneo sano es fundamentalmente una mezcla de triacilglicéridos de distinta complejidad. En la **Tabla 18** se detalla la asignación de las señales que en mayor medida están contribuyendo al perfil orgánico de las muestras de peritoneo sano. Las señales más representativas corresponden a los ^1H del esqueleto del glicerol de los triacilglicéridos representados como 3 señales en la región 4.10–4.30 ppm del espectro (7, 8).

Tabla 18: Características químicas y espectroscópicas de las señales de los triacilglicéridos identificados en los extractos orgánicos de peritoneo sano

Lípidos	N°	Asignación	Multiplidad
	1	-CH ₃	t
	2	-CH ₂	m
	3	-COO-CH ₂ -CH ₂	m
	4	-CH ₂ -CH ₂ -CH=CH-	m
	5	-COO-CH ₂ -CH ₂	m
	6	-CH=CH-CH ₂ -CH=CH-	m
	7	C ₁ H ₂ ; C ₃ H ₂ del glicerol	dd
	8	C ₂ H del glicerol	dd
	9	-CH=CH-	m

3.2 Comparación de los perfiles metabólicos

Una vez caracterizados los perfiles metabólicos de los distintos tipos de tejido, se procedió a la comparación de los perfiles procedentes de las pacientes con endometriosis respecto a las mujeres del grupo control. Mediante este análisis se pretendía identificar las posibles alteraciones metabólicas en los distintos tipos de tejidos debido a la presencia de la enfermedad. Para ello se realizaron las siguientes comparaciones (Figura 50):

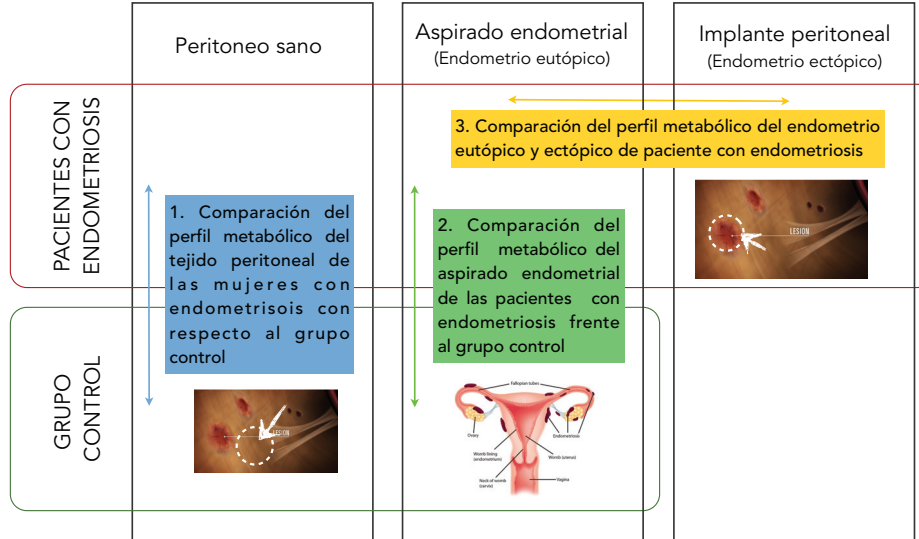
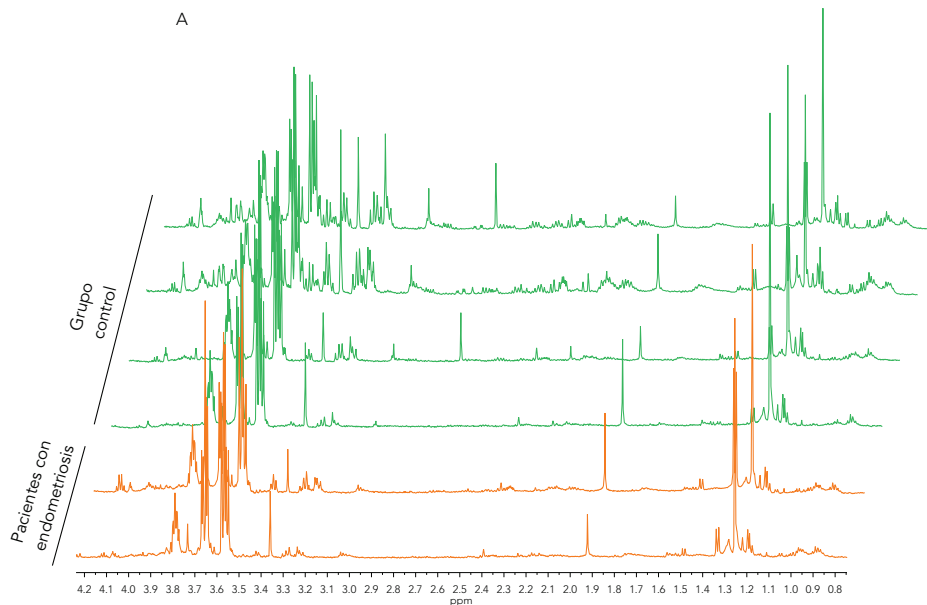


Figura 50: Comparaciones realizadas entre los perfiles metabólicos de las distintas muestras de tejido de los dos grupos de estudio

1. TEJIDO PERITONEAL

Las lesiones endometriósicas analizadas en este estudio se localizan en el tejido peritoneal. En las pacientes con endometriosis, y en contraposición a lo que sucede en las mujeres del grupo control, el tejido endometrial tiene la capacidad de implantarse y crecer sobre el tejido peritoneal. En estas pacientes, el perfil del tejido peritoneal podría presentar alteraciones metabólicas como consecuencia de la enfermedad o bien porque el propio tejido posee determinadas características que favorecen la supervivencia del tejido autólogo.

Con el objetivo de determinar si el tejido peritoneal de las mujeres con endometriosis posee un perfil metabólico característico, se compararon tanto las fases acuosas como orgánicas de este tejido (**Figura 51**). Si la enfermedad ha afectado al peritoneo sano, se esperaría que la firma metabólica de este tejido fuese diferente en las mujeres con y sin endometriosis.



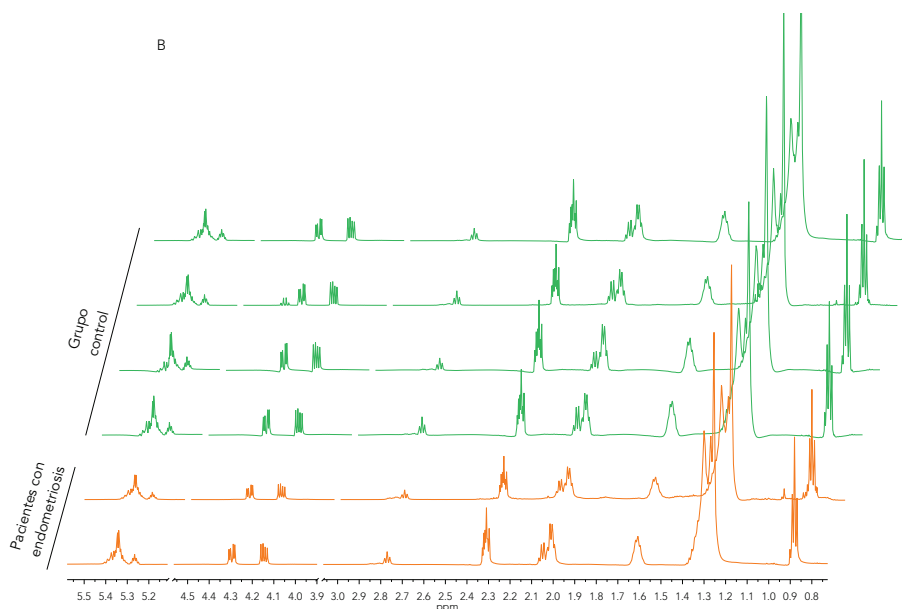


Figura 51: Comparación de los espectros ^1H -RMN CPMG del peritoneo sano de las pacientes con endometriosis respecto al de las mujeres del grupo control. A) fase acuosa; B) fase orgánica

En los espectros de las fases acuosas (**Figura 51A**), se observó que los perfiles de este tipo de tejido no eran homogéneos. Independientemente de si las muestras procedían del grupo control o del grupo de pacientes, se identificaron dos perfiles metabólicos diferentes. La diferencia más evidente entre ambos perfiles era la proporción de glicerol (3.50–3.70 ppm) con respecto al resto de metabolitos del espectro.

Dado que la heterogeneidad de los perfiles no estaba asociada a la presencia/ausencia de endometriosis, ni tampoco al día de preparación de las muestras o adquisición de los experimentos, se trató de identificar el motivo de la variabilidad observada. Una posible causa sería la distinta localización de las muestras analizadas. Si las muestras procedían de zonas diferentes de la cavidad peritoneal pudieron haber estado influidas por ambientes diferentes dando lugar a las diferencias observadas en los perfiles. Por otro lado, tampoco se puede descartar que esta variabilidad sea consecuencia de un diferente rendimiento durante el protocolo de extracción de los metabolitos.

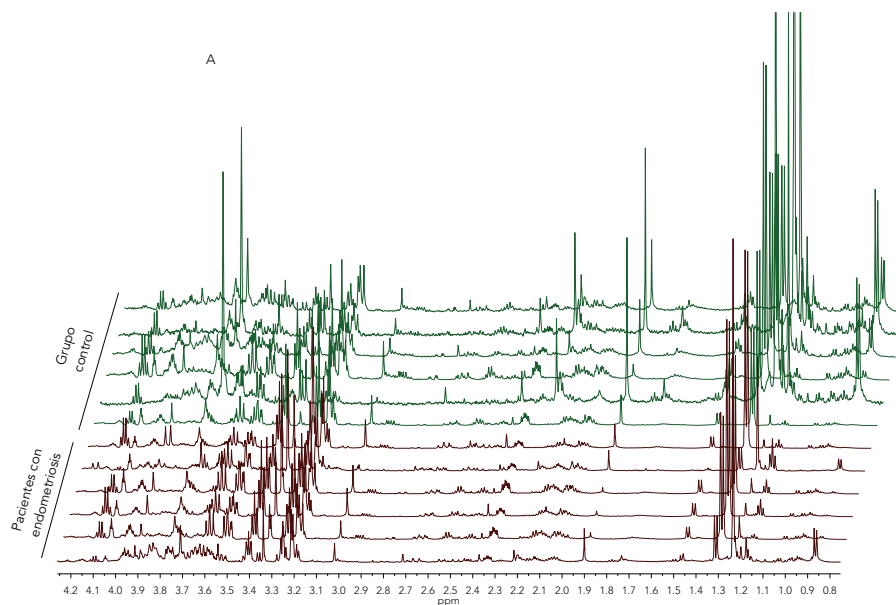
A la vista de los resultados, sería necesario analizar un mayor número de muestras y evaluar el posible impacto de la localización de las muestras y el método de extracción en sus perfiles metabólicos. La estandarización de los

protocolos durante las etapas de recogida y procesado de las muestras permitirá garantizar una mayor reproducibilidad de los resultados y confirmar o descartar la presencia de una firma metabólica característica en el tejido peritoneal de las pacientes con endometrio.

2. ASPIRADO ENDOMETRIAL

Como se ha descrito anteriormente, existen varias teorías sobre la etiología de la enfermedad, pero ninguna de ellas es capaz de explicar por qué, siendo la menstruación retrógrada un proceso casi universal, la endometriosis sólo se desarrolla en el 10% de las mujeres. Si el endometrio de las pacientes presentara un metabolismo celular característico que contribuyera a su implantación ectópica supondría, en cierto modo, que estas mujeres presentan una predisposición a desarrollar la enfermedad.

Con el fin de determinar si efectivamente existen diferencias en el perfil del endometrio eutópico de las mujeres con y sin endometriosis, se compararon los espectros de RMN del aspirado endometrial en ambos grupos (**Figura 52**). La identificación de los metabolitos responsables de estas diferencias y las rutas en las que participan constituiría un importante avance en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la implantación y proliferación de este tejido fuera del útero.



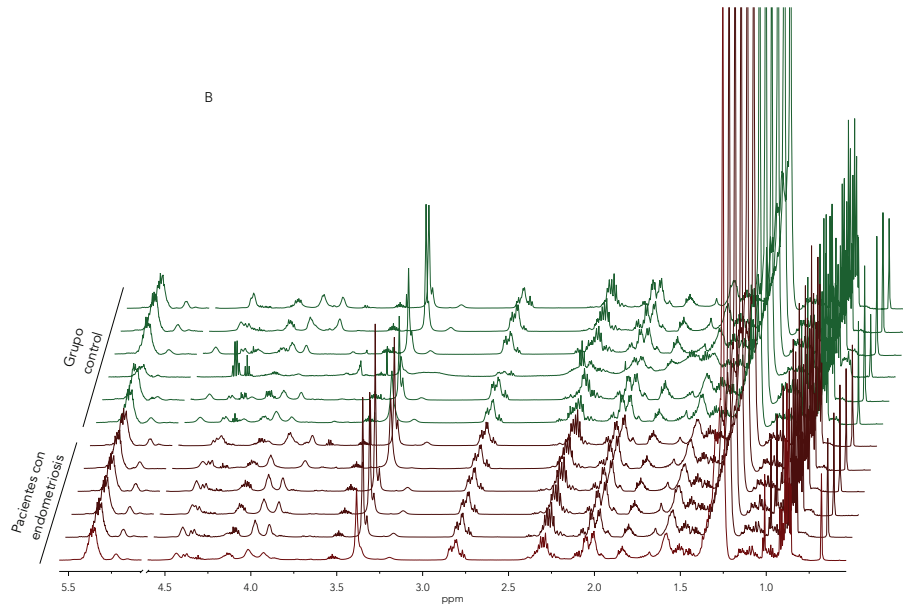


Figura 52: Comparación de los espectros de ^1H -RMN CPMG del endometrio eutópico en las mujeres con y sin endometriosis. A) fase acuosa; B) fase orgánica

A diferencia de lo que ocurría con las muestras de peritoneo sano, los perfiles de aspirados endometrial son homogéneos tanto en las fases acuosas como en las orgánicas (Figura 52). Pese a tratarse de un análisis exploratorio con un número limitado de muestras, se observaron diferencias en los perfiles de las fases acuosas entre ambos grupos de muestras (Figura 52A), concretamente en las señales correspondientes al acetato (1.91 ppm), acetona (2.23 ppm), ascorbato (3.72 ppm) y formato (8.44 ppm), entre otros. Para comprobar si las diferencias observadas son reproducibles, sería necesario realizar estudios adicionales basados en un número mayor de muestras.

3. IMPLANTE PERITONEAL

Por último, en el grupo de pacientes con endometriosis, se comparó el endometrio eutópico con respecto a este mismo tejido en su localización ectópica (implantes peritoneales) (Figura 53). El endometrio en la cavidad peritoneal podría adquirir un comportamiento diferente lo que evidenciaría las posibles rutas metabólicas alteradas en estas lesiones.

III. Resultados y desarrollo argumental

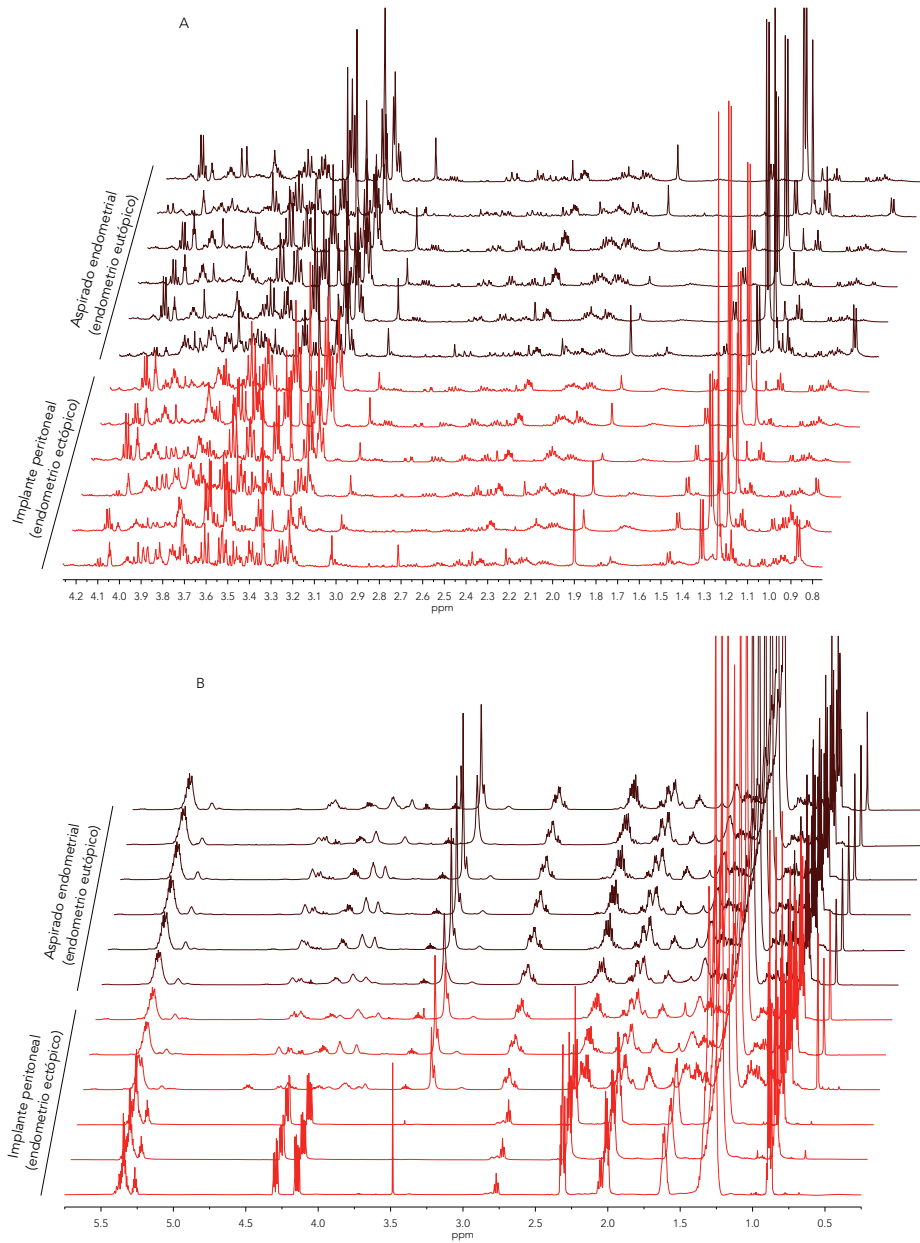


Figura 53: Comparación de los espectros de ^1H -RMN CPMG del endometrio en su localización ectópica (implante peritoneal) con respecto al correspondientes endometrio en su localización eutópica (aspirado endometrial) en mujeres con endometriosis. A) fase acuosa; B) fase orgánica

En esta comparación se observó que una parte de los implantes peritoneales, tanto la fase acuosa como la orgánica, presentaban el mismo tipo de perfil que el aspirado endometrial. Ciertamente, se trata del mismo tejido aunque procedente de una localización anatómica diferente. Pero otra parte de las muestras presentaban un perfil completamente diferente al endometrio eutópico. Estas diferencias eran especialmente evidentes en las fases orgánicas (**Figura 53B**).

Curiosamente, al comparar los tres tipos de muestras procedentes de una misma paciente con endometriosis (aspirado endometrial, implante peritoneal y peritoneo sano), en algunos casos se observó que los implantes presentaban el mismo perfil que el peritoneo sano (**Figura 54B**). La similitud entre ambos tejidos podría explicarse por la localización de las lesiones. Como se expuso anteriormente, las lesiones se escindieron de la cavidad peritoneal y parte del peritoneo pudo quedar adherido a las lesiones. El perfil de RMN observado sería, por tanto, una combinación del correspondiente a ambos tipos de tejido. En función de la proporción de peritoneo sano que contuvieran los implantes, los espectros se parecerían más al perfil metabólico del peritoneo o al del tejido endometrial. En las fases acuosas (**Figura 54A**), estas mismas diferencias, como consecuencia de la posible contaminación con el tejido peritoneal, son mucho más discretas, quizá porque los perfiles polares de los distintos tipos de tejido son más parecidos entre sí.

En base a estos resultados no fue posible concluir si el endometrio en su localización ectópica presentaba un perfil diferente al endometrio eutópico, debido a la heterogeneidad en los perfiles de las lesiones, probablemente como consecuencia de la contaminación con el tejido peritoneal.

III. Resultados y desarrollo argumental

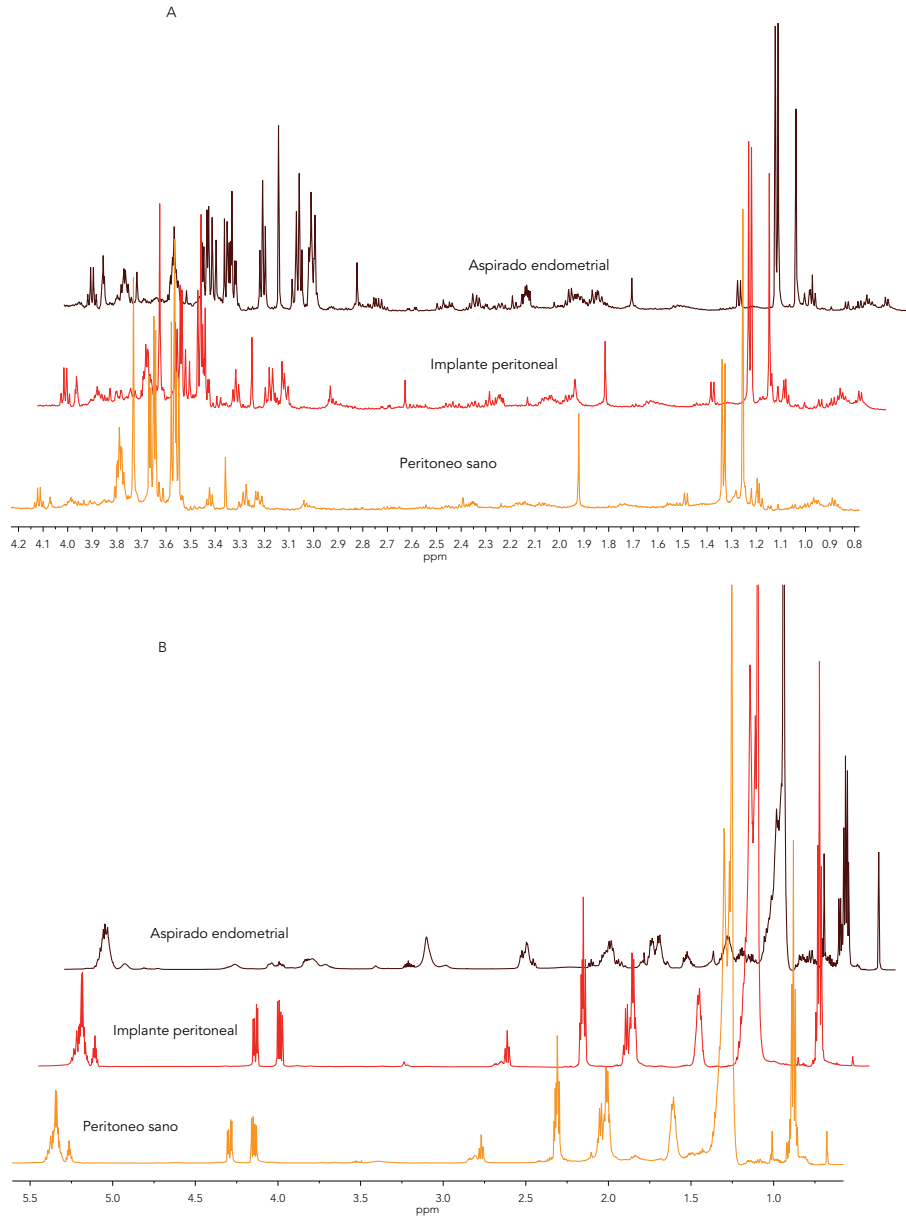


Figura 54: Perfiles metabólicos ¹H-RMN CPMG de los tres tipos de tejido procedentes de una misma paciente con endometriosis. A) espectros correspondientes a la fase acuosa. En esta paciente el implante peritoneal presenta un perfil intermedio entre el aspirado endometrial y el peritoneo sano; B) espectros correspondientes a la fase orgánica. El implante peritoneal presenta el mismo perfil lipídico que el peritoneo sano

En términos generales, el análisis de las muestras de tejido endometrial y peritoneal ha permitido la caracterización metabólica de los distintos tipos de tejido implicados en la endometriosis, lo que demuestra la versatilidad de la técnica, capaz de obtener espectros de calidad para tejidos de distinta naturaleza.

Finalmente, y tal como se ha señalado con anterioridad, el estudio del tejido tiene un gran valor como análisis complementario al realizado en los biofluidos. La caracterización de los perfiles de los distintos tipos de tejidos en cada una de las situaciones expuestas podría ser de gran utilidad como validación de las alteraciones metabólicas identificadas en orina y en plasma y un claro reflejo de lo que sucede a nivel local en presencia de endometriosis.

4. DISCUSIÓN GENERAL

El estudio de los perfiles metabólicos mediante RMN proporciona una visión global de las alteraciones metabólicas asociadas a la endometriosis. La caracterización de los perfiles de orina y plasma, empleando una estrategia no dirigida, ha permitido la identificación de un conjunto de metabolitos cuyos niveles difieren significativamente entre las pacientes con endometriosis y el grupo control. Además, la identificación de las rutas metabólicas en las que participan dichos compuestos ha permitido establecer una relación entre los perfiles metabólicos y los mecanismos moleculares implicados en la endometriosis.

La validación de estos resultados requiere un estudio más amplio que incluya un número mayor de pacientes en los estadios iniciales de enfermedad. La información proporcionada por este análisis posibilitaría la identificación de biomarcadores de diagnóstico temprano y de los mecanismo moleculares implicados en el inicio de la enfermedad. Por otro lado, una distribución equilibrada de las muestras en los distintos estadios permitiría la comparación de los perfiles en las etapas tempranas y avanzadas de la endometriosis. A través de este análisis se podría determinar si existen cambios metabólicos asociados a la progresión de la enfermedad.

La obtención de modelos estadísticos basados en un tamaño muestral mayor permitiría, no sólo, comprobar la reproducibilidad de los perfiles caracterizados en este estudio, sino también evaluar la relevancia y el posible papel de cada uno de los metabolitos en la fisiopatología de la enfermedad. En particular, aquellos metabolitos cuyas concentraciones estaban alteradas de forma significativa tanto en la orina como en el plasma de las pacientes con endometriosis (creatinina, valina, lisina, fucosa y metabolitos de la colina).

Desde el punto de vista clínico, la implicación más importante del desarrollo de un método de diagnóstico no invasivo sería la reducción de los riesgos y los síntomas asociados a esta enfermedad, gracias a la facilidad de su traslación a la práctica clínica. La identificación de uno o varios biomacador/es en orina o plasma reduciría el lapso de tiempo desde la aparición de los primeros síntomas hasta el diagnóstico definitivo de la enfermedad. Un diagnóstico más rápido permitiría a las pacientes beneficiarse de un tratamiento temprano, deteniendo así la progresión de la enfermedad y minimizando las complicaciones asociadas.

Finalmente, el análisis por RMN de los distintos tipos de tejido relacionados con la endometriosis ha permitido su caracterización metabólica en mujeres con y sin endometriosis. Frente a la invasividad que implica el análisis de este tipo de muestras, la identificación de alteraciones metabólicas asociadas a la endometriosis tiene un gran potencial para entender el metabolismo local e identificar las rutas bioquímicas implicadas en el desarrollo de la endometriosis. En estudios futuros, los perfiles metabolómicos de tejido podrían constituir una herramienta complementaria al análisis de biofluidos para el desarrollo de nuevos biomarcadores de diagnóstico de la endometriosis.

V. CONCLUSIONES

1. La metabolómica por RMN constituye una técnica eficaz, no invasiva y no destructiva capaz de identificar y cuantificar la abundancia relativa de los componentes metabólicos de los biofluidos. La caracterización de los perfiles metabolómicos permite, además, relacionar las alteraciones identificadas y los mecanismos moleculares implicados en la fisiopatología de la endometriosis.
2. El análisis de los espectros de orina de pacientes con endometriosis revela un perfil metabólico caracterizado por un aumento en los niveles de 4-PY, guanidinosuccinato, creatinina, taurina, valina y 2-hidroxi-isovalerato y una disminución en los niveles de lisina en relación a las mujeres del grupo control.
3. El perfil metabolómico de las muestras de plasma procedentes de pacientes con endometriosis está definido por un incremento en los niveles de metabolitos que contienen colina, fucosa, valina, lipoproteínas y la región correspondiente con la lisina/arginina, así como por una disminución en los niveles de creatinina.
4. El conjunto de las alteraciones metabólicas observadas en el perfil de plasma y orina de las pacientes con endometriosis están relacionadas de forma directa o indirecta con la proliferación celular, inflamación y estrés oxidativo, todos ellos procesos celulares implicados en el desarrollo de la endometriosis.
5. La RMN ha permitido, además, la obtención de espectros de buena calidad de los distintos tipos de tejidos asociados con la endometriosis (tejido peritoneal, endometrio eutópico y ectópico) posibilitando su análisis y caracterización metabólica en presencia y ausencia de la enfermedad.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abu Bakar, M. H., Sarmidi, M. R., Cheng, K. K., Ali Khan, A., Suan, C. L., Zaman Huri, H. & Yaakob, H.** (2015). Metabolomics - the complementary field in systems biology: a review on obesity and type 2 diabetes. *Mol Biosyst* **11**, 1742-74.
- Acién, P. & Velasco, I.** (2013). Endometriosis: a disease that remains enigmatic. *SRN obstetrics and gynecology* **2013**, 1-12.
- Adachi, S., Tajima, A., Quan, J., Haino, K., Yoshihara, K., Masuzaki, H., Katabuchi, H., Ikuma, K., Suginami, H., Nishida, N., Kuwano, R., Okazaki, Y., Kawamura, Y., Sasaki, T., Tokunaga, K., Inoue, I. & Tanaka, K.** (2010). Meta-analysis of genome-wide association scans for genetic susceptibility to endometriosis in Japanese population. *J Hum Genet* **55**, 816-21.
- Adamson, G. D.** (2011). Endometriosis classification: an update. *Current opinion in obstetrics & gynecology* **23**, 213-220.
- Aghajanova, L. & Giudice, L. C.** (2011). Molecular evidence for differences in endometrium in severe versus mild endometriosis. *Reprod Sci* **18**, 229-51.
- Albertsen, H. M., Chettier, R., Farrington, P. & Ward, K.** (2013). Genome-wide association study link novel loci to endometriosis. *PLoS One* **8**, e58257.
- Altmae, S., Esteban, F. J., Stavreus-Evers, A., Simon, C., Giudice, L., Lessey, B. A., Horcajadas, J. A., Macklon, N. S., D'Hooghe, T., Campoy, C., Fauser, B. C., Salamonsen, L. A. & Salumets, A.** (2014). Guidelines for the design, analysis and interpretation of 'omics' data: focus on human endometrium. *Hum Reprod Update* **20**, 12-28.
- American Society for Reproductive Medicine** (1997). Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* **65**, 817-821.
- Ametzazurra, A., Matorras, R., Garcia-Velasco, J. A., Prieto, B., Simon, L., Martinez, A. & Nagore, D.** (2009). Endometrial fluid is a specific and non-invasive biological sample for protein biomarker identification in endometriosis. *Hum Reprod* **24**, 954-65.
- Augoulea, A., Alexandrou, A., Creatsa, M., Vrachnis, N. & Lambrinoudaki, I.** (2012). Pathogenesis of endometriosis: the role of genetics, inflammation and oxidative stress. *Arch Gynecol Obstet* **286**, 99-103.
- Balasch, J.** (2003). Tratamiento de la endometriosis y medicina basada en la evidencia. *Progresos de Obstetricia y Ginecología* **46**, 24-37.
- Banerjee, P., Dutta, M., Srivastava, S., Joshi, M., Chakravarty, B. & Chaudhury, K.** (2014). (1)H NMR serum metabolomics for understanding metabolic dysregulation in women with idiopathic recurrent spontaneous miscarriage during implantation window. *J Proteome Res* **13**, 3100-6.
- Beckonert, O., Keun, H. C., Ebbels, T. M., Bundy, J., Holmes, E., Lindon, J. C. & Nicholson, J. K.** (2007). Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc* **2**, 2692-703.
- Bellver, J., Mundi, M., Esteban, F. J., Mosquera, S. & Horcajadas, J. A.** (2012). '-omics' technology and human reproduction: reproductomics. *Expert Rev. Obstet. Gynecol.* **7**, 493-506.
- Berkes, E., Muzinic, A., Rigo, J., Jr., Tinneberg, H. R. & Oehmke, F.** (2013). The analysis of the human plasma N-glycome in endometriosis patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **171**, 107-15.

VI. Bibliografia

- Bloski, T. & Pierson, R.** (2008). Endometriosis and Chronic Pelvic Pain: Unraveling the Mystery Behind this Complex Condition. *Nurs Womens Health* **12**, 382-95.
- Bothwell, J. H. & Griffin, J. L.** (2011). An introduction to biological nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biol Rev Camb Philos Soc* **86**, 493-510.
- Bulum, S.** (2009). Endometrisois. *The new England journal of Medicine* **360**, 268-279.
- Burney, R. O.** (2013). The genetics and biochemistry of endometriosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* **25**, 280-6.
- Burney, R. O., Hamilton, A. E., Aghajanova, L., Vo, K. C., Nezhat, C. N., Lessey, B. A. & Giudice, L. C.** (2009). MicroRNA expression profiling of eutopic secretory endometrium in women with versus without endometriosis. *Mol Hum Reprod* **15**, 625-31.
- Buyse, M., Sargent, D. J., Grothey, A., Matheson, A. & de Gramont, A.** (2010). Biomarkers and surrogate end points--the challenge of statistical validation. *Nat Rev Clin Oncol* **7**, 309-17.
- Carvalho, L. F., Samadder, A. N., Agarwal, A., Fernandes, L. F. & Abrao, M. S.** (2012). Oxidative stress biomarkers in patients with endometriosis: systematic review. *Arch Gynecol Obstet* **286**, 1033-40.
- Casado-Vela, J., Rodriguez-Suarez, E., Iloro, I., Ametzazurra, A., Alkorta, N., Garcia-Velasco, J. A., Matorras, R., Prieto, B., Gonzalez, S., Nagore, D., Simon, L. & Elortza, F.** (2009). Comprehensive proteomic analysis of human endometrial fluid aspirate. *J Proteome Res* **8**, 4622-32.
- Chehna-Patel, N., Sachdeva, G., Gajbhiye, R., Warty, N. & Khole, V.** (2010). "Spot"-ting differences between the ectopic and eutopic endometrium of endometriosis patients. *Fertil Steril* **94**, 1964-71, 1971.e1.
- Cho, S., Choi, Y. S., Yim, S. Y., Yang, H. I., Jeon, Y. E., Lee, K. E., Kim, H., Seo, S. K. & Lee, B. S.** (2012). Urinary vitamin D-binding protein is elevated in patients with endometriosis. *Hum Reprod* **27**, 515-22.
- Chun, E., Chan, Y., Koh, P. K., Mal, M., Cheah, P. Y., Eu, K. W., Backshall, A., Cavill, R., Nicholson, J. K. & Keun, H. C.** (2009). Metabolic profiling of human colorectal cancer using High-Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance (HR-MAS NMR) spectroscopy and Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS). *J Proteome Res* **8**, 352-361.
- Cobas, C., Seoane, F., Domínguez, S. & Sykora, S.** (2011). A new approach to improving automated analysis of proton NMR spectra through Global Spectral Deconvolution (GSD). *Spectroscopy Europe* **23**, 26-30.
- Cobas, C., Seoane, F. & Sykora, S.** (2008). Global Spectral Deconvolution (GSD) of 1D-NMR spectra. Mestre Nova: Santa Fe (NM, USA).
- Cramer, D. W. & Missmer, S. a.** (2002). The epidemiology of endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **955**, 11-22.
- Davis, V. W., Bathe, O. F., Schiller, D. E., Slupsky, C. M. & Sawyer, M. B.** (2011). Metabolomics and surgical oncology: Potential role for small molecule biomarkers. *J Surg Oncol* **103**, 451-9.

- Dessi, A., Corsello, G., Stronati, M., Gazzolo, D., Caboni, P., Carboni, R. & Fanos, V. (2014). New diagnostic possibilities in systemic neonatal infections: metabolomics. *Early Hum Dev* **90** Suppl 1, S19-21.
- Diaz, S. O., Barros, A. S., Goodfellow, B. J., Duarte, I. F., Galhano, E., Pita, C., Almeida Mdo, C., Carreira, I. M. & Gil, A. M. (2013). Second trimester maternal urine for the diagnosis of trisomy 21 and prediction of poor pregnancy outcomes. *J Proteome Res* **12**, 2946-57.
- Diaz-Gimeno, P., Horcajadas, J. A., Martinez-Conejero, J. A., Esteban, F. J., Alama, P., Pellicer, A. & Simon, C. (2011). A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertil Steril* **95**, 50-60, 60.e1-15.
- Dieterle, F., Ross, A., Schlotterbeck, G. & Senn, H. (2006). Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in 1H NMR metabonomics. *Anal Chem* **78**, 4281-4290.
- Dominguez, F., Meseguer, M., Aparicio-Ruiz, B., Piqueras, P., Quiñero, A. & Simón, C. New strategy for diagnosing embryo implantation potential by combining proteomics and time-lapse technologies. *Fertility and Sterility*.
- Dona, A. C., Jimenez, B., Schafer, H., Humpfer, E., Spraul, M., Lewis, M. R., Pearce, J. T., Holmes, E., Lindon, J. C. & Nicholson, J. K. (2014). Precision high-throughput proton NMR spectroscopy of human urine, serum, and plasma for large-scale metabolic phenotyping. *Anal Chem* **86**, 9887-94.
- Druml, W., Heinzl, G. & Kleinberger, G. (2001). Amino acid kinetics in patients with sepsis. *Am J Clin Nutr* **73**, 908-913.
- Dumas, M. E. & Davidovic, L. (2013). Metabolic phenotyping and systems biology approaches to understanding neurological disorders. *F1000Prime Rep* **5**, 18.
- Dunn, W. B., Broadhurst, D. I., Atherton, H. J., Goodacre, R. & Griffin, J. L. (2011). Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Soc Rev* **40**, 387-426.
- Dunselman, G. A., Vermeulen, N., Becker, C., Calhaz-Jorge, C., D'Hooghe, T., De Bie, B., Heikinheimo, O., Horne, A. W., Kiesel, L., Nap, A., Prentice, A., Saridogan, E., Soriano, D., Nelen, W., European Society of Human, R. & Embryology (2014). ESHRE guideline: management of women with endometriosis. *Hum Reprod* **29**, 400-12.
- Dutta, M., Joshi, M., Srivastava, S., Lodh, I., Chakravarty, B. & Chaudhury, K. (2012). A metabonomics approach as a means for identification of potential biomarkers for early diagnosis of endometriosis. *Mol Biosyst* **8**, 3281-7.
- Dutta, M., Subramani, E., Taunk, K., Gajbhiye, A., Seal, S., Pendharkar, N., Dhali, S., Ray, C. D., Lodh, I., Chakravarty, B., Dasgupta, S., Rapole, S. & Chaudhury, K. (2015). Investigation of serum proteome alterations in human endometriosis. *J Proteomics* **114**, 182-96.
- El-Kasti, M. M., Wright, C., Fye, H. K., Roseman, F., Kessler, B. M. & Becker, C. M. (2011). Urinary peptide profiling identifies a panel of putative biomarkers for diagnosing and staging endometriosis. *Fertil Steril* **95**, 1261-6.e1-6.

VI. Bibliografia

- El-Sayed, S., Bezabeh, T., Odlum, O., Patel, R., Ahing, S., MacDonald, K., Somorjai, R. L. & Smith, I. C. (2002). An ex vivo study exploring the diagnostic potential of ¹H magnetic resonance spectroscopy in squamous cell carcinoma of the head and neck region. *Head Neck* **24**, 766-72.
- Emwas, A.-H. M., Salek, R. M., Griffin, J. L. & Merzaban, J. (2013). NMR-based metabolomics in human disease diagnosis: applications, limitations, and recommendations. *Metabolomics* **9**, 1048-1072.
- Emwas, A. H. (2015). The strengths and weaknesses of NMR spectroscopy and mass spectrometry with particular focus on metabolomics research. *Methods Mol Biol* **1277**, 161-93.
- Eriksson, L., Johansson, E., Kettaneh-Wold, N., Trygg, J., Wikstrom, C. & Wold, S. (2006a). *Multi- and Megavariate Data Analysis, Part 2, Advanced Applications and Method Extensions*. Umetrics AB.
- Eriksson, L., Johansson, E., Kettaneh-Wold, N., Trygg, J., Wikstrom, C. & Wold, S. (2006b). *Multi- and Megavariate Data Analysis, Part I, Basic Principles and Applications*. Umetrics AB.
- Eyster, K. M., Klinkova, O., Kennedy, V. & Hansen, K. A. (2007). Whole genome deoxyribonucleic acid microarray analysis of gene expression in ectopic versus eutopic endometrium. *Fertil Steril* **88**, 1505-33.
- Fan, J., Hong, J., Hu, J. D. & Chen, J. L. (2012). Ion chromatography based urine amino Acid profiling applied for diagnosis of gastric cancer. *Gastroenterol Res Pract* **2012**, 474907.
- Fanos, V., Atzori, L., Makarenko, K., Melis, G. B. & Ferrazzi, E. (2013). Metabolomics application in maternal-fetal medicine. *Biomed Res Int* **2013**, 720514.
- Fassbender, A., Burney, R. O., O, D. F., D'Hooghe, T. & Giudice, L. (2015). Update on Biomarkers for the Detection of Endometriosis. *Biomed Res Int* **2015**, 130854.
- Fassbender, A., Verbeeck, N., Bornigen, D., Kyama, C. M., Bokor, A., Vodolazkaia, A., Peeraer, K., Tomassetti, C., Meuleman, C., Gevaert, O., Van de Plas, R., Ojeda, F., De Moor, B., Moreau, Y., Waelkens, E. & D'Hooghe, T. M. (2012a). Combined mRNA microarray and proteomic analysis of eutopic endometrium of women with and without endometriosis. *Hum Reprod* **27**, 2020-9.
- Fassbender, A., Vodolazkaia, A., Saunders, P., Lebovic, D., Waelkens, E., De Moor, B. & D'Hooghe, T. (2013). Biomarkers of endometriosis. *Fertil Steril* **99**, 1135-45.
- Fassbender, A., Waelkens, E., Verbeeck, N., Kyama, C. M., Bokor, A., Vodolazkaia, A., Van de Plas, R., Meuleman, C., Peeraer, K., Tomassetti, C., Gevaert, O., Ojeda, F., De Moor, B. & D'Hooghe, T. (2012b). Proteomics analysis of plasma for early diagnosis of endometriosis. *Obstet Gynecol* **119**, 276-85.
- Fowler, P. A., Tattum, J., Bhattacharya, S., Klönisch, T., Hombach-Klonisch, S., Gazvani, R., Lea, R. G., Miller, I., Simpson, W. G. & Cash, P. (2007). An investigation of the effects of endometriosis on the proteome of human eutopic endometrium: a heterogeneous tissue with a complex disease. *Proteomics* **7**, 130-42.
- Fung, J. N., Rogers, P. A. & Montgomery, G. W. (2015). Identifying the biological basis of GWAS hits for endometriosis. *Biol Reprod* **92**, 87.

- Gajbhiye, R., Sonawani, A., Khan, S., Suryawanshi, A., Kadam, S., Warty, N., Raut, V. & Khole, V.** (2012). Identification and validation of novel serum markers for early diagnosis of endometriosis. *Hum Reprod* **27**, 408-17.
- Galazis, N., Pang, Y. L., Galazi, M., Haoula, Z., Layfield, R. & Atiomo, W.** (2013). Proteomic biomarkers of endometrial cancer risk in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and biomarker database integration. *Gynecol Endocrinol* **29**, 638-44.
- Gamagedara, S., Shi, H. & Ma, Y.** (2012). Quantitative determination of taurine and related biomarkers in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **402**, 763-70.
- Garcia, E., Andrews, C., Hua, J., Kim, H. L., Sukumaran, D. K., Szyperski, T. & Odunsi, K.** (2011). Diagnosis of early stage ovarian cancer by ¹H NMR metabonomics of serum explored by use of a microflow NMR probe. *J Proteome Res* **10**, 1765-71.
- García Velasco, J. A. & Botros Rizk, M.** (2010). *Endometriosis: tratamiento actual y futuras tendencias*. Jaypee-Highlights: Panama.
- GenomaEspaña & FUAM** (2010). Biomarcadores de uso clínico. GENOMA ESPAÑA / FUAM.
- Gibellini, F. & Smith, T. K.** (2010). The Kennedy pathway--De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life* **62**, 414-28.
- Gilbert-Estelles, J., Braza-Boils, A., Ramon, L. A., Zorio, E., Medina, P., Espana, F. & Estelles, A.** (2012). Role of microRNAs in gynecological pathology. *Curr Med Chem* **19**, 2406-13.
- Giudice, L. C.** (2010). Clinical practice. Endometriosis. *N Engl J Med* **362**, 2389-98.
- Giudice, L. C., Evers, Johannes L.H., and Healy, David L.** (2012). *Endometriosis: Science and Practice*.
- Giudice, L. C. & Kao, L. C.** (2004). Endometriosis. *The Lancet* **364**, 1789-1799.
- Gowda, G. A., Zhang, S., Gu, H., Asiago, V., Shanaiah, N. & Raftery, D.** (2008). Metabolomics-based methods for early disease diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* **8**, 617-33.
- Griffin, J. L., Mann, C. J., Scott, J., Shoulders, C. C. & Nicholson, J. K.** (2001). Choline containing metabolites during cell transfection- an insight into magnetic resonance spectroscopy detectable changes. *FEBS Letters* **509**, 263-266.
- Griffin, J. L. & Shockcor, J. P.** (2004). Metabolic profiles of cancer cells. *Nat Rev Cancer* **4**, 551-61.
- Gupta, S., Agarwal, A., Krajcir, N. & Alvarez, J. G.** (2006). Role of oxidative stress in endometriosis. *Reprod Biomed Online* **13**, 126-34.
- Halis, G. & Arici, A.** (2004). Endometriosis and inflammation in infertility. *Ann N Y Acad Sci* **1034**, 300-15.
- Hamamah, S., Assou, S., Haouzi, D., Dechaud, H., Anahory T Hedon, B. & De Vos, J.** (2010). Omics: Tools for Personalized Reproductive Medicine. *J Reproduktionsmed Endokrinol* **7**, 229-232.
- Hendriks, M. M. W. B., Eeuwijk, F. A. v., Jellema, R. H., Westerhuis, J. A., Reijmers, T. H., Hoefsloot, H. C. J. & Smilde, A. K.** (2011). Data-processing strategies for metabolomics studies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **30**, 1685-1698.

VI. Bibliografia

- Hoffman, B., Schorge, J., Schaffer, J., Halvorson, L., Bradshaw, K. & Cunningham, F. (2012). *Williams Gynecology, Second Edition*. McGraw-hill.
- Horgan, R. P. & Kenny, L. C. (2011). SAC review 'Omic' technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *the obstetrician & Gynaecologist* **13**, 189-195.
- Jana, S. K., Dutta, M., Joshi, M., Srivastava, S., Chakravarty, B. & Chaudhury, K. (2013). ¹H NMR Based Targeted Metabolite Profiling for Understanding the Complex Relationship Connecting Oxidative Stress with Endometriosis. *BioMed Res Int* **2013**, 1-9.
- Janssen, E. B., Rijkers, A. C., Hoppenbrouwers, K., Meuleman, C. & D'Hooghe, T. M. (2013). Prevalence of endometriosis diagnosed by laparoscopy in adolescents with dysmenorrhea or chronic pelvic pain: a systematic review. *Hum Reprod Update* **19**, 570-82.
- Jia, S. Z., Yang, Y., Lang, J., Sun, P. & Leng, J. (2013). Plasma miR-17-5p, miR-20a and miR-22 are down-regulated in women with endometriosis. *Hum Reprod* **28**, 322-30.
- Keeler, J. (2005). *Understanding NMR Spectroscopy*. Wiley.
- Kennedy, S., Bergqvist, A., Chapron, C., D'Hooghe, T., Dunselman, G., Greb, R., Hummelshoj, L., Prentice, A. & Saridogan, E. (2005). ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod* **20**, 2698-704.
- Kok, I., Yap, S., Angley, M., Veselkov, K. A., Holmes, E., Lindon, J. C. & Nicholson, J. K. (2010). Urinary metabolic phenotyping differentiates children with autism, from their unaffected siblings and age-matched controls. *J Proteome Res* **9**, 2996-3004.
- Kordalewska, M. & Markuszewski, M. J. (2015). Metabolomics in cardiovascular diseases. *J Pharm Biomed Anal*.
- Kostara, C. E., Papathanasiou, A., Cung, M. T., Elisaf, M. S., Goudevenos, J. & Bairaktari, E. T. (2010). Evaluation of established coronary heart disease on the basis of HDL and non-HDL NMR lipid profiling. *J Proteome Res* **9**, 897-911.
- Kyama, C. M., Debrock, S., Mwenda, J. M. & Hooghe, T. M. D. (2003). Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis. *RB&E* **9**, 1-9.
- Kyama, C. M., Mihalyi, A., Gevaert, O., Waelkens, E., Simsa, P., Van de Plas, R., Meuleman, C., De Moor, B. & D'Hooghe, T. M. (2011). Evaluation of endometrial biomarkers for semi-invasive diagnosis of endometriosis. *Fertil Steril* **95**, 1338-43.e1-3.
- Lewis, G. D., Asnani, A. & Gerszten, R. E. (2008). Application of metabolomics to cardiovascular biomarker and pathway discovery. *J Am Coll Cardiol* **52**, 117-23.
- Lindon, J. C., Nicholson, J. & Holmes, E. (2007). *Handbook of metabonomics and metabolomics*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Lindon, J. C., Tranter, G. & Koppenaal, D. (2010). Biofluids Studied by NMR Spectroscopy. In *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry*, pp. 98-116.
- Manjula, S., Monteiro, F., Rao Aroor, A., Rao, S., Annaswamy, R. & Rao, A. (2010). Assessment of serum L-fucose in brain tumor cases. *Ann Indian Acad Neurol* **13**, 33-6.
- Marcinkiewicz, J. & Kontny, E. (2014). Taurine and inflammatory diseases. *Amino Acids* **46**, 7-20.

Mari-Alexandre, J., Garcia-Oms, J., Barcelo-Molina, M., Gilabert-Aguilar, J., Estelles, A., Braza-Boils, A. & Gilabert-Estelles, J. (2015). MicroRNAs and angiogenesis in endometriosis. *Thromb Res* **135** Suppl 1, S38-40.

Marín, J. M. (2011). Análisis Multivariado de datos. <https://sites.google.com/site/ramolinacruz41/apuntes>.

May, K. E., Conduit-Hulbert, S. A., Villar, J., Kirtley, S., Kennedy, S. H. & Becker, C. M. (2010). Peripheral biomarkers of endometriosis: a systematic review. *Hum Reprod Update* **16**, 651-74.

Melo, A. S., Rosa-e-Silva, J. C., Rosa-e-Silva, A. C., Poli-Neto, O. B., Ferriani, R. A. & Vieira, C. S. (2010). Unfavorable lipid profile in women with endometriosis. *Fertil Steril* **93**, 2433-6.

Mickiewicz, B., Vogel, H. J., Wong, H. R. & Winston, B. W. (2013). Metabolomics as a novel approach for early diagnosis of pediatric septic shock and its mortality. *Am J Respir Crit Care Med* **187**, 967-76.

Milkevitch, M., Shim, H., Pilatus, U., Pickup, S., Wehrle, J. P., Samid, D., Poptani, H., Glickson, J. D. & Delikatny, E. J. (2005). Increases in NMR-visible lipid and glycerophosphocholine during phenylbutyrate-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta* **1734**, 1-12.

Mol, B. W., Bayram, N., Lijmer, J. G., Wiegerinck, M. A., Bongers, M. Y., van der Veen, F. & Bossuyt, P. M. (1998). The performance of CA-125 measurement in the detection of endometriosis: a meta-analysis. *Fertil Steril* **70**, 1101-8.

Moore, J., Copley, S., Morris, J., Lindsell, D., Golding, S. & Kennedy, S. H. (2002). A systematic review of the accuracy of ultrasound in the diagnosis of endometriosis. *Ultrasound in obstetrics & gynecology* **20**, 630-634.

Munksgaard, P. S. & Blaakaer, J. (2011). The association between endometriosis and gynecological cancers and breast cancer: a review of epidemiological data. *Gynecol Oncol* **123**, 157-63.

Murri, M., Insenser, M. & Escobar-Morreale, H. F. (2014). Metabolomics in polycystic ovary syndrome. *Clin Chim Acta* **429**, 181-8.

Nagana Gowda, G. A., Gowda, Y. N. & Raftery, D. (2015). Expanding the limits of human blood metabolite quantitation using NMR spectroscopy. *Anal Chem* **87**, 706-15.

Nel-Themaat, L. & Nagy, Z. P. (2011). A review of the promises and pitfalls of oocyte and embryo metabolomics. *Placenta* **32** Suppl 3, S257-63.

Newton, R., Kuitert, L. M., Slater, D. M., Adcock, I. M. & Barnes, P. J. (1997). Cytokine induction of cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 mRNA is suppressed by glucocorticoids in human epithelial cells. *Life Sci* **60**, 67-78.

Nicholson, J. K., Foxall, P. J., Spraul, M., Farrant, R. D. & Lindon, J. C. (1995). 750 MHz ¹H and ¹H-¹³C NMR spectroscopy of human blood plasma. *Anal Chem* **67**, 793-811.

Nyholt, D. R., Low, S. K., Anderson, C. A., Painter, J. N., Uno, S., Morris, A. P., MacGregor, S., Gordon, S. D., Henders, A. K., Martin, N. G., Attia, J., Holliday, E. G., McEvoy, M., Scott, R. J., Kennedy, S. H., Treloar, S. A., Missmer, S. A., Adachi, S., Tanaka, K., Nakamura, Y., Zondervan, K. T., Zembutsu, H. & Montgomery, G.

VI. Bibliografia

- W. (2012). Genome-wide association meta-analysis identifies new endometriosis risk loci. *Nat Genet* **44**, 1355-9.
- Olive, D. L. & Pritts, E. A. (2001). Treatment of endometriosis. *N Engl J Med* **345**, 266-75.
- Overton, C., Davis, C., McMillan, L. & Shaw, W. R. (2007). *An Atlas of Endometriosis*
- Painter, J. N., Anderson, C. A., Nyholt, D. R., Macgregor, S., Lin, J., Lee, S. H., Lambert, A., Zhao, Z. Z., Roseman, F., Guo, Q., Gordon, S. D., Wallace, L., Henders, A. K., Visscher, P. M., Kraft, P., Martin, N. G., Morris, A. P., Treloar, S. A., Kennedy, S. H., Missmer, S. A., Montgomery, G. W. & Zondervan, K. T. (2011). Genome-wide association study identifies a locus at 7p15.2 associated with endometriosis. *Nat Genet* **43**, 51-4.
- Patti, G. J., Yanes, O. & Siuzdak, G. (2012). Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 263-269.
- Petracco, R., Grechukhina, O., Popkhadze, S., Massasa, E., Zhou, Y. & Taylor, H. S. (2011). MicroRNA 135 regulates HOXA10 expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* **96**, E1925-33.
- Petricoin, E. F., Zoon, K. C., Kohn, E. C., Barrett, J. C. & Liotta, L. A. (2002). Clinical proteomics: translating benchside promise into bedside reality. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 683-95.
- Pietilainen, K. H., Sysi-Aho, M., Rissanen, A., Seppanen-Laakso, T., Yki-Jarvinen, H., Kaprio, J. & Oresic, M. (2007). Acquired obesity is associated with changes in the serum lipidomic profile independent of genetic effects--a monozygotic twin study. *PLoS One* **2**, e218.
- Piva, M., Moreno, J. I. & Sharpe-Timms, K. L. (2003). Glycosylation and over-expression of endometriosis-associated peritoneal haptoglobin. *Glycoconj J* **19**, 33-41.
- Psychogios, N., Hau, D. D., Peng, J., Guo, A. C., Mandal, R., Bouatra, S., Sinelnikov, I., Krishnamurthy, R., Eisner, R., Gautam, B., Young, N., Xia, J., Knox, C., Dong, E., Huang, P., Hollander, Z., Pedersen, T. L., Smith, S. R., Bamforth, F., Greiner, R., McManus, B., Newman, J. W., Goodfriend, T. & Wishart, D. S. (2011). The human serum metabolome. *PLoS One* **6**, e16957.
- Puchades-Carrasco, L., Lecumberri, R., Martinez-Lopez, J., Lahuerta, J. J., Mateos, M. V., Prosper, F., San-Miguel, J. F. & Pineda-Lucena, A. (2013). Multiple myeloma patients have a specific serum metabolomic profile that changes after achieving complete remission. *Clin Cancer Res* **19**, 4770-9.
- Pugsley, Z. & Ballard, K. (2007). Management of endometriosis in general practice- the pathway to diagnosis. *British Journal of General Practice*, 470-476.
- Quintás, G., Portillo, N., García-Cañaveras, J. C., Castell, J. V., Ferrer, A. & Lahoz, A. (2011). Chemometric approaches to improve PLS-DA model outcome for predicting human non-alcoholic fatty liver disease using UPLC-MS as a metabolic profiling tool. *Metabolomics* **8**, 86-98.
- Rahmioglu, N., Nyholt, D. R., Morris, A. P., Missmer, S. A., Montgomery, G. W. & Zondervan, K. T. (2014). Genetic variants underlying risk of endometriosis: insights from meta-analysis of eight genome-wide association and replication datasets. *Hum Reprod Update* **20**, 702-16.
- Rasmuson, T. & Björk, G. R. (1995). Urinary excretion of pseudouridine and prognosis of patients with malignant lymphoma. *Acta Oncol* **34**, 61-67.

- Reza Razzaghi, M., Mohsen Mazloomfard, M. & Ansari Jafari, A.** (2012). Endometriosis. In *Endometriosis - Basic Concepts and Current research Trends*, pp. 3-30. InTech.
- Rizner, T. L.** (2009). Estrogen metabolism and action in endometriosis. *Mol Cell Endocrinol* **307**, 8-18.
- Romero, R., Espinoza, J., Gotsch, F., Kusanovic, J. P., Friel, L. A., Erez, O., Mazaki-Tovi, S., Than, N. G., Hassan, S. & Tromp, G.** (2006). The use of high-dimensional biology (genomics, transcriptomics, proteomics, and metabolomics) to understand the preterm parturition syndrome. *Bjog* **113 Suppl 3**, 118-35.
- Rutkowski, B., Slominska, E., Szolekiewicz, M., Smolinski, R. T., Striley, C., Rutkowski, P. & Swierczynski, J.** (2003). N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide: A novel uremic toxin? *Kidney int* **63**, 19-21.
- Rutkowski, P., Slominska, E. M., Szolkiewicz, M., Aleksandrowicz, E., Smolenski, R. T., Wolyniec, W., Renke, M., Wisterowicz, K., Swierczynski, J. & Rutkowski, B.** (2007). Relationship between uremic toxins and oxidative stress in patients with chronic renal failure. *Scand J Urol Nephrol* **41**, 243-8.
- Saccetti, E., Hoefsloot, H. C. J., Smilde, A. K., Westerhuis, J. A. & Hendriks, M. M. W. B.** (2013). Reflections on univariate and multivariate analysis of metabolomics data. *Metabolomics* **10**, 361-374.
- Sakkas, D.** (2014). Embryo selection using metabolomics. *Methods Mol Biol* **1154**, 533-40.
- Salek, R. M., Maguire, M. L., Bentley, E., Rubtsov, D. V., Hough, T., Cheeseman, M., Nunez, D., Sweatman, B. C., Haselden, J. N., Cox, R. D., Connor, S. C. & Griffin, J. L.** (2007). A metabolomic comparison of urinary changes in type 2 diabetes in mouse, rat, and human. *Physiol Genomics* **29**, 99-108.
- Sampson, J. A.** (1927). Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* **14**, 422-469.
- Sano, M., Morishita, T., Nozaki, M., Yokoyama, M., Watanabe, Y. & Nakano, H.** (1994). Elevation of the phospholipase A2 activity in peritoneal fluid cells from women with endometriosis. *Fertil Steril* **61**, 657-62.
- Sanz-Cortes, M., Carbajo, R. J., Crispi, F., Figueras, F., Pineda-Lucena, A. & Gratacos, E.** (2013). Metabolomic profile of umbilical cord blood plasma from early and late intrauterine growth restricted (IUGR) neonates with and without signs of brain vasodilation. *PLoS One* **8**, e80121.
- Scully, R. E.** (1987). Classification of Human Ovarian Tumors. *Environ health perspect* **73**, 15-25.
- Shetty, R. K. S., Bhandary, S. K. & Kali, A.** (2013). Significance of Serum L-fucose Glycoprotein as Cancer Biomarker in Head and Neck Malignancies without Distant Metastasis. *J Clin Diagn Res* **7**, 2818-20.
- Sitole, L. J., Williams, A. A. & Meyer, D.** (2013). Metabonomic analysis of HIV-infected biofluids. *Mol Biosyst* **9**, 18-28.
- Slupsky, C. M., Steed, H., Wells, T. H., Dabbs, K., Schepansky, A., Capstick, V., Faught, W. & Sawyer, M. B.** (2010). Urine metabolite analysis offers potential early diagnosis of ovarian and breast cancers. *Clin Cancer Res* **16**, 5835-41.

VI. Bibliografia

- Somigliana, E., Vigano, P., Parazzini, F., Stoppelli, S., Giambattista, E. & Vercellini, P. (2006). Association between endometriosis and cancer: a comprehensive review and a critical analysis of clinical and epidemiological evidence. *Gynecol Oncol* **101**, 331-41.
- Sourial, S., Tempest, N. & Hapangama, D. K. (2014). Theories on the pathogenesis of endometriosis. *Int J Reprod Med* **2014**, 179515.
- Stenlund, H. (2011). Improving interpretation by orthogonal variation: Multivariate analysis of spectroscopic data. In *Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology*. Umeå University.
- Stephens, A. N., Hannan, N. J., Rainczuk, A., Meehan, K. L., Chen, J., Nicholls, P. K., Rombauts, L. J., Stanton, P. G., Robertson, D. M. & Salamonsen, L. A. (2010). Post-translational modifications and protein-specific isoforms in endometriosis revealed by 2D DIGE. *J Proteome Res* **9**, 2438-49.
- Subramanian, A., Shankar Joshi, B., Roy, A. D., Roy, R., Gupta, V. & Dang, R. S. (2008). NMR spectroscopic identification of cholesterol esters, plasmalogen and phenolic glycolipids as fingerprint markers of human intracranial tuberculomas. *NMR Biomed* **21**, 272-88.
- Suliman, M. E., Qureshi, a. R., Stenvinkel, P., Pecoits-Filho, R., Bárány, P., Heimbürger, O., Anderstam, B., Rodríguez Ayala, E., Divino Filho, J. C., Alvestrand, A. & Lindholm, B. (2005). Inflammation contributes to low plasma amino acid concentrations in patients with chronic kidney disease. *Ame J Clin Nutr* **82**, 342-349.
- Suryawanshi, S., Vlad, A. M., Lin, H. M., Mantia-Smaldone, G., Laskey, R., Lee, M., Lin, Y., Donnellan, N., Klein-Patel, M., Lee, T., Mansuria, S., Elishaev, E., Budiu, R., Edwards, R. P. & Huang, X. (2013). Plasma microRNAs as novel biomarkers for endometriosis and endometriosis-associated ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **19**, 1213-24.
- Taes, Y. E., Marescau, B., De Vriese, A., De Deyn, P. P., Schepers, E., Vanholder, R. & Delanghe, J. R. (2008). Guanidino compounds after creatine supplementation in renal failure patients and their relation to inflammatory status. *Nephrol Dial Transplant* **23**, 1330-5.
- Teague, E. M., Print, C. G. & Hull, M. L. (2010). The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. *Hum Reprod Update* **16**, 142-65.
- Ten Have, S., Fraser, I., Markham, R., Lam, A. & Matsumoto, I. (2007). Proteomic analysis of protein expression in the eutopic endometrium of women with endometriosis. *Proteomics Clin Appl* **1**, 1243-51.
- Tokushige, N., Markham, R., Crossett, B., Ahn, S. B., Nelaturi, V. L., Khan, A. & Fraser, I. S. (2011). Discovery of a novel biomarker in the urine in women with endometriosis. *Fertil Steril* **95**, 46-9.
- Ueda, Y., Enomoto, T., Kimura, T., Miyatake, T., Yoshino, K., Fujita, M. & Kimura, T. (2010). Serum biomarkers for early detection of gynecologic cancers. *Cancers (Basel)* **2**, 1312-27.
- Ulrich, E. L., Akutsu, H., Doreleijers, J. F., Harano, Y., Ioannidis, Y. E., Lin, J., Livny, M., Mading, S., Maziuk, D., Miller, Z., Nakatani, E., Schulte, C. F., Tolmie, D. E., Kent Wenger, R., Yao, H. & Markley, J. L. (2008). BioMagResBank. *Nucleic Acids Res* **36**, D402-8.
- Uno, S., Zembutsu, H., Hirasawa, A., Takahashi, A., Kubo, M., Akahane, T., Aoki, D., Kamatani, N., Hirata, K. & Nakamura, Y. (2010). A genome-wide association study

identifies genetic variants in the CDKN2BAS locus associated with endometriosis in Japanese. *Nat Genet* **42**, 707-10.

Van Langendonckt, A., Casanas-Roux, F. & Donnez, J. (2002). Oxidative stress and peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* **77**, 861-870.

Vercellini, P., Vigano, P., Somigliana, E. & Fedele, L. (2014). Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* **10**, 261-75.

Vinaixa, M., Samino, S., Saez, I., Duran, J., Guinovart, J. J. & Yanes, O. (2012). A Guideline to Univariate Statistical Analysis for LC/MS-Based Untargeted Metabolomics-Derived Data. *Metabolites* **2**, 775-95.

Vinatier, D., Orazi, G., Cosson, M. & Dufour, P. (2001). Theories of endometriosis. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology* **96**, 21-34.

Vinayavekhin, N., Homan, E. A. & Saghatelian, A. (2010). Exploring Disease through Metabolomics. *Acs Chemical Biology* **5**, 91-103.

Vitonis, A. F., Baer, H. J., Hankinson, S. E., Laufer, M. R. & Missmer, S. A. (2010). A prospective study of body size during childhood and early adulthood and the incidence of endometriosis. *Hum Reprod* **25**, 1325-34.

Vodolazkaia, A., El-Aalamat, Y., Popovic, D., Mihalyi, A., Bossuyt, X., Kyama, C. M., Fassbender, A., Bokor, A., Schols, D., Huskens, D., Meuleman, C., Peeraer, K., Tomassetti, C., Gevaert, O., Waelkens, E., Kasran, A., De Moor, B. & D'Hooghe, T. M. (2012). Evaluation of a panel of 28 biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. *Hum Reprod* **27**, 2698-711.

Vouk, K., Hevir, N., Ribic-Pucelj, M., Haarpaintner, G., Scherb, H., Osredkar, J., Moller, G., Prehn, C., Rizner, T. L. & Adamski, J. (2012). Discovery of phosphatidylcholines and sphingomyelins as biomarkers for ovarian endometriosis. *Hum Reprod* **27**, 2955-65.

Vouk, K., Smuc, T., Guggenberger, C., Ribic-Pucelj, M., Sinkovec, J., Husen, B., Thole, H., Houba, P., Thaete, C., Adamski, J. & Rizner, T. L. (2011). Novel estrogen-related genes and potential biomarkers of ovarian endometriosis identified by differential expression analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol* **125**, 231-42.

Vu, T. N. & Laukens, K. (2013). Getting your peaks in line: a review of alignment methods for NMR spectral data. *Metabolites* **3**, 259-76.

Vu, T. N., Valkenburg, D., Smets, K., Verwaest, K. A., Dommissie, R., Lemiere, F., Verschoren, A., Goethals, B. & Laukens, K. (2011). An integrated workflow for robust alignment and simplified quantitative analysis of NMR spectrometry data. *BMC Bioinformatics* **12**, 405.

Wallace, M., Hashim, Y. Z., Wingfield, M., Culliton, M., McAuliffe, F., Gibney, M. J. & Brennan, L. (2010). Effects of menstrual cycle phase on metabolomic profiles in premenopausal women. *Hum Reprod* **25**, 949-56.

Wang, H., Tso, V. K., Slupsky, C. M. & Fedorak, R. N. (2010). Metabolomics and detection of colorectal cancer in humans: a systematic review. *Future Oncol* **6**, 1395-406.

Webb-Robertson, B. J., Lowry, D. F., Jarman, K. H., Harbo, S. J., Meng, Q. R., Fuciarelli, A. F., Pounds, J. G. & Lee, K. M. (2005). A study of spectral integration and normalization in NMR-based metabolomic analyses. *J Pharm Biomed Anal* **39**, 830-6.

VI. Bibliografia

- Wehrens, R.** (2011). *Chemometrics with R: Multivariate Data Analysis in the Natural Sciences and Life Sciences*. Springer.
- Weiss, G., Goldsmith, L. T., Taylor, R. N., Bellet, D. & Taylor, H. S.** (2009). Inflammation in reproductive disorders. *Reprod Sci* **16**, 216-29.
- Wishart, D. S., Jewison, T., Guo, A. C., Wilson, M., Knox, C., Liu, Y., Djombou, Y., Mandal, R., Aziat, F., Dong, E., Bouatra, S., Sinelnikov, I., Arndt, D., Xia, J., Liu, P., Yallou, F., Bjorn Dahl, T., Perez-Pineiro, R., Eisner, R., Allen, F., Neveu, V., Greiner, R. & Scalbert, A.** (2013). HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res* **41**, D801-7.
- Wojcik, O. P., Koenig, K. L., Zeleniuch-Jacquotte, A., Costa, M. & Chen, Y.** (2010). The potential protective effects of taurine on coronary heart disease. *Atherosclerosis* **208**, 19-25.
- Wu, J. M., Ward, R. M., Allen-Brady, K. L., Edwards, T. L., Norton, P. A., Hartmann, K. E., Hauser, E. R. & Velez Edwards, D. R.** (2013). Phenotyping clinical disorders: lessons learned from pelvic organ prolapse. *Am J Obstet Gynecol* **208**, 360-5.
- Wu, M. H., Lu, C. W., Chuang, P. C. & Tsai, S. J.** (2010). Prostaglandin E2: the master of endometriosis? *Exp Biol Med (Maywood)* **235**, 668-77.
- Zhang, H., Niu, Y., Feng, J., Guo, H., Ye, X. & Cui, H.** (2006). Use of proteomic analysis of endometriosis to identify different protein expression in patients with endometriosis versus normal controls. *Fertil Steril* **86**, 274-82.
- Zhang, S., Zheng, C., Lanza, I. R., Nair, K. S., Raftery, D. & Vitek, O.** (2009). Interdependence of signal processing and analysis of urine ¹H NMR spectra for metabolic profiling. *Anal Chem* **81**, 6080-8.
- Zheng, N., Pan, C. & Liu, W.** (2011). New serum biomarkers for detection of endometriosis using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Int Med Res* **39**, 1184-92.
- Zhou, A., Ni, J., Xu, Z., Wang, Y., Zhang, H., Wu, W., Lu, S., Karakousis, P. C. & Yao, Y. F.** (2015). Metabolomics specificity of tuberculosis plasma revealed by (1)H NMR spectroscopy. *Tuberculosis (Edinb)* **95**, 294-302.

VII. ANEXOS

1. COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

Autor: Vicente-Muñoz S, Puchades-Carrasco L, Morcillo I, Hidalgo JJ, Gilabert-Estelles J, Novella-Maestre E, Pellicer A, Pineda-Lucena A.

Título: **Towards the development of a non-invasive diagnostic test of endometriosis using metabolomics by NMR**

Tipo de participación: Póster

Congreso: Rethinking targets for therapeutic intervention, INTERBIO Symposium

Lugar de celebración: Burdeos, Francia Fecha: 2011

Autores: Vicente-Muñoz S, Puchades-Carrasco L, Morcillo I, Hidalgo JJ, Gilabert-Estelles J, Novella-Maestre E, Pellicer A, Pineda-Lucena A.

Título: **Metabolomics by NMR as a tool for diagnosing endometriosis**

Tipo de participación: Póster

Congreso: 27th Annual Meeting of ESHRE

Lugar de celebración: Estocolmo, Suecia Fecha: 2011

Autores: Vicente-Muñoz S, Puchades-Carrasco L, Morcillo I, Payá V, Novella-Maestre E, Pellicer A, Pineda-Lucena A.

Título: **An NMR metabolomics approach for identifying endometriosis biomarkers**

Tipo de participación: Póster

Congreso: IV Ibero-American NMR Meeting - VI GERMN Bienal Meeting

Lugar de celebración: University of Aveiro, Portugal Fecha: 2012

Autor: Vicente-Muñoz S.

Título: **Diagnóstico temprano de endometriosis mediante nuevas tecnologías: aplicación de la plataforma metabolómica.**

Tipo de participación: Comunicación oral

Congreso: Seminario de Investigación

Lugar de celebración: Servicio de Obstetricia y Ginecología

Hospital de Manises, Valencia, España Fecha: 2012

Autores: Morcillo López I, Moreno Collado A, Vicente-Muñoz S, Calvo Hoyas P, Abad Carrascosa A, Pellicer Martínez A.

Título: **Descubrimiento y validación de metabolitos en orina, suero y tejido propios de endometriosis por RMN-EM**

Tipo de participación: Póster

Congreso: XXXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO)

Lugar de celebración: Tenerife, España Fecha: 2013

VII. Anexos

Autores: Calvo Hoyas P, Morcillo López I, Juárez Pallares I, Vicente-Muñoz S, Paya Amate V, Abad Carrascosa A.

Título: **Characterization of urine metabolic profile of endometriosis using metabolomics by NMR**

Tipo de participación: Póster

Congreso: 2nd European Congress of Endometriosis

Lugar de celebración: Berlín, Alemania

Fecha: 2013

Autores: Vicente-Muñoz S, Puchades-Carrasco L, Morcillo I, Calvo Hoyas P, Juárez Pallarés I, Payá V, Abad Carrascosa A, Pellicer A, Pineda-Lucena A.

Título: **Metabolomics by NMR: a tool for identifying biomarkers involved in Endometriosis**

Tipo de participación: Póster

Congreso: 2nd Biomarker Meeting in Personalized Reproductive Medicine

Lugar de celebración: Valencia, España

Fecha: 2014

Autor: Vicente-Muñoz S

Título: **Metabolomics by NMR: a tool for identifying biomarkers involved in endometriosis.**

Tipo de participación: Comunicación oral

Congreso: Seminario de Investigación

Lugar de celebración: Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Valencia, España

Fecha: 2014

Nuclear magnetic resonance metabolomic profiling of urine provides a noninvasive alternative to the identification of biomarkers associated with endometriosis

Sara Vicente-Muñoz, M.Sc.,^{a,b} Inmaculada Morcillo, M.D.,^b Leonor Puchades-Carrasco, Ph.D.,^a Vicente Payá, M.D.,^b Antonio Pellicer, M.D.,^{b,c} and Antonio Pineda-Lucena, Ph.D.^{a,d}

^a Structural Biochemistry Laboratory, Centro de Investigación Príncipe Felipe; ^b Department of Obstetrics and Gynecology, Hospital Universitario La Fe; ^c Instituto Valenciano de Infertilidad; and ^d Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia, Spain

Objective: To investigate whether urine metabolomic profile can be used to identify biomarkers associated to endometriosis.

Design: Prospective study. For each subject, a urine sample was collected after overnight fasting and before surgery.

Setting: University medical center.

Patient(s): The clinical cohort included 45 endometriosis patients, diagnosed at early (n = 6) and advanced (n = 39) stages of the disease, and 36 healthy women. All women underwent diagnostic laparoscopy to visually confirm the presence or absence of endometriotic lesions.

Intervention(s): Metabolomic profiling of urine samples based on ¹H-nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy in combination with statistical approaches.

Main Outcome Measure(s): Comparative identification of metabolites present in urine from endometriosis patients and healthy women.

Result(s): The urine metabolomic profile of endometriosis patients exhibited higher concentrations of N¹-methyl-4-pyridone-5-carboxamide, guanidinosuccinate, creatinine, taurine, valine, and 2-hydroxyisovalerate and decreased concentrations of lysine compared with healthy women. Most of these metabolites are involved in inflammation and oxidative stress processes. These pathophysiologic events had been previously described to be present in ectopic endometrial proliferation foci.

Conclusion(s): Overall, the results demonstrate the potential of ¹H-NMR-based metabolomics, a rapid and noninvasive approach, to identify metabolic changes associated to endometriosis in urine samples. This information could be useful to get a better understanding of the pathogenesis of endometriosis, thus providing support to the noninvasive diagnosis of this pathology. (Fertil Steril® 2015; ■:■-■. ©2015 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: Endometriosis, metabolomics, ¹H-NMR spectroscopy, urine, biomarkers

Discuss: You can discuss this article with its authors and with other ASRM members at <http://fertstertforum.com/vicentemunozs-urine-metabolomics-endometriosis/>



Use your smartphone to scan this QR code and connect to the discussion forum for this article now.*

* Download a free QR code scanner by searching for "QR scanner" in your smartphone's app store or app marketplace.

Endometriosis is a chronic gynecologic disease, estrogen dependent, and associated with pelvic

pain and infertility. Endometriosis is defined by the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity (1) and

represents one of the most common benign gynecologic disorders. The exact prevalence of endometriosis is unknown, but estimates range from 10% in women of reproductive age to up to 50% in women with pelvic pain and/or infertility (2, 3). Endometriosis symptoms are highly variable, often nonspecific, and common in the general population. The wide range of clinical manifestations complicates the diagnosis of endometriosis based

Received May 8, 2015; revised July 20, 2015; accepted July 22, 2015.

S.V.-M. has nothing to disclose. I.M. has nothing to disclose. L.P.-C. has nothing to disclose. V.P. has nothing to disclose. A.P. has nothing to disclose. A.P.-L. has nothing to disclose.

Supported by the Conselleria de Educació, Regional Government of Valencia, Spain (PROMETEO/2010/078), and the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2014-53977-R).

Reprint requests: Antonio Pineda-Lucena, Ph.D., Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Avenida Fernando Abril Martorell 106, 46026 Valencia, Spain (E-mail: pineda_ant@gva.es).

Fertility and Sterility® Vol. ■, No. ■, ■ 2015 0015-0282/\$36.00

Copyright ©2015 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.07.1149>

on symptoms or clinical examination. Furthermore, available imaging techniques and blood tests have limited value as diagnostic tools (4). The compounding effects of all these factors contribute to diagnostic delays of an average of 8 years (5).

Currently, the definitive method to diagnose and classify endometriosis is direct visualization at surgery, usually via laparoscopy (2). But laparoscopy is an invasive procedure and inappropriate for periodic restaging of the disease after treatment. In this context, a biomarker, or a combination of them, that could be measured in an easily accessible biofluid would provide a starting point for the noninvasive diagnosis of endometriosis. However, despite numerous efforts carried out during the past years focused on the discovery of endometriosis biomarkers, nowadays, there is no simple test that can be used to diagnose endometriosis with enough statistical power to be applied in clinical practice. Thus, the discovery of biomarkers in biologic fluids remains an unresolved challenge.

Metabolomics focuses on the characterization of patterns of metabolites present in body fluids or tissues and is leading to advanced diagnostics and therapeutics (6). Metabolites are low-molecular-weight compounds, end-products of metabolism (7), that can be objectively measured and evaluated as indicators of normal physiologic or pathologic processes, pharmacologic responses to treatment, etc. (8). Disease status is known to alter the metabolic composition of biofluids, in qualitative and quantitative terms, by generating metabolic signatures that correlate with a given pathologic condition (9). The most commonly used analytic techniques for metabolic profiling are nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and mass spectrometry (MS). In particular, metabolomics with the use of $^1\text{H-NMR}$ provides a robust and reliable platform for the simultaneous measurement and quantification of a wide range of metabolites in a given sample (10) with minimal sample handling (11).

The aim of the present study was the characterization of the urine metabolomic profile of endometriosis patients and its comparison with that of healthy women. Our results show that metabolites involved in inflammation and oxidative stress processes play a very important role in this disease. This information could be useful for getting a better understanding of the molecular mechanisms involved in the pathogenesis of endometriosis and contribute to the noninvasive diagnosis of this disease.

MATERIALS AND METHODS

Study Design and Subjects

Patient recruitment was carried out at the Hospital Universitario La Fe (Valencia, Spain), and measurement and analysis of the urine metabolomic profiles were carried out at the Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia, Spain). Samples were collected from 81 volunteers recruited from November 2009 to December 2012. Clinical diagnosis and classification of subjects was performed with the use of laparoscopy to visually confirm the presence or absence of endometriosis. The group of women diagnosed with endometriosis consisted of 45 patients aged 18–43 years, presenting

endometriosis-associated symptoms, who were scheduled for laparoscopy for diagnosis and surgical treatment. Women diagnosed with endometriosis were staged from I to IV according to the revised American Society for Reproductive Medicine score (12). The control group was composed of 36 healthy women aged 26–45 years, who underwent routine diagnostic laparoscopy for tubal sterilization and, after discarding the presence of endometriosis, were included in the healthy individuals cohort. Menstrual cycle phases (MCPs) were classified as follicular phase (cycle days 1–14) or luteal phase (cycle days 15–28) after adjustment to a 28-day cycle. Women with previous history of endometriosis or other gynecologic diseases, including fibroids, other ovarian cysts, or pelvic inflammatory disease were excluded from the study. None of the participating women had received hormonal therapy for ≥ 1 month before surgery. In addition, women diagnosed with any other disease or under pharmacologic treatment were not included in the study. Clinical information associated with each sample group is summarized in Table 1.

Patient recruitment and sampling procedures were performed in accordance with the Declaration of Helsinki and applicable local regulatory requirements and laws and after approval from the Ethics Committee of the Hospital Universitario La Fe. Written informed consent was obtained from each participant before being included in this study.

Sample Collection and NMR Sample Preparation

Urine samples were collected from each participant after overnight fasting and before surgery into labeled tubes containing 0.05% sodium azide (NaN_3) to avoid bacterial growth (13). After collection, samples were rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until NMR analysis. For NMR analysis, urine samples were thawed at room temperature and gently mixed before sample preparation. 700 μL urine was centrifuged at 6000g for 10 minutes, 540 μL of the supernate was added to 60 μL 1.5 mol/L potassium phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.1% trimethylsilylpropionic acid-d4 sodium salt (TSP) as internal standard compound, and 0.05% NaN_3 in D_2O . Then samples were transferred to 5-mm NMR tubes and stored at 4°C until their analysis.

TABLE 1

Clinical characteristics of the samples included in the urine metabolomic study.

Characteristic	Healthy women (n = 36)	Endometriosis patients (n = 45)
Age (y), mean \pm SD	35.47 \pm 5.15	32.29 \pm 6.59
Menstrual cycle phase		
Follicular	30	30
Luteal	6	15
Stage of the disease		
Minimal/mild (I–II)	–	6
Moderate/severe (III–IV)	–	39

Vicente-Muñoz. Urine metabolomics of endometriosis. *Fertil Steril* 2015.

NMR Spectroscopy and Spectral Processing

¹H-NMR spectra were acquired at 300K on a Bruker Avance III 500 spectrometer (Bruker Biospin) operating at a ¹H frequency of 500.13 MHz and equipped with a 5-mm TBI broadband probe. For each sample, two one-dimensional (1D) NMR experiments were performed: 1) a standard Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) spin-echo pulse sequence (14); and 2) a 1D nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY) pulse sequence generating an unedited spectrum with improved solvent suppression (15). Sixteen free induction decays (FIDs) were collected into 64K data points over a spectral width of 20 ppm. Water resonance was presaturated with a 25-Hz pulse during a 4-second relaxation delay. Before Fourier transformation, each FID was zero filled and multiplied by an exponential weighting function with a line broadening of 1 Hz. Transformed spectra were automatically phased and baseline corrected with the use of Topspin 3.0 software (Bruker Biospin), and the chemical shifts were referenced internally to the TSP peak at 0.00 ppm. Additionally, two-dimensional (2D) ¹H-¹H total correlation spectroscopy and 2D ¹H-¹³C heteronuclear single quantum correlation experiments were performed for selected samples to facilitate the identification of biochemical substances (13). Metabolite assignment was performed with the use of analysis of mixtures (AMIX v. 3.9.7; Bruker Biospin) in combination with the Bruker NMR metabolic profiling database (Bbiorecode 2.0.0; Bruker Biospin) as well as other existing public databases and literature reports (16, 17).

1D CPMG spectra were used to build the data matrix. For spectral data reduction and before statistical analysis, each spectrum (δ 0.5–9.3 ppm) was automatically segmented into 6,532 consecutive equal width buckets (0.001 ppm), and the corresponding spectral areas were integrated with the use of AMIX 3.9.7. Regions of δ 6.50–4.32 ppm, including the residual water and urea resonances, and the baseline region of δ 9.26–9.15 ppm were excluded from the analysis. Then spectra were aligned with the use of the hierarchic cluster-based peak alignment algorithm (“Speaq” R package) (18) and normalized by means of probabilistic quotient normalization (19). Subsequently, the resulting bucket table was transformed into a data matrix of 653 consecutive rectangular buckets (0.01 ppm) with the use of the “Chemospec” R package (20) to facilitate the statistical analysis.

Multivariate and Univariate Statistical Analysis

Multivariate statistical analysis was carried out with the use of Simca 13.0.2 (Umetrics). Before statistical analysis, data were scaled to unit variance by dividing each variable by 1/SD, where SD represents the standard deviation value of each variable, so that all variables were given equal weight regardless of their absolute value. Principal component analysis (PCA), a nonsupervised statistical approach, was performed on normalized data for finding potential patterns, intrinsic clusters, and outliers, and univariate statistical analysis was used to identify the relevant spectral regions responsible for the discrimination between healthy women and endometriosis patients. Based on this analysis, the relative in-

tensity of each relevant spectral region, corresponding to a well resolved signal, was selected and integrated using the variable-size bucketing approach. Statistical significance of the data obtained for each metabolite was assessed with the use of the nonparametric Wilcoxon–Mann–Whitney *U* test (21). A *P* value of <.05 was considered to be statistically significant.

RESULTS

Urine Metabolomic Profile of Endometriosis Patients

Metabolomic profiles corresponding to all samples included in the study were obtained by means of ¹H-NMR spectroscopy. Good-quality spectra, characterized by the presence of signals with varying degrees of overlapping, were obtained for most of the samples. Figure 1 displays a representative urine ¹H-NMR spectrum from an endometriosis patient and the assignment of the most representative metabolites identified in these samples. In general, this biofluid contains spectral signals from a wide range of low-molecular-weight metabolites of diverse chemical classes (22), including organic acids, simple sugars and polysaccharides, amino acids, and low-molecular-weight proteins. In particular, urine spectra are dominated by urea, creatinine, trimethylamine-N-oxide, dimethylamine, hippuric acid, and citric acid resonances, among others (Fig. 1).

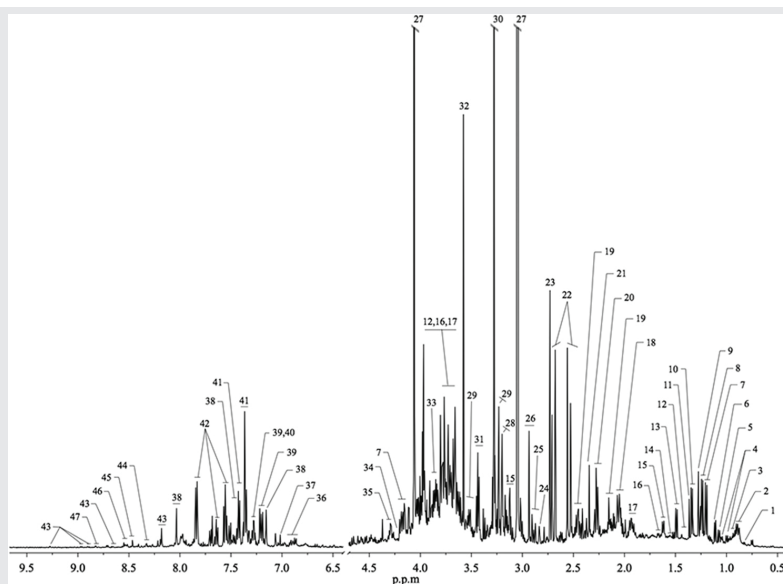
Sample Homogeneity and Outliers Detection

Sample homogeneity within the groups of samples was based on the PCA analysis of the CPMG urine spectra. Using this approach, it was possible to identify urine samples exhibiting metabolic profiles unusually different to the rest of the samples within their groups. Thus, four samples—two control and two endometriosis—showed urine metabolomic profiles characterized by the presence of either ethanol, nonidentifiable sources of contaminations, or bad-quality spectra. All of these samples were classified as outliers and excluded from the study. A PCA analysis of the data did not reveal any significant statistical difference between the urine metabolic profiles of the two sample groups, healthy women and endometriosis patients (data not shown). This nonsupervised analysis was also performed to evaluate the potential impact of different clinical variables (i.e., age, body mass index, MCP, disease stage) in the distribution of the data. However, the PCA analysis did not reveal either any pattern or clustering of the samples according to these descriptors.

Univariate Statistical Analysis of the Data

Once nonsupervised analyses were carried out, the data were subjected to a univariate statistical analysis to compare the CPMG urine spectra of both groups of samples and evaluate potential metabolic alterations associated with endometriosis. This analysis, based on the evaluation of the data matrix containing all urine spectral resonances, revealed significant statistical differences between the urine metabolomic profiles of healthy women and endometriosis patients. A total of 79 out of 653 variables, with *P* values <.05, were identified as

FIGURE 1



Representative 500-MHz $^1\text{H-NMR}$ spectrum of a urine sample from an endometriosis patient. Assigned metabolites: 1, 2-hydroxyisovalerate; 2, butyrate/ethylmalonate; 3, leucine/isoleucine; 4, valine; 5, isobutyrate/2-methylglutarate; 6, fucose; 7, 3-hydroxybutyrate/3-aminoisobutyrate; 8, methylmalonate; 9, 3-hydroxyisovalerate; 10, threonine; 11, 2-hydroxyisobutyrate; 12, lysine; 13, alanine; 14, adipate; 15, citrulline; 16, arginine; 17, ornithine; 18, N-acetyl groups; 19, glutamine; 20, 2-hydroxyglutarate; 21, pyruvate; 22, citrate; 23, dimethylamine; 24, methylguanidine; 25, asparagine; 26, trimethylamine; 27, creatinine; 28, choline; 29, glycerophosphocholine; 30, trimethylamine-N-oxide; 31, taurine; 32, glycine; 33, serine; 34, guanidinosuccinate; 35, pseudouridine; 36, 3,4-dihydroxymandelate; 37, 3-methylhistidine; 38, histidine; 39, indoxyl sulfate; 40, tryptophan; 41, phenylalanine/phenylacetylglutamine; 42, hippurate; 43, 1-methylnicotinamide; 44, N¹-Methyl-2-pyridone-5-carboxamide; 45, formate; 46, N¹-methyl-4-pyridone-5-carboxamide; 47, trigonelline.

Vicente-Muñoz. Urine metabolomics of endometriosis. *Fertil Steril* 2015.

relevant regions in the discrimination and used to identify the spectral signals corresponding to the altered metabolites in pathologic conditions.

Univariate statistical analysis of the comparison between endometriosis patients and healthy women was also performed according to the MCP. Thus, the 56 samples collected during the follicular phase (28 healthy women and 28 endometriosis patients) and the remaining 21 urine samples obtained during the luteal phase (6 healthy women, 15 endometriosis patients) were independently compared. This analysis revealed the existence of 52 and 66 statistically significant buckets, respectively, contributing to the discrimination between healthy women and endometriosis patients at these two menstrual phases. Finally, a similar approach was followed to compare the urine metabolomic profile of healthy women with those of endometriosis patients diagnosed at early stages of the disease. Although most of the endometriosis patients included in the study were diagnosed at advanced stages, thus preventing the generalization of the results to early stages of this disease, the comparison between healthy women ($n = 34$) and endometriosis patients at early stages ($n = 6$) revealed 40 statistically significant buckets between both groups of samples.

Metabolite Identification and Quantification

Further analyses of the data were carried out with the use of variable-size bucketing to assess if the metabolites associated with the relevant buckets identified in previous comparisons were also statistically significant when comparing the different groups of samples. This analysis was initially performed on the data obtained from the comparison between healthy women and endometriosis patients. Examination of the metabolites associated with the 79 variables involved in the discrimination between both groups revealed the existence of statistically significant differences in the concentrations of 10 metabolites. Thus, it was found that urine from endometriosis patients, compared with healthy women, was characterized by increased concentrations of N¹-methyl-4-pyridone-5-carboxamide (4-Py), guanidinosuccinate, creatinine, taurine, valine, 2-hydroxyisovalerate, an unknown metabolite U2, and decreased concentrations of lysine and two other unknown metabolites, U1 and U6 (Table 2).

A similar analysis revealed that seven metabolites displayed statistically significant concentration differences when comparing endometriosis patients and healthy women

TABLE 2

Variations for the statistically significant metabolites found in the comparison between endometriosis patients (n = 43) and healthy women (n = 34).

δ ¹ H (ppm) ^a	Metabolite	Multiplicity	P value ^b	% variation ^c
8.5565–8.5005	4-Py	m	.011	47.72
6.9985–6.9695	U1	d	.041	–32.36
4.2415–4.2285	Guanidinosuccinate	m	.012	14.31
4.0855–4.0625	Creatinine	s	.018	12.63
3.4565–3.4195	Taurine	t	.002	28.62
3.4185–3.4115	U2	s	.009	18.16
1.4745–1.4465	Lysine	m	.002	–18.57
1.4455–1.4315	U6	s	.010	–16.86
1.0585–1.0375	Valine	d	.011	2.59
0.8385–0.8145	2-Hydroxyisovalerate	d	.014	11.87

Note: 4-Py = N¹-methyl-4-pyridone-5-carboxamide; d = doublet; m = multiplet; s = singlet; t = triplet; U = unknown metabolite.

^a Chemical shift range for the integration.

^b Calculated by means of Wilcoxon–Mann–Whitney U test.

^c Relative variation of the metabolite level in endometriosis patients compared with healthy women.

Vicente-Muñoz. Urine metabolomics of endometriosis. *Fertil Steril* 2015.

during the follicular phase. At this MCP, the urine of endometriosis patients was characterized by increased concentrations of 4-Py, taurine, valine, 2-hydroxyisovalerate, and U2 and decreased concentrations of lysine and U4 compared with healthy women (Table 3). On the other hand, the analysis performed on the samples collected during the luteal phase showed that ten metabolites presented statistically significant concentration differences. The concentrations of pseudouridine, creatinine, taurine, glycerophosphocholine (GPC), U2, and U3 were found to be significantly higher in women with endometriosis, and lysine, threonine, fucose, and U5 were decreased, compared with healthy women (Table 3). Overall, it was found that three metabolites (taurine, U2, and lysine) were significantly altered ($P < .05$) regardless of MCP.

Finally, the analysis of the 40 statistically significant buckets identified in the discrimination between healthy women and endometriosis patients at early stages of the disease led to the identification of four significant metabolites ($P < .05$). All of them were present and displayed the same variation as that found in the general model. Thus, the urine metabolomic profile of endometriosis patients at early stages of the disease, compared with healthy women, was characterized by increased concentrations of valine and 2-hydroxyisovalerate and decreased concentrations of lysine and U6.

DISCUSSION

Extensive research has been carried out aiming to develop noninvasive tests for diagnosing endometriosis. However, although several biomarkers have been proposed, none of them have shown to provide clinically relevant benefits (3, 23). To the best of our knowledge, this study provides the first global examination by means of NMR of the urine metabolomic profile of women diagnosed with endometriosis. Our results indicate that the urine metabolites identified as relevant in the discrimination between endometriosis patients and healthy women provide a better understanding of the pathophysiologic mechanisms

involved in this disease and could eventually contribute to the diagnosis of endometriosis.

Metabolomic profiling of urine has become particularly attractive for biomarker discovery due to its noninvasive nature (24). However, the analysis of this biofluid is extremely difficult owing to the elevated number of signals present in the spectra and the high degree of overlapping among them. This complexity requires the application of robust statistical methods that can differentiate changes associated with the variable of interest from random variations in the metabolite levels (25). In the context of this study, a preliminary analysis of the data, based on a nonsupervised approach (PCA), did not show any relevant discrimination between endometriosis and healthy women. However, a univariate statistical analysis of the data revealed that urine samples of women diagnosed with endometriosis exhibit differences in their metabolic profile compared with healthy women. The advantage of the univariate analysis over multivariate methods is the ease of application and results interpretation (26). The results showed that urine from endometriosis patients is characterized by increased concentrations of 4-Py, guanidinosuccinate, creatinine, taurine, valine, 2-hydroxyisovalerate, and U2 and decreased concentrations of lysine, U1, and U6.

Taurine is an important metabolite in osmoregulation, and its concentration has been found to be increased in several tumors (24, 27, 28). In this context, although endometriosis is considered to be a tumor-like lesion and classified as a benign condition (29), it shares some characteristics with malignant cells. Thus, endometriosis can present both local as well as distant lesions and it can attach to other tissues, invade, and cause damage (30). The increased levels of taurine observed in some tumors could thus be associated with a relatively higher proliferative activity and the cell density of tumors (31) or with endometriotic lesions. Furthermore, our observation that urine levels of valine are significantly increased in endometriosis patients is in agreement with an earlier report performed on sera samples of endometriosis patients (32). Following the analogy with neoplastic processes, urine of gastric cancer patients has

TABLE 3

Variations for the statistically significant metabolites found in the comparison between endometriosis patients and healthy women classified according to the MCP.

Follicular phase: endometriosis patients (n = 28) vs. healthy women (n = 28)				Luteal phase: endometriosis patients (n = 15) vs. healthy women (n = 6)					
$\delta^1\text{H}$ (ppm) ^a	Metabolite	Multiplicity	P value ^b	$\delta^1\text{H}$ (ppm) ^a	Metabolite	Multiplicity	P value ^b	% variation ^c	% variation ^c
8.5565–8.5005	4-Py	m	.011	4.3065–4.2725	Pseudouridine	t	.013	41.47	23.16
3.4565–3.4195	Taurine	t	.037	4.0855–4.0625	Creatinine	s	.043	23.58	26.78
3.4185–3.4115	U2	s	.027	3.4565–3.4195	Taurine	t	.008	18.18	75.70
2.2035–2.1735	U4	d	.037	3.4185–3.4115	U2	s	.036	–23.02	47.64
1.4745–1.4465	Lysine	m	.025	3.2365–3.2275	GPC	s	.016	–17.72	150.22
1.0585–1.0375	Valine	d	.017	2.7905–2.7725	U3	s	.016	2.39	174.09
0.8385–0.8145	2-hydroxyisovalerate	d	.005	1.8045–1.7675	U5	m	.036	15.52	–9.57
				1.4745–1.4465	Lysine	m	.036		–18.67
				1.3535–1.3215	Threonine	d	.011		–37.92
				1.1225–1.0975	Fucose	d	.016		–50.30

Notes: GPC = glycerophosphocholine; other abbreviations as in Table 2.

^a Chemical shift range for the integration.

^b Calculated by means of Wilcoxon–Mann–Whitney U test.

^c Relative variation of the metabolite level in endometriosis patients compared with healthy women.

Vicente-Munoz. Urine metabolomics of endometriosis. Fertil Steril 2015.

also been found to exhibit higher than normal concentrations of valine (33), a process that seems to be related to the specific uptake of amino acids by tumor cells.

Endometriosis is considered to be a multifactorial disease associated with a general inflammatory response in the peritoneal cavity (34, 35), and oxidative stress has been proposed as a potential factor involved in the pathophysiology of this disease (35). At inflammation sites, oxidative stress is mediated by reactive oxygen species generated by primary activated leukocytes releasing cytokines, tumor necrosis factor alpha, and other growth and angiogenic factors that possibly contribute to the survival of ectopic endometrium (34). In this context, it should be noted that taurine has been suggested to be an important antioxidant to protect cells, including leukocytes, from oxidative stress (36), thus explaining the high concentration of this compound in tissues undergoing oxidative processes. Taurine is transported into tissues via the taurine transporter (TauT). High concentrations of taurine down-regulate TauT, and taurine is excreted from the body in urine (37), which is in agreement with our observation. Furthermore, the action of oxygen radicals mediates the conversion of argininosuccinate to guanidinosuccinate, a compound that has been associated with the suppression of the natural killer cell response (38). Interestingly, it is known that endometriosis patients have a defective cellular immunity characterized by a failure of the natural killer cells to scavenge autologous endometrial cells, thus contributing to the survival and the ectopic implantation of endometrial cells (39).

The inflammatory response is also associated with hyper-metabolism, increased oxygen consumption, and energy expenditure (40). Inflammation regulates the demand of energy, leading to an enhanced fat breakdown and resulting in a tendency toward ketoacidosis and lactic acidosis (41) which could explain the observed elevated urinary excretion of 2-hydroxyisovalerate. Furthermore, inflammation stimulates protein catabolism and the release of amino acids from muscle proteins for the synthesis of acute-phase proteins, a process characterized by a reduction in plasma amino acids concentration (42). Among them, lysine has been found to show significant lower concentrations when comparing patients with and without inflammation (42). This observation is in agreement with the reduced urine levels of lysine identified in endometriosis patients.

The univariate analysis also revealed significant variations in the levels of 4-Py between healthy women and endometriosis patients. This metabolite, as well as N¹-methyl-2-pyridone-5-carboxiamide (2-Py), also present in urine spectra, are the end-products of nicotinamide-adenine dinucleotide metabolism (43). The relationship between 2-Py and 4-Py and oxidative stress is still unclear. However, it is possible that inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP1) by 2-Py and 4-Py could play a key role in this process (44). The accumulation of nicotinamide end-products may cause overinhibition of PARP1 and via this mechanism enhance the proliferation of oxidative stress processes (43). Interestingly, a correlation has already been reported between the serum concentration of 2-Py (as well as 4-Py and nicotinamide) and creatinine (44).

An analysis of the urine metabolomic profile of healthy women and endometriosis patients at different MCPs was also performed, and statistical significant differences were observed during both phases. The increased GPC levels found in endometriosis patients during the luteal phase are in agreement with previous metabolomic studies (45). GPC and fatty acids are released by the consecutive action of phospholipase A2 (PLA2) and lysophospholipase on phospholipids (46). PLA2, an enzyme activated by cytokines (47), is involved in inflammation, and earlier studies have described the up-regulation of PLA2 in eutopic and ectopic endometrium in both peritoneal and ovarian endometriosis (48). Altered threonine concentrations have also been previously observed in endometriosis patients (32), and the decreased urine levels of this amino acid observed in our study could be explained by the activation of protein catabolism in inflammation (42). Furthermore, inflammatory cytokines, such as interleukin-6, produced by endometriotic lesions significantly alter the glycosylation patterns of acute-phase response proteins (49). Fucose, a hexose involved in different glycosylation reactions, has been reported to exhibit higher blood concentrations in patients diagnosed with malignant diseases (breast cancer, gynecologic cancers, leukemia, small-cell lung cancer, etc.) and certain benign disorders (50). This result is in agreement with earlier reports (49, 51) and could be related to the reduced clearance of this metabolite observed in the urine of endometriosis patients. Furthermore, the increased urine excretion of pseudouridine found in endometriosis women during the luteal phase has also been observed in other pathologic situations (52). Pseudouridine excretion does not seem to be specific for any particular malignancy, because it reflects the turnover of RNA and could be considered a marker of disease activity (52).

Overall, the results of the study are in agreement with earlier reports (32, 45, 53) and show that metabolites involved in inflammation, oxidative stress, and immune response are associated with endometriosis. According to earlier studies, retrograde menstruation and the presence of ectopic tissue in the peritoneal cavity are associated with overproduction of prostaglandins, cytokines, and chemokines, favoring the growth of endometriotic lesions and promoting their angiogenesis (54). Therefore, processes associated with cell proliferation and survival could be playing a critical role in the onset, progression, and maintenance of endometriosis.

In summary, the present study reveals that the analysis of urine metabolomic profiles provides a noninvasive tool for characterizing endometriosis-associated biomarkers and for getting a better understanding of the metabolic alterations underlying this pathologic process. Future studies will focus on the validation of these results with the use of larger cohorts of patients, including a representative group of early-stage endometriosis patients where the altered metabolites identified in this study could be established as a starting point for identifying and validating early biomarkers of the disease. It will facilitate the identification of clinically relevant biomarkers associated with the onset of this process and could eventually improve the clinical management of the patients.

Furthermore, those studies will also include additional groups of patients diagnosed with other conditions associated with pelvic inflammation to evaluate the specific metabolic alterations associated with those disorders. Those studies will shed new light on the metabolic pathways involved in those pathologies and will facilitate the identification of potential cross-talk between different biochemical pathways involved in endometriosis and these other conditions.

Acknowledgments: The authors thank Centro de Investigación Príncipe Felipe for their economic support. They also thank all of the staff members at Hospital Universitario La Fe who contributed to samples collection and handling.

REFERENCES

- Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet* 2004;364:1789–99.
- Giudice LC. Clinical practice. Endometriosis. *N Engl J Med* 2010;362:2389–98.
- May KE, Conduit-Hulbert SA, Villar J, Kirtley S, Kennedy SH, Becker CM. Peripheral biomarkers of endometriosis: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2010;16:651–74.
- Fassbender A, Waelkens E, Verbeeck N, Kyama CM, Bokor A, Vodolazkaia A, et al. Proteomics analysis of plasma for early diagnosis of endometriosis. *Obstet Gynecol* 2012;119:276–85.
- Nnoaham KE, Hummelshoj L, Webster P, d'Hooghe T, de Cicco Nardone F, de Cicco Nardone C, et al. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. *Fertil Steril* 2011;96:366–73.
- Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nat Rev Microbiol* 2005;3:431–8.
- Nicholson JK, Lindon JC. System Biology: Metabonomics. *Nature* 2008;455:1054–6.
- Buyse M, Sargent DJ, Grothey A, Matheson A, de Gramont A. Biomarkers and surrogate end points—the challenge of statistical validation. *Nat Rev Clin Oncol* 2010;7:309–17.
- Barton RH, Nicholson JK, Elliott P, Holmes E. High-throughput ¹H NMR-based metabolic analysis of human serum and urine for large-scale epidemiological studies: validation study. *Int J Epidemiol* 2008;37:31–40.
- Mamas M, Dunn WB, Neyses L, Goodacre R. The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease. *Arch Toxicol* 2011;85:5–17.
- Duarte IF, Gil AM. Metabolic signatures of cancer unveiled by NMR spectroscopy of human biofluids. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 2012;62:51–74.
- American Society for Reproductive Medicine. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997;65:817–21.
- Beckonert O, Keun HC, Ebbels TM, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc* 2007;2:2692–703.
- Meiboom S, Gill D. Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation time. *Rev Sci Instrum* 1958;29:688–701.
- Nicholson JK, Foxall PJ, Spraul M, Farrant RD, Lindon JC. 750 MHz ¹H and ¹³C NMR spectroscopy of human blood plasma. *Anal Chem* 1995;67:793–811.
- Lindon JC, Tranter G, Koppenaal D. *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry*. London: Academic Press; 2010.
- Diaz SO, Barros AS, Goodfellow BJ, Duarte IF, Galhano E, Pita C, et al. Second trimester maternal urine for the diagnosis of trisomy 21 and prediction of poor pregnancy outcomes. *J Proteome Res* 2013;12:2946–57.
- Vu TN, Valkenburg D, Smets K, Verwaest KA, Dommissie R, Lemiere F, et al. An integrated workflow for robust alignment and simplified quantitative analysis of NMR spectrometry data. *BMC Bioinformatics* 2011;12:405.
- Dieterle F, Ross A, Schlotterbeck G, Senn H. Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex

ORIGINAL ARTICLE: ENDOMETRIOSIS

- biological mixtures. Application in ^1H NMR metabolomics. *Anal Chem* 2006;78:4281–90.
20. Hanson BA. Chemospec: an R package for chemometric analysis of spectroscopic data and chromatograms. Package Version 2.0-2; 2014.
 21. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2013.
 22. Kok I, Yap S, Angley M, Veselkov KA, Holmes E, Lindon JC, et al. Urinary metabolic phenotyping differentiates children with autism, from their unaffected siblings and age-matched controls. *J Proteome Res* 2010;9:2996–3004.
 23. Fassbender A, Vodolazkaia A, Saunders P, Lebovic D, Waelkens E, de Moor B, et al. Biomarkers of endometriosis. *Fertil Steril* 2013;99:1135–45.
 24. Gamagedara S, Shi H, Ma Y. Quantitative determination of taurine and related biomarkers in urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2012;402:763–70.
 25. Zhang S, Zheng C, Lanza IR, Nair KS, Raftery D, Vitek O. Interdependence of signal processing and analysis of urine ^1H NMR spectra for metabolic profiling. *Anal Chem* 2009;81:6080–8.
 26. Vinaixa M, Samino S, Saez I, Duran J, Guinovart JJ, Yanes O. A guideline to univariate statistical analysis for LC/MS-based untargeted metabolomics-derived data. *Metabolites* 2012;2:775–95.
 27. Chun E, Chan Y, Koh PK, Mal M, Cheah PY, Eu KW, et al. Metabolic profiling of human colorectal cancer using high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance (HR-MAS NMR) spectroscopy and gas chromatography mass spectrometry (GC/MS). *J Proteome Res* 2009;8:352–61.
 28. El-Sayed S, Bezabeh T, Odium O, Patel R, Ahing S, MacDonald K, et al. An ex vivo study exploring the diagnostic potential of ^1H magnetic resonance spectroscopy in squamous cell carcinoma of the head and neck region. *Head Neck* 2002;24:766–72.
 29. Scully RE. Classification of human ovarian tumors. *Environ Health Perspect* 1987;73:15–25.
 30. Munksgaard PS, Blaakaer J. The association between endometriosis and gynecological cancers and breast cancer: a review of epidemiological data. *Gynecol Oncol* 2011;123:157–63.
 31. Griffin JL, Shockcor JP. Metabolic profiles of cancer cells. *Nat Rev Cancer* 2004;4:551–61.
 32. Dutta M, Joshi M, Srivastava S, Lodh I, Chakravarty B, Chaudhury K. A metabolomics approach as a means for identification of potential biomarkers for early diagnosis of endometriosis. *Mol Biosyst* 2012;8:3281–7.
 33. Fan J, Hong J, Hu JD, Chen JL. Ion chromatography based urine amino acid profiling applied for diagnosis of gastric cancer. *Gastroenterol Res Pract* 2012;2012:474907.
 34. Rizner TL. Estrogen metabolism and action in endometriosis. *Mol Cell Endocrinol* 2009;307:8–18.
 35. van Langendonck A, Casanas-Roux F, Donne J. Oxidative stress and peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 2002;77:861–70.
 36. Marcinkiewicz J, Kontry E. Taurine and inflammatory diseases. *Amino Acids* 2014;46:7–20.
 37. Wojcik OP, Koenig KL, Zeleniuch-Jacquotte A, Costa M, Chen Y. The potential protective effects of taurine on coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2010;208:19–25.
 38. Taes YE, Marescau B, de Vriese A, de Deyn PP, Schepers E, Vanholder R, et al. Guanidino compounds after creatine supplementation in renal failure patients and their relation to inflammatory status. *Nephrol Dial Transpl* 2008;23:1330–5.
 39. Kyama CM, Debrock S, Mwenda JM, Hooghe TMD. Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;9:1–9.
 40. Druml W, Heinzl G, Kleinberger G. Amino acid kinetics in patients with sepsis. *Am J Clin Nutr* 2001;73:908–13.
 41. Mickiewicz B, Vogel HJ, Wong HR, Winston BW. Metabolomics as a novel approach for early diagnosis of pediatric septic shock and its mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187:967–76.
 42. Suliman ME, Qureshi AR, Stenvinkel P, Pecoits-Filho R, Bárány P, Heimbürger O, et al. Inflammation contributes to low plasma amino acid concentrations in patients with chronic kidney disease. *Am J Clin Nutr* 2005;82:342–9.
 43. Rutkowski P, Slominska EM, Szolkiewicz M, Aleksandrowicz E, Smolinski RT, Wolyniec W, et al. Relationship between uremic toxins and oxidative stress in patients with chronic renal failure. *Scand J Urol Nephrol* 2007;41:243–8.
 44. Rutkowski B, Slominska E, Szolkiewicz M, Smolinski RT, Striley C, Rutkowski P, et al. N-Methyl-2-pyridone-5-carboxamide: a novel uremic toxin? *Kidney Int Suppl* 2003;63:19–21.
 45. Jana SK, Dutta M, Joshi M, Srivastava S, Chakravarty B, Chaudhury K. ^1H NMR based targeted metabolite profiling for understanding the complex relationship connecting oxidative stress with endometriosis. *Biomed Res Int* 2013;2013:1–9.
 46. Milkevitch M, Shim H, Pilatus U, Pickup S, Wehrle JP, Samid D, et al. Increases in NMR-visible lipid and glycerophosphocholine during phenylbutyrate-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2005;1734:1–12.
 47. Newton R, Kuitert LM, Slater DM, Adcock IM, Barnes PJ. Cytokine induction of cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 mRNA is suppressed by glucocorticoids in human epithelial cells. *Life Sci* 1997;60:67–78.
 48. Burney RO. The genetics and biochemistry of endometriosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2013;25:280–6.
 49. Piva M, Moreno JJ, Sharpe-Timms KL. Glycosylation and over-expression of endometriosis-associated peritoneal haptoglobin. *Glycoconj J* 2003;19:33–41.
 50. Manjula S, Monteiro F, Rao Arora A, Rao S, Annaswamy R, Rao A. Assessment of serum L-fucose in brain tumor cases. *Ann Indian Acad Neurol* 2010;13:33–6.
 51. Berkes E, Muzinic A, Rigo J Jr, Tinneberg HR, Oehmke F. The analysis of the human plasma N-glycome in endometriosis patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013;171:107–15.
 52. Rasmuson T, Björk GR. Urinary excretion of pseudouridine and prognosis of patients with malignant lymphoma. *Acta Oncol* 1995;34:61–7.
 53. Carvalho LF, Samadder AN, Agarwal A, Fernandes LF, Abrao MS. Oxidative stress biomarkers in patients with endometriosis: systematic review. *Arch Gynecol Obstet* 2012;286:1033–40.
 54. Vercellini P, Viganò P, Somigliana E, Fedele L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* 2014;10:261–75.