



Programa de Doctorado 3139 Medicina

Tesis doctoral

**Identificación de biomarcadores
urinarios de cáncer vesical mediante
análisis metabolómico por
espectrometría de masas**

Presentada por: Marta Trassierra Villa

Dirigida por: Dr. José Luis Ruíz Cerdá

Dr. Guillermo Quintás Soriano

Valencia, Octubre 2020



Departamento de Cirugía

Tesis doctoral

**Identificación de biomarcadores
urinarios de cáncer vesical mediante
análisis metabólico por
espectrometría de masas**

Marta Trassierra Villa
Licenciada en Medicina y Cirugía

Valencia, Octubre 2020

El **Dr. José Luis Ruiz Cerdá**, Profesor titular del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia y Jefe de sección del Servicio de Urología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, y el **Dr. Guillermo Quintás Soriano**, Doctor en Química y Director del Laboratorio de Metabolómica y Bioanálisis (LEITAT Technological Center-Instituto Investigación Sanitaria la FE)

CERTIFICAN

Que **Marta Trassierra Villa** ha realizado, bajo nuestra dirección, el trabajo *Identificación de biomarcadores urinarios de cáncer vesical mediante análisis metabolómico por espectrometría de masas*, que presenta como tesis doctoral con el fin de obtener el título de Doctor en Medicina.

Valencia, Octubre de 2020

Fdo.: José Luis Ruiz Cerdá

El/La (co)director/a



Fdo.: Guillermo Quintás Soriano

El/La (co)director/a



Agradecimientos

Al Dr. José Luis Ruiz, por ofrecerme la oportunidad de participar en este proyecto, por su dedicación y motivación durante todo el proceso de la Tesis doctoral.

Al Dr. Guillermo Quintás por su implicación, accesibilidad, ilimitada disponibilidad y supervisión continua de mi trabajo sin la que no hubiera sido posible finalizar este proyecto.

A Miguel Ángel por su imprescindible paciencia y apoyo incondicional.

A mis padres, por su esfuerzo en mi educación y su perseverante ánimo.

A Ana Gil Brusola por ser un referente a seguir y confiar en mi.

a Miguel, Emma y Maia

Índice general

Capítulo 1. Introducción	1
Epidemiología en el cáncer de vejiga	1
Biomarcadores urinarios en CaV	7
▪ Citología de orina	9
▪ Biomarcadores urinarios validados disponibles	9
• BTA (<i>Bladder Tumour Antigen</i>)	10
• NMP22 (<i>Nuclear Matrix Protein 22</i>)	10
• ImmunoCyt (uCyt+)	10
• UroVysion	11
• HA-HAase (<i>Hyaluronic Acid – Hyaluronidasa</i>)	11
• UBC (<i>Urinary Bladder Carcinoma Antigen</i>)	11
• CYFRA 21-1	12
▪ Biomarcadores urinarios en desarrollo	13
• Biomarcadores epigenéticos	13
• Biomarcadores transcriptómicos	14
• Biomarcadores proteómicos	15
Metabólica	17
Diseño de un estudio metabólico	19
▪ Recogida y preparación de muestras biológicas	20
▪ Técnicas de análisis de la muestra biológica	23
• Análisis dirigido o perfil metabólico	23
• Análisis no dirigido o huella metabólica	23
▪ Espectrometría de masas	25
• Técnicas de acoplamiento	26
• Fuentes de ionización	28
• Espectrómetro de masas	29
▪ Procesamiento y análisis de datos	30

• Pre-tratamiento de los datos LC-MS	30
• Análisis bioestadístico	31
1. PCA.	32
2. PLS-DA	33
Metabolómica y CaV	35
Capítulo 2. Hipótesis	39
Capítulo 3. Objetivos	41
Capítulo 4. Material y Método	43
Selección de pacientes	43
▪ Criterios de Inclusión	45
▪ Criterios de Exclusión	45
Variables clínicas	47
▪ Historia clínica	47
▪ Características macroscópicas del tumor	47
▪ Características de la resección tumoral	47
▪ Características anatomopatológicas	48
• Estadio del tumor	48
• Grado tumoral	49
• Grupos de riesgo y progresión	49
Recogida de muestras	53
▪ Muestras biológicas y almacenamiento	53
▪ Esquema de recogida de muestras de orina	53
Análisis metabólico de la muestra	55
▪ Reactivos	55
▪ Preparación de las muestras	55
• Muestras de orina	55
• Muestra Control Calidad (<i>Quality Control, QC</i>)	56
• Blancos de muestra	57
▪ Análisis UPLC-TOF-MS	58
▪ Tabla de picos UPLC-TOF-MS	59

▪ Aseguramiento y control de calidad analítica	60
• Validación de las etapas automáticas de integración, extracción y alineamiento de picos	60
• Eliminación de señales debidas a contaminantes	60
• Estabilidad instrumental: <i>batch effect</i>	60
▪ Análisis PLS-DA	63
▪ Software	65
Capítulo 5. Resultados	67
Análisis descriptivo de variables clínicas	67
Análisis metabolómico	71
▪ Muestras analizadas	71
▪ Calidad de la señal analítica	73
▪ Exactitud de masa (m/z)	73
▪ Exactitud de la integración automática de la señal	74
▪ Eliminación de señales no informativas	75
▪ Análisis y eliminación del efecto <i>batch</i>	76
• Intensidad del estándar interno (<i>ISs</i>)	76
• Coeficiente de Variación (<i>RSD</i>) en el QC	78
Análisis discriminante	81
▪ Selección de variables metabólicas discriminantes y validación externa	84
▪ Control de fuentes de error sistemático	91
Capítulo 6. Discusión	93
Capítulo 7. Conclusiones	105
Capítulo 8. Bibliografía	107
Capítulo 9. Anexos	125
I. Informe Comité Ético de Investigación Biomédica del IIS la Fe	125
II. Consentimiento Informado para la participación en el estudio y para el almacenamiento de muestras en el Biobanco	129

Índice de figuras

Figura 1. Tasas de incidencia ajustada por 100.000 habitantes de los principales tumores en UE/ España/ CV en 2014.	2
Figura 2. Cascada ómica.	17
Figura 3. Flujo de trabajo para la identificación y validación de biomarcadores metabolómicos.	19
Figura 4. Número de publicaciones en metabolómica basadas en LC-MS, NMR y GC-MS en el periodo 2002-2017.	27
Figura 5. Equipo UPLC-TOF-MS utilizado en el estudio.	29
Figura 6. Vías metabólicas en condiciones normales y en condiciones de falta de nutrientes.	36
Figura 7. Diseño de recogida de muestras.	44
Figura 8. Estadistado y gradación del CaV.	48
Figura 9. Diseño preparación de muestras orina y QC para análisis metabolómico mediante UPLC-TOF-MS.	56
Figura 10. Diseño preparación de muestras de blancos.	57
Figura 11. Variación en el valor m/z observado para un patrón interno adicionado (Cafeina-D ₉) en función del orden de inyección.	74
Figura 12. Correlación entre el área de picos de cuatro metabolitos, obtenidos mediante integración manual de la señal y automática utilizando el programa XCMS.	75
Figura 13. Eliminación de variables no informativas (contaminantes y/o carry-over) a partir del análisis de la señal observada en blancos. Distribución de las variables retenidas (puntos rojos) y eliminadas (puntos negros).	76
Figura 14. Variación del área de pico cromatográfico de patrones internos adicionados en función del orden de inyección.	77

Figura 15. Funciones de distribución acumulada del %RSD en los QCs antes y después del QC-SVRC.	78
Figura 16. Esquema de eliminación de señales no informativas, unidades arbitrarias, señales con RSD(QC) >15% y no representativas.	79
Figura 17. Esquema de análisis para el desarrollo de un modelo con capacidad discriminante entre orinas BC y CTRL.	81
Figura 18. Valores calculados para las muestras de calibración y validación utilizando un modelo PLS-DA y 108 variables metabólicas seleccionadas.	85
Figura 19. Curva ROC (<i>Receiver Operating Characteristic</i>) calculada para el conjunto de muestras de validación externa basado en las clases predichas del modelo PLS-DA (p.ej. BC, CTRL) usando 108 características metabólicas seleccionadas y 1 LV.	86
Figura 20. Representación del valor en el vector de regresión PLS en función del VIP <i>score (arriba)</i> y distribución en el cromatograma, para las 108 variables seleccionadas como discriminantes (VIP>1).	88
Figura 21. Predicción de las réplicas para la estimación del error del instrumental y de la preparación de las muestras.	92

Índice de tablas

Tabla 1. Indicadores de Incidencia estimada de CaV en la Comunidad Valenciana.	3
Tabla 2. BioM para CaV comercialmente disponibles.	12
Tabla 3. Principales metodologías de análisis en metabolómica.	24
Tabla 4. Tipos de espectrómetro de masa más frecuentes.	30
Tabla 5. Sistema puntuación EORTC.	50
Tabla 6. Grupos de riesgo de recidiva y progresión EORTC.	51
Tabla 7. Variables clínicas de los TVNMI incluidos en este estudio.	68
Tabla 8. Tablas de confusión obtenida mediante 2CV para el conjunto de muestras de calibración y validación. Los resultados obtenidos para el conjunto de validación se obtuvieron a partir de un modelo PLSDA utilizando 108 variables previamente identificadas como discriminantes.	82
Tabla 9. Índices de los test de validación estimados para la evaluación del rendimiento predictivo del modelo PLS-DA entre muestras BC y CTRL en el conjunto de calibración y de validación.	83
Tabla 10. Índices del test de validación para la evaluación del modelo predictivo PLS-DA entre muestras BC pre-RTU y CTRL post-RTU del subgrupo de validación incluyendo solo muestras del grupo de riesgo intermedio y alto, mediante el modelo PLSDA calculado utilizando 108 variables discriminantes y 1 LV.	87
Tabla 11. Identificación putativa de variables seleccionadas como discriminantes mediante PLS-DA.	89

Índice de abreviaturas

Ac	Anticuerpos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AP	Anatomía patológica
APCI	Ionización química a presión atmosférica
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATC	Ácido tricarboxílico
ATP	Adenosina trifosfato,
AU	Unidades arbitrarias (<i>arbitrary units</i>)
AURKA	Aurora Kinasa A
AUROC	<i>Area under the receiver operator characteristic</i>
BC	<i>Bladder cancer</i>
BCAAs	Aminoácidos ramificados (<i>branched-chain amino acids</i>)
bioM	Biomarcador
BTA	<i>Bladder Tumour Antigen</i>
CaV	Cáncer de vejiga
CE-MS	Electroforesis Capilar-Espectrometría de Masas
CIE	Clasificación internacional de enfermedades
CIS	Carcinoma <i>in situ</i>
cFH	Factor H del complemento humano
CoA	Coenzima A
CTRL	Control
CV	Validación cruzada (<i>Cross Validation</i>)
Da	Dalton
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>

EORTC	<i>European Organisation for Research and Treatment of Cancer</i>
ESI	Ionización mediante electrospray
EUROCARE	<i>European Cancer Registry Based Study on Survival and Care of Cancer Patients</i>
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
FISH	Hibridación Fluorescente In Situ
FGFR3	Fibroblast Growth Factor Receptor 3
FN	Falso negativo
FP	Falso positivo
FTIR	<i>Fourier –transform infrared spectroscopy</i>
FT-IRC-MS	Espectrómetro de masas de resonancia de ion-ciclotrón con transformada de Fourier.
GC-MS	Cromatografía de gases-espectrometría de masas
HA	Ácido hialurónico
HAase	Hialuronidasa
HA-HAase	Hyaluronic Acid – Hyaluronidasa
HCA	<i>Hierarchical Clustering Analysis</i>
HILIC	<i>Hydrophilic interaction liquid chromatography</i>
HIT	Heterogeneidad metabólica intratumoral
HMDB	<i>Human Metabolome Database</i>
NMR	Resonancia magnética nuclear (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
IC	Intervalo de confianza
IS	Patrón interno (<i>internal standard</i>)
LC-MS	Cromatografía líquida-espectrometría de masas
LOOCV	<i>Leave-one-out cross-validation</i>
LOPO-2CV	<i>Leave one patient out -double cross-validation</i>
LV	Variable latente (<i>latent variable</i>)
MAS	<i>Magic angle spinning</i>

miARN	micro-ARN
MNT	Monitorización
MS	Espectrometría de Masas
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
NA	No aplicable
NGC	<i>Next Generation Sequencing</i>
NMC	Número de muestras mal clasificadas
NMP22	<i>Nuclear Matrix Protein 22</i>
NPV	Valor predictivo negativo (<i>Negative Predictive Value</i>)
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PLS-DA	<i>Partial Least Square Discriminant Analysis</i>
POC	<i>Point of care</i>
ppm	Partes por millón
PPV	Valor predictivo positivo (<i>Positive Predictive Value</i>)
PSA	Antígeno prostático específico
QC	Control de calidad (<i>Quality control</i>)
QC-SVRC	<i>Quality Control - Support Vector Regression</i>
QQQ	Triple cuádrupolo
QT	Quimioterapia
QTOF	Cuádruplo-tiempo de vuelo
RBC	<i>Red Blood Cells</i>
REDECAN	Red Española de Registros de Cáncer
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMSECV	<i>Root mean squared error of cross validation</i>
RP-LC	Cromatografía en fase reversa
RP-UPLC	Cromatografía líquida de ultra resolución en fase reversa
RSD	Desviación estándar relativa (<i>relative standard deviation</i>)

RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RTU	Resección transuretral
SIO	Sistema de Información Oncológico
TCA	Ácido tricarboxílico
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
TN	Verdadero negativo (<i>true negative</i>)
TNM	Tumor-Nodes-Metastasis
TOF	<i>Time of flight</i>
TP	Verdadero positivo (<i>true positive</i>)
tR	Tiempo de retención
TsA	Tasa Acumulada.
TsAj	Tasa Ajustada.
TsB	Tasa Bruta.
TVMI	Tumores vesical músculo invasivo
TVNMI	Tumor vesical no musculo invasivo
UBC	<i>Urinary Bladder Carcinoma Antigen</i>
uCyt+	<i>ImmunoCyt</i>
UICC	<i>Union for Internacional Cancer Control</i>
UPLC	<i>Ultra performance liquid chromatography</i>
VIP	<i>Variable Importance in Projection</i>
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
WHO	<i>World Health Organization</i>

Capítulo 1

Introducción

Epidemiología del cáncer de vejiga

El cáncer de vejiga (CaV) tiene una gran relevancia epidemiológica, económica y clínica reflejada por los datos epidemiológicos observados. Es el décimo diagnóstico de cáncer más común en el mundo (549.000 casos nuevos) y el quinto más frecuentemente diagnosticado en España y Europa (197.100 casos nuevos). En hombres se estimaron 424.082 casos nuevos en el mundo y 153.800 casos nuevos en Europa, ocupando la octava y la cuarta posición respectivamente. En mujeres se estiman 125.311 casos nuevos a nivel mundial (18ª posición) y 43.300 casos nuevos en Europa (13ª posición)(Bray *et al.*, 2018).

En hombres, la tasa de incidencia ajustada a la población estándar europea varió entre el 15.2 por 100.000 habitantes (Austria) y 60.6 por 100.000 habitantes (Grecia), mientras que en España fue de 42.2 por 100.000, representando el cuarto país europeo con más incidencia. En mujeres la tasa más alta se dio en Hungría (13 por 100.000) y la más baja en Ucrania (3.1 por 100.000), quedando España en una posición intermedia (8.3 por 100.000) (Ferlay *et al.*, 2018).

En España la estimación de la incidencia de nuevos casos diagnosticados de CaV fue de un total 21.093 en 2015, 17.439 en hombres y 3.654 en mujeres. En hombres ocupa la cuarta posición por detrás del cáncer de

próstata, colon-recto y pulmón, y en mujeres la quinta posición (Red Española de Registros de Cáncer REDECAN 2019)(Figura1)

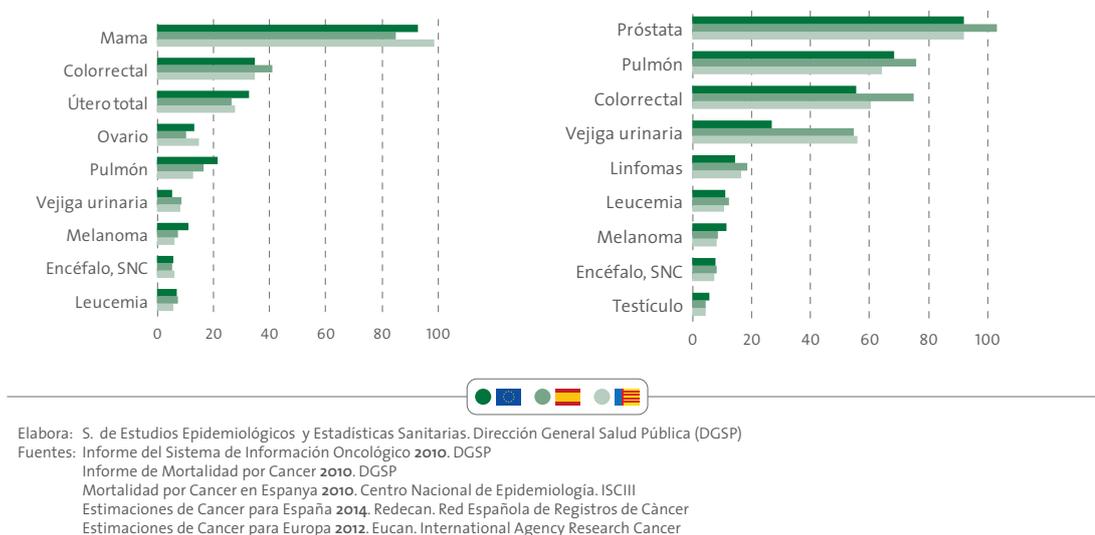


Figura 1. Tasas de incidencia ajustada por 100.000 habitantes de los principales tumores en UE/ España/ CV en 2014.

En la Comunidad Valenciana se describe una incidencia por CaV de 2.313 casos nuevos en 2015, según el *Sistema de Información Oncológico (SIO)*, con una tasa bruta de 46 casos por 100.000 habitantes, siendo la incidencia en hombres de 1.924 casos nuevos, representando el 13% de los todos los tumores en el hombre, el cuarto más frecuente, y el 4 % en la mujer. (Tabla 1)

El efecto de las diferencias en la prevalencia del tabaquismo en España influye en la gran variabilidad geográfica y en el tiempo de las tasas de incidencia de CaV. Si comparamos las tasas de incidencia ajustadas entre las diferentes comunidades autónomas, para el periodo 2003-2007, en hombres la Comunidad Valenciana ocupa la quinta en frecuencia (37.2 por 100.00) por detrás Mallorca, Navarra, Murcia y Girona, y la segunda en frecuencia para mujeres (5.7 por 100.000) (SIO 2015).

Tabla 1. Indicadores de Incidencia estimada de CaV en la Comunidad Valenciana.

Sexo	Número casos	Tasa Bruta	Ts A (%) 0-74 años	Ts Aj (P. Europea)	IC (95%)	Ts Aj (P. Mundial)	IC (95%)
Hombres	1.924	78.2	4.5	90.9	(86.8 : 95.0)	38.0	(36.2 : 39.8)
Mujeres	389	15.4	0.6	14.3	(12.8 : 15.7)	5.9	(5.2 : 6.6)
Ambos	2.313	46.4	2.5	48.5	(46.5 : 50.5)	20.8	(19.9 : 21.7)

Tasa bruta y ajustada (TsAj) por 100.000 habitantes

Tasa Acumulada (TsA: Suma de tasas de incidencia específica por edad hasta los 74 años, como aproximación de riesgo acumulado de desarrollar cáncer

Fuente: Sistema de Información Oncológico (SIO 2015). Elaboración: Servicio de estudios epidemiológicos y estadísticas sanitarias DGSP

Si valoramos la variabilidad en el tiempo, observamos que en España la tasa de incidencia en hombres desde el periodo 1993-1997 al año 2014 ha sido similar, con un porcentaje de variación entre periodo 2003-2007 y 2014 de -0.2%. Sin embargo, en mujeres se observa un aumento progresivo de la tasa incidencia con un porcentaje de variación de 29.4% (Forman D et al 2013, REDECAN 2014).

El número de defunciones secundarias a CaV (con un diagnóstico de CIE 67) en España en 2013 fue de 4188, lo que representa una mortalidad de 18.26 por 100.000 habitantes. En mujeres fue de 960 defunciones, 4.06 por 100.000 habitantes (Área de epidemiología ambiental y cáncer, Centro Nacional de Epidemiología, ISCIII). La Comunidad Valenciana representa la cuarta con mayor tasa de mortalidad de España.

La supervivencia relativa, estandarizada por edad, a 5 años en España para hombres en el periodo 2000-2007 fue de 70.3%, muy similar a la media Europea (69.4%). Las mujeres presentaron una supervivencia discretamente superior en España (70.8%) a la observada en Europa (66.4%) (EUROCARE 4 y 5 y REDECAN).

Aparte de la alta incidencia de este cáncer, también presenta una alta prevalencia. La estimación de la prevalencia para el año 2012 en España para hombres fue de 204.8 por cada 100.000, la cuarta más elevada de Europa por detrás de Alemania, Bélgica y Italia. En mujeres fue del 36.7 por 100.000. En números absolutos representa casi 40.000 hombres y 7.400 mujeres (Bray et

al., 2013). En hombres esta alta prevalencia se justifica, al menos parcialmente, además de por su alta incidencia, a una supervivencia mayor respecto a la media europea (De Angelis *et al.*, 2013).

El CaV es, por tanto, un grave problema de salud pública determinado tanto por su alta incidencia como por una muy elevada prevalencia, por lo que hay que tener en cuenta la relevancia social y económica que supone.

El CaV engloba a los tumores vesicales no músculo invasivo (TVNMI), tumores vesicales músculo invasivos (TVMI) y la enfermedad metastásica, comportándose en la mayoría de casos como una enfermedad crónica. La mayoría de tumores en el momento del diagnóstico son de tipo TVNMI (70%), comprendiendo estadios Ta y T1. Sin embargo, las tasas de recidiva tras el primer tratamiento son elevadas durante el seguimiento (30-70%), presentando unas cifras de progresión de hasta un 30% (Babjuk *et al.*, 2011). En el primer año tras la resección transuretral (RTU), los pacientes con tumores de riesgo bajo e intermedio presentan un 20 y 40% de recidiva tumoral, respectivamente, y los tumores de alto riesgo pueden presentar cifras de hasta un 90% de recidiva en el primer y segundo año post-RTU (Shelley, Mason and Kynaston, 2010). Estos pacientes van a requerir múltiples cirugías para el tratamiento de la recidiva y una vigilancia estrecha para evitar la progresión a enfermedad invasiva.

Los métodos estándar de diagnóstico y seguimiento incluyen la cistoscopia, la citología de orina y las técnicas de imagen del tracto urotelial superior para descartar tumor de vía superior concomitante. La cistoscopia es el mejor método visual de diagnóstico del tumor vesical, pero es invasiva, dolorosa e implica un elevado coste económico, además puede no diagnosticar pequeñas áreas de carcinoma *in situ*. Tras el tratamiento primario mediante RTU, se recomienda un seguimiento de los pacientes con cistoscopia y citología periódicas a lo largo de su vida (cada 3-6 meses) (Hall *et al.*, 2007; Babjuk *et al.*, 2011).

Debido a su baja mortalidad y sus largos periodos de seguimiento, el tumor vesical se considera el cáncer de mayor coste económico (Avritscher *et al.*, 2006). Aproximadamente un 60% del mismo es consecuencia del seguimiento y los retratamientos por recidiva (Hedelin, Holmäng and Wiman, 2002; Stenzl, Hennenlotter and Schilling, 2008). Aunque varía en función del sistema de salud de cada país, el coste de la monitorización del seguimiento y el tratamiento de las recidivas durante toda la vida del paciente es el más alto de todos los cánceres y, por ejemplo, en Estados Unidos representa entre 96.000 y 187.000 dólares por paciente (Botteman *et al.*, 2003). El coste de una cistoscopia pueden variar entre 520-163 € y el de una RTU entre 2.200-4.348 € (Svatek *et al.*, 2014). Sin embargo, a pesar de que el CaV es un contribuyente muy relevante al gasto sanitario, y en el caso del TVNMI superior incluso al de otros tumores urológicos como el cáncer de próstata, el gasto invertido en investigación ha sido inferior (Sangar *et al.*, 2005).

Biomarcadores Urinarios en CaV

Un biomarcador (bioM) es una característica objetivamente medible y evaluable como indicador de un proceso biológico normal, patogénico o de respuesta terapéutica a un fármaco o intervención externa. El término bioM es una abreviatura de marcador biomolecular. Los bioM de cáncer son aquellos producidos por el propio tumor o por el cuerpo en respuesta al tumor (Atkinson A.J. *et al.*, 2001; Shariat *et al.*, 2010).

Se puede describir seis tipos de bioM en función de su objetivo:

i) Detección temprana (cribado o *screening*), para la evaluación de pacientes con factores de riesgo o con síntomas de cáncer.

ii) Diagnóstico, para la clasificación de características histopatológicas en función de la presencia o no del cáncer.

iii) Pronóstico, para la predicción de la evolución de un paciente en función de las diferencias del riesgo de recidiva, progresión o muerte. Este bioM ofrece información sobre el curso de la enfermedad y facilita la toma de decisiones terapéuticas, permitiendo individualizar el manejo de los pacientes.

iv) Predictivo, para la identificación de la mejor modalidad terapéutica.

v) Diana terapéutica, para la identificación de pacientes que se beneficiarían de un tratamiento específico. Identificar moléculas diana sobre las que actúen nuevas terapias.

vi) Sustituto de variable resultado de valoración clínica, este tipo de bioM se utilizaría para substituir un criterio de valoración clínica y/o medir el daño.

Las cuatro características que debe presentar un bioM óptimo para el diagnóstico del CaV primario, la monitorización del seguimiento y/o la estratificación de los pacientes de alto riesgo de recidiva y progresión son:

- i) obtención no invasiva de las muestras y bajos requerimientos de manejo y preparación;
- ii) análisis e interpretación de resultados estandarizado, reproducible, económico y objetivo;
- iii) aplicable a la logística hospitalaria;
- iv) rendimiento diagnóstico específico dependiendo de su utilidad.

La identificación de un bioM urinario sensible y específico para la detección de TVNMI, disminuiría la morbilidad asociada a la cistoscopia, mejorando la calidad de vida de los pacientes y, simultáneamente, contribuyendo a la disminución del coste hospitalario al sustituir un procedimiento endoscópico invasivo por uno alternativo de menor coste. Idealmente, este bioM de detección–diagnóstico de enfermedad debería proporcionar tanto una elevada sensibilidad, como una alta especificidad para minimizar la probabilidad de generar falsos positivos (FP), que podrían provocar sobret ratamientos o decisiones terapéuticas inseguras si detectaran tumores asintomáticos o antes de ser visibles endoscópicamente. Por otro lado, debería proporcionar un elevado valor predictivo negativo (VPN), si se pretende reemplazar a la cistoscopia en el seguimiento de las recidivas. Además, su utilidad para estadiar o medir respuesta terapéutica debería correlacionarse con la carga tumoral o el grado de diferenciación. Este bioM urinario ideal, además de ser útil en el diagnóstico de TVNMI, debería ser aplicable dentro de programas de cribado o detección precoz, lo que algunos autores han denominado como "*buscar un PSA vesical*" (Khochikar, 2011). En este sentido, las muestras de orina son perfectas para estos programas porque se obtienen de forma no invasiva, fácil y económica (Svatek *et al.*, 2008).

▪ Citología orina

La citología de orina es un marcador altamente específico y no invasivo, que consiste en la detección de células tumorales en la orina. Su valor predictivo positivo (VPP) es de aproximadamente el 90% (Bastacky *et al.*, 1999; Planz *et al.*, 2005) y tiene una alta sensibilidad en la detección de tumores de alto grado y CIS. Sin embargo, la sensibilidad de este marcador disminuye en los tumores de bajo grado a niveles que oscilan entre el 4% y el 31% (Lotan and Roehrborn, 2003). Aunque la citología urinaria está considerada como el bioM estándar y tiene una elevada especificidad, carece de la suficiente sensibilidad para llevar a cabo programas de detección precoz poblacionales.

Alguna de las desventajas de la citología urinaria, que influyen negativamente en su exactitud y reproducibilidad, son la variabilidad que presenta, al depender de la interpretación del citopatólogo responsable del análisis, y de la calidad de la muestra de orina recogida (Karakiewicz *et al.*, 2006). Además, los resultados pueden llevar a confusión en condiciones de inflamación vesical como la infección y las instilaciones vesicales con quimioterápicos (Talwar *et al.*, 2007).

▪ Biomarcadores urinarios validados disponibles

El desarrollo de la genómica y la proteómica ha contribuido, de forma muy significativa, al estudio del CaV a través de la identificación de alteraciones genéticas o protéicas en tumores de pacientes con CaV. Como resultado de estas identificaciones, la investigación de nuevos bioM se ha intensificado en los últimos años, lo que ha permitido el desarrollo de test dirigidos a la determinación de moléculas liberadas a la orina asociadas al tumor tales como anticuerpos (Ac) de superficie celular de células exfoliadas, proteínas solubles, morfología nuclear o expresión de genes (Tilki *et al.*, 2011; Kamat *et al.*, 2013a; Rosser, Urquidi and Goodison, 2013) (Tabla 2).

Los bioM urinarios validados y aprobados por la *US Food and Drug Administration* (FDA, EEUU), comercialmente disponibles en algún caso, se describen a continuación:

- **BTA (Bladder Tumour Antigen)**. El BTA es un test que permite detectar proteínas relacionadas al Factor H del complemento humano (cFH) en la orina de los pacientes con CaV (Kinders *et al.*, 1998). BTA-stat es un test cualitativo *point of care (POC)* y BTA-TRAK es un test cuantitativo ELISA. Aunque la sensibilidad de los test puede alcanzar el 90%, su especificidad se ve limitada por la influencia de condiciones genitourinarias no tumorales (Thomas *et al.*, 1999; Mahnert *et al.*, 2003) y la hematuria (Oge, Kozaci and Gemalmaz, 2002). Debido a su alta tasa de FP no se recomienda su uso no asociado a la cistoscopia.

- **NMP22 (Nuclear Matrix Protein 22)**. Este test permite detectar la proteína del aparato mitótico nuclear de forma cuantitativa o cualitativa *POC* (también conocida como *BladderCheck*). Al igual que el BTA, puede alcanzar una sensibilidad superior a la citología y presentar una especificidad similar a la misma (86%), pero no supera la sensibilidad de la cistoscopia ni la necesidad de esta (Huber *et al.*, 2012; Schlake *et al.*, 2012). Además, su especificidad disminuye de forma significativa en presencia de enfermedades inflamatorias o infecciosas, litiasis, instrumentación o hematuria (Sharma *et al.*, 1999; Shariat *et al.*, 2005; Hutterer *et al.*, 2008).

- **ImmunoCyt (uCyt+)**. El test uCyt+ combina la citología con técnicas de inmunofluorescencia (Fradet and Lockhard, 1997). Se desarrolló como suplemento a la citología para detectar bioM celulares de CaV en células de exfoliación urotelial, usando Ac monoclonales fluorescentes para formas de alto peso molecular del antígeno del carcinoma embrionario y dos células tumorales vesicales asociadas a mucina. La sensibilidad del test combinado con la citología es alta, pero su especificidad es menor que la alcanzada por la citología independientemente (Hautmann *et al.*, 2004; Mian *et al.*, 2006). Es un test menos influenciado por la hematuria o enfermedades inflamatorias,

pero precisa de un gran número de células de exfoliación y, al igual que la citología, depende de citopatólogos de experiencia (Li *et al.*, 2010).

- UroVysion. Es un test multiprueba de hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH) que detecta aneuploidías en los cromosomas 3, 7 y 17 así como pérdida del 9p21 del gen supresor de tumores p16, como demuestran estudios citogenéticos previos (Junker *et al.*, 2003), en células exfoliadas de muestras de orina. Esta técnica supera a la citología en sensibilidad (75%) (Halling, 2003) y, combinada con el estudio de morfología, alcanza el 100% de sensibilidad y 65% de especificidad (Daniely *et al.*, 2007). Sin embargo, es una técnica de alto coste y compleja que precisa de personal especializado para su interpretación, con una falta de consenso en la definición de anormalidad (Caraway *et al.*, 2010).

- HA-HAase (Hyaluronic Acid – Hyaluronidasa). El ácido hialurónico (HA) es un glicosaminoglicano no sulfatado que regula la adhesión y migración celular y promueve la progresión tumoral y la metástasis. La hialuronidasa (HAase), es una endoglicosidasa que degrada el HA en fragmentos pequeños que promueven la angiogénesis (Lokeshwar *et al.*, 2000). Los niveles urinarios de HA y HAase pueden medirse en orina mediante técnicas ELISA y se ha demostrado una correlación positiva de estos y el CaV con una sensibilidad elevada (>90%) (Hautmann *et al.*, 2001), sin embargo la exactitud para detectar tumores de bajo grado es baja y menor que la citología (Hautmann *et al.*, 2004).

Además de estos test existen otros bioM urinarios validados basados en citoqueratinas, pero con una sensibilidad y especificidad también muy por debajo de la cistoscopia (D'Costa *et al.*, 2016):

- UBC (Urinary Bladder Carcinoma Antigen). Mide fragmentos solubles de la citoqueratina 18 y 8 en la orina. Su sensibilidad es menor que la citología aunque alcanza el 100% en casos de CIS (Babjuk *et al.*, 2008). Sin embargo, el rendimiento global de este test no es superior a la citología u otros bioM.

•CYFRA 21-1. Mide fragmentos de citoqueratina 19 (proteína del citoesqueleto). Su sensibilidad y especificidad es similar al UBC test (D'Costa *et al.*, 2016).

Tabla 2. BioM para CaV comercialmente disponibles (Kamat *et al.*, 2013b).

Test	Detección /tipo marcador	Muestra	Tipo análisis	Aprobación FDA	Laboratorio
Citología	células tumorales	OdV	Microscopia	NA	-
Detección Hematuria	A: hemoglobina B: RBC	OdV	A: tira reactiva B: interference microscopia/ analizador RBC	-	A: Bayer Corp B: -
BTA-Stat	Proteína relacionada cFH	OdV	Inmunoanálisis tira reactiva	diagnóstico seguimiento	Bard/Bion Diagnostics
BTA -TRAK	Proteína relacionada cFH	OdV	Sandwich ELISA	diagnóstico seguimiento	Bard/Bion Diagnostics
NMP-22	Proteína nuclear mitótica	OdV	Sandwich ELISA	seguimiento	Alere
NMP22	Proteína nuclear mitótica	OdV	Point of care test	diagnóstico alto riesgo seguimiento	Alere
BLCA-4	Nuclear matrix protein	OdV	ELISA (Ac. policlonal ratón)	-	Eichrom Technologies
Survivin	Inhibidores gen apoptosis familiar	OdV	Bio-dot test	-	Fujirebio diagnostics
UBC	Citoqueratina 8 y 18	OdV	Sandwich ELISA o Point of care test	-	IDL Biotech
CYFRA 21-1	Citoqueratina 19	OdV	Análisis inmunoradiométrico o ELISA	-	Bio international Roche Diagnostics
DD23	antígeno asociado a tumor 185 kDa	CdE OdV	immunocitoquímico	-	UroCor LAbs
uCyt+	Antígeno carcinoma embrionario Células tumorales asociadas a mucina	OdV CdE	immunocitoquímico	seguimiento	Scimedx
UroVysion	Alteración cromosomas 3,7,17 y 9p21	OdV CdE	FISH	diagnóstico seguimiento	Abbot ,Vysis

OdV: orina de vaciado, CdE: células de exfoliación, FDA: Food and Drug Administration, NA: no aplicable, RBC: Red Blood Cells, ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay, FISH, Fluorescence *in situ* Hybridization

▪ Biomarcadores urinarios en desarrollo

El CaV es una enfermedad heterogénea caracterizada por una red compleja de alteraciones moleculares y expresión genética. Los estudios genéticos han identificado dianas terapéuticas potenciales incluyendo los receptores de la tirosina quinasa, rutas de señalización intracelular, reguladores del ciclo celular, remodeladores de la cromatina y mediadores inmunes (Netto and Tafe, 2016). El desarrollo de tecnología de alto rendimiento facilita la posibilidad de investigación y identificación de ADN, ARN o proteínas como posibles nuevos bioM de CaV, como se describe a continuación.

• Biomarcadores epigenéticos.

La epigenética es el conjunto de cambios en el ADN que conlleva a un impacto en la regulación de la expresión génica sin que cambie su estructura primaria (Berger *et al.*, 2009). Uno de los bioM genómicos más descritos en asociación al CaV es el gen *FGFR3* (*Fibroblast Growth Factor Receptor 3*). Las mutaciones de este gen aparecen en el 50% de los tumores vesicales con especial prevalencia en los tumores de bajo grado y estadio (Oers *et al.*, 2005). Aunque la optimización de su análisis es muy sensible, solo es precisa con tumores de gran tamaño y es solo aplicable a un subconjunto de casos de CaV con esa mutación (Zuiverloon *et al.*, 2011).

La inestabilidad cromosómica y la aneuploidía del gen *AURKA* (*Aurora Kinasa A*), que codifica una serina/tirosina quinasa, también se puede explorar en sedimento de orina mediante FISH. Se ha descrito una alta sensibilidad y especificidad en estudios preliminares (87 y 97%) que precisan de validación adicionales (Park *et al.*, 2008).

Otra alteración epigenética frecuente en el CaV es la detección de genes metilados en orina de vaciado. Varios grupos de investigación han demostrado una buena sensibilidad y especificidad en la detección de metilación de genes como *PCDH17/TCF2*, *DAPK*, *RAR β* , *E-cadherina* y *p16* o los genes de *BCL2*, *CDK2A* y *NID2*. La identificación de hipermetilación de los

genes *APC*, *RASSF1A* y *p14* y la metilación de los genes *TWIST1* y *NID2*, que se encuentran con frecuencia en orinas de pacientes con CaV, ha demostrado especificidades de más del 90% (Renard *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2011; Scher *et al.*, 2012).

Además de la metilación del ADN, también es común encontrar aberraciones genéticas asociadas al CaV. El análisis de orina con bioM microsátélites ha demostrado que la mutación más frecuentes en orina es la pérdida de heterogeneidad del cromosoma 9p (Von Knobloch *et al.*, 2001).

•Biomarcadores transcriptómicos.

La transcriptómica incluye el análisis global de la expresión del ARN mensajero (ARNm) y refleja, con gran sensibilidad y precisión, el estado funcional de la célula. El avance en técnicas de alto rendimiento, como los *microarrays* de expresión de genes, la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR) y la secuenciación masiva o *Next Generation Sequencing* (NGS), han permitido el avance en la búsqueda de bioM de este tipo. Se ha demostrado la posibilidad de determinar perfiles transcriptómicos de células uroteliales exfoliadas presentes en la orina.

Mediante técnicas cuantitativas RT-PCR, se ha podido detectar CaV mediante 14 genes de expresión genética distintiva de células uroteliales, con el 100% de especificidad y 90% de sensibilidad (Mengual *et al.*, 2010). También ha sido posible determinar en orina, la sobreexpresión de ARNm de determinados genes asociados a la presencia de CaV. Entre ellos está el *ETS2/PLAU*, *BIRC 5 (survivin)*, *HYAL1*, *KRT20* y *MUC7* con sensibilidades similares, observando además que la combinación de 2-3 bioM ARN tienen más capacidad que el análisis de uno solo (Hanke *et al.*, 2007; Pu *et al.*, 2008; Eissa *et al.*, 2010) Los resultados son prometedores, pero existe una falta en la estandarización de la técnica y determinación de los valores de punto de corte.

Los microARN (miARN) son pequeñas moléculas de ARN no codificante de cadena sencilla que regulan la expresión de genes post-transcriptional. Podrían ofrecer la posibilidad de bioM ideales por su estabilidad en la orina y frente a la degradación de las nucleasas por su pequeño tamaño (Catto *et al.*, 2011). Mediante técnicas cuantitativas de RT-PCR se ha podido determinar la expresión de 157 miARN en células exfoliadas en orina, encontrando una regulación al alza de miRs-126/182/199 discriminante de pacientes con CaV (Hanke *et al.*, 2010). Otros análisis han demostrado una regulación a la baja de miRs-125 y 99 con una alta especificidad y sensibilidad (Zhang *et al.*, 2014).

• Biomarcadores proteómicos.

Los bioM basados en proteínas ofrecen ventajas frente a los basados en ácido nucléico, ya que el perfil proteómico tiene en cuenta los cambios en la expresión de los genes relacionados con modificaciones de transcripción, traslación y post-traslación. Los cambios fenotípicos solo se van a manifestar por si mismo a través de alteraciones de la expresión protéica y, por tanto, la identificación de factores protéicos en la orina de pacientes con CaV podría elucidar mejor la biología tumoral (Rosser, Urquidi and Goodison, 2013).

Se han descrito numerosos potenciales bioM proteómicos y se han observado perfiles protéicos asociados a TVNMI con alta exactitud diagnóstica (Linden *et al.* 2012). Sin embargo, muchas de estas proteínas no van a ser específicas de CaV. Los únicos bioM protéicos que han sido bien validados son los descritos anteriormente (NMP22, BTA, UBC y Cyfra21-1) aunque existen muchos más potenciales bioM (fibronectina, clusterina, CEACAM1, APOA4, Calprotectina, CD147, coronina 1A, DJ-1, reg-1...) que precisan de validación (D'Costa *et al.*, 2016).

Aunque la mayoría de los bioM propuestos han demostrado una mayor sensibilidad que la citología, ninguno de ellos ha demostrado una mayor utilidad clínica que la citología y la cistoscopia, generalmente por su limitada

especificidad, generando un tasa inaceptablemente alta de FP comparada con la citología urinaria (Chade *et al.*, 2009; Tilki *et al.*, 2011). Estas limitaciones explican que, a pesar de resultados inicialmente prometedores, ninguno haya supuesto un cambio sustancial en el diagnóstico y abordaje del CaV en la práctica clínica diaria, y que, por tanto, todavía no se haya encontrado el bioM ideal de utilidad en los diferentes escenarios diagnósticos (*screening*, detección precoz y supervivencia) (Lokeshwar *et al.*, 2005; Hall *et al.*, 2007; Robinson *et al.*, 2010; Kamat *et al.*, 2013b).

Metabolómica

La metabolómica es una herramienta de investigación emergente de gran potencia que se integra en la biología de sistemas. Estudia de forma sistemática las concentraciones y flujos del conjunto de metabolitos (moléculas químicas de pequeño peso molecular (<1500 Da)) presentes en un sistema biológico (p.ej. metaboloma) (Kell, 2006; Wishart, 2011). El metaboloma refleja la interacción entre la regulación genética, transcriptómica y proteómica, así como el efecto del ambiente e intervenciones externas (p.ej. dieta, actividad farmacológica) (Figura 2).

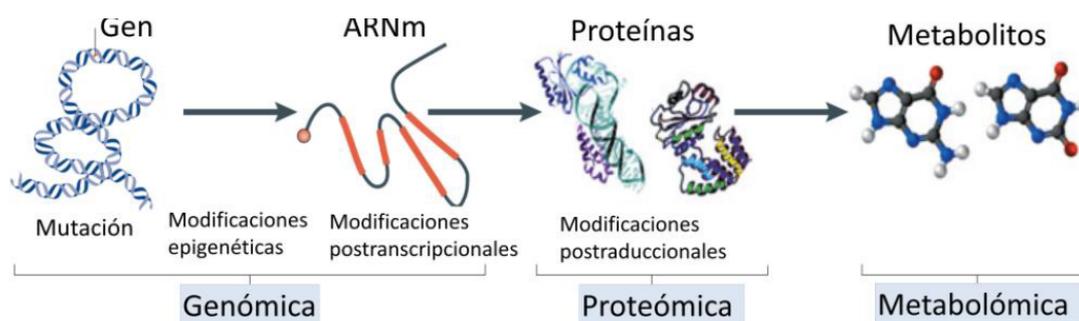


Figura 2: *Cascada ómica.* Genes y proteínas están sujetos a mutación, procesos de regulación epigenética y modificaciones post-traduccionales, respectivamente. Los metabolitos representan los productos finales de la cascada, los cuales están más cercanos al fenotipo (Vázquez Fresno, 2015)

Se estima que el número de metabolitos primarios presentes en el cuerpo humano es aproximadamente entre 2.500-6.000, excluyendo las moléculas lipídicas, inferior al número de genes (>30.000), ARN transcripción (>100.000) o proteínas (>1.000.000) (Nicholson, Lindon and Holmes, 1999). A pesar de ser una aproximación, es razonable esperar que este número aumente con el desarrollo de tecnologías analíticas de mayor sensibilidad y especificidad.

En contraste con la genómica y la proteómica, la metabolómica aporta una información muy dinámica puesto que refleja alteraciones genómicas e interacciones entre diferentes niveles (p.ej. genoma, proteoma) que condicionan la patogénesis y la progresión tumoral y las condiciones fisiológicas celulares (Kell, 2006). El análisis comparativo de alteraciones en el metaboloma permite potencialmente la identificación de bioM asociados a diferentes tipos de procesos biológicos tales como una enfermedad, reacciones a fármacos o respuesta dinámica a estrés ambiental.

En definitiva, el perfil metabólico refleja el estado fenotípico de un organismo de forma dinámica y ofrece una aproximación a los procesos finales en la cascada biológica (Lindon and Holmes, 2007).

Diseño del estudio metabolómico

Al igual que en otras áreas experimentales, una de las etapas más determinantes de un estudio metabolómico de identificación de bioM es el diseño del experimento. El diseño experimental debe permitir disponer de datos analíticos robustos y exactos, que permitan aislar las diferentes fuentes de varianza y obtener resultados estadísticamente significativos. El diseño del estudio debe tener en cuenta las etapas de recogida, pre-tratamiento y almacenamiento de la muestra, la selección de la técnica y método de análisis, pre-procesado de los datos, control de calidad de la señal analítica, así como el análisis estadístico (quimiométrico) y bioquímico para la interpretación de la información obtenida.

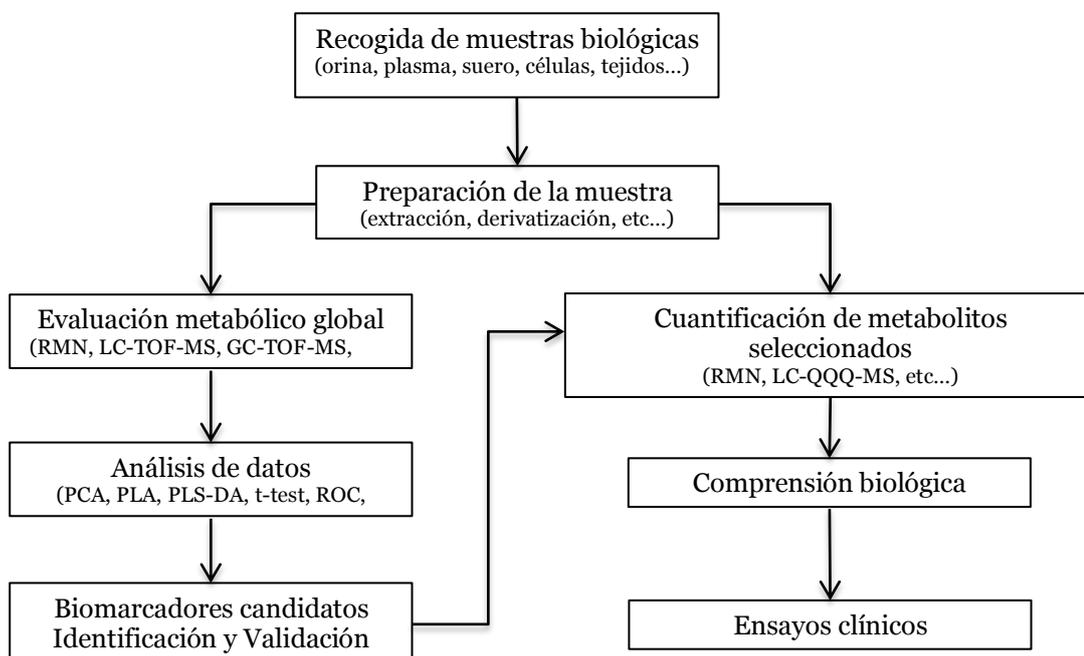


Figura 3. Flujo de trabajo para la identificación y validación de biomarcadores metabolómicos (Zhang, 2012).

El diseño de un estudio en metabolómica clínica debe tener también en cuenta aspectos éticos para garantizar la protección de los derechos, seguridad y bienestar de los voluntarios incluidos en él.

Por último, en este tipo de estudios se debe controlar en la medida de lo posible la presencia de posibles factores de confusión (p.ej. edad, sexo, raza, estilo de vida, actividad física, medicación) que pudieran afectar al metaboloma.

La Figura 3 muestra de forma esquemática las diferentes etapas incluidas en el diseño de un estudio metabolómico clínico con el objetivo de identificar un perfil metabólico característico asociado a Ca.

▪ Recogida y preparación de muestras biológicas

La recogida de muestras es una etapa crítica en un estudio metabolómico. Cualquier alteración de la composición de la matriz asociada al proceso de recogida y pre-tratamiento de la muestra se verá reflejada en los datos analíticos obtenidos y, por consiguiente, afectará a la interpretación estadística y bioquímica de la información. El procedimiento habitual de recogida y preparación de muestras incluye las etapas de muestreo, estabilización metabólica (*metabolic quenching*), almacenamiento y, en caso de estudios dirigidos, extracción del metabolito. Las matrices biológicas habitualmente utilizadas en investigación clínica del cáncer son biofluidos (p.ej. orina, suero, plasma) y tejido.

Como se ha descrito anteriormente, el diseño de un estudio metabolómico debe minimizar las fuentes de variación no biológicas. Así, el diseño debe describir de manera detallada las etapas de muestreo (p.ej. tiempo, instrumental analítico), alicuotado, almacenamiento de muestra y procesado. Estas etapas deben garantizar que el metabolismo se detiene de forma cuantitativa (*metabolic quenching*) durante el procesado de la muestra, de manera que el análisis metabolómico de la muestra se pueda asociar al estado metabólico del sistema biológico en el momento de recogida de

manera reproducible. El *quenching* interrumpe el metabolismo inhibiendo enzimas endógenas, suprimiendo o reduciendo cambios en la composición de la matriz durante el proceso de recogida y pre-tratamiento de la muestra. Debido a que la cinética de algunos metabolitos es extremadamente rápida, la falta o la selección de protocolos de *quenching* inapropiados pueden conducir a resultados sesgados (Teahan *et al.*, 2006). Por tanto, como regla general, el periodo de tiempo entre la recogida de muestra y el análisis debe ser tan corto como sea posible. Sin embargo, el análisis inmediato de las muestras en algunas ocasiones es imposible por lo que se requiere su almacenaje. Es relevante mencionar que diferencias en el tiempo de almacenaje o frecuencia de los ciclos de descongelación/congelación puede tener influencia en el desarrollo de modelos metabolómicos, por lo que es una variable que conviene analizar como un posible factor de confusión.

La etapa de extracción de los metabolitos es crítica en el proceso analítico y, junto con la etapa previa de recogida de la muestra, determina en gran medida la calidad de los datos. La etapa de extracción tiene como objetivo aislar los metabolitos de interés de componentes de la matriz que pudieran actuar como interferentes (p.ej. proteínas, sales). Esta etapa puede tener también como objetivo la pre-concentración de los metabolitos, o aumentar la compatibilidad del extracto con la subsiguiente técnica analítica. En general, el proceso de preparación de la muestra se diseña teniendo en cuenta las características instrumentales de las diferentes plataformas analíticas.

La existencia de mas de un material biológico (orina, plasma, suero, células, tejidos...) accesible para muestreo permite la selección de la muestra más adecuada para el análisis del problema a estudiar. La orina, matriz utilizada en este estudio, es un producto final del cuerpo y contiene numerosos metabolitos generados por el metabolismo celular. El uso de orina presenta ventajas respecto a otras matrices: la recogida de muestra es no invasiva y fácil y, habitualmente, la preparación de la muestra es más

sencilla que la necesaria en otro tipo de matrices (p.ej. tejidos, plasma), lo que permite incrementar la repetibilidad del análisis. Sin embargo, la composición de las muestras de orina varía ampliamente entre individuos y dentro del mismo individuo dependiendo del volumen urinario, agua y comida ingeridos y otras condiciones fisiológicas (p.ej. edad, género, peso, hábitos personales, efectos ambientales)(Lauridsen *et al.*, 2007; Saude *et al.*, 2007). Una estrategia habitual para minimizar la variación es la recogida de muestras de orina como “orina de 24h” o “muestras de orina primera hora mañana”. (Walsh *et al.*, 2006). Se ha demostrado que las muestras de orina humana permanecen estables más de 6 meses si se mantienen almacenadas entre -20 y -80°C. En almacenamientos a corto plazo pueden mantenerse a 4°C manteniendo estables las muestras por encima de 48h si se van a procesar por cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas (LC-MS) (Gika, Theodoridis and Wilson, 2008).

La orina puede ser analizada con diferentes técnicas tras una mínima preparación de la muestra (p.ej. centrifugación y dilución inicial de la muestra (Wong *et al.*, 2008)) debido a su escaso contenido en proteínas (Kemperman *et al.*, 2007). No obstante, para la determinación de analitos a bajos niveles de concentración puede ser necesaria una etapa de preconcentración. Otros biofluidos, como el plasma o el suero, están menos influenciados por la variación diurna, sin embargo presentan un alto contenido protéico (Chan *et al.*, 2015). La preparación de la muestra irá más enfocada a la eliminación de las proteínas mediante la utilización de, por ejemplo, disolventes orgánicos (acetronilo, metanol...)(Bruce *et al.*, 2009) o ultrafiltración (Tiziani *et al.*, 2008).

La sangre y orina proporcionan información complementaria sobre el estado de un organismo. El análisis metabólico de plasma como de orina proporcionan información complementaria acerca de procesos exógenos (p.ej. exposición, cambios medioambientales), como endógenos, incluida la comunicación interórgano, el metabolismo energético, inflamación y estado

de enfermedad. La sangre proporciona una lectura “instantánea” del estado metabólico en el momento de la recolección, y su composición refleja los procesos catabólicos y anabólicos ocurridos en el total del organismo. La orina, por otra parte, proporciona un patrón “promedio” de la descarga de metabolitos polares fácilmente excretados desde el cuerpo como resultado de los procesos catabólicos. Aunque la evaluación metabólica de ambos, sangre y orina, es una tarea desafiante, y potencialmente proporcionan información altamente complementaria sobre el metabolismo de un individuo, existen pocos trabajos publicados hasta la fecha que utilicen esta estrategia (Kuligowski, Perez-Guaita, *et al.*, 2015).

▪ Técnicas de análisis de la muestra biológica

Antes de proceder al análisis metabolómico de las muestras, debemos determinar la orientación de este análisis en función de la información previa al problema de estudio en cuestión. Existe principalmente dos enfoques diferentes:

- Análisis dirigido o perfil metabólico (*metabolic profiling*)

Este tipo de análisis permite el análisis cuantitativo de un grupo de metabolitos predefinidos. La selección inicial del metabolito permite optimizar y validar todas las etapas del método analítico (toma de muestra, conservación, extracción, detección).

- Análisis no dirigido o huella metabólica (*metabolic fingerprint*)

En este tipo de análisis, el objetivo es la detección del mayor número de metabolitos posibles presentes en la muestra biológica, obteniendo información tipo semicuantitativa. Este enfoque, se utiliza en estudios metabólicos de generación de hipótesis para, p.ej. la caracterización de fenotipos o, como en este estudio, para la identificación de patrones metabólicos característicos de la presencia o progresión de una enfermedad.

Actualmente, las técnicas más usadas en los estudios de metabolómica son la espectroscopia por resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (MS). Tanto la espectroscopia RMN como los diferentes acoplamientos entre técnicas de separación cromatográficas o electroforéticas y MS ofrecen una gran capacidad de detección de un amplio rango de metabolitos de forma simultánea, permiten además esclarecer la estructura del compuesto, y medir concentraciones relativas y absolutas.

Tabla 3. Principales metodologías de análisis utilizados en metabolómica

Técnicas		Ventajas	Inconvenientes
RMN	1D	Preparación mínima Rápida Alta reproducibilidad	Baja sensibilidad Alto solapamiento espectral
	2D	Mayor selectividad	Menor linealidad
	MAS	Adecuado para el análisis de tejidos intactos	Baja sensibilidad
MS	GC-MS	Alta selectividad Alta sensibilidad Buena reproductibilidad Bibliotecas espectrales	Preparación de la muestra tediosa Menor rango de detección que la LC-MS
	LC-MS	Alta sensibilidad Alta selectividad	Supresión iónica Reproducibilidad media
	CE-MS	Alta selectividad	Supresión iónica Reproducibilidad baja

RMN: resonancia magnética nuclear, 1D:Espectroscopia unidimensional, 2D: espectroscopia bidimensional, MAS: *magic angle spinning* MS: espectrometría de masas, GCMS: cromatografía de gas asociada a MS, LC-MS: cromatografía líquida asociada a MS, CE-MS: electroforesis capilar asociada a MS

La RMN es una técnica espectroscópica basada en la absorción y reemisión de energía del núcleo de ciertos átomos (^1H , ^{13}C , ^{19}F y ^{31}P) con núcleos magnéticamente activos (*spin*). La RMN es una técnica robusta que permite la detección de una gran número de metabolitos con un pretratamiento de la muestra sencillo para la mayoría de las matrices habituales en estudios metabolómicos. Las principales limitaciones de la espectroscopia RMN, comparada con la MS, son una menor sensibilidad y

selectividad. La MS habitualmente es más sensible que la RMN y tiene un alto rendimiento, selectividad y potencial de detección. Su principal desventaja es que puede requerir una extensiva preparación de la muestra, dependiendo de la matriz biológica, pudiendo introducir una variación adicional en los datos que reduzca la potencia estadística de un estudio (Tabla 3). Ambos métodos ofrecen elevados niveles de sensibilidad y selectividad, sin embargo, la enorme complejidad físico-química del metaboloma hace que no exista ninguna técnica instrumental o analítica capaz de analizar de forma cualitativa o cuantitativa el metaboloma completo, por ello cada vez es más frecuente el estudio metabolómico combinando NMR y MS o entre diferentes acoplamientos MS (Qiu *et al.*, 2009; Sreekumar *et al.*, 2009; Saric *et al.*, 2012).

▪ Espectrometría de Masas

La MS es una técnica analítica de elevada exactitud y precisión, usada tanto en análisis cualitativo para la identificación y elucidación estructural de compuestos desconocidos, como para el análisis cuantitativo y semicuantitativo de compuestos conocidos. Requiere cantidades pequeñas de muestra y proporciona información característica del analito como el peso molecular y fórmula molecular. Además, el análisis en modo MSⁿ proporciona información que puede permitir identificar la estructura molecular del analito.

Debido a la alta complejidad analítica que supone la caracterización de un metaboloma, se recurre al acoplamiento entre técnicas de separación y espectroscópicas. Los métodos de separación más utilizados para el acoplamiento a la MS son la cromatografía líquida (LC-MS), la cromatografía de gas (GC-MS) y la electroforesis capilar (CE-MS). El acoplamiento entre dichas técnicas ha proporcionado una herramienta de extraordinaria sensibilidad y especificidad para identificar cuantitativa y cualitativamente metabolitos en muestras biológicas.

• Técnicas de acoplamiento

El acoplamiento GC-MS se utiliza para el análisis de compuestos volátiles o aquellos no volátiles previa derivatización. La ventaja de esta técnica es su alta eficacia de separación y alta reproductibilidad de tiempos de retención, así como la existencia de bibliotecas espectrales. Sin embargo, la derivatización para su uso en compuestos no volátiles, es un proceso largo y costoso y algunos compuestos como los aminoácidos no son muy estables a la misma y pueden perderse o causar artefactos (Wang, Byun and Pennathur, 2010).

La cromatografía líquida de ultra resolución (*ultra performance liquid chromatography*, UPLC) es una técnica utilizada en la separación de componentes de una muestra basándose en diferentes tipos de interacciones físico-químicas entre estos y una fase estacionaria cromatográfica.

La UPLC en fase reversa (RP-UPLC) es la técnica habitualmente más empleada para la adquisición de perfiles metabólicos globales y ofrece una resolución óptima para compuestos de media y alta polaridad. Para el análisis de metabolitos de mayor polaridad la cromatografía de interacción hidrofílica o *hydrophilic interaction liquid chromatography* (HILIC) ofrece una mejor resolución cromatográfica. El desarrollo de cromatografía líquida de ultra-alta resolución, que utiliza rellenos cromatográficos con partículas con un diámetro de partícula $<2 \mu\text{m}$, aumenta la resolución cromatográfica, la sensibilidad y la selectividad del acoplamiento LC-MS, y permite una disminución del tiempo de análisis (Wang *et al.*, 2011). El acoplamiento UPLC-MS de alta resolución (p.ej. TOF, Orbitrap), supone una de las principales herramientas para el análisis metabólico dirigido y no dirigido metabólico (Roux *et al.*, 2011), como demuestra el aumento creciente de publicaciones relacionadas (ver Figura 4).

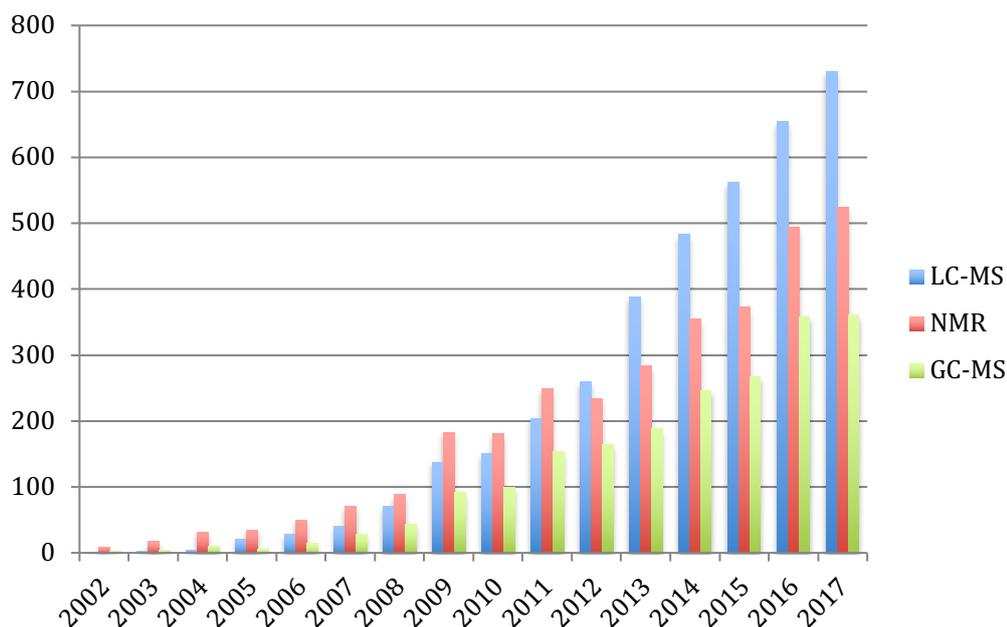


Figura 4. Número de publicaciones metabolómicas basadas en LC-MS, NMR y GC-MS en el periodo 2002-2017. Criterio de búsqueda en PubMed: (metabolomics OR metabonomics) AND (liquid chromatography) AND (mass spectrometry) frente a (metabolomics OR metabonomics) AND (NMR) frente (metabolomics OR metabonomics) AND (gas chromatography) AND (mass spectrometry)

En la LC la muestra se hace pasar a través de una columna cromatográfica mediante el bombeo de un eluyente apropiado (fase móvil) a alta presión. A partir de la introducción de la muestra en el sistema cromatográfico, sus componentes se retienen diferencialmente dependiendo del tipo y grado de las interacciones físico-químicas que establecen de forma reversible con la fase estacionaria. El grado de retención de los componentes de la muestra y, por lo tanto, la capacidad de resolución cromatográfica del sistema depende, principalmente, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil y de la interacción del analito con la fase estacionaria. El tiempo que tarda un compuesto en eluir se denomina *tiempo de retención (t_R)* y es una propiedad característica de un determinado compuesto bajo unas determinadas condiciones cromatográficas. La utilización de alta presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna y reduce así su difusión radial dentro de la misma, mejorando la

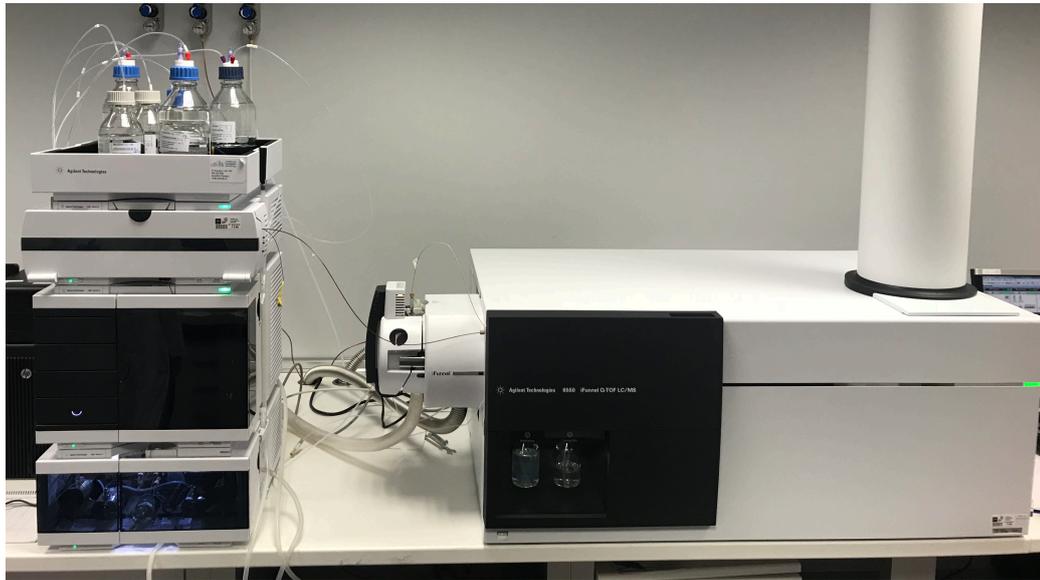
resolución cromatográfica así como la sensibilidad y selectividad del acoplamiento con un sistema de detección adecuado (p. ej. MS).

Existen diferentes tipos de clasificaciones de los modos de separación cromatográficos, en función del tipo de interacción entre los analitos y las fases estacionarias. Dentro de esta clasificación, el modo más comúnmente empleado para el análisis metabolómico es la cromatografía en fase reversa (RP-LC). En este tipo de separaciones, los disolventes más utilizados son agua y un disolvente orgánico (p.ej. metanol, acetonitrilo) de menor polaridad. Además, la fase móvil suele contener modificadores orgánicos o inorgánicos (p.ej. ácido trifluoroacético, ácido fórmico) para mejorar la resolución cromatográfica y/o la ionización de los analitos. Las fases estacionarias más utilizadas son de tipo C18 y C8 y ofrecen una resolución óptima para compuestos de media y alta polaridad.

• Fuentes de ionización

La MS nos permite medir la relación de masa/carga (m/z) de los iones. Para ello, es preciso ionizar los analitos (metabolitos) tras la separación cromatográfica. Los iones que se generan son acelerados hacia un analizador y separados en función de su relación m/z mediante la aplicación de campos electromagnéticos. La medida de los iones generados se denomina *espectro de masas* (ver Figura 5) a partir del cual se podrá determinar y cuantificar un determinado metabolito, con un grado de incertidumbre que dependerá de la exactitud y resolución de masa del instrumento.

La fuente de ionización es el elemento del sistema UPLC-MS donde tiene lugar la ionización de los analitos previa a la detección. Existen diferentes tipos de ionización para el acoplamiento LC-MS que determinan, en gran medida, el tipo de señal analítica. La ionización por electrospray (*electrospray ionization*, ESI), utilizada en este estudio, y la ionización química a presión atmosférica (APCI) son los tipos de ionización más empleados actualmente para el acoplamiento entre UPLC/HPLC y MS en estudios metabolómicos.



UPLC

Ionización
ESI

Q-q-TOF

Figura 5. Equipo UPLC-ESI-TOF-MS utilizado en el estudio.

•Espectrómetro de masas

El analizador de masas es el dispositivo que permite separar los iones según su relación m/z . El poder de resolución del espectrómetro de masa permite la diferenciación de iones con relaciones m/z similares. Existen diferentes tipos de analizadores en función de si utiliza un campo magnético o eléctrico para afectar la trayectoria o la velocidad de las moléculas, dirigiéndolas hacia el detector. La exactitud de masa y el poder resolución varía entre ellos (Tabla 4)(Bristow, 2006; Cortés-Francisco *et al.*, 2011). Los más utilizados en la actualidad, en estudios metabolómicos, son el analizador de tiempo de vuelo o *time of flight* (TOF), el MS de resonancia de ión-ciclotrón con transformada de Fourier (FT-ICR-MS) y Orbitrap por su alta resolución y exactitud de masa (<3 ppm).

Tabla 4. Tipos de espectrómetro de masa más frecuentes.

Espectrómetro	Ventajas	Inconvenientes
Q	Facilidad de uso y calibración	Baja resolución
QQQ	Facilidad de uso y calibración Alta sensibilidad	Baja resolución
TOF	Alta sensibilidad Alta resolución Alta selectividad	Linealidad limitada
Q-TOF	Alta sensibilidad Alta resolución Alta selectividad	Linealidad limitada
FT-IRC-MS	Alta sensibilidad Exactitud de masa (< ppm) Ultra alta resolución	Mantenimiento complejo Costes muy elevados
Orbitrap	Alta sensibilidad Alta resolución Alta selectividad	Costes muy elevados

Q: Cuádruplo, QQQ: triple cuádruplo, TOF: *time of flight*, Q-TOF: cuádruplo tiempo de vuelo, FT-IRC-MS: espectrómetro de masas de resonancia de ion-ciclotrón con transformada de Fourier.

▪ Procesamiento y análisis de datos

• Pre-tratamiento de los datos LC-MS

El pre-procesado de los datos incluye el conjunto de acciones previas al análisis metabólico no dirigido utilizando métodos uni o multivariantes. Esta etapa incluye la detección, integración, deconvolución y alineamiento de picos MS y cromatográficos, imputación de datos faltantes (*missing values*), eliminación de ruido de fondo, eliminación de efectos instrumentales (*batch effects*), normalización, transformación y escalado.

Una vez realizado el análisis de las muestras, se obtiene una *tabla de picos*. Las tablas de picos son matrices de datos en las que cada fila representa un objeto (muestra analizada) y cada columna una variable (señal metabólica identificadas a partir de su relación m/z y su t_R), y el valor de cada elemento corresponde al área de pico cromatográfico, que se asume como proporcional a la concentración del analito en la muestra.

El pretratamiento de los datos incluye, inicialmente, la eliminación de variables detectadas en el análisis de blancos de muestra, medidos en la misma sesión de trabajo que las muestras biológicas, que provienen de componentes no relacionados con la muestra biológica (contaminantes, plastificantes, impurezas de los solventes). Posteriormente, para mejorar la precisión de la medida, el pretratamiento de los datos incluye etapas de eliminación de señales con baja repetibilidad (p.ej. con un coeficiente de variación superior al 20% en las muestras de control de calidad, QCs), o intensidad. Una vez realizado este pretratamiento obtenemos una matriz de datos preparada para el análisis bioestadístico.

•Análisis bioestadístico

Al igual que en otras *ómicas* (p.ej. genómica, proteómica), una característica de la mayoría de estudios metabolómicos es la complejidad en la estructura de los conjuntos de datos obtenidos debido a su multidimensionalidad, colinealidad y al elevado número de factores ambientales o genéticos (muchos de ellos desconocidos) que afectan al perfil metabólico.

Además, los metabolitos son el producto de reacciones bioquímicas en las que participan otros metabolitos, por lo que es lógico esperar un alto nivel de interdependencia entre ellos. Este estudio incluye el análisis de un número relativamente elevado de muestras y variables metabólicas, por lo que resulta imprescindible un análisis multivariante que permita, de forma simultánea, reducir la dimensionalidad y analizar las asociaciones entre muestras y metabolitos.

Dentro de los métodos estadísticos multivariantes, los dos más ampliamente utilizados son el Análisis de Componentes Principales (PCA, *Principal Component Analysis*) y la regresión parcial de mínimos cuadrados discriminante (PLS-DA, *Partial Least Squares Discriminant Analysis*).

1. PCA. El PCA es una técnica no supervisada y no paramétrica basada en un algoritmo lineal. Este método surgió de la necesidad de comprimir y extraer información de conjuntos de datos multivariantes en los que la información (p.ej. la estructura de los datos) depende, no solo de un número de variables aisladas, sino de la relación entre variables.

Los métodos no supervisados no requieren el uso de información relativa a la clase a la que pertenecen las muestras. Como se ha descrito anteriormente, el objetivo en un PCA es reducir la dimensión del conjunto de datos intentando conservar la mayor cantidad de información posible de manera que, posteriormente, se faciliten criterios de decisión sobre las muestras (p.ej. clasificaciones, detección de datos anómalos) o variables (p.ej. metabolitos asociados a un determinado subconjunto de muestras). El PCA reduce la complejidad de la matriz de datos originales generando representaciones gráficas y numéricas que facilitan la interpretación de las asociaciones entre muestras y variables.

En metabolómica, el PCA, se aplica muy frecuentemente para la identificación de muestras anómalas y para un análisis inicial de la estructura de los datos para, por ejemplo, la identificación de *clusters* o grupos de muestras diferenciadas.

En un análisis PCA los datos se disponen en forma matricial con una estructura $\mathbf{X}(I \times J)$ formada por I filas y J columnas, donde I es el número de muestras y J el número de variables metabólicas. Tras un centrado y, de manera opcional, un escalado de los datos, el PCA implica una transformación lineal de la matriz $\mathbf{X}(I \times J)$ en un nuevo sistema de coordenadas ortogonales en el que los vectores de proyección de los datos, en el nuevo espacio de menor dimensionalidad, son las direcciones (ortogonales) de máxima varianza de los datos originales. La distancia entre muestras representadas en un gráfico de puntuaciones (*scores*) refleja la diferencia entre estas muestras en el patrón descrito por el modelo (Trygg, Holmes and Lundstedt, 2007).

2. PLS-DA. El PLS-DA es una técnica de análisis discriminante lineal, multivariante y supervisada. Los métodos metabolómicos supervisados requieren una clasificación previa de un conjunto de muestras, que se utilizan para el desarrollo de un modelo dirigido, a la identificación de patrones metabólicos característicos con capacidad discriminante o a la clasificación de muestras futuras.

El PLS-DA es un modelo multivariante que proyecta la matriz de datos original (\mathbf{X}) y las variables cualitativas binarias de clase (\mathbf{y}) en un nuevo espacio de menor dimensionalidad. Cada nuevo eje ortogonal corresponde a una variable latente (*LV, latent variable*). La dirección de cada LV de la matriz \mathbf{X} maximiza la covarianza entre ella y la LV del vector \mathbf{y} . Los modelos PLSDA presentan una gran capacidad de ajuste por lo que es imprescindible evaluar la capacidad de generalización del modelo y evitar el cálculo de modelos sobreajustados sin capacidad de generalización a nuevas muestras. Con este objetivo, una de las aproximaciones habitualmente empleadas es la validación cruzada (*CV, Cross Validation*).

Dentro de las estrategias de CV habituales, la denominada *k-fold CV* es, probablemente, la más empleada. La *k-fold CV* divide el conjunto de muestras inicial en un número *k* de subconjuntos. A continuación, se extrae del conjunto utilizado para la calibración o aprendizaje (*train set*) del modelo uno de estos subconjuntos (*test set*), y se desarrolla un modelo PLS-DA utilizando los restantes *k-1* subconjuntos (*train set*). Posteriormente, el modelo calculado se utiliza para la predicción de las muestras incluidas en el *test set*. Este proceso se repite iterativamente hasta que los *k* subconjuntos han sido incluidos una única vez en un *test set*. La *leave-one-out cross-validation (LOOCV)* representa un caso singular de CV en el que *k* es igual al número de muestras del conjunto de datos. A partir de los valores estimados para el conjunto de muestras, se calcula el error de predicción del modelo (p.ej. número de muestras

correctamente clasificadas, AUROC). El error obtenido se utiliza con dos objetivos complementarios: su optimización mediante la selección del número de LV del modelo, que proporcione un menor error de predicción, y la estimación de la capacidad de generalización del modelo seleccionado (Westerhuis *et al.*, 2008). Una limitación de esta aproximación es que el proceso para el cálculo del error de predicción utiliza parcialmente las muestras empleadas para la selección del modelo, por lo que está sesgado y proporciona valores potencialmente demasiado optimistas.

Una estrategia alternativa a la validación cruzada anteriormente descrita, es la doble validación cruzada (*2CV, Doble Cross Validation*). La 2CV se basa, al igual que la CV, en una división del conjunto de datos inicial en k subconjuntos de muestras. A continuación, $k-1$ de estos subconjuntos (*calibration set*) se utilizan para optimizar un modelo que luego se evalúa en el subconjunto no incluido (*validation set*). Sin embargo, a diferencia de la CV, la optimización del modelo se basa en resultados obtenidos mediante una k -fold CV interna en la que se utiliza exclusivamente las muestras incluidas en el *calibration set*. Este paso se repite, al igual que en la CV anteriormente descrita, hasta que todas las muestras han sido incluidas una vez en el *validation set*.

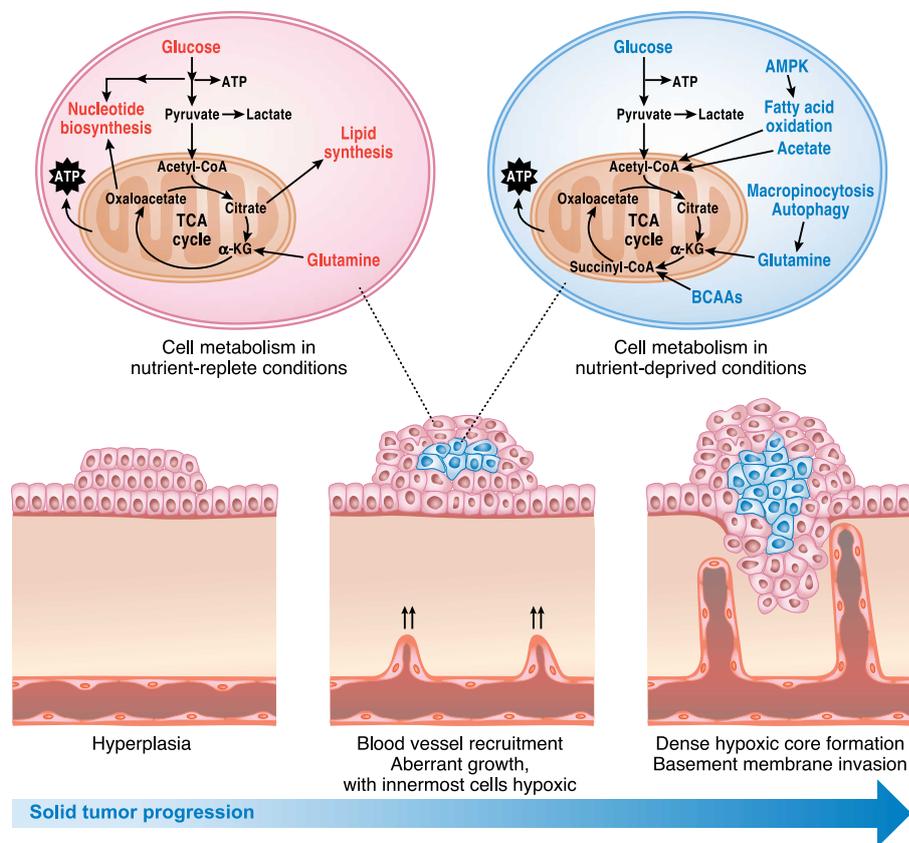
Por otra parte, es necesario calcular la significancia estadística de los diferentes estimadores del error de predicción calculado, tanto mediante CV como a través de una 2CV (p.ej. el AUROC o exactitud de clasificación). Este cálculo se puede llevar a cabo mediante un test de permutación. Este test compara el valor obtenido utilizando clases reales (el error estimado para el modelo inicialmente) con la distribución nula de estimaciones de error obtenidos empleando valores de clases permutados aleatoriamente.

Metabolómica y CaV

La transformación neoplásica de las células tumorales requiere cambios en las vías metabólicas y en la adquisición de nutrientes (alta replicación del DNA, síntesis de proteínas, rápido y constante crecimiento...) que permitan cubrir unas necesidades energéticas superiores a las que presentan las células normales (reprogramación metabólica) así como el control metabólico de la inflamación y la inmunidad (Deberardinis and Chandel, 2016). Esta reprogramación del metabolismo energético se considera en la actualidad una marca distintiva emergente en el desarrollo del tumor (Hanahan and Weinberg, 2011).

Otto Warburg fue el primero en observar anomalías en el metabolismo energético de las células tumorales respecto a las células normales (Koppenol, Bounds and Dang, 2011; Otto, 2016) describiendo que estas podían reprogramar el metabolismo de la glucosa y limitar su metabolismo energético, incluso en presencia de oxígeno, a la glucólisis, llevando a la célula a un estado denominado como "glucólisis aeróbica". Los tumores sólidos presentan una heterogeneidad de perfusión por lo que muchas de sus células se encuentran en un ambiente pobre de nutrientes y oxígeno. En esta situación, además de la producción de piruvato derivado de la glicólisis, los ácidos grasos y los amino ácidos pueden suplir los sustratos del ciclo ATC (ácido tricarboxílico) para mantener la producción de ATP (adenosina trifosfato) mitocondrial de las células tumorales (Figura 6).

La identificación y caracterización en un sistema biológico o en matrices biológicas (p.ej. orina) de las alteraciones metabólicas debidas a la presencia de células tumorales (p.ej. glicólisis, catabolismo de amino ácidos y ácidos grasos), refleja las alteraciones en las vías de señalización metabólica de estas permitiendo diferenciarlas de las células no tumorales (Deberardinis and Chandel, 2016).



ATP: adenosina trifosfato, TCA: ácido tricarbóxico, BCAAs: branched-chain amino acids (amino ácidos de cadena ramificada), CoA: Coenzima A

Figura 6. Vías metabólicas en condiciones normales y en condiciones de falta de nutrientes (Deberardinis and Chandel, 2016)

El descubrimiento y entendimiento de estas vías metabólicas va a permitir la mejor selección de pacientes y el desarrollo de técnicas de monitorización de respuesta de terapias dirigidas a enzimas metabólicas (Ben-Haim and Ell, 2009; Hensley, Wasti and DeBerardinis, 2013; Vander Heiden, 2013; Yang, Soga and Pollard, 2013).

Los avances en técnicas *ómicas*, principalmente EM y RMN, han facilitado la identificación de perfiles metabólicos asociados con la reprogramación metabólica de células tumorales en una variedad de cánceres, incluyendo colon, estómago, pulmón o cáncer de próstata (Kami *et al.*, 2013).

El CaV parece el ideal para identificar un perfil metabólico asociado al proceso tumoral mediante el análisis urinario por el hecho de que la orina se encuentra en íntimo contacto con el tumor (Zhang *et al.*, 2012). Estudios previos han demostrado que perros entrenados son capaces de distinguir con su olfato orinas procedentes de pacientes con CaV y diferenciarlas de pacientes control (Willis *et al.*, 2004). La presumida existencia de un perfil metabólico específico, con componentes volátiles o semivolátiles, sería responsable de un olor característico de la orina que justifica la capacidad de los perros para detectar las orinas de pacientes con CaV.

En el CaV se ha podido demostrar que las principales alteraciones metabólicas distintivas del mismo implican a vías metabólicas relacionadas con la energía (glicolisis, ciclo ácido tricarboxílico, β -oxidación de ácidos grasos y metabolismo de los aminoácidos), la formación de membranas (glicerofosfolípidos), síntesis de ácidos nucleicos (purinas and pirimidinas) y de estrés oxidativo (glutación) (Putluri *et al.*, 2011; Tripathi *et al.*, 2013). De acuerdo con estos hallazgos, los estudios realizados en biofluidos, como la orina, han identificado perfiles metabólicos con altas capacidades discriminatorias para CaV (Pasikanti *et al.*, 2013; Wittmann *et al.*, 2014) que revelan las principales vías desreguladas en estos tumores así como la posibilidad de desarrollo de nuevos prometedores bioM urinarios no invasivos de detección temprana de CaV (Cheng *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2016).

Sin embargo, los estudios realizados hasta la fecha están limitados por el pequeño tamaño de sus muestras y la heterogeneidad de sus cohortes, la falta de validación y de estandarización del método cuantitativo y la afectación por posibles factores de confusión (Rodrigues *et al.*, 2016). Un buen bioM tiene que ser capaz de identificar los perfiles metabólicos generados según los diferentes estadios y grados tumorales (Jin *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2016) pero también tiene que tener en cuenta la heterogeneidad metabólica intratumoral (HIT) (Gerlinger *et al.*, 2015), ya que las células pueden adoptar

diferentes perfiles metabólicos según su localización intratumoral que puede dificultar la identificación y validación de estos bioM (Lehuédé *et al.*, 2016).

La mayoría de estos estudios, han sido diseñados para identificar bioM de diagnóstico de CaV, comparando cohortes de pacientes sanos y de pacientes con tumor (Putluri *et al.*, 2011; Pasikanti *et al.*, 2013) o de cribado de CaV en pacientes con diferentes causas de hematuria, benigna y tumoral, y de pacientes sanos (Jin *et al.*, 2014; Wittmann *et al.*, 2014). Sin embargo, para el diseño de un estudio capaz de identificar bioM de monitorización de la progresión de la enfermedad, hay que tener en cuenta que estos tumores son panuroteliales y que, además, existen alteraciones epigenéticas que preceden a los cambios histopatológicos, y por tanto al tumor visible (Han, Wolff and Liang, 2012; Todenhöfer *et al.*, 2015a), cuyas alteraciones metabólicas, después de la resección tumoral, pueden mantenerse sin modificar a diferencia de un paciente sano. Por tanto, el perfil metabólico del tumor debe representar la heterogeneidad metabólica individual del paciente, siendo representativo no solo del tumor macroscópico si no de todo su urotelio.

En este contexto, el diseño de nuestro estudio, plantea la comparación del perfil metabólico de orina de pacientes con CaV y de orina tras la RTU del tumor en estos mismos pacientes, de forma que los cambios producidos en este perfil se deban a cambios principalmente secundarios a la desaparición del tumor macroscópico. Este enfoque buscaría determinar una "huella metabólica" tumoral que podría ser potencialmente utilizada como bioM para el seguimiento de recurrencia del CaV.

Este bioM permitiría una alternativa a la cistoscopia en el diagnóstico del tumor primario y en la monitorización del seguimiento, de forma que se pudieran reducir el número de cistoscopias en el mismo y por tanto programas de seguimiento mas costo-efectivos.

Capítulo 2.

Hipótesis

- La presencia de un tumor vesical en íntimo contacto con la orina altera el metaboloma urinario del paciente.
- El análisis metabolómico mediante espectrometría de masas acoplada a técnicas de separación de alta resolución debería permitir, a través de un análisis estadístico de la señal, la identificación de un conjunto reducido de biomarcadores asociados a la presencia de tumor vesical.
- El conjunto de biomarcadores debe permitir el desarrollo de un modelo para el diagnóstico no invasivo de CaV y de la monitorización de la recidiva.

Capítulo 3.

Objetivo

Identificar una huella metabólica urinaria específica de CaV y estudiar su valor como biomarcador tumoral de diagnóstico-detección de enfermedad y de monitorización de la recidiva durante el seguimiento tras la RTU vesical.

Capítulo 4.

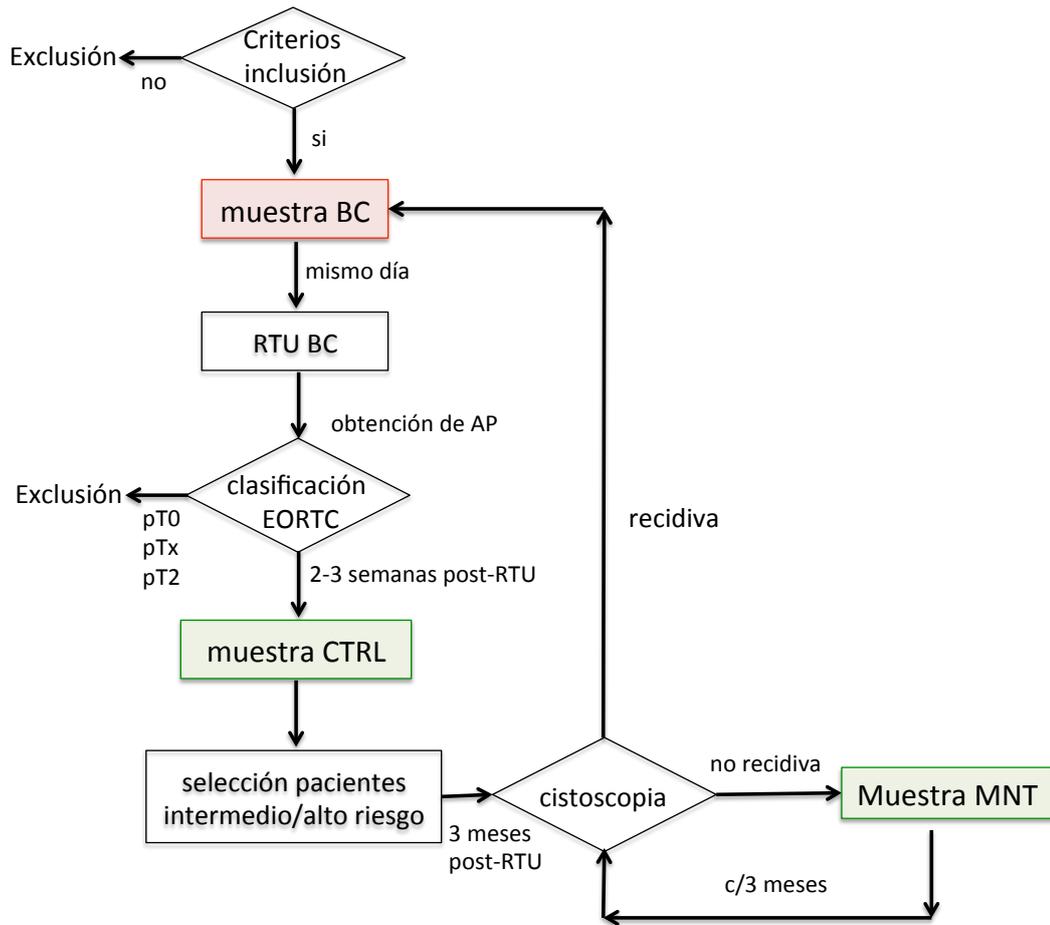
Materiales y métodos

Selección de pacientes

El desarrollo de este estudio se realizó sobre el área poblacional de pacientes que pertenecen, por sectorización, al Servicio de Urología del Hospital Universitario y Politécnico la Fe de Valencia, diagnosticados de CaV e incluidos en lista de espera quirúrgica para RTU vesical, en el periodo comprendido entre Febrero de 2012 y Diciembre de 2015. Se identificó a los pacientes desde la información obtenida de la lista de espera quirúrgica de nuestro centro, de forma que serían válidos para el estudio aquellos con diagnóstico definitivo de TVNMI (Código de diagnóstico CIE-10: 188) e incluidos para ser intervenidos quirúrgicamente mediante RTU (Código de tratamiento CIE 10: 57,49). A los casos seleccionados, de acuerdo a los criterios de inclusión, se les invitó a participar en el estudio el día previo al ingreso para la intervención quirúrgica. Se realizó una recogida urinaria sistemática pre-RTU (tumoral) y post-RTU (control) y, durante la intervención quirúrgica, se recogieron muestras de tejido tumoral y de tejido sano.

Tras la clasificación en grupos de riesgo de recidiva, de acuerdo a la puntuación de la EORTC (*European Organisation for Research and Treatment of Cancer*)(Sylvester *et al.*, 2006), se decide que pacientes se incluyen en un programa de seguimiento. A los pacientes incluidos se les realiza un seguimiento de forma trimestral hasta que finalice la fase de recogida.

En cada monitorización, durante el seguimiento, se les recoge orina (monitorización) y si presentan recidiva objetivada en la cistoscopia, se procede de nuevo a recogida de orina pre-RTU y post-RTU (Figura 7).



BC, *bladder cancer* (carcinoma vesical primario o recidiva); CTRL, control (ausencia de tumor); EORTC, *European Organisation for Research and Treatment of Cancer*; MNT, monitorización.

Figura 7 . Diseño de recogida de muestras

■ Criterios Inclusión

Los criterios de inclusión de los pacientes seleccionados se describen a continuación:

- pacientes de ambos sexos
- edad entre 20-80 años
- pacientes con TVNMI
- tumor primario o recidiva
- tumor vesical recidivado detectado por cistoscopia realizada durante el protocolo de monitorización y ausencia de tumor en cistoscopia y citología previa en al menos dos controles anteriores
- tumor único o múltiple
- tamaño tumoral >1cm

■ Criterios Exclusión

Los criterios de exclusión para la no selección eran los siguientes:

- pacientes con diagnóstico de CaV e incluidos en lista de espera para la realización de las siguientes intervenciones: cistectomía, RTU re-estadaje, segunda RTU por previa incompleta o toma de biopsia randomizada.
- pacientes portadores de sonda vesical.
- pacientes que tras la RTU presenten en el informe anatomopatológico: ausencia de tumor (pT0), papiloma o pTis.
- pacientes que tras la RTU presenten en el informe anatomopatológico: tumor infiltrante (pT2-4).

Variables clínicas

▪ Historia Clínica

De la historia clínica se recogieron datos personales y epidemiológicos del enfermo (p.ej. edad, sexo) mediante la utilización del programa informático de historia clínica del hospital (ORION o Mizar). En caso de tratarse de una recidiva tumoral, se estableció el tiempo libre de recidiva como el periodo transcurrido entre las fechas de detección de recidiva y de la última RTU.

▪ Características macroscópicas tumorales

De la cistoscopia previa a la resección, se describió y recogió información sobre las características tumorales: localización, tamaño (en cm), número y morfología tumoral.

▪ Características sobre la resección tumoral

La RTU de vejiga se realizó bajo anestesia raquídea o general y bajo profilaxis antibiótica.

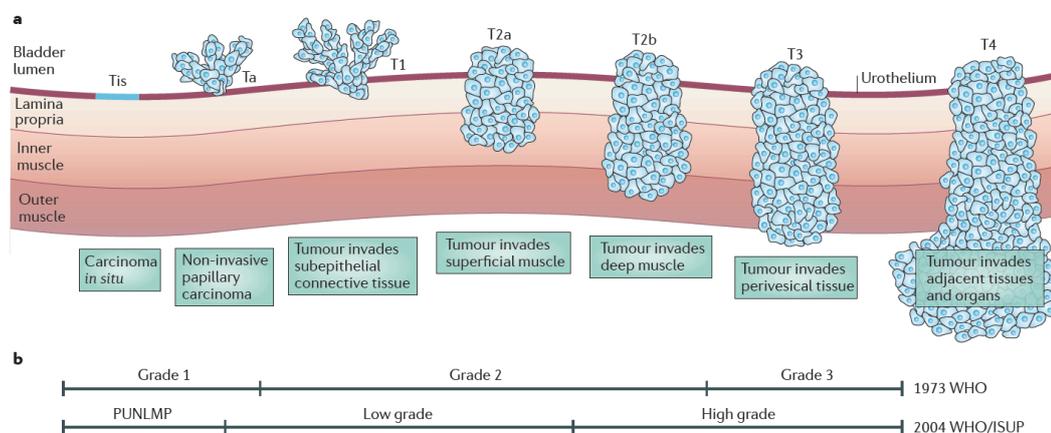
Se resecó el tumor vesical y la base hasta plano músculo-graso y se remitió por separado a anatomía patológica para obtener el estadio tumoral. Previo a la resección se realizaron biopsias con pinza fría del tumor vesical y de mucosa vesical sana, para la recogida de muestras de tejido para el estudio.

De la información recogida en el protocolo quirúrgico, se obtuvieron datos sobre la fecha de la resección y si la exéresis fue completa o incompleta.

■ Características anatomopatológicas

Tras la resección tumoral, se obtuvo información sobre el análisis anatomopatológico (AP) de las muestras en cuanto a tipo histológico, estadio tumoral y grado tumoral (Figura 8).

Todos los pacientes de este estudio presentaron CaV de tipo histológico transicional.



- Estadio tumoral según la clasificación del sistema TNM
- Grado tumoral según las dos clasificaciones actuales de WHO 1973 y 2004

Figura 8. Estadiaje y gradación del CaV (Margaret A. Knowles and Hurst, 2015)

● Estadio del tumor

Se utiliza la clasificación tumoral TNM (*American Joint Committee on Cancer cancer staging 7th ed.*) (UICC, 2009) que se basa en tres puntos:

- *T* describe cómo afecta el tumor en profundidad a la pared de la vejiga y la afectación de órganos vecinos.
- *N* indica si existe afectación ganglionar linfática local.
- *M* indica si exista afectación tumoral a distancia (metástasis) de órganos o de ganglios linfáticos.

Todos los pacientes incluidos en este estudio presentaban CaV en estadio N0 y M0, es decir, no presentaban afectación ganglionar ni metastásica.

Las categorías de *T* en cáncer de vejiga son las siguientes:

T_x tumor primario no puede evaluarse

T₀ no existe evidencia del tumor

T_a carcinoma papilar no invasivo

T_{is} carcinoma in situ (o CIS)

T₁ tumor que invade el tejido conectivo subepitelial

T₂ tumor que invade la capa muscular

T₃ tumor que invade tejido graso

T₄ tumor que afecta tejidos u órganos vecinos

Los TVNMI incluyen estadios *T_a* y *T₁*. Los TVMI engloban *T₂*-*T₄*.

- **Grado tumoral**

El grado histológico o grado de diferenciación tumoral se establece de acuerdo a la Graduación de la *World Health Organization (WHO)* de 1973

Papiloma urotelial

Grado 1 bien diferenciado

Grado 2 moderadamente diferenciado

Grado 3 poco diferenciado

- **Grupo de riesgo y progresión**

Asociando datos del AP, características tumorales y tasa de recidiva, se pudo clasificar a los pacientes por grupo de riesgo y progresión según el sistema de clasificación EORTC, en función de la puntuación recibida según número de tumores, tamaño, estadio, grado, presencia de CIS y si el tumor es primario o recidiva (Sylvester *et al.*, 2006). En función de esta clasificación, se estimó el riesgo de recidiva y progresión a 1 y 5 años de los pacientes (Tabla 5).

Tabla 5. Sistema puntuación EORTC

Factor	Recidiva	Progresión
Número tumores		
Único	0	0
2-7	3	3
≥ 8	6	3
Diámetro tumoral		
<3cm	0	0
≥ 3cm	3	3
Tasa recidiva previa		
Primario	0	0
≤ 1 recidiva/año	2	2
> 1 recidiva /año	4	2
Categoría		
Ta	0	0
T1	1	4
CIS concomitante		
No	0	0
Si	1	6
Grado (OMS 1973)		
G1	0	0
G2	1	0
G3	2	5
Puntuación total	0-17	0-23

Los pacientes que presentan puntuación de 0 se clasifican en el grupo de bajo riesgo (15% de probabilidad de recidiva en un año), de 1-9 se clasifican en el grupo intermedio (24-38% de probabilidad de recidiva en un año) y los que presentan 10-17 en el grupo de riesgo alto (61% de probabilidad de recidiva en un año) (ver Tabla 6). Los pacientes clasificados en estos dos últimos grupos de riesgo, con puntuación mayor de 4, se seleccionaron para la inclusión en el protocolo de monitorización y estudio de la recidiva.

Tabla 6. Grupos de riesgo de recidiva y progresión EORTC

Puntuación recidiva	Probabilidad Recurrencia 1 año (%)	Probabilidad Recurrencia 5 años (%)	Grupo Riesgo Recidiva
0	15	31	Riesgo bajo
1-4	24	46	Riesgo intermedio
5-9	38	62	
10-17	61	78	Riesgo alto

Puntuación progresión	Probabilidad progresión 1 año (%)	Probabilidad progresión 5 año (%)	Grupo Riesgo progresión
0	0.2	0.8	Riesgo bajo
2-6	1	6	Riesgo intermedio
7-13	5	17	Riesgo alto
14-23	17	45	

Recogida de las muestras

▪ Muestras biológicas y almacenamiento

El desarrollo de la plataforma de análisis metabolómico para la identificación de biomarcadores de CaV fue aprobado por Comité Ético de Investigación Biomédica del IIS la Fe (Anexo 1).

Las muestras de orina se recogieron en el Servicio de Urología del Hospital La Fe y, posteriormente, se alicuotaron y almacenaron en el Biobanco del Hospital La Fe.

Las muestras de orina se obtuvieron de primera hora de la mañana recogidas por micción espontánea (30 mL). Las muestras de tejido se recogieron en el mismo momento de la cirugía y fueron almacenadas en viales criogénicos en N₂(l). De cada muestra de orina se prepararon 5 alícuotas de 3 mL que se conservaron en criotubos a -80°C. Las muestras se etiquetaron de acuerdo a un código numérico secuencial anonimizado. El código incluye la fecha de recogida, la patología y número de registro: (día/mes/año-CaV vs Control-Nº Registro). Tras la recogida y etiquetado, se introdujo esta información en una base de datos para el control de la codificación y trazabilidad de las muestras.

Todos los pacientes incluidos en el estudio, fueron informados de los objetivos del mismo y voluntariamente accedieron a firmar el Consentimiento Informado para la participación en el estudio y almacenamiento de muestras en el Biobanco. Este documento fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Biomédica del IIS la Fe (Anexo 2).

▪ Esquema de recogida de muestras orina

El diseño de la recogida de muestras se describe en la Figura 7. Se recogió una muestra de orina inicial, antes de la RTU (**bladder cancer BC**), y una segunda muestra tras la resección del mismo (**control CTRL**), que se realizó en la visita posterior de cada paciente en consultas externas, a las 2-3 semanas tras la retirada de la sonda vesical y antes de iniciar la quimioterapia endovesical diferida, en caso de indicación.

Tras la clasificación en grupos de riesgo de recidiva de acuerdo a la puntuación de la EORTC, se seleccionó aquellos con riesgo intermedio o alto de recidiva y/o progresión para su inclusión en el grupo de **monitorización (MNT)**. A estos pacientes incluidos se les monitorizó de forma trimestral con recogida de orina (orinas **MNT**) hasta finalización de la fase de recogida de muestras. En caso de presentar recidiva objetivada en la cistoscopia durante el seguimiento, se procedió de nuevo a recogida de orina pre-RTU (**BC**) y post-RTU (**CTRL**).

Análisis metabolómico de la muestra

▪ Reactivos

Los disolventes utilizados en el análisis (grado LC-MS) se obtuvieron en Scharlau (Barcelona, Spain). El agua ultra-pura se obtuvo empleando el sistema de purificación de agua Milli-Q (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). El ácido fórmico ($\geq 95\%$ v/v) se obtuvo de Sigma-Aldrich Química SA. Los patrones internos utilizados para el control inicial de la respuesta analítica fueron: DL-Fenilalanina-D₅ (Cambridge Isotopes Laboratory Inc., Andover, MA, USA), Cafeína-D₉ (Toronto Research Chemicals, Toronto, Ontario, Canada), Reserpina y Leucina encefalina (Sigma-Aldrich Química SA, Madrid, España).

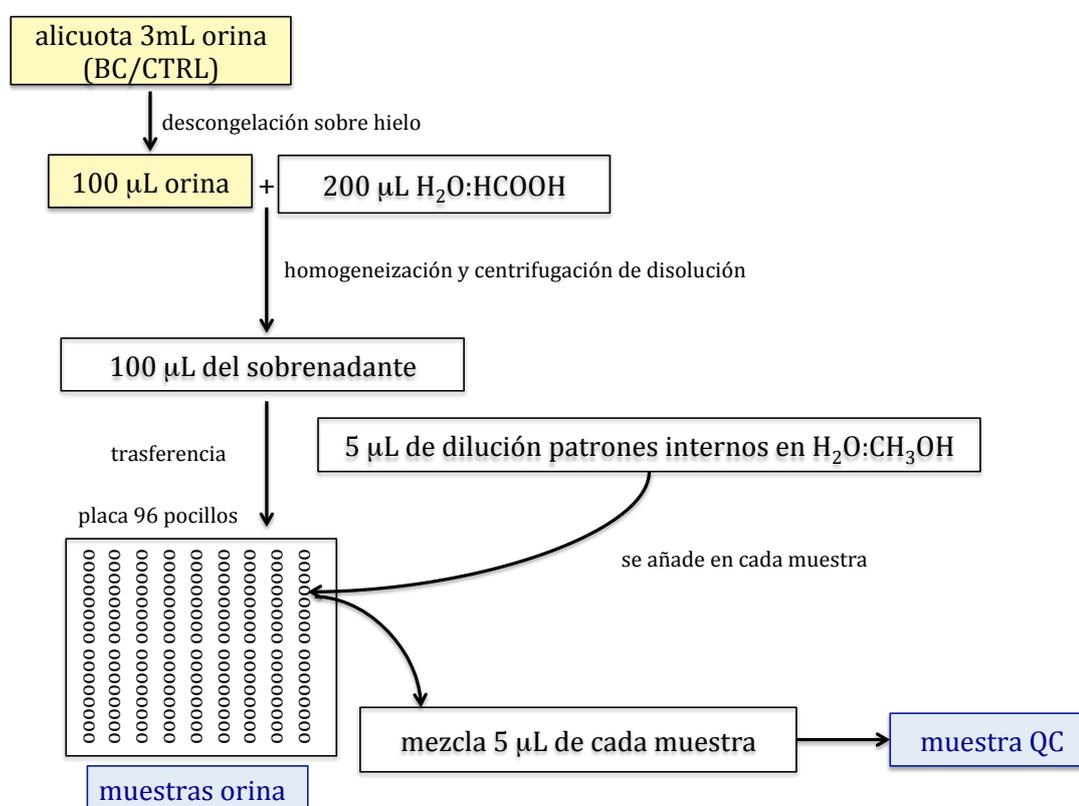
▪ Preparación de las muestras

• Muestras de orina

Las muestras de orina almacenadas a -80°C se descongelaron sobre hielo. A continuación, se pipeteó 100 μL de orina y se añadió 200 μL de una disolución acuosa de ácido fórmico (1:1, 0.1% v/v HCOOH). La disolución obtenida se homogeneizó por agitación (Vortex, 10 s) y, a continuación, se centrifugó ($10.000 \times g$, 4°C , 10 min). Se recogieron 100 μL del sobrenadante y se transfirieron a una placa de 96 pocillos donde se le añadió a cada muestra 5 μL de una disolución de los patrones internos 4 μM (Fenilalanina-D₅, Cafeína-D₉, Leucina encefalina, Reserpina) en H₂O:CH₃OH (1:1, 0.1% v/v HCOOH) (Figura 9).

•Muestra Control Calidad (*Quality Control, QC*)

La muestra utilizada para el control de calidad de la respuesta analítica (*QC, Quality Control*) se preparó a partir de homogeneización (vortex, 10 s) de 5 μL de cada muestra de orina preparada para el análisis mediante UPLC-MS una vez añadida a las mismas la disolución de los patrones internos.

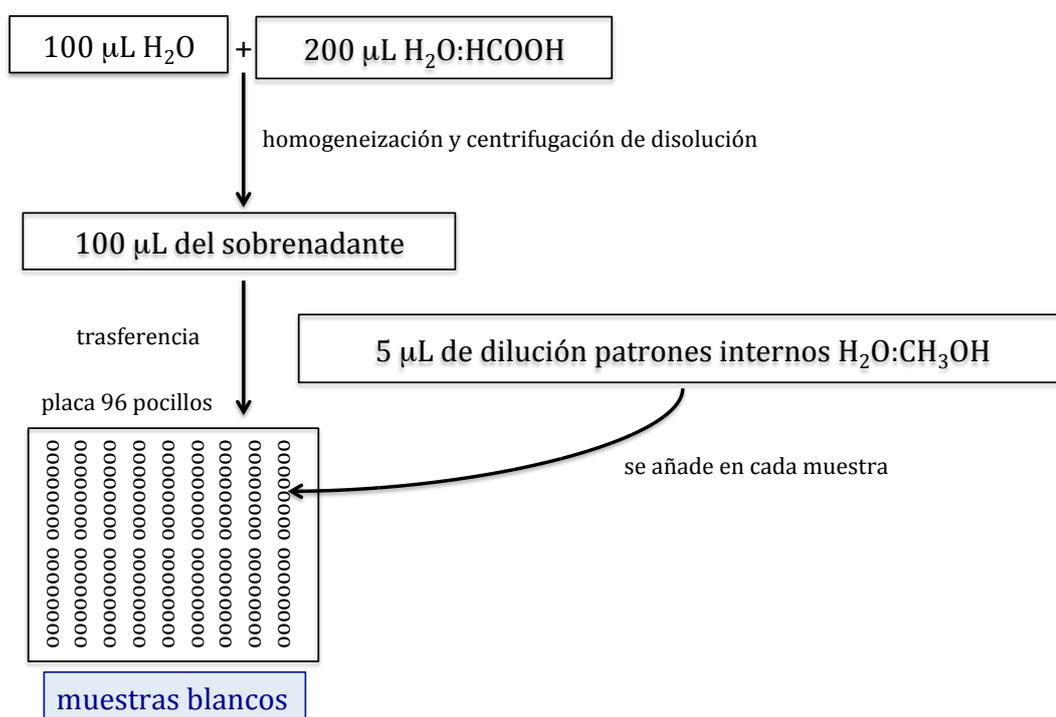


BC, *bladder cancer* (carcinoma vesical primario o recidiva); CTRL, control (ausencia de tumor); H_2O , agua; HCOOH , ácido fórmico; CH_3OH , metanol; QC, *quality control*

Figura 9. Diseño de la preparación de muestras de orina y muestras QC para análisis mediante UPLC-TOF-MS

•Blancos de muestra

Para la preparación de blancos de muestra, se sustituyó la orina de las muestras por H₂O y después se siguió el mismo protocolo empleado para la preparación de muestras de orina (Figura 10).



H₂O, agua; HCOOH, ácido fórmico; CH₃OH, metanol; QC, *quality control*

Figura 10. Diseño preparación de muestras de blancos

▪ Análisis UPLC-TOF-MS

El análisis de las muestras se realizó mediante RP-LC empleando un cromatógrafo *Agilent 1290 Infinity* (Agilent Technologies, CA, USA) y un detector de tipo cuádruplo-tiempo de vuelo (QTOF) *Agilent 6550*. La separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando una columna Acquity UPLC BEH C₁₈ (100 x 2.1 mm, 1.7 µm, Waters, Wexford, Irlanda) y el siguiente gradiente binario H₂O (0.1% v/v HCOOH):CH₃CN (0.1% v/v HCOOH) (A:B) a un flujo de 400 µL/min: 0 min, 2%B; 2 min, 2% B; 5.5 min 20% ; 9.5 min 95%B; 10.5 min, 95%B; 10.75 min, 2%B; 14 min, 2%B. El automuestreador y la columna se mantuvieron a 4 y 40°C respectivamente durante el análisis. El volumen de inyección empleado fue 4 µL.

La detección de la señal MS en el rango m/z 100-1700, se llevó a cabo empleando las siguientes condiciones de ionización: T gas, 200°C; flujo de gas de secado, 14 l/min; presión nebulizador, 37 psig; temperatura gas *sheath* T, 350°C; flujo gas *sheath*: 11 l/min; modo de ionización: positivo (ESI+); voltaje del capilar: 3.2 kV; voltaje del cono: 20 V; temperatura de la fuente y desolvatación: 120 y 380°C, respectivamente; flujos de N₂ de cono y nebulización: 50 y 800 L/h respectivamente. La exactitud de masa (error<5 ppm) se mantuvo durante el análisis utilizando re-calibración a partir de la señal de los iones moleculares protonados de tres patrones introducidos directamente de forma continua en la fuente de ionización: anhídrido ftálico (m/z 149.0233), Purine (m/z 121.050873) y HP-0921 (m/z 922.009798).

El orden de inyección de las muestras se aleatorizó para evitar el sesgo que podría introducir la presencia de variaciones en la respuesta instrumental debidas a, por ejemplo, contaminación de la interfaz ESI, cambios en la capacidad de la columna cromatográfica, temperatura, etc. Además de las orinas tumorales (BC) y no tumorales (CTRL) también se incluyó el análisis de blancos de muestras (Blanco), que permitieron identificar y excluir del análisis estadístico señales debidas a, por ejemplo, contaminantes o plastificantes. Finalmente, se incluyó el análisis de una serie

de réplicas de la muestra QC, distribuidas homogéneamente a lo largo de la secuencia de análisis, para la monitorización y corrección de variaciones en la respuesta instrumental. Además, los perfiles metabolómicos obtenidos a partir de las medidas de réplicas de la muestra QC, se utilizaron para la estimación del error instrumental en el valor calculado de y en los modelos PLS-DA.

■ Tabla de picos UPLC-TOF-MS

Los datos crudos generados durante el análisis UPLC-TOF-MS se convirtieron al formato mzXML utilizando el programa ProteoWizard (<http://proteowizard.sourceforge.net/>).

A continuación, se generó una tabla de picos mediante el software XCMS en entorno R. La tabla de picos se obtuvo empleando los siguientes parámetros:

- El método *centWave* se utilizó para la detección de picos con los siguientes valores: tolerancia de $m/z = 15$ ppm, anchura de pico cromatográfico 6-20 s, relación señal ruido superior a 25.
- Para picos con tR superpuestos se seleccionó una diferencia mínima en m/z de 5 mDa.
- El valor de m/z para la anotación de los picos cromatográficos se calculó utilizando una media ponderada de los valores de m/z observados en el pico cromatográfico usando la función *wMean*.
- Los límites para la integración del pico cromatográfico se definieron utilizando el método *Mexican hat* incluido en el software XCMS.
- El alineamiento de picos cromatográficos se realizó utilizando el método *nearest* empleando tolerancias de tiempo de retención y m/z de 6 y 5 mDa respectivamente, y utilizando el mismo peso a ambas variables.
- Tras el alineamiento de las señales se procedió a una segunda integración de las señales cromatográficas método *fillPeaks* para

reducir al mínimo el número de valores faltantes en la tabla de picos que pudieran haberse originado por un alineamiento incorrecto de la señal.

Esta tabla de picos se importó al entorno MATLAB R2014b (Mathworks Inc., Natick, MA, USA) para el análisis de datos.

▪ Aseguramiento y control de calidad analítica

• Validación de las etapas automáticas de integración, extracción y alineamiento de picos

La exactitud de la tabla de picos obtenida se evaluó a partir del análisis de la correlación entre los valores del área de pico cromatográfico de los patrones internos DL-Fenilalanina-D₅, Cafeína-D₉, Reserpina y Leucina Encefalina, obtenidos mediante el procesado automático de la señal en XCMS, y los valores de área de pico obtenidos a partir de la integración manual de la señal en MassHunter.

• Eliminación de señales debidas a contaminantes

El objetivo de esta etapa fue la eliminación de señales presentes en la muestra debido a diferentes fuentes contaminantes tales como plastificantes, impurezas de disolventes, etc. Para ello se analizaron las señales obtenidas en el análisis de Blancos y se compararon los valores promedio de área de pico en los QC y los Blancos. Las señales con una intensidad similar en muestras QC y blancos se consideraron ruido de fondo y se excluyeron del análisis bioestadístico. Además, se eliminaron aquellas variables con valores mediana <20.000 AU (unidades arbitrarias) en los QCs.

• Estabilidad instrumental: *batch effect*

En el análisis metabolómico no dirigido se puede identificar varias fuentes de variación. Por una parte, se encuentra la variabilidad biológica (inter e intra-individual), asociada o no a la variable de estudio (p.ej. presencia de tumor). Una segunda fuente de variación es de tipo

experimental, asociada al proceso de recogida, conservación y pre-tratamiento de la muestra. Por último, se encuentra la variación de tipo instrumental asociada al proceso de medida. Esta última categoría incluye, por una parte, las variaciones aleatorias asociadas a la medida (p.ej. volumen de inyección, respuesta instrumental, temperatura); y por otra parte, de forma especialmente relevante en el caso de UPLC-ESI-MS, la modificación sistemática de la respuesta instrumental en función del orden de inyección (p. ej. efecto *batch*) debida a, por ejemplo, una contaminación de la interfase de ionización o a la adsorción irreversible de compuestos de la matriz biológica a partículas del relleno de la columna UPLC, que modifican la retención o resolución cromatográfica del sistema.

Una vez identificadas y eliminadas del análisis aquellas variables identificadas como contaminantes y/o con una baja relación señal-ruido, la siguiente etapa de pre-procesado de los datos tuvo como objetivo el análisis y eliminación del efecto *batch*.

La evaluación del impacto del efecto *batch* sobre los datos se evaluó, inicialmente, de forma cualitativa mediante la representación gráfica de la respuesta analítica observada para la Intensidad del estándar interno (ISs) de la DL-Fenilalanina-D₅, Cafeína-D₉, Reserpina y Leucina Encefalina en función del orden de inyección (ver Figura 9). Posteriormente, de forma cuantitativa, se analizó utilizando la distribución de coeficientes de variación o *relative standard deviation (RSD)* de la respuesta analítica observada para el conjunto de señales metabólicas en QCs, definido como:

$$RSD = \frac{100 \sigma}{\bar{x}}$$

Si bien no existe un valor teórico de RSD a partir del cual se pueda definir una variable como 'inestable', se suele aceptar niveles 15-20% como máximo trazando un paralelismo con la guía FDA para la validación de métodos bioanalíticos dirigidos y cuantitativos. En este estudio se seleccionó un RSD=15% como valor límite para la aceptación de una variable metabólica. Es decir, aquellas que tras el proceso de corrección del efecto

batch presentaron un RSD>15% en los QCs, se clasificaron como variables inestables y se excluyeron del análisis bioestadístico posterior.

La eliminación del efecto *batch* se llevó a cabo empleando el método QC-SVRC (*Quality Control samples and Support Vector Regression*) propuesto por Kuligowski et al.(Kuligowski, Sanchez-Illana, *et al.*, 2015). Este método se basa en el empleo de las muestras QC para analizar la estabilidad de la señal. Los QCs son replicas analizadas periódicamente a lo largo de la secuencia, por lo que la respuesta para cada metabolito debe ser, bajo condiciones de repetibilidad, constante. Es decir, los residuales de los valores de área de pico cromatográfico de cada variable metabólica deben seguir una distribución normal y no mostrar ninguna tendencia asociada al orden de inyección. Utilizando exclusivamente los QCs, el método QC-SVRC optimiza y selecciona, para cada señal metabólica de forma independiente, una curva de regresión SVR en función del orden de inyección. Dicha curva se utiliza, posteriormente, para la normalización de las señales observadas en las muestras de orina. La máquina de soporte vectorial no lineal para regresión utilizada empleó un kernel de tipo *radial basis function*. Los parámetros de penalización del ajuste ϵ -insensitive loss parameter, C, y el parámetro de kernel γ usados para el ajuste de SVR se seleccionaron siguiendo la estrategia propuesta por Kuligowski et al: el parámetro ϵ -insensitive loss parameter se definió, para cada característica metabólica, como la precisión instrumental esperada en ausencia de efecto *batch* (p.ej. 5% de la señal promedio en QCs, en este estudio); el valor de C se definió como la diferencia entre 10 y 90 intercuartiles de la respuesta de los QCs. Finalmente, se seleccionó el valor de kernel γ en el rango $[2^{-6}, 2^{-2}, \dots, 2^8]$ mediante LOOCV utilizando el valor mínimo de RMSECV (*root mean squared error of cross validation*) como criterio de selección (Kuligowski, Sanchez-Illana, *et al.*, 2015). Para aumentar el grado de confianza en la evaluación de la corrección del efecto *batch*, se utilizaron los QCs pares para el proceso de corrección, mientras que los

impares se utilizaron como conjunto externo para la evaluación del ajuste instrumental y su efecto sobre la repetibilidad en el modelo PLS-DA. Además, los primeros y los últimos tres QCs inyectados consecutivamente el principio y al final del lote se utilizaron en la QC-SVRC para reducir el impacto potencial de la extrapolación en el LOOCV durante la optimización de los parámetros SVR. Se incluyó un análisis mediante componentes principales (PCA) de los datos corregidos para la identificación de muestras anómalas y una evaluación visual, complementaria, de la presencia de efecto *batch*.

■ Análisis PLS-DA

Para analizar las diferencias entre el perfil metabólico de las orinas *BC* (pre-RTU) y las *CTRL* (post-RTU), se optimizó un modelo supervisado PLS-DA. Previo al análisis, las muestras de orina se dividieron en dos subgrupos de calibración y validación. Las muestras de calibración se utilizaron para el desarrollo del modelo PLS-DA y la selección de variables metabólicas discriminantes. Una vez optimizado y seleccionado, se evaluó su capacidad predictiva utilizando el conjunto de muestras de validación. Las muestras incluidas en el conjunto de validación no se utilizaron en ningún momento durante el desarrollo del modelo discriminante, con el objetivo de mejorar la generalizabilidad de las estimaciones de la capacidad discriminante del modelo.

La optimización del modelo PLS-DA se llevó a cabo empleando valores de área de pico autoescalados y número máximo de 5 variables latentes (*latent variables*, LVs). El vector y contiene la información relativa a la clase de cada muestra (-1 o +1 para CTRL y BC respectivamente). Para la evaluación de la presencia de una diferencia estadísticamente significativa entre los perfiles metabólicos de muestras BC vs CTRL, las cifras de mérito del modelo PLSDA se estimaron mediante *LOPO-2CV* (*leave one patient out -2CV*). La selección de la dimensionalidad (p.ej. el número de LVs) del modelo PLS-DA interno se basó en el RMSECV calculado mediante LOO-CV. A partir de las clases

predichas se construyeron tablas de confusión con el número obtenido de falsos positivos (FP, *false positive*) y negativos (FN, *false negative*), así como de muestras positivas y negativas correctamente clasificadas (TP (*true positive*), TN (*true negative*)). Además, se calculó el área bajo la curva ROC (AUROC, *area under the receiver operator characteristic*) así como la sensibilidad, especificidad, los valores predictivos positivos (PPV, *positive predictive value*) y negativos (NPV, *negative predictive value*), y el índice de probabilidad de un test positivo o negativo. La sensibilidad se estimó como el ratio del número de muestras BC sobre el número de muestras clasificadas como BC. La especificidad se estimó como el ratio del número de muestras CTRL sobre el número de muestras clasificadas como CTRL. EL PPV se calculó como el ratio entre el número de muestras BC correctamente clasificadas (TP) y el número total de TP y FP. EL NPV se calculó como el ratio entre el número de muestras CTRL correctamente clasificadas (TN) y el número total de TN y FN.

Para evaluar inicialmente, la capacidad discriminante del modelo PLS-DA se seleccionó el número de muestras incorrectamente clasificadas (NMC=FP+FN) y el AUROC. La significancia estadística de los valores obtenidos y la ausencia de un sobreajuste en el modelo PLS se evaluó mediante un test de permutaciones empleando, en este estudio, 1000 permutaciones (Westerhuis *et al.*, 2008). Este test se basa en el análisis de los resultados obtenidos en una serie de modelos generados utilizando un vector de clases permutado aleatoriamente (p.ej. NMC_{perm} , $AUROC_{perm}$). La permutación del vector y elimina la asociación entre las matrices \mathbf{X} e \mathbf{y} de los datos (datos metabolómicos y clase de las muestras, respectivamente) (Westerhuis *et al.*, 2008). Debido a esto, las distribuciones de los estadísticos calculados para evaluar las capacidades predictivas de modelos discriminantes de datos permutados, se pueden considerar como distribuciones nulas (H_0). A partir de estas distribuciones, es posible el cálculo de valores p asociados a los estadísticos generados utilizando las clases reales como la fracción de los

estadísticos obtenidos en el test de permutaciones con un valor al menos tan extremo como el encontrado inicialmente. Además, los límites exactos de confianza binomial se estiman para los valores de sensibilidad, especificidad, PPV y NPV, respaldado por la diferencia estadísticamente significativa de la diferencia entre clases.

La selección de las variables metabólicas discriminantes se llevó a cabo usando la media de los vectores de regresión obtenidos en los test de permutación y la media del vector de regresión calculado utilizando la clase real. De manera análoga al cálculo de la significancia estadística de los estadísticos NMC_{perm} y $AUROC_{perm}$, descrita anteriormente, se calculó un valor p empírico, para cada variable, como la fracción de valores permutados que son tan extremos como el vector de regresión obtenido usando las etiquetas de clase reales (Quintás *et al.*, 2012). Aquellas variables con valores de $p < 0.005$ se clasificaron como metabolitos discriminantes y se retuvieron para el cálculo de un segundo modelo PLSDA. El número de LV del segundo modelo PLSDA se seleccionó mediante CV y se evaluó su capacidad predictiva utilizando el conjunto de muestras del subgrupo de validación no empleado durante la etapa de selección de variables.

■ Software

El PLSDA se llevó a cabo utilizando *PLS Toolbox 8.0* (Eigenvector Research Inc., Wenatchee, USA) en MATLAB (Mathworks Inc., Natick, MA, USA). El SVR se realiza en MATLAB usando la librería LIBSVM (Chang and Lin, 2011). La identificación de metabolitos se realizó emparejando los valores m/z coincidentes con los valores del *Human Metabolome Database*, HMDB, (<http://www.hmdb.ca>) y la base de datos METLIN (<http://metlin.scripps.edu/>) con una tolerancia de 5 ppm. Las fórmulas moleculares fueron estimadas utilizando el software *MassHunter Workstation Software-Qualitative Analysis* (Agilent).

Capítulo 5

Resultados

Análisis descriptivo de variables clínicas

Durante el periodo entre Enero 2012 y Septiembre 2015 se seleccionaron 183 pacientes con diagnóstico de TVNMI que iban a ser intervenidos de RTU vesical en el Hospital Universitario La Fe (Valencia). Tras la RTU vesical y la obtención de la AP de las muestras obtenidas, se confirmaron los criterios de inclusión y exclusión en el estudio, además de la confirmación de la obtención y almacenaje de orina tumoral y control de todos los pacientes en el Biobanco. De esta forma, finalmente se seleccionaron e incluyeron en el estudio a 53 pacientes (46 hombres (86,8%), 7 mujeres (13,2%)), con una edad media de 64 ± 10 años.

Inicialmente, se incluyeron orinas BC de 37 (70%) tumores primarios y de 16 (30%) recidivas. Tras la RTU y AP, se clasificaron los pacientes de acuerdo al grupo de riesgo, según los criterios de EORTC. De esos 53 pacientes, se incluyeron en el grupo de monitorización trimestral a 27 de ellos con riesgo intermedio o alto. En este programa de monitorización se detectaron, en el seguimiento, nuevas recidivas tumorales (14) en 10 pacientes, lo que permitió aumentar el número de muestras de orina BC incluidas en el estudio. En total se recogieron 129 muestras de orina (67 de orina BC, 62 de orina CTRL). Además, se recogió un conjunto de 55 orinas de MNT trimestral.

Los datos clínico-patológicos de los pacientes incluidos en el estudio se detallan en la Tabla 7. En 39 casos (58%) los CaV fueron estadio pTa y en 27 (40%) pT1.

Tabla 7. Variables clínicas de los TVNMI incluidos en este estudio

	CALIBRACIÓN	VALIDACIÓN
Número de casos tumorales	24	43
Tumor		
primario	20	17
recidiva	4	26
Estadio tumoral ^a		
pTa	13	26
pT1	11	16
pTx	0	1
Grado ^b		
I	7	13
II	9	25
III	8	5
Tamaño tumoral		
<3cm	12	27
≥3cm	12	15
desconocido	0	1
Número tumoral		
1	15	20
2-7	9	22
≥8	0	0
desconocido	0	1
Grupo riesgo de recurrencia ^c		
bajo	1	2
intermedio bajo	10	13
intermedio alto	13	20
alto	0	5
desconocido	0	3
Grupo riesgo de progresión ^c		
bajo	2	2
intermedio bajo	10	14
intermedio alto	8	21
alto	4	5
desconocido	0	1

^ade acuerdo con el sistema TNM 2004; ^bde acuerdo con la clasificación de World Health Organization (WHO) de 1973; ^cde acuerdo con la clasificación EORTC

Los tumores presentaron un grado tumoral GI en 20 casos (29,8%), GII en 34 (50,8%) y GIII en 13 (19,4%). En 39 (58,2%) casos los tumores fueron <3cm y en 27 (40,2%) casos \geq 3cm. La mayoría fueron tumores únicos, 35 (52,2%), en 31 casos (46,2%) presentaron de 2 a 7 tumores y ningún paciente presentó 8 o más tumores. Los grupos de riesgo de recidiva y progresión, según la clasificación EORTC, mostraron una mayoría de casos clasificados en los grupos de riesgo intermedios: 23 (34,3%) casos clasificados como riesgo intermedio bajo y 33 (49,2%) como riesgo intermedio alto, según el riesgo de recurrencia, y 24 (35,8%) y 29 (43,3%), respectivamente, según el riesgo de progresión.

Análisis metabolómico

▪ Muestras analizadas

El estudio metabolómico incluyó el análisis de un total de 244 cromatogramas, que incluyeron 129 muestras de orina (67 BC y 62 CTRL) y 55 de MNT. Además, el análisis de las muestras incluyó 45 muestras QC (1 QC cada 5 muestras analizadas) y 3 blancos de muestra para el control de la calidad y corrección de la señal analítica. La variación observada en los valores predichos por los modelos predictivos PLSDA (p.ej. y) para los QCs nos permitió estimar la contribución al error de predicción asociada al error instrumental, tal y como se describe en una sección anterior. Adicionalmente, el estudio incluyó el análisis de un sub-conjunto de muestras por duplicado (12 muestras: 7 BC y 5 CTRL) con el objetivo de estimar la contribución al error de predicción asociada a la etapa de preparación de la muestra.

Calidad de la señal analítica

El control de calidad de la señal analítica es un aspecto fundamental dentro de los estudios metabolómicos. El control de calidad permite mejorar la interpretación de los resultados, al eliminar señales no biológicas o con una baja relación señal ruido, aumentar la potencia estadística de los modelos y, además, mejorar la repetibilidad y la reproducibilidad de los resultados obtenidos, uno de los aspectos que han venido limitando el desarrollo de la metabolómica en la investigación clínica.

En este estudio, la calidad de la señal analítica se aseguró a través del control y medida de los siguientes parámetros: exactitud de masa (m/z), exactitud de la integración automática de la señal, eliminación de señales no informativas, eliminación del efecto *batch*, y eliminación de señales con baja repetibilidad. Además, la inyección de las muestras se aleatorizó para evitar el sesgo del efecto de las derivas del instrumental durante el procesado.

▪ Exactitud de masa (m/z)

La estabilidad y exactitud de la medida de las relaciones masa-carga (m/z) es, evidentemente, uno de los parámetros más básicos a la hora de controlar el rendimiento y la estabilidad de un sistema de MS. Una deriva importante en la exactitud podría introducir un sesgo en el análisis imposible de corregir. De igual forma, una baja exactitud de m/z introduciría un error sistemático en la medida que limitaría, no sólo la reproducibilidad de los resultados, sino también su interpretabilidad, ya que podría fácilmente conducir a identificaciones erróneas de los metabolitos. La figura 11 muestra el error m/z observado en el ión molecular $[M+H]^+$ de un patrón interno adicionado de Cafeína-D₉, en función del orden de inyección. Los resultados indicaron una exactitud de masa adecuada y una estabilidad de la medida

suficiente, sin que se observara ninguna tendencia significativa durante la medida de las muestras de orina. A partir de estos resultados, la variabilidad observada (5 ppm) se seleccionó como tolerancia en el valor de m/z durante el pre-procesado de los datos necesario para el alineamiento y deconvolución de picos cromatográficos.

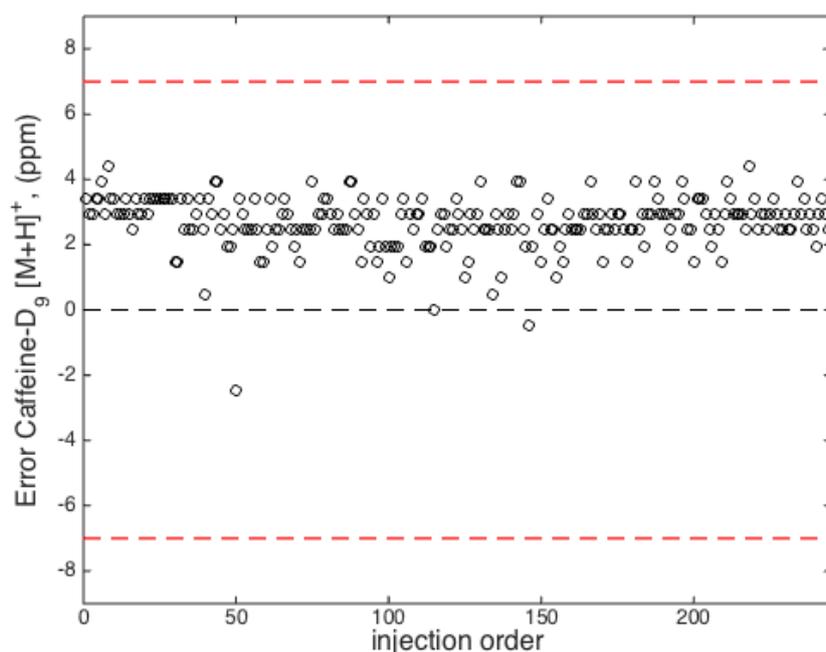


Figura 11. Variación en el valor m/z observado para un patrón interno adicionado (Cafeína- D_9) en función del orden de inyección.

▪ Exactitud de la integración automática de la señal

Como medida adicional para asegurar la exactitud de los datos analizados, se incluyó una etapa de comprobación de la integración automática de la señal cromatográfica llevada a cabo utilizando XCMS. En la figura 12 podemos observar la correlación entre los valores del área de picos de la Fenilalanina- D_5 , Reserpina, Leucina Encefalina y Cafeína- D_9 obtenidas utilizando XCMS para la detección, deconvolución e integración automática y

mediante una integración manual de los picos cromatográficos utilizando el software MassHunter. Los resultados obtenidos confirmaron la idoneidad de los parámetros de integración y alineamiento utilizados en la etapa de la generación de la tabla de picos.

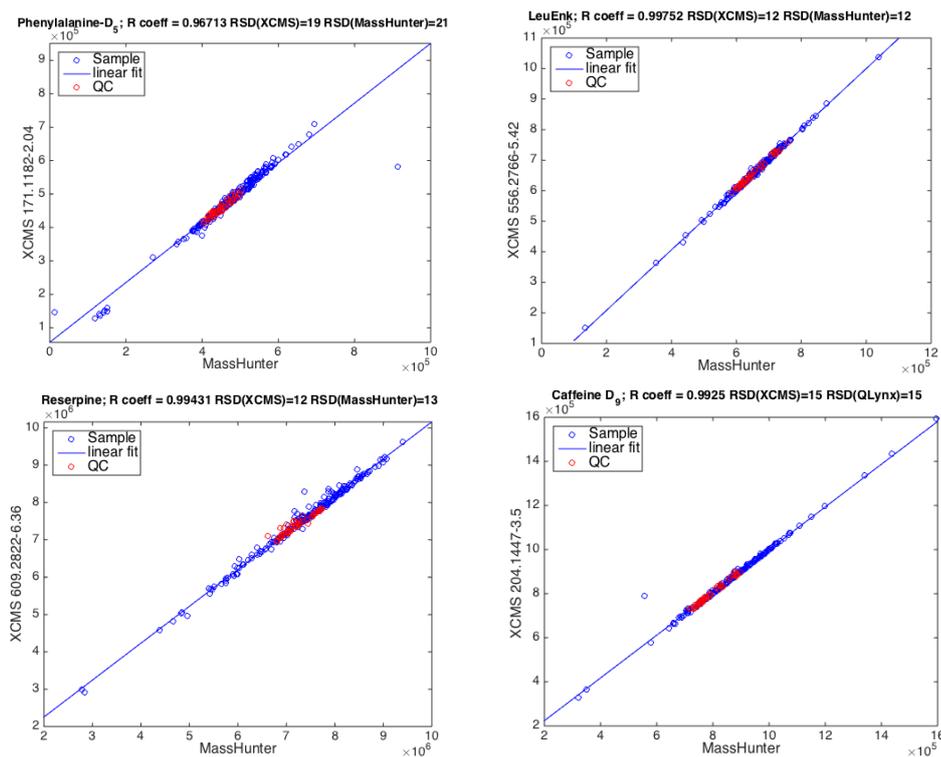


Figura 12. Correlación entre el área de picos de cuatro metabolitos, obtenidos mediante integración manual de la señal y automática utilizando el programa XCMS.

■ Eliminación de señales no informativas

El pre-procesado inicial de los datos LCMS (detección de picos MS, detección de picos cromatográficos, alineamiento, deconvolución y reintegración) permitió la identificación de un total de 14.164 señales en la tabla de picos generadas, identificadas por un valor de m/z y tR (m/z - tR) determinado. La detección mediante MS de alta resolución proporciona unos niveles de sensibilidad muy elevados, lo que permite la detección de un gran

número de metabolitos con una gran variabilidad de propiedades físico-químicas y rangos de concentración. Sin embargo, esta ventaja conlleva habitualmente la detección de un gran número de analitos no biológicos.

Una vez obtenidas las 14.164 señales, se identificó y eliminó un total de 7470 variables detectadas en las muestras de blancos, derivadas de contaminantes, plastificantes o impurezas de los solventes (Figura 13). Posteriormente, con el objetivo de eliminar aquellas señales con una relación señal ruido baja, se calculó la mediana del área de pico en las muestras de QC, BC y CTRL y se redujo la dimensionalidad de la matriz de datos al excluir 3819 variables con valores mediana < 20000 AU en cada uno de los grupos.

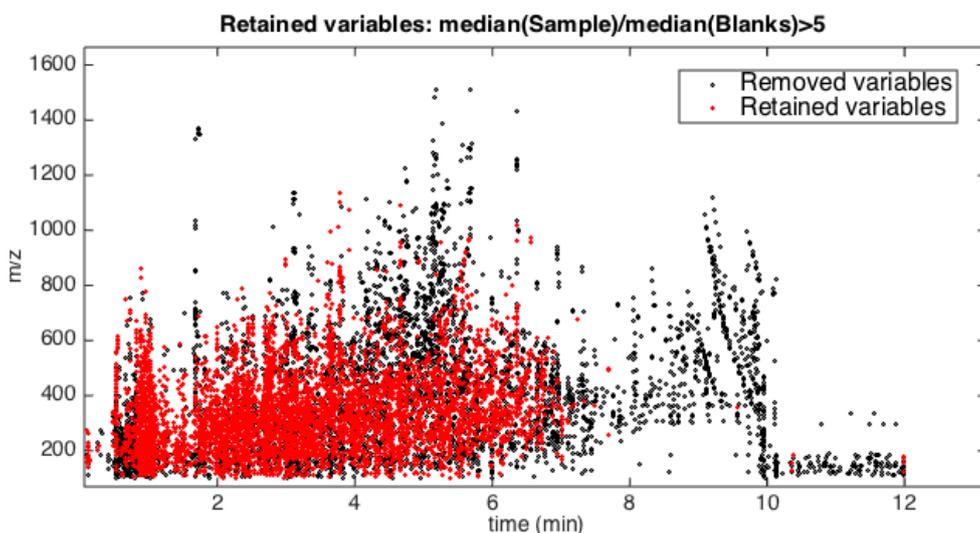


Figura 13. Eliminación de variables no informativas (contaminantes y/o carry-over) a partir del análisis de la señal observada en blancos. Distribución de las variables retenidas (puntos rojos) y eliminadas (puntos negros).

■ Análisis y eliminación del efecto *batch*

Tras la eliminación de variables no informativas debidas a la presencia de contaminantes, *carry over* o por presentar una baja relación señal ruido, se obtuvo una matriz **X** (244 x 2875), donde cada fila representa un cromatograma y cada columna una característica metabólica identificada a partir del *tR* y la relación *m/z*.

• Intensidad del estándar interno (*ISs*)

En la figura 14 se muestran, a modo de ejemplo representativo, los valores del área de pico *ISs* adicionados en función del orden de inyección. A pesar de la elevada exactitud espectral (error *m/z* <5ppm), los valores del área de pico mostraron una significativa tendencia decreciente, indicativa de un efecto instrumental en la medida que podría introducir un sesgo en el análisis y, en cualquier caso, reducir la exactitud de los perfiles metabólicos analizados.

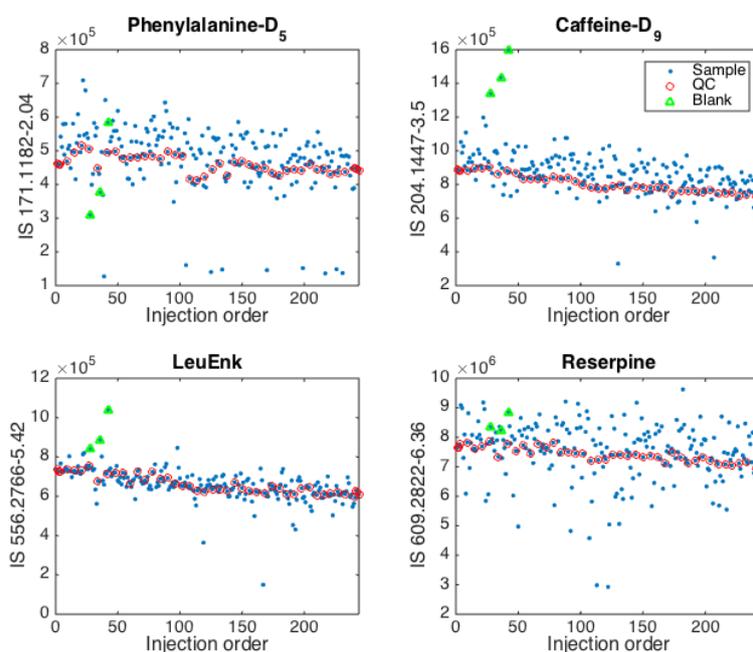


Figura 14. Variación del área de pico cromatográfico de patrones internos adicionados en función del orden de inyección, observada en los datos iniciales antes de la eliminación post-adquisición del efecto *batch*.

- Coeficiente de Variación (*RSD*) en el QC

La Figura 15 muestra las funciones de distribución acumuladas del RSD% para el conjunto de 2875 señales LCMS, calculadas en los QCs y utilizadas para la evaluación de la precisión de la medida, antes y después de la corrección del *efecto batch* mediante QC-SVRC. La efectividad de la corrección se reflejó en el incremento del número de variables con $RSD < 15\%$ desde 2175 a 2522, así como en la disminución del valor mediana del 8.1% a 4.5%. Para mejorar la robustez de los resultados obtenidos, se consideró un valor límite de $RSD(QCs) = 15\%$, eliminando aquellas variables que mostraron una mayor imprecisión.

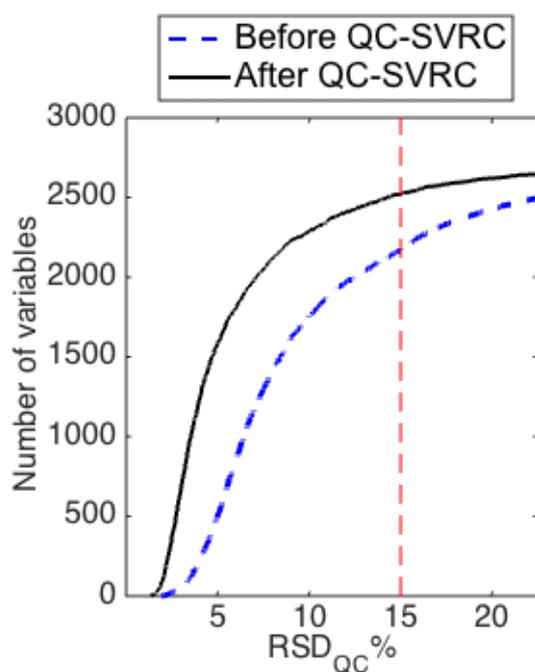


Figura 15 Funciones de distribución acumulada del %RSD en los QCs antes y después del QC-SVRC.

Además, se excluyeron de análisis posteriores 143 variables cuyos valores de mediana en QCs se diferenciaban de la distribución de valores observados en muestras de orina (Kirwan *et al.*, 2014) (Wilcoxon Signed-Rank test, critical p -value = 10^{-16}). De esta manera la matriz de datos finalmente obtenida, incluyó 2379 variables (Figura 16).

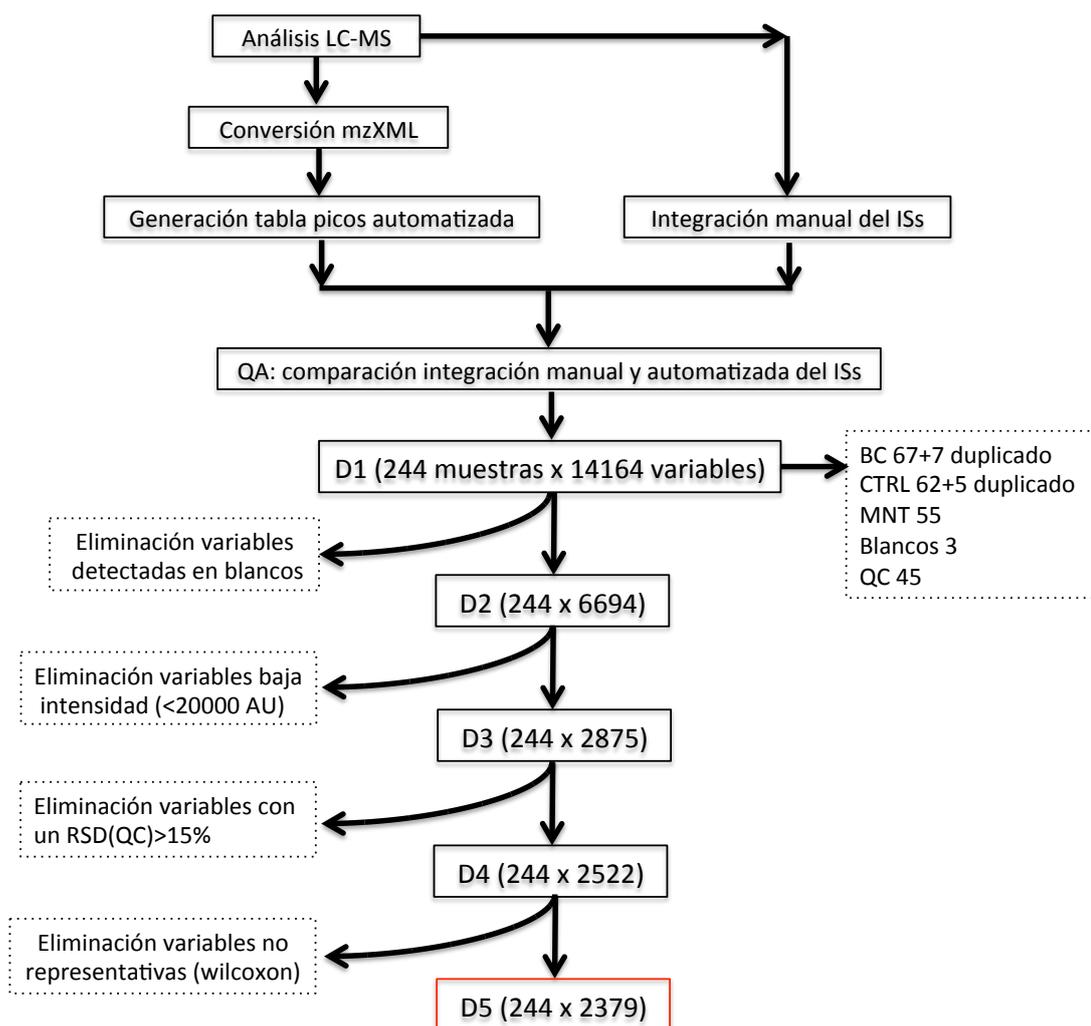


Figura 16. Esquema de eliminación de señales no informativas, con baja relación señal ruido, señales con $RSD(QC) > 15\%$ y no representativas durante la etapa de pretratamiento de los datos.

Análisis discriminante

El análisis discriminante se llevó a cabo para analizar las diferencias entre el perfil metabólico de orinas recogidas en pacientes BC y CTRL. El conjunto de muestras se dividió en dos sub-conjuntos que se emplearon para el desarrollo de un modelo multivariante discriminante (**conjunto de calibración**) y para la evaluación de la capacidad predictiva de dicho modelo en muestras futuras (**conjunto de validación**). El esquema del procedimiento se detalla en la figura 17.

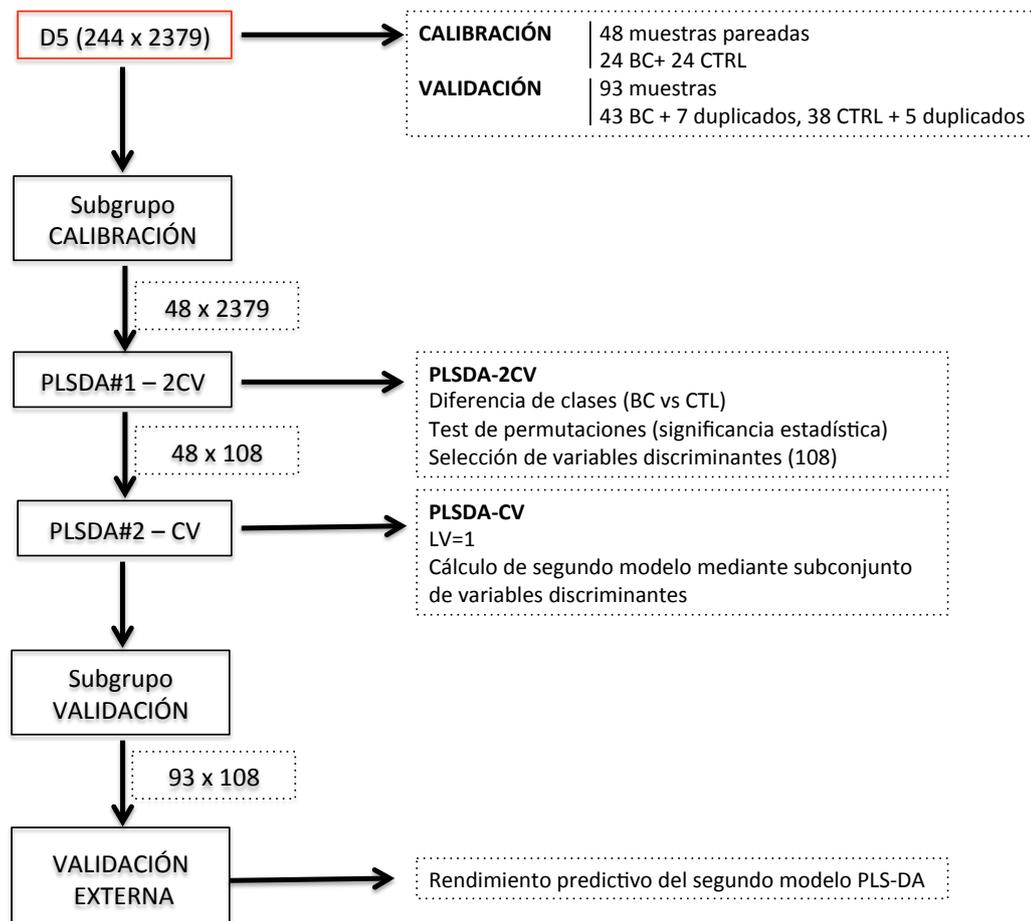


Figura 17. Esquema de análisis para el desarrollo de un modelo con capacidad discriminante entre orinas BC y CTRL

El sub-conjunto de calibración, formado por 24 muestras BC y 24 CTRL pareadas de 24 pacientes seleccionados al azar, se utilizó para el desarrollo del modelo y la selección de variables metabólicas discriminantes. La discriminación entre los grupos BC y CTRL se analizó mediante un modelo PLS-DA, utilizando 2CV y dos estimadores para la evaluación de la capacidad discriminante del modelo: el porcentaje de NMC y el AUROC. La significancia estadística de ambos estimadores se evaluó utilizando un test de permutaciones (1000 permutaciones).

La Tabla 8 muestra las tablas de confusión obtenidas a partir de la predicción de las muestras de los subgrupos de calibración y validación (ver Figura 17). A partir de esos valores se calcularon las figuras de mérito incluidas en la Tabla 9: AUROC, NMC, sensibilidad, selectividad y los valores VPP y VPN

Tabla 8. Tablas de confusión obtenida mediante 2CV para el conjunto de muestras de calibración y validación. Los resultados obtenidos para el conjunto de validación se obtuvieron a partir de un modelo PLSDA utilizando 108 variables previamente identificadas como discriminantes.

	Calibración (2CV)		Validación externa	
	BC	CTRL	BC	CTRL
Clasificado como BC	16	5	36	13
Clasificado como CTRL	8	19	7	25

Los resultados obtenidos, tanto a partir de la 2CV como de la predicción del conjunto de validación, mostraron diferencias significativas entre los perfiles metabólicos de los grupos BC y CTRL (p. ej. NMC = 13, p -valor=0.002), indicando diferencia significativa en el fenotipo metabólico urinario entre ambos grupos. Este modelo PLS-DA presentó un 73% de exactitud diagnóstica, con 16 de 24 muestras de BC pre-RTU correctamente clasificadas y 19 de 24 CTRL post RTU, incluidas en este subgrupo. La

sensibilidad del modelo fue del 67% (IC 95%, 45-88%) y la especificidad del 79% (IC 95%, 58-92%). Teniendo en cuenta la tasa de prevalencia verdadera del subgrupo de muestras utilizado en el desarrollo del modelo, los resultados proporcionaron valores del VPN del 70% (IC 95%, 50-86%) y VPP del 76% (IC 95%, 53-92%). (Tabla 9)

Tabla 9. Índices de los test de validación estimados para la evaluación del rendimiento predictivo del modelo PLS-DA entre muestras BC y CTRL en el conjunto de calibración mediante 2CV (izquierda) y de validación (derecha).

Índices test validación	Calibración (2CV)	Validación externa
	Estimación (IC 95%)	Estimación (IC 95%)
Prevalencia verdadera ^a	50% (35-64)	53% (42-64)
Sensibilidad ^b	67% (45-88)	83% (69-93)
Especificidad ^c	79% (58-92)	66% (49-80)
Valor predictivo positivo ^d	76% (53-92)	73% (64-81)
Valor predictivo negativo ^e	70% (50-86)	78% (64-88)
Exactitud diagnóstica ^f	73% (58-85)	75% (64-84)
Likelihood ratio positivo ^g	3.2 (1.4-7.3)	2.4 (1.5-3.9)
Likelihood ratio negativo ^h	0.42 (0.2-0.8)	0.2 (0.1-0.5)

^a Proporción de población afecta de CaV en la muestra, ^b proporción de verdaderos positivos, ^c proporción de verdaderos negativos ^d número de verdaderos positivos BC pre-RTU en el modelo PLS-DA dividido por el número de muestras testadas positivas, ^e número de verdaderos negativos CTRL post-RTU en modelo PLS-DA dividido por el número de muestras con un test negativo, ^f proporción de predicciones positivas, ^g sensibilidad/(1-especificidad), ^h (1-sensibilidad)/especificidad).

Una vez analizada la significancia estadística del modelo PLS-DA, los modelos PLS-DA generados en el test de permutaciones se utilizaron para la identificación del conjunto de variables más discriminantes. Durante el test de permutaciones se obtuvo un conjunto de 1000 vectores de regresión PLS-DA calculados empleando clases (BC o CTRL) aleatoriamente seleccionadas. Esta distribución nula (H0) se utilizó para el cálculo de un valor *p* asociado a cada variable metabólica, como la fracción de los estadísticos obtenidos en el

test de permutaciones con un valor al menos tan extremo como el encontrado inicialmente en el vector de regresión promedio calculado utilizando las clases reales. Esta estrategia de selección de variables permitió la selección de un conjunto reducido de 108 variables metabólicas altamente discriminantes (valores $p < 0.05$). Este subconjunto de variables se utilizó para el desarrollo y optimización de un segundo modelo PLS-DA siguiendo una estrategia CV.

- **Selección variables metabólicas discriminantes y validación externa.**

En el conjunto de validación se incluyeron 93 cromatogramas obtenidos a partir del análisis de 81 muestras recogidas de 29 pacientes (43 BC y 38 CTRL) y 12 réplicas (7 BC y 5 CTRL) para la estimación del error instrumental y de preparación de la muestra.

El rendimiento predictivo del segundo modelo PLS-DA, usando el conjunto de las 108 variables seleccionadas como discriminantes, se evaluó utilizando el conjunto de muestras de validación. Este conjunto de validación externa, como se ha descrito en un apartado anterior, no se utilizó en las etapas de optimización del modelo, selección de variables discriminantes o escalado de los datos.

La Figura 18 muestra los valores y predichos para las muestras de los conjuntos de calibración y validación utilizando un modelo PLS-DA construido con el modelo de 108 variables metabólicas. Los resultados encontrados en esta fase de validación estuvieron de acuerdo con la discriminación observada previamente entre las muestras BC y CTRL durante el desarrollo del modelo.

A partir de los resultados obtenidos utilizando el modelo construido con el subgrupo de 108 variables, se calculó una tabla de confusión para el conjunto de 81 muestras incluidas en el conjunto de validación (Tabla 8).

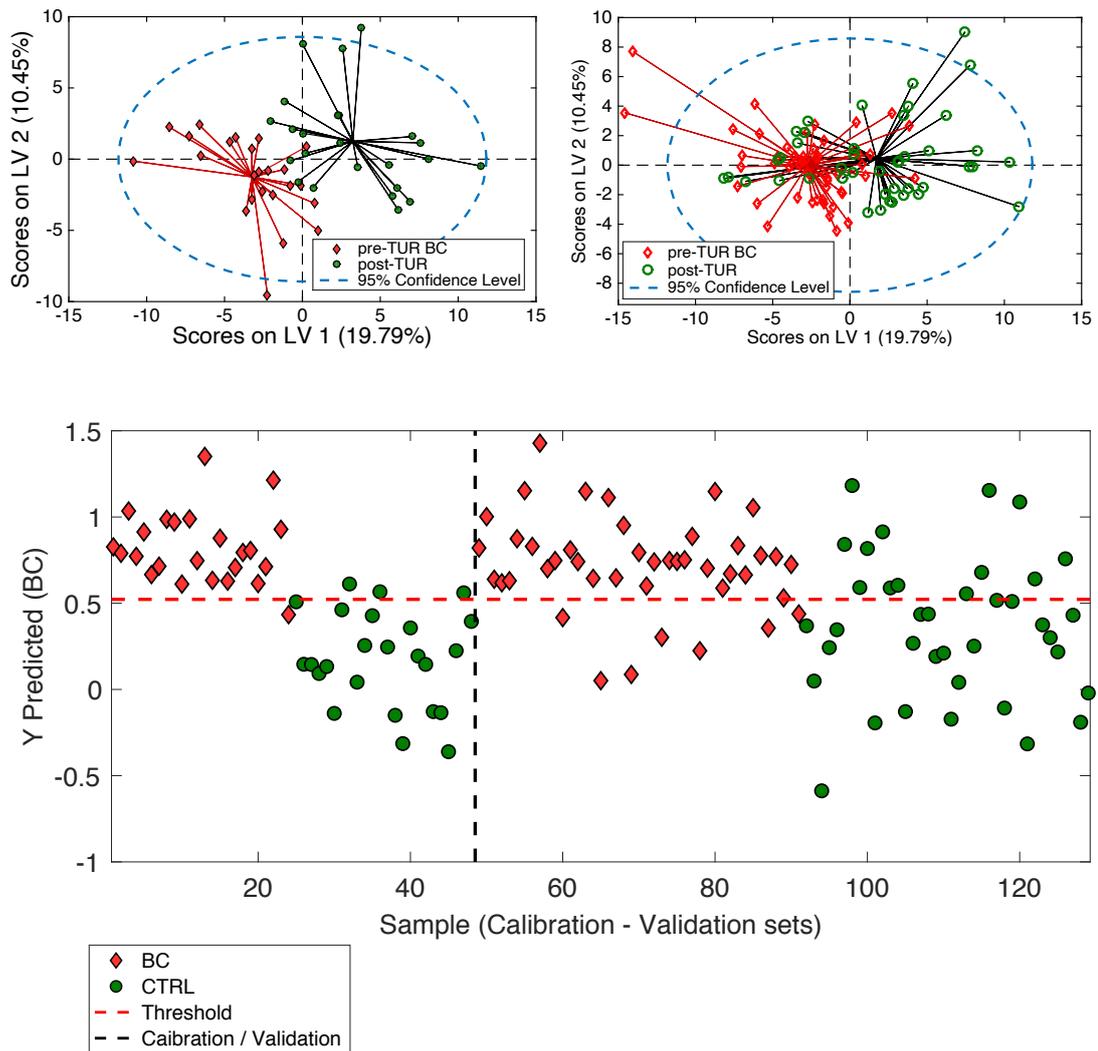


Figura 18. Valores calculados para las muestras de calibración y validación utilizando un modelo PLS-DA y 108 variables metabólicas seleccionadas. Arriba; PLS-SA scores de las muestras de calibración (izquierda) y validación (derecha). Abajo, valores y predichos para las muestras de calibración (izquierda) y validación (derecha).

Este modelo PLS-DA permitió clasificar correctamente 36 de las 43 muestras BC pre-RTU y a 25 de las 38 CTRL post-RTU. El modelo mostró un 75% de exactitud diagnóstica y un valor AUROC estimado de 0.77 en los grupos de muestras BC y CTRL (Figura 19). Considerando una tasa de prevalencia del 53%, el valor estimado de sensibilidad fue del 83% (IC 95%,

69-93%) y el de especificidad del 66% (IC 95%, 49-80%), mientras que el VPN estimado fue del 78% (IC 95%, 64-88%) y el VPP de 73% (IC 95%, 64-81%) (Tabla 9).

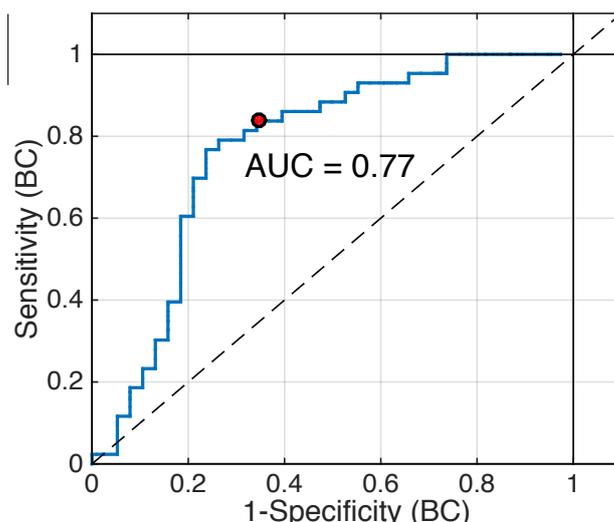


Figura 19. Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) calculada para el conjunto de muestras de validación externa a partir de las clases predichas por el modelo PLS-DA (p.ej. BC, CTRL) usando 108 características metabólicas seleccionadas y 1 LV.

Cuando analizamos las muestras NMC observamos que 5 de las 7 muestras de validación (71.4%) clasificadas por el modelo como FN (muestras BC clasificados como CTRL) correspondían a tumores de baja agresividad (pTaG1-2), de pequeño tamaño (1cm) y en número de 1 o 2 tumores.

Posteriormente, realizamos un análisis de validación incluyendo solo muestras de riesgo intermedio o alto riesgo. El modelo mostró una sensibilidad de 87% (IC 95%, 72-96), una especificidad de 67% (IC 95%, 49-81%), un VPN 83% (IC 95%, 67-92%) y un VPP 74% (IC 95%, 64-82%) (Tabla 10).

Tabla 10. Índices del test de validación para la evaluación del modelo predictivo PLS-DA entre muestras BC pre-RTU y CTRL post-RTU del subgrupo de validación incluyendo solo muestras del grupo de riesgo intermedio y alto, mediante el modelo PLS-DA calculado utilizando 108 variables discriminantes y 1 LV.

Índices test validación	Validación externa
	Estimación (IC 95%)
Prevalencia verdadera ^a	52% (40-64)
Sensibilidad ^b	87% (72-96)
Especificidad ^c	67% (49-81)
Valor predictivo positivo ^d	74% (64-82)
Valor predictivo negativo ^e	83% (67-92)
Exactitud diagnóstica ^f	77% (66-86)
Likelihood ratio positivo ^g	2.6 (1.6-4.2)
Likelihood ratio negativo ^h	0.2 (0.1-0.4)

La identificación de las variables con un mayor poder discriminante en el modelo PLS-DA tuvo como objetivo reducir la dimensionalidad del modelo, mejorar su interpretabilidad y, al mismo tiempo, incrementar su robustez al eliminar la contribución de variables metabólicas no asociadas a la diferencia entre clases descrita por el modelo discriminante. El proceso de selección de variables se basó en el cálculo del *Variable Importance in Projection (VIP)* (Chong and Jun, 2005). El *VIP score* de una variable se calcula como la suma ponderada de las correlaciones cuadradas entre los componentes del modelo PLS-DA y la variable original. Los pesos utilizados para la ponderación corresponden con el porcentaje de varianza explicada por cada componente en el modelo PLS-DA.

Para la identificación de las variables más discriminantes se utilizó un valor mínimo $VIP=1$ en el modelo PLS calculado utilizando 108 variables seleccionadas anteriormente. La Figura 20 muestra los valores VIP y del vector de regresión del modelo PLS, así como la distribución de las variables metabólicas en el cromatograma. La identificación de los metabolitos seleccionados se resume en la tabla 11.

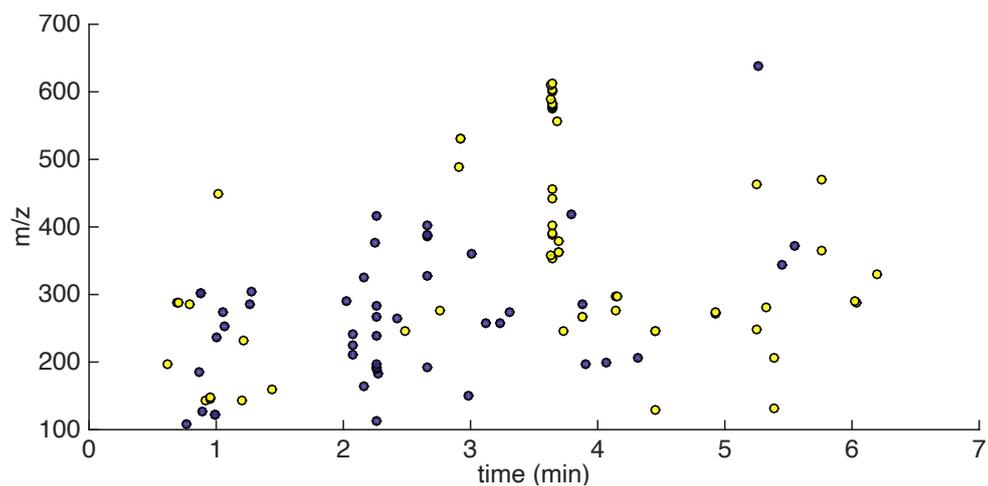
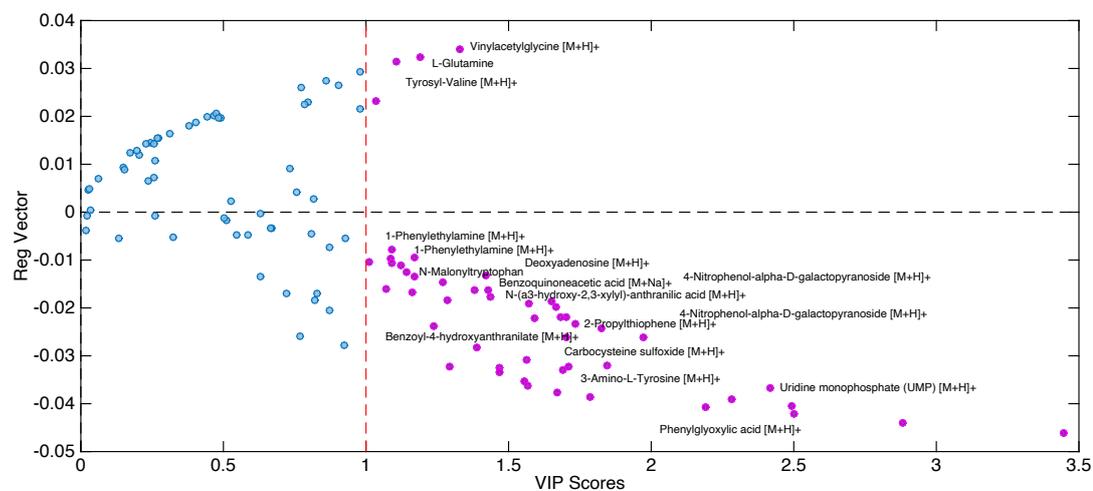


Figura 20. Representación del valor en el vector de regresión PLS en función del VIP score (arriba) y distribución en el cromatograma, para las 108 variables seleccionadas como discriminantes (VIP>1).

Tabla 11. Identificación putativa de variables seleccionadas como discriminantes mediante PLS-DA.

VIP rank	Mol Fmla	Putative ID (<i>m/z</i>)
3	[C5H10NO5S] ⁺	Carbocysteine sulfoxide [M+H] ⁺
9	[C14H12NO4] ⁺	Benzoyl-4-hydroxyanthranilate [M+H] ⁺
11	[C10H14N5O3] ⁺	Deoxyadenosine [M+H] ⁺
12	[C14H15N2O5] ⁺	N-Malonyltryptophan
13	[C12H16NO8] ⁺	4-Nitrophenol-alpha-D-galactopyranoside [M+H] ⁺
16	[C12H16NO8] ⁺	4-Nitrophenol-alpha-D-galactopyranoside [M+H] ⁺
19	[C15H16NO3] ⁺	N-(α 3-hydroxy-2,3-xylyl)-anthranilic acid [M+H] ⁺
21	[C8H6O4Na] ⁺	Benzoquinoneacetic acid [M+Na] ⁺
22	[C8H12N] ⁺	1-Phenylethylamine [M+H] ⁺
35	[C8H12N] ⁺	1-Phenylethylamine [M+H] ⁺
48	[C7H11S] ⁺	2-Propylthiophene [M+H] ⁺
53	[C9H13N2O3] ⁺	3-Amino-L-Tyrosine [M+H] ⁺
54	[C11H12NO] ⁺	5-Methoxyindoleacetate [M+H] ⁺
61	[C5H11N2O3] ⁺	L-Glutamine
65	[C10H10NO] ⁺	1-Acetylintole [M+H] ⁺
70	[C7H10N] ⁺	N-Methyl-aniline
72	[C15H30NO4] ⁺	Carnitine (8:0)
77	[C19H28NO] ⁺	1-Methyl-2-nonyl-4 (1H)-quinolinone [M+H] ⁺
79	[C5H11N2O3] ⁺	L-Glutamine
85	[C15H30NO4] ⁺	Carnitine(8:0)
90	[C16H21O2] ⁺	FA(14:3) 6E,8E,12E-Hexadecatrien-10-ynoic acid [M+H] ⁺
91	[C14H27N2O4] ⁺	N-Acetyl-leucyl-leucine [M+H] ⁺
94	[C14H27N2O4] ⁺	N-Acetyl-leucyl-leucine [M+H] ⁺ isotope
99	[C16H21O2] ⁺	FA(14:3) 6E,8E,12E-Hexadecatrien-10-ynoic acid [M+H] ⁺
102	[C5H9N2O2] ⁺	Hydrouracil [M+H] ⁺

■ Control de fuentes de error sistemático

Durante la etapa inicial de diseño del estudio se identificó una serie de posibles fuentes de error asociadas a las etapas de recogida, preparación y análisis de las muestras:

- Recogida de muestra. Una primera fuente de error se asoció al proceso de recogida y almacenamiento de la muestra, ya que cualquier tipo de sesgo o error sistemático en esta etapa se mantiene en los análisis sucesivos, reduciendo la generalizabilidad de los resultados obtenidos en los modelos estadísticos generados. Para minimizar y controlar esta fuente de error se desarrolló y aplicó un único protocolo de recogida y almacenamiento de muestras a lo largo del estudio.
- Preparación de muestras. Al igual que la recogida, el control de las condiciones de preparación de las muestras es fundamental para asegurar la reproducibilidad de los resultados obtenidos. Esta fuente de variación se controló trabajando en condiciones de repetibilidad (un único laboratorio, equipo, y sesión de análisis) y siguiendo un estricto protocolo de preparación de la muestra.
- Análisis de muestras. La etapa de análisis cromatográfico de las muestras recogidas presenta, a su vez, una potencial fuente de error sistemático asociado a la variación de la respuesta instrumental a lo largo de la medida de un conjunto de muestras elevado (*batch effect*). Para eliminar esta contribución, el diseño del estudio contó con el análisis de muestras QC repetido a lo largo de la secuencia de análisis. El análisis de la variabilidad observada en estas muestras permitió el desarrollo de modelos SVR específicos para cada variable metabolómica, adecuados para la corrección de los cambios en la respuesta instrumental.

Con el objetivo de cuantificar la repetibilidad alcanzada, este estudio incluyó en el análisis de un conjunto reducido de 12 muestras por duplicado.

Los perfiles metabolómicos obtenidos a partir del análisis de estas réplicas nos permitieron estimar la contribución al error de predicción asociada a la etapa de preparación y análisis de la muestra. El resultado alcanzado indicó un error relativo del 14% (estimado como coeficiente de variación sobre los valores medios de las réplicas analizadas) (ver Figura 21). Por otra parte, la variación observada en los valores y estimados para el conjunto de QCs analizadas, nos permitieron estimar la contribución al error de predicción asociada al error instrumental estimado como el 4% (Kuligowski et al., 2016). Ambos estimadores indicaron una excelente repetibilidad en las condiciones de preparación de la muestra y una elevada exactitud en el proceso de análisis y posterior corrección de los datos analíticos.

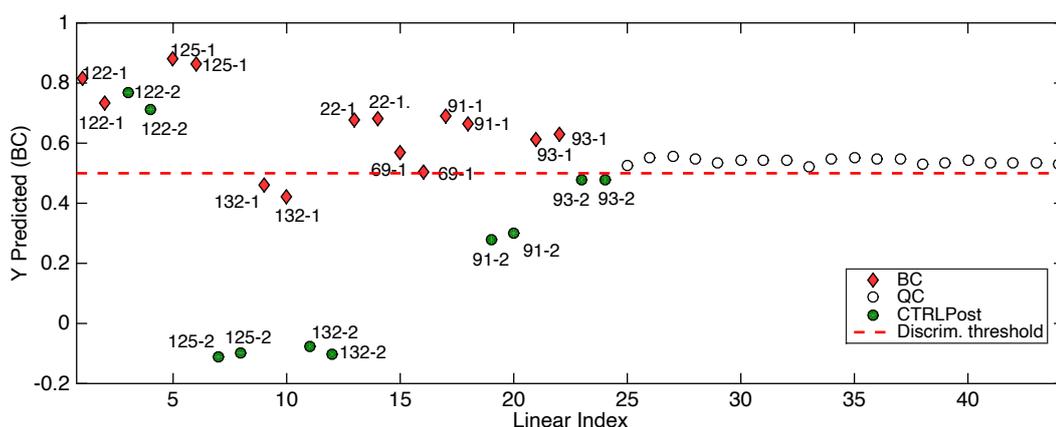


Figura 21. Predicción de las réplicas para la estimación del error del instrumental y de la preparación de las muestras.

Capítulo 6

Discusión

El CaV tiene una gran relevancia epidemiológica, económica y clínica. Aún con limitaciones, las herramientas de diagnóstico y seguimiento continúan siendo la cistoscopia y la citología. La primera es una técnica invasiva y la segunda tiene alta especificidad pero su sensibilidad es muy limitada en los tumores de bajo riesgo.

Por este motivo, existe una necesidad de identificación de nuevos bioM que sean altamente sensibles y específicos. Su objetivo clínico es disminuir cistoscopias, reducir su morbilidad y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

A pesar de que existen diferentes bioM proteómicos y genómicos que han mostrado una mayor sensibilidad que la citología, su limitada especificidad no ha permitido su aplicación clínica.

En contraste con la genómica y la proteómica, la metabolómica muestra las alteraciones genómicas e interacciones entre diferentes niveles *ómicos* (p.ej. genoma-proteoma). Además, refleja el estado fenotípico de un organismo de forma dinámica y ofrece una aproximación a los procesos finales de la cascada biológica (Lindon and Holmes, 2007). La mejoría en las técnicas de análisis metabolómicos de EM y RMN ha facilitado la identificación de perfiles metabólicos asociados con la reprogramación metabólica de células tumorales en una variedad de cánceres (Kami *et al.*, 2013).

El CaV presenta unas características particulares que han impulsado la investigación en la identificación de un perfil metabólico asociado al proceso tumoral, ya que la obtención de muestras de orina para su análisis no es

invasiva y el hecho de que la orina se encuentra en contacto directo con el tumor podría introducir alteraciones significativas en el metaboloma urinario de estos pacientes (Zhang *et al.*, 2012).

Los estudios que, hasta el momento, han sido diseñados para identificar bioM metabolómicos de diagnóstico del CaV han utilizado como grupo control tanto cohortes de voluntarios sanos (Srivastava *et al.*, 2010) como pacientes que presentan hematuria por diferentes causas (Putluri *et al.*, 2011; Pasikanti *et al.*, 2013) o pacientes de CaV en diferentes estados de la enfermedad y grupos de riesgo (Jin *et al.*, 2014). Sin embargo, el diseño de estos estudios no es óptimo para la identificación de un bioM de monitorización de progresión de enfermedad.

En el diseño de nuestra investigación, planteamos el análisis metabólico de muestras de orina de pacientes con TVNMI antes de la RTU del tumor y un mes después de la cirugía. De esta manera, en lugar de utilizar pacientes sanos como controles, este diseño permite establecer un nivel basal del metaboloma para cada paciente y analizar el cambio respecto a dicho nivel asociado al efecto del tratamiento, de manera que cada paciente actúa como su propio control.

El CaV es un tumor panurotelial donde, en un mismo paciente, pueden desarrollarse múltiples tumores sincrónicos y metacrónicos, lo que justifica el diseño de esta tesis. Esta particularidad es debida a que todo el urotelio se expone de forma uniforme a los carcinógenos, de manera que se producen alteraciones genéticas y epigenéticas independientes en muchas células del urotelio alejadas predisponiéndolas a una eventual transformación oncogénica. Los defectos en estas áreas pueden preceder a los cambios histopatológicos y, por tanto, al tumor macroscópicamente visible (Han, Wolff and Liang, 2012). De hecho, se ha observado que áreas de mucosa vesical aparentemente normal en la cistoscopia y lesiones pre-neoplásicas imperceptibles, como la hiperplasia o la displasia, ya presentan alteraciones moleculares que están presentes también en el tejido tumoral (M A Knowles

and Hurst, 2015). En este contexto, estudios previos han demostrado que diferentes marcadores urinarios pueden ser positivos, precediendo a la detección del tumor mediante cistoscopia, reafirmando que existen cambios premalignos detectables que no son macroscópicamente visibles (Todenhöfer *et al.*, 2015b). Muy probablemente existen alteraciones metabólicas al diagnóstico que no se normalizan tras la resección del tumor macroscópico, y que, por tanto, no estarían presentes en el perfil metabolómico de un paciente sano. Por este motivo, el perfil metabolómico de un paciente debería ser representativo no solo del tumor macroscópico al diagnóstico sino de todo su urotelio.

Además, tenemos que tener en cuenta que un tumor con la misma histología, estadio y grado puede presentar variaciones moleculares diferentes en cada paciente. Dicha heterogeneidad intertumoral podría explicar que tumores vesicales en pacientes distintos pudieran ser diferentes a nivel metabólico, apoyando la teoría de la existencia de un perfil metabólico individual para cada paciente (Gerlinger *et al.*, 2015). En consecuencia, el diseño de nuestra investigación, con recogida de muestras de orina BC (pre-RTU) y CTRL (post-RTU) de cada paciente, tiene como objetivo mejorar la capacidad analítica para la identificación de una huella metabólica tumoral individual asociada al tumor macroscópicamente visible en cada paciente.

La sistematización en el procedimiento de recogida y tratamiento de las muestras de orina durante el estudio ha permitido reducir la variabilidad aleatoria y controlar fuentes de error sistemático que pudieran introducir un sesgo en los resultados del análisis metabolómico. A pesar de ello, pueden existir variables de confusión dependientes de las condiciones del paciente en el momento de la recogida que podrían modificar el efecto observado. Entre estos potenciales factores de confusión se encuentra la necesidad de sondaje en tiempo prolongado tras la cirugía, la administración de QT endovesical precoz tras la RTU, posibles cambios en la alimentación o medicación del paciente durante el proceso. Sin embargo, la recogida

longitudinal de muestras de un mismo paciente durante el seguimiento reduce el efecto de estos posibles factores de confusión en los resultados presentados.

Durante el proceso de análisis metabolómico existen diferentes fuentes de error, tanto sistemático como aleatorio. El empleo de un único protocolo para la recogida, almacenamiento, pre-procesado y análisis de las muestras de orina reduce la posibilidad de introducir un error instrumental sistemático asociado a estas etapas. Por otra parte, las muestras se analizaron siguiendo un orden aleatorio para eliminar errores sistemáticos derivados de cambios en la respuesta instrumental durante la medida y, adicionalmente, se incluyó una etapa de post-procesado de los datos para corregir esta deriva mediante el empleo de QCs.

La enorme variabilidad en las propiedades físico-químicas e intervalos de concentración que presenta el metaboloma hace imposible su detección utilizando una única plataforma o método de análisis. Sin embargo, la técnica seleccionada en nuestro estudio (UPLC-ESI-TOFMS), permite alcanzar niveles muy elevados de sensibilidad y especificidad adecuados para minimizar, en lo posible, esta limitación. No obstante, sería deseable que futuros estudios extendieran estos análisis a otras técnicas (p. ej. RMN) y modos de análisis (p. ej. ionización ESI negativa, cromatografía HILIC).

Los resultados alcanzados en nuestro estudio, utilizando una aproximación metabolómica no dirigida, han permitido demostrar una huella metabolómica urinaria con capacidad diagnóstica del CaV. El análisis demostró diferencias en el patrón metabolómico de los pacientes antes (BC) y después (CTRL) de la RTU del tumor vesical y, por tanto, que estos cambios están asociados fundamentalmente a la eliminación del tumor macroscópico.

La determinación de una huella metabólica asociada a la presencia de tumor macroscópico podría utilizarse potencialmente como un bioM de monitorización de la recurrencia. Las recurrencias macroscópicas detectadas por cistoscopia son factibles de ser tratadas mediante RTU. Si bien, pueden

existir cambios metabólicos de lesiones pre-neoplásicas invisibles durante la cistoscopia.

Según las guías clínicas editadas por *International Bladder Cancer Network*, un buen bioM de diagnóstico, útil en el *screening* y diagnóstico diferencial de la hematuria, precisa de una baja tasa de FP mientras que un buen bioM de monitorización, de seguimiento del paciente, debería presentar una alta sensibilidad y VPN (Goebell, Groshen and Schmitz-Dräger, 2008). La alta sensibilidad va a ser esencial para la detección de la recurrencia, sobre todo en aquellos casos en los que la citología presenta limitaciones, como es el caso de los tumores de bajo grado. El alto VPN es fundamental para poder reducir el número de cistoscopias en el programa de seguimiento.

En nuestros resultados, la huella metabólica de CaV seleccionada demuestra un buen rendimiento en la fase de validación, alcanzando cifras de sensibilidad del 83% (IC 95%, 69-93%) así como un VPN estimado del 78% (IC 95%, 64-88%) y un VPP del 73% (IC 95%, 64-81%). Este resultado sugiere la posibilidad de una futura reducción de la frecuencia de cistoscopias en estos pacientes, si presentaran resultados negativos persistentes, con consecuencias clínicas limitadas. En el grupo de alto riesgo, el VPN global fue del 83%, por lo que sería necesario la realización de la cistoscopia, para descartar la presencia de tumor, y la combinación con otros bioM (citología) para aumentar el rendimiento.

Nuestros resultados apoyan la continuación de esta línea de investigación para la validación de los resultados obtenidos. Para ello, sería deseable que futuros estudios tuvieran como objetivo la identificación de los metabolitos discriminantes seleccionados, el desarrollo y validación de métodos analíticos para su cuantificación y la confirmación de que los cambios observados son secundarios al tumor y válidos para determinar el estado tumoral, en la práctica clínica, durante la monitorización tras la realización de la RTU. Además, los resultados obtenidos servirían de base

para extensión de estos análisis a otras técnicas (p. ej. RMN) y modos de análisis dirigidos al análisis de rutas metabólicas predeterminadas.

La relevancia y la utilidad clínica de estos hallazgos podrá ser validada en un futuro próximo mediante el análisis metabolómico de tejidos recogidos en este estudio y de muestras de orina recogidas de forma prospectiva, durante el programa de monitorización de los pacientes a partir del primer mes tras la RTU, lo que permitirá correlacionar el resultado de cada muestra de orina con el estatus clínico del paciente. La determinación y cuantificación de la capacidad diagnóstica del bioM metabolómico, permitiría su comparación con resultados de citología como marcador diagnóstico y de monitorización de la recidiva, para así poder determinar su utilidad y relevancia clínica. Además, los resultados del estudio de estas orinas de monitorización, podrán ofrecernos información adicional que facilitaran esquemas de vigilancia mediante cistoscopia personalizados para cada paciente. Los estudios de validación permitirían la identificación y evaluación de posibles factores de confusión que pudieran modificar el perfil metabolómico de las muestras de orina de CaV.

En cuanto a la identificación de los metabolitos discriminantes, diferentes estudios metabolómicos en tejido y plasma de pacientes con CaV han demostrado alteraciones en vías metabólicas distintivas del CaV, incluyendo alteraciones en el metabolismo de la energía (glicolisis, ciclo ácido tricarboxílico, β -oxidación de ácidos grasos y metabolismo de los aminoácidos), formación de membranas (metabolismo glicerofosfolípido) y síntesis de ADN y proteínas (Putluri *et al.*, 2011; Cao *et al.*, 2012; Tripathi *et al.*, 2013).

Los primeros estudios metabolómicos *in vitro* de líneas celulares tumorales de CaV, pudieron demostrar concentraciones elevadas de niveles de glutatión. Esta alteración reflejaría la sobreexpresión de enzimas antioxidantes cruciales para la supervivencia celular tumoral bajo condiciones de estrés (Pendyala *et al.*, 1997), aunque no sería específica del

CaV. También se pudieron observar alteraciones en la glicólisis, con un aumento del lactato y una disminución del piruvato y la glucosa, que permitirían cubrir las necesidades energéticas de la célula tumoral, y la sobrerregulación de la síntesis de aminoácidos, esenciales para la síntesis de nucleótidos (Pasikanti, Norasmara, *et al.*, 2010; Dettmer *et al.*, 2013; Conde *et al.*, 2015).

Uno de los primeros estudios metabolómicos en biofluidos fue realizado mediante ^1H -RMN, comparando orina de pacientes con CaV y controles sanos o con patología benigna (ITU/litiasis vesical). En este estudio, se pudo identificar una elevación de la concentración de taurina en la orina de pacientes con CaV, así como una disminución de los niveles de citrato, fenilalanina y ácido hipúrico, proponiendo la taurina como bioM diagnóstico de CaV (Srivastava *et al.*, 2010). Sin embargo, no se pudo diferenciar los estadios tumorales. Estos hallazgos fueron similares a los encontrados por Gamagedara *et al.*, utilizando un método cuantitativo LC-MS (Gamagedara, Shi and Ma, 2012). La taurina es un aminoácido con un papel importante en la protección del daño celular ante radicales libres o hipoxia, actuando como agente antioxidante, y en la disminución de la respuesta inmune, reduciendo la producción de citoquinas pro-inflamatorias, facilitando así el desarrollo tumoral (Shi *et al.*, 2016).

Posteriormente, Pasikanti *et al.*, demostraron al comparar perfiles urinarios de pacientes con CaV y orina de controles sanos, una alteración significativa del metabolismo del triptófano (disminución de los niveles del triptófano y elevación del nivel de ácido kinurénico) sugiriendo un papel importante de metabolitos de esta vía, como la kinurenina, en el desarrollo del CaV (Pasikanti *et al.* 2013). Recientemente, estudios en suero de pacientes con CaV mediante LC-MS han descrito una elevación de los niveles de cuatro metabolitos de esta vía (kinurenina, acetyl-N-formyl-5-metoxikinurenina, ácido indoleacético y ácido indoleláctico) (Tan *et al.*, 2017). Los metabolitos de esta vía del triptófano estarían implicados en la

supervivencia de las células tumorales mediante la supresión de la respuesta inmune antitumoral modulada por las células T inmunitarias (Opitz *et al.*, 2011).

Varios estudios han demostrado también niveles elevados de carnitina y acetil coenzima A (acetil-coA) en la orina de pacientes con CaV. La carnitina es un metabolito esencial en el transporte de ácidos grasos de cadena larga dentro de la mitocondria y en la regulación del equilibrio intramitocondrial de acetil-coA y coA libre. El acetil-coA es un producto final de la β oxidación. Niveles elevados de estos dos metabolitos podrían estar asociados a una desregulación de la β oxidación de los ácidos grasos como soporte de la rápida proliferación de las células tumorales (Putluri *et al.*, 2011; Alberice *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2014; Wittmann *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2015). Además, se han descrito niveles de carnitina más elevados en los TVMI que en los TVNMI lo que sugiere una correlación entre estos niveles y la agresividad del tumor, que facilitaría la distinción de grados tumorales (Jin *et al.*, 2014).

Así mismo, se ha observado una alteración en las vías metabólicas de la purina y pirimidina, reflejadas en niveles aumentados en orina de uridina e hipoxantina y disminuidos de ácidos úrico y ureidosuccinico (Alberice *et al.*, 2013; Pasikanti *et al.*, 2013; Shen *et al.*, 2015). Estas alteraciones, reflejarían un incremento en la síntesis de DNA asociado a un aumento de la actividad del ciclo celular en el tumor (Chan *et al.*, 2015).

En cuanto al metabolismo de aminoácidos, varios estudios demuestran una elevación de aminoácidos, tanto esenciales (Leucina, Valina, Fenilalanina) como no esenciales (Histamina, Serina, Glutamina), en orina de pacientes con CaV (Pasikanti, Esuvaranathan, *et al.*, 2010; Putluri *et al.*, 2011; Alberice *et al.*, 2013). El aumento de estos aminoácidos sería consecuencia del catabolismo protéico sistémico, de la degradación de la matriz extracelular del microambiente tumoral y de la síntesis *de novo*; y van a ser fundamentales para la proliferación celular y como sustrato metabólico (Cheng *et al.*, 2015).

Respecto al metabolismo glicerofosfolípido, estudios en tejido demuestran una elevación de la colina y/o de componentes que contienen colina (Tripathi *et al.*, 2013), mientras que estudios en plasma y orina han mostrado una disminución de estos metabolitos en biofluidos (Huang *et al.*, 2011; Cao *et al.*, 2012). Estos hallazgos, sugieren tanto una acumulación como un exceso de consumo por la rápida formación de membranas celulares, ya que la colina es un importante precursor de los constituyentes de esta membrana (Bansal *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2016).

Los resultados de estos estudios en biofluidos apoyan la idea de la existencia de un perfil metabólico discriminante del CaV y la posibilidad del desarrollo de nuevos bioM urinarios no invasivos basados en estos cambios. Sin embargo, la mayoría de estos estudios presentan limitaciones por el pequeño tamaño y heterogeneidad de sus cohortes (incluyendo TVNMI y TVMI), la falta de validación externa, de validación del método analítico y la posible afectación por factores de confusión (p. ej. edad, sexo, estilo de vida, medicación, cirugía) (Rodrigues *et al.*, 2016). Recientemente el grupo de Putluri y colaboradores han identificado diferencias en las alteraciones metabólicas del suero de pacientes con CaV de origen Africano-Americano comparado con los Europeo-Americano, lo que demuestra una influencia étnica en la regulación metabólica de los tumores (Vantaku *et al.*, 2019). El sexo y la edad son factores de confusión que influyen en la variación interindividual. Por ejemplo, los niveles elevados de acil-carnitinas en sexo masculino reflejarían una mayor producción de energía y del metabolismo de los ácidos grasos, y los altos niveles del metabolismo del citrato en la orina de mujeres serían secundarios al control estrogénico. Con la edad, existe un aumento en la degradación de aminoácidos y de oxidación que contribuyen a cambios en las rutas metabólicas (Liu *et al.*, 2018).

Un buen bioM de diagnóstico no sólo tiene que ser capaz de detectar el CaV, si no que debería ser capaz de identificar los diferentes perfiles metabólicos según los grados y estadios del tumor, dado que los resultados

sugieren que los tumores más avanzados presentan perfiles metabólicos diferentes (Jin *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2016).

Es más, un buen bioM tendrá que tener en cuenta la heterogeneidad metabólica intratumoral (HIT). Esta puede ser secundaria a mutaciones adicionales en el proceso expansivo del cáncer, conllevando una HIT entre las células del mismo tumor, pero también puede ser secundaria a los diferentes estados funcionales de las células tumorales y la heterogeneidad del microambiente tumoral (Gerlinger *et al.*, 2015). Las diferentes subpoblaciones de células cancerosas van a adoptar perfiles metabólicos diferentes, dependiendo de su localización intratumoral, para mantener su estado bioenergético (Lehuédé *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta el papel fundamental que representa la angiogénesis en el crecimiento y adaptación a la hipoxia de los tumores (Fus and Górnicka, 2016), existe una plasticidad metabólica que va a permitir que las células tumorales utilicen diferentes estrategias metabólicas para colaborar en el crecimiento tumoral, según su proximidad vascular. Por tanto, siendo la hipoxia uno de los factores fundamentales para determinar el estado metabólico de la célula tumoral, se ha descrito un modelo de dos compartimentos, con una relación simbiótica, en el que las células que se encuentran en una zona de hipoxia basarían su metabolismo en la glicólisis anaeróbica mientras que las células dentro de un microambiente oxigenado basarían su metabolismo en la fosforilación de ácidos grasos, aminoácidos y glutamina. Además, esta simbiosis metabólica bidireccional se extendería también entre las células tumorales y las diferentes células que componen el estroma (fibroblastos, células inmunitarias, células progenitoras mesenquimales, adipocitos y células endoteliales) (Lehuédé *et al.*, 2016) reforzando aún más la HIT que va a complicar la identificación de perfiles metabólicos precisos en el CaV.

Los resultados alcanzados en esta Tesis Doctoral servirán como base de futuros estudios para la optimización del método de análisis dirigido a la identificación definitiva de los metabolitos seleccionados, y su validación como futuros bioM de diagnóstico y monitorización del CaV.

Capítulo 7

Conclusiones

Estudios previos han identificado perfiles metabólicos con capacidad diagnóstica del CaV, sin embargo, la identificación de bioM metabólicos para la monitorización del CaV tras la RTU es más compleja debido a la alta heterogeneidad metabólica y biológica intratumoral.

A partir de los resultados obtenidos como respuesta a los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral, desde el punto de vista metodológico, de resultados y de nuevas investigaciones, se desprenden las siguientes conclusiones:

1. El diseño de nuestro estudio, con la recogida de orina previa y posterior a la RTU vesical, demuestra que los resultados están asociados a la presencia del tumor macroscópico vesical y que se generan tras la resección del mismo.
2. La sistematización en la recogida de muestras y en el tratamiento de las mismas para su análisis aumenta la potencia estadística de los resultados al disminuir el efecto de errores sistemáticos y aleatorios asociados a la etapa analítica.
3. El análisis UPLC-TOF-MS no dirigido de las muestras de orina nos permite identificar una huella metabólica de CaV.
4. La validación externa de la huella identificada alcanza una sensibilidad del 83%, una especificidad del 66%, un VPP del 73% y un VPN del 78%.

5. Se plantean futuros estudios, con muestras más amplias y estratificadas, que investiguen la utilidad clínica de la huella metabólica identificada como bioM no invasivo de diagnóstico y monitorización de recurrencia de los pacientes con CaV.
6. La validación de este resultado genera una alternativa no invasiva a la cistoscopia, permitiendo reducir la frecuencia de esta exploración y, por tanto, el desarrollo de programas de seguimiento más sostenibles económicamente.
7. Nuestros resultados deben completarse con estudios de identificación de los metabolitos discriminantes seleccionados y las rutas metabólicas implicadas.

Capítulo 8

Bibliografía

Alberice, J. V. *et al.* (2013) 'Searching for urine biomarkers of bladder cancer recurrence using a liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis-mass spectrometry metabolomics approach', *Journal of Chromatography A*. Elsevier B.V., 1318, pp. 163–170. doi: 10.1016/j.chroma.2013.10.002.

De Angelis, R. *et al.* (2013) 'Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO CARE-5-a population-based study.', *The lancet oncology*, 2045(13), pp. 1–12. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70546-1.

Atkinson A.J., J. *et al.* (2001) 'Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework', *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, pp. 89–95. doi: 10.1067/mcp.2001.113989.

Avritscher, E. B. C. *et al.* (2006) 'Clinical model of lifetime cost of treating bladder cancer and associated complications', *Urology*, 68(3), pp. 549–553. doi: 10.1016/j.urology.2006.03.062.

Babjuk, M. *et al.* (2008) 'Urinary Cytology and Quantitative BTA and UBC Tests in Surveillance of Patients with pT_{ap}T₁ Bladder Urothelial Carcinoma', *Urology*, 71(4), pp. 718–722. doi: 10.1016/j.urology.2007.12.021.

Babjuk, M. *et al.* (2011) 'EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011 update', *European Urology*, 59(6), pp. 997–1008. doi: 10.1016/j.eururo.2011.03.017.

Bansal, N. *et al.* (2013) 'Low- and High-Grade Bladder Cancer Determination via Human Serum-Based Metabolomics Approach Low- and High-Grade Bladder Cancer Determination via Human Serum-Based Metabolomics Approach Corresponding Author':

- Bastacky, S. *et al.* (1999) 'The accuracy of urinary cytology in daily practice', *Cancer*, 87(3), pp. 118–128. doi: 10.1002/(SICI)1097-0142(19990625)87:3<118::AID-CNCR4>3.0.CO;2-N.
- Ben-Haim, S. and Ell, P. (2009) '18F-FDG PET and PET/CT in the evaluation of cancer treatment response', *J Nucl Med*, 50(1), pp. 88–99. doi: 10.2967/jnumed.108.054205.
- Berger, S. L. *et al.* (2009) 'An operational definition of epigenetics', *Genes and Development*, 23(7), pp. 781–783. doi: 10.1101/gad.1787609.
- Botteman, M. F. *et al.* (2003) 'The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature.', *Pharmacoeconomics*, 21(18), pp. 1315–1330. doi: 21183 [pii].
- Bray, F. *et al.* (2013) 'Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008', *International Journal of Cancer*, 132(5), pp. 1133–1145. doi: 10.1002/ijc.27711.
- Bray, F. *et al.* (2018) 'Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.', *CA: a cancer journal for clinicians*. doi: 10.3322/caac.21492.
- Bristow, A. W. T. (2006) 'Accurate mass measurement for the determination of elemental formula - A tutorial', *Mass Spectrometry Reviews*, 25(1), pp. 99–111. doi: 10.1002/mas.20058.
- Bruce, S. J. *et al.* (2009) 'Investigation of human blood plasma sample preparation for performing metabolomics using ultrahigh performance liquid chromatography/mass spectrometry', *Analytical Chemistry*, 81(9), pp. 3285–3296. doi: 10.1021/ac8024569.
- Cao, M. *et al.* (2012) 'NMR-based metabolomic analysis of human bladder cancer.', *Analytical sciences: the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 28(5), pp. 451–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22687923>.
- Caraway, N. P. *et al.* (2010) 'Fluorescence in situ hybridization for detecting urothelial carcinoma: A clinicopathologic study', *Cancer Cytopathology*,

- 118(5), pp. 259–268. doi: 10.1002/cncy.20099.
- Catto, J. W. F. *et al.* (2011) 'MicroRNA in prostate, bladder, and kidney cancer: A systematic review', *European Urology*, pp. 671–681. doi: 10.1016/j.eururo.2011.01.044.
- Chade, D. C. *et al.* (2009) 'Critical review of biomarkers for the early detection and surveillance of bladder cancer', *Journal of Men's Health*, pp. 368–382. doi: 10.1016/j.jomh.2009.07.004.
- Chan, E. C. Y. *et al.* (2015) 'Metabonomic profiling of bladder cancer', *Journal of Proteome Research*, pp. 587–602. doi: 10.1021/pr500966h.
- Chang, C.-C. and Lin, C.-J. (2011) 'LIBSVM: A library for support vector machines', *ACM Transactions on Intelligent Systems and Technology (TIST)*, 2(3), p. 27. doi: 10.1145/1961189.1961199.
- Cheng, Y. *et al.* (2015) 'Metabolomics in bladder cancer: a systematic review', *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(7), pp. 11052–11063.
- Chong, I. G. and Jun, C. H. (2005) 'Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present', *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. doi: 10.1016/j.chemolab.2004.12.011.
- Conde, V. R. *et al.* (2015) 'The progression from a lower to a higher invasive stage of bladder cancer is associated with severe alterations in glucose and pyruvate metabolism', *Experimental Cell Research*, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.yexcr.2015.04.007.
- Cortés-Francisco, N. *et al.* (2011) 'Accurate mass measurements and ultrahigh-resolution: Evaluation of different mass spectrometers for daily routine analysis of small molecules in negative electrospray ionization mode', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400(10), pp. 3595–3606. doi: 10.1007/s00216-011-5046-8.
- Costa, V. L. *et al.* (2011) 'TCF21 and PCDH17 methylation: An innovative panel of biomarkers for a simultaneous detection of urological cancers', *Epigenetics*, 6(9), pp. 1120–1130. doi: 10.4161/epi.6.9.16376.

- D'Costa, J. J. *et al.* (2016) 'A Systematic Review of the Diagnostic and Prognostic Value of Urinary Protein Biomarkers in Urothelial Bladder Cancer', *Bladder Cancer*, 2(3), pp. 301–317. doi: 10.3233/BLC-160054.
- Daniely, M. *et al.* (2007) 'Combined morphologic and fluorescence in situ hybridization analysis of voided urine samples for the detection and follow-up of bladder cancer in patients with benign urine cytology', *Cancer*, 111(6), pp. 517–524. doi: 10.1002/cncr.23119.
- Deberardinis, R. J. and Chandel, N. S. (2016) 'Fundamentals of cancer metabolism', (May). doi: 10.1126/sciadv.1600200.
- Dettmer, K. *et al.* (2013) 'Distinct metabolic differences between various human cancer and primary cells', *Electrophoresis*, 34(19), pp. 2836–2847. doi: 10.1002/elps.201300228.
- Eissa, S. *et al.* (2010) 'Expression of HYAL1 and Survivin RNA as Diagnostic Molecular Markers for Bladder Cancer', *Journal of Urology*, 183(2), pp. 493–498. doi: 10.1016/j.juro.2009.10.024.
- Ferlay, J. *et al.* (2018) 'Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018', *European Journal of Cancer*. doi: 10.1016/j.ejca.2018.07.005.
- Fradet, Y. and Lockhard, C. (1997) 'Performance characteristics of a new monoclonal antibody test for bladder cancer: ImmunoCyt trade mark.', *The Canadian journal of urology*, 4(3), pp. 400–405. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12735818>.
- Fus, Ł. P. and Górnicka, B. (2016) 'Role of angiogenesis in urothelial bladder carcinoma', *Central European Journal of Urology*, 69(3), pp. 258–263. doi: 10.5173/cej.2016.830.
- Gamagedara, S., Shi, H. and Ma, Y. (2012) 'Quantitative determination of taurine and related biomarkers in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. doi: 10.1007/s00216-011-5491-4.
- Gerlinger, M. *et al.* (2015) 'Intratumour heterogeneity in urologic cancers:

from molecular evidence to clinical implications', *European Urology*, 67(4), pp. 729–737. doi: 10.1016/j.eururo.2014.04.014.

Gika, H. G., Theodoridis, G. A. and Wilson, I. D. (2008) 'Liquid chromatography and ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry fingerprinting of human urine. Sample stability under different handling and storage conditions for metabonomics studies', *Journal of Chromatography A*, 1189(1–2), pp. 314–322. doi: 10.1016/j.chroma.2007.10.066.

Goebell, P. J., Groshen, S. L. and Schmitz-Dräger, B. J. (2008) 'Guidelines for development of diagnostic markers in bladder cancer', *World Journal of Urology*, 26(1), pp. 5–11. doi: 10.1007/s00345-008-0240-9.

Hall, M. C. *et al.* (2007) 'Guideline for the Management of Nonmuscle Invasive Bladder Cancer (Stages Ta, T1, and Tis): 2007 Update', *Journal of Urology*, 178(6), pp. 2314–2330. doi: 10.1016/j.juro.2007.09.003.

Halling, K. C. (2003) 'Vysis UroVysion for the detection of urothelial carcinoma', *Expert review of molecular diagnostics*, 3(4), pp. 507–519. doi: 10.1586/14737159.3.4.507.

Han, H., Wolff, E. M. and Liang, G. (2012) 'Epigenetic alterations in bladder cancer and their potential clinical implications', *Advances in Urology*, 2012, p. 546917. doi: 10.1155/2012/546917.

Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011) 'Hallmarks of cancer: the next generation', *Cell*, 144(5), pp. 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hanke, M. *et al.* (2007) 'Detailed technical analysis of urine RNA-based tumor diagnostics reveals ETS2/urokinase plasminogen activator to be a novel marker for bladder cancer', *Clinical Chemistry*, 53(12), pp. 2070–2077. doi: 10.1373/clinchem.2007.091363.

Hanke, M. *et al.* (2010) 'A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: MicroRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer', *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 28(6), pp. 655–661. doi: 10.1016/j.urolonc.2009.01.027.

Hautmann, S. *et al.* (2004) 'Immunocyt and the HA-HAase urine tests for the

detection of bladder cancer: A side-by-side comparison', *European Urology*, 46(4), pp. 466–471. doi: 10.1016/j.eururo.2004.06.006.

Hautmann, S. H. *et al.* (2001) 'Elevated tissue expression of hyaluronic acid and hyaluronidase validates the HA-HAase urine test for bladder cancer.', *The Journal of urology*, 165(6 Pt 1), pp. 2068–2074.

Hedelin, H., Holmäng, S. and Wiman, L. (2002) 'The cost of bladder tumour treatment and follow-up.', *Scandinavian journal of urology and nephrology*, 36(5), pp. 344–347. doi: 10.1080/003655902320783845.

Vander Heiden, M. G. (2013) 'Exploiting tumor metabolism: challenges for clinical translation', *J Clin Invest*, 123(9), pp. 3648–3651. doi: 10.1172/JCI72391.

Hensley, C. T., Wasti, A. T. and DeBerardinis, R. (2013) 'Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical\nopportunities', *J. Clin. Invest.*, 123(9), pp. 3678–3684.

Huang, Z. *et al.* (2011) 'Bladder Cancer Determination Via Two Urinary Metabolites: A Biomarker Pattern Approach', *Molecular & Cellular Proteomics*. doi: 10.1074/mcp.M111.007922.

Huber, S. *et al.* (2012) 'Nuclear matrix protein-22: A prospective evaluation in a population at risk for bladder cancer. Results from the UroScreen study', *BJU International*, 110(5), pp. 699–708. doi: 10.1111/j.1464-410X.2011.10883.x.

Hutterer, G. C. *et al.* (2008) 'Urinary cytology and nuclear matrix protein 22 in the detection of bladder cancer recurrence other than transitional cell carcinoma', *BJU International*, 101(5), pp. 561–565. doi: 10.1111/j.1464-410X.2007.07352.x.

Jin, X. *et al.* (2014) 'Diagnosis of bladder cancer and prediction of survival by urinary metabolomics.', *Oncotarget*, 5(6), pp. 1635–45. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4039236&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Junker, K. *et al.* (2003) 'Analysis of genetic alterations in normal bladder

urothelium', *Urology*, 62(6), pp. 1134–1138. doi: 10.1016/S0090-4295(03)00692-7.

Kamat, A. M. *et al.* (2013a) 'ICUD-EAU international consultation on bladder cancer 2012: Screening, diagnosis, and molecular markers', *European Urology*, 63(1), pp. 4–15. doi: 10.1016/j.eururo.2012.09.057.

Kamat, A. M. *et al.* (2013b) 'ICUD-EAU international consultation on bladder cancer 2012: Screening, diagnosis, and molecular markers', *European Urology*, pp. 4–15. doi: 10.1016/j.eururo.2012.09.057.

Kami, K. *et al.* (2013) 'Metabolomic profiling of lung and prostate tumor tissues by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry', *Metabolomics*, 9(2), pp. 444–453. doi: 10.1007/s11306-012-0452-2.

Karakiewicz, P. I. *et al.* (2006) 'Institutional variability in the accuracy of urinary cytology for predicting recurrence of transitional cell carcinoma of the bladder', *BJU International*, pp. 997–1001. doi: 10.1111/j.1464-410X.2006.06036.x.

Kell, D. B. (2006) 'Metabolomics, modelling and machine learning in systems biology – towards an understanding of the languages of cells', *{FEBS} Journal*, 273(5), pp. 873–894. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05136.x.

Kemperman, R. F. *et al.* (2007) 'Comparative urine analysis by liquid chromatography-mass spectrometry and multivariate statistics: method development, evaluation, and application to proteinuria', *J Proteome Res*, 6(1), pp. 194–206. doi: 10.1021/pr060362r.

Khochikar, M. V (2011) 'Rationale for an early detection program for bladder cancer.', *Indian journal of urology: IJU: journal of the Urological Society of India*, 27(2), pp. 218–225. doi: 10.4103/0970-1591.82841.

Kinders, R. *et al.* (1998) 'Complement factor H or a related protein is a marker for transitional cell cancer of the bladder.', *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 4(10), pp. 2511–2520.

Kirwan, J. A. *et al.* (2014) 'Direct infusion mass spectrometry metabolomics

dataset: a benchmark for data processing and quality control', *Scientific Data*, 1. doi: 10.1038/sdata.2014.12.

Kk, P. *et al.* (2013) 'Urinary Metabotyping of Bladder Cancer Using Two-Dimensional Gas Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry.', *J Proteome Res*, 12(9), pp. 3865–3873. Available at: <http://dx.doi.org/10.1021/pr4000448>.

Von Knobloch, R. *et al.* (2001) 'Serum DNA and urine DNA alterations of urinary transitional cell bladder carcinoma detected by fluorescent microsatellite analysis', *International Journal of Cancer*, 94(1), pp. 67–72. doi: 10.1002/ijc.1434.

Knowles, Margaret A. and Hurst, C. D. (2015) 'Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity', *Nature Reviews. Cancer*, 15(1), pp. 25–41. doi: 10.1038/nrc3817.

Knowles, M A and Hurst, C. D. (2015) 'Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity', *Nat Rev Cancer*. doi: 10.1038/nrc3817.

Koppenol, W. H., Bounds, P. L. and Dang, C. V. (2011) 'Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism', *Nature Reviews. Cancer*, 11(5), pp. 325–337. doi: 10.1038/nrc3038.

Kuligowski, J., Perez-Guaita, D., *et al.* (2015) 'Analysis of multi-source metabolomic data using joint and individual variation explained (JIVE)', *Analyst*, 140(13), pp. 4521–4529. doi: 10.1039/c5an00706b.

Kuligowski, J., Sanchez-Illana, A., *et al.* (2015) 'Intra-batch effect correction in liquid chromatography-mass spectrometry using quality control samples and support vector regression (QC-SVRC)', *Analyst*, 140(22), pp. 7810–7817. doi: 10.1039/c5an01638j.

Kuligowski, J. *et al.* (2016) 'Metabolomic analysis of gastric cancer progression within the Correa's cascade using ultraperformance liquid chromatography-mass spectrometry', *Journal of Proteome Research*. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00281.

- Lauridsen, M. *et al.* (2007) 'Human urine as test material in ¹H NMR-based metabonomics: Recommendations for sample preparation and storage', *Analytical Chemistry*, 79(3), pp. 1181–1186. doi: 10.1021/ac061354x.
- Lehuédé, C. *et al.* (2016) 'Metabolic Plasticity as a Determinant of Tumor Growth and Metastasis', *Cancer Research*, 76(18), pp. 5201–5208. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0266.
- Li, H. X. *et al.* (2010) 'ImmunoCyt and cytokeratin 20 immunocytochemistry as adjunct markers for urine cytologic detection of bladder cancer: A prospective study', *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, 32(1), pp. 45–52.
- Lindner, M. *et al.* (2012) 'Proteomic analysis of urinary biomarker candidates for nonmuscle invasive bladder cancer', *Proteomics*, 12(1), pp. 135–144. doi: 10.1002/pmic.201000810.
- Lindon, J. C. and Holmes, E. (2007) 'A Survey of Metabonomics Approaches for Disease Characterisation', in *The Handbook of Metabonomics and Metabolomics*, pp. 413–442. doi: 10.1016/B978-044452841-4/50016-3.
- Liu, X. *et al.* (2018) 'Investigation of the urinary metabolic variations and the application in bladder cancer biomarker discovery', *Int. J. Cancer*, 143, pp. 408–418. doi: 10.1002/ijc.31323.
- Lokeshwar, V. B. *et al.* (2000) 'Urinary hyaluronic acid and hyaluronidase: markers for bladder cancer detection and evaluation of grade.', *The Journal of urology*, 163(1), pp. 348–356. doi: 10.1016/S0022-5347(05)68050-0.
- Lokeshwar, V. B. *et al.* (2005) 'Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers', *Urology*, 66(6 SUPPL. 1), pp. 35–63. doi: 10.1016/j.urology.2005.08.064.
- Lotan, Y. and Roehrborn, C. G. (2003) 'Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: Results of a comprehensive literature review and meta-analyses', *Urology*, 61(1), pp. 109–118. doi: 10.1016/S0090-4295(02)02136-2.
- Mahnert, B. *et al.* (2003) 'Measurements of complement factor H-related

protein (BTA-TRAK assay) and nuclear matrix protein (NMP22 assay)--useful diagnostic tools in the diagnosis of urinary bladder cancer?', *Clinical chemistry and laboratory medicine: CCLM / FESCC*, 41(1), pp. 104–110. doi: 10.1515/CCLM.2003.018.

Mengual, L. *et al.* (2010) 'Gene expression signature in urine for diagnosing and assessing aggressiveness of bladder urothelial carcinoma', *Clinical Cancer Research*, 16(9), pp. 2624–2633. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-3373.

Mian, C. *et al.* (2006) 'uCyt+/ImmunoCyt??? in the detection of recurrent urothelial carcinoma: An update on 1991 analyses', *Cancer*, 108(1), pp. 60–65. doi: 10.1002/cncr.21712.

Netto, G. J. and Tafe, L. J. (2016) 'Emerging Bladder Cancer Biomarkers and Targets of Therapy Urothelial carcinoma Bladder cancer Genomics Targeted therapy Clinical trials Biomarkers'.

Nicholson, J. K., Lindon, J. C. and Holmes, E. (1999) "Metabonomics": understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data', *Xenobiotica*, 29(11), pp. 1181–1189. doi: 10.1080/004982599238047.

Oers, J. M. M. Van *et al.* (2005) 'A Simple and Fast Method for the Simultaneous Detection of Nine Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Mutations in Bladder Cancer and Voided Urine', *Erasmus*, 11(6), pp. 7743–7748. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1045.

Oge, O., Kozaci, D. and Gemalmaz, H. (2002) 'The BTA stat test is nonspecific for hematuria: an experimental hematuria model.', *The Journal of urology*, 167(3), pp. 1318–9; discussion 1319–20. doi: S0022-5347(05)64207-3 [pii] 10.1097/01.ju.0000035901.97012.fa.

Opitz, C. A. *et al.* (2011) 'An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor', *Nature*. doi: 10.1038/nature10491.

Otto, A. M. (2016) 'Warburg effect(s)—a biographical sketch of Otto Warburg and his impacts on tumor metabolism', *Cancer & Metabolism*. doi:

10.1186/s40170-016-0145-9.

Park, H.-S. *et al.* (2008) 'Quantitation of Aurora kinase A gene copy number in urine sediments and bladder cancer detection.', *Journal of the National Cancer Institute*, 100(19), pp. 1401–11. doi: 10.1093/jnci/djn304.

Pasikanti, K. K., Norasmara, J., *et al.* (2010) 'Metabolic footprinting of tumorigenic and nontumorigenic uroepithelial cells using two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry', in *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, pp. 1285–1293. doi: 10.1007/s00216-010-4055-3.

Pasikanti, K. K., Esuvaranathan, K., *et al.* (2010) 'Noninvasive urinary metabonomic diagnosis of human bladder cancer', *Journal of Proteome Research*, 9(6), pp. 2988–2995. doi: 10.1021/pr901173v.

Pasikanti, K. K. *et al.* (2013) 'Urinary metabotyping of bladder cancer using two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry', *Journal of Proteome Research*, 12(9), pp. 3865–3873. doi: 10.1021/pr4000448.

Pendyala, L. *et al.* (1997) 'Translational studies of glutathione in bladder cancer cell lines and human specimens', *Clinical Cancer Research*, 3(5), pp. 793–798.

Planz, B. *et al.* (2005) 'The role of urinary cytology for detection of bladder cancer', *European Journal of Surgical Oncology*, 31(3), pp. 304–308. doi: 10.1016/j.ejso.2004.12.008.

Pu, X. Y. *et al.* (2008) 'The value of combined use of survivin, cytokeratin 20 and mucin 7 mRNA for bladder cancer detection in voided urine', *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 134(6), pp. 659–665. doi: 10.1007/s00432-007-0331-9.

Putluri, N. *et al.* (2011) 'Metabolomic Profiling Reveals Potential Markers and Bioprocesses Altered in Bladder Cancer Progression', *Cancer Research*, 71(24), pp. 7376–7386. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1154.

Qiu, Y. *et al.* (2009) 'Serum metabolite profiling of human colorectal cancer using GC-TOFMS and UPLC-QTOFMS', *J Proteome Res*, 8(10), pp. 4844–4850.

doi: 10.1021/pr9004162.

Quintás, G. *et al.* (2012) 'Chemometric approaches to improve PLSDA model outcome for predicting human non-alcoholic fatty liver disease using UPLC-MS as a metabolic profiling tool', *Metabolomics*, 8(1), pp. 86–98. doi: 10.1007/s11306-011-0292-5.

Renard, I. *et al.* (2010) 'Identification and Validation of the Methylated TWIST1 and NID2 Genes through Real-Time Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction Assays for the Noninvasive Detection of Primary Bladder Cancer in Urine Samples', *European Urology*, 58(1), pp. 96–104. doi: 10.1016/j.eururo.2009.07.041.

Robinson, V. L. *et al.* (2010) 'BCAN Think Tank session 2: Molecular detection of bladder cancer: The path to progress', *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. Elsevier Inc., 28(3), pp. 334–337. doi: 10.1016/j.urolonc.2009.07.026.

Rodrigues, D. *et al.* (2016) 'Biomarkers in bladder cancer: A metabolomic approach using in vitro and ex vivo model systems', *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*. doi: 10.1002/ijc.30016.

Rosser, C. J., Urquidi, V. and Goodison, S. (2013) 'Urinary biomarkers of bladder cancer: an update and future perspectives.', *Biomarkers in medicine*, 7(5), pp. 779–90. doi: 10.2217/bmm.13.73.

Roux, A. *et al.* (2011) 'Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review', *Clinical Biochemistry*, pp. 119–135. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2010.08.016.

Sangar, V. K. *et al.* (2005) 'The economic consequences of prostate and bladder cancer in the UK', *BJU International*, 95(1), pp. 59–63. doi: 10.1111/j.1464-410X.2005.05249.x.

Saric, J. *et al.* (2012) 'Systematic evaluation of extraction methods for multiplatform-based metabotyping: Application to the fasciola hepatica metabolome', *Analytical Chemistry*, 84(16), pp. 6963–6972. doi:

10.1021/ac300586m.

Saude, E. J. *et al.* (2007) 'Variation of metabolites in normal human urine', *Metabolomics*, 3(4), pp. 439–451. doi: 10.1007/s11306-007-0091-1.

Scher, M. B. *et al.* (2012) 'Detecting DNA methylation of the BCL2, CDKN2A and NID2 genes in urine using a nested methylation specific polymerase chain reaction assay to predict bladder cancer', *Journal of Urology*, 188(6), pp. 2101–2107. doi: 10.1016/j.juro.2012.08.015.

Schlake, A. *et al.* (2012) 'NMP-22, urinary cytology, and cystoscopy: A 1 year comparison study', *Canadian Journal of Urology*, 19(4), pp. 6345–6350.

Shariat, S. F. *et al.* (2005) 'Nomograms including nuclear matrix protein 22 for prediction of disease recurrence and progression in patients with Ta, T1 or CIS transitional cell carcinoma of the bladder.', *The Journal of urology*, 173(5), pp. 1518–25. doi: 10.1097/01.ju.0000154696.48217.75.

Shariat, S. F. *et al.* (2010) 'Statistical consideration for clinical biomarker research in bladder cancer', *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, pp. 389–400. doi: 10.1016/j.urolonc.2010.02.011.

Sharma, S. *et al.* (1999) 'Exclusion criteria enhance the specificity and positive predictive value of NMP22 and BTA stat.', *The Journal of urology*, 162(1), pp. 53–57. doi: 10.1097/00005392-199907000-00014.

Shelley, M. D., Mason, M. D. and Kynaston, H. (2010) 'Intravesical therapy for superficial bladder cancer: a systematic review of randomised trials and meta-analyses', *Cancer Treat Rev*, 36(3), pp. 195–205. doi: S0305-7372(09)00187-X [pii]\r10.1016/j.ctrv.2009.12.005.

Shen, C. *et al.* (2015) 'Developing urinary metabolomic signatures as early bladder cancer diagnostic markers.', *Omics : a journal of integrative biology*, 19(1), pp. 1–11. doi: 10.1089/omi.2014.0116.

Shi, H. *et al.* (2016) 'Discovery of urine biomarkers for bladder cancer via global metabolomics', *Biomarkers*. doi: 10.3109/1354750X.2016.1171903.

Sreekumar, A. *et al.* (2009) 'Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression.', *Nature*, 457(7231), pp. 910–4. doi:

10.1038/nature07762.

Srivastava, S. *et al.* (2010) 'Taurine - a possible fingerprint biomarker in non-muscle invasive bladder cancer: A pilot study by ¹H NMR spectroscopy.', *Cancer biomarkers: section A of Disease markers*, 6(1), pp. 11–20. doi: 10.3233/CBM-2009-0115.

Stenzl, A., Hennenlotter, J. and Schilling, D. (2008) 'Can we still afford bladder cancer?', *Current opinion in urology*, 18(5), pp. 488–492. doi: 10.1097/MOU.0b013e32830b8925.

Svatek, R. S. *et al.* (2008) 'Screening for bladder cancer using urine-based tumor markers', *Minerva Urologica e Nefrologica*, pp. 247–253.

Svatek, R. S. *et al.* (2014) 'The economics of bladder cancer: Costs and considerations of caring for this disease', *European Urology*, 66(2), pp. 253–262. doi: 10.1016/j.eururo.2014.01.006.

Sylvester, R. J. *et al.* (2006) 'Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials', *European Urology*, 49(3), pp. 466–465; discussion 475–477. doi: 10.1016/j.eururo.2005.12.031.

Talwar, R. *et al.* (2007) 'Voided Urinary Cytology in Bladder Cancer: Is It Time to Review the Indications?', *Urology*, 70(2), pp. 267–271. doi: 10.1016/j.urology.2007.03.070.

Tan, G. *et al.* (2017) 'Three serum metabolite signatures for diagnosing low-grade and high-grade bladder cancer', *Scientific Reports*. doi: 10.1038/srep46176.

Teahan, O. *et al.* (2006) 'Impact of analytical bias in metabonomic studies of human blood serum and plasma', *Analytical Chemistry*, 78(13), pp. 4307–4318. doi: 10.1021/ac051972y.

Thomas, L. *et al.* (1999) 'Multicenter trial of the quantitative BTA TRAK assay in the detection of bladder cancer', *Clinical Chemistry*, 45(4), pp. 472–477.

Tilki, D. *et al.* (2011) 'Urine Markers for Detection and Surveillance of Non-

Muscle-Invasive Bladder Cancer', *European Urology*, 60(3), pp. 484–492. doi: 10.1016/j.eururo.2011.05.053.

Tiziani, S. *et al.* (2008) 'Optimized metabolite extraction from blood serum for ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy.', *Analytical biochemistry*, 377, pp. 16–23. doi: 10.1016/j.ab.2008.01.037.

Todenhöfer, T. *et al.* (2015a) 'Prognostic relevance of positive urine markers in patients with negative cystoscopy during surveillance of bladder cancer', *BMC cancer*, 15, p. 155. doi: 10.1186/s12885-015-1089-0.

Todenhöfer, T. *et al.* (2015b) 'Prognostic relevance of positive urine markers in patients with negative cystoscopy during surveillance of bladder cancer', *BMC Cancer*, 15(1). doi: 10.1186/s12885-015-1089-0.

Tripathi, P. *et al.* (2013) 'HR-MAS NMR tissue metabolomic signatures cross-validated by mass spectrometry distinguish bladder cancer from benign disease', *Journal of Proteome Research*, 12(7), pp. 3519–3528. doi: 10.1021/pr4004135.

Trygg, J., Holmes, E. and Lundstedt, T. (2007) 'Chemometrics in metabonomics', *Journal of Proteome Research*, pp. 469–479. doi: 10.1021/pr060594q.

UICC (2009) 'TNM 7 th edition due December 2009', *Union for International Cancer Control*. doi: 10.1016/B978-1-4377-0272-9.50014-0.

Vázquez Fresno, R. (2015) *Estudio metabolómico de biomarcadores nutricionales en estudio de intervención mediante resonancia magnética nuclear. Intervención con alimentos, complementos y patrones alimentarios*. Universidad de Barcelona.

Vantaku, V., *et al.* (2019) 'Large scale profiling of serum metabolites in African American and European American patients with bladder cancer reveals metabolic pathway associated with patient survival', *Cancer*, 125, pp. 921–932. doi : 10.1002/cncr.31890.

Walsh, M. C. *et al.* (2006) 'Effect of acute dietary standardization on the urinary, plasma, and salivary metabolomic profiles of healthy humans',

American Journal of Clinical Nutrition, 84(3), pp. 531–539. doi: 84/3/531 [pii].

Wang, J. H., Byun, J. and Pennathur, S. (2010) 'Analytical approaches to metabolomics and applications to systems biology', *Seminars in Nephrology*, 30(5), pp. 500–511. doi: 10.1016/j.semnephrol.2010.07.007.

Wang, X. *et al.* (2011) 'Ultra-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry as a sensitive and powerful technology for metabolomic studies', *Journal of Separation Science*, 34(24), pp. 3451–3459. doi: 10.1002/jssc.201100333.

Westerhuis, J. A. *et al.* (2008) 'Assessment of PLSDA cross validation', *Metabolomics*, 4(1), pp. 81–89. doi: 10.1007/s11306-007-0099-6.

Willis, C. M. *et al.* (2004) 'Olfactory detection of human bladder cancer by dogs: proof of principle study.', *BMJ (Clinical research ed.)*, 329(7468), p. 712. doi: 10.1136/bmj.329.7468.712.

Wishart, D. S. (2011) 'Advances in metabolite identification.', *Bioanalysis*, 3(15), pp. 1769–1782. doi: 10.4155/bio.11.155.

Wittmann, B. M. *et al.* (2014) 'Bladder Cancer Biomarker Discovery Using Global Metabolomic Profiling of Urine', *PLoS ONE*, 9(12), p. e115870. doi: 10.1371/journal.pone.0115870.

Wong, M. C. Y. *et al.* (2008) 'An approach towards method development for untargeted urinary metabolite profiling in metabonomic research using UPLC/QToF MS', *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 871(2), pp. 341–348. doi: 10.1016/j.jchromb.2008.06.033.

Yang, M., Soga, T. and Pollard, P. J. (2013) 'Oncometabolites: Linking altered metabolism with cancer', *Journal of Clinical Investigation*, pp. 3652–3658. doi: 10.1172/JCI67228.

Zhang, D. Z. *et al.* (2014) 'Cell-free urinary MicroRNA-99a and MicroRNA-125b are diagnostic markers for the non-invasive screening of bladder cancer', *PLoS ONE*, 9(7). doi: 10.1371/journal.pone.0100793.

Zhang, J. (2012) *Metabolomics-based methods for cancer biomarker discovery: application to esophageal and bladder cancers*, ProQuest Dissertations and Theses. Available at:

<http://search.proquest.com/docview/1238007660?accountid=50433>.

Zhang, J. *et al.* (2012) 'NMR-based metabolomics study of canine bladder cancer', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier B.V., 1822(11), pp. 1807–1814. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.08.001.

Zuiverloon, T. C. M. *et al.* (2011) 'Optimization of nonmuscle invasive bladder cancer recurrence detection using a urine based FGFR3 mutation assay', *Journal of Urology*, 186(2), pp. 707–712. doi: 10.1016/j.juro.2011.03.141.

Capítulo 9

Anexos

Anexo 1. Informe Comité Ético de Investigación Biomédica del IIS la Fe



DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Don Serafín Rodríguez Capellán, Secretario del Comité Ético de Investigación Biomédica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe,

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado en su sesión de fecha **18 de Septiembre de 2012**, el Proyecto de Investigación titulado **“DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA DE ANALISIS METABOLOMICO PARA LA IDENTIFICACION DE BIOMARCADORES URINARIOS DE CANCER VESICAL.”**, con nº de registro **2012/0186**.

Que dicho proyecto se ajusta a las normativas éticas sobre investigación biomédica con sujetos humanos y es viable en cuanto al planteamiento científico, objetivos, material y métodos, etc, descritos en la solicitud, así como la Hoja de Información al Paciente y el Consentimiento Informado.

En consecuencia este Comité acuerda emitir **INFORME FAVORABLE** de dicho Proyecto de Investigación que será realizado en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe por el/la Dr. / Dra. **JOSE LUIS RUIZ CERDA** del servicio de **UROLOGIA** como Investigador Principal.

Miembros del CEIB:

Presidente:

Dr. Juan B. Salom Sanvalero. (Unidad de Circulación Cerebral Experimental)

Secretario- Licenciado en Derecho:

D. Serafín Rodríguez Capellán. (Asesor jurídico)

Miembros:

Dr. Melchor Hoyos García. (Gerente del Departamento de salud Valencia La Fe)

Dr. José Vicente Castell Ripoll. (Director de Investigación)

Dr. Salvador Aliño Pellicer. (Farmacólogo Clínico - Hospital U. i P. La Fe)

Dra. Remedios Clemente García. (Medicina Intensiva)

Dra. M^a Luisa Martínez Triguero. (Análisis Clínicos)

Dr. José Vicente Cervera Zamora. (Hematología)

Dr. José Luis Vicente Sánchez. (Jefe de sección - Unidad de Reanimación)

Dr. Isidro Vitoria Miñana. (Pediatria)

Dra. Belén Beltrán Niclós. (Medicina Digestiva)

Dra. Inmaculada Calvo Penadés. (Reumatología Pediátrica)

Dr. Alfredo José Perales Marín (Jefe de Servicio - Obstetricia)

Dra. Begoña Polo Miquel (Gastroenterología Pediátrica).

Dr. Enrique Viosca Herrero (Jefe de Servicio - Medicina Física y Rehabilitación)

Dra. Eugenia Pareja Ibars (Unidad de Cirugía y Trasplante Hepático).

Dr. Jaime Sanz Caballer (Grupo Acreditado en Hematología y Hemoterapia)

Dr. José Luis Ponce Marco (Unidad de Cirugía Endocrino Metabólica)

Dr. José Antonio Aznar Lucea (Jefe de Unidad - Hemostasia y Trombosis)

Dra. Pilar Sáenz González (Neonatología)

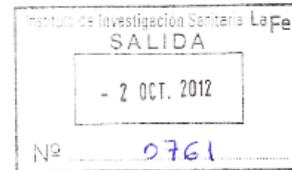


Dr. Rafael Botella Estrada (Dermatología)
Dr. José Luis Mullor Sanjose (Grupo de Investigación Traslacional en Enfermedades Neurosensoriales)
Dr. Francisco Javier Pemán García (Grupo Acreditado multidisciplinar para el estudio de la Infección Grave)
Dra. María José Gómez-Lechón Moliner (Grupo Acreditado en Hepatología Experimental)
Dr. Ramiro Jover Atienza. (Unidad de Bioquímica y Biología Molecular)
Dra. María Tordera Baviera. (Farmacéutica del Hospital)
D. Jesús Delgado Ochando. (Diplomado en Enfermería)

Lo que firmo en Valencia, a 18 de Septiembre de 2012



Fdo.: Don Serafín Rodríguez Capellán
Secretario del Comité Ético de Investigación Biomédica



Dr. José Luis Ruíz Cerdá
Servicio de Urología

Asunto: Autorización Inicio Estudio.

Valencia, 28 de Septiembre de 2012.

Adjunto le remito copia de los Informes Científico y Ético de Investigación, en el que se acuerda informar **favorablemente**.

A la vista de los dictámenes emitidos, el Proyecto de Investigación titulado: "DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA DE ANALISIS METABOLOMICO PARA LA IDENTIFICACION DE BIOMARCADORES URINARIOS DE CANCER VESICAL", puede iniciarse y llevarse a cabo.

Atentamente,



Dr. José V. Castell, PhD., MD.
Director General

D. José Vte. Castell Ripoll, Presidente de la Comisión de Investigación del Hospital Universitario La Fe de Valencia,

INFORMA:

Que el Proyecto de Investigación titulado: "DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA DE ANALISIS METABOLOMICO PARA LA IDENTIFICACION DE BIOMARCADORES URINARIOS DE CANCER VESICAL" que presenta el/la Dr./Dra. **José Luis Ruíz Cerdá** del Servicio de Urología del Hospital La Fe de Valencia, contiene elementos objetivos suficientes en cuanto a la Hipótesis, Planteamientos y Plan de Trabajo que, a juicio de esta Comisión, permiten pronunciarse **positivamente** en cuanto a su viabilidad.

P.O.
Valencia a 28 de Septiembre de 2012.



Anexo 2. Consentimiento informado para donación y almacenamiento de muestras orina

Consentimiento informado para la donación voluntaria

Consentimiento informado para la donación voluntaria de muestras biológicas para investigación al biobanco del...

(1 de 6)

1. Identificación y descripción del procedimiento

El procedimiento que se le propone consiste en donar voluntariamente muestra/s biológica/s de Estas muestras biológicas se almacenarán en un biobanco y sólo podrán ser utilizadas en proyectos de investigación biomédica que previamente sean aprobados por los comités externos, ético y científico, a los que está adscrito el biobanco.

Las muestras seguirán almacenadas en el biobanco hasta el fin de las existencias si no existe una revocación del presente consentimiento.

2. Objetivo

La finalidad del biobanco es recoger y almacenar muestras biológicas humanas para realizar proyectos de investigación biomédica o diagnósticos. Los resultados de dichos proyectos de investigación pueden derivar en el descubrimiento de nuevos métodos para el mejor diagnóstico de las enfermedades y de nuevas medicinas para tratarlas.

3. Condiciones de la donación

Usted no recibirá ninguna compensación económica ni otros beneficios materiales por donar sus muestras. Sin embargo, si las investigaciones que se realicen tuvieran éxito, podrán ayudar en el futuro a pacientes que tienen su misma enfermedad o padecen otras enfermedades similares.

Las muestras de los tejidos y/o sangre que usted dona no serán vendidas o distribuidas a terceros con fines comerciales, pero los costes de obtención, conservación y envío de las muestras se repercutirán, sin ánimo de lucro, a quienes las utilicen.

La donación de muestras no impedirá que usted o su familia puedan hacer uso de ellas siempre que estén disponibles, cuando así lo requieran.

En caso de producirse un eventual cierre del biobanco o revocación de la autorización para su constitución y funcionamiento, la información sobre el destino de las muestras estará a disposición en el Registro Nacional de Biobancos para Investigación Biomédica, con el fin de que pueda manifestar su conformidad o disconformidad con el destino previsto de las muestras.

4. Consecuencias previsibles de su realización

Se podría dar la circunstancia de ser contactado/a con el fin de recabar nueva información sobre su situación o de tomar una nueva muestra que pudiera ser interesante en el desarrollo de la investigación biomédica, en cuyo caso volverá a ser informado/a de la situación y tendrá la libertad de participar o rechazar dicha participación. Por tal motivo, es importante que comunique al Servicio de Admisión del centro FUTUROS CAMBIOS DE DIRECCIÓN y números de TELÉFONO, ya que es la única vía para poder contactar con usted.

Es posible que se obtenga información relativa a su salud derivada del desarrollo de los proyectos de investigación y, en particular, datos genéticos con relevancia clínica. En este sentido, puede solicitar la información relativa a su salud derivada del estudio de las muestras donadas. Para ejercer este derecho, tiene a su disposición en el biobanco el correspondiente formulario de solicitud.

La información que se obtenga puede ser relevante también para sus familiares biológicos. Es decisión suya informarles – algo que nosotros le aconsejamos – con el fin de que, si ellos lo desean, puedan ser estudiados y valorar así cual es el riesgo personal y sus opciones de salud en un futuro.

Cuando esta información, según criterio médico, sea necesaria para evitar un grave perjuicio a la salud de sus familiares biológicos, previa consulta del comité asistencial, se les informará de ello.



EJEMPLAR PARA EL BIOBANCO

Declaración de consentimiento

D./Dª de años de edad, con domicilio en

DNI y nº de SIP

D./Dª de años de edad, con domicilio en.....

DNI en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad)
del paciente con DNI y nº de SIP

DECLARO

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He sido informado por el profesional de salud abajo mencionado sobre la donación de muestras a un biobanco.

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo.

He podido realizar observaciones y me han sido aclaradas todas las dudas que he planteado.

He comprendido que la donación de muestras a un biobanco es voluntaria y puedo revocar mi consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Que libre y voluntariamente acepto la realización de la donación voluntaria de:

Una/s muestra/s de

Que puedo incluir restricciones sobre el uso de las mismas:

CONSIENTO

Que el Hospital u otros centros de investigación, públicos o privados, utilicen mis datos y las muestras donadas en las condiciones establecidas en la hoja de información.

Que el ente coordinador de la Red Valenciana de Biobancos pueda acceder a mis datos, en la medida en que sea necesario y manteniendo siempre su confidencialidad.

A completar por el donante:

Fdo.: D./Dª
DNI:

A completar por el profesional de salud

Fdo.: D./Dª
DNI:
Colegiado Nº:
En condición de:

En a de de 20.....

Consentimiento informado para la donación voluntaria
de muestras biológicas para investigación
al biobanco del...

(4 de 6)

EJEMPLAR PARA EL DONANTE

Declaración de consentimiento

D./Dª de años de edad, con domicilio en

DNI y nº de SIP

D./Dª de años de edad, con domicilio en

DNI en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad)
del paciente con DNI y nº de SIP

DECLARO

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He sido informado por el profesional de salud abajo mencionado sobre la donación de muestras a un biobanco.

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo.

He podido realizar observaciones y me han sido aclaradas todas las dudas que he planteado.

He comprendido que la donación de muestras a un biobanco es voluntaria y puedo revocar mi consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Que libre y voluntariamente acepto la realización de la donación voluntaria de:

Una/s muestra/s de

Que puedo incluir restricciones sobre el uso de las mismas:

CONSIENTO

Que el Hospital u otros centros de investigación, públicos o privados, utilicen mis datos y las muestras donadas en las condiciones establecidas en la hoja de información.

Que el ente coordinador de la Red Valenciana de Biobancos pueda acceder a mis datos, en la medida en que sea necesario y manteniendo siempre su confidencialidad.

A completar por el donante:

Fdo.: D./Dª
DNI:

A completar por el profesional de salud

Fdo.: D./Dª
DNI:
Colegiado Nº:
En condición de:

En a de de 20.....



RED VALENCIANA DE BIOBANCOS

Consentimiento informado para la donación voluntaria
de muestras biológicas para investigación
al biobanco del...
(5 de 6)



EJEMPLAR PARA EL CENTRO

Declaración de consentimiento

D./Dª de años de edad, con domicilio en

DNI y nº de SIP

D./Dª de años de edad, con domicilio en.....

DNI en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad)
del paciente con DNI y nº de SIP

DECLARO

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He sido informado por el profesional de salud abajo mencionado sobre la donación de muestras a un biobanco.

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo.

He podido realizar observaciones y me han sido aclaradas todas las dudas que he planteado.

He comprendido que la donación de muestras a un biobanco es voluntaria y puedo revocar mi consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Que libre y voluntariamente acepto la realización de la donación voluntaria de:

Una/s muestra/s de

Que puedo incluir restricciones sobre el uso de las mismas:

CONSIENTO

Que el Hospital u otros centros de investigación, públicos o privados, utilicen mis datos y las muestras donadas en las condiciones establecidas en la hoja de información.

Que el ente coordinador de la Red Valenciana de Biobancos pueda acceder a mis datos, en la medida en que sea necesario y manteniendo siempre su confidencialidad.

A completar por el donante:

Fdo.: D./Dª

DNI:

A completar por el profesional de salud

Fdo.: D./Dª

DNI:

Colegiado Nº:

En condición de:

En a de de 20.....

Consentimiento informado para la donación voluntaria
de muestras biológicas para investigación
al biobanco del...

(6 de 6)

Revocación del consentimiento

Revoco el consentimiento prestado en fecha de de 2..... y no
deseo proseguir la donación voluntaria que doy con esta fecha por finalizada.

A completar por el donante:

Fdo.: D./Dª
DNI:

A completar por el profesional de salud

Fdo.: D./Dª
DNI:
Colegiado Nº:
En condición de:

En a de de 20.....



RED VALENCIANA DE BIOBANCOS