

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA

Departamento de Cirugía

Programa de Doctorado: 3139 Medicina



Tesis Doctoral

ESTUDIO METABOLÓMICO EN TEJIDO PROSTÁTICO Y ORINA PARA EL DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

Presentada por:

Jorge Panach Navarrete

Directores:

José María Martínez Jabaloyas

José Manuel Morales Tatay

Vannina González Marrachelli

Tutor:

Cristina Doménech Pérez

Septiembre, 2021

INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS

Director (es) / Codirector (es):

1.- Apellidos y nombre: José María Martínez Jabaloyas N.I.F. 73545306T, Departamento/Instituto: Cirugía Centro: Facultat de Medicina i Odontologia, Universitat de València

2.- Apellidos y nombre: José Manuel Morales Tatay N.I.F. 52649917L, Departamento/Instituto: Patología Centro: Facultat de Medicina i Odontologia, Universitat de València

3.- Apellidos y nombre: Vannina González Marrachelli N.I.F. 29185198S, Departamento/Instituto: Fisiología Centro: Facultat de Medicina i Odontologia, Universitat de València

Tutor o tutora (si procede)

Apellidos y nombre: Cristina Doménech Pérez. N.I.F. 21626407J, Departamento/Instituto: Cirugía Centro: Facultat de Medicina i Odontologia, Universitat de València

Directores/as y tutor/a, respectivamente, de la tesis doctoral: "Estudio metabólico en tejido prostático y orina para el diagnóstico y pronóstico del cáncer de próstata".

de D/Dña. Jorge Panach Navarrete,

estudiante del Programa de Doctorado **3139 Medicina** (RD99/2011) en Medicina de la Universitat de València, emiten informe favorable (*favorable/desfavorable*) para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: 15/09/2021

Fdo.: José M^a Martínez Jabaloyas Fdo.: J. Manuel Morales Tatay Fdo.: Vannina González Marachelli Fdo.: Cristina Doménech Pérez

Director

Director

Directora

Tutora

**ESCUELA DOCTORAL
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

AGRADECIMIENTOS

El trabajo que aquí presento ha supuesto para mí un largo camino. Como todos los largos caminos, ha tenido momentos de alegría y optimismo, y otros momentos de introspección y reflexión. He intentado vivir cada tramo del camino empapándome de lo positivo de cada vivencia, e intentando aprender de aciertos y de errores. Realmente no sé cuándo empezó este viaje, pero sé sin lugar a dudas qué personas me han llevado de la mano en cada cuesta, en cada curva, y en cada bache del camino.

En primer lugar, quería agradecer de la forma más sincera todo el trabajo llevado a cabo por el Dr. García Morata y la Dra. Sales. Sin vosotros, esta tesis no habría sido posible. Vuestros esfuerzos han sido los cimientos de este estudio. Os lo agradeceré siempre.

No puedo olvidarme de las personas que fueron mi familia en algunos de los mejores y a la vez más duros años de mi vida. Andrés, Edu, María... con vosotros empecé a conocer un mundo desconocido y complicado. Tener al lado a gente como vosotros ha sido todo un lujo, haciendo que todavía hoy, los días grises de vuelta a casa, recuerde alguna anécdota juntos y sonrío al recordarlos. Tengo la suerte de seguir compartiendo horas de hospital con Ana y Lorena, me encanta pasar horas a vuestro lado, pues sigo aprendiendo de vosotras y me hacéis mejor persona. El esfuerzo de esta tesis ha sido más llevadero con vosotros cerca. Os llevo y llevaré siempre muy dentro a todos.

Marcos, Paco, Stefan, y el resto de compañeros y compañeras del servicio. Habéis sido, de alguna u otra forma, fuente de motivación e inspiración para mí en algún momento. Ir a trabajar y saber que estaréis o habéis estado ahí, es un gusto. Gracias.

A José Manuel y Vannina, vosotros ocupáis un papel principal en esta tesis. Cogisteis a un novato en esto de la metabolómica, y con una dosis alta de paciencia, habéis conseguido que me sumergiera en el "universo metabólico". Perdonadme si he sido pesado en alguna ocasión, si he hecho las cosas del revés a como vosotros queríais, o si he tardado en responder. Espero haber estado a la altura. Vuestro optimismo, predisposición y cercanía han sido básicos para tirar adelante con este

trabajo. Gracias por haberme tratado muchas veces más como un amigo que como un alumno. Cada vez que mire la tesis, me acordaré de vosotros.

Agradecimiento especial a Pepe, mi padre urológico. Mucho de lo poco que sé, te lo debo a ti. Los primeros meses en el servicio creía que me enseñarías laparoscopia, cómo manejarme con los pacientes, qué indicaciones seguir... los últimos años me he dado cuenta de que eso no es nada. Esos aprendizajes son sólo la copa de los árboles del bosque de enseñanzas que me has brindado. Me has formado como urólogo, como médico y como persona, y sin saberlo has dejado una huella que nunca borraré. Eternamente gracias.

A mis amigos de siempre, Javi, Alejandro, Borja, Alba, David, Pepe, Ema, Porto....aquellos que me vieron crecer en el cole y en el pueblo, y con los que tuve la suerte de compartir los años más bonitos de mi vida. En las tardes en un banco o en partidos de fútbol, disfruté cada vivencia a vuestro lado, aprendiendo a crecer y aprendiendo lo que es la vida. Me habéis ayudado a llegar donde he llegado, y parte de esta tesis es por vuestra culpa. Os quiero, aunque no os lo diga.

Acordarme de Marina y de Alba, dos luces que han iluminado mi camino desde hace unos años. Con un rato a vuestro lado conseguís apartar el nubarrón más negro del cielo, y me impregnáis de algo que, sin saber cómo se llama, me llena el corazón de felicidad. El mejor momento de la semana suele suceder a vuestro lado. Dar las gracias a mi hermano Ignacio. Cuando era pequeño, intentaba estudiar como tú, hablar como tú, ser como tú. Soy lo que soy gracias a ti. No podía haber tenido mejor hermano mayor. Gracias. Para mis padres, Matías y Rosa, habéis hecho que creciese rodeado de amor y me habéis llevado por el camino correcto. Me habéis empujado cuando tenía que andar, y me habéis frenado cuando tenía que parar. Las buenas decisiones que he tomado os las debo a vosotros, y las malas habéis hecho que sean para mejorar. Os quiero mucho.

Por último, dar las gracias a mi compañera de mi vida, a mi mitad. Pienso que las cosas importantes de la vida suelen ocurrir por casualidad, por detalles azarosos y por decisiones que llevan a la duda por bandera. El momento de conocer a Lucía fue una casualidad, todo lo sucedido después, no. Gracias por apoyarme en los malos

momentos, por aconsejarme y animarme, por aguantar momentos de impertinencia, por comprenderme como soy, por haber pasado tantas etapas distintas a mi lado y haber ido moldeándote en cada etapa para que fuéramos felices; en definitiva, gracias por cambiarme la vida. Sin ti esta tesis no habría terminado. El mejor regalo de nuestras vidas, coincidió con los últimos metros de este largo camino. Carlos, gracias por dar sentido a nuestras vidas, y por hacernos saber, que lo único importante eres tú.

"Con voluntad se puede todo. Yo soy lo que yo quiero"

La vida es bella, 1997

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1: CÁNCER DE PRÓSTATA	1
1.1 Epidemiología	1
1.2 Anatomía e histología de la próstata.....	2
1.3 Definición histopatológica y clasificación Tumor Node Metastasis (TNM).....	4
1.4 Diagnóstico y tratamiento.....	9
1.4.1 Detección temprana.....	9
1.4.2 Tacto rectal.....	10
1.4.3 Antígeno Prostático Específico (PSA).....	11
1.4.4 Ecografía y biopsia de próstata.....	12
1.4.5 Marcadores tumorales en cáncer de próstata.....	18
1.4.6 Modalidades de tratamiento en cáncer de próstata.....	26
CAPÍTULO 2: RESONANCIA MAGNÉTICA	29
2.1 Concepto básico de resonancia magnética	29
2.2 Aplicaciones biomédicas de la RMN.....	31
2.2.1 Espectroscopía por resonancia magnética (ERM).....	32
2.2.2 Espectroscopia de RMN de alta resolución por giro de ángulo mágico: High resolution magic angle spinning (HR-MAS) de muestras biológicas.....	33
2.3 La metabolómica en el ámbito de la oncología y el cáncer de próstata.....	37
2.3.1 HR-MAS en cáncer de próstata.....	38
2.3.2 Cuantificación de biomarcadores en orina mediante RMN. Uso en cáncer de próstata.....	40
2.3.3 Imagen por resonancia magnética (IRM). Papel de las técnicas de resonancia magnética en el diagnóstico, estadiaje y seguimiento del cáncer de próstata.....	42
2.3.4 Resonancia magnética morfológica.....	42
2.3.5 Resonancia magnética multiparamétrica.....	43
2.3.5.1 Resonancia magnética espectroscopía	43
2.3.5.2 Resonancia magnética difusión.....	44
2.3.5.3 Resonancia magnética perfusión	44
2.3.5.4 Detección multiparamétrica.....	44
2.3.6 Seguimiento activo y monitorización del tratamiento	47
2.3.7 Alteraciones metabólicas descritas en cáncer de próstata. Oportunidades diagnósticas y terapéuticas	48
2.3.7.1 Metabolismo de ácidos grasos (FA)	48
2.3.7.2 Metabolismo del Colesterol	49
2.3.7.3 Metabolismo del folato y metionina	51
2.3.7.4 Metabolismo de aminoácidos: glutaminólisis.....	51
2.3.7.5 Metabolismo de glucosa	52
2.3.8 Relevancia clínica.....	53
2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	59
2.1. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	57
3. OBJETIVOS.....	61
3.1 OBJETIVOS GENERALES	61
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	61
4. MATERIAL Y MÉTODOS	63

4.1 ESTUDIO POBLACIONAL Y PLANTEAMIENTO METODOLÓGICO	63
4.2 RECOGIDA DE MUESTRAS.....	66
4.2.1 <i>Biopsia transrectal</i>	68
4.2.2 <i>Muestra de orina</i>	71
4.3 ESTUDIO HISTOLÓGICO EN EL SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA.....	71
4.4 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA LA DETERMINACIÓN DEL PERFIL METABÓLICO MEDIANTE RMN.....	72
4.4.1 <i>Adquisición de los espectros de RMN</i>	74
4.4.1.1 Muestras de tejido prostático.....	74
4.4.1.2 Muestras de orina	75
4.4.2 <i>Procesado de los espectros</i>	76
4.4.2.1 Asignación de los espectros.....	76
4.4.2.2 Procesado de los datos	76
4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	77
4.5.1 <i>Datos poblacionales</i>	77
4.5.2 <i>Análisis de los datos metabólicos Análisis quimiométrico</i>	78

5. RESULTADOS 83

5.1 ANÁLISIS POBLACIONAL	83
5.1.1 <i>Características clínicas y demográficas de la muestra</i>	83
5.1.2. <i>Variables clínicas relacionadas con la patología prostática</i>	84
5.1.3. <i>Cilindros medidos por HR-MAS</i>	85
5.1.4 <i>Análisis comparativo entre grupos según características clínicas del tumor</i>	86
5.1.5 <i>Seguimiento de los pacientes diagnosticados de carcinoma de próstata</i>	88
5.1.6 <i>Casos con recidiva bioquímica</i>	90
5.2 CARACTERIZACIÓN METABÓLICA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA MEDIANTE METABOLÓMICA POR RMN.....	90
5.2.1. <i>Determinación de la huella metabólica por HR-MAS del cáncer de próstata en un cilindro obtenido mediante biopsia transrectal</i>	90
5.2.1.1 Análisis y asignación de espectros.....	91
5.2.2. <i>Análisis no supervisado: PCA, huella metabólica por HR-MAS del cáncer de próstata en un cilindro obtenido mediante biopsia transrectal con tru-cut</i>	93
5.2.2.1. Identificación de outliers.....	94
.....	97
5.2.2.2. Identificación de agrupaciones.....	98
5.2.3. <i>Análisis supervisado: PLS-DA, huella metabólica por HR-MAS del cáncer de próstata en un cilindro obtenido mediante biopsia transrectal</i>	99
5.2.4. <i>Validación cruzada, huella metabólica por HR-MAS del cáncer de próstata en un cilindro obtenido mediante biopsia transrectal</i>	101
5.2.5 <i>Perfil metabólico y vías metabólicas relacionadas con el tumor de próstata</i>	103
5.2.6 <i>Modelos con variables clínicas y perfil metabólico. Huella metabólica por HR-MAS del cáncer de próstata en un cilindro obtenido mediante biopsia transrectal</i>	107
5.3 IDENTIFICACIÓN DEL CARCINOMA PROSTÁTICO EN CUALQUIER LOCALIZACIÓN DENTRO DEL ÓRGANO, A PARTIR DEL PERFIL METABOLÓMICO POR HR-MAS DE UN SOLO CILINDRO DE PRÓSTATA	111
5.3.1 <i>Análisis no supervisado: PCA, identificación del carcinoma prostático, en cualquier localización dentro del órgano, a partir del perfil metabólico por HR-MAS de un solo cilindro de próstata</i>	112

5.3.2 <i>Análisis supervisado: PLS-DA, identificación del carcinoma prostático, en cualquier localización dentro del órgano, a partir del perfil metabólico por HR-MAS de un solo cilindro de próstata</i>	113
5.4 CAPACIDAD DE LA METABOLÓMICA POR HR-MAS PARA CONSTRUIR UN MODELO QUE PERMITA VALORAR LA AGRESIVIDAD DEL CÁNCER DE PRÓSTATA (SEGÚN GRADO DE GLEASON)	115
5.4.1 <i>Selección de la muestra y análisis preliminar: capacidad de la metabolómica por HR-MAS para construir un modelo que permita valorar la agresividad del cáncer de próstata</i>	116
5.4.2. <i>Análisis no supervisado: PCA, predicción de agresividad en cáncer de próstata</i>	119
5.4.3 <i>Análisis supervisado: PLS-DA, predicción de agresividad en cáncer de próstata</i>	120
5.4.4 <i>Validación cruzada, modelo metabólico de agresividad en cáncer de próstata</i>	123
5.4.5 <i>Perfil metabólico y vías metabólicas relacionadas con la agresividad en cáncer de próstata</i>	125
5.4.6 <i>Modelos con variables clínicas y perfil metabólico, capacidad de la metabolómica por HR-MAS para construir un modelo que permita valorar la agresividad del cáncer de próstata</i>	129
5.5 CAPACIDAD DE LA METABOLÓMICA POR HR-MAS PARA CONSTRUIR UN MODELO QUE PERMITA VALORAR LA RECIDIVA BIOQUÍMICA EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA	133
5.5.1 <i>Selección de la muestra: capacidad de la metabolómica por HR-MAS para construir un modelo que valore la recidiva bioquímica</i>	133
5.5.2 <i>Análisis no supervisado: PCA, capacidad de la metabolómica por HR-MAS para construir un modelo que valore la recidiva bioquímica en pacientes tratados</i>	134
5.5.3. <i>Análisis supervisado: PLS-DA, capacidad de la metabolómica por HR-MAS para construir un modelo que valore la recidiva bioquímica en pacientes tratados</i>	135
5.5.4. <i>Validación cruzada: modelo metabólico que valore la recidiva bioquímica</i>	136
5.5.5. <i>Perfil metabólico y vías relacionadas con la recidiva bioquímica</i>	138
5.5.6. <i>Modelos con variables clínicas y perfil metabólico, capacidad de la metabolómica por HR-MAS para predecir recidiva bioquímica</i>	142
5.6 CAPACIDAD DE DIAGNOSTICAR CÁNCER DE PRÓSTATA MEDIANTE PERFIL METABOLÓMICO EN ORINA	146
5.6.1 <i>Análisis y asignación de espectros</i>	147
5.6.2. <i>Análisis no supervisado: PCA, capacidad para diagnosticar cáncer de próstata mediante perfil metabólico en orina</i>	149
5.6.3. <i>Análisis supervisado: PLS-DA, capacidad para diagnosticar cáncer de próstata mediante perfil metabólico en orina</i>	151
5.6.4 <i>Optimización del modelo, capacidad para diagnosticar cáncer de próstata mediante perfil metabólico en orina</i>	153
5.6.5. <i>Modelos con variables clínicas y perfil metabólico. Capacidad para diagnosticar cáncer de próstata mediante perfil metabólico en orina</i>	156
5.7 CAPACIDAD PARA PREDECIR LA AGRESIVIDAD DEL CÁNCER DE PRÓSTATA MEDIANTE EL PERFIL METABÓLICO EN ORINA	159
5.7.1. <i>Análisis no supervisado: PCA, capacidad para predecir la agresividad del cáncer de próstata mediante el perfil metabólico en orina</i>	159
5.7.2. <i>Análisis supervisado: PLS-DA, capacidad para predecir la agresividad del cáncer de próstata mediante el perfil metabólico en orina</i>	161
5.7.3. <i>Optimización del modelo, capacidad para predecir la agresividad del cáncer de próstata mediante el perfil metabólico en orina</i>	163
5.7.4. <i>Modelos con variables clínicas y perfil metabólico. Capacidad para predecir la agresividad del cáncer de próstata mediante el perfil metabólico en orina</i>	166

5.8 CAPACIDAD PARA PREDECIR LA RECIDIVA BIOQUÍMICA EN CÁNCER DE PRÓSTATA MEDIANTE EL PERFIL METABÓLICO EN ORINA	169
5.8.1 Análisis no supervisado: PCA, capacidad para predecir la recidiva bioquímica en cáncer de próstata mediante el perfil metabólico en orina	169
5.8.2. Análisis supervisado: PLS-DA, capacidad para predecir la recidiva bioquímica en cáncer de próstata mediante el perfil metabólico en orina	170
5.9 PERFIL METABÓLICO Y VÍAS METABÓLICAS EN ORINA RELACIONADAS CON EL CÁNCER DE PRÓSTATA	175
6. DISCUSIÓN	185
6.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE UNA MUESTRA DE PACIENTES SOMETIDOS A BIOPSIA TRANSRECTAL DE PRÓSTATA EN NUESTRO HOSPITAL.....	185
6.2 CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS Y CLÍNICAS DE UNA MUESTRA DE PACIENTES SOMETIDOS A BIOPSIA TRANSRECTAL DE PRÓSTATA EN NUESTRO HOSPITAL	187
6.3. HUELLA METABÓLICA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA EN TEJIDO. RESULTADOS PUBLICADOS DIFERENCIANDO ENTRE CASOS CON Y SIN CÁNCER.....	191
6.4. HUELLA METABÓLICA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA EN TEJIDO. APORTACIONES RELEVANTES DE NUESTROS RESULTADOS.....	197
6.4.1 Metabolitos destacados	198
6.5 PERFIL METABÓLICO EN TEJIDO PARA PREDECIR LA AGRESIVIDAD DEL CÁNCER DE PRÓSTATA. RESULTADOS PUBLICADOS	204
6.6 PERFIL METABÓLICO EN TEJIDO PARA PREDECIR LA AGRESIVIDAD DEL CÁNCER DE PRÓSTATA. RELEVANCIA DE NUESTROS RESULTADOS	208
6.6.1 Metabolitos destacados y vías metabólicas en tejido relacionadas con la agresividad cáncer de próstata. Nuestros resultados.....	210
6.7 PERFIL METABÓLICO EN TEJIDO PARA PREDECIR LA RECIDIVA BIOQUÍMICA. RELEVANCIA DE NUESTROS RESULTADOS	213
6.7.1 Metabolitos destacados y vías metabólicas en tejido relacionadas con la recidiva bioquímica. Nuestros resultados.	215
6.8 PERFIL METABÓLICO EN TEJIDO PARA PREDECIR LA PRESENCIA DE CÁNCER EN CUALQUIER LOCALIZACIÓN DE LA PRÓSTATA	216
6.9 BIOMARCADORES METABÓLICOS DE CÁNCER DE PRÓSTATA EN ORINA	219
6.9.1 Metabolismo en orina para diagnosticar cáncer de próstata	220
6.9.2 Metabolismo en orina según agresividad tumoral y según recidiva bioquímica	222
6.10 UTILIDAD DE LOS NOMOGRAMAS CLÍNICOS Y MODELOS PREDICTIVOS EN CÁNCER DE PRÓSTATA	225
6.10.1 Modelos utilizados en la práctica clínica habitual	225
6.10.2 Marcadores presentes y futuros en la práctica clínica	229
6.11 COMPARACIÓN DE NUESTROS MODELOS EN ORINA CON LOS MARCADORES Y MODELOS DESCRITOS	231
6.11.1 Marcadores y modelos para predecir la presencia de cáncer	232
6.11.2 Marcadores y modelos para predecir cáncer de próstata de alto riesgo (Gleason mayor de 7)	235
6.11.3 Modelos para predecir recidiva bioquímica en cáncer de próstata.....	238
6.12 PROYECCIONES DEL ESTUDIO. PERSPECTIVAS FUTURAS	240
7. CONCLUSIONES.....	249

8. BIBLIOGRAFÍA.....	251
9. ANEXOS.....	251
ANEXO I. PARÁMETROS ESPECTRALES	275
ANEXO II: CONSENTIMIENTO INFORMADO Y APROBACIONES DE COMITÉS.....	275
ANEXO III: ANÁLISIS DE DATOS METABOLÓMICOS Y LA INTERPRETACIÓN DEL ANÁLISIS DE LAS CURVAS ROC.....	283
ANEXO IV: NIVELES PROMEDIOS DE METABOLITOS EN EL ESTUDIO	251

ÍNDICE DE TABLAS

1. INTRODUCCIÓN 1

Tabla 1. Sistema Gleason modificado de la Sociedad Internacional de Patología Urinaria, año 2005 (17).....	6
Tabla 2. Equivalencia entre grados de la International Society of Urological Pathology y la escala Gleason, año 2014 (18).....	7
Tabla 3. Clasificación Tumour Node Metastasis (TNM) para el cáncer de próstata (19).	8
Tabla 4. Marcadores tumorales relacionados con el cáncer de próstata.	19
Tabla 5. Ventajas e inconvenientes de la RMN funcional multiparamétrica en el cáncer de próstata (133).....	45
Tabla 6. Criterios de imagen paramétrica en RM del cáncer de próstata (133)	46

4. MATERIAL Y MÉTODOS 63

Tabla 7. Diferentes anticuerpos y su descripción utilizados para el estudio inmunohistoquímico de las muestras (168).	72
--	----

5. RESULTADOS 83

Tabla 8. Características clínicas y demográficas de los varones sometidos a biopsia prostática.	83
Tabla 9. Variables clínicas relacionadas con la patología prostática.....	84
Tabla 10. Concordancia entre el resultado histológico (positividad/negatividad para carcinoma) del cilindro HR-MAS y el de la biopsia estándar.	86
Tabla 11. Grados de Gleason en los cilindros HR-MAS (26 de los 56 positivos para carcinoma).	86
Tabla 12. Análisis comparativo entre variables clínicas en pacientes con y sin tumor.	87
Tabla 13. Análisis comparativo entre pacientes sanos, casos con Gleason 6-7 y los casos con Gleason 8-9.	88
Tabla 14. Manejo terapéutico tras biopsia de los 107 casos de carcinoma.....	89
Tabla 15. Datos de los casos intervenidos de prostatectomía radical (38 de los 41 casos). ...	89
Tabla 16. Matriz de confusión para el modelo PLS-DA, enfermos y sanos según histología del cilindro HR-MAS.	103
Tabla 17. Metabolitos identificados con VIP score > 1 y vías metabólicas asociadas en muestras de tejido	103
Tabla 18. Análisis univariante de los cinco metabolitos con VIP score >2 en el modelo PLS-DA discriminatorio entre enfermos y sanos según histología del cilindro HR-MAS.	106
Tabla 19. Análisis multivariante. Regresión logística binaria incluyendo los metabolitos con tendencia a diferencias estadísticamente significativas en el análisis univariante previo....	106
Tabla 20. Análisis univariante. Diferencias en las variables clínicas entre los dos grupos de estudio (enfermos y sanos según histología del cilindro HR-MAS).....	108
Tabla 21. Análisis multivariante. Regresión logística binaria incluyendo las variables clínicas con diferencias estadísticamente significativas en el análisis univariante previo	108

Tabla 22. Análisis multivariante. Regresión logística binaria conjunta incluyendo variables clínicas y metabolitos	109
Tabla 23. Valores de AUC, sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo obtenidos a partir de las curvas ROC en los tres modelos calculados enfermos-sanos según histología del cilindro HR-MAS.	110
Tabla 24. Matriz de confusión para el modelo PLS-DA, casos con Gleason 6-7 frente a Gleason 8+9+10 en el cilindro HR-MAS.	125
Tabla 25. Metabolitos con VIP score por encima de 1 en tejido y las rutas metabólicas implicadas (estudio de agresividad tumoral según Gleason del cilindro HR-MAS).....	126
Tabla 26. Análisis univariante. Diferencias de áreas promedios entre los metabolitos que más contribuyeron a la discriminación del modelo.....	128
Tabla 27. Análisis multivariante. Regresión logística binaria incluyendo los metabolitos con más influencia en el PLS-DA.	129
Tabla 28. Análisis univariante. Diferencias entre características clínicas de los dos grupos a estudio	130
Tabla 29. Análisis multivariante. Regresión logística binaria incluyendo las variables clínicas con tendencia a diferencias estadísticamente significativas en el análisis univariante previo	130
Tabla 30. Análisis multivariante. Regresión logística binaria incluyendo variables clínicas y metabolitos	131
Tabla 31. Resultados de las curvas ROC en los tres modelos calculados a partir de diferentes variables con el objetivo de construir un modelo que permita valorar la agresividad del cáncer de próstata.	132
Tabla 32. Metabolitos con VIP score por encima de 1 en tejido y las rutas metabólicas implicadas (estudio de recidivas bioquímicas con HR-MAS).	138
Tabla 33. Análisis univariante. Diferencias de niveles promedios entre los casos con y sin recidiva bioquímica durante el seguimiento.	141
Tabla 34. Análisis multivariante. Regresión logística binaria incluyendo los metabolitos con mayor valor VIP score en el PLS-DA.....	141
Tabla 35. Análisis univariante. Diferencias entre características clínicas de los dos grupos a estudio (casos con y sin recidiva bioquímica).....	142
Tabla 36. Análisis multivariante. Regresión logística binaria incluyendo las variables clínicas con tendencia a diferencias estadísticamente significativas en el análisis univariante previo (casos con y sin recidiva bioquímica).....	143
Tabla 37. Análisis multivariante. Regresión logística binaria incluyendo variables clínicas y metabolitos (casos con y sin recidiva bioquímica).	143
Tabla 38. Resultados de las curvas ROC en los tres modelos calculados.....	144
Tabla 39. Metabolitos con VIP score por encima de 1 en orina y las rutas metabólicas implicadas (estudio para distinguir enfermos y sanos).	154
Tabla 40. Matriz de confusión para el modelo derivado de los metabolitos en orina con VIP score por encima de 1 (análisis enfermos - sanos).....	156
Tabla 41. Análisis univariante. Diferencias entre las variables clínicas estudiadas (enfermos y sanos según histología de cilindro HR-MAS y de le biopsia estándar).	156
Tabla 42. Análisis multivariante. Diferencias entre las variables clínicas estudiadas (enfermos y sanos según histología de cilindro HR-MAS y de le biopsia estándar).....	157

Tabla 43. Resultados de las curvas ROC en los tres modelos calculados.....	159
Tabla 44. Metabolitos con VIP score por encima de 1 en orina y las rutas metabólicas implicadas	164
Tabla 45. Matriz de confusión para el modelo derivado de los metabolitos en orina con VIP score por encima de 1 (análisis Gleason 6-7 frente a Gleason 8 o mayor).	165
Tabla 46. Análisis univariante. Diferencias entre las variables clínicas estudiadas (Gleason 6-7 frente a 8 o mayor).	166
Tabla 47. Análisis multivariante. Diferencias entre las variables clínicas estudiadas (Gleason 6-7 frente a 8 o mayor).	167
Tabla 48. Resultados de las curvas ROC en los tres modelos calculados.....	168
Tabla 49. Metabolitos con VIP score por encima de 1 en orina y las rutas metabólicas implicadas	172
Tabla 50. Matriz de confusión para el modelo derivado de los metabolitos en orina con VIP score por encima de 1 (análisis enfermos - sanos).....	174
Tabla 51. Análisis univariante. Diferencias entre las variables clínicas estudiadas (análisis de recidivas bioquímicas).....	174
Tabla 52. Análisis multivariante. Diferencias entre las variables clínicas estudiadas (análisis de recidivas bioquímicas).....	175

6. DISCUSIÓN 185

Tabla 53. Estudios en los que se ha utilizado una sonda de HR-MAS para distinguir entre tejido con y sin cáncer de próstata.....	196
Tabla 54. Estudios en los que se ha utilizado una sonda de HR-MAS para distinguir estudiar la agresividad del cáncer de próstata.....	207
Tabla 55. Estudios de metabolómica centrados en el análisis de orina para identificar biomarcadores en cáncer de próstata (ordenados cronológicamente).....	224
Tabla 56. Valores de área bajo la curva de diferentes modelos utilizados en la práctica clínica para el diagnóstico de cáncer de próstata	234
Tabla 57. Áreas bajo la curva de diferentes modelos para predecir cáncer de próstata de alto riesgo (Gleason mayor de 7).....	236
Tabla 58. Áreas bajo la curva de diferentes modelos para predecir recidiva bioquímica en cáncer de próstata.	239

ÍNDICE DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN	1
Figura 1. Anatomía de la glándula prostática según las zonas propuestas por McNeal.	3
Figura 2. Imágenes microscópicas de cilindros prostáticos obtenidos mediante biopsia transrectal y teñidos con hematoxilina eosina	5
Figura 3. Imágenes ecográficas de zonas prostáticas hipoecoicas, sospechosas de malignidad.....	14
Figura 4. Diferentes esquemas de biopsia.....	16
Figura 5. Efecto en la orientación del momento magnético de un núcleo atómico con un número cuántico (l) de 1/2 sometido a un campo magnético (B ₀)	29
Figura 6. Modelo de magnetización microscópica	30
Figura 7. Obtención de un espectro a partir de una FID utilizando la transformada de Fourier. Tomada de (103)	31
Figura 8. "Ángulo mágico" formado dentro de la sonda HR-MAS entre la orientación de la turbina para el giro de la muestra alrededor del eje longitudinal de la turbina y el campo magnético principal (B ₀).	34
Figura 9. Membrana de intercambio de aniones en solución de metanol, mostrándose el efecto de la velocidad de giro en HR-MAS sobre dicha muestra	35
Figura 10. Anatomía en corte axial ponderado en T2.....	43
Figura 11. Imagen multiparamétrica del cáncer de próstata.....	46
4. MATERIAL Y MÉTODOS	63
Figura 12. Diagrama de flujo mostrando el planteamiento metodológico del estudio.	63
Figura 13. Diagrama de flujo mostrando el procedimiento de recogida de muestras y su posterior envío al Laboratorio de Imagen Molecular y Metabolómica y al Servicio de Anatomía Patológica.	67
Figura 14. Esquema de biopsia seguido en el Servicio de Urología del Hospital Clínico Universitario.....	69
Figura 15. Material utilizado en el Laboratorio de Imagen Molecular y Metabolómica para el procesamiento de las muestras	73
Figura 16. Material utilizado en el Laboratorio de Imagen Molecular y Metabolómica para la medición de las muestras.....	75
5. RESULTADOS	83
Figura 17. Espectros promedio de ¹ H-HR-MAS PRESAT	92
Figura 18. Gráfico T2 de Hotelling obtenido del análisis PCA de los espectros de ¹ H-HR-MAS PRESAT de las muestras de tejido de próstata	96
Figura 19. Gráfico de barras con la comparación de los niveles metabólicos.....	97
Figura 20. Diagrama de puntos del PCA obtenido del análisis PCA de los espectros de ¹ H-HR-MAS PRESAT	98
Figura 21. Estudio de errores de clasificación para la selección del número óptimo de variables latentes del modelo PLS-DA de tejido de próstata tumorales respecto a sano.....	100

Figura 22. Diagrama de puntos obtenido del análisis PLS-DA de los espectros de 1H-HR-MAS PRESAT	101
Figura 23. Curvas ROC obtenidas del modelo PLS-DA que discrimina entre enfermos y sanos según histología del cilindro HR-MAS.....	102
Figura 25. Valores VIP score de los 5 metabolitos con mayor contribución al modelo discriminatorio PLS-DA entre enfermos y sanos según histología del cilindro HR-MAS	105
Figura 26. Curvas ROC obtenidas de los diferentes modelos multivariantes (enfermos o sanos según histología del cilindro HR-MAS).	110
Figura 27. Diagrama de puntos obtenido del análisis PCA de los espectros de ¹ H-HR-MAS PRESAT	113
Figura 28. Diagrama de puntos obtenido del análisis PLS-DA de los espectros de ¹ H-HR-MAS PRESAT	114
Figura 29. Diagrama de puntos obtenido del análisis PCA de los espectros de ¹ H-HR-MAS PRESAT	117
Figura 30. Diagrama de puntos obtenido del análisis PLS-DA de los espectros de ¹ H-HR-MAS PRESAT	118
Figura 31. Diagrama de puntos obtenido del análisis PCA de los espectros de 1H-HR-MAS PRESAT	120
Figura 32. Diagrama de puntos obtenido del análisis PLS-DA de los espectros de 1H-HR-MAS PRESAT	121
Figura 33. Curvas ROC obtenidas del modelo PLS-DA que discrimina entre las muestras de tejido de próstata agrupadas como grupos Gleason 6+7 y Gleason 8+9+10 según histología del cilindro HR-MAS.	124
Figura 35. Valores VIP score de los metabolitos con mayor contribución al modelo discriminatorio PLS-DA entre Gleason 6+7 frente a Gleason 8+9+10 según la histología del cilindro HR-MAS.	128
Figura 36. Curvas ROC obtenidas para los diferentes modelos multivariantes ensayados con el objetivo de construir un modelo que permita valorar la agresividad del cáncer de próstata	132
Figura 37. Diagrama de puntos obtenido del análisis PCA de los espectros de ¹ H-HR-MAS PRESAT	135
Figura 38. Diagrama de puntos obtenido del análisis PLS-DA de los espectros de ¹ H-HR-MAS PRESAT	136
Figura 41. Valores VIP score de los metabolitos seleccionados con mayor contribución al modelo discriminatorio PLS-DA entre casos con y sin recidiva bioquímica según el perfil metabolómico del cilindro HR-MAS.	140
Figura 42. Curvas ROC obtenidas de los diferentes modelos multivariantes construidos para la predicción de recidiva bioquímica.	145
Figura 43. Asignación de las señales más representativas en un espectro 1H-RMN PRESAT	148
Figura 44. Diagrama de puntos obtenido del análisis PCA de los espectros de ¹ H PRESAT de las muestras de orina para los casos enfermos y sanos	151
Figura 45. Análisis en orina. Diagrama de puntos del PLS-DA, casos enfermos y sanos	152
Figura 46. Curvas ROC obtenidas del modelo PLS-DA que discrimina entre enfermos y sanos según perfil metabólico en orina.....	153

Figura 47. Curva ROC obtenida del modelo con los metabolitos en orina con VIP score por encima de 1	155
Figura 48. Curvas ROC obtenidas de los diferentes modelos multivariantes en orina para la detección de cáncer de próstata.	158
Figura 49. Diagrama de puntos obtenido del análisis PCA de los espectros de 1H PRESAT de las muestras de orina para los casos con Gleason 6-7 frente a casos con Gleason 8 o mayor	161
Figura 50. Diagrama de puntos obtenido del análisis PLS-DA de los espectros de 1H PRESAT de las muestras de orina para discriminar entre casos con Gleason 6-7 frente a casos con Gleason 8 o mayor	162
Figura 51. Curva ROC derivada modelo PLS-DA que discrimina entre Gleason 6-7 y Gleason 8 o mayor según perfil metabólico en orina	163
Figura 53. Curvas ROC obtenidas de los diferentes modelos multivariantes en orina para la predicción de la agresividad del tumor de próstata	167
Figura 54. Diagrama de puntos obtenido del análisis PCA de los espectros de 1H PRESAT de las muestras de orina para casos con recidiva bioquímica frente a casos sin recidiva	170
Figura 55. Diagrama de puntos obtenido del análisis PLS-DA de los espectros de 1H PRESAT de las muestras de orina para casos con recidiva bioquímica frente a casos sin recidiva. ...	171
Figura 56. Curva ROC obtenida del modelo con los metabolitos en orina con VIP score por encima de 1 (curva azul),.....	173
Figura. 57. Rutas metabólicas relacionadas con la presencia de cáncer de próstata en tejido y orina.	63

ÍNDICE DE ECUACIONES

1. INTRODUCCIÓN	1
Ecuación 1. Relación entre la diferencia de energía entre estados del espín	29
Ecuación 2. Valor de las interacciones dipolares entre núcleos 1 y 2.....	33
4. MATERIAL Y MÉTODOS	63
Ecuación 3. Fórmula empleada para el cálculo del tamaño muestral	64

ABREVIATURAS

1D: una dimensión

A2M: α_2 -macroglobulina

ACAC: quelato acetilacetato

ACT: α_1 -antiquimiotripsina

ADC: coeficiente de difusión aparente

ADN: ácido desoxiribonucleico

AKT: protein quinasa activada

AMACR: alfa-metilacil-CoA racemasa

AMBP1: Alpha-1-Microglobulin/Bikunin Precursor

AMP_c: adenosín monofosfato cíclico

AMPK: protein quinasa AMP-activada

ANOVA: Análisis de la varianza con un factor

API: el inhibidor de α_1 - proteasa

ARN: ácido ribonucleico

ATP: adenosín trifosfato

AUC: área bajo la curva

Bcl-2: *B cell lymphoma 2*

BGLAP: *Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein*

C18-CH3: colesterol

CCP: *Cell Cycle Progression*

CD45: cúmulo de diferenciación 45

CDK6: proteína quinasa de división celular 6

Ch: charrier

CHMP4A: proteína 4a del cuerpo multivesicular cargada

CHMP4C: proteína 4c del cuerpo multivesicular cargada

col.: colaboradores

CPRC: cáncer de próstata resistente a la castración

CV: validación cruzada

CYP3A: citocromo p3A

CYP17: citocromo p17

DE: desviación estándar

DD3: proteína D-Dimer anticuerpo

DM: diabetes mellitus

DL: dislipemia

DLX1: *Distal-Less Homeobox 1*

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidémico

ERG: factor de transcripción ERG

ERM: espectroscopía por resonancia magnética

ERSPC: *European Randomized Trial of Prostate Cancer Screening*

ETS: factor de transcripción familia E

FA: ácidos grasos

FID: decaimiento libre de la señal

fPSA: PSA libre

GLUT1: transportador de glucosa 1

GSMT1: Glutación S-transferasa Mu 1

GSTP1: Glutación-S-transferasa P1

GSTT1: glutación S-transferasa theta-1

hK2: calicreína h2

HBP: Hiperplasia benigna de próstata

HDL: *high density lipoprotein*

HIF-1 α : subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia

HIFU: ultrasonidos focalizados de alta intensidad

HK1: hexoquinasa 1

HK2: hexoquinasa 2

HOXC6: proteína Homeobox Hox-C6

HR-MAS: *high resolution magic angle spinning*

HTA: hipertensión arterial

IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1

IMC: índice de masa corporal

IRM: imagen por resonancia magnética

ISUP: *International Society of Urological Pathology*

Ki-67: antígeno nuclear 67

KLK2: *Kallikrein Related Peptidase 2*

FABP-5: proteína de unión a ácidos grasos 5

fPSA: antígeno prostático específico libre

GLUT-1: transportador de glucosa 1

IC: intervalo de confianza

KLK 3: calicreína 3

KLK4: calicreína 4

KLK11: calicreína 11

KLK14: calicreína 14

KLK15: calicreína 15

LDHC: glucolítica lactato deshidrogenasa C

LDL: *low density lipoprotein*

LV: variables latentes

M2BP: mac-2 binding protein

micro-RNA: micro ácido ribonucleico

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

MSKCC: *Memorial Sloan-Kattering Cancer*

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NMP48: proteína de matriz nuclear 48

OR: *odds ratio*

p53: proteína 53

p63: proteína 63

PCA: análisis de componentes principales

PCA3: antígeno de cáncer de próstata 3

PCPT: *Prostate Cancer Prevention Trial*

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PCs: componentes principales

PFK2: fosfofructoquinasa-2

PHI: *Prostate Health Index*

PIN: neoplasia intraepitelial

PI-RADS: *prostate imaging reporting and data system*

PLCO: *Prostate, Lung, Colon and Ovary*

PLS-DA: Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales

PRESS: *predictive residual sum of squares*

proPSA: pro antígeno prostático específico

PSA: antígeno prostático específico

PSAd: densidad de antígeno prostático específico

PSAM: antígeno prostático específico de membrana

PTEN: fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa

RASSF1A: isoforma A de la proteína de la familia con dominio de asociación RAS

REDUCE: *Reduction by DUtasteride of prostate Cancer Events*

RMC: perfusión con contraste dinámico

RMD: difusión por resonancia magnética

RME: espectroscopía por resonancia magnética

RMN: resonancia magnética nuclear

RMNmp: resonancia magnética nuclear multiparamétrica

RMSECV: raíz cuadrada del error cuadrático medio

ROC: Receiver operating characteristic

RTU: resección transuretral

SCD1: *stearoyl-CoA desaturase-1*

SCE: supervivencia cáncer específica

SG: supervivencia global

SLM: supervivencia libre de metástasis

SLRB: supervivencia libre de recidiva bioquímica

SNAIL: *Zinc finger protein SNAI1*

SNP: polimorfismos de un solo nucleótido

SRBEP: *Sterol regulatory element-binding proteins*

SSB: *Spinning side bands*

SULT1A1: sulfotransferasa 1A1

TCA: ciclo de los ácidos tricarboxílicos

TLR4: receptor 4 tipo Toll

TMPRSS2: proteasa transmembrana, serina 2

TNM: *Tumor Node Metastasis*

tRNA: RNA de transferencia

TSP: trimetilsilil propiónico

TWIST1: *Twist Family BHLH Transcription Factor 1*

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

VIP: *Variable Important in the Projection*

VLDL: *very low density lipoproteins*

VPN: valor predictivo negativo

VPP: valor predictivo positivo

WMA: *World Medical Association*

ZGPR: pulsos de presaturación de agua

1. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1: CÁNCER DE PRÓSTATA

1.1 Epidemiología

En estudios demográficos que recogen datos a nivel mundial, se concluye que las tasas de incidencia muestran al cáncer de próstata como el quinto cáncer más común en todo el mundo y el segundo en hombres. Esta neoplasia constituye el 11,7% de los cánceres nuevos a nivel mundial, el 19% en los países desarrollados y el 5,3% en los países en vías de desarrollo. Su incidencia varía de forma notable entre diferentes países y poblaciones étnicas, llegando a diferir las tasas de incidencia más de 100 veces entre diferentes poblaciones. Por ejemplo, la tasa de incidencia anual más baja se registra en Asia (1,9:100.000, en China) y la más alta en Norteamérica y Escandinavia, sobre todo en afroamericanos (249:100.000). Los principales causantes del aumento en la incidencia de este tumor son la introducción del cribado poblacional mediante el uso del antígeno prostático específico (PSA) y el diagnóstico de carcinomas latentes localizados tras la resección transuretral (RTU) de próstata (1). Entre todos los países que forman la Unión Europea, se ha descrito una tasa anual de nuevos diagnósticos de cáncer de próstata de 450.000 casos (2)

En Estados Unidos, desde mitad de la década de los 80 el cáncer de próstata se ha considerado como el cáncer no cutáneo más común en hombres, llegando a representar hoy en día un cuarto de todos estos cánceres, y con mayor prevalencia que el cáncer de pulmón o el colorrectal (3). El riesgo estimado de padecer esta enfermedad en pacientes americanos se ha establecido en un 16,72% para cualquier edad, con un riesgo de muerte del 2,57% en la población general de varones. Estos datos señalan la diferencia que existe en cuanto a incidencia y mortalidad en esta neoplasia, hecho que está relacionado la historia natural del cáncer de próstata, y que se caracteriza habitualmente por un periodo largo de años desde el diagnóstico hasta la muerte. Además, los programas de cribado actuales también favorecen el bajo riesgo de mortalidad, como se explica más adelante.

Por otra parte, según datos de la Sociedad Española de Oncología Médica, el cáncer de próstata fue la neoplasia maligna más frecuente y prevalente en España en 2020 (4, 5). Se diagnosticaron 27.853 nuevos casos de próstata en España y 399.964 en Europa durante este período, con una tasa de incidencia estandarizada por edad y mortalidad por 100.000 habitantes de 96,8 y 15,2 en España, y 92,1 y 19,3 en Europa, respectivamente. Las predicciones pronostican que se detectarán aproximadamente 33.000 y 455.732 casos nuevos en España y Europa, respectivamente, en los próximos años. Aproximadamente, el 30% de los pacientes con carcinoma de próstata desarrollarán una enfermedad avanzada, y eventualmente muchos desarrollarán una enfermedad progresiva, un estado llamado cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC)(6).

La mortalidad también varía ampliamente entre países, encontrándose la más alta en países del Caribe (28:100.000/año) y la más baja en el sudeste asiático, China y norte de África (menor de 5:100.000/año). También varía mucho la supervivencia estandarizada por edad a los 5 años del diagnóstico, oscilando entre 80% o más en Estados Unidos, Australia y Canadá, y menos del 40% en Dinamarca, Polonia o Argelia. Estas variaciones en datos de mortalidad pueden deberse a la diferencia en el acceso a los cuidados de salud, la calidad de éstos, la precisión de los registros de cáncer o la mayor o menor implantación de cribado con PSA. La gran variabilidad en las estrategias de tratamiento y los efectos medioambientales también se han descrito como influyentes en la mortalidad por esta neoplasia (7). En España, estudios recientes arrojan una tasa de mortalidad de 15,2 casos por 100.000 habitantes/año. En un estudio de 2018 con datos de 185 países de todo el mundo, el cáncer de próstata abarca el 7,1% de las muertes por neoplasia, sólo siendo superado en varones por el cáncer de pulmón (18,4%) (1, 8-10).

1.2 Anatomía e histología de la próstata

La próstata es un órgano fibromuscular y glandular que se encuentra situado por debajo de la vejiga y por encima de la musculatura que forma el suelo pélvico (11). Su objetivo es intervenir en la función eyaculatoria para lograr una eyaculación anterógrada y aportar sustancias como iones y enzimas al líquido seminal. En su

interior se encuentra la uretra prostática, de unos 2,5 cm de longitud. Anteriormente se encuentra sostenida por los ligamentos puboprostáticos, y caudalmente por el diafragma urogenital. Este órgano se encuentra perforado en la parte posterior por los conductos eyaculadores, los cuales la atraviesan para desembocar en el suelo de la uretra a través del *veru montanum*, proximalmente al esfínter urinario externo (11, 12).

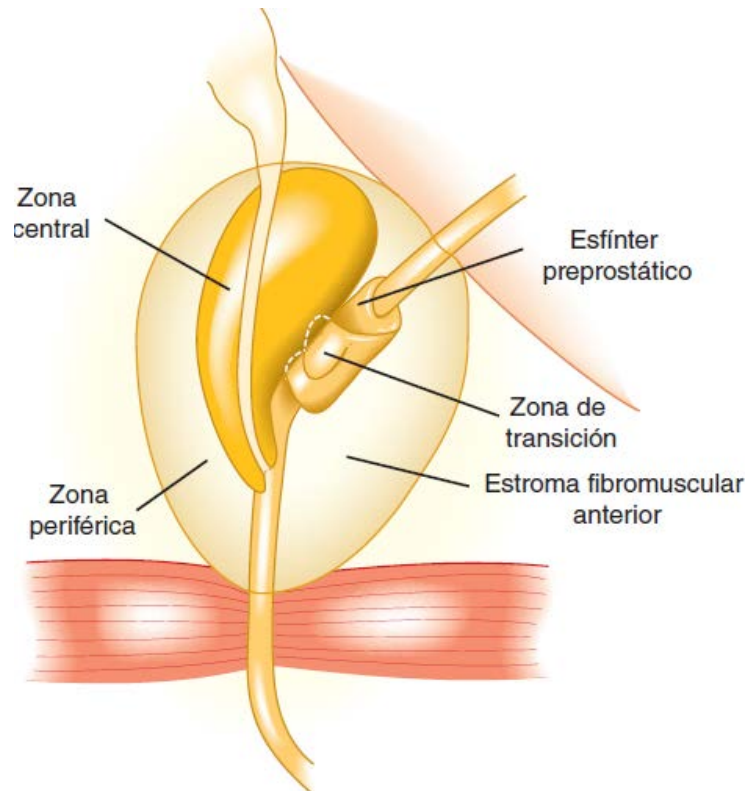


Figura 1. Anatomía de la glándula prostática según las zonas propuestas por McNeal.

El componente glandular se distribuye en tres zonas: zona de transición, central y periférica. La zona central corresponde al 25% del tejido glandular, tratándose de una estructura cuneiforme con base en la vejiga y vértice en la uretra. La zona de transición se sitúa alrededor de la uretra proximal hasta su inflexión con la porción distal, por lo que se distribuye en dos partes laterales, representando un 5-10% de la glándula. La zona periférica constituye el 70% del componente glandular, y constituye tanto el ápex prostático como la zona accesible por tacto rectal. Adaptada de: McAninch JW LT. Urología general. 18 ed: McGraw Hill; 2014. (13).

Según la clasificación zonal propuesta por McNeal en 1972 (14), la próstata se divide en una zona periférica, una zona central y otra de transición; una zona anterior, y una zona esfintérica periprostática (figura 1). Dentro de la glándula se encuentra incorporada gran cantidad de musculatura lisa derivada de la musculatura vesical

longitudinal externa. Esta musculatura es la que formará el esfínter involuntario liso de la uretra posterior en los hombres (12). La próstata es una delgada cápsula fibrosa debajo de la cual se encuentra fibras musculares lisas orientadas en forma circular y tejido colágeno que rodea a la uretra (esfínter involuntario). En lo profundo de esta capa se encuentra el estroma prostático, compuesto por tejidos conjuntivo y elástico, y fibras musculares lisas en las cuales están alojadas las glándulas epiteliales. Estas glándulas drenan en los conductos excretores principales (unos 25 en total), los cuales se abren principalmente en el suelo de la uretra, entre el *veru montanum* y el cuello vesical. Justo por debajo del epitelio de transición de la uretra prostática se encuentran las glándulas periuretrales (12).

1.3 Definición histopatológica y clasificación Tumor Node Metastasis (TNM)

Se calcula que en más del 80% de los tumores de próstata no palpables y diagnosticados mediante biopsia, la masa tumoral más grande se encuentra situada en la zona periférica. En los otros casos, los tumores suelen asentarse en las zonas de transición y central(15). Otra característica anatomopatológica de esta neoplasia es la multifocalidad, afectando diferentes localizaciones a la vez en más del 85% de los casos. En cuanto al volumen tumoral, éste varía mucho en cada caso. De forma habitual, el tamaño del carcinoma prostático suele asociarse con su estadio. Se ha postulado, por ejemplo, que tumores menores de 0,5 cc afectan de forma infrecuente a los tejidos extraprostáticos, y los menores de 4 cc no suelen presentar afectación adenopática o invasión de las vesículas seminales. El volumen tumoral, también suele ser proporcional al grado (el cual se describe más adelante) (15).

El sistema de gradación más ampliamente aceptado para este tumor es el sistema de Gleason (16). Se trata de un sistema basado en el patrón glandular de la neoplasia, identificado con bajo aumento microscópico. Por otro lado, las características citológicas no son utilizadas en la gradación del tumor. Los patrones arquitectónicos primario (predominante) y secundario (el segundo en prevalencia) son clasificados mediante la asignación de un grado, de 1 a 5. El 1 será el grado más diferenciado y 5 el menos diferenciado (figura 2).

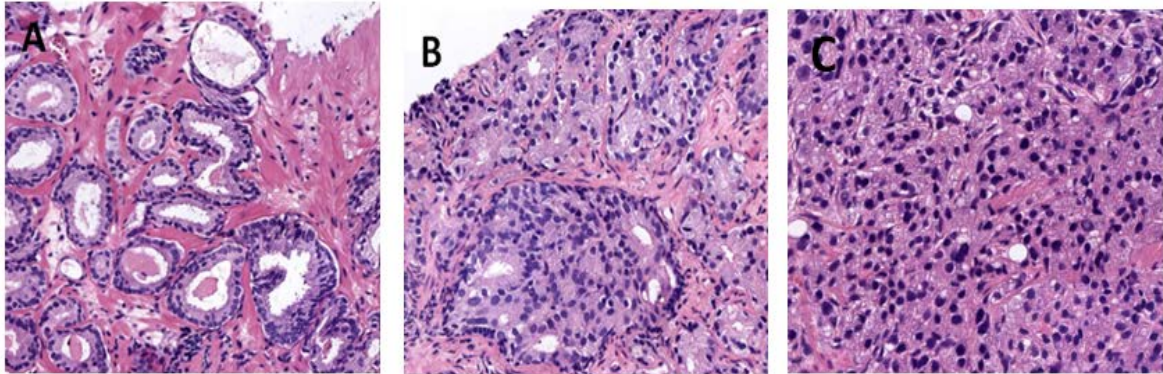


Figura 2. Imágenes microscópicas de cilindros prostáticos obtenidos mediante biopsia transrectal y teñidos con hematoxilina eosina. Pueden observarse: A) una muestra con grado Gleason 3 donde se aprecian las unidades glandulares separadas, con infiltración tumoral en y entre acinos prostáticos; B) una muestra Gleason 4, con un patrón cribiforme. Otras glándulas como las microacinares fusionadas o glándulas mal definidas con lumen glandular mal formado también son características del Gleason 4; y finalmente, C) una muestra Gleason 5, con ausencia de diferenciación de glandular, compuesta por láminas sólidas, cordones o células aisladas. (Imágenes cortesía de la Dra. Sales Maicas, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínico Universitario de Valencia).

Hoy en día se considera carcinoma aquellas muestras con patrones de Gleason 3 o mayores. Debido a que los patrones primario y secundario afectan al pronóstico, existe una suma o puntuación de Gleason que se obtiene de sumar los grados primario y secundario. En caso de que el tumor tenga sólo un patrón histológico, por razones de uniformidad a los patrones primario y secundario se les asigna el mismo grado. En caso de coexistir más de dos patrones, el Gleason está formado por el sumatorio del patrón más frecuente y del más alto, independientemente de su extensión.

Tabla 1. Sistema Gleason modificado de la Sociedad Internacional de Patología Urinaria, año 2005 (17).

Patrón 1	Nódulo circunscrito o nódulos separados pero estrechamente agrupados, uniformes, redondeados u ovals y con acinos de tamaño mediano (glándulas más grandes que las del patrón 3).
Patrón 2	Igual que el patrón 1, bastante circunscrito, aunque un nódulo en el borde del tumor puede ser mínimamente infiltrativo. Las glándulas tienen una disposición más laxa y no son tan uniformes como en el patrón de Gleason 1.
Patrón 3	Unidades glandulares separadas. Glándulas típicamente más pequeñas que las observadas en los patrones Gleason 1 y 2. Variación marcada de tamaño y forma.
Patrón 4	Glándulas microacinares fusionadas. Glándulas mal definidas con lumen glandular mal formado. Glándulas cribiformes grandes. Hipernefromatoide.
Patrón 5	Esencialmente, ausencia de diferenciación glandular; compuesta por láminas sólidas, cordones o células aisladas. Comedocarcinoma con necrosis central, rodeado por masas papilares, cribiformes o sólidas.

Desde 2014, la International Society of Urological Pathology (ISUP), agrupó las diferentes puntuaciones de Gleason en 5 grados, simplificando la clasificación. De este modo se pretende asemejar la clasificación del carcinoma de próstata con el de otros cánceres, a la vez que se consigue agrupar a todos los tumores bien diferenciados en el mismo grado o se diferencian los diferentes Gleason 7, los cuales tienen una evolución diferente. La descripción de los diferentes patrones de Gleason puede observarse en la tabla 1, y los grados de la ISUP en la tabla 2.

Tabla 2. Equivalencia entre grados de la International Society of Urological Pathology y la escala Gleason, año 2014 (18).

PUNTUACIÓN DE GLEASON	GRADO DE LA ISUP*
2 - 6	1
7 (3+4)	2
7 (4+3)	3
8 (4+4, 3+5, 5+3)	4
9 - 10	5

*ISUP: International Society of Urological Pathology

En cuanto al sistema de clasificación del cáncer de próstata, el TNM, pretende agrupar pacientes que vayan a tener una evolución clínica similar, además de ser útil para comparar datos de forma global entre diferentes instituciones. El TNM queda desarrollado en la tabla 3 (19). La estadificación en el cáncer de próstata, igual que sucede en otras neoplasias, se utiliza como elemento predictor de la extensión de la enfermedad, además de ser útil en la toma de decisiones sobre el tratamiento adecuado. Los elementos que se utilizan antes del tratamiento para predecir la extensión de la enfermedad son el tacto rectal (estadio T), el PSA, las características tumorales obtenidas mediante biopsia y los estudios radiológicos.

En función del estadio T, el Gleason y los niveles de PSA, el cáncer de próstata se clasifica en diferentes grupos que traducen el estado localizado o avanzado de la enfermedad, con implicaciones sobre todo en el manejo terapéutico y en el pronóstico de la enfermedad. A continuación, se muestra esta clasificación en función de los distintos parámetros clínicos e histológicos:

- Tumor incidental: T1a-T1b
- Tumor localizado de bajo riesgo: T1c-2a, Gleason ≤ 6 y PSA < 10 ng/mL
- Tumor localizado de riesgo intermedio: T2b-2c o Gleason = 7 o PSA = 10-20 ng/mL
- Tumor localizado de alto riesgo: T3a o Gleason ≥ 8 o PSA > 20 ng/mL
- Tumor localmente avanzado: T3b o T4
- Cáncer de próstata metastásico: T2-4 con N+ (N1, M1a), T2-4 con NxM1b-M1c

Tabla 3. Clasificación Tumour Node Metastasis (TNM) para el cáncer de próstata (19).

T - TUMOR PRIMARIO
<ul style="list-style-type: none">• Tx: El tumor primario no puede ser evaluado• T0: Sin evidencia de tumor primario• T1: Tumor clínicamente no palpable<ul style="list-style-type: none">➤ T1a: Hallazgo histológico accidental tumoral en 5% o menos del tejido resecado por RTU➤ T1b: Hallazgo histológico accidental tumoral en 5% o más del tejido resecado por RTU➤ T1c: Tumor identificado por biopsia con aguja (por ejemplo, debido a un PSA elevado)• T2: Tumor que es palpable y confinado dentro de la próstata<ul style="list-style-type: none">➤ T2a: El tumor afecta a la mitad o menos de un lóbulo prostático➤ T2b: El tumor afecta a más de la mitad de un lóbulo prostático, pero no a ambos lóbulos➤ T2c: El tumor afecta a ambos lóbulos• T3: El tumor se extiende más allá de la cápsula prostática<ul style="list-style-type: none">➤ T3a: Extensión extracapsular (uni o bilateral) incluyendo afectación microscópica del cuello de la vejiga➤ T3b: El tumor invade las vesículas seminales.• T4: El tumor invade estructuras adyacentes a las vesículas seminales: esfínter externo, recto, músculo elevador del ano y/o suelo pélvico
N - GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES
<ul style="list-style-type: none">• Nx: Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados• N0: Ausencia de metástasis en ganglios linfáticos regionales• N1: Presencia de metástasis en ganglios linfáticos regionales
M - METÁSTASIS A DISTANCIA
<ul style="list-style-type: none">• M0: Ausencia de metástasis a distancia• M1: Presencia de metástasis a distancia<ul style="list-style-type: none">➤ M1a: Afectación de ganglio/s linfático/s no regionales➤ M1b: Hueso/s➤ M1c: Otras localizaciones

1.4 Diagnóstico y tratamiento

El cáncer de próstata no causa síntomas en los estadios iniciales de la enfermedad, comportándose como una neoplasia silente. La aparición de síntomas o signos como dilatación del tracto urinario superior, hemospermia, disminución del volumen de eyaculado, o síntomas urinarios de vaciado, suelen traducir estadios avanzados de la enfermedad. Por otro lado, las manifestaciones de afectación metastásica son el dolor óseo, fracturas patológicas, anemia, edema de miembros inferiores, o alteraciones en la coagulación (20). Actualmente, la afectación localmente avanzada y la metastásica son infrecuentes debido al uso extendido de programas de detección precoz mediante tacto rectal y PSA (21).

1.4.1 Detección temprana

El concepto de detección temprana se refiere a buscar una enfermedad en una población sana y asintomática. Se trata de un hecho diferente al diagnóstico, tratándose este último de la localización de la enfermedad en sujetos enfermos o sintomáticos. En el caso del cáncer de próstata, aunque se ha concluido que con los métodos de detección temprana se reducen las tasas de enfermedad avanzada, existe controversia respecto a la relación entre daños y beneficios (20). Durante la década de los 90 y principios de los años 2000 se concluyó que, tras el uso generalizado del PSA y las campañas de detección precoz, la tasa de mortalidad por esta neoplasia se redujo en más de un 30%, además de objetivar una reducción del 75% de casos de enfermedad avanzada en el momento del diagnóstico (22).

Existen principalmente dos ensayos aleatorizados que han intentado indagar sobre los efectos de la detección temprana en cáncer de próstata: el estudio *Prostate, Lung, Colon and Ovary* (PLCO, 2001) del Instituto Nacional Estadounidense de Cáncer y el *European Randomized Trial of Prostate Cancer Screening* (ERSPC, 2003). En el estudio europeo se concluyó que con los programas de detección precoz se conseguía reducir los casos de cáncer de próstata de alto grado y los de enfermedad localmente avanzada y metastásica, además de una reducción del 20% en la mortalidad cáncer específica en los sujetos sometidos a detección temprana respecto a los que no se

sometieron a ninguna detección. No obstante, los datos de este ensayo también mostraron que para prevenir una muerte por cáncer de próstata, era necesaria la detección de 570 hombres y tratar 18 hombres (23, 24). Por otro lado, el estudio PLCO no encontró ninguna diferencia en mortalidad cáncer específica entre los grupos de detección sistemática y el grupo control. Así pues, el beneficio de estos programas, sigue siendo un tema controvertido y se necesita un seguimiento de más años para obtener conclusiones de peso, dada la historia natural de esta enfermedad (22). Organismos dedicados a la medicina preventiva, como el United States Preventive Services Task Force, recomiendan en la actualidad que la decisión de someterse a un examen periódico con PSA debe ser individual en cada paciente, y sólo en varones entre 55 y 69 años. Antes de decidir si iniciar un programa de detección temprana, se deben explicar al paciente los beneficios y daños potenciales del tratamiento en fases tempranas, ayudando así a la toma de decisiones al varón implicado(20). En el caso concreto de España, los programas de detección temprana con PSA son una práctica extendida (21, 25).

1.4.2 Tacto rectal

La exploración física mediante tacto rectal se ha demostrado como útil en caso de examinadores expertos, aceptando además que no es capaz de detectar muchos de los cánceres en estadios tempranos (20). Algunos autores han descrito que la detección de las neoplasias prostáticas mediante palpación rectal es poco útil en casos de varones con niveles de PSA inferiores a 3 ng/mL. Dado que el PSA mejora el valor predictivo positivo del tacto rectal, la práctica clínica habitual consiste en combinar PSA y tacto rectal juntos para la detección precoz del cáncer de próstata. En general, la detección es más alta con PSA que con tacto rectal, pero se acepta que la detección es todavía mayor cuando se combinan las dos pruebas. Esto es así porque, tumores muy indiferenciados pueden no aumentar los niveles de PSA, pero sí provocar áreas palpables sospechosas de malignidad al tacto rectal.

1.4.3 Antígeno Prostático Específico (PSA)

El PSA es una proteína, concretamente una calicreína formada por 17 aminoácidos diferentes, la cual se encuentra en altas concentraciones en el semen, siendo su principal función la licuefacción del mismo. La medición de sus niveles en sangre puede ser útil para la detección de patología prostática (20). Aunque en general está aceptado como un marcador tumoral de neoplasia prostática, se trata de un marcador específico de órgano y no de cáncer. En condiciones normales, las concentraciones de PSA en suero suelen ser bajas, midiéndose en ng/mL. En suero, el PSA circula en formas unidas a proteínas y en formas no unidas o libres. Hoy en día se conocen tres proteínas con las que circulan las formas unidas de PSA: la α_1 -antiquimiotripsina (ACT), α_2 -macroglobulina (A2M), y el inhibidor de α_1 -proteasa (API). Aunque las células neoplásicas no producen más PSA que el epitelio prostático benigno, el PSA producido por las células malignas sí parece escapar de los procesamientos proteolíticos (26).

Una gran variedad de factores puede afectar a los niveles sanguíneos de PSA, como son la edad, la raza o el volumen prostático. Por otra parte, los andrógenos afectan de algún modo en la expresión de PSA, de forma que, a menor testosterona, menores niveles de PSA. Algunos fármacos, como los inhibidores de la 5- α -reductasa, utilizados en el tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata (HBP), también reducen los niveles en suero de esta proteína. No obstante, en general se acepta que el factor influyente más importante sobre la concentración de PSA es la patología prostática, como por ejemplo el cáncer de próstata, la prostatitis o la HBP (27).

Hoy en día se acepta que el uso de PSA aumenta la detección de neoplasia de próstata, incluso en casos de enfermedad limitada al órgano. Niveles altos de PSA traducen tanto una probabilidad aumentada de tener cáncer de próstata en el momento como de desarrollarlo en el futuro (28). La probabilidad de detectar cáncer de próstata aumenta en la biopsia conforme aumentan los niveles de PSA, y todavía es mayor si existe un tacto rectal sospechoso (29).

En la actualidad no existe un nivel umbral de PSA a partir del cual esté indicado realizar una biopsia de próstata. Aunque de forma generalizada se acepte que unos niveles por encima de 4 ng/mL son anormales, deben tenerse en cuenta factores como la edad, el volumen prostático o la coexistencia de patologías prostáticas para indicar una biopsia de próstata. El valor umbral varía mucho según centros, y algunos grupos utilizan incluso valores de 2,5 o 3 ng/mL para indicar la biopsia. Es recomendable partir de varias determinaciones séricas para tomar decisiones (27, 30-32).

Existen diferentes propuestas para mejorar el rendimiento del PSA, como por ejemplo el uso de derivados y formas moleculares del PSA. Uno de los parámetros más utilizados es la densidad de PSA (PSAd), la cual utiliza el volumen prostático para ajustar la concentración de PSA. El objetivo de dividir los niveles de PSA por el volumen prostático es distinguir entre los aumentos de proteína causados por la HBP y los causados por la presencia de un tumor. Algunos autores han demostrado una relación entre la PSAd y la probabilidad de cáncer, recomendando realizar una biopsia en los varones con PSAd mayor de 0,15, y niveles de PSA entre 4 y 10 ng/mL con tacto rectal normal. Aunque no todos los estudios demuestran la utilidad de la PSAd, su uso es bastante generalizado (33, 34).

Otros parámetros de PSA utilizados son la velocidad de PSA, el PSA libre o las isoformas de PSA, como el proPSA o el PSA intacto(20).

1.4.4 Ecografía y biopsia de próstata

La ecografía transrectal se ha convertido en la técnica básica de exploración en diferentes intervenciones urológicas, como por ejemplo la braquiterapia, la crioterapia, y por supuesto la biopsia prostática. En la actualidad, la detección de PSA en hombres asintomáticos ha hecho que la biopsia prostática mediante ecografía transrectal se considere el método de rutina para el estudio anatomopatológico de este órgano. La próstata, al ser una glándula localizada entre el cuello vesical por arriba, la musculatura del suelo pélvico por debajo y al recto situado posterior, muestra una situación idónea para ser alcanzada de forma transrectal (35). Aunque todas las zonas prostáticas descritas anteriormente no se pueden distinguir con

claridad mediante la ecografía transrectal, diferenciar la zona periférica de la central es posible. Las zonas central y la periférica normales se visualizan como áreas ecogénicas homogéneas, mientras que la zona de transición suele observarse como una zona más heterogénea (36). Este hecho permite dividir las muestras de biopsias en función de la localización prostática de la cual se han obtenido (37).

Mediante esta técnica pueden visualizarse un número importante de estructuras y elementos presentes en próstatas sin patología neoplásica. Así, es frecuente la visualización de calcificaciones entre la zona periférica y la zona de transición, siendo un hallazgo ecográfico normal, estando más en relación con la edad que con patología maligna (38). Otras estructuras benignas de visualización común son las lesiones quísticas, que pueden derivar de estructuras müllerianas (como los quistes del conducto de Müller) o de estructuras wolffianas (quistes del conducto eyaculador y de las vesículas seminales) (39). Por otro lado, las vesículas seminales se visualizan como dos estructuras de contenido anecoico, de aspecto sacular y liso, simétricas y con unas medidas aproximadas de 4,5 a 5,5 cm de longitud y 2 cm de ancho (40).

Por otro lado, las lesiones malignas en la próstata se visualizan característicamente de forma hipoecoica (figura 3). Aunque no se compruebe ninguna imagen hipoecoica, la biopsia de próstata debe realizarse de igual forma en caso de que esté indicada, ya que se calcula que hasta el 39% de los tumores pueden ser isoecoicos y el 1% hiperecoicos (41). Además, no todas las imágenes hipoecoicas traducen la presencia de un tumor, pudiendo relacionarse con áreas de tejido normal, o con procesos como prostatitis granulomatosa o infarto prostático, entre otros (42). Se calcula que una lesión hipoecoica es maligna en el 17-57% de los casos, por lo tanto no es patognomónica del cáncer de próstata (43). Otras imágenes, como la pérdida de los contornos lisos de la glándula, la pérdida del ángulo prostatoseminal o la pérdida focal de la grasa periprostática (típicamente blanca y brillante), también son indicativos de afectación tumoral extraprostática.

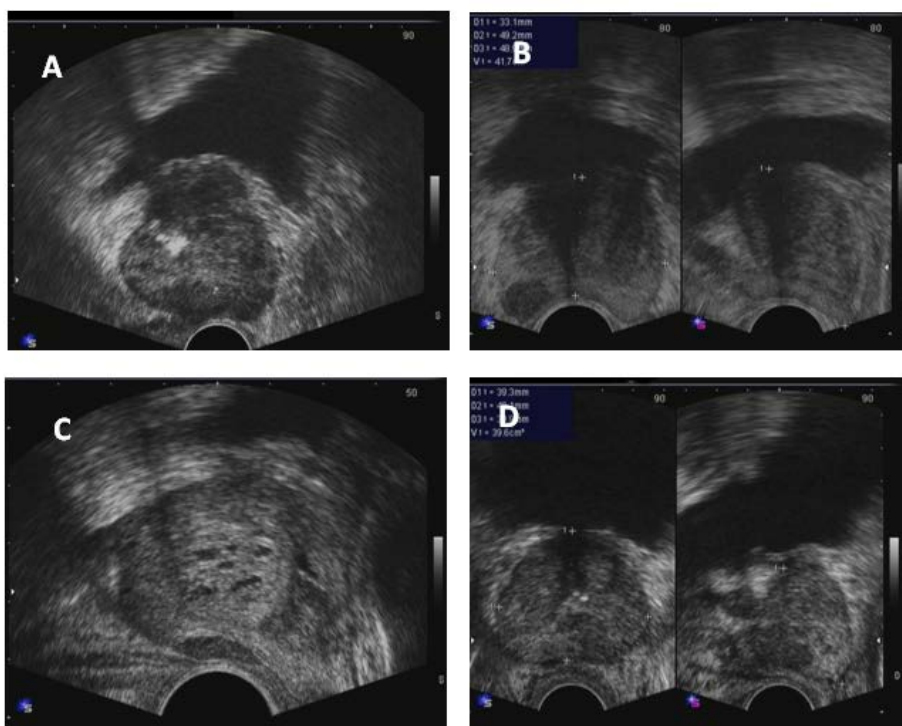


Figura 3. Imágenes ecográficas de zonas prostáticas hipoeoicas, sospechosas de malignidad. A: imagen hipoeoica en toda la zona periférica, calcificación (imagen hiperecoica) en zona transicional. B: imagen hipoeoica en zona periférica. C: imagen hipoeoica en zona periférica, junto a transductor ecográfico. D: imágenes hipoeoicas difusas por toda la próstata. Imágenes cortesía del Dr. García-Morata, Servicio de Urología, Hospital Clínico Universitario de Valencia.

La biopsia con tru-cut es el método de referencia en la actualidad para el estudio histológico de la próstata. La técnica de punción-aspiración con aguja fina está contraindicada por su bajo rendimiento diagnóstico. Las diferentes sociedades urológicas exponen sus propias recomendaciones en cuanto a las indicaciones para llevar a cabo esta intervención. Algunas de las recomendaciones más frecuentes se muestran a continuación (44):

- Diagnóstico en el contexto de alta sospecha de cáncer sintomático, como por ejemplo en casos de metástasis óseas o de compresión medular.
- Cribado de cáncer de próstata en varones asintomáticos de más de 50 años de edad y con una expectativa de vida de más de 10 años (si existen antecedentes familiares o en hombres afroamericanos debe considerarse el cribado a partir de los 40 años), en los casos de:
 - Nódulo prostático o asimetría importante de la próstata durante el tacto rectal, independientemente de los niveles de PSA.

- PSA > 4 ng/dL, con independencia de la edad.
- En hombres menores de 60 años, debe considerarse biopsia si los niveles de PSA son mayores de 2,5 ng/dL.
- Aumento de la velocidad de PSA (> 0,75 ng/dL por año).
- Seguimiento en los casos de vigilancia activa (explicada más adelante).
- Otros menos frecuentes: previo a la cirugía de cistoprostatectomía radical con derivación urinaria ortotópica; para diagnosticar fracaso de la radioterapia antes de iniciar un tratamiento de segunda línea; biopsia de seguimiento en casos concretos como, por ejemplo, en los casos de proliferación acinar atípica en una biopsia previa.

En cuanto a la técnica, se debe informar en todos los casos a los pacientes de los posibles riesgos, además de firmar un consentimiento informado para que quede constancia de que el sujeto conoce los riesgos y beneficios del procedimiento. Aunque cada centro suele tener su propio protocolo de biopsia transrectal, existen algunos aspectos ampliamente aceptados.

De esta forma, todos los hombres que vayan a ser sometidos a una biopsia, deben suspender tratamientos anticoagulantes (como warfarina u otros anticoagulantes orales) una semana antes de la intervención. En cuanto a la profilaxis antibiótica, ésta debería ajustarse según las resistencias antibióticas de cada región, pero en lo que coinciden las sociedades urológicas es en que el uso de una profilaxis es necesaria en todos los casos (45). Las fluoroquinolonas suelen ser un antibiótico de uso generalizado en estos casos, con una prevalencia de sepsis tras el uso de los mismos que se ha descrito entre el 0,1-0,5% de los casos (46). Otros aspectos a tener en cuenta durante la realización de esta técnica se desarrollan en el apartado de material y métodos.

La técnica de biopsia difiere según centros, de forma que el número de muestras y la localización de donde se obtienen, puede variar. La biopsia por sextantes, la cual establecía un núcleo de biopsia en la base, otro en la parte media y otro en el vértice, siendo biopsiados los núcleos de forma bilateral, se ha ido abandonando durante los últimos años. Las modificaciones que se han ido

desarrollando a partir de la biopsia por sextantes han tenido como objetivo obtener más muestras de la zona periférica de la glándula, ya que es conocido que es en esta localización donde se asientan la mayoría de las neoplasias. Las muestras de la zona de transición tienen un mayor rendimiento diagnóstico en casos de próstata grandes, de más de 50 cc (con un rendimiento adicional del 15% para la detección de cáncer). En la figura 4 se muestran algunos de los esquemas de biopsia más utilizados. La mayoría de protocolos obtienen de 8 a 13 cilindros, y se centran sobre todo en obtener muestras de las zonas laterales a ambos de la base, de la zona media, y también de la zona apical (35, 47, 48).

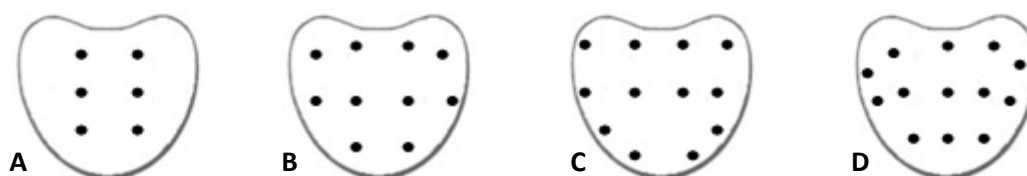


Figura 4. Diferentes esquemas de biopsia. A. Biopsia por sextantes. B. Biopsia de 10 núcleos. C. Biopsia de 12 núcleos o doble sextante. D. Biopsia de 5 regiones o de 13 núcleos (35, 47, 48).

En la práctica clínica son habituales los casos de pacientes con una biopsia de próstata negativa y que mantienen unos niveles séricos de PSA elevados, o que persisten con un tacto rectal sospechoso. De esta forma, es frecuente que en estas situaciones se precise la realización de biopsias sucesivas, con el aumento de las molestias y de la probabilidad de complicaciones que acarrea esta técnica. Aunque se ha publicado que el rendimiento diagnóstico de las rebiopsias es menor que el de la primera biopsia, hoy en día la obtención de una muestra histológica es la única forma de diagnóstico definitivo, motivo por el cual es frecuente la necesidad de realizar diferentes biopsias. Djavan et al, por ejemplo, sobre una muestra de 1.136 hombres describieron una tasa de detección de cáncer en primera biopsia del 34%, mientras que descendía a 19%, 5% y 4% en segunda, tercera y cuarta biopsia respectivamente(49).

Esta necesidad de repetidas biopsias con rendimiento decreciente, hace que en algunos centros se lleve a cabo la biopsia por saturación. Aunque no existe una definición estricta para esta intervención, normalmente se acepta como biopsia de saturación aquella en la que se extraen más de 20 cilindros. Se trata de procedimientos que suelen realizarse con requerimientos anestésicos que van más allá de la anestesia local. Todos estos aspectos hacen que aumente la molestia para los pacientes, los gastos sanitarios, y la probabilidad de complicaciones en relación a un procedimiento de biopsia más agresivo. Así pues, todavía hoy no se tiene respuesta a ¿cuándo realizar una segunda o tercera biopsia?, ¿cuándo hacer una biopsia de saturación?, o ¿cuándo dejar de hacer biopsias? El manejo dependerá del protocolo en cada centro y de la experiencia del médico que practica la biopsia. Algunos autores justifican una segunda biopsia siguiendo los mismos criterios que llevan a la realización de la primera; mientras que la tercera y sucesivas sólo tendrían cabida en casos de pacientes con alta sospecha de cáncer o con factores de mal pronóstico en las biopsias previas (50). En este contexto, durante los últimos años ha ganado protagonismo la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) multiparamétrica, estando indicada en los casos de una primera biopsia negativa, previamente a la realización de la segunda biopsia, y recientemente incluso recomendada antes de primera biopsia (51). Algunas series han demostrado una tasa de detección de neoplasia alrededor del 50% cuando se utiliza la RMN multiparamétrica para planificar una segunda biopsia (52). Más adelante se desarrolla la RMN multiparamétrica de forma extensa.

Otras modalidades de biopsia en el contexto diagnóstico del cáncer de próstata son la biopsia transperineal y la RTU de próstata. La biopsia transperineal se lleva a cabo con el paciente en posición de litotomía dorsal, accediendo ecográficamente a la próstata con el transductor en periné. Aunque se ha descrito una mayor dificultad para visualizar las zonas periféricas de la glándula o para localizar las vesículas seminales con este abordaje, ensayos clínicos que lo comparan con el acceso transrectal concluyen tasas de detección de carcinoma similares, aunque con más complicaciones en el abordaje transperineal (53). Por otro lado, la RTU se ha descrito como la técnica óptima para tomar muestras de la zona de transición, aunque está descrito una localización tumoral en este área en menos del 5% de los pacientes (54).

En cuanto a las complicaciones de la biopsia prostática, la más frecuente es la infección tras el procedimiento. A pesar de que en todos los protocolos debe incluirse una profilaxis antibiótica, la infección urinaria sintomática y la infección febril aparecen en alrededor del 2% de la mayoría de series (55). Estudios previos al uso de la profilaxis antibiótica describieron bacteriuria en el 32-36% de los pacientes tras biopsia y fiebre en el 48%-69% (56). Por otra parte, el sangrado en forma de hematuria es un signo frecuente los días posteriores al procedimiento, con tasas alrededor del 23-63%, siendo en la mayoría de casos asintomática (57). La hemorragia rectal no suele ser grave, y en raras ocasiones precisa de intervención endoscópica rectal para su resolución. La hemospermia, también es frecuente pero no precisa gravedad (57). Otras complicaciones, en orden de frecuencia, son el síndrome vasovagal (1,4-5,3%) y la retención aguda de orina los días posteriores (0,2-0,4%) (58).

Así pues, puede observarse que la biopsia de próstata sigue siendo hoy en día el patrón oro para el diagnóstico de cáncer de próstata, a pesar de limitaciones como la necesidad de rebiopsias, la heterogeneidad ecográfica del carcinoma prostático, o las tasas de complicaciones que se relacionan con el procedimiento. Otras herramientas a tener en cuenta en este contexto, y cada vez más presentes en la práctica diaria, son los marcadores séricos tumorales, pruebas de imagen como la resonancia magnética nuclear (RMN), o estudios moleculares procedentes de las ciencias ómicas. La combinación de éstos puede ser útil en la toma de decisiones a la hora de indicar una biopsia, pudiendo así individualizar la indicación en cada paciente, intentando así reducir costes, complicaciones y procedimientos innecesarios o con bajo rendimiento diagnóstico.

1.4.5 Marcadores tumorales en cáncer de próstata

Como ya se ha comentado anteriormente, el PSA es en la actualidad el marcador más utilizado para la detección, estadificación y control del cáncer de próstata. No obstante, existen otros marcadores tisulares, sanguíneos, urinarios o celulares que deben tenerse en cuenta. Alguno de ellos, como la expresión de la

proteína DD3 por el gen PCA3, se encuentran vigentes en la práctica diaria, mientras que otros precisan más desarrollo y estudios de validación para su uso generalizado (59).

La búsqueda de nuevos marcadores en el cáncer de próstata tiene un interés creciente por tres motivos. El primero de ellos hace referencia a la baja especificidad del PSA para la detección tumoral (27, 60). Otro aspecto a tener en cuenta es la alta tasa de negatividad para carcinoma en la biopsia transrectal, tal y como se ha comentado (49). Además, se espera que algunos marcadores puedan tener un papel pronóstico de la enfermedad como sucede en otras neoplasias, como por ejemplo en el tumor testicular (61). Esto podría ayudar a la toma de decisiones durante el seguimiento.

En la tabla 4 se desarrollan los diferentes marcadores tumorales relacionados con el cáncer de próstata en función de su origen de obtención (62-65).

Tabla 4. Marcadores tumorales relacionados con el cáncer de próstata.

BIOMARCADORES TISULARES	
Glutación-S-transferasa Pi (GSTP1)	Los productos de dos genes hipermetilados se han relacionado con el desarrollo de cáncer de próstata, el glutación-S-transferasa P1 (GSTP1) y la isoforma A de la proteína de la familia con dominio de asociación RAS (RASSF1A). Se ha demostrado una hipermetilación elevada hasta en el 50% de los sedimentos urinarios de hombres con cáncer de próstata y hasta el 70% en el caso del RASSF1A (62, 63)
Fusión de genes	Las fusiones de los factores de transcripción TM-PRSS2 y ETS se detectan hasta en el 37% de las muestras de orina en pacientes con cáncer de próstata (66).
Polimorfismos de genes y del receptor de andrógenos	Existen patrones de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) que confieren un riesgo más elevado de cáncer de próstata. Además, la subforma 7 del receptor de andrógenos está aumentada en pacientes diagnosticados de esta

	neoplasia (67).
BIOMARCADORES SANGUÍNEOS Y URINARIOS	
Antígeno prostático específico de membrana (PSAM)	El PSAM se encuentra en la membrana de las células epiteliales prostáticas. Una de las 3 variantes de PSAM se expresa de forma diferente en próstata normal, HBP y en carcinoma (68).
Familia de genes de calicreína humana	Formada por 15 genes diferentes. Se liberan del epitelio prostático, detectándose en semen y suero. La calicreína más utilizada ha sido hK2, estando aumentada en carcinoma de próstata pobremente diferenciado (69). Otros marcadores de calicreína que han demostrado alto potencial diagnóstico son los genes KLK4, KLK11, KLK 14 y KLK15 (70).
PSA	Ya descrito anteriormente.
Derivados moleculares del PSA	Aquí se engloba la unión de PSA con la ACT, con la A2M y con el API, además del PSA libre (fPSA). El porcentaje de fPSA se utiliza como prueba auxiliar en hombres con PSA entre 4-10 ng/mL con tacto rectal benigno. En estos casos, si el porcentaje de fPSA se encuentra entre 0-10%, el riesgo de tener cáncer de próstata es de alrededor del 50% (71).
Patrones proteómicos	Mediante la espectrometría de masas se han separado péptidos para crear patrones diferentes en pacientes con patología benigna y maligna de próstata (72).
Endoglina	Glucoproteína de membrana no específica de la próstata. Se ha demostrado que sus concentraciones plasmáticas predicen el riesgo de progresión bioquímica (explicada más adelante) tras el tratamiento del cáncer de próstata (73).
PCA-3	La expresión de la proteína DD3 por este gen se ha encontrado en el 95% de piezas quirúrgicas con cáncer de próstata. En 2002 se desarrolló una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa y se mostró una regulación positiva de 66 veces esta proteína en tejido neoplásico

	<p>prostático en comparación con tejido sano. Incluso en piezas quirúrgicas con poca cantidad de cáncer, se ha demostrado la presencia de esta proteína. Actualmente existe en el mercado un kit de detección de DD3 en orina tras masaje prostático, con una sensibilidad del 67% y una especificidad del 83% (74, 75).</p>
<p>BIOMARCADORES CELULARES</p>	
<p>Células tumorales circulantes</p>	<p>Existen kits con combinación de anticuerpos diseñados para detectar células epiteliales en sangre. Los anticuerpos van dirigidos contra CD45 y citoqueratinas 8, 18 y 19. La tinción posterior negativa para CD45 y positiva para las citoqueratinas indica células tumorales circulantes en sangre (76).</p>
<p>Respuestas autoinmunitarias</p>	<p>Se han descrito perfiles autoinmunitarios para distinguir pacientes con y sin cáncer de próstata, aunque no han sido validados con posterioridad (77).</p>
<p>p53 y Bcl-2</p>	<p>El gen supresor tumoral p53 es un marcador de control de proliferación celular y apoptosis. El aumento de su concentración nuclear se ha asociado con estadios avanzados del cáncer de próstata. El Bcl-2 es una proteína antiapoptótica que también se sobreexpresa en el cáncer de próstata (78, 79).</p>
<p>Ki-67</p>	<p>Es una proteína asociada a la proliferación celular con un patrón de expresión regulador por el ciclo celular. La tinción con técnicas inmunohistoquímicas de Ki-67 consigue discriminar entre un cáncer de próstata con peor pronóstico y uno latente, según la proporción de células con proliferación activa (80).</p>
<p>p63</p>	<p>Homólogo del gen p53. Se utiliza en combinación con citoqueratinas, habiéndose descrito tasas altas de falsos negativos (81).</p>

BIOLOGÍA MOLECULAR	
Locus génicos de susceptibilidad	Los antecedentes familiares de cáncer de próstata son un factor de riesgo para padecerlo. Se han estudiado variantes polimórficas de genes que codifican el receptor de andrógenos, CYP17 y 5 α -reductasa tipo 2, relacionándose con un mayor riesgo de tener cáncer de próstata. Otras variantes estudiadas son los genes que codifican CYP3A, GSTT1, GSMT1, GSTP1 e IGF-1 (82).
Micro-RNA	Se trata de secuencias con menos de 22 nucleótidos que participan en la regulación del RNA mensajero (mRNA). Se ha demostrado que la detección del micro-RNA 141 distingue a pacientes con y sin enfermedad. Existen otros micro-RNA en estudio (83).
α -metilcil coenzima A racemasa (AMACR)	El gen de la AMACR, en el cromosoma 5, tiene regulación positiva en los tejidos con cáncer de próstata. Se ha descrito que hasta el 88% de casos con neoplasia prostática son positivos para AMACR (84).
Gen UROC28	Localizado en el cromosoma 6q23-24, la expresión de su proteína en suero puede medirse, y se ha utilizado para distinguir tejidos sanos y con cáncer (85).
Anexina A3	Es una de las proteínas urinarias utilizadas como biomarcador. Mediante inmunotransferencia de muestra de orina a una membrana, se ha demostrado que las concentraciones de anexina A3 tiene una relación inversa con la presencia de carcinoma de próstata (86).
Hepsina	Se trata de una proteína transmembrana tipo II. Análisis de ADN complementario ha demostrado su sobreexpresión en cáncer de próstata en comparación con tejidos prostáticos sanos (87).
NMP 48	Es una proteína de unión a la vitamina D detectada en suero de varones con cáncer de próstata (88).

<p>Delección del gen PTEN</p>	<p>Gen supresor tumoral. Su delección promueve el crecimiento, proliferación, supervivencia y migración celular, asociándose a tumores de alto riesgo (89).</p>
<p>Fusión de genes TMPRSS2-ERG</p>	<p>El gen que codifica la proteasa transmembrana serina 2 (TMPRSS2), regulado por andrógenos, se expresa tanto en el epitelio prostático normal como en las células malignas. El gen ERG, es un miembro de la familia de oncogenes ETS, que modulan la transcripción de genes diana que participan en el crecimiento y transformación celular, así como la apoptosis. Al fusionarse con TMPRSS2, ERG queda también bajo el control de los andrógenos lo que sugiere un mecanismo de transformación neoplásica (90).</p>

Además de lo expuesto en la tabla anterior, una de las características de las células cancerosas son las alteraciones en su metabolismo. En general, las células neoplásicas utilizan una fuente menos eficiente de generación de energía, y por lo tanto de supervivencia. Mediante una combinación de cromatografía con espectroscopía de masa, la metabolómica consigue diferenciar perfiles metabolómicos entre tejido canceroso y sano. En el caso concreto del cáncer de próstata, una de las primeras moléculas que se describió como claramente diferenciada fue la sarcosina, aunque posteriormente se incluyeron muchas más, como se describirá posteriormente. Así pues, la metabolómica es también una de las ramas de investigación básica que está aportando nuevas conclusiones con el objetivo de obtener marcadores tumorales (91).

La gran mayoría de los marcadores tumorales investigados para cáncer de próstata no están integrados en la práctica clínica, debido probablemente a la falta de métodos estandarizados para su realización e interpretación, aunque también, a la influencia de un diseño inadecuado de los estudios. La heterogeneidad de este cáncer es un problema adicional, especialmente cuando los especímenes provienen de origen diferente (biopsia transrectal, RTU de próstata, prostatectomía radical). Por lo tanto, el uso de una combinación de marcadores parece una estrategia razonable para

augmentar la precisión diagnóstica y manejar mejor aspectos pronósticos y terapéuticos de la enfermedad. Los microarrays de anticuerpos para proteínas o ácidos nucleicos son un método óptimo para analizar varios marcadores de forma simultánea desde una pequeña muestra biológica. Sin embargo, las muestras de tejido prostático como material para evaluar estos marcadores no son lo ideal, debido al carácter invasivo de las biopsias y al conocido error asociado al muestreo. Además, en el estudio de la enfermedad avanzada, adquirir tejido tumoral de las metástasis óseas (lugar frecuente de asentamiento metastásico) puede ser difícil desde el punto de vista técnico y limitar la repetición de muestreo de estas lesiones. En consecuencia, el conocimiento acerca de las alteraciones genéticas que surgen en este contexto es aún limitado (92).

Entre los marcadores moleculares tisulares de cáncer de próstata con uso clínico, pronóstico, y que intentan predecir la respuesta al tratamiento figuran p53, Bcl-2, Ki-67, PTEN y algunos otros. Una dificultad que se encuentra habitualmente en estos estudios, es la heterogeneidad al definir la agresividad del tumor y el resultado final de la enfermedad, aplicándose distintos criterios clinicopatológicos. En otros casos, poniendo como ejemplo el de PTEN, estas discrepancias se pueden relacionar con el hecho de que la ausencia del gen tampoco fue definida consistentemente: delección del gen versus la pérdida de expresión de su proteína.

A pesar de estas dificultades, la detección tisular de AMARC, así como los test mediante PCR cuantitativa en tiempo real para la determinación de la expresión de genes promotores de carcinogénesis, y otros paneles genéticos para cáncer de próstata, representan una gran promesa como instrumento de diagnóstico. Los test comercializados a partir de ellos podrían tener un gran impacto en la reducción del número de biopsias innecesarias y consecuentemente en el coste/eficacia. En el campo de los genes de fusión, la elevada incidencia y la conexión con la vía de señalización de los andrógenos de TMPRSS2-ERG, hacen que este marcador tenga mucho potencial en el diagnóstico y pronóstico, si bien aún no está disponible ningún test tisular para uso en clínica. Con relación a la metilación del gen GSTP1, estas alteraciones epigenéticas se pueden detectar en el tejido próximo a la lesión cancerosa cuyas características histológicas aún son benignas. Este “efecto halo” explica los

beneficios potenciales de un test de metilación para complementar los resultados histopatológicos, ampliando la sensibilidad del diagnóstico (92).

Con la utilización de los marcadores apropiados se podría ayudar a los pacientes a tomar decisiones clínicas más efectivas para su plan terapéutico lo que debería traducirse en ventajas en cuanto a morbilidad y costes. Para la incorporación de nuevos test moleculares, la demostración de su utilidad clínica con resultados significativos en cuanto a supervivencia, morbilidad o calidad de vida, resulta un requisito imprescindible. Un test nuevo puede tener excelente validez analítica y eficacia clínica probada, pero si está estrechamente correlacionado con un predictor clínico o histopatológico ya establecido, no proporcionará ninguna utilidad clínica adicional. En cáncer de próstata, el marcador Gleason sigue siendo todavía la característica aislada más importante para el pronóstico del cáncer localizado al igual que los nomogramas, basados conjuntamente en PSA, Gleason y estadio tumoral. La evidencia sobre la validez clínica de los nuevos marcadores para la detección y pronóstico de la enfermedad es aún variable e incompleta, dejando incertidumbres sobre su rendimiento y características como sensibilidad, especificidad y valor predictivo (92).

Los marcadores utilizados hoy en día tienen cabida en cuatro escenarios clínicos diferentes. El primero de ellos sería aquel en que el paciente, bien por elevación de PSA o por un tacto rectal sospechoso para carcinoma, tiene indicación de realizarse una biopsia de próstata. En esta situación, existen marcadores que predicen el resultado negativo de dicha biopsia, por lo que podría evitarse o retrasar el procedimiento en caso de una escasa positividad para carcinoma de la misma. El segundo escenario es aquel con casos de biopsia negativa, pero una alta sospecha de cáncer. Así pues, los marcadores son utilizados aquí para reforzar ese resultado negativo y/o evitar la realización de otra biopsia en un corto periodo de tiempo. El tercer caso donde los marcadores se muestran útiles es en los pacientes con una biopsia positiva para un carcinoma que traduce una enfermedad de riesgo intermedio o bajo, y se les quiere ofrecer una vigilancia activa, pudiendo así apoyarla o descartarla. Por último, después de un tratamiento con intención radical, el uso de biomarcadores podría ser útil para valorar la necesidad de una terapia adyuvante. (59)

Se ofrece una información detallada de los diferentes test actuales en el mercado y los marcadores que los componen en la discusión del presente documento. El desarrollo de nuevos biomarcadores futuros ayudará a la toma de decisiones más individualizadas en cada paciente (64, 65).

1.4.6 Modalidades de tratamiento en cáncer de próstata

El cáncer de próstata es una patología con diferentes opciones de tratamiento en función de numerosos factores: potencial maligno de la neoplasia, esperanza de vida del paciente, estadiaje de la enfermedad, o preferencias del paciente. La evolución natural del cáncer de próstata varía desde una enfermedad poco maligna y asintomática, hasta fases avanzadas con rápida progresión metastásica, síntomas y corta esperanza de vida. En este contexto, el desafío debe ser ajustar el mejor tratamiento a cada caso, evaluando expectativa de vida, calidad de vida del paciente o preferencias del mismo.

En primer lugar, cabe citar a la vigilancia activa y a la conducta expectante. Esta última, hace referencia a la observación del paciente hasta que presente enfermedad metastásica que precise de tratamiento paliativo. Por su parte, la vigilancia activa traduce una estrategia de seguimiento con biopsias, mediciones en suero de PSA y tacto rectal, para comprobar si en algún momento progresa la enfermedad y el paciente precisa un tratamiento con intención curativa. Aunque los criterios de "paciente idóneo" para vigilancia han ido cambiando durante los últimos años, actualmente la mayoría de protocolos incluyen pacientes jóvenes, con tumores de bajo volumen, y con bajo grado o intermedio (incluso Gleason de hasta 7, 3+4). El objetivo de esta estrategia es diferir un tratamiento agresivo que podría no ser necesario a corto plazo, o incluso evitarlo. Algunos estudios de prevalencia han concluido que hasta un 10% de pacientes diagnosticados de carcinoma prostático optan por la vigilancia activa (93, 94).

La prostatectomía radical, con sus diferentes abordajes (abierta, laparoscópica o robótica), es actualmente el procedimiento terapéutico de referencia para el cáncer de próstata localizado. El candidato ideal sería un varón con expectativa de vida de, por lo

menos, 10 años. Antes de optar por este o por el resto de tratamientos, deben valorarse parámetros clínicos e histológicos para predecir el estadio patológico del tumor, e identificar así a los pacientes que con más probabilidad pueden beneficiarse de este tratamiento. Más allá de las posibles dificultades técnicas de la cirugía, de los tiempos de hospitalización y de recuperación, las complicaciones frecuentes a medio y largo plazo son la persistencia de disfunción eréctil, incontinencia urinaria, y el desarrollo de estenosis uretral. Factores pre e intraoperatorios como la edad del paciente o la preservación en la cirugía de los nervios erectores, influirán en la mayor o menor probabilidad de desarrollar estas complicaciones. Añadir que la superioridad entre los diferentes abordajes quirúrgicos en términos funcionales y oncológicos es todavía hoy un tema controvertido (95).

Por su parte, la radioterapia de haz externo utiliza haces de radiación gamma dirigidos a la próstata y los tejidos adyacentes a través de múltiples campos. Con el objetivo de minimizar la lesión de los tejidos vecinos, se han desarrollado la radioterapia conformal tridimensional y la radioterapia de intensidad modulada. Los pacientes con elevadas concentraciones de PSA, con alta carga tumoral y con alta puntuación de Gleason, se benefician de instaurar un bloqueo hormonal al mismo tiempo que reciben radioterapia. La radioterapia adyuvante después del tratamiento quirúrgico se ha descrito como beneficiosa en casos de pacientes con márgenes de la pieza quirúrgica afectados por tumor, extensión extracapsular del tumor o compromiso de los ganglios linfáticos. Durante el seguimiento de la enfermedad es aplicada como tratamiento de rescate tras la cirugía cuando se produce una recidiva bioquímica, concepto explicado a continuación. Todavía hoy se desconoce la superioridad de la radioterapia adyuvante o la administrada de rescate. Otra modalidad de tratamiento es la braquiterapia, en la cual se implantan semillas radiactivas en la próstata para conseguir una alta dosis de radiación del tumor, afectando mínimamente a los tejidos adyacentes. Está especialmente indicada en tumores localizados (96).

El tratamiento primario de privación de andrógenos suele ser apropiado en hombres mayores, con importantes comorbilidades, o en aquellos que no deseen otra opción de tratamiento ni una conducta expectante. En todos los casos en que se instaure este tratamiento hay que ser consciente del riesgo cardiovascular que

Introducción

acarrea. La hormonoterapia nunca es curativa, pero en muchos casos puede llegar a conseguir una remisión de la enfermedad local, e incluso metastásica. La orquiectomía subalbugínea bilateral, los análogos de la hormona liberadora de hormona luteinizante y los antiandrógenos son los métodos quirúrgicos y farmacológicos que se incluyen dentro de la hormonoterapia (97, 98).

Otros tratamientos menos frecuentes, destinados al tratamiento de la enfermedad localizada son la crioablación, la ablación por radiofrecuencia y los ultrasonidos focalizados de alta intensidad (HIFU). Suelen ser aplicados en centros de referencia y muchas veces dentro de ensayos clínicos (99).

Independientemente del tratamiento, todos los pacientes precisan un seguimiento con una exploración, como las determinaciones séricas de PSA, exploración física y pruebas de imagen. De todas ellas, el PSA es la más utilizada. La conocida como recidiva bioquímica, casi siempre precede en años a la recurrencia clínica. Los criterios de recidiva bioquímica se enumeran a continuación, en función del tratamiento recibido por el paciente (100):

- Tras la prostatectomía radical: dos elevaciones de PSA sérico por encima de 0,2 ng/mL.
- Tras la radioterapia: una elevación de PSA por encima del PSA nadir + 2 ng/mL. El PSA nadir es el nivel mínimo de PSA alcanzado tras el tratamiento.
- Tras la hormonoterapia: tres elevaciones consecutivas de PSA, separadas al menos una semana, que tienen como resultado dos incrementos del 50% sobre el nadir, y siempre que este incremento provoque un PSA por encima de 2 ng/mL. Además, la testosterona total debe estar siempre en rango de castración (menor de 50 ng/dL).
- Tras las terapias locales: no existe consenso.

CAPÍTULO 2: RESONANCIA MAGNÉTICA

2.1 Concepto básico de resonancia magnética

La RMN es una rama de la espectroscopía que trabaja en la región del espectro de frecuencias comprendida entre 10^7 y 10^9 Hz. Se trata de una técnica basada en la propiedad de algunos núcleos atómicos, como por ejemplo en núcleo de hidrógeno llamada espín. Esta propiedad la poseen aquellos núcleos cuyo momento angular de espín es diferente a cero ($I \neq 0$) (ecuación 1).

Ecuación 1. Relación entre la diferencia de energía entre estados del espín

$$\Delta E = h\nu = h \frac{\omega}{2\pi} = h \frac{\gamma}{2\pi} B_0$$

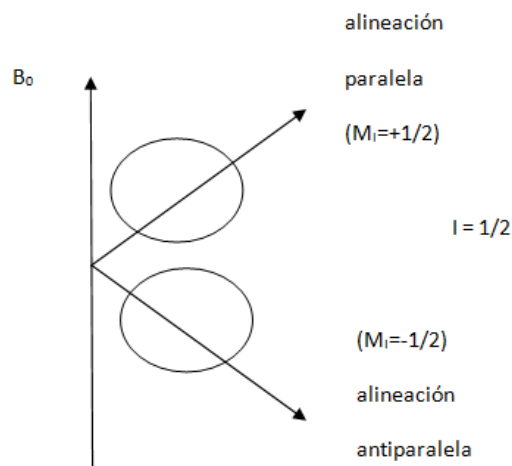


Figura 5. Efecto en la orientación del momento magnético de un núcleo atómico con un número cuántico (I) de $1/2$ sometido a un campo magnético (B_0). Los núcleos se dividen en dos grupos, los que se alinean de forma paralela a B_0 y los que se alinean de forma antiparalela. Adaptada de (101).

Dicha propiedad aporta a estos núcleos un momento magnético, pudiendo adoptar diferentes orientaciones cuando son sometidos a un campo magnético estable (B_0). En el caso por ejemplo del núcleo de ^1H , se pueden encontrar dos orientaciones,

Introducción

$M_I=1/2$ y $M_I=-1/2$ con diferentes estados energéticos. La alineación "paralela" del núcleo corresponderá al estado de menor energía, y la "antiparalela" estará relacionada con el estado de mayor energía (figura. 5).

Los núcleos no sólo adoptarán las direcciones mencionadas, sino que al ser sometidos a un campo magnético estable, presentan un movimiento de rotación sobre su propio eje y de rotación sobre el eje principal del campo magnético externo (figura 6) (102, 103).

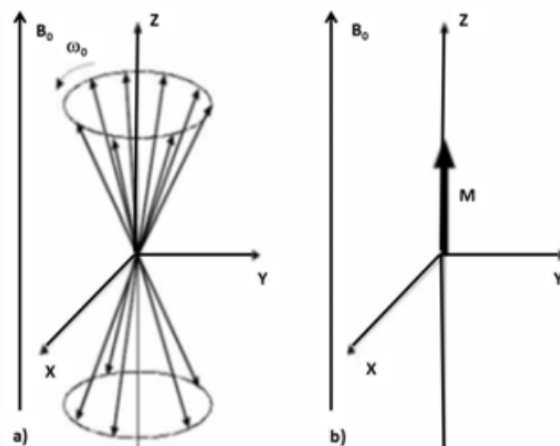


Figura 6. Modelo de magnetización microscópica (a) de los núcleos como vectores individuales precesionando alrededor de B_0 y modelo de magnetización macroscópica (M) en (b) resultante de la suma de los diferentes vectores resultantes. Tomada de (103).

Por una parte, el campo electromagnético y el momento magnético podrían apuntar a la misma dirección, de forma que se establece una configuración con energía mínima, siendo la predominante en situación de equilibrio termodinámico. Por otro lado, los dos vectores pueden apuntar en direcciones opuestas, siendo así la energía ligeramente superior. La diferencia de energía entre ambos estados se expresa en la ecuación 1. " γ " hace referencia a la constante giromagnética, que varía según el tipo de núcleo; " h " es la constante de Planck; " B_0 " es el campo magnético del imán; " ν " la frecuencia de Larmor (también llamada de resonancia) y " ω " la velocidad angular de giro de los momentos magnéticos alrededor del campo magnético principal, B_0 (101).

Si un núcleo es sometido a una irradiación con la radiofrecuencia apropiada (frecuencia de Larmor), sucederá el fenómeno de resonancia, de forma que los núcleos que ocupan un estado de energía inferior, absorberán dicha energía y se excitarán, saltando al estado de energía superior. Una vez finalizada la radiofrecuencia, los núcleos vuelven a su estado inicial. Los dos niveles estarán condicionados según las leyes del equilibrio térmico. La diferencia de energía entre ellos será proporcional a la magnitud del campo magnético, estando directamente relacionada con la frecuencia de Larmor o precesión del momento magnético. La diferente orientación de la magnetización dependerá del predominio del tipo de energía (102).

Las bobinas receptoras detectan la precesión de la magnetización macroscópica durante el periodo de relajación en forma de corriente alterna. La variación de intensidad de corriente se llama *free induction decay* (FID), y es una función exponencial decreciente (intensidad VS tiempo). La transformada de Fourier transforma esta información al dominio de frecuencias (figura 7) (103, 104).

Información sobre los parámetros espectrales en RMN puede encontrarse en el anexo I de este documento.

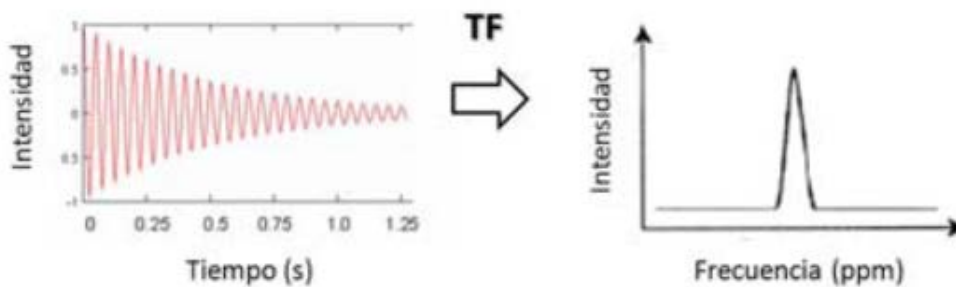


Figura 7. Obtención de un espectro a partir de una FID utilizando la transformada de Fourier. Tomada de (103)

2.2 Aplicaciones biomédicas de la RMN

La RMN presenta dos campos diferentes de aplicación en el área de biomedicina: la espectroscopía, más conocida en el campo de la bioquímica y la investigación básica, y la imagen, de uso frecuente en la práctica médica. Desde que en 1972 se desarrolló el estudio del metabolismo de la glucosa mediante espectroscopía

de carbono 13, el uso de técnicas basadas en RMN ha ido en aumento. La espectroscopía aportará información sobre los perfiles metabólicos de muestras biológicas, mientras que la imagen es capaz de mostrar estructuras anatómicas. La combinación de ambas permite obtener conclusiones entorno a la composición de un tejido y la localización exacta de cambios metabólicos en dicha composición (103).

2.2.1 Espectroscopía por resonancia magnética (ERM)

La espectroscopía *in vivo* es considerada actualmente como el método no invasivo que mejor estudia el metabolismo de los seres vivos. Mediante la ERM es posible determinar de forma categórica y cuantitativa una gran variedad de metabolitos en cualquier tejido, proporcionando así información sobre su composición. A pesar de todo, existen algunos aspectos que han limitado la generalización de esta técnica para su uso en la práctica clínica habitual, como por ejemplo la falta de familiarización del personal sanitario con la misma, la complejidad de interpretación de los resultados, o el uso en la práctica habitual de campos magnéticos bajos (de 1,5 teslas o 3 teslas) en comparación con los campos utilizados en las aplicaciones bioquímicas (limitando así el número de metabolitos a estudio)(103).

La ERM estará regida por los mismos principios generales de la RMN descritos anteriormente, produciéndose una excitación de los núcleos de ^1H de una muestra y detectando la señal mientras vuelven al estado de equilibrio. Los parámetros que describen a cada señal en un espectro de ERM serán la frecuencia de resonancia (su desplazamiento químico), la intensidad y la anchura a media altura. A pesar de todo, los metabolitos se encontrarán en concentraciones muy bajas en comparación con el agua del tejido en cuestión, motivo por el cual es necesaria una presaturación selectiva sobre la señal de agua para disminuir la intensidad relativa de ésta. Además, pueden existir con frecuencia artefactos en la señal causados por la heterogeneidad del campo magnético o de la muestra. Así pues, para obtener un espectro de buena calidad será indispensable un campo magnético homogéneo(101).

2.2.2 Espectroscopia de RMN de alta resolución por giro de ángulo mágico: High resolution magic angle spinning (HR-MAS) de muestras biológicas

La espectroscopía de alta resolución con giro en ángulo mágico, High Resolution Magic Angle Spinning (HR-MAS) se utiliza desde la década de los 90 para el estudio de muestras de tejido intacto ex vivo. La técnica posee un alto grado de reproducibilidad, y no destruye las muestras medidas, de forma que posteriormente los tejidos pueden ser estudiados histológicamente. De esta forma, es posible comparar los datos espectroscópicos y morfológicos (105, 106).

Andrew y col. y Lowe y col. describieron que al hacer girar una muestra sólida rápidamente (entre 4 y 6 kHz) en un ángulo de $54,7^\circ$ relativo al campo magnético principal, se reducía la anchura de las señales detectadas durante la adquisición de espectros de RMN. Con esto se consigue evitar la pérdida de información causada por las interacciones debidas a la heterogeneidad de la muestra y a los parámetros residuales anisotrópicos, los cuales no pueden ser promediados por el movimiento browniano en muestras sólidas, tal y como ocurriría en una muestra líquida (103).

El espectro de RMN dependerá fundamentalmente del entorno microscópico de las moléculas investigadas. De esta forma, pueden existir interacciones dipolares (entre dos núcleos con momento magnético), anisotropía con desplazamiento químico (entre núcleo y nube electrónica), y en caso de sólidos interacciones cuadrupolares. Si una muestra gira sobre su propio eje a altas velocidades manteniendo el ángulo mágico con B_0 (figura 8), las interacciones dipolo-dipolo- se promedian resultando un valor de cero (ecuación 2). De forma práctica, esto conlleva a la reducción de la anchura de banda efectiva de las resonancias de interés a valores comparables con los obtenidos en muestras homogéneas líquidas (103).

Ecuación 2. Valor de las interacciones dipolares entre núcleos 1 y 2. Siendo $\mu_0 =$ permeabilidad del vacío y μ_1 el momento magnético del núcleo 1. Cuando $\theta = 54^\circ 74'$ (ángulo

mágico), $3\cos^2\theta = 1$ y las interacciones dipolares del núcleo 1 sobre el 2 desaparecen.

$$B_{1 \rightarrow 2} = \left(\frac{\mu_1 \mu_0}{4\pi} \right) \times \frac{(3 \cos^2 \theta - 1)}{r^3}$$

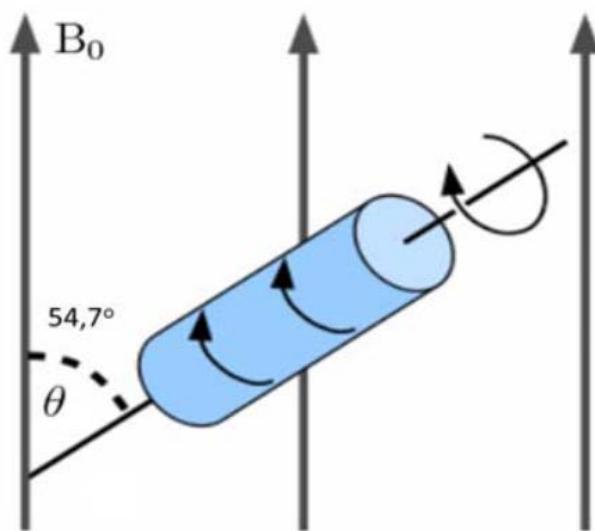


Figura 8. "Ángulo mágico" formado dentro de la sonda HR-MAS entre la orientación de la turbina para el giro de la muestra alrededor del eje longitudinal de la turbina y el campo magnético principal (B₀). Tomada de (103).

Por otro lado, las interacciones debidas a la anisotropía del desplazamiento químico se promedian a un valor diferente de cero y la interacción cuadrupolar se promedia sólo parcialmente, dejando una interacción cuadrupolar residual secundaria. En líquidos, las interacciones dipolares se promedian a cero debido al movimiento molecular de las moléculas en disolución que se produce. Este promedio a cero de las interacciones dipolares que se da en líquidos se reproduce en sólidos y semisólidos mediante el uso de la técnica de RMN de alta resolución por giro de ángulo mágico, obteniendo así señales de anchura comparable a las que se obtendrían con metabolitos en solución. A pesar de todo, al girar la muestra en ángulo mágico pueden generarse componentes de modulaciones a frecuencias correspondientes con la frecuencia de giro de la muestra, conocidas como *Spinning Side Bands* (SSB), las cuales

podrían complicar la interpretación del patrón espectral si no se evita que aparezcan (101).

Una velocidad de giro moderada (en torno a 3-4 kHz) es suficiente para evitar efectos de ensanchamiento de la señal, obteniendo así espectros de alta resolución. Sin embargo, velocidades de giro demasiado bajas (500 Hz o inferiores) puede producir SSB de intensidad importante en el rango de desplazamiento químico de interés, pudiendo enmascarar la detección de metabolitos de interés. Algunos estudios han concluido la velocidad óptima de giro (aspecto que dependerá siempre del campo magnético externo) 3.000 Hz para un B_0 de 9,4T para evitar el problema de las SSB (107). Por lo tanto, la espectroscopía HR-MAS consistirá en hacer girar una muestra a altas velocidades (1 - 15 kHz) en un ángulo de $54,7^\circ$ respecto a B_0 , llamado "Ángulo mágico" (ver figura. 9) (101).

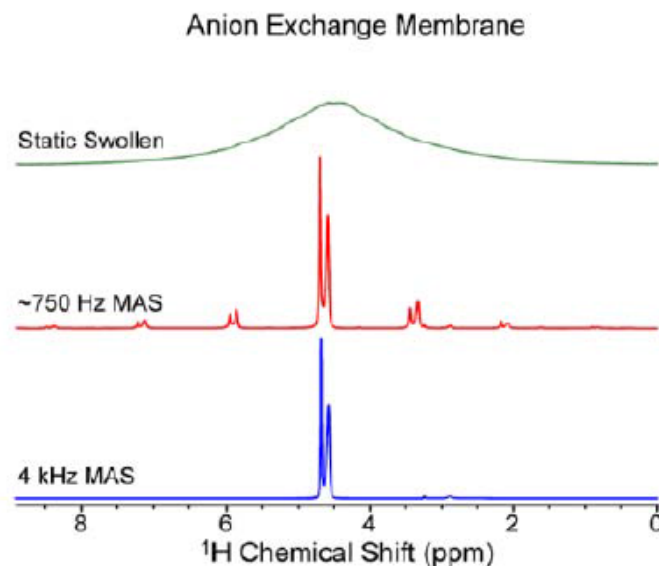


Figura 9. Membrana de intercambio de aniones en solución de metanol, mostrándose el efecto de la velocidad de giro en HR-MAS sobre dicha muestra. En el espectro superior (verde) la muestra no está girando. En el espectro central (rojo) la muestra está girando a 750 Hz, velocidad a la que aparecen las SSB. En el espectro inferior (azul) la muestra gira a 4.000 Hz. Imagen extraída de (101).

La técnica HR-MAS se realiza con una preparación simple de las muestras, consiguiendo evitar el paso de extracción de metabolitos (por ejemplo, extractos con ácido perclórico para metabolitos solubles)(103). Una de las ventajas del

procedimiento es que, al usar la muestra intacta, ésta misma se puede utilizar posteriormente para otros análisis, por ejemplo el histológico o el inmunohistoquímico. Así pues, es posible, por ejemplo, comparar los resultados del espectro metabólico obtenido con los resultados anatomopatológicos de la muestra. Varios trabajos concluyen la alta concordancia tras validar histológicamente un tejido caracterizado metabólicamente. La espectroscopía de alta resolución en tejidos es también usada para la ayuda en la interpretación de espectros in vivo de la muestra correspondiente (108, 109).

En la actualidad, hay diferentes métodos para integrar las señales de RMN. No obstante, la cuantificación de espectros HR-MAS siempre ha sido un reto por las dificultades de estandarización y por la superposición de señales. Estas dificultades conllevan que se realicen rutinas post-procesamiento manuales para el ajuste de señales. Cuando existe un solapamiento importante de señales (tanto en HR-MAS como en líquidos) se suele acudir a secuencias de medida complementarias como son los espectros 2D. Secuencias de doble adquisición donde las señales se representan en un espectro de dos dimensiones y se facilita la separación de las señales solapadas. Los espectros 2D pueden ser homonucleares (^1H - ^1H) o también heteronucleares (^1H - ^{13}C , ^1H - ^{15}N). (110, 111).

Sobre la cuantificación, añadir que se puede plantear desde dos aproximaciones. Una cuantificación relativa, donde simplemente se integra el área bajo la curva de las diferentes señales y se compara el área de un pico para las diferentes muestras. Los resultados son adimensionales. Otra aproximación es una cuantificación semi absoluta en la cual se emplea una sustancia patrón interna (TSP, trimetilsilil propiónico). Mediante un software de cuantificación, se compara el área bajo la curva del pico de interés con el área de la señal del TSP. En este caso los resultados se pueden expresar en unidades relativas o directamente en unidades de molaridad. En el caso particular del HR-MAS no se puede utilizar el TSP pues es un sistema heterogéneo (líquido-tejido) y la cuantificación mediante un patrón líquido no tiene sentido.

2.3 La metabolómica en el ámbito de la oncología y el cáncer de próstata

La metabolómica es el estudio de la respuesta metabólica de sistemas vivos a estímulos fisiopatológicos o a modificaciones genéticas. El estudio se realiza de forma multiparamétrica, intentado establecer la influencia de forma independiente de cada metabolito en la respuesta que se está estudiando, sin que la posible relación se vea influenciada por otras variables (112). El metaboloma, conjunto cuantitativo de metabolitos, se establece mediante el análisis de muestras biológicas, en nuestro caso, tejido y orina como se explicará más adelante (113).

A medida que el ciclo celular se modifica, por ejemplo durante los procesos de transformación neoplásica, los metabolitos que se forman como subproductos de la actividad celular difieren de los encontrados en fases normales de recambio celular no maligno (114). Además, el metaboloma expresa un cambio dinámico a lo largo del tiempo, de forma que en diferentes momentos de una enfermedad, el perfil metabólico va variando. Así pues, la metabolómica, que puede considerarse el estudio de los productos derivados de la proteómica, transcriptómica y genómica, presenta una fuente importante para establecer, con métodos no invasivos, biomarcadores útiles en el ámbito de la oncología. La metabolómica combina la espectroscopía con posteriores procesamientos estadísticos para evaluar y describir el estado metabólico (115).

El enfoque práctico en el ámbito del cáncer de próstata que se le puede dar a la metabolómica es muy diverso. En primer lugar, la metabolómica se ha visto como una buena herramienta de cribado en algunos tumores. En cáncer de mama, por ejemplo, se ha descrito una sensibilidad del 92% en un modelo predictor creado a base de metabolitos, superior al cribado realizado con mamografía (sensibilidad del 84%) (116). En el contexto del cáncer de próstata, sería interesante comparar perfiles metabólicos en el cribado, frente al PSA; o lo que podría ser todavía más rentable para el diagnóstico, crear un modelo predictor con metabolitos y con variables clínicas, como el PSA.

Otro punto útil de la metabolómica es la caracterización metabólica propia del tumor, es decir, describir el perfil metabólico y compararlo con el de casos sanos. Esto

se ha hecho con abundantes neoplasias cerebrales, pancreáticas, de mama, tiroideas o pulmonares (117). En próstata, los primeros estudios en metabolómica, publicados hace más de una década, iban todos dirigidos a describir el perfil metabólico de tejido prostático canceroso (111, 118-120). Los trabajos más abundantes en este sentido son los del cáncer de mama, donde además de caracterizar los perfiles del tumor, existen subanálisis para establecer perfiles según agresividad del tumor, expresión o no de receptores, o de subtipos moleculares de tumores (113). En el cáncer de próstata, los trabajos más recientes buscan objetivos similares, intentado establecer espectros que traduzcan grados de Gleason concretos o una mayor carga tumoral (121-123).

Otra utilidad de la metabolómica hace referencia a la respuesta a tratamientos o a la evolución de la enfermedad. La medicina individualizada es cada vez más frecuente en el área de la oncología, ya que pacientes con la misma enfermedad pueden responder de forma distinta a un mismo tratamiento. En este sentido, la metabolómica ha intentado también predecir respuesta a tratamientos o posibilidades de recidiva. Aunque los paneles de genes son frecuentemente utilizados para establecer conclusiones sobre estas cuestiones, el uso de biomarcadores dados por la metabolómica podría ayudar en la toma de decisiones (113, 124). En el cáncer de próstata, por ejemplo, conocer el paciente con riesgo de recidiva bioquímica o aquel que puede tener una resistencia a la castración precoz, podría ser útil a la hora de seleccionar un tratamiento o de tener un seguimiento más estrecho.

2.3.1 HR-MAS en cáncer de próstata

Los primeros estudios de HR-MAS en cáncer de próstata se centraron en evaluar la presencia de enfermedad, carga tumoral y agresividad del cáncer. Stenman y col. concluyeron en 2011, sobre muestras de 40 pacientes, que no existían perfiles metabólicos específicos que pudieran distinguir los diferentes patrones de Gleason, midiendo muestras con tejido tumoral. En cambio, en muestras prostáticas sin tumor, pero pertenecientes a próstatas con tumor en otra localización de la glándula, sí encontraron relaciones de mio-inositol/escilo-inositol y de colina/creatina que se relacionaban de forma significativa con el Gleason de la glándula, pudiendo diferenciar incluso entre Gleason 6 y 7 (122). En este mismo estudio, se comprobó que las

concentraciones medias de glicerofosfocolina, y de los cocientes fosfocolina/creatina, mio-inositol/escilo-inositol, colina/creatina, scyllo-inositol/creatina, se correlacionaban con la carga tumoral en los cilindros prostáticos procesados para las realizar las mediciones. Incluso, los niveles de glicerofosfocolina y el ratio fosfocolina/creatina se relacionaron con los niveles de células que expresaban el marcador Ki67, pudiendo diferenciar entre tejido maligno y no maligno (122). Son muchos los trabajos posteriores que se han publicado siguiendo esta línea.

Entre los primeros trabajos sobre cáncer de próstata con HR-MAS, destaca en 2010 el de Maxeiner y col., en el cual comparan 16 casos de recidiva bioquímica tras prostatectomía radical con 16 casos, también operados, sin recidiva bioquímica. Se realizó un análisis sobre las 27 señales más intensas, concluyendo que analizando los cuatro componentes con mayor diferencia de concentración entre los dos grupos, se obtenía un valor predictivo positivo del 78% para predecir la recidiva bioquímica (124).

Además de estudios en tejidos intactos, trabajos con HR-MAS también se han utilizado para obtener perfiles metabólicos de líneas celulares, por ejemplo células cancerosas PC3, y comprobar, por ejemplo, su respuesta a quimioterapia. Bayet-Robert y col, publicaron en 2010 como en cáncer de próstata, las células cancerosas PC3 mostraban un aumento de fosfocolina, lactato y ácidos grasos; mientras que disminuían los niveles de acetato y aminoácidos celulares como glutamina, prolina, asparagina, arginina, glicina, alanina, lisina, fenilalanina y leucina. Estos resultados sugieren que técnicas como HR-MAS podrían utilizarse para caracterizar vías de metabolismo celular, además de proporcionar información sobre los fenotipos de células tumorales (125).

Durante los últimos años han seguido apareciendo publicaciones que utilizan HR-MAS para su correlación con parámetros clínicos, como son niveles de PSA, grados de Gleason, respuesta a tratamientos como el Degarelix, o localización en zona periférica o central del tumor dentro de la glándula. No obstante, los estudios que intentan diferenciar tejido sano de tejido tumoral son los más abundantes, y su discusión será abordada posteriormente en este documento (117).

Así pues, en el contexto del cáncer de próstata, los estudios con HR-MAS han demostrado su utilidad para aportar información futura sobre esta patología. Las conclusiones aportadas por la metabolómica buscan ser aplicadas en algún momento en la práctica clínica diaria, intentando ahorrar métodos invasivos diagnósticos como la biopsia de próstata; mejorando dichos métodos, por ejemplo a la hora de dirigir la biopsia a zonas prostáticas sospechosas; o como algoritmo de seguimiento en pacientes diagnosticados de esta enfermedad. Aunque el HR-MAS es una técnica invasiva, pues precisa de una biopsia, la información que aporta intenta desarrollar modelos de espectroscopia in vivo que permitan evitar cualquier tipo de intervención invasiva sobre el paciente en un futuro.

2.3.2 Cuantificación de biomarcadores en orina mediante RMN. Uso en cáncer de próstata

Como se ha comentado, la metabolómica ha demostrado ser prometedora para el diagnóstico de enfermedades mediante el uso de biomarcadores, siendo además un método no invasivo para los pacientes. Además de su uso en tejidos, también se ha aplicado la RMN para establecer perfiles metabólicos en fluidos. En este contexto, se han utilizado diferentes tipos de fluidos, desde suero, saliva o líquido cefalorraquídeo. Entre todos, la orina se ha descrito como más ventajosa que el resto por ser un líquido abundante, estéril, de fácil obtención y sin invasividad, y con poca preparación para el procesamiento de la muestra. Además, la orina acumula una cantidad importante de sustancias de desecho, proporcionando así una rica fuente de biomarcadores (126).

A pesar de esto, también existen una serie de consideraciones que deben tenerse en cuenta a la hora de buscar e interpretar marcadores en orina. Por ejemplo, de sobra es conocida la importante variación en las concentraciones químicas en la orina debido a factores como el género, la edad, la dieta, el estilo de vida, las comorbilidades, o el ejercicio físico practicado (126). Todos estos aspectos hacen que la búsqueda de biomarcadores en orina pueda ser una tarea compleja. En el caso concreto de los metabolitos, sus concentraciones en orina reflejan la dinámica metabólica que traduce la respuesta del organismo a factores ambientales, estímulos fisiopatológicos o al perfil genético(127).

La orina se ha descrito como un biofluido que presenta una fuerte estabilidad fenotípica o metabolotípica, de forma que, a pesar de la diversidad entre individuos, sus características y composiciones se mantienen bastante estables dentro del mismo sujeto, lo cual la hace atractiva para establecer perfiles metabólicos. Su composición se basa en moléculas hidrofílicas como azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, lípidos solubles, aminas orgánicas, etc, además de sales inorgánicas que son lo suficientemente pequeñas como para pasar con éxito a través del sistema reticuloendotelial del cuerpo (128) . Aunque la presencia de todas estas moléculas es una ventaja por la riqueza metabólica encontrada en la orina, la elevada variedad de sustancias y la diversidad entre sujetos supone el principal desafío en su análisis. Algunos metabolitos pueden asociarse a factores fisiológicos, otros a estados patológicos, otros a exposiciones ambientales, consumo de tóxicos o alimentación (129).

Metodológicamente, la medición de muestras de orina y la interpretación es similar a la del tejido, como se explicará posteriormente. Uno de los puntos problemáticos de las ciencias ómicas es la dificultad para la cuantificación de biomarcadores. Esto se debe a que ciencias como la metabolómica, no se diseñaron en inicio para la cuantificación comparativa, ni tampoco para comparar con precisión diferentes plataformas instrumentales de medición (128). A pesar de esto, en los últimos años está habiendo un cambio en esta percepción, intentado usar las ciencias ómicas para cuantificar biomarcadores de forma relativa o absoluta, con el objetivo de aplicar estas herramientas en la práctica clínica habitual (126).

Aunque son bastante menos abundantes los trabajos sobre orina que sobre tejido, existen algunas publicaciones que han utilizado este fluido para obtener perfiles metabólicos. Sreekumar et al., encontraron 87 metabolitos que discriminaban entre sujetos sanos y con cáncer de próstata. De todos ellos, el que mejor respondía al perfil de biomarcador era la sarcosina(91). Se trata de un aminoácido no proteogénico generado por el metabolismo de la glicina-N-metiltransferasa. Sin embargo, un estudio de validación de estos hallazgos no pudo refrendarlo (130). No obstante, estos resultados contradictorios pueden deberse a sesgos técnicos. Por ejemplo a la manipulación de muestras, normalización, etc (131).

En conclusión, las referencias bibliográficas en esta área de descubrimiento de metabolitos no son muy abundantes, en parte por la dificultad de interpretar datos metabólicos en orina. No obstante, se piensa que en el futuro podría ser una técnica relevante para obtener nuevos biomarcadores, motivo por el cual se ha utilizado en el presente trabajo.

2.3.3 Imagen por resonancia magnética (IRM). Papel de las técnicas de resonancia magnética en el diagnóstico, estadiaje y seguimiento del cáncer de próstata

La imagen por resonancia magnética (IRM) como método diagnóstico no invasivo es una técnica con amplia difusión en los países desarrollados. Esto se debe a su importante calidad en el análisis anatómico que la convierte en una herramienta diagnóstica básica tanto en el contexto de patologías benignas como malignas. Posee un alto grado de diferenciación y detección de los diferentes tejidos del cuerpo humano, además de una resolución espacial difícil de lograr con otras técnicas de imagen, especialmente en el estudio de tejidos blandos. La riqueza en las imágenes obtenidas se debe al contraste de las mismas: zonas claras (hiperintensas) y zonas oscuras (hipointensas) según los entornos biofísicos en que se encuentran los protones del agua y según los parámetros de adquisición usados.

En el caso concreto de la próstata, la RMN es la técnica que mejor define su anatomía. Además, la RMN permite valorar la imagen funcional de la próstata mediante técnicas como difusión (RMD), espectroscopía (RME) y perfusión con contraste dinámico (RMC). Para llevar a cabo estos estudios, son precisos equipos de alto campo, de 1,5 o de 3 teslas. Dependiendo de las indicaciones clínicas y del equipo, puede bastar para llevarse a cabo una bobina convencional, y no una endorectal.

2.3.4 Resonancia magnética morfológica

La secuencia en T1 permite la valoración de adenopatías pélvicas, analizar la pelvis ósea para descartar metástasis y valorar la posibilidad de cambios hemorrágicos en la glándula post biopsia. Por otro lado, la secuencia en T2 debe realizarse de alta resolución para valorar la anatomía normal de la próstata. La zona periférica se muestra homogéneamente hiperintensa, separada de la zona central-transicional que

se muestra de forma heterogénea e hipointensa, aunque pueden observarse áreas hiperintensas de adenoma en la misma zona central. El paquete neurovascular (o nervios erectores) se localiza posterolateral a la glándula periférica (132). El criterio patológico de sospecha de cáncer en la RMN morfológica potenciada en T2 se establece ante la presencia de áreas hipointensas nodulares en el interior de la hiperintensidad normal de la glándula o zona periférica (figura 10). Por otro lado, los hallazgos que sugieren cáncer en la zona transicional son: hipointensidad difusa mal delimitada, sin el borde hipointenso visualizado en los adenomas y/o interrupción de la pseudocápsula quirúrgica.

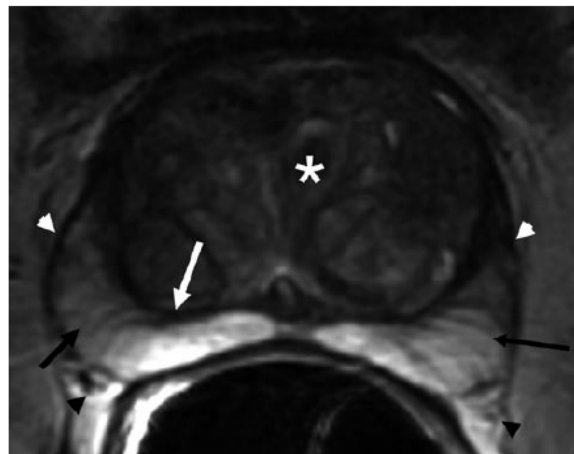


Figura 10. Anatomía en corte axial ponderado en T2. Señal hiperintensa normal de la zona periférica (flechas negras). Pseudocápsula quirúrgica (flecha blanca). Zona transicional con hipertrofia heterogénea normal (asterisco). Cápsula verdadera (cabezas de flechas blancas). Plexo neurovascular (cabezas de flechas negras). Tomada de (133).

2.3.5 Resonancia magnética multiparamétrica

2.3.5.1 Resonancia magnética espectroscopía

La ERM proporciona información metabólica de la glándula. El tejido prostático normal contiene cifras elevadas de citrato y cifras bajas de colina; en cambio, el tejido neoplásico tiene cifras elevadas de colina y reducidas de citrato. El criterio de sospecha es considerar el cociente $(\text{creatina} + \text{colina}) / \text{citrato} > 0,7$ basándose en el análisis realizado en la glándula periférica en equipo de 1,5T, aunque no hay consenso en el cociente metabólico que determine la presencia de cáncer de próstata debido a la

propia variabilidad entre pacientes y equipos de exploración. El criterio más aceptado como sospecha de neoplasia en ERM es cuando las cifras de la colina son más elevadas que el citrato (134, 135). A pesar de todo, la espectroscopía tiene poco valor actualmente en los análisis de RMN multiparamétrica, siendo más importantes, por ejemplo, las imágenes en T2 o las secuencias de difusión.

2.3.5.2 Resonancia magnética difusión

La resonancia magnética difusión aporta información acerca del movimiento browniano aleatorio de las moléculas de agua libre en el espacio intersticial y a través de la membrana celular. En general, el tejido neoplásico tiene más restricción de la difusión que el tejido normal debido a la mayor densidad celular, dificultando así la normal difusión de las moléculas de agua. La secuencia de difusión aporta información, aparte de la densidad celular, la tortuosidad del espacio extracelular, la integridad de las membranas celulares y el grado de organización glandular (133).

2.3.5.3 Resonancia magnética perfusión

La resonancia magnética perfusión permite la valoración de la vascularización de los tumores y de forma indirecta de la angiogénesis. El análisis de los datos del valor de la señal de intensidad del contraste respecto al tiempo puede obtenerse de 3 formas: cualitativo (perfil de la curva), semicuantitativo (cambios en la intensidad de señal) o cuantitativo. Las medidas cualitativas miden el tipo de perfil de curva: tipo I (captación progresiva), tipo II (en meseta) o tipo III (lavado rápido). Algunos autores han demostrado que el parámetro más fiable para detectar neoplasia es la presencia de una pendiente de captación elevada en los primeros segundos, acompañada de un lavado rápido (136).

2.3.5.4 Detección multiparamétrica

La utilización de la secuencia ponderada en T2 de alta resolución es relativamente sensible pero poco específica para localizar el cáncer de próstata. La utilización de las secuencias funcionales, como la ERM, resonancia magnética difusión

y perfusión se muestran potencialmente útiles en complementar la secuencia ponderada en T2, y mejorar así la detección del cáncer de próstata mediante la combinación de 1 o 2 secuencias funcionales, ERM, difusión o perfusión. No ha sido demostrada cuál podría ser la combinación más eficaz de las secuencias funcionales para complementar la secuencia ponderada en T2, ni tampoco la mayor eficacia en combinar todas las secuencias funcionales. Algunas ventajas e inconvenientes de la detección multiparamétrica se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Ventajas e inconvenientes de la RMN funcional multiparamétrica en el cáncer de próstata (133).

VENTAJAS	INCONVENIENTES
Identificar pacientes de alto riesgo	Dificultad de correlacionar la imagen RMN con la ecografía transrectal
Identificar zonas de mayor sospecha	Complejidad en disponer de biopsia dirigida en equipo RMN
Mejorar el rendimiento de la biopsia dirigida por imagen	Artefactos post biopsia
Evitar biopsias innecesarias y repetidas	Dificultad en estandarizar, validar los parámetros de las secuencias
Valoración global de la glándula	Déficit de implementación universal de la RMN de próstata
Detección y estadificación del cáncer	
Seguimiento post tratamiento	
Posibilidad de gradación histológica	

La utilización de la RMN funcional multiparamétrica como herramienta pre-biopsia permite obtener información topográfica de la localización del tumor para dirigir mejor la aguja sobre la lesión. Se trata de evitar la ineficacia de realizar las biopsias a ciegas, lo que supone un método poco preciso para identificar el cáncer de próstata. La eficacia de la RMN multiparamétrica ha sido demostrada también en pacientes con biopsias previas negativas. De todas formas, existe la dificultad en trasladar la información de la RMN a la pantalla de ecografía en el momento de la biopsia, cuando la lesión no es evidente en ecografía. Para ello se pueden valorar distintas opciones. La primera sería detallar de forma específica mediante un diagrama morfológico, la localización del tumor (fusión cognitiva), aunque ello no está exento de error operador dependiente. La segunda sería realizar una sincronización de la imagen en RMN sobre la pantalla de ecografía en tiempo real, aunque la dificultad técnica radica en integrar una imagen estática como la RMN con la ecografía dinámica. La

Introducción

tercera sería realizar la biopsia con guía RMN en la misma sala de exploración de resonancia, aunque el inconveniente es la disponibilidad, coste y complejidad del proceso debido al aparataje necesario. La opción más viable es la de sincronizar la imagen de la RMN en la pantalla de ecografía en el momento de realizar la biopsia (biopsia de fusión) (133, 137-139). Un resumen de los criterios de imagen paramétrica para el cáncer de próstata puede observarse en la tabla 6 y en la figura 11.

Tabla 6. Criterios de imagen paramétrica en RM del cáncer de próstata (133)

SECUENCIA	SIGNIFICADO BIOLÓGICO	HALLAZGOS
Ponderada en T2	Morfología	Disminución de señal nodular
Espectroscopía	Metabolismo	Aumento de ratio (colina+creatinina)/citrato
Difusión	Densidad celular	Disminución del coeficiente de señal aparente
Perfusión	Vascularización	Aumento de pendiente inicial ($\geq 200\%$) + lavado rápido

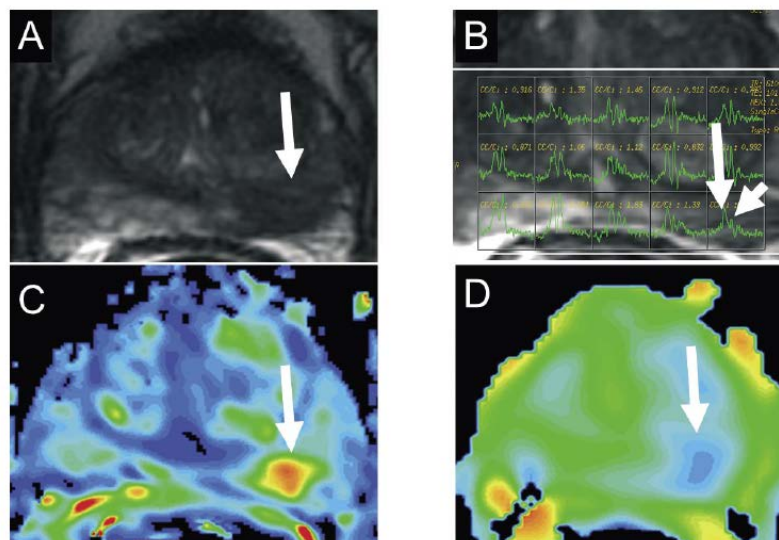


Figura 11. Imagen multiparamétrica del cáncer de próstata. A) Corte axial ponderado en T2 mostrando lesión hipointensa en el lado izquierdo de la zona periférica (flecha). B) El estudio de espectroscopía demuestra elevación de la colina (flecha larga) y descenso del citrato (flecha corta). C) Imagen de perfusión en mapa de color mostrando lesión nodular de color rojo traduciendo intensa captación y lavado rápido del contraste. D) Imagen del mapa de difusión en color con el cálculo del coeficiente de difusión aparente (ADC), traduciendo el color azul valores bajos de ADC (flecha). Tomada de (133).

En el año 2012 se publicó la guía europea para la RMN de próstata. La guía pretendía estandarizar la exploración, las indicaciones y el informe en la RMN multiparamétrica de próstata, mediante la clasificación PI-RADS (*Prostate Imaging Reporting and Data System*), y poder mejorar la eficacia de la biopsia. La clasificación PI-RADS utiliza una puntuación de 1 a 5 para cada una de las secuencias y una puntuación final definitiva, mostrando el criterio PI-RADS más relevante para decidir el grado de sospecha de la exploración. El criterio definitivo, ante discrepancia entre distintas secuencias, se basa en la secuencia que proporcione mayor relevancia en la información para decidir la puntuación final. Una puntuación final de PI-RADS 1 o 2 indica una glándula con baja sospecha de neoplasia, mientras que PI-RADS de 4 o 5 indica sospecha de neoplasia, siendo estos casos tributarios de biopsia (140).

2.3.6 Seguimiento activo y monitorización del tratamiento

El cáncer de bajo riesgo se define como un cáncer con un estadio clínico $\leq T2$, una escala de Gleason ≤ 6 , un nivel de PSA ≤ 10 ng/ml, ≤ 2 cilindros de cáncer de próstata, y 50 % de volumen de cáncer o menos por cilindro. El análisis multiparamétrico en T2, RMD, RME y/o RMC ha mostrado resultados prometedores para correlacionar los hallazgos de imagen a la agresividad del cáncer. Los parámetros clínicos y de la RMN multiparamétrica para el cáncer de próstata no agresivo podrían definirse como el cáncer confinado al órgano, $\leq 0,5$ cc, valores bajos del cociente entre la colina y el citrato, valores más elevados del coeficiente de señal aparente y tumores menos vascularizados (141).

En cuanto a la monitorización tras tratamiento, una vez se ha comprobado una recidiva bioquímica, el principal papel de la imagen es poder precisar si se trata de una recidiva local o a distancia. La RMN funcional puede ser útil para descartar, detectar, y localizar el nivel de la recidiva local tanto para tratamiento quirúrgico como para radiobraquiterapia, hormonoterapia, crioterapia o ultrasonido focal de alta intensidad (HIFU) (142).

2.3.7 Alteraciones metabólicas descritas en cáncer de próstata. Oportunidades diagnósticas y terapéuticas

Una propiedad intrínseca de las células tumorales es lo que se ha denominado como "autosuficiencia metabólica", haciendo referencia a los cambios metabólicos en las células que permiten la carcinogénesis y la progresión tumoral. Estos cambios van destinados al aumento de consumo de energía y a la generación de biomasa, lo que conlleva la proliferación de la neoplasia (143).

En muchas células cancerosas, la glucosa se utiliza como fuente de carbono para los procesos anabólicos necesarios para apoyar la proliferación celular. En el cáncer de próstata son, a menudo, procesos no glucolíticos los que intervienen. En este tumor, alteraciones en el metabolismo de los lípidos, y más concretamente de los ácidos grasos, son necesarios para la síntesis de energía, la producción de membrana celular o la modificación de moléculas de señalización. Así pues, literatura reciente sobre el tema se ha centrado en la lipogénesis regulada al alza, con procesos como la biosíntesis de lípidos, la β -oxidación, la fosforilación oxidativa, además de otros típicos en tumores como la glucólisis o el ciclo del ácido cítrico (144-146). Además de esto, de sobra son conocidas las conexiones entre vías metabólicas y oncogenes, sabiendo que enzimas metabólicas regulan y a su vez están reguladas por este tipo de genes (147).

2.3.7.1 Metabolismo de ácidos grasos (FA)

El desarrollo y la progresión del cáncer de próstata están asociados con mayor lipogénesis, con niveles de triglicéridos altos en suero, bajos de HDL y altos de LDL. La hipercolesterolemia se ha descrito en algunos estudios como factor independiente de cáncer de próstata agresivo, mientras que pacientes con niveles altos de HDL parecen tener un efecto protector frente a tumores de próstata agresivos (148, 149).

Una mayor síntesis de ácidos grasos, de forma independiente con los niveles lipídicos circulantes, es un sello distintivo de cáncer de próstata. La FA sintetasa, igual que otras enzimas lipogénicas y modificadoras de lípidos (ACAC, acetil-CoA lipasa y SCD) se sobreexpresan en cáncer de próstata. En concreto, la FA sintetasa es una proteína citosólica que promueve la síntesis *de novo* de la cadena larga del palmitato.

Este último y sus derivados son promotores de lípidos estructurales que se utilizan en la síntesis de membranas de células tumorales, además de ser un almacén de energía útil para la proliferación celular (150).

Otra vía por la cual los FA intervienen en la progresión del cáncer de próstata es la síntesis de carnitinas a partir de FA, las cuales aumentan la oxidación en las mitocondrias, proceso frecuente en cualquier tipo de neoplasia. Además de esto, los FA también tienen el papel de segundos mensajeros, activando la señalización de las principales vías oncogénicas o sirviendo de sustrato para modificaciones oncogénicas como la palmitoilación o la potenciación de señalización celular (144).

La principal enzima que se ha relacionado con el potencial oncogénico de los FA es la SCD1, que actúa convirtiendo los FA saturados en monoinsaturados. La actividad de la SCD1 se ha relacionado con la transformación neoplásica, el aumento de la proliferación celular, la supervivencia de las células tumorales y la invasividad. SCD1 se ha comprobado como sobreexpresada en tejido prostático canceroso, objetivado tanto con ARNm como midiendo niveles de proteínas. Otras enzimas implicadas en la capacidad oncogénica de los FA son la AKT activada o la monoacilglicerol lipasa. De especial relevancia es la enzima AMPK, encargada de regular la homeostasis entre el metabolismo de la glucosa y el de los FA. Se ha comprobado que el receptor de andrógenos actúa sobre AMPK aumentando la síntesis de FA (147, 151).

El reto en el futuro será encontrar fármacos que, alterando la vía de los FA, puedan ser útiles en el contexto del cáncer de próstata. Ensayos preclínicos donde se ha demostrado que moléculas inhibitoras de la síntesis de FA, como teglicar o etomoxir, conllevan una disminución de la supervivencia celular tumoral en cáncer de próstata (152).

2.3.7.2 Metabolismo del Colesterol

El metabolismo del colesterol es importante en la síntesis de membrana y en la esteroidogénesis, esenciales ambas en la supervivencia y mantenimiento tumoral. Un tercio de los lípidos de membrana plasmática están formados por colesterol, además de ser el componente principal de los microdominios de membrana. Éstos regulan la

transducción de señales, canalizando estímulos extracelulares hacia el núcleo. Las señales pueden regular la síntesis tanto de colesterol como de otros lípidos. Se han descrito algunas moléculas presentes en estos microdominios, como AKT, la cual juega un papel importante en el crecimiento y supervivencia celular, estimulando a nivel transcripcional genes involucrados en la síntesis de FA y colesterol (153).

La hipercolesterolemia se ha asociado con una mayor proliferación celular tumoral, un aumento de activación de AKT y unos mayores niveles de andrógenos. El colesterol es un precursor metabólico para la síntesis de hormonas esteroideas como los andrógenos. En el cáncer de próstata avanzado, los andrógenos se pueden sintetizar directamente a partir del colesterol. Además, la correlación *in vitro* entre concentraciones de colesterol y CYP17A, una enzima esencial para la síntesis de andrógenos, apoya esta teoría (154).

Otro aspecto conocido sobre el metabolismo del colesterol en el cáncer de próstata es el aumento del receptor LDL en las células metastásicas. Se ha comprobado que estas células tumorales esterifican el colesterol en gotas de lípidos para evitar la toxicidad propia del colesterol intracelular. De esta forma, las células mantienen niveles de colesterol constantes de forma independiente de los niveles séricos de colesterol. Estos niveles elevados de colesterol mantienen activos algunos enzimas reguladores como por ejemplo SRBEP, encargado de la biogénesis celular de colesterol. Las células tumorales con SREBP2 o SREBP1 controlan directamente el gen transcriptor de LDL, consiguiendo siempre niveles elevados de colesterol (155, 156).

Sobre posibles dianas terapéuticas en este contexto, se ha comprobado que el uso de estatinas (fármaco que inhibe el sitio activo catalítico de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa), se ha asociado con un menor riesgo de desarrollar cáncer de próstata, incluso se ha concluido un aumento de la supervivencia libre de progresión después de prostatectomía o radioterapia (157).

2.3.7.3 Metabolismo del folato y metionina

En cáncer de próstata, el ciclo del folato es importante y tiene una peculiar función. El agotamiento del folato desencadena la transformación maligna a través de la inestabilidad genómica causada por la hipometilación del ADN. Por el contrario, los altos niveles de folato permiten una alta proliferación, crecimiento y mejora de la síntesis de ADN. Es conocido que las células tumorales prostáticas son sensibles a las concentraciones de folato (158).

Por otro lado, la vía de la transulfuración de la metionina regula la homeostasis celular. La disregulación de esta vía genera un exceso de radicales libres, dañando proteínas y ADN. Las células normales están protegidas de la oxidación producida por glutatión, un producto de la vía de transulfuración, a través de glutatión-peroxidasas y glutatión-transferasas. En el cáncer de próstata, estas enzimas son silenciadas por la hipermetilación del ADN, y este efecto podría ser responsable de la resistencia a algunas terapias (159).

En cuanto a la terapéutica, la importancia del metabolismo del folato queda subrayada por el amplio uso de la quimioterapia antifolato. En cáncer de próstata, los resultados de estos tratamientos son controvertidos, y en cáncer de próstata resistente a la castración, la acción de algunos antifolatos llega a interferir con el receptor de andrógenos. Por ejemplo, el metotrexato inhibe la actividad del receptor de andrógenos en pacientes tratados con terapia de deprivación de andrógenos. El uso de drogas antifolato podría ser útil en los casos de cáncer de próstata en tumores relacionados con estas alteraciones metabólicas (158).

2.3.7.4 Metabolismo de aminoácidos: glutaminólisis

La glutaminólisis representa una fuente de carbono y nitrógeno en el ciclo del ácido tricarboxílico, produciendo NADPH. La glutamina se convierte en glutamato a través de la glutaminasa, y luego en α -cetoglutarato, que ingresa en el ciclo del ácido tricarboxílico, produciendo energía en forma de ATP celular. Adicionalmente, la glutamina contribuye a la acumulación de carbono mitocondrial para el

mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial y para la síntesis de nucleótidos, proteínas y lípidos (160).

El receptor de andrógenos en las células tumorales regula a los transportadores de glutamina e impulsa el metabolismo de la glutamina hacia la glutaminólisis, que conduce a la acumulación de α -cetoglutarato. Así pues, el receptor de andrógenos favorece la absorción de glutamina, mientras que fármacos como la rapamicina disminuye la absorción mediada por este receptor. Por otro lado, algunos oncogenes como MYC están regulados en el cáncer de próstata, siendo su función la modulación de glutaminólisis en las mitocondrias. La sobreexpresión de MYC en cáncer de próstata induce la conversión de glutamina en ácido glutámico, que es utilizado como fuente de carbono para la producción de NADPH (161).

La enzima glutaminasa se ha convertido en un objetivo clave para las terapias moleculares en esta vía, aunque no existen estudios in vivo concluyentes (162).

2.3.7.5 Metabolismo de glucosa

Las células tumorales generalmente exhiben glucólisis elevada para obtener energía y producción de biomasa. Aunque la glucólisis aeróbica no es un sello metabólico específico del cáncer de próstata, un nivel elevado del fenotipo glucolítico se ha descrito en etapas avanzadas de la enfermedad. Enzimas clave descritas en esta vía son GLUT1, HK1, HK2 y PFK2, todas ellas bajo el control del receptor de andrógenos (151).

Por otro lado, es especialmente importante el papel de GLUT1, un transportador transmembrana de glucosa sobreexpresado en cáncer de próstata y regulado por el receptor de andrógenos. Algunos factores como la hipoxia, pueden aumentar la expresión de GLUT1 en las membranas celulares, y en consecuencia favorecer la absorción de glucosa. Se ha demostrado que GLUT1 se sobreexpresa con mayor frecuencia en cáncer de próstata, y en casos con Gleason elevado. Añadir que la pérdida de la proteína tumoral 53, frecuente en el cáncer de próstata, también favorece la expresión de GLUT1 (163).

Varias moléculas están siendo investigadas mediante ensayos clínicos en este contexto. Entre ellas, la silibina, inhibidor de GLUT1, puede reducir la angiogénesis y regular negativamente EGFR. Otro es la lonidamina, que causa acidificación intracelular y apoptosis in vitro de las células tumorales prostáticas (164).

2.3.8 Relevancia clínica

Aunque actualmente no hay relevancia para el uso rutinario de perfiles metabólicos como biomarcadores predictivos en cáncer de próstata, existen ya argumentos contrastados que revelan una fuerte asociación entre alteraciones metabólicas con el desarrollo y progresión del cáncer de próstata. A pesar de que los perfiles metabólicos pueden verse alterados por hechos como tratamientos farmacológicos o hábitos de vida, hay un creciente número de alteraciones descritas que se vinculan con alteraciones metabólicas específicas del cáncer de próstata. Por ejemplo, la enzima AMPK, desregulada también en el síndrome metabólico y en la diabetes; inhibidores de la glutaminasa; inhibidores de lipogénesis con SREBP1, o inhibidores de GLUT1, son algunas de las dianas terapéuticas para alterar el metabolismo que actualmente se encuentran en estudio (147, 165).

De esta forma, como se ha descrito al inicio de esta tesis, el cáncer de próstata es una enfermedad muy prevalente a nivel mundial, y en la cual se manejan un número importante de recursos a nivel de diagnóstico, de tratamiento o de seguimiento. A pesar de la introducción durante los últimos años de nuevas herramientas diagnósticas, como la RMN multiparamétrica, el diagnóstico definitivo sigue siendo mediante biopsia prostática. Éste es un método invasivo, y por lo tanto con complicaciones asociadas. Por este motivo, durante las últimas décadas existen numerosas líneas de investigación en el ámbito de los biomarcadores, intentando ir más allá del clásico PSA. Aunque se han descrito algunos de los habituales en la práctica clínica, su uso no está hoy todavía implementado de forma generalizada.

La metabolómica es una de las ciencias ómicas capaz de aportar perfiles metabólicos específicos de enfermedades, y por lo tanto que podría tener valor para hallar biomarcadores en el contexto del cáncer de próstata. En otro apartado también

Introducción

se han descrito alteraciones en vías metabólicas que ocurren en este tipo de neoplasia. En caso de poder especificar qué moléculas de estas vías diferencian exactamente los casos con cáncer, con tumores agresivos, o con peor evolución, podrían desarrollarse modelos predictores que incluyeran a esos metabolitos y que ayudasen, de forma no invasiva, a la toma de decisiones en el ámbito del cáncer de próstata.

2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

2.1. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

El cáncer de próstata es una patología muy heterogénea y con una evolución desconocida en muchas ocasiones tras ser diagnosticada. En la actualidad se utilizan abundantes parámetros clínico-patológicos y pruebas de imagen para detectar el cáncer de próstata, intentando así evaluar la necesidad de un tratamiento concreto, bien de forma temprana o diferida, en función de la agresividad tumoral. A pesar de la existencia de sistemas predictivos basados en factores histopatológicos (como la escala Gleason), bioquímicos (como el PSA), o en la RMN prostática (como el PI-RADS), éstos suelen tener importantes limitaciones en cuanto a la predicción en el diagnóstico y en la evolución de la enfermedad. Por este motivo, se han depositado grandes esperanzas en el uso de biomarcadores moleculares obtenidos de las ciencias ómicas, los cuales podrían estar íntimamente relacionados con las características biológicas del estado tumoral. Así pues, se espera que estos biomarcadores se conviertan en un futuro en una herramienta útil para mejorar en el diagnóstico y para la predicción de la evolución de esta patología, ayudando a tomar decisiones en el manejo de esta enfermedad.

La hipótesis de partida es que el tejido prostático de un varón que sufre cáncer de próstata presentará un perfil metabolómico diferencial respecto al de un varón sano, y ese perfil metabolómico puede ser identificado tanto en tejido como en la orina. El cáncer de próstata es un proceso gradual que va evolucionando hacia estadios de mayor malignidad. Pensamos que según evoluciona la enfermedad a grados mayores de agresividad, mayor es el cambio metabolómico que se genera en el tejido y por tanto sería posible correlacionar el perfil metabólico con el grado de agresividad. Por otra parte, planteamos la posibilidad de utilizar la orina que está en contacto con la próstata cancerosa para la detección indirecta del cáncer. La presencia aumentada o disminuida de ciertos metabolitos en la orina pueden aportar información adicional para discriminar la presencia de cáncer y estratificar la agresividad del tumor.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GENERALES

Esta tesis se centra en el estudio metabólico de tejido prostático tumoral humano *ex vivo* mediante ^1H -HR-MAS. Esta técnica permite la adquisición de espectros directamente de tejidos intactos (biopsia o cirugía), y se ha vuelto muy importante para estudios de metabolómica integrada.

Los objetivos generales de esta tesis son:

1. Describir y comparar características clínicas y demográficas de una muestra de varones de nuestra área sanitaria (departamento de salud número 5 de la Comunidad Valenciana) que se someten a una biopsia prostática transrectal.
2. Determinar la capacidad del HR-MAS para crear una huella metabólica que diferencie el tejido tumoral de un cilindro de próstata de tejido sano.
3. Analizar si la huella metabólica obtenida en un cilindro permite obtener información sobre la existencia de tejido tumoral en cualquier zona restante de la próstata.
4. Determinar si el perfil metabólico de la orina tiene utilidad en el diagnóstico del carcinoma prostático.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos que se pretenden conseguir en esta tesis son los siguientes:

1. Estudiar la capacidad de la metabolómica por HR-MAS para construir un modelo que permita valorar mejor la agresividad del tumor o estratificar mejor a los pacientes en base a la agresividad tumoral (según grado de Gleason).
2. Determinar si el perfil metabólico de la orina tiene utilidad para estratificar mejor a los pacientes en base a la agresividad tumoral (según grado de Gleason).

Objetivos

3. Evaluar la capacidad de la metabolómica por HR-MAS para estimar el riesgo de recidiva bioquímica.
4. Determinar si el perfil metabólico de la orina tiene utilidad para estimar el riesgo de recidiva bioquímica.
5. Establecer las vías metabólicas clave involucradas en el cáncer prostático y su conexión con el metaboloma urinario para comprender mejor la biología del cáncer de próstata así como para servir como potencial diana terapéutica

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 ESTUDIO POBLACIONAL Y PLANTEAMIENTO METODOLÓGICO

Para el desarrollo de esta tesis hemos planteado un estudio en dos fases (figura 12). Una primera, transversal, en la que se recogieron los datos de las variables clínicas y anatomopatológicas clásicas con respecto al momento de la biopsia y la posterior cirugía (en los casos que se optó por cirugía como tratamiento) y la realización de las mediciones de metabolitos en tejido y orina. En la segunda fase, ambispectiva, se realizó seguimiento longitudinal de los pacientes para comprobar si se produjo recidiva bioquímica, recogiendo estos datos de seguimiento.

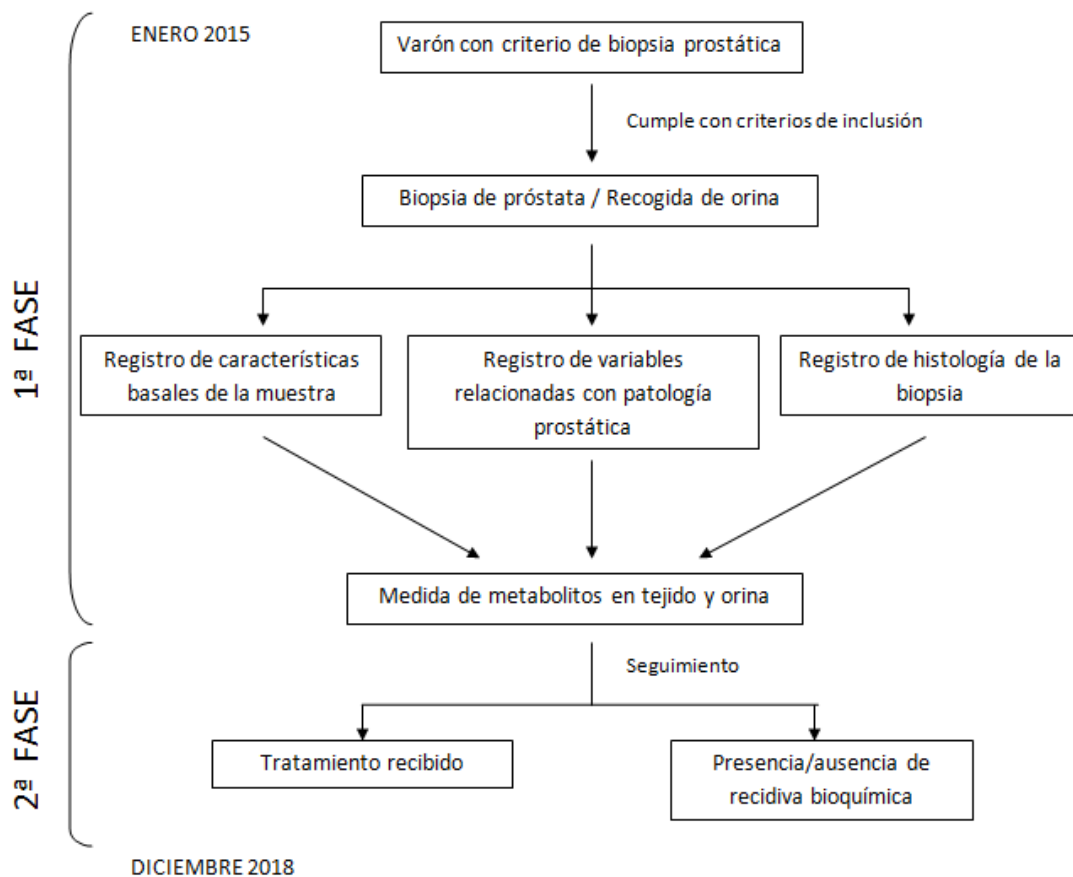


Figura 12. Diagrama de flujo mostrando el planteamiento metodológico del estudio.

Material y Métodos

El tamaño muestral se calculó en base al tamaño de la población, con un nivel de confianza y margen de error establecidos (ecuación 3). Así pues, se aceptó como tamaño de la población al número de varones de 45 años (por aumentar el riesgo de tener cáncer de próstata a partir de esa edad) o más de nuestro departamento sanitario en el momento de iniciar el estudio (datos de 2014), siendo de 67.000 hombres (21). Se estableció un nivel de confianza del 95% y un margen de error del 5%. La fórmula utilizada para este cálculo es la que se muestra a continuación. La puntuación aceptada fue 1,96, que corresponde a un nivel de confianza deseado del 95%. Este cálculo, se llevó a cabo con el programa estadístico SPSS ver. 20 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows. Armonk, NY: IBM Corp.) El tamaño muestral mínimo calculado fue de 168 casos.

$$\text{Tamaño de la muestra} = \frac{\frac{z^2 \times p(1-p)}{e^2}}{1 + \left(\frac{z^2 \times p(1-p)}{e^2 N} \right)}$$

Ecuación 3. Fórmula empleada para el cálculo del tamaño muestral, donde e = margen de error, z = puntuación z, N = tamaño de la población y p = nivel de significación estadística.

Los sujetos del estudio fueron seleccionados desde consultas de urología del Hospital Clínico de Valencia, siendo pacientes que acudían por sospecha de cáncer de próstata y con alguna de las indicaciones habituales de biopsia: PSA igual o mayor de 4 ng/mL, tacto rectal sospechoso, o seguimiento dentro del manejo de pacientes en vigilancia activa. El inicio de la recogida de muestras se inició en enero de 2015, hasta alcanzar, como mínimo, el tamaño muestral deseado. La mayor parte de pacientes pertenecían al área de salud 5 de la Comunidad Valenciana. En el momento de inicio del estudio, vivían 350.905 personas en este departamento, siendo varones 169.656, de los cuales 67.000 tenían igual o más de 50 años.

Los criterios de inclusión planteados para participar en el estudio fueron:

- Pacientes mayores de 18 años que entendiesen el estudio y que dieran su consentimiento para participar en el mismo. Todos los casos debían leer el consentimiento informado, entenderlo, y dar su aprobación mediante firma.

- Pacientes que llegasen correctamente preparados para realizar la biopsia transrectal de próstata, siguiendo de forma estricta el protocolo de biopsia prostática del Servicio de Urología que se expone posteriormente.
- Pacientes que aceptasen y tolerasen un masaje transrectal de próstata previamente a la biopsia, y que pudiesen orinar a continuación para la recogida de orina.
- Pacientes que tolerasen bien la biopsia de forma que pudiera extraerse una muestra de más para su estudio metabólico y posterior histológico.

De todos los pacientes incluidos se recogieron las características demográficas basales, relacionadas con la patología prostática, y también datos sobre la evolución de la enfermedad. Los datos recogidos incluyeron la edad de los pacientes en el momento de la biopsia (en años) y las comorbilidades. Dentro de las comorbilidades se registró el índice de masa corporal (IMC); la presencia o ausencia de hipertensión arterial (HTA); diabetes mellitus (DM); dislipemia (DL); neumopatía; neuropatía; cardiopatía; vasculopatía; endocrinopatía; patología digestiva; hiperplasia benigna de próstata (HBP); o depresión. El IMC se tuvo en cuenta tanto para describir las características basales de la muestra como para relacionarlo con la patología prostática, ya que la obesidad se ha descrito como un factor que puede aumentar el riesgo de cáncer de próstata (7). Para describir las características basales, la muestra se agrupó según IMC en normopeso (menor de 25), sobrepeso (entre 25 y 29,9), y obesidad (igual o mayor de 30). Todos los datos de comorbilidades se recogieron a partir de la información disponible en el programa Abucasis, el sistema para la gestión sanitaria de la Agencia Valenciana de Salud. En este sistema se encuentran todos los antecedentes médicos del paciente incorporados por cualquier profesional sanitario en algún momento.

También se registraron características basales en relación con la patología prostática: valor de PSA (en ng/mL), densidad de PSA (PSAd) y cociente de PSA en la biopsia; volumen prostático medido por ecografía transrectal en cc (midiendo los tres ejes espaciales entre sí y por 0,55); grado de Gleason en la biopsia transrectal; afectación tumoral de las vesículas seminales; casos con tumor o ausencia de tumor tanto en el estudio de la biopsia estándar como en el cilindro utilizado para el estudio

metabolómico; casos con sospecha al tacto rectal y con sospecha ecográfica de carcinoma; y casos con recidiva bioquímica. En el apartado descriptivo, para los valores de PSA y de fracciones de PSA se utilizaron los puntos de corte más utilizados en la práctica clínica habitual (166). Así, la muestra se dividió según niveles de PSA en menor de 4 ng/mL, entre 4-10 ng/mL, y mayor de 10 ng/mL. Según PSAd, entre mayor y menor de 0,15 (sospechoso para carcinoma mayor de 0,15), y según cociente de PSA en mayor y menor de 0,2 (sospechoso para tumor menor de 0,2). Además, se registraron el porcentaje de cilindros afectados (dentro de los 10 biopsiados) y la zona prostática afectada en la biopsia (periférica, central o ambas).

4.2 RECOGIDA DE MUESTRAS

Todas las muestras biológicas se recogieron previo consentimiento informado de los pacientes, y de acuerdo con los requisitos establecidos en la Declaración de Helsinki y en la Asociación Médica Mundial (*World Medical Association, WMA*), tras la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia, y del Comité Científico Interno de la Fundación de Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia (documentos adjuntos en anexo II).

Mediante un proceso de biopsiado transrectal, se obtuvieron de cada paciente 10 cilindros para el estudio histológico habitual, y 1 cilindro para el estudio metabolómico y posterior estudio histológico. En adelante, al cilindro utilizado para el estudio metabólico lo denominaremos "cilindro HR-MAS" y a los otros diez cilindros recogidos se les citará como "biopsia estándar". Adicionalmente, se realizó un masaje transrectal y se recogió la orina posterior tras micción espontánea, en el momento inmediatamente previo a la biopsia. Después de la recogida de muestras, el cilindro HR-MAS y la orina fueron enviados la misma mañana de la recogida al Laboratorio de Imagen Molecular y Metabolómica de la Unidad Central de Investigación en Medicina de la Universitat de València, para ser congeladas a -80°C y mantenidas allí hasta su procesamiento y medición. El cilindro HR-MAS, tras ser medido, se envió al Servicio de Anatomía Patológica para su estudio histológico. Al mismo tiempo, los 10 cilindros de la biopsia estándar, destinados al estudio histológico habitual, fueron fijados en formol en el momento inmediato a su recogida y transportados al Servicio de Anatomía

Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Tras ser medidos y procesados los cilindros de HR-MAS, se recuperó la muestra, se fijó en formol y trasladada al Servicio de Anatomía Patológica para su estudio histológico.

Por otra parte, la base de datos fue completada conforme los casos eran recogidos. De esta forma, las características basales de los pacientes se registraban en el momento de inclusión en el estudio; las características anatomopatológicas se registraban un mes después de la recogida, que es el tiempo que tardan en ser informadas las biopsias en el Servicio de Anatomía Patológica.

A modo de resumen, la figura 13 muestra esquemáticamente el procedimiento de recogida y gestión de la muestra biológica hasta la medida de RMN y el estudio histopatológico del tejido.



Figura 13. Diagrama de flujo mostrando el procedimiento de recogida de muestras y su posterior envío al Laboratorio de Imagen Molecular y Metabólica y al Servicio de Anatomía Patológica.

4.2.1 Biopsia transrectal

El material biológico correspondiente con tejido prostático fue recogido en el momento de realización de biopsia transrectal de próstata. Las indicaciones más frecuentes para llevar a cabo esta exploración fueron: PSA igual o mayor de 4 ng/mL, tacto rectal sospechoso, o seguimiento dentro del manejo de pacientes en vigilancia activa. A todos los pacientes se les indicó la biopsia en alguna visita desde consultas externas de urología, debiendo entender en qué consistía la exploración y firmando el consentimiento informado bien de la Conselleria de Sanitat Universal i Salut Pública, o bien de la Asociación Española de Urología.

El protocolo utilizado en el Servicio de Urología del Hospital Clínico Universitario de Valencia para la realización de biopsia transrectal durante el periodo de reclutamiento, se expone a continuación:

1. Preparación del paciente.
 - Para evitar complicaciones infecciosas, los pacientes debían tomar ciprofloxacino, 500 mg, uno cada 12 horas, comenzando el día previo a la realización de la biopsia. En caso de alergia medicamentosa a quinolonas, el antibiótico era sustituido por cefuroxima 500 mg, uno cada 12 horas, empezando también el día previo. La pauta antibiótica debía mantenerse hasta un total de 5 días.
 - Como preparación intestinal, se administraba un enema transrectal de limpieza de 250 ml, la misma mañana de la prueba.
 - En caso de toma habitual de anticoagulantes, los pacientes debían acudir a su centro de control de tratamiento anticoagulante para suspensión temporal o sustitución por heparina de bajo peso molecular previamente a la biopsia.
 - En caso de tratamiento con clopidogrel o con ácido acetil salicílico 300 mg, se sustituyó el tratamiento 5 días antes y hasta 5 días después de la biopsia por ácido acetil salicílico 100 mg.
2. Exploración y toma de muestra prostática.

- La exploración se inició con un examen físico mediante tacto rectal.
- La realización de la biopsia se llevó a cabo con el paciente en decúbito lateral, flexionando las rodillas, e intentando llevarlas hacia el pecho.
- El ecógrafo utilizado fue un G50 de Siemens®.
- En todos los casos se inició la técnica infiltrando anestesia local para disminuir las molestias en los pacientes. Esto se llevó a cabo mediante la inyección de 4 ml de lidocaína al 2%, inyectando 2 ml en la zona del ángulo prostatoseminal y 2 ml en la zona del ápex prostático, con una aguja de 20G.
- A continuación, se procedió a la realización de la ecografía (no incluía ningún programa de análisis de imagen). En ella se calculaba el volumen de próstata mediante la medición de los diámetros craneocaudal, lateral y oblicuo de la próstata. Además, se buscaron imágenes sospechosas de afectación tumoral, como son zonas hipoecoicas, ausencia de bordes nítidos en la periferia de la glándula, o el borramiento del ángulo prostatoseminal. En la figura 3 de este documento pueden observarse imágenes sospechas de carcinoma en ecografía.
- El protocolo habitual comprendía la obtención de 10 muestras, 5 del lóbulo izquierdo y 5 del derecho. De cada lóbulo se tomó un cilindro de tejido de la zona periférica basal, periférica media, periférica apical, medial basal, y medial apical (estas dos últimas localizaciones correspondientes a la zona central prostática). Los cilindros se extrajeron mediante una aguja tru-cut de 18 Ch de grosor y 25 cm de longitud. Dentro de cada zona, en caso de existir una zona ecográficamente sospechosa de tumor, se tomó la muestra en ese lugar.

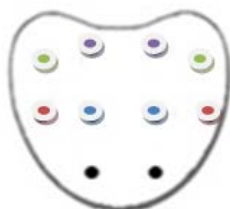


Figura 14. Esquema de biopsia seguido en el Servicio de Urología del Hospital Clínico Universitario. En verde, zona periférica basal; en marrón zona periférica media; en negro, zona periférica apical; en morado, zona medial basal; en azul, zona medial apical.

Material y Métodos

- Cada uno de los cilindros extraídos eran depositados en un bote no estéril con formol, indicando en cada bote la localización prostática de la cual procedía el tejido. De esta forma, se consiguió localizar el lugar de asentamiento exacto el tumor en caso de existir.
- Los botes eran transportados al final de la jornada al Servicio de Anatomía Patológica para su procesamiento y estudio histológico.

En aquellos pacientes que cumplían con los criterios de inclusión del estudio, se añadieron las siguientes maniobras a la biopsia estándar:

- Inicio del procedimiento cuando el paciente tuviera el suficiente deseo de micción espontánea, para poder recoger así muestra urinaria.
- Durante el tacto rectal debía realizarse un masaje digital prostático, con el objetivo de obtener líquido prostático en la posterior muestra de orina.
- Micción espontánea y recogida de orina en un bote antes de iniciar las maniobras de ecografía transrectal.
- Recogida de un cilindro "extra" para su procesamiento y medida en el Laboratorio de Imagen Molecular y Metabólica. En caso de existir una zona ecográficamente sospechosa, la muestra adicional debía tomarse de esa localización. Los cilindros extra (cilindro HR-MAS), a diferencia de los 10 del protocolo habitual (biopsia estándar), eran depositados en un bote no estéril sin formol, indicando en cada bote un código anónimo e inequívoco para cada paciente.
- Traslado de las muestras (la porción de tejido prostático y la orina recogida) tras su recogida al Laboratorio de Imagen Molecular y Metabólica para su conservación en ultra congelación a -80°C.

El hecho de tomar un cilindro extra para realizar el estudio o de realizar un masaje prostático, no fue considerado como una alteración significativa de la práctica clínica habitual. Existen numerosos protocolos de biopsia transrectal, diferentes al utilizado en nuestro servicio, consistentes en tomar más muestras que las 10 obtenidas habitualmente en nuestro hospital (167). Las tasas de complicaciones en estos

protocolos son escasas, por lo que consideramos que tomar un onceavo cilindro, no supuso ningún perjuicio sobre los pacientes. Además, el cilindro destinado al estudio metabolómico fue posteriormente procesado para su estudio histológico, de forma que también resultó útil para el diagnóstico de carcinoma en los pacientes.

4.2.2 Muestra de orina

Para la recogida de la muestra de orina se siguió el siguiente protocolo:

- En el momento inmediatamente previo a la biopsia, y cuando el paciente tuviera el suficiente deseo de micción espontánea, se realizó un masaje transrectal prostático.
- Micción espontánea y recogida de orina en un bote no estéril, antes de iniciar las maniobras de ecografía transrectal.

De manera similar a la muestra de tejido, cada bote de orina fue rotulado con un código anónimo e inequívoco para cada paciente, y trasladado al Laboratorio de Imagen Molecular y Metabolómica para su conservación en ultra congelación a -80°C.

4.3 ESTUDIO HISTOLÓGICO EN EL SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA

Tras la recepción de las biopsias en el Servicio de Anatomía Patológica, se prepararon las muestras mediante el protocolo estándar de procesamiento para visualización al microscopio óptico. El protocolo incluye las fases de fijación, deshidratación, inclusión, corte, desparafinado e hidratación, tinción y montaje.

Las muestras de próstata se fijaron en formaldehído al 10% y se procesaron de forma automatizada (procesador tisular de vacío Leica ASP6025®) en alcoholes en concentraciones crecientes y xiloles, para su inclusión en bloques de parafina. Se realizaron secciones de 3 micras que se tiñeron con hematoxilina-eosina, de acuerdo al protocolo validado Dako Reagent Management System® en el teñidor-montador automático Dako CoverStainer® (168).

Material y Métodos

El estudio inmunohistoquímico para diagnóstico histopatológico, se realizó mediante tres anticuerpos monoclonales (racemasa, p63 y Ck34betaE12; ver tabla 7). La racemasa permite distinguir entre carcinoma, PIN de alto grado, hiperplasia adenomatosa atípica, y glandular normal. Los otros dos anticuerpos señalan la presencia de células basales en las glándulas benignas, estando estas células ausentes en los carcinomas de próstata (169). La técnica de inmunotinción se realizó siguiendo el protocolo de visualización Dako EnVision FLEX[®] en el inmunoteñidor Dako Autostainer Link 48[®] (168).

Tabla 7. Diferentes anticuerpos y su descripción utilizados para el estudio inmunohistoquímico de las muestras (168).

ANTICUERPO	CLON	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
RACEMASA	13H4	prediluido	Dako
p63	DAK-p63	prediluido	Dako
CK34betaE12	CK34betaE12	prediluido	Dako

4.4 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA LA DETERMINACIÓN DEL PERFIL METABÓLICO MEDIANTE RMN

Las medidas del cilindro HR-MAS se realizaron mediante una sonda de High-Resolution Magic Angle Spinning de 4mm para semisólidos (figura 15). El proceso de preparación consistió en coger la totalidad de la muestra disponible congelada (1-12 mg), introducirla en un rotor de 50 μ l de zirconia y añadirle 25 μ l de D₂O. El proceso completo de manejo de la muestra para la preparación del rotor se llevó a cabo en frío mediante nitrógeno líquido para evitar la descongelación y posible degradación de la misma. La manipulación de la muestra y el proceso de preparación del rotor no duró más de 5 minutos. Los espectros se adquirieron a una temperatura constante de 277K dentro del rotor.

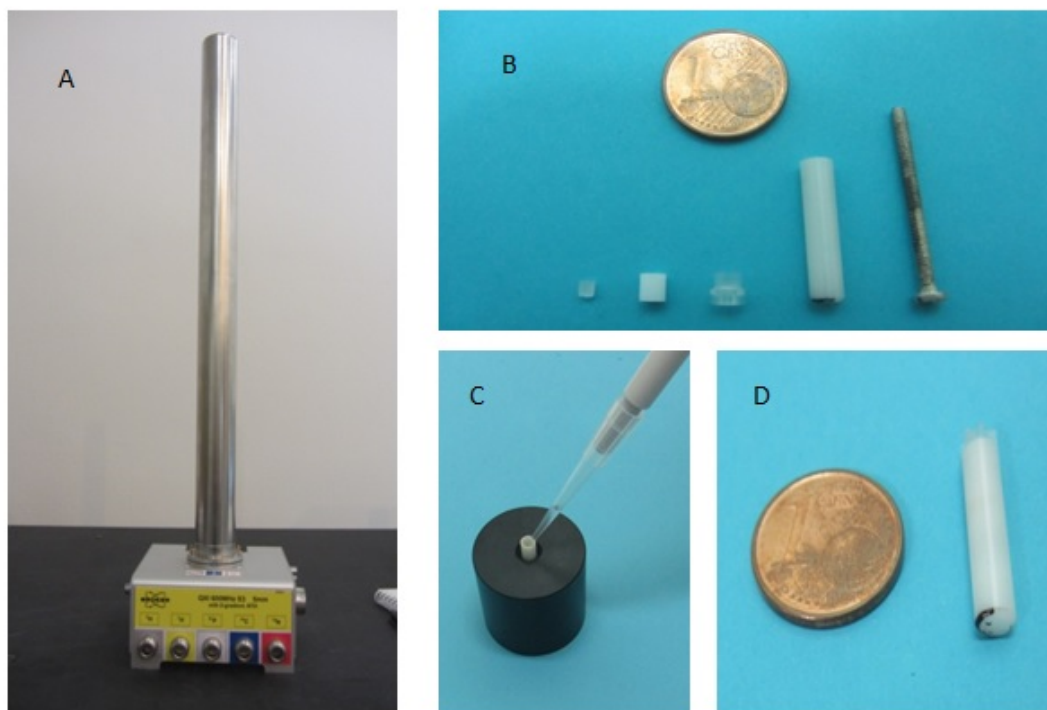


Figura 15. Material utilizado en el Laboratorio de Imagen Molecular y Metabólica para el procesamiento de las muestras. A) Sonda QXI de 5 mm para líquidos utilizada para medir las muestras de orina. La sonda utilizada para medir los cilindros de tejido fue de 4 mm de HR-MAS (para semisólidos) con una apariencia externa similar. B) Materiales utilizados para montar el rotor y comparación de tamaño con una moneda de 1 céntimo de Euro. C) Adición de 25 μL de D_2O a la muestra del cilindro prostático. D) Forma final del rotor montado y comparativa de tamaño con una moneda de 1 céntimo de Euro.

Por otro lado, las muestras líquidas de orina se prepararon en tubos de 5mm de RMN de alto campo para SampleJet. El procedimiento general de preparación de las muestras consistió en adicionar 80 μL de una solución de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (39mM) / $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (62mM) / ácido trimetilsililpropanoico- d_4 (TSP, 31,54 mM) en D_2O a 425 μL de orina e introducir el total de la mezcla dentro del tubo de 5mm de RMN. La concentración final de TSP en el tubo de medida fue de 5,05 mM.

4.4.1 Adquisición de los espectros de RMN

4.4.1.1 Muestras de tejido prostático

Todos los espectros fueron adquiridos en un espectrómetro Bruker Avance III DRX 600 (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Alemania) operando a una frecuencia de ^1H de 600,13 MHz (figura 16). El espectrómetro está equipado con una sonda de triple resonancia de HR-MAS para los núcleos ^1H - ^{13}C - ^{15}N , con juego de rotores de 4 mm, con gradiente de campo magnético alineados con el eje del ángulo mágico. La velocidad de giro de las muestras se mantuvo a 5000 Hz para mantener las bandas laterales de rotación fuera de la ventana de adquisición. Con el fin de minimizar los efectos de la degradación del tejido con la temperatura, lo que alteraría la composición metabólica de la muestra, todos los espectros fueron adquiridos a una temperatura de 277 K. Antes de realizar las medidas correspondientes a las muestras, se corrigió la posible diferencia entre la temperatura interna del rotor respecto a la nominal mediante un calibrado con una muestra de metanol 100%. Para todas las muestras se adquirió un experimento de un pulso simple con presaturación de agua, de 15 minutos de duración, con 2,27 segundos de tiempo de adquisición, 256 repeticiones, 32768 puntos adquiridos y 1 segundo de tiempo de relajación. La presaturación del agua se usó durante 1 segundo a lo largo del tiempo de reciclado para la supresión de la señal del solvente. La anchura espectral para todos los espectros fue de 8000 Hz (12 ppm) para el espectro de ^1H . Para todas las muestras se adquirió un experimento de un pulso simple con presaturación de agua, con 256 repeticiones y 32768 puntos. La presaturación del agua se usó durante 1 segundo a lo largo del tiempo de reciclado para la supresión de la señal del solvente. La anchura espectral para todos los espectros fue de 8000 Hz para el espectro de ^1H . Antes de aplicar la transformada de Fourier a los datos, se multiplicó la FID (decaimiento libre de la señal) por una función exponencial de anchura de línea de 1 Hz.



Figura 16. Material utilizado en el Laboratorio de Imagen Molecular y Metabólica para la medición de las muestras. A) Espectrómetro Bruker Avance III DRX 600 (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Alemania), utilizado en este estudio. B) Pantalla de la unidad de HR-MAS mostrando la velocidad de giro de las muestras de tejido prostático (5000 Hz).

4.4.1.2 Muestras de orina

Al igual que en tejido, todos los espectros fueron adquiridos en un espectrómetro Bruker Avance III DRX 600 (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Alemania) operando a una frecuencia de ^1H de 600,13 MHz y equipado con una sonda QXI 5mm de cuádruple resonancia $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^{31}\text{P}$. La gestión de los tubos de medida, entrada y salida del espectrómetro, se realizó mediante un robot muestreador termostatzado SampleJet. La temperatura de la muestra dentro del equipo se controló mediante una unidad enfriadora BCU Xtreme. La uniformidad del campo magnético se consiguió inicialmente mediante un ajuste manual de las bobinas de homogeneidad usando un experimento 1D con presaturación de agua en modo interactivo. Para el resto de las medidas, la homogeneidad de campo se mantuvo mediante una rutina de corrección automática (TopShim) implementada en el software del equipo. La temperatura nominal de la muestra durante las medidas se mantuvo constante en 310K. Para todas las muestras se adquirió un experimento de un pulso simple con presaturación de agua, de 3 minutos de duración, 256 repeticiones, 65.000 puntos, 2 segundos de tiempo de relajación y 3,94 segundos de

tiempo de adquisición. La presaturación del agua se ejecutó durante 1 segundo a lo largo del tiempo de reciclado para la supresión de la señal del solvente. La anchura espectral para todos los espectros se ajustó a 8000 Hz para el espectro de ^1H . Antes de aplicar la transformada de Fourier a los datos, se multiplicó la FID (decaimiento libre de la señal) por una función exponencial de anchura de línea de 0,3 Hz.

4.4.2 Procesado de los espectros

Los espectros se procesaron, previamente al análisis, mediante corrección manual de fase, ajuste de la línea base y referenciado del desplazamiento químico usando el software MestReNova 10 (Mestrelab Research S.L., Santiago de Compostela, España). En el caso de las muestras de tejido prostático, el desplazamiento químico del espectro se referenció a la señal doblete del metilo de la molécula de alanina a 1,475 ppm, y para las muestras de orina, el espectro se referenció a la señal del TSP a -0.016 ppm.

4.4.2.1 Asignación de los espectros

La asignación de las señales de los espectros se realizó de acuerdo a la información disponible en la bibliografía publicada, las bases de datos especializadas (HMDB, BMRB, etc.) y la base de datos espectral incluida en el programa de ajuste y cuantificación Chenomx NMR Suite 8.1 (Chenomx Inc, Alberta, Canadá)(170).

4.4.2.2 Procesado de los datos

Los experimentos que se emplearon con el objetivo de cuantificar los niveles metabólicos fueron, en todos los casos, los correspondientes a la secuencia ^1H -RMN ZGPR de la librería de secuencias de Bruker. Las señales que pertenecen a los metabolitos seleccionados se asignaron y cuantificaron utilizando el programa de ajuste y cuantificación Chenomx NMR Suite 8.1 (Chenomx Inc, Alberta, Canadá)(170) y rutinas propias semiautomáticas de ajuste al área del pico desarrolladas en MATLAB R2019b (MathWorks, Natick, Estados Unidos). En el caso de la integración de picos mediante MATLAB procedimos previamente a un troceado equidistante en segmentos de 0,005 ppm de anchura de todo el espectro. La concentración de los metabolitos se

expresa en unidades de área bajo el pico, normalizada a la suma del área espectral total, con el fin de hacer directamente comparables todas las muestras entre sí.

4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.5.1 Datos poblacionales

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS ver. 20 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows. Armonk, NY: IBM Corp.). Como parte del análisis estadístico, en primer lugar, se llevó a cabo un análisis descriptivo con las características basales de la muestra. Las variables registradas fueron citadas en el punto 4.1, al hablar de la muestra poblacional. Las variables categóricas registradas se expresaron en valores absolutos y en porcentajes, mientras que las variables continuas se expresaron en medias y desviaciones estándar, y en mediana e intervalos. En el apartado de datos poblacionales, además de análisis descriptivos, se realizaron análisis comparativos, por ejemplo, entre grupos con y sin tumor, o entre grupos con diferentes grados de Gleason. En función del objetivo del análisis, se realizaron diferentes test estadísticos: para comparar porcentajes se utilizó un test-Chi cuadrado, o un exacto de Fisher en el caso de que alguno de los grupos estuviera formado por cinco o menos casos. Para comparar medias, se comprobó la normalidad de la muestra mediante un test de Kolmogorov-Smirnov, y en caso de una $p > 0,05$ en este test, se aceptó una distribución normal y se utilizaron test paramétricos. En caso de poder utilizar test paramétricos, se usó un t-Student para comparar medias entre dos grupos, o un ANOVA para comparar medias entre tres o más grupos. Si había que utilizar test no paramétricos por una distribución no normal, se utilizó un U de Mann-Whitney para comparar medias entre dos grupos o un Kruskal-Wallis para comparar entre tres o más grupos. En casos concretos, como en el PSA y PSA_d, se utilizó una comparación de medianas, ya que la desviación estándar de las medias resultó tener valores muy extremos, y metodológicamente fue más correcto comparar medianas. Se utilizó el test de la mediana para la comparación.

Dentro de los datos poblacionales, también se registró la evolución de los pacientes con diagnóstico de carcinoma, comprobando el manejo terapéutico utilizado en los 105 casos con carcinoma. En los casos de varones sometidos a prostatectomía radical, se registró además la información histológica de la pieza de prostatectomía (Gleason, zona prostática afecta, estadio de la enfermedad tras la cirugía, invasión vascular o linfática, e invasión perineural). También se comprobaron los casos que tuvieron una recidiva bioquímica durante la evolución tras el tratamiento, y se calculó la media y desviación estándar de tiempo hasta su desarrollo. El seguimiento se llevó a cabo desde enero de 2015 hasta diciembre de 2018, un total de 36 meses.

4.5.2 Análisis de los datos metabolómicos Análisis quimiométrico

El análisis multivariable de los datos metabolómicos se realizó en el entorno de programación científica y matemática MATLAB R2019b (MathWorks, Natick, Estados Unidos), en el que se utilizaron las rutinas propias diseñadas e implementadas en el Laboratorio de Imagen Molecular y Metabolómica y el paquete de herramientas estadísticas PLS_Toolbox (Eigenvector Research, Inc., Washington, Estados Unidos). En la búsqueda de correlaciones globales se emplearon técnicas avanzadas de estadística multivariante como el Análisis de Componentes Principales (PCA), para detectar patrones y/o agrupaciones dentro de los grupos de las muestras, y el Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA) para forzar la separación entre grupos y construir modelos discriminantes.

Inicialmente se aplicó un PCA al conjunto de datos procesados para explorar la posibilidad de separación espontánea entre los grupos experimentales e identificar qué variables contribuían más a la separación. Un análisis PCA es un método no supervisado que permite proyectar en un espacio de pocas dimensiones la complejidad de un sistema experimental complejo multivariable. Cuando la separación entre grupos fue compleja e incompleta, se procedió a realizar un análisis discriminante supervisado como es el PLS-DA. Los diagramas de cargas de las variables latentes y el valor VIP score de cada una de ellas fueron los métodos empleados para determinar los metabolitos que tenían mayor contribución al modelo.

Una vez identificados los metabolitos más relevantes, se cuantificaron individualmente mediante deconvolución de la señal de RMN y sus niveles fueron analizados en relación a los diversos criterios clasificatorios. La determinación de la significación estadística entre las medias de las integrales de los picos entre dos grupos, se realizó mediante test U de Mann-Whitney.

El poder de discriminación y/o predicción del modelo construido se evaluó mediante la construcción de las correspondientes curvas ROC (mostrando la variación de la sensibilidad en función de la especificidad para cada sistema). Los resultados de forma gráfica se muestran como dos curvas ROC, la primera que corresponde al modelo con todas las muestras y la segunda es la de entrenamiento. La curva de entrenamiento debe aproximarse a la curva del modelo, pero siempre será inferior.

El área bajo la curva será un valor que oscile entre 0,5 y 1. Un valor de 0,5 sería aquel que se solapa con la línea diagonal entre los ejes X e Y, y traduciría una curva con nula capacidad predictiva. Por el contrario, un área bajo la curva de 1 representaría una curva perfecta. El área bajo la curva siempre va acompañada de un intervalo de confianza, normalmente del 95%.

En la representación gráfica de la curva, se muestran los resultados de la validación, donde se expresa la variación del valor de sensibilidad frente a la especificidad para un sistema, según varía el umbral de discriminación. El punto de corte óptimo de la curva será aquel punto más cercano al extremo superior izquierdo del gráfico, considerando que éste tiene el mismo impacto para un resultado falso positivo que uno falso negativo.

Con el objetivo de evaluar la calidad de los análisis realizados y la fiabilidad de los modelos obtenidos, procedimos a realizar una validación cruzada mediante un método Venetian Blinds con 10 divisiones de los datos y dejando fuera 1 muestra por división. Este procedimiento se repite hasta que todas las muestras han sido excluidas del modelo al menos una vez. Los parámetros estadísticos obtenidos son estadísticos como la raíz cuadrada del error cuadrático medio (RMSECV) y la capacidad predictiva (Q²).

Material y Métodos

Más información detallada sobre la estadística utilizada en el análisis de datos metabolómicos y la interpretación del análisis de las curvas puede encontrarse en el anexo III.

Además, en cada subanálisis se localizaron los metabolitos más influyentes en la discriminación entre grupos en base a su VIP score. Con estos metabolitos identificados, se llevaron a cabo análisis univariantes, utilizando los valores de área bajo los picos de los metabolitos como variables cuantitativas continuas. Se estudiaron los diferentes valores de áreas bajo el pico con las variables dependientes a estudio (presencia de tumor, diferentes grados de Gleason, etc). Para ello se utilizaron test paramétricos de comparación de medias, el t-Student cuando se compararon medias entre dos grupos y el ANOVA cuando se compararon medias entre más de dos grupos. Aquellos metabolitos con tendencia a la significación estadística ($p < 0,3$) en el análisis univariante, fueron incluidos para un posterior análisis multivariante. Para los modelos multivariantes se utilizaron una regresión logística binaria en caso de una variable dependiente con dos categorías o una regresión logística multinomial en caso de más de dos categorías. En todo el estudio se aceptaron diferencias estadísticamente significativas en el análisis multivariante aquellas con una $p < 0,05$.

Finalmente, realizamos un análisis de regresión logística, primero, con las variables utilizadas habitualmente en la clínica para el diagnóstico del cáncer de próstata y, en segundo lugar, añadiendo las variables metabolómicas con VIP score elevado. Realizamos una validación mediante selección paso a paso (criterios: entrada = 0,15, eliminación = 0,15). Además de esto, se llevó a cabo una comparación de las curvas ROC derivadas de cada modelo multivariante mediante el comando *roccomp* del programa Stata.

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISIS POBLACIONAL

5.1.1 Características clínicas y demográficas de la muestra

En total se incluyeron en el estudio 201 pacientes. Las características basales se muestran en la tabla 8. La media de edad fue de 67,20 +/- 7,90 años, y la mediana de 67 años (62-74). La prevalencia de algunas enfermedades crónicas fue alta, como la hipertensión arterial o la dislipemia, con una prevalencia del 53,7% y del 47,3% respectivamente. Además, el 19,4% de los varones tenían el diagnóstico de HBP en el momento de realizarse la biopsia.

Tabla 8. Características clínicas y demográficas de los varones sometidos a biopsia prostática.

CARACTERÍSTICAS BASALES	n (%)
Edad (años)	
<= 67,2	105 (52,3%)
> 67,2	96 (47,7%)
IMC	
<25, normopeso	42 (20,9%)
25-29,9, sobrepeso	89 (44,2%)
>=30, obesidad	70 (34,8%)
HTA	108 (53,7%)
DM	37 (18,4%)
DL	95 (47,3%)
Neumopatía	20 (10%)
Neuropatía	5 (2,5%)
Cardiopatía	18 (9%)
Vasculopatía	11 (5,5%)
Endocrinopatía	21 (10,4%)
Patología digestiva	2 (1%)
HBP	39 (19,4%)
Depresión	13 (6,5%)

IMC: Índice de masa corporal, HTA: Hipertensión arterial, DM: Diabetes Mellitus, DL: Dislipemia, HBP: Hiperplasia benigna de próstata

5.1.2. Variables clínicas relacionadas con la patología prostática

Tabla 9. Variables clínicas relacionadas con la patología prostática.

VARIABLES CLÍNICAS	n (%)
PSA (ng/mL)	
<4	2 (1%)
4-10	107 (53,2%)
>10	92 (45,8%)
dPSA	
<0,15	54 (26,9%)
=>0,15	147 (73,1%)
Cociente de PSA	
<0,2	166 (82,6%)
=>0,2	35 (17,4%)
Volumen prostático (cc), media 47,1	
<= 47,1	123 (61,2%)
> 47,1	78 (38,8%)
Gleason en biopsia	
6 (3+3)	16 (13,3%)
7 (3+4)	33 (31,4%)
7 (4+3)	24 (22,8%)
8 (4+4)	10 (9,5%)
9 (4+5)	21 (20%)
9 (5+4)	3 (2,8%)
Grado de la ISUP en biopsia	
1	16 (13,3%)
2	33 (31,4%)
3	24 (22,8%)
4	10 (9,5%)
5	24 (22,8%)
Infiltración tumoral de vesículas seminales	4 (2%)
Tacto rectal sospechoso	57 (28,4%)
Imagen sospechosa en ecografía	88 (43,8%)
Porcentaje de cilindros afectados en la biopsia	
=<20%	33 (31,4%)
20% - <=60%	52 (49,5%)
>60%	20 (19,1%)
Zona afectada en la biopsia	
Periférica	16 (15,5%)
Central	12 (11,6%)
Ambas	75 (72,8%)

ISUP: International Society of Urological Pathology, PSA: Antígeno prostático específico, dPSA: densidad de antígeno prostático específico

Las variables relacionadas con la patología prostática quedan plasmadas en la tabla 9. La media de PSA en ng/mL fue de 23,2 +/- 105,5 y la mediana 9 (rango 3-1446); la media de dPSA fue 0,6 +/- 2,1 y la mediana 0,23 (0,04-24,8); mientras que la media de cociente de PSA fue 0,13 +/- 0,07 y la mediana 0,13 (0,01-0,39). La importante diferencia entre media y mediana en los valores de PSA y fracciones de PSA, traduce una amplia diversidad de valores, con presencia valores extremos (por ejemplo, pacientes metastásicos al diagnóstico con cifras de PSA muy altas). Por otro lado, la media del volumen prostático en cc fue de 47,1 +/- 24,7, y la mediana de 41,7 (11-159). La descripción detallada de las variables clínicas relacionadas con la patología prostática se muestra en la tabla 9.

De los 201 casos, se diagnosticó cáncer de próstata en 107 (53,2%) casos, y el resultado fue negativo para malignidad en los otros 94 (46,8%). De los 107 casos con tumor, 2 (1,9%) hombres tenían un PSA por debajo de 4 ng/mL, 49 (45,8%) tenían un PSA entre 4 y 10 ng/mL, y 56 (52,3%) un PSA por encima de 10 ng/mL. El Gleason de los casos con tumor se muestra en la tabla 9. Según histología de biopsia estándar, se recogieron un total de 16 Gleason 6 (3+3), 33 Gleason 7 (3+4), 24 Gleason 7 (4+3), 10 Gleason 8 (4+4), 21 Gleason 9 (4+5) y 3 Gleason 9 (5+4).

5.1.3. Cilindros medidos por HR-MAS

De todos los cilindros medidos por HR-MAS, y posteriormente sometidos al estudio histológico habitual, 56 (27,8%) resultaron positivos para carcinoma. La división de la muestra en cuatro grupos, según concordancia entre la positividad/negatividad para carcinoma del cilindro HR-MAS y la positividad/negatividad para carcinoma de la biopsia estándar, se muestra en la tabla 10. Puede observarse que la concordancia entre positividad/negatividad para carcinoma según histología ocurrió en un 73,7% de los casos, mientras que en un 26,3% existió discordancia.

Resultados

Tabla 10. Concordancia entre el resultado histológico (positividad/negatividad para carcinoma) del cilindro HR-MAS y el de la biopsia estándar. Los valores se muestran en n (%).

Biopsia - Cilindro-	Biopsia - Cilindro+	Biopsia+ Cilindro-	Biopsia +Cilindro+
94 (46,8%)	2 (1%)	51 (25,4%)	54 (26,9%)

En cuanto al Gleason de los cilindros HR-MAS, en 26 (46,4%) de los 56 positivos para carcinoma pudo concluirse de forma correcta la graduación del tejido mediante su correspondiente estudio histopatológico. Es muy probable que, debido al proceso de congelación y posterior introducción del tejido en el rotor de HR-MAS, las muestras puedan estar artefactadas por su manipulación, con estructuras tumorales retraídas y colapsadas, con la posibilidad de sobreestimar el Gleason definitivo

El resultado de estos 26 puede observarse en la tabla 11. Sólo hubo un caso de Gleason 10 (5+5), correspondiente a un paciente que en el estudio histológico según biopsia estándar fue catalogado como un Gleason 9 (5+4).

Tabla 11. Grados de Gleason en los cilindros HR-MAS (26 de los 56 positivos para carcinoma).

HISTOLOGÍA DEL CILINDRO HR-MAS	n (%)
Gleason en biopsia	
6 (3+3)	4 (15,4%)
7 (3+4)	5 (19,2%)
7 (4+3)	2 (7,7%)
8 (4+4)	3 (11,5%)
9 (4+5)	9 (34,6%)
9 (5+4)	2 (7,7%)
10 (5+5)	1 (3,8%)

5.1.4 Análisis comparativo entre grupos según características clínicas del tumor

En primer lugar, se realizó la comparativa de las variables clínicas entre pacientes con tumor (107 casos) y sin tumor (94 casos) (ver tabla 10, concordancia histológica). En la tabla 12 puede observarse que los pacientes con carcinoma eran

más mayores, y con una mediana de PSAd más elevada que los casos sanos. Además, el porcentaje de tacto rectal sospechoso y de ecografía sospechosa para carcinoma también fueron mayores en el grupo con tumor

Tabla 12. Análisis comparativo entre variables clínicas en pacientes con y sin tumor.

VARIABLE	TUMOR SÍ	TUMOR NO	p-valor
EDAD en años(media +/- DE)	68,68 +/- 8,46	65,36 +/- 6,69	0,004*
IMC	29,15 +/- 4,19	28,78 +/- 3,42	0,8*
PSA en ng/mL (mediana, intervalo)	10 (3-1446)	8 (4-67)	0,06**
Densidad de PSA (mediana, intervalo)	0,31 (0,06-24,8)	0,16 (0,04-1,83)	<0,001**
Cociente de PSA (media +/- DE)	0,15 +/- 0,07	0,11 +/- 0,06	<0,001*
Vol. prostático en cc (media +/- DE)	39,04 +/- 19,27	56,06 +/- 27,03	< 0,001*
Tacto rectal sospechoso (n (%))	43 (41%)	14 (15,6%)	< 0,001***
Sospecha en ecografía	61 (57%)	27 (29%)	< 0,001***

Vol.: Volumen

* t-Student **Prueba de la mediana ***Chi-cuadrado

Posteriormente se dividió a la muestra en tres grupos, separando entre sí a sanos, Gleason 6-7, y Gleason 8-9, para realizar así otro análisis comparativo. Los resultados pueden observarse en la tabla 13.

Tabla 13. Análisis comparativo entre pacientes sanos, casos con Gleason 6-7 y los casos con Gleason 8-9.

VARIABLE	SANOS	GLEASON 6-7	GLEASON 8-9	p-valor
EDAD en años(media +/- DE)	65,38 +/- 6,69	67,02 +/- 8,22	71,88 +/- 8,28	0,001*
IMC	28,78 +/- 3,42	29,07 +/- 4,15	29,33 +/- 4,40	0,970*
PSA en ng/mL (mediana, intervalo)	8 (4-67)	9 (13-116)	17,50 (4-1446)	0,004**
Densidad de PSA (mediana, intervalo)	0,16 (0,04-1,83)	0,25 (0,06-24,8)	0,48 (0,10-10,80)	< 0,001**
Cociente de PSA (media +/- DE)	0,15 +/- 0,07	0,12 +/- 0,06	0,10 +/- 0,07	0,001*
Vol. prostático en cc (media +/- DE)	56,06 +/- 27,03	40,39 +/- 18,74	36,16 +/- 20,36	< 0,001*
Tacto rectal sospechoso (n (%))	14 (15,2%)	17 (24,3%)	26 (78,8%)	<0,001***
Sospecha en ecografía	27 (28,4%)	30 (42,3%)	31 (91,2%)	<0,001***

DE: Desviación estándar, IMC: Índice de masa corporal, PSA: Antígeno prostático específico, Vol.: Volumen

* ANOVA **Prueba de la mediana ***Chi-cuadrado

De los 107 casos con tumor, 73 pacientes se englobaron dentro del grupo de Gleason 6-7 (68,2%) y 34 dentro de los 8-9 (31,8%). Se comprobó que los pacientes con mayor Gleason tenían más edad, más niveles de PSA y PSA_d, menor volumen prostático, y mayor porcentaje de casos con tacto rectal sospechoso y con ecografía sospechosa para carcinoma.

5.1.5 Seguimiento de los pacientes diagnosticados de carcinoma de próstata

El manejo terapéutico seguido por cada uno de los 107 casos de carcinoma en la biopsia queda reflejado en la tabla 14. Destaca que el 38,31% optaron por prostatectomía radical y el 27,10% que fueron tratados con radioterapia, siendo estos dos grupos los más numerosos. Además, un 14,01% tuvo una pérdida de seguimiento, bien porque decidieron tratarse en otro centro o por falta de información en la historia clínica.

Tabla 14. Manejo terapéutico tras biopsia de los 107 casos de carcinoma.

MANEJO TERAPÉUTICO	n (%)
Cirugía	41 (38,31%)
Radioterapia	29 (27,10%)
Bloqueo hormonal	19 (17,75%)
Braquiterapia	1 (0,93%)
Observación	2 (1,86%)
Pérdida de seguimiento	15 (14,01%)

De los pacientes tratados quirúrgicamente, 3 de los 41 se intervinieron en otro centro. No se dispone de la información de la pieza de prostatectomía de estos 3 casos, pero sí de toda la información del cilindro HR-MAS y de la biopsia estándar. El grado mayor de Gleason en la pieza de prostatectomía para los otros 38 pacientes, junto con otra información extraída de la pieza de prostatectomía, se muestra en la tabla 15. El grupo con más casos fue el de Gleason 7(3+4), con 21 pacientes (55,26%).

Tabla 15. Datos de los casos intervenidos de prostatectomía radical (38 de los 41 casos).

DATOS DE PACIENTES OPERADOS	n (%)
Gleason en pieza de prostatectomía	
6 (3+3)	1 (2,63%)
7 (3+4)	21 (55,26%)
7 (4+3)	7 (18,42%)
8 (4+4)	1 (2,63%)
9 (4+5)	7 (18,42%)
9 (5+4)	1 (2,63%)
Zona afecta en pieza de prostatectomía	
Periférica	8 (21,10%)
Central	0 (0%)
Ambas	30 (78,90%)
Estadio de la enfermedad tras la cirugía	
T2a	3 (7,9%)
T2b	1 (2,6%)
T2c	16 (42,1%)
T3a	14 (36,8%)
T3b	4 (10,5%)
Invasión vascular/linfática	2 (5,26%)
Invasión perineural	25 (65,78%)

5.1.6 Casos con recidiva bioquímica

El concepto de recidiva bioquímica se desarrolló en la introducción, en el punto 1.4.6. De los 91 casos que recibieron tratamiento, 16 tuvieron una recidiva bioquímica, con una media hasta la recidiva de 25,68 +/- 15,39 meses, y una mediana de 25 (13-36) meses.

5.2 CARACTERIZACIÓN METABÓLICA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA MEDIANTE METABOLÓMICA POR RMN.

En este apartado se comprobó si la espectroscopia de RMN permitía realizar un análisis metabólico del tejido prostático intacto obtenido mediante biopsia transrectal con tru-cut. La capacidad de esta técnica para estudiar la composición química de las muestras en sus estados nativos ofrece varias mejoras sobre los tediosos procedimientos de extracción química que destruyen la estructura del tejido. Además, el perfil metabólico diferencial obtenido entre los cilindros tumorales y los que no lo son, serviría de base para comprobar dos objetivos más. En primer lugar, determinar si la existencia de un perfil tumoral en un cilindro puede aportar información sobre la presencia o no de tumor en el resto de la próstata; y, en segundo lugar, si este perfil es observable también en muestras orina y, por tanto, es capaz de ofrecer un diagnóstico del cáncer de próstata menos invasivo para el paciente.

5.2.1. Determinación de la huella metabólica por HR-MAS del cáncer de próstata en un cilindro obtenido mediante biopsia transrectal.

Uno de los objetivos del trabajo fue determinar la huella metabólica de tejido prostático sano y tumoral obtenido mediante biopsia transrectal. Aunque parece lógico pensar que el perfil metabólico debe ser diferente entre casos con y sin tumor, el establecimiento de diferencias en la huella metabólica entre ambos grupos debía ser un paso inicial en el análisis de espectros.

5.2.1.1 Análisis y asignación de espectros

El estudio incluyó el análisis por RMN de 201 muestras de cilindros de próstata obtenidos mediante tru-cut, de los cuales el análisis anatomopatológico reveló *a posteriori* que 107 eran tumorales y 94 no tumorales. El volumen promedio de la biopsia medida fue de 4,85 mg, con una muestra mínima de 0,9 mg y una máxima de 12,40 mg. A pesar de la escasa cantidad de muestra disponible, los espectros presentaron una buena relación señal/ruido y una resolución de la multiplicidad, en la mayoría de las señales, con buena calidad. Sólo en un caso, el espectro obtenido estaba artefactado y se decidió eliminar la muestra del estudio (paciente 185). Se integraron un total de 80 regiones espectrales que se asignaron a 71 metabolitos y 9 no identificados. La tabla 1 del anexo IV, muestra la media y desviación típica de los mismos para el tejido sano y el tejido tumoral. En la figura 17 se muestran los espectros promedio ^1H -HRMAS PRESAT de los cilindros control y tumorales. Un metabolito puede presentar varias señales de RMN en diferentes partes del espectro, una por cada grupo magnéticamente activo. Sin embargo, cada señal o pico que se observa en el espectro corresponde inequívocamente a un tipo de molécula o metabolito. El área contenida bajo la señal es directamente proporcional a la concentración de dicho metabolito en la muestra. Se obtuvieron espectros de buena calidad tanto para las muestras control, como para las tumorales, y hay que resaltar la gran cantidad de resonancias identificadas a pesar de la reducida cantidad de tejido.

Resultados

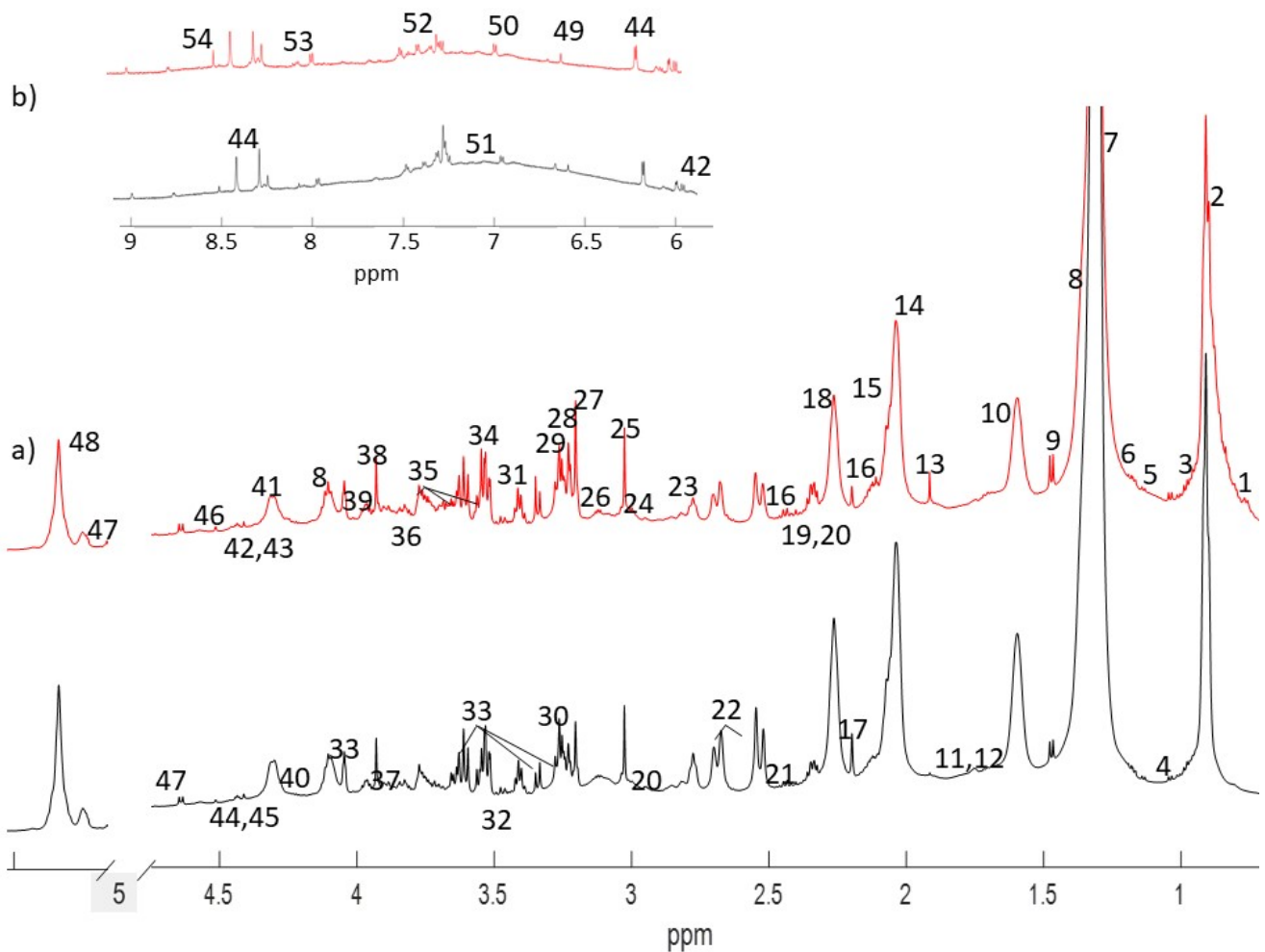


Figura 17. Espectros promedio de ^1H -HR-MAS PRESAT adquiridos a 600 MHz de muestras de cilindros no tumorales (negro) y tumorales (rojo) de próstata, medida a 310K con asignación de desplazamiento químico de varios metabolitos. La región espectral de agua residual (4.6 – 5.2 ppm) está excluida. a) Región alifática del espectro ($\delta=5.5\text{-}0.5$ ppm) y b) región aromática ($\delta=9.00\text{-}6.50$ ppm). Asignación de los picos: 1, colesterol (C18-CH₃); 2, lípidos (-CH₃) (principalmente LDL/VLDL); 3, leucina; 4, isoleucina; 5, valina; 6, 3-hidroxibutirato; 7, lípidos (CH₂)_n (principalmente LDL/VLDL); 8, lactato; 9, alanina; 10, lípidos (-CH₂)_n; 11, lisina; 12, arginina; 13, acetato; 14, lípidos (CH₂-C=C); 15, NAC (grupos acetilo de las glicoproteínas); 16, glutamina; 17, acetoina; 18, lípidos (CH₂-CO); 19, glutamato; 20, glutatión; 21, piruvato; 22, citrato; 23, lípidos (CH=CH-CH₂-CH=CH-); 24, creatina; 25, creatinina; 26, etanolamina; 27, colina; 28, O-fosfocolina; 29, 3-glicero-fosfocolina; 30, N-óxido de trimetilamina; 31, taurina; 32, escilo-inositol; 33, mio-inositol; 34, glicina; 35, glicerol; 36, serine; 37, aspartato; 38, creatina fosfato; 39 O-fosfoetanolamina; 40, treonina; 41, desconocido1; 42, uridina; 43, treonina; 44, inosina; 45, 1,3-dihidroxiacetona; 46, ascorbato; 47, glucosa; 48, lípidos (-CH=CH-); 49, fumarato; 50, tirosina; 51, histidina; 52, fenilalanina; 53, triptófano; 54, formato.

Los espectros están mayoritariamente dominados por las señales correspondientes a metabolitos de bajo peso molecular. Se detectó una amplia gama de metabolitos típicamente presentes en tejido prostático, como aminoácidos alifáticos (p.ej. lisina, arginina, glutamina, leucina, valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina), glucosa, cuerpos cetónicos, creatina, creatinina, y ácidos grasos de cadena corta (lactato, citrato, formato). Igualmente, se pueden observar otras señales correspondientes a metabolitos de mayor peso molecular como protones de los grupos acetilo de la cadena lipídica de glicoproteínas, ácidos grasos, lipoproteínas (LDL, VLDL, colesterol) y glicoproteínas.

5.2.2. Análisis no supervisado: PCA, huella metabólica por HR-MAS del cáncer de próstata en un cilindro obtenido mediante biopsia transrectal con tru-cut.

En este primer análisis metabólico se quería establecer la posible diferencia de huella metabólica entre enfermos y sanos. Se incluyó como enfermos a aquellos casos con el cilindro HR-MAS positivo para carcinoma en el estudio histológico (en la figura 10, los englobados dentro de las columnas biopsia -cilindro +, biopsia + cilindro +). El resto de casos, con cilindro HR-MAS negativo para carcinoma en el estudio histológico, se aceptaron como sanos. Los pacientes quedaron etiquetados en función de la histología del cilindro HR-MAS, y no del resto de la próstata.

De todos los cilindros prostáticos sometidos a estudio metabólico, 56 (27,86% del total) fueron positivos para diagnóstico de carcinoma, y 146 (72,14%) fueron negativos para carcinoma, según estudio histológico. Como se observa en la tabla 10, existió discordancia en algunos casos entre el estudio histológico del cilindro medido por HR-MAS y el estudio histológico de la biopsia estándar dentro del mismo sujeto. En dos varones con biopsia estándar negativa para carcinoma se objetivó tumor en la histología del cilindro HR-MAS, por lo que se clasificaron dentro del grupo de enfermos para este análisis.

Resultados

Primero se utilizó un método de análisis no supervisado, que permite evaluar la variabilidad de los datos sin tener en cuenta la clasificación de los pacientes dentro de ningún grupo. Para ello se empleó un análisis de componentes principales (PCA). El objetivo de este tratamiento de los datos es describir toda la información metabólica de las muestras, mediante nuevas variables (componentes principales) no correlacionadas. Mediante el PCA se busca, por un lado, detectar y estudiar la existencia de valores atípicos o *outliers* (cualquier muestra que presente un comportamiento anómalo en relación a su grupo). Una vez identificadas estas muestras, se trata de justificar su inclusión/exclusión en el estudio. En segundo lugar, el PCA permite determinar si los datos de una muestra se separan/agrupan espontáneamente, por ejemplo, en dos grupos (enfermos/sanos). Esta separación espontánea en modelos animales, donde todas las variables excepto la de estudio permanecen constantes, es muy común. Sin embargo, en poblaciones humanas es muy infrecuente la separación espontánea, debido a la variabilidad intraespecífica de los individuos (edad, sexo, patologías asociadas, medicación, dieta...).

5.2.2.1. Identificación de *outliers*

En primer lugar, mediante el análisis de los diagramas de cargas y del gráfico T^2 de *Hotelling*, se identificaron varias muestras anómalas con un contenido metabólico que se desviaba de una forma importante del comportamiento general del resto de conjunto de datos. Estas muestras corresponden con los casos 41, 52 y 86. En la figura 18 se observa cómo quedan muy alejados del intervalo de confianza del 99% en el gráfico T^2 de *Hotelling*, y mostraban por tanto un comportamiento estadístico muy diferente al del resto de muestras. El porcentaje recogido en cada uno de los ejes del PCA hace referencia a la porción de variabilidad explicada sobre el total.

Con el objetivo de buscar una razón a la diferencia de estas tres muestras respecto al conjunto, se realizó una revisión de los datos incluidos en la historia clínica de estos pacientes. El varón correspondiente con la muestra 41 (sano), fue biopsiado en 2015, con diagnóstico de ausencia de lesiones malignas en todos los cilindros obtenidos. Tenía un PSA en el momento de la biopsia de 6,7 ng/mL y un volumen

prostático de 120 cc. En 2016 fue intervenido quirúrgicamente de cirugía para la HBP en otro centro, perdiéndose el seguimiento.

El paciente de la muestra 52 (enfermo según biopsia estándar, sano según cilindro HR-MAS) fue operado en 2015 de prostatectomía radical laparoscópica. En el momento de la biopsia tenía unos niveles de PSA de 14,42 ng/mL y un volumen prostático de 30 cc. El resultado histológico de la biopsia fue un carcinoma Gleason 7 (3+4), coincidiendo con la histología de la prostatectomía radical (Gleason 7 (3+4)), afectando tanto al área periférica como central de la próstata. No obstante, en el cilindro utilizado para el estudio metabolómico no se encontró tumor en el resultado histológico.

Por su parte, el paciente 86 (enfermo según biopsia estándar, sano según cilindro HR-MAS), fue un varón biopsiado en 2016, con histología de carcinoma Gleason 7 (3+4) en el 60% de los cilindros biopsiados. El PSA en el momento de la biopsia fue de 10,6 ng/mL, y el volumen prostático de 23 cc. No obstante, en este caso no se halló tumor en el cilindro HR-MAS. Este caso recibió tratamiento con bloqueo hormonal desde el inicio, manteniendo niveles bajos y estables de PSA durante el seguimiento.

En ninguno de los tres casos se encontró alguna variable clínica que pudiera justificar su perfil como valores alejados en el análisis metabolómico. Por lo tanto, estas muestras se excluyeron para los análisis posteriores por su cualidad de *outliers*. La característica como valores extremos de estas tres muestras queda representada en la figura 18.

Desde el punto de vista metabolómico, estos tres casos sí presentaban diferencias evidentes en la concentración de ciertos metabolitos con respecto al nivel promedio del resto de muestras de sanos. Tal y como queda reflejado en la figura 19, el paciente #41 presentaba tres veces más concentración de citrato (región metabólica 15), el doble de N-acetil glicoproteínas (región 67) y una reducción a la mitad del nivel de lípidos (región 65) respecto al promedio del resto de pacientes sanos. Igualmente presentaba una elevación del nivel de la región metabólica 70 que corresponde a un metabolito que no ha sido identificado. El paciente #52 tenía un perfil muy similar al

Resultados

promedio de los pacientes sanos excepto en una elevación de cinco veces la concentración de N-acetil glicoproteínas (región 67), incremento del contenido lipídico (regiones 65, 66 y 68) y dos regiones que no pudieron ser asignadas a metabolito alguno (regiones 70 y 72). Por último, el paciente #86 presentaba cuatro veces más concentración de citrato que el promedio de sanos, y elevación más modesta de los niveles de otros metabolitos como cistationina, glucosa, lisina, taurina y mio-inositol.

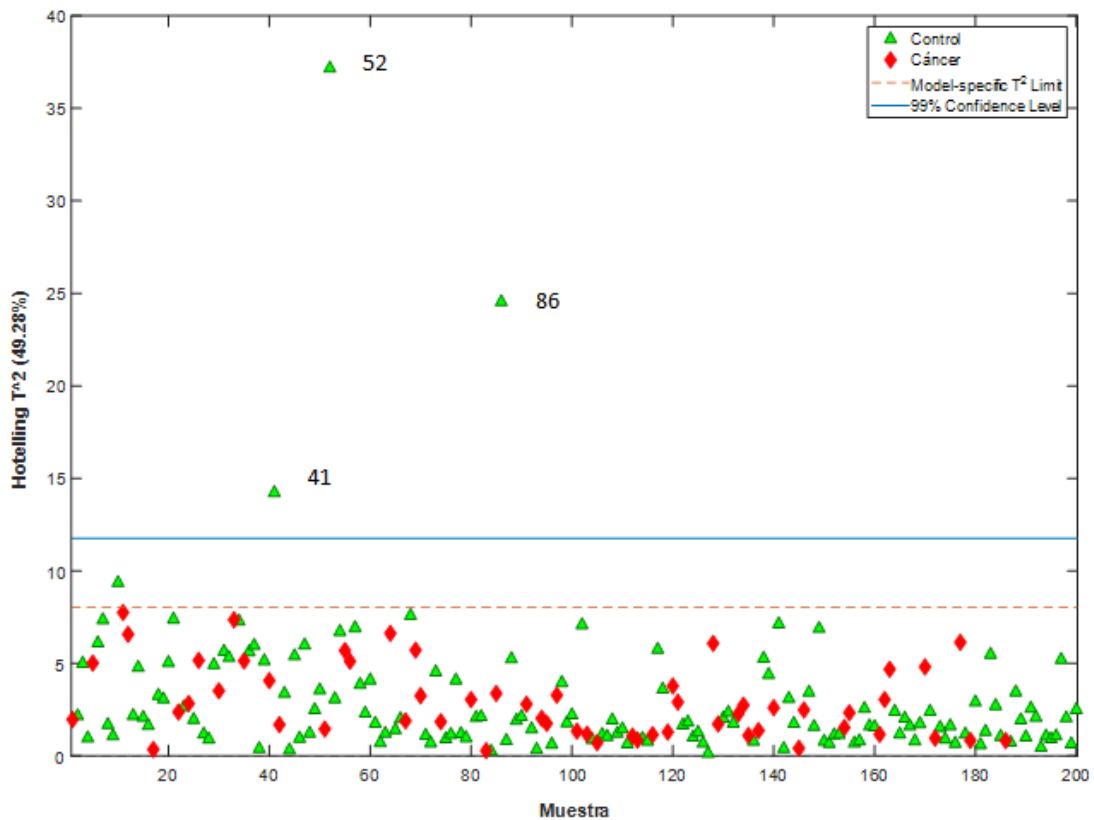


Figura 18. Gráfico T2 de Hotelling obtenido del análisis PCA de los espectros de 1H-HR-MAS PRESAT de las muestras de tejido de próstata. Los triángulos verdes representan los casos sanos y los rombos rojos a los enfermos, según el estudio histológico del cilindro HR-MAS. Los límites marcados en azul y naranja indican los intervalos de confianza del 99% y 95%, respectivamente. Las muestras situadas fuera del límite del 99% se consideran anómalas extremas, aberrantes u *outliers* (41, 52 y 86). Estas muestras posteriormente fueron excluidas para los siguientes análisis.

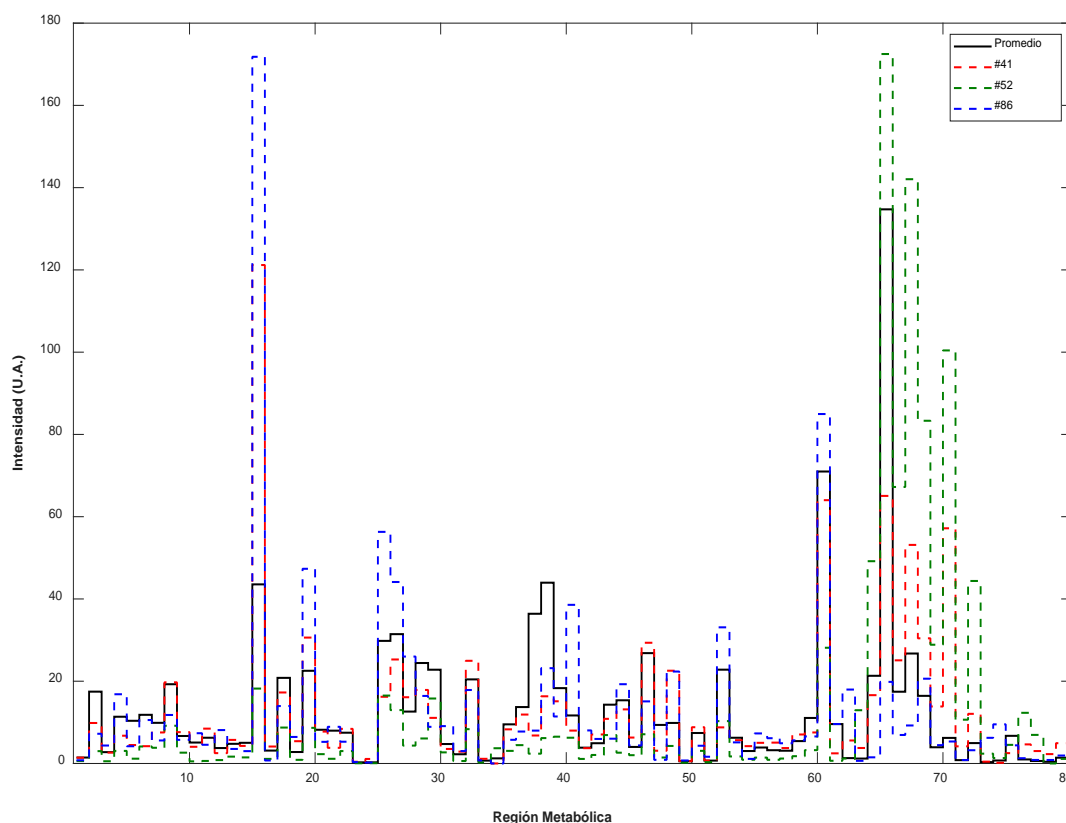


Figura 19. Gráfico de barras con la comparación de los niveles metabólicos, de las 80 regiones metabólicas integradas en los espectros de RMN, entre los tres *outliers* (rojo, #41; verde, #52 y azul, #86) y el nivel promedio de los espectros para las muestras control (negro).

Además de los tres *outliers*, el paciente 185 (sano) también fue excluido debido a que la muestra tisular del cilindro HR-MAS se degradó excesivamente. Esto sucedió bien durante la manipulación para preparar el rotor o bien durante el transporte de la muestra al laboratorio de metabolómica. El resultado fue un espectro extremadamente artefactado y de muy baja calidad. Debido a esto, fue difícil de procesar y muy complicado de cuantificar de manera comparable con el resto de muestras.

5.2.2.2. Identificación de agrupaciones

Tras excluir justificadamente para el análisis enfermo-sano a los *outliers* y a la muestra #185, el conjunto de muestras para el análisis quedó con 56 enfermos y 141 sanos. Se prosiguió con un análisis PCA no supervisado con el objetivo de evaluar si existía un agrupamiento o tendencia en base a la pertenencia de las muestras al grupo enfermo o sano. Como se muestra en el diagrama de puntos (figura 20), la elección de las dos primeras componentes principales explica un 44% de la varianza de los datos, pero los dos grupos se presentan muy solapados, y no revela un agrupamiento significativo con clara diferenciación.

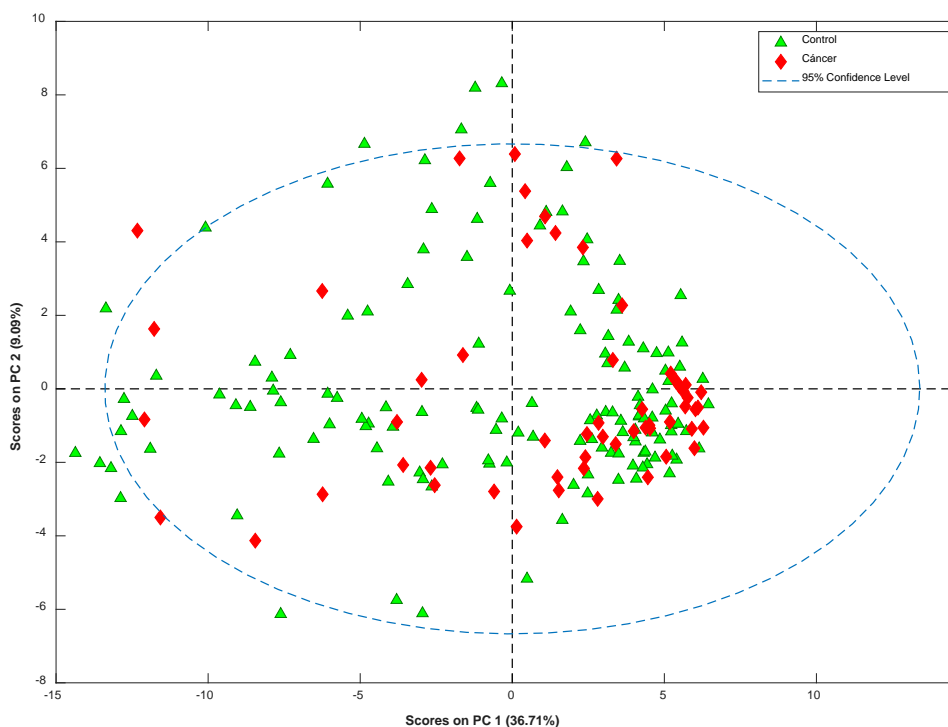


Figura 20. Diagrama de puntos del PCA obtenido del análisis PCA de los espectros de 1H-HR-MAS PRESAT de las muestras de tejido de próstata del grupo enfermo con carcinoma (rombo rojo) y tejido sano (triángulo verde) según histología del cilindro HR-MAS. Puede observarse que no existe una agrupación espontánea de las dos muestras.

5.2.3. Análisis supervisado: PLS-DA, huella metabólica por HR-MAS del cáncer de próstata en un cilindro obtenido mediante biopsia transrectal

El PCA proporciona una descripción general de la estructura de datos, pero es posible que no revele una agrupación significativa entre grupos si la clase no se encuentra entre las principales fuentes de variación en el conjunto de datos.

Dado que el análisis PCA no reveló una agrupación significativa de las muestras en grupos, posiblemente por factores como la polimedicación de los pacientes o la variabilidad genética de los mismos, se llevó a cabo un análisis supervisado PLS-DA. En él, se construye un modelo a partir del conocimiento previo de las muestras, o sea, a qué grupo pertenecen. El análisis PLS-DA se emplea para explicar y predecir la pertenencia de las muestras a un grupo utilizando variables explicativas cuantitativas. Se excluyeron del mismo las tres muestras comprobadas como extremas en el PCA y también el paciente 185, por su dificultad para ser cuantificado de forma comparable con el resto de muestras.

El número óptimo de componentes, es decir, el número de variables latentes (LV) necesarias para construir el modelo PLS-DA se seleccionó en base al resultado de un algoritmo matemático, que mediante una validación cruzada tipo Leave-one-out, calcula el error de clasificación con un número creciente de variables latentes. La figura 21 muestra un gráfico típico de resultados en el que se observa como el modelo óptimo queda creado con 2 variables latentes.

Resultados

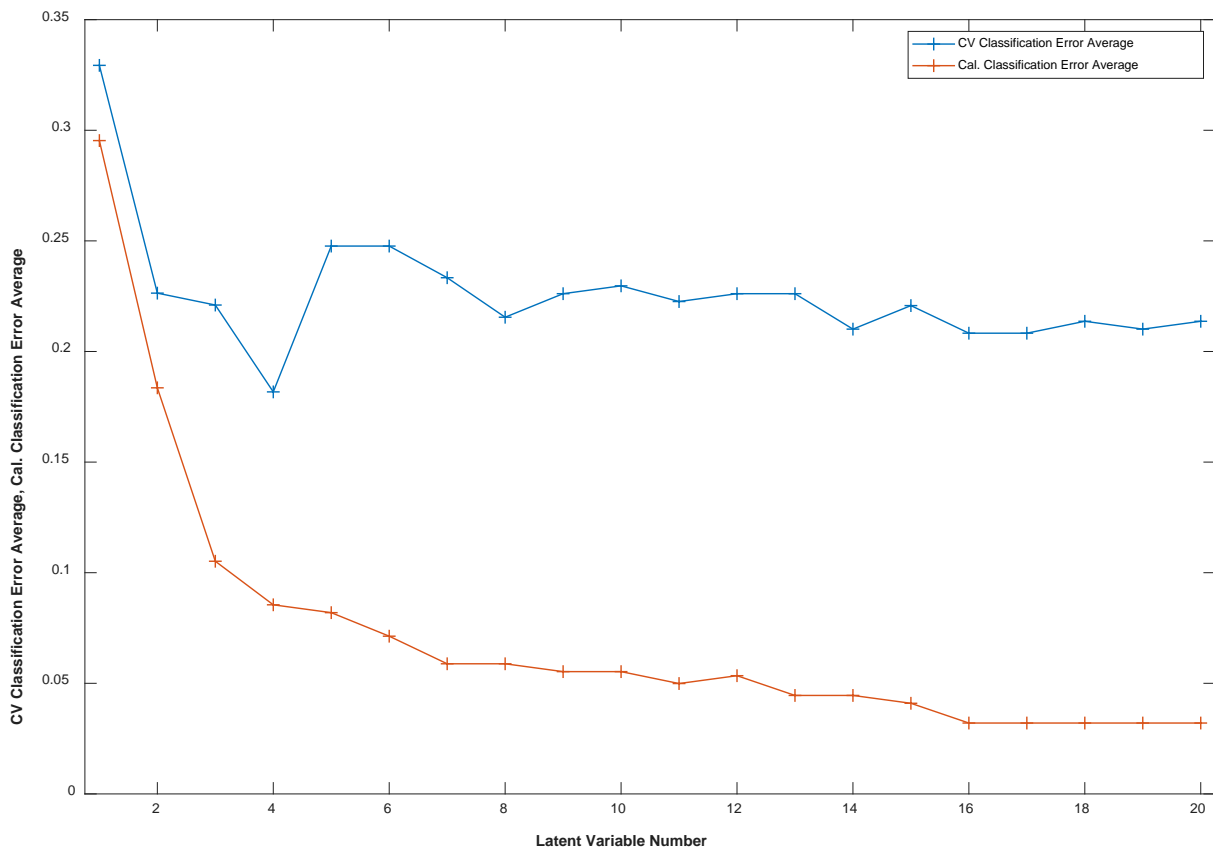


Figura 21. Estudio de errores de clasificación para la selección del número óptimo de variables latentes del modelo PLS-DA de tejido de próstata tumorales respecto a sano. La línea azul se corresponde a 1-[media (precisión)] de la validación cruzada (CV) y la línea roja a 1-[media (precisión)] de la calibración (Cal).

En este caso, se comprobó que las muestras presentaban una buena separación entre los dos grupos con una mínima zona de solapamiento (figura 22). Los casos con cáncer ocupaban en su mayoría el cuadrante superior derecho, aunque algunos se distribuían en los cuadrantes contiguos. Por su parte, los sanos tendían a agruparse en la zona central del diagrama, y en los dos cuadrantes del lado izquierdo.

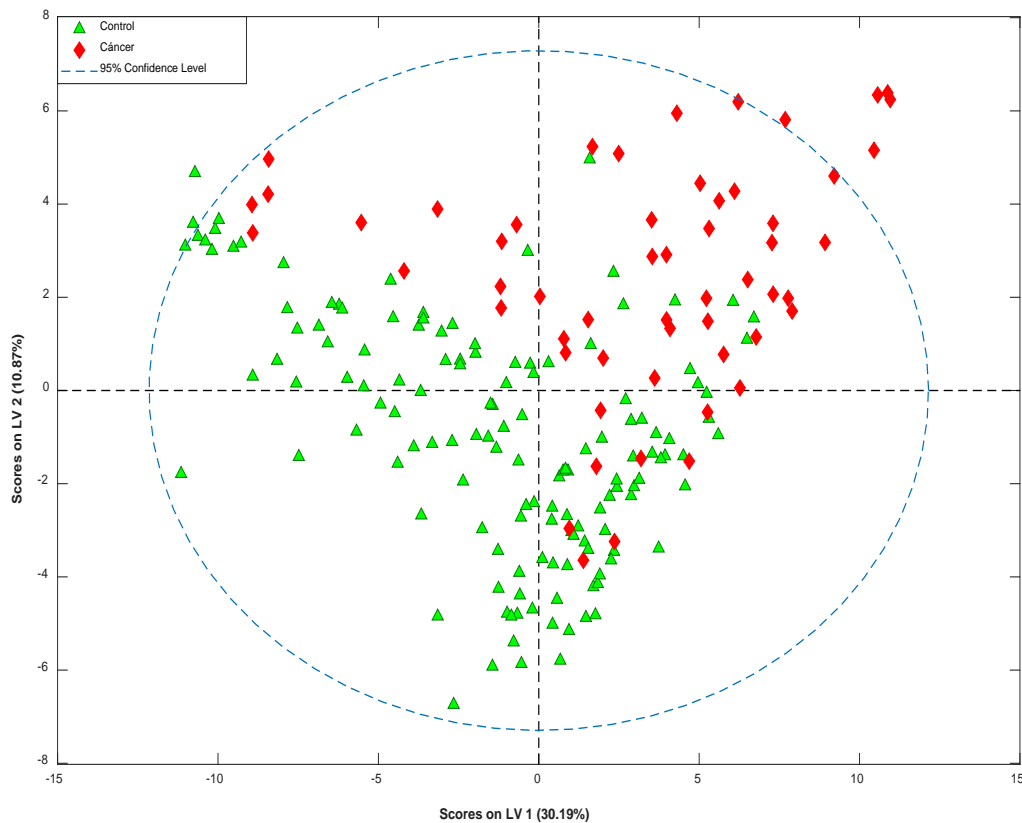


Figura 22. Diagrama de puntos obtenido del análisis PLS-DA de los espectros de 1H-HR-MAS PRESAT de las muestras de tejido de próstata del grupo enfermo con carcinoma (rombo rojo) y tejido sano (triángulo verde) según histología del cilindro HR-MAS.

5.2.4. Validación cruzada, huella metabólica por HR-MAS del cáncer de próstata en un cilindro obtenido mediante biopsia transrectal.

Con el fin de validar y evaluar los resultados obtenidos para el modelo estadístico multivariante PLS-DA que discrimina entre enfermos y sanos según histología del cilindro HR-MAS, se realizó una validación cruzada de los datos. El resultado de la validación se representa de forma gráfica con una curva ROC, que se muestra en la figura 23.

Resultados

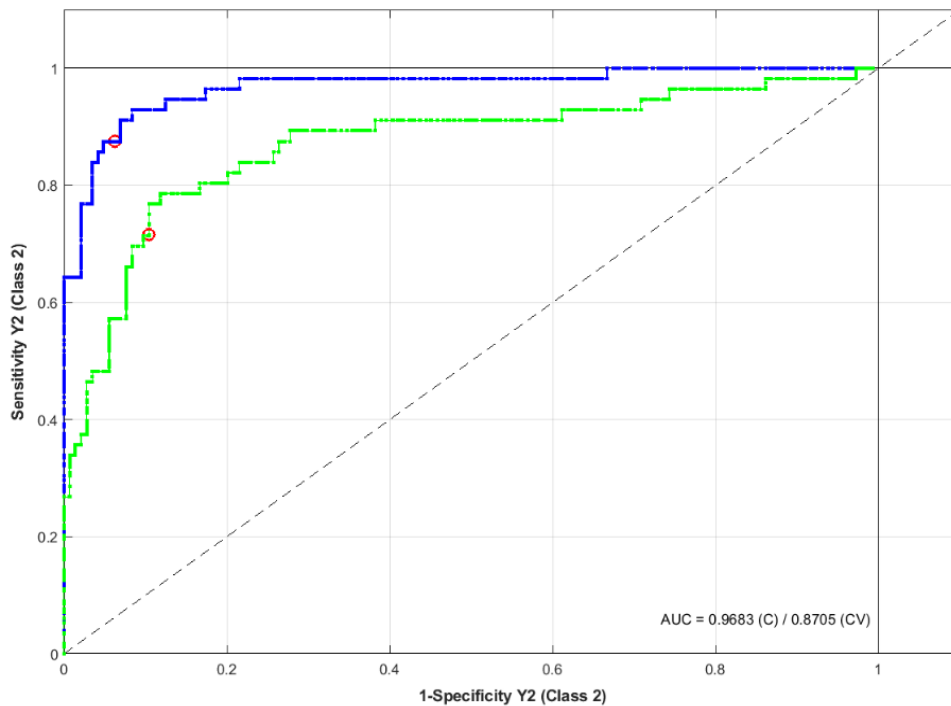


Figura 23. Curvas ROC obtenidas del modelo PLS-DA que discrimina entre enfermos y sanos según histología del cilindro HR-MAS. La línea azul corresponde a los datos estimados y la línea verde, a la validación cruzada. Los límites seleccionados por el algoritmo PLS-DA para el cálculo de la sensibilidad y especificidad del modelo se muestran como un círculo rojo en cada una de las curvas.

El valor del área bajo la curva fue de 0,87, clasificando a la curva ROC como buena. Los altos valores de área bajo la curva (AUC) para ambas curvas, la estimada y la obtenida de la validación cruzada, son un indicador del buen funcionamiento y robustez del modelo discriminativo.

De forma numérica, se valoró la potencia y exactitud del modelo en base a los parámetros estadísticos de validación RMSECV y Q₂. Los resultados del test de permutación con 100 repeticiones aleatorias para el modelo PLS-DA arrojaron unos resultados de RMSECV=0,47 y Q₂=0,31, los cuales confirmaron que existía una buena bondad de ajuste del modelo, aunque con una regular capacidad predictiva.

Igualmente, se evaluó el valor predictivo del modelo mediante la matriz de confusión. Los resultados se presentan en la tabla 16. Se comprobó que, para los enfermos, el modelo presentaba un valor predictivo positivo del 74% y un valor predictivo negativo del 89%. La lectura de los datos indicaba que el modelo predecía

mejor a los casos sanos que a los enfermos. El coeficiente de correlación de Matthew (medida de asociación entre dos variables binarias) arrojó un valor de 0,63, traduciendo una buena predicción, alejada de la predicción aleatoria (valor 0), aunque sin alcanzar la predicción perfecta (valor de 1).

Tabla 16. Matriz de confusión para el modelo PLS-DA, enfermos y sanos según histología del cilindro HR-MAS.

GRUPO	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Casos	73%	90%	74%	89%

Coeficiente de correlación de Matthew = 0,636; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo

5.2.5 Perfil metabólico y vías metabólicas relacionadas con el tumor de próstata

Tabla 17. Metabolitos identificados con VIP score > 1 y vías metabólicas asociadas en muestras de tejido (estudio de enfermos y sanos según histología del cilindro HR-MAS). Los niveles promedios entre grupos y el valor de p al comparar los mismos, pueden encontrarse en el anexo 4.

METABOLITO	RUTA METABÓLICA
Citrato	Ciclo del ácido tricarboxílico
Glicerol-3-fosfolina	Metabolismo de la glicólisis
Carnitina	Metabolismo de los ácidos grasos
O-fosfolina	Metabolismo glicerofosfolípido
Trans-aconitato	Ciclo del ácido tricarboxílico
Acetoína	Ciclo del ácido tricarboxílico
Glucosa	Metabolismo de la glicólisis
O-fosfoetanolamina	Metabolismo de los ácidos grasos
C(18)H3	Metabolismo de la glicólisis
Glutamato	Metabolismo del glutamato
Putrescina	Biosíntesis de poliaminas
Colina	Metabolismo glicerofosfolípido
1,3-dihidroxiacetona	Metabolismo de la glicólisis
Ascorbato	Metabolismo del inositol
Creatinina	Metabolismo de los aminoácidos
Alanina	Metabolismo de los aminoácidos
Cistationina	Metabolismo de los aminoácidos
Formato	Metabolismo de la microbioma intestinal
Homocitrulina	Ciclo de la urea
2-oxoglutarato	Ciclo del ácido tricarboxílico
Serina	Metabolismo glicerofosfolípido

Resultados

Una vez construido el modelo discriminante, el siguiente paso fue la identificación de los metabolitos que más contribuyeron a la separación de los dos grupos, enfermos y sanos.

El análisis detallado de la lista VIP score correspondiente a este modelo estadístico permitió identificar los metabolitos del cilindro que contribuían en mayor grado ($VIP > 1$) a la discriminación entre los dos grupos (tabla 17). Estos metabolitos fueron relacionados con diversas rutas metabólicas alteradas, como se muestra de forma gráfica en la figura 24. El impacto más llamativo se encontró en las vías del metabolismo del citrato, ciclo de Krebs, metabolismo de aminoácidos, y en el metabolismo de la glucosa.

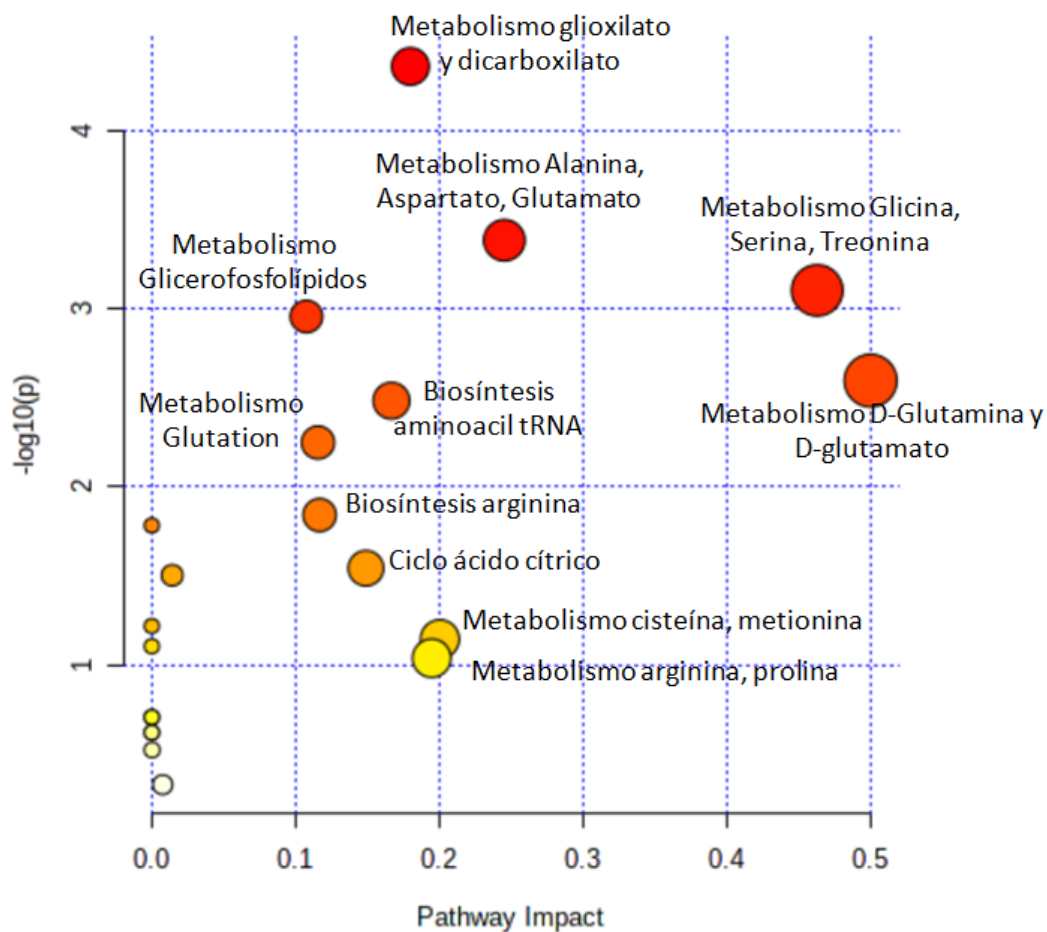


Figura 24. Análisis de las rutas metabólicas alteradas en muestras de tejido prostático (estudio para distinguir entre enfermos y sanos). El eje horizontal presenta los valores de impacto de la vía (basados en la centralidad de intermediación relativa), y el eje vertical los valores p respectivos (basados en la prueba hipergeométrica). El color y el tamaño de cada círculo indican su valor p y el valor de impacto de la vía, respectivamente.

Finalmente, se procedió a realizar una regresión logística con el fin de conocer la influencia que, una serie de variables metabólicas tienen en una variable respuesta dicotómica, como es la presencia o no de tejido canceroso en la biopsia de próstata. Con el objetivo de simplificar el modelo clasificatorio y así aumentar su utilidad práctica en vista a una posible introducción en la rutina clínica diaria, optamos por utilizar un mínimo número de variables. Así pues, se incluyeron como moléculas con peso en la discriminación entre grupos, todas aquellas con un VIP score superior a 2. Se incluyeron un total de 5 metabolitos. En la figura 25 se muestra el valor VIP score de cada metabolito incluido en la regresión logística, además de indicar si la concentración es superior en los enfermos o en los sanos.

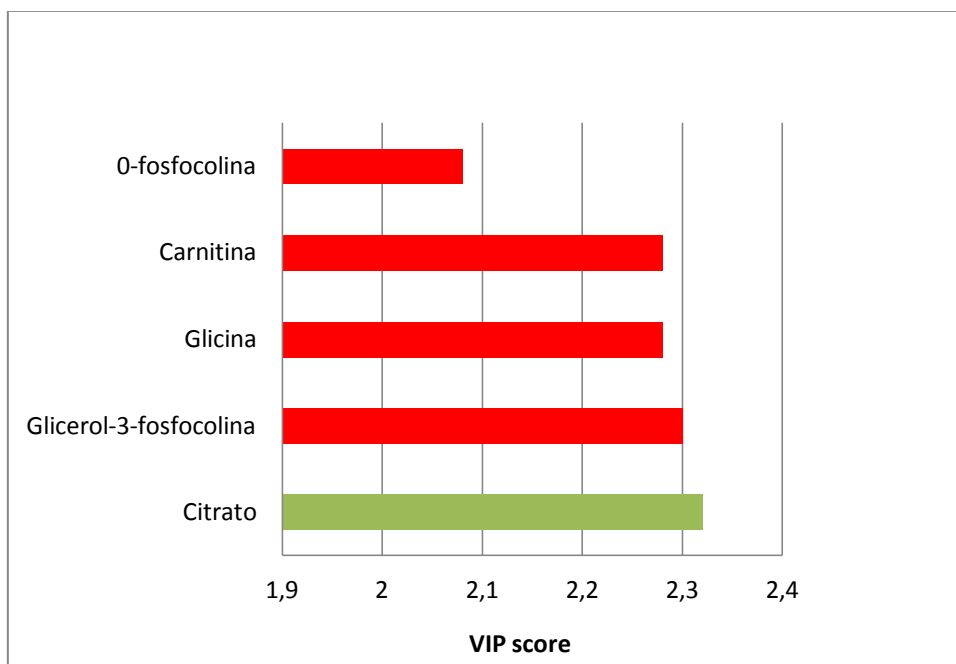


Figura 25. Valores VIP score de los 5 metabolitos con mayor contribución al modelo discriminador PLS-DA entre enfermos y sanos según histología del cilindro HR-MAS.

El color de las barras indica la dirección del cambio metabólico relativo respecto a los casos sanos (verde= metabolitos con mayor concentración en casos sanos, rojo= metabolitos con mayor concentración en casos enfermos).

El primer paso consistió en el análisis univariante de cada una de las cinco variables seleccionadas. Se comprobó la distribución normal de las concentraciones mediante un test de Kolmogorov-Smirnov ($p > 0,05$), y se compararon las medias de los dos grupos mediante un test t-Student. En la tabla 18 se incluyen los datos estadísticos

Resultados

más relevantes como el valor promedio del área bajo el pico, la desviación estándar y el valor de la significación estadística en la comparación de las medias de metabolitos obtenidos en sujetos con y sin tumor. Comprobamos como todos los metabolitos seleccionados presentaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos, y por lo tanto, los cinco se consideraron necesarios para la correcta discriminación entre los perfiles metabolómicos de pacientes sanos y enfermos de cáncer.

Tabla 18. Análisis univariante de los cinco metabolitos con VIP score >2 en el modelo PLS-DA discriminatorio entre enfermos y sanos según histología del cilindro HR-MAS.

METABOLITOS	ENFERMO SEGÚN CILINDRO HR-MAS	SANO SEGÚN CILINDRO HR-MAS	p-valor*
Citrato	22,54 +/- 23,56	44,79 +/- 38,30	<0,001
Glicerol-3-fosfocolina	17,76 +/- 12,42	9,39 +/- 8,54	<0,001
Glicina	7,48 +/- 4,11	4,73 +/- 2,52	<0,001
Carnitina	10,53 +/- 11,64	4,75 +/- 4,48	0,001
O-fosfocolina	22,06 +/- 11,68	14,15 +/- 8,46	<0,001

Valores mostrados como media +/- desviación estándar

*Test T-Student

El siguiente paso consistió en la realización de una regresión logística binaria, en la que se incluyeron los cinco metabolitos. Los resultados del modelo multivariante indicaron que tres metabolitos debían ser incluidos (citrato, glicerol-3-fosfocolina y carnitina). Los principales datos estadísticos de la regresión multivariable se resumen en la tabla 19. El citrato (a más concentración, menos probabilidad de tumor según histología del cilindro HR-MAS), el glicerol-3-fosfocolina y la carnitina (a mayor concentración, más probabilidad de tumor en el cilindro HR-MAS), obtuvieron influencia significativa sobre la variable dependiente dentro del análisis multivariante.

Tabla 19. Análisis multivariante. Regresión logística binaria incluyendo los metabolitos con tendencia a diferencias estadísticamente significativas en el análisis univariante previo.

METABOLITO	OR	IC- 95%	p-valor*
Citrato	0,97	0,95 - 0,98	<0,001
Glicerol-3-fosfocolina	1,05	1,01 - 1,10	0,01
Glicina	1,14	0,95 - 1,37	0,15
Carnitina	1,08	1,01 - 1,16	0,02
O-fosfocolina	1,03	0,98 - 1,09	0,18

OR: Odds ratio, IC: Intervalo de confianza

* Regresión logística binaria

Los valores de OR, calculados para cada metabolito, se conocen como OR ajustados, ya que incorporan el efecto de la influencia del resto de variables. De esta forma, quedaron excluidas de la ecuación de la regresión logística multivariante metabólica todas las variables metabólicas que no presentaron niveles de significación estadística.

5.2.6 Modelos con variables clínicas y perfil metabólico. Huella metabólica por HR-MAS del cáncer de próstata en un cilindro obtenido mediante biopsia transrectal

Los modelos de regresión logística aplicados a las ciencias de la salud nos permiten el análisis de los resultados en términos explicativos y predictivos, pudiendo conocer la fuerza de asociación mediante los odds ratio de los factores de riesgo con el efecto estudiado de una manera independiente, además de conocer el valor predictivo de cada uno de ellos o bien del modelo en su conjunto. Con esta finalidad, se procedió al análisis por regresión logística, en primer lugar, con las variables utilizadas habitualmente en la clínica para el diagnóstico del cáncer de próstata y, en segundo lugar, añadiendo las variables identificadas como posibles biomarcadores de cáncer de próstata obtenidas en el estudio metabólico de los cilindros de HR-MAS para casos enfermos y sanos.

El resultado del análisis univariante, con las variables clínicas diferenciadas entre los dos grupos, se muestra en la tabla 20. En el presente análisis se incluyeron como enfermos todos aquellos con tumor en el cilindro HR-MAS y se excluyeron los *outliers*. Se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos con todas las variables menos con la edad, el IMC y el PSA. Con la mediana de PSA, aunque no hubo diferencias, existía una tendencia a la significación estadística ($p < 0,3$), motivo por el cual también se incluyó en la regresión logística posterior.

A continuación, en base a los resultados previos del análisis univariante de las variables clínicas, se realizó una regresión logística binaria en la que se incluyeron todas las variables que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de interés (tabla 21). Los resultados del modelo multivariante indicaron que tanto el volumen prostático como el tacto rectal sospechoso eran variables clínicas

Resultados

que mostraban influencia independiente sobre la presencia de tumor en el cilindro de HR-MAS.

Tabla 20. Análisis univariante. Diferencias en las variables clínicas entre los dos grupos de estudio (enfermos y sanos según histología del cilindro HR-MAS).

VARIABLE	CON TUMOR EN CILINDRO HR-MAS	SIN TUMOR EN CILINDRO HR-MAS	p-valor
EDAD en años(media +/- DE)	68,17 +/- 9,56	66,80 +/- 7,10	0,35*
IMC	30,07 +/- 4,77	28,57 +/- 3,37	0,9*
PSA en ng/mL (mediana, intervalo)	10 (3-1446)	8 (4-67)	0,06 [^]
Densidad de PSA (mediana, intervalo)	0,31 (0,06-24,8)	0,16 (0,04-1,83)	<0,001 [^]
Cociente de PSA	0,11 +/- 0,06	0,14 +/- 0,07	0,01*
Vol. prostático en cc (media +/- DE)	35,85 +/- 18,91	51,50 +/- 25,36	< 0,001*
Tacto rectal sospechoso (n (%))	30 (54,5%)	27 (19,3%)	< 0,001 ⁺
Sospecha en ecografía (n (%))	40 (71,4%)	59 (40,7%)	< 0,001 ⁺

DE: Desviación estándar, IMC: Índice de masa corporal, PSA: Antígeno prostático específico, Vol.: Volumen

* T-Student [^]Prueba de la mediana ⁺Chi-cuadrado

Tabla 21. Análisis multivariante. Regresión logística binaria incluyendo las variables clínicas con diferencias estadísticamente significativas en el análisis univariante previo (enfermos-sanos según histología del cilindro HR-MAS).

VARIABLE	OR	IC- 95%	p-valor*
PSA	1,01	0,99 - 1,04	0,09
Densidad de PSA	0,87	0,55 - 1,40	0,58
Cociente de PSA	1,18	0,85 - 1,12	0,63
Vol. prostático	0,96	0,94 - 0,98	0,001
Tacto rectal sospechoso	2,60	1,01 - 6,75	0,04
Sospecha en ecografía	1,68	0,61 - 4,58	0,30

OR: Odds ratio, IC: Intervalo de confianza, PSA: Antígeno prostático específico, Vol.: Volumen

* Regresión logística binaria

Finalmente, siguiendo una metodología similar a la utilizada con las variables metabólicas y clínicas, se procedió a realizar un análisis multivariante conjunto incluyendo los cinco metabolitos que más peso tenían en el modelo discriminativo

(aquellos con VIP score por encima de 2), y las dos variables clínicas que aparecían como significativas en la regresión logística binaria. Los resultados obtenidos del análisis multivariante conjunto con variables clínicas y metabólicas se muestran en la tabla 22. En este nuevo modelo, las variables metabólicas que siguen presentando diferencias estadísticamente significativas son el citrato y la glicerol-3-fosfocolina, mientras que la carnitina se queda en la frontera de la significación ($p=0,06$). Las dos variables clínicas siguen manteniéndose dentro del modelo, de forma que a menor volumen prostático y en caso de tacto rectal sospechoso, mayor probabilidad de presentar carcinoma en la histología del cilindro HR-MAS.

Tabla 22. Análisis multivariante. Regresión logística binaria conjunta incluyendo variables clínicas y metabolitos (enfermos-sanos según histología del cilindro HR-MAS).

METABOLITO	OR	IC- 95%	p-valor*
Citrato	0,97	0,95 - 0,98	0,001
Glicerol-3-fosfocolina	1,05	1,01 - 1,09	0,02
Glicina	1,18	0,96 - 1,44	0,10
Carnitina	1,07	0,99 - 1,16	0,06
O-fosfocolina	1,02	0,97 - 1,09	0,32
Vol. prostático	0,97	0,95 - 0,99	0,01
Tacto rectal sospechoso	2,90	1,20 - 7,01	0,01

OR: Odds ratio, IC: Intervalo de confianza, Vol.: Volumen

* Regresión logística binaria

A partir de los resultados obtenidos en la regresión logística binaria conjunta, se valoró la capacidad predictiva de los modelos propuestos. Con este objetivo se calcularon las curvas ROC de tres modelos predictores distintos: el que sólo incluía metabolitos con VIP score mayor a 2, el que sólo incluía variables clínicas, y finalmente, el que incluía variables clínicas y metabolitos. Las curvas ROC obtenidas para los diferentes modelos se muestran en la figura 26. Por otra parte, en la tabla 23 se incluyen los valores de AUC calculados para cada una de estas curvas ROC, el intervalo de confianza asintótico al 95% y los principales parámetros de calidad obtenidos a partir de las curvas ROC. Puede observarse que los modelos construidos con metabolitos aportaban mejor capacidad predictiva que el formado sólo con variables clínicas, pero el modelo conjunto con variables clínicas y metabólicas, es el mejor, con

Resultados

muy buena especificidad y valores predictivos, aunque con una sensibilidad baja, clasificando mejor a los casos sanos que a los enfermos.

Tabla 23. Valores de AUC, sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo obtenidos a partir de las curvas ROC en los tres modelos calculados enfermos-sanos según histología del cilindro HR-MAS.

MODELO	AUC	IC 95% - AUC	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Variables clínicas	0,78	0,71 - 0,85	45%	89%	64%	79%
Metabolitos	0,84	0,77 - 0,90	50%	93%	73%	82%
Variables clínicas y metabolitos	0,87	0,81 - 0,93	59%	94%	80%	84%

AUC: Área bajo la curva, IC: Intervalo de confianza, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo

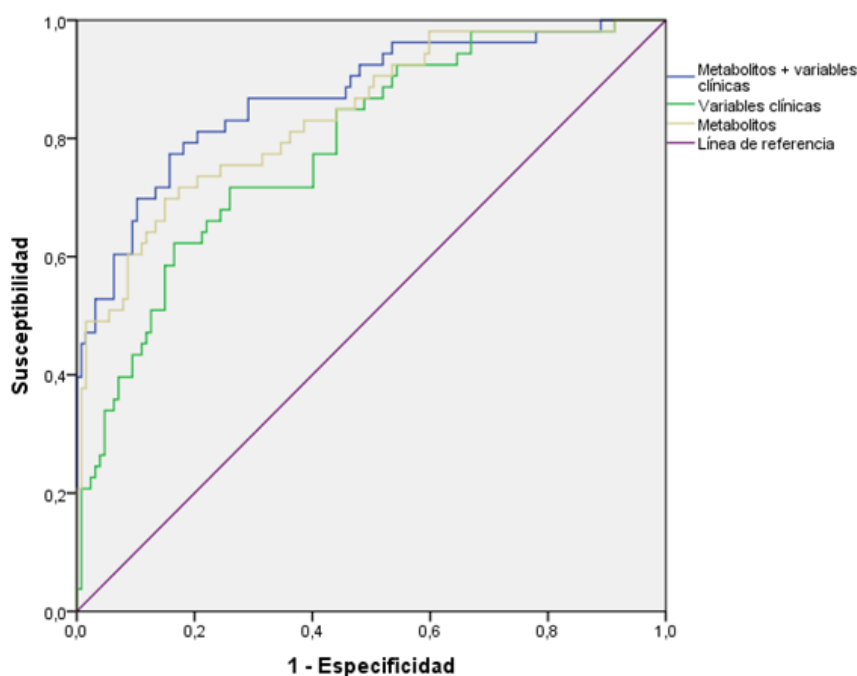


Figura 26. Curvas ROC obtenidas de los diferentes modelos multivariantes (enfermos o sanos según histología del cilindro HR-MAS).

Adicionalmente, se llevó a cabo la comparación de los valores de AUC de los tres modelos entre sí, y también comparaciones dos a dos. Así pues, al comparar el AUC de las tres curvas conjuntamente, se hallaron que las diferencias presentes eran estadísticamente significativas ($p < 0,001$). Al comparar dos a dos, entre la curva con metabolitos más variables clínicas y la curva sólo con metabolitos, no hubo diferencia

estadísticamente significativa, con $p=0,07$. Tampoco fue estadísticamente significativa la diferencia entre la curva sólo con metabolitos y la curva sólo con variables clínicas, con una $p=0,24$. Sin embargo, la diferencia entre la curva con metabolitos más variables clínicas y la curva sólo con variables clínicas presentó una significación estadística con $p=0,01$.

Por lo tanto, el modelo que mejor discrimina entre enfermos y sanos es aquel que incluye a los metabolitos con mayor VIP score del PLS-DA, junto con las variables clínicas: volumen prostático y tacto rectal sospechoso. Este modelo mostró mejor sensibilidad y especificidad que el resto, y destaca por la buena capacidad (VPN 84%) para detectar casos sanos. En general, se considera un marcador de diagnóstico aceptable, cuando el valor de AUC es igual o superior a 0,75. Este criterio sería deseable en la comparación entre pacientes sanos y con cáncer de próstata, y en el objetivo de identificar biomarcadores que permitan hacer posible la detección de la enfermedad de manera precoz. Se puede apreciar como la inclusión de la metabolómica en la discriminación entre pacientes sanos y enfermos mejora los resultados que exhibe un modelo basado únicamente en las variables clínicas habituales.

5.3 IDENTIFICACIÓN DEL CARCINOMA PROSTÁTICO EN CUALQUIER LOCALIZACIÓN DENTRO DEL ÓRGANO, A PARTIR DEL PERFIL METABOLÓMICO POR HR-MAS DE UN SOLO CILINDRO DE PRÓSTATA

Siguiendo con otro de los objetivos de esta tesis, se intentó construir, mediante el análisis metabolómico con sonda HR-MAS de un cilindro de tejido prostático, un modelo que permitiese identificar la presencia de células cancerosas en cualquier otra localización dentro del órgano y no sólo en el cilindro medido por RMN.

Para la consecución del objetivo planteado en este apartado utilizamos la información histológica tanto del cilindro HR-MAS como de los cilindros de la biopsia

Resultados

estándar. De esta manera, los cuatro grupos de muestras establecidos inicialmente (ver Tabla 10) los reagrupamos en tres grupos: cáncer, control y cilindro negativo. El grupo cáncer incluyó las muestras que presentaban células cancerosas tanto en el cilindro HR-MAS como en la biopsia estándar (Biopsia + Cilindro +, 54 casos) más las muestras que las células cancerosas se identificaron únicamente en el cilindro HR-MAS (Biopsia - Cilindro +, 2 casos). El grupo control lo conformaba las muestras que no presentaron cáncer ni en el cilindro HR-MAS ni en la biopsia estándar (Biopsia - Cilindro -, 94 casos), y finalmente, definimos un tercer grupo como cilindro negativo que incluía las muestras donde el cilindro HR-MAS medido era tejido sano pero el paciente fue diagnosticado de cáncer por aparecer células tumorales en alguna otra localización de la próstata (Biopsia + Cilindro -, 51 casos).

Las muestras identificadas en el análisis previo como valores extremos (41, 52 y 86) fueron excluidas tanto del PCA como del PLS-DA, además del paciente 185 debido al mismo argumento expuesto anteriormente. De esta forma, finalmente el análisis incluyó 56 casos de cáncer, 92 control, y 49 cilindro negativo.

5.3.1 Análisis no supervisado: PCA, identificación del carcinoma prostático, en cualquier localización dentro del órgano, a partir del perfil metabólico por HR-MAS de un solo cilindro de próstata

En el análisis no supervisado mediante un PCA, puede observarse (figura 27) que las muestras se distribuyen de manera uniforme ocupando todo el espacio multivariable. No presentan una tendencia o agrupación en función de los tres grupos definidos previamente, ni tampoco se aprecia otra fuente de variabilidad diferente al diagnóstico del cilindro que pueda influir en la homogeneidad de las muestras. Las muestras cilindro negativo se presentan muy solapadas con los otros dos grupos.

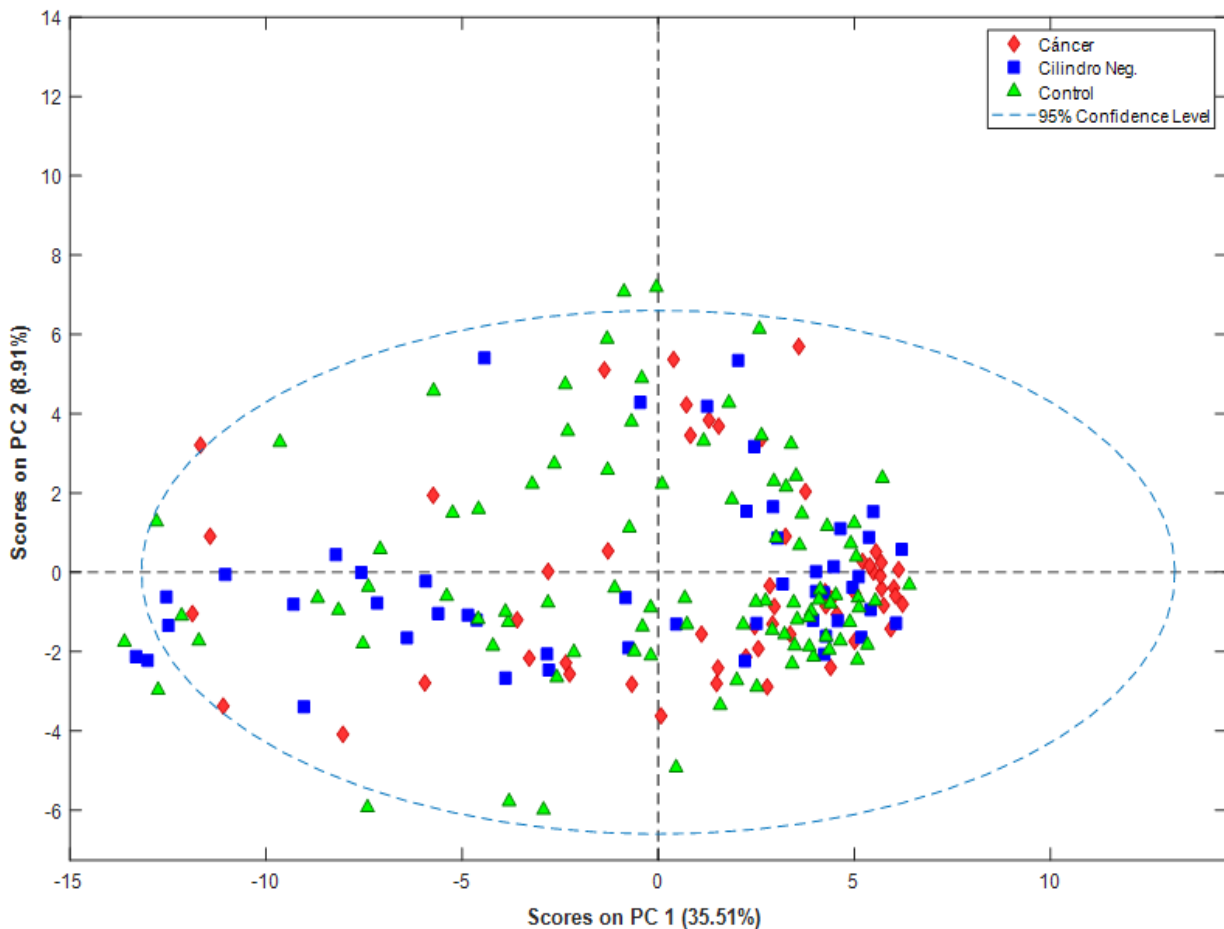


Figura 27. Diagrama de puntos obtenido del análisis PCA de los espectros de ^1H -HR-MAS PRESAT de las muestras de tejido de próstata del grupo enfermo con carcinoma (rombo rojo), sanos (triángulo verde) y grupo biopsia + cilindro - (cuadrado azul).

5.3.2 Análisis supervisado: PLS-DA, identificación del carcinoma prostático, en cualquier localización dentro del órgano, a partir del perfil metabólico por HR-MAS de un solo cilindro de próstata

Una vez comprobado que las muestras no se agrupaban de forma espontánea en el PCA, se procedió a construir un modelo discriminatorio PLS-DA. Como se comentó previamente, mediante el análisis PLS-DA se fuerza la separación entre grupos, pudiendo comprobar distribuciones muy distintas en modelos donde previamente el PCA mostraba una falta de distribución diferencial entre grupos. La estrategia seguida fue construir un modelo que separase los dos grupos metabólicamente más diferentes, control vs cáncer, y luego proyectar en el espacio multivariable el tercer grupo, las muestras cilindro negativo. En la figura 28 se muestra

Resultados

el diagrama de puntos obtenido como resultado del PLS-DA donde se representa la distribución de los tres grupos en el nuevo espacio multivariable.

Puede observarse una clara separación entre los grupos de cáncer y los sanos, con una pequeña zona de solapamiento. Así pues, se comprueba una distribución diferencial entre los dos grupos, como ya sucedía al estudiar la huella metabólica distinta entre sanos y enfermos anteriormente directamente en el cilindro HR-MAS.

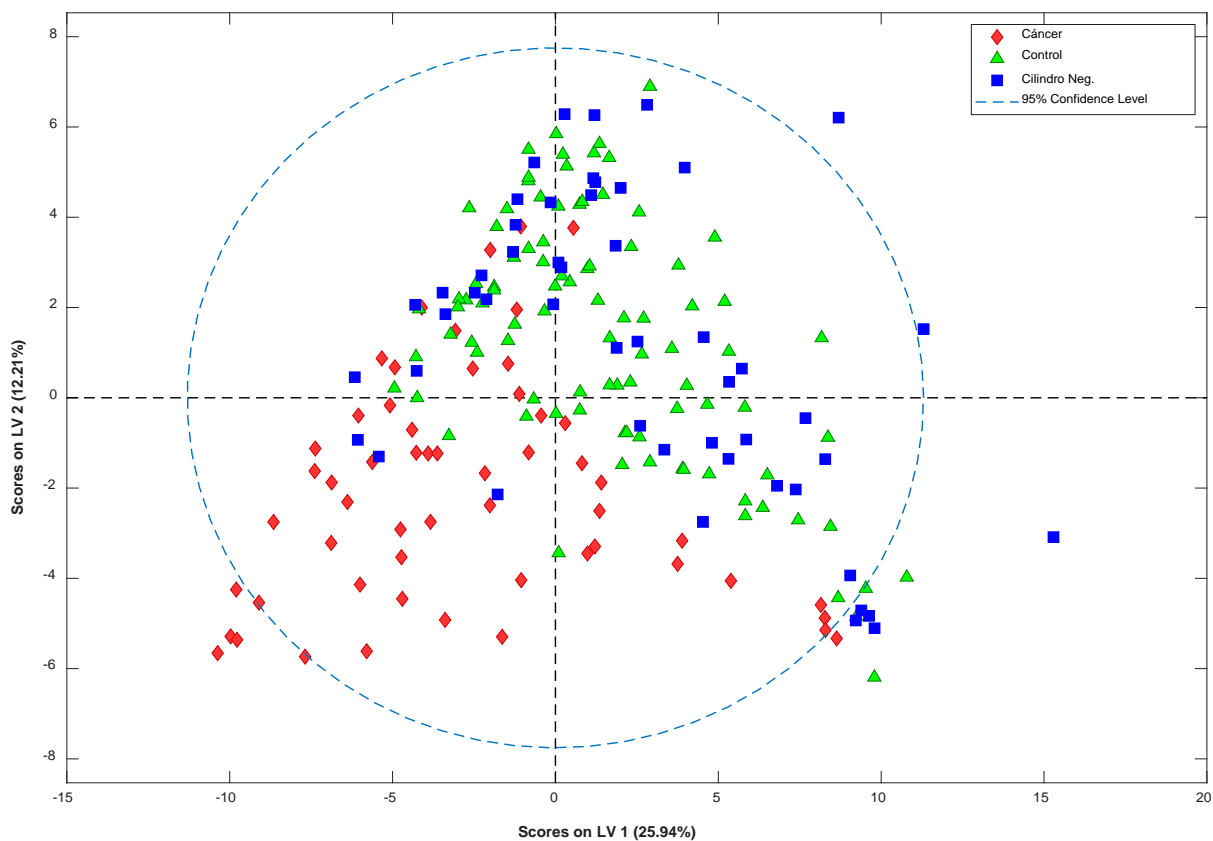


Figura 28. Diagrama de puntos obtenido del análisis PLS-DA de los espectros de ^1H -HR-MAS PRESAT de las muestras de tejido de próstata del grupo enfermo con carcinoma (rombo rojo), sanos (triángulo verde) y grupo biopsia + cilindro - (cuadrado azul). El modelo discriminativo se ha construido maximizando las diferencias entre los grupos cáncer y sanos, a continuación, se ha proyectado en el nuevo espacio multivariable el grupo cilindro negativo.

Una vez proyectadas las muestras del grupo cilindro negativo sobre las nuevas variables latentes del PLS-DA observamos como, especialmente, se localizan mayoritariamente sobre las muestras control. Esto revela que las muestras denominadas cilindro negativo son metabólicamente más parecidas a las muestras de

sanos. Es decir, que a pesar de ser sujetos con tumor en otra localización de la próstata distinta al cilindro HR-MAS, el perfil metabólico no parece diferenciar estos casos de los sujetos realmente sanos.

De forma adicional a la representación gráfica del diagrama de puntos, establecimos numéricamente la capacidad de clasificar las muestras cilindro negativo por parte del modelo PLS-DA mediante una prueba de predicción. Cargamos al modelo discriminativo estas muestras como un conjunto independiente de datos de validación, y calculamos la predicción como pertenencia más probable. El resultado fue que 6/49 muestras (12%) las clasificó como tumorales, mientras que 43/49 (88%) las consideró muestras sanas como más probable.

5.4 CAPACIDAD DE LA METABOLÓMICA POR HR-MAS PARA CONSTRUIR UN MODELO QUE PERMITA VALORAR LA AGRESIVIDAD DEL CÁNCER DE PRÓSTATA (SEGÚN GRADO DE GLEASON)

Otro objetivo de este trabajo fue comprobar si mediante una sonda HR-MAS se podían establecer perfiles metabólicos específicos, evaluados directamente sobre la biopsia de próstata, que permitiesen valorar la agresividad del cáncer de próstata o estratificar mejor a los pacientes en base a la agresividad tumoral. Como se ha comentado en la introducción de esta tesis, existen varios sistemas de clasificación en la práctica clínica que son utilizados para describir la agresividad del tumor. Uno de los más utilizados es el grado de Gleason, en base al patrón glandular de la neoplasia, identificado mediante bajo aumento microscópico.

En base a los resultados previos obtenidos para la construcción del modelo predictivo de agresividad tumoral, se decidió establecer como referencia de agresividad tumoral al análisis Gleason del cilindro medido por HR-MAS. Así pues, en aquellos casos con un valor Gleason diferente entre la biopsia estándar y el cilindro HR-MAS, se aceptó para este análisis el Gleason del cilindro HR-MAS. Por supuesto, todos los casos sin tumor en el cilindro HR-MAS se excluyeron en este apartado, ya que

Resultados

se les consideró individuos sanos y por lo tanto no se pudo estudiar en ellos la agresividad tumoral.

5.4.1 Selección de la muestra y análisis preliminar: capacidad de la metabolómica por HR-MAS para construir un modelo que permita valorar la agresividad del cáncer de próstata

Como se comentó anteriormente, de los 54 cilindros HR-MAS con tumor, se pudo establecer de forma correcta la graduación Gleason del tejido mediante su correspondiente estudio histopatológico en 26 de ellos (ver tabla 11), siendo incluidos para este análisis. La distribución de las muestras en los diferentes grupos Gleason fue de la siguiente manera: 4 muestras Gleason 6, 7 de Gleason 7, 3 de Gleason 8, 11 de Gleason 9 y 1 de Gleason 10. Las muestras identificadas en los análisis previos como valores extremos o *outliers* (41, 52 y 86) fueron excluidas tanto del PCA como del PLS-DA, además del paciente 185 debido al mismo argumento expuesto anteriormente. En ninguno de los 3 *outliers* ni en el paciente 185 se determinó la presencia de carcinoma en el cilindro HR-MAS, por lo que no cumplían con el criterio de inclusión en este análisis (Gleason presente en el cilindro HR-MAS).

En primer lugar, comenzamos con un análisis exploratorio PCA de los datos con el objetivo de comprobar la posible agrupación de los datos en función del valor de Gleason. En la figura 29 se presenta el diagrama de puntos del análisis PCA donde se puede apreciar que las muestras de los diferentes grupos se distribuyen homogéneamente por todo el espacio multivariable. La elección de las dos primeras componentes principales explica hasta un 42% de la varianza de los datos, pero los grupos se presentan completamente solapados y no se aprecian agrupamientos en función del grado de agresividad tumoral Gleason.

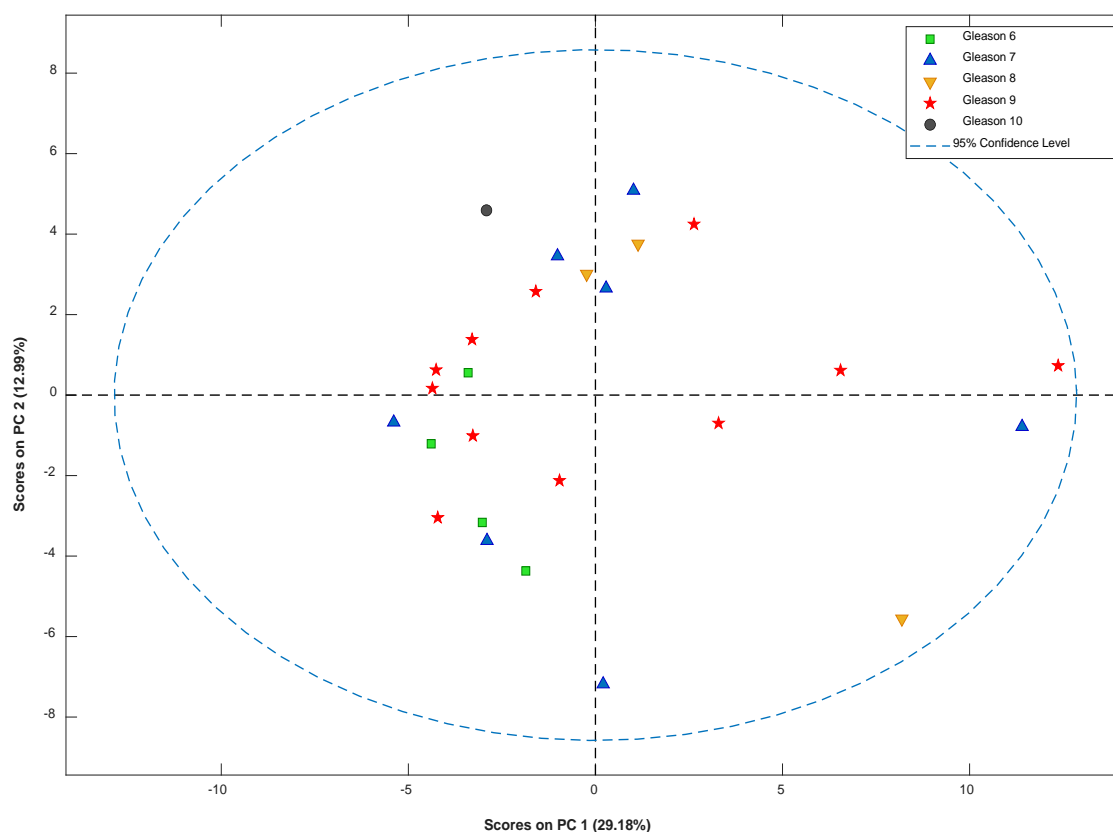


Figura 29. Diagrama de puntos obtenido del análisis PCA de los espectros de ^1H -HR-MAS PRESAT de las muestras de tejido de próstata graduadas como grupos Gleason 6 (cuadrado verde), Gleason 7 (triángulo azul), Gleason 8 (triángulo invertido naranja), Gleason 9 (estrella roja) y Gleason 10 (círculo negro).

Dado que el análisis PCA no reveló una asociación de las muestras en grupos se llevó a cabo un análisis discriminante PLS-DA. El modelo discriminativo se construyó con el objetivo de separar los dos grupos extremos (Gleason 6 vs Gleason 9), y posteriormente proyectar sobre ese mismo modelo el resto de las muestras con el objetivo de apreciar similitudes metabólicas. En la Figura 30 se muestra el diagrama de puntos del análisis PLS-DA creado con las dos primeras variables latentes, y que recoge hasta un 44% de la variabilidad total del sistema.

Resultados

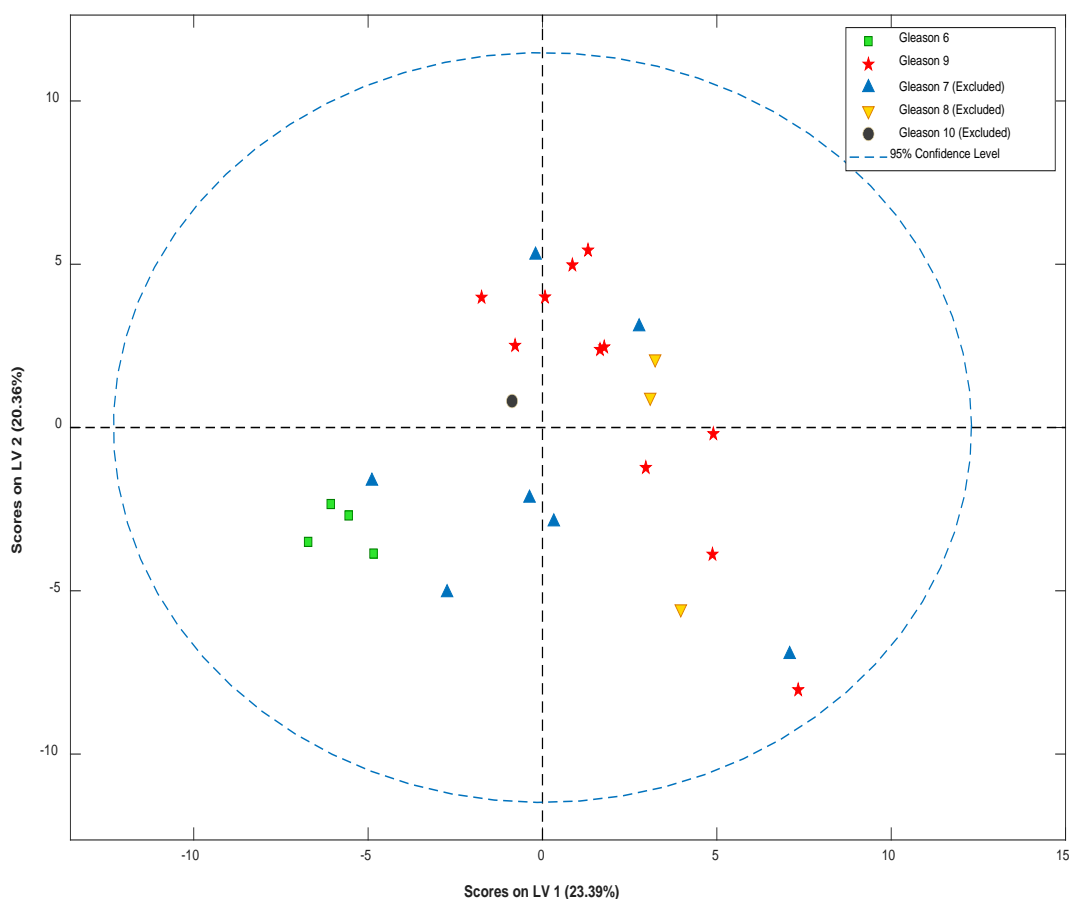


Figura 30. Diagrama de puntos obtenido del análisis PLS-DA de los espectros de ^1H -HR-MAS PRESAT de las muestras de tejido de próstata clasificadas según su grupo Gleason en base a la histología del cilindro HR-MAS. El modelo se construyó con el objetivo de separar los dos grupos extremos, Gleason 6 (cuadrado verde) y Gleason 9 (estrella roja). El resto de muestras, Gleason 7 (triángulo azul), Gleason 8 (triángulo invertido naranja) y Gleason 10 (círculo negro) se proyectaron sobre el modelo con el objetivo de determinar semejanzas metabólicas.

En el PLS-DA, a pesar de las pocas muestras, el modelo presenta una buena separación entre las muestras Gleason 6 y las Gleason 9 sin ningún tipo de solapamiento. Los grupos extremos se separan perfectamente, no ocurre lo mismo con el resto de grupos. Las muestras Gleason 7 son las más heterogéneas, es como si se dividiesen, a su vez, en dos subgrupos. Un primer subgrupo de cuatro pacientes que se localizan relativamente próximos al grupo Gleason 6, pero sin solaparse, en una posición intermedia entre la mínima agresividad (Gleason 6) y los grupos de máxima agresividad (Gleason 8 y 9). Un segundo subgrupo de tres muestras Gleason 7 se

localizan en el espacio que ocupan mayoritariamente las muestras Gleason 9, lo que podría interpretarse como que éstas presentan metabólicamente mayor agresividad de la que determinó el estudio histopatológico. Por último, las muestras de los grupos Gleason 8, 9 y 10 se localizan prácticamente solapadas, dando a entender que en estadios de alta agresividad, metabólicamente, las muestras son similares.

5.4.2. Análisis no supervisado: PCA, predicción de agresividad en cáncer de próstata

En base a los resultados obtenidos en el análisis previo, donde se clasificaron las muestras empleando los 5 grupos de agresividad Gleason, procedimos a rehacer el análisis, pero creando nuevas agrupaciones. Dado que el número de muestras es limitado para este apartado, y para facilitar el análisis, se decidió reagrupar los casos en dos grupos. Uno de baja agresividad que incluía a los pacientes Gleason 6-7, y otro de agresividad alta que incluye a los pacientes Gleason 8 y superiores. Se decidió llevar a cabo esta división por las connotaciones terapéuticas y pronósticas de cada uno de los grupos, más similares para los Gleason englobados en uno u otro grupo. Finalmente, 11 cilindros fueron incluidos en el subgrupo Gleason 6-7 y 15 lo fueron en el Gleason 8 o mayor. Un único paciente con Gleason 10 en el cilindro HR-MAS se incluyó dentro del grupo de 8 o mayor. De esta forma, los sujetos quedan agrupados de manera que clínicamente son más similares en cuanto a pronóstico y manejo, de ahí la agrupación descrita. Las muestras extremas que fueron retiradas del primer análisis también lo son en esta segunda estrategia.

El diagrama de puntos del análisis no supervisado PCA de las muestras reagrupadas se muestra en la siguiente figura 31. La proyección de las muestras en un nuevo espacio de pocas dimensiones consigue explicar hasta un 42% de la variabilidad total. Se observa que no existe una separación completa y espontánea de las muestras en función de los dos grupos definidos, y persiste una región amplia de solapamiento.

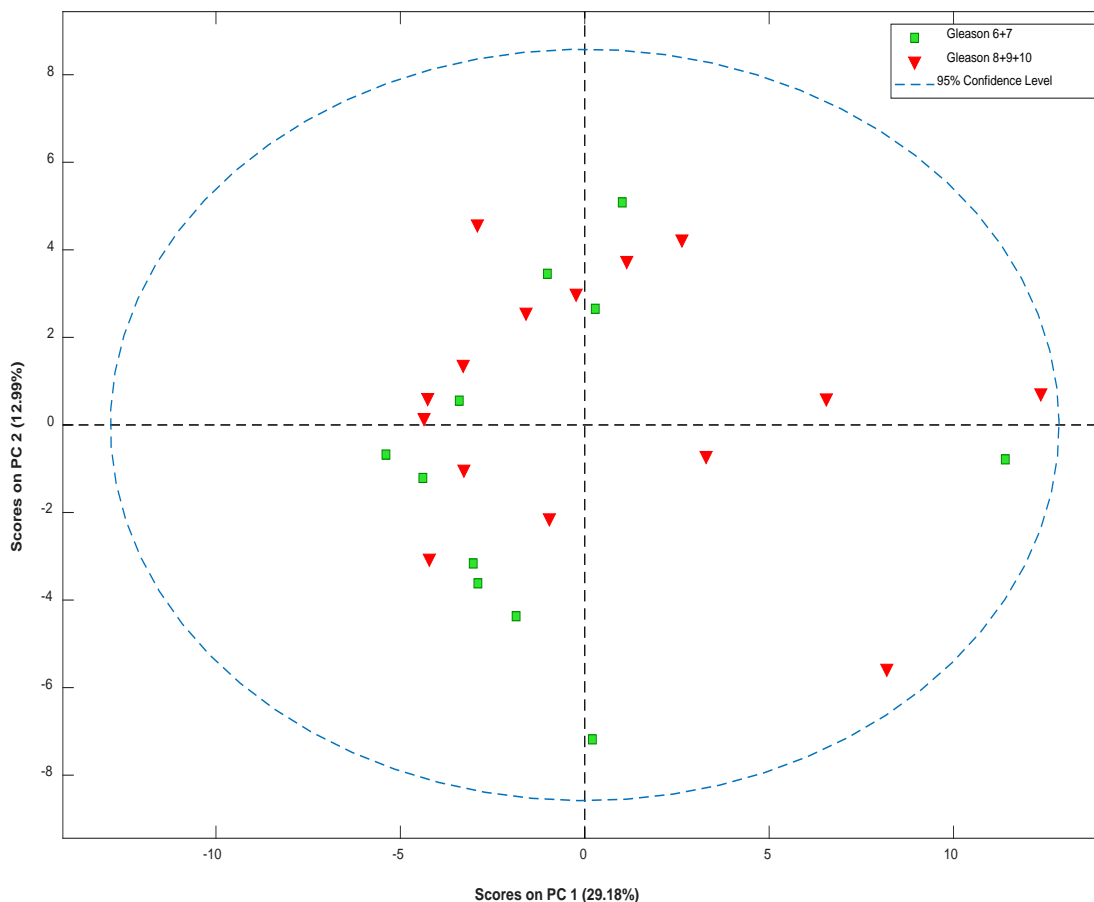


Figura 31. Diagrama de puntos obtenido del análisis PCA de los espectros de 1H-HR-MAS PRESAT de las muestras de tejido de próstata agrupadas como grupos Gleason 6+7 (cuadrado verde) y Gleason 8+9+10 (triángulo invertido rojo).

5.4.3 Análisis supervisado: PLS-DA, predicción de agresividad en cáncer de próstata

Con el objetivo de maximizar la separación entre ambos grupos, baja y alta agresividad tumoral basada en el Gleason se llevó a cabo un análisis supervisado tipo PLS-DA. El resultado en forma de diagrama de puntos se muestra en la figura 32.

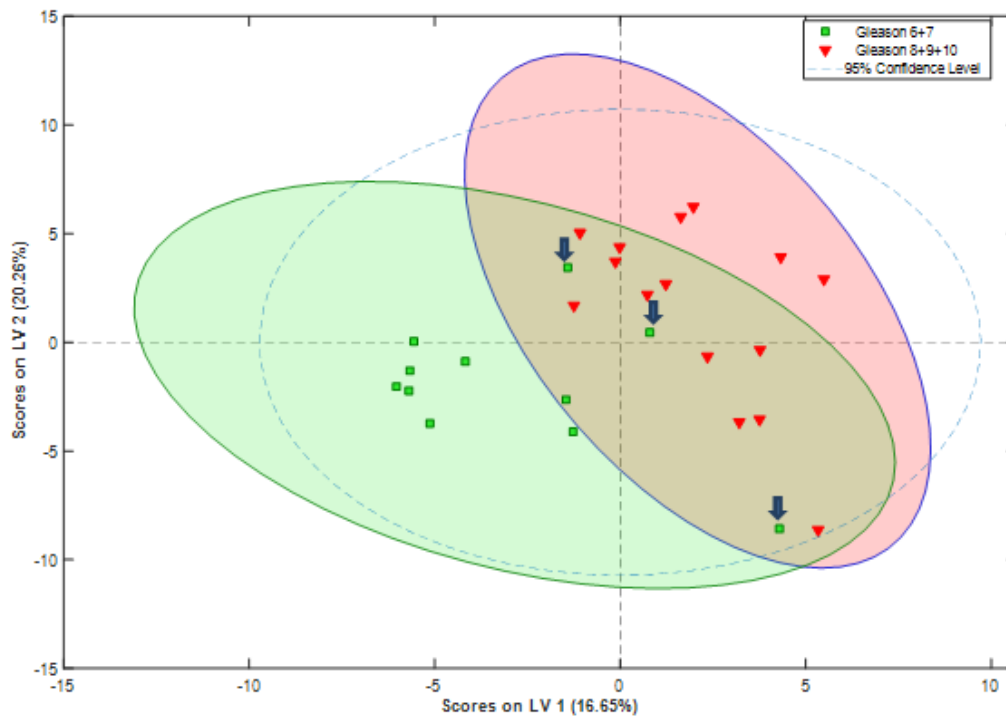


Figura 32. Diagrama de puntos obtenido del análisis PLS-DA de los espectros de 1H-HR-MAS PRESAT de las muestras de tejido de próstata agrupadas como grupos Gleason 6+7 (cuadrado verde) y Gleason 8+9+10 (triángulo invertido rojo). Las elipses coloreadas representan el intervalo de confianza del 95% para ese grupo. Las flechas indican la posición de los pacientes (de arriba abajo) #177, #30 y #5.

En el gráfico se observa una clara separación entre los dos grupos con una mínima región solapada, y cómo las elipses de confianza al 95% incluyen todas las muestras de cada grupo. La elipse asociada a las muestras de mayor agresividad es ligeramente más pequeña que la correspondiente a las muestras de menor agresividad. Esto puede interpretarse como que las muestras de mayor agresividad, aunque incluyen pacientes de hasta 3 subgrupos Gleason (8+9+10) en realidad a nivel metabólico son de una composición más homogénea que las de menor agresividad. En un análisis más detallado de la figura, nos llama la atención la disposición de tres muestras correspondientes al grupo Gleason 6-7, que se localizan en la zona frontera entre los dos grupos, muy próximas metabólicamente a las muestras del grupo Gleason 8+9+10. Estos tres casos correspondían a los pacientes 177, 30 y 5. Debido a este hecho, se decidió revisar la historia clínica de estos tres pacientes, para comprobar si podían haberse comportado como tumores agresivos o de alto riesgo a

Resultados

pesar de tratarse de Gleason 6-7 o cualquier otra singularidad que explicase su proximidad metabólica al grupo de mayor agresividad.

El paciente número 5 fue un varón que en el momento de realizar la biopsia tenía un PSA de 5 ng/mL, una densidad de PSA de 0,06 y un volumen prostático de 94 cc. Ecográficamente presentaba una zona sospechosa, pero el tacto rectal no era sugestivo de carcinoma. El Gleason según biopsia estándar fue un 7 (3+4) (1 cilindro de 10 afectos), al igual que el cilindro HR-MAS. Destacaba el alto porcentaje tumoral del cilindro HR-MAS, ocupando el tumor un 40% del tejido total. Acabó interviniéndose al paciente de prostatectomía radical laparoscópica, siendo el resultado histológico de la pieza un Gleason 7 (3+4), un foco tumoral afectando sólo a uno de los dos lóbulos prostáticos. Como factor de mal pronóstico, la pieza de prostatectomía presentaba también afectación perineural. Durante el seguimiento no tuvo una recidiva propiamente dicha, pero el PSA fue ascendiendo progresivamente y no se mantenía en valores indetectables. Los niveles de PSA en el momento de esta revisión eran de 0,11 ng/mL (36 meses tras la cirugía).

Por otro lado, el paciente número 30 fue un hombre que en el momento de la biopsia presentaba un PSA alto de 66 ng/mL, con una densidad de PSA de 1,78 y un volumen prostático de 37 cc. Ecográficamente se observó una zona sospechosa, pero el tacto rectal no era sugestivo de carcinoma. El Gleason según biopsia estándar fue un 7 (4+3), con una alta afectación de cilindros, hasta un 80% de los recogidos en la biopsia estándar. Además, presentaba tejido de vesículas seminales en la biopsia, con afectación tumoral del mismo, lo cual traducía un tumor agresivo, localmente avanzado. En el estudio de imagen se comprobó afectación ganglionar local, lo cual expresaba la agresividad del tumor a pesar de ser un Gleason 7. En cuanto al cilindro HR-MAS, también presentaba un Gleason 7 (4+3), afectando a casi todo el tejido del cilindro (un 80% del mismo). Este paciente se trató con bloqueo hormonal, manteniendo niveles de PSA alrededor de 0,6-0,8 ng/mL, sin ascensos hasta el momento de la revisión.

Por último, el paciente número 177 presentaba en la biopsia un PSA de 4,22, con una densidad de PSA de 0,24 y un volumen prostático de 17 cc. Ni la ecografía ni el tacto rectal fueron sugestivos de malignidad. El Gleason según biopsia estándar fue un 7 (3+4), con una afectación del 30% de los cilindros recogidos. En cuanto al cilindro HR-MAS, también fue un Gleason 7 (3+4), con una alta ocupación del tumor en el cilindro, (un 90% del tejido del cilindro ocupado por tumor). Este paciente se sometió a prostatectomía radical, con una histología muy desfavorable en la pieza quirúrgica, pues, aunque se mantuvo un Gleason 7 (3+4), existía afectación extracapsular tumoral, siendo un tumor localmente avanzado, además de tener infiltración perineural. A pesar de lo agresivo del tumor, se ha mantenido con PSA de 0 ng/mL, sin recidiva bioquímica hasta el momento de la revisión.

De este modo, en los pacientes 30 y 177 se encontraron características clínicas típicas de tumores de alto riesgo, como por ejemplo la afectación localmente avanzada o los altos niveles de PSA. Sin embargo, el paciente 5, por el contrario, no presentaba ninguna característica clínica tan definitoria de tumor de alto riesgo, aunque sí tenía bastante carga tumoral en el cilindro HR-MAS, infiltración perineural en la pieza de prostatectomía, y presentó aumento progresivo del PSA tras el tratamiento (sin alcanzar rango de recidiva bioquímica). La disposición en el PLS-DA de estas tres muestras podría interpretarse como ejemplos de muestras que histológicamente se clasifican con un nivel bajo de agresividad, pero donde el contenido metabólico de las mismas parece indicar que comparten más características con las muestras de alta agresividad.

5.4.4 Validación cruzada, modelo metabólico de agresividad en cáncer de próstata

Una vez obtenido el modelo discriminativo, se validó y se evaluaron los resultados obtenidos mediante una validación cruzada de los datos y la construcción de las correspondientes curvas ROC (figura 33).

Resultados

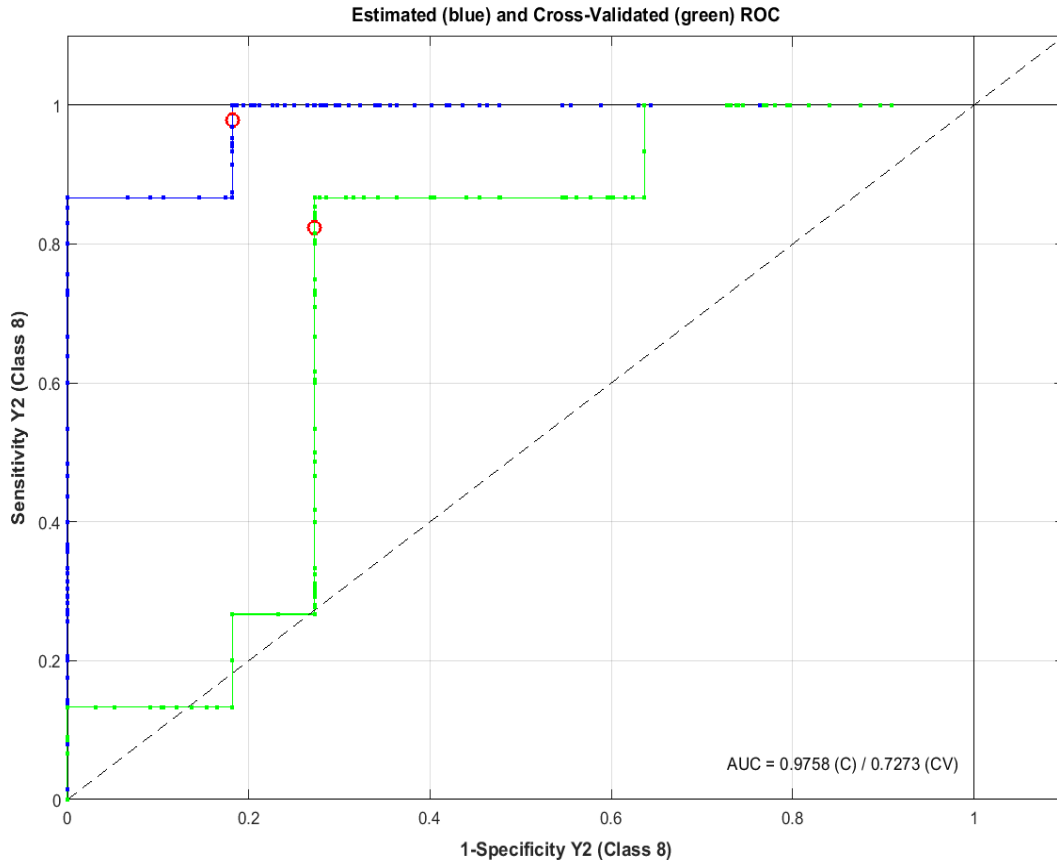


Figura 33. Curvas ROC obtenidas del modelo PLS-DA que discrimina entre las muestras de tejido de próstata agrupadas como grupos Gleason 6+7 y Gleason 8+9+10 según histología del cilindro HR-MAS. La línea azul corresponde a los datos estimados y la línea verde, a la validación cruzada. Los límites seleccionados por el algoritmo PLS-DA para el cálculo de la sensibilidad y especificidad del modelo se muestran como un círculo rojo en cada una de las curvas.

Los resultados obtenidos muestran que la curva de validación cruzada (en color verde) presenta una importante diferencia respecto a la línea que corresponde a los datos estimados (azul), El valor del área bajo la curva fue de 0,72, clasificando a la curva ROC como regular/buena. La matriz de confusión correspondiente a la curva se muestra en la tabla 24. Los datos estadísticos indican que se trata de un modelo con buena sensibilidad, especificidad y valores predictivos, útil para detectar a casos en ambos grupos.

Tabla 24. Matriz de confusión para el modelo PLS-DA, casos con Gleason 6-7 frente a Gleason 8+9+10 en el cilindro HR-MAS.

GRUPO	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Gleason 8 o mayor	93%	81%	87%	90%

Coeficiente de correlación de Matthews = 0,763, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo.

En cuanto a la valoración numérica del modelo, el mismo presentó valores dispares en los parámetros de validación, con RMSECV alto de 0,74, pero con Q2 bajo de 0,15. El coeficiente de Matthews (0,763) también traducía una buena correlación entre las clasificaciones observadas y predichas. Así pues, parámetros como el área bajo la curva, las tasas altas de verdaderos positivos y negativos, y la mayoría de parámetros cercanos a 1 en la valoración numérica, expresaban una buena validación del modelo predictor derivado del PLS-DA.

5.4.5 Perfil metabólico y vías metabólicas relacionadas con la agresividad en cáncer de próstata

Siguiendo la metodología empleada en apartados anteriores, tras obtener el modelo discriminante se prosiguió con la identificación de las regiones del espectro que más influían en el modelo, las que más contribuían a la separación entre grupos. En la tabla 25 se exponen los metabolitos más influyentes (VIP score por encima de 1) junto con la ruta metabólica implicada. Como se muestra en la figura 34, el impacto más importante se encontró en el metabolismo del glutamato, de algunos aminoácidos como el glutatión o la histidina, y de determinados ácidos grasos.

Tabla 25. Metabolitos con VIP score por encima de 1 en tejido y las rutas metabólicas implicadas (estudio de agresividad tumoral según Gleason del cilindro HR-MAS).

METABOLITO	RUTA METABÓLICA
Glutamato	Metabolismo del glutamato
Trans-aconitato	Ciclo del ácido tricarboxílico
Carnitina	Metabolismo de los ácidos grasos
Creatinina	Metabolismo de los aminoácidos
Histidina	Metabolismo de los aminoácidos
Homocitruilina	Ciclo de la urea
1,3-dihidroxiacetona	Metabolismo de la glicólisis
2-hidroxiacetato	Metabolismo de los ácidos grasos
FA-CH ₃	Metabolismo de los ácidos grasos
Glutación	Metabolismo de los aminoácidos
Leucina	Metabolismo de los aminoácidos
Ibuprofeno	Metabolismo glicerofosfolípido
Cistationina	Metabolismo de los aminoácidos
Glucosa	Metabolismo de la glicólisis
Acetoína	Ciclo del ácido tricarboxílico
Lisina	Metabolismo de los aminoácidos
C(18)H ₃	Metabolismo de la glicólisis
Succinato	Ciclo del ácido tricarboxílico
FA(-COCH ₂ CH ₂ -)	Metabolismo de los ácidos grasos
Glicina	Metabolismo de la glicina
Citrato	Ciclo del ácido tricarboxílico
FA(-CH ₂) _n	Metabolismo de los ácidos grasos

Dentro de los metabolitos con VIP score >1 se incluyen dos regiones etiquetadas como “desconocidas”. Es decir, son dos regiones espectrales que se cuantificaron de manera relativa en la etapa de integración de las señales, pero no se logró identificar certeramente a qué metabolitos corresponden. Estas regiones “desconocidas” se han incluido en la matriz de concentraciones usada para la obtención de los modelos clasificatorios, aunque no es posible deducir mayor información bioquímica.

Como se hizo en el análisis con enfermos y sanos, se volvieron a seleccionar un número concreto de metabolitos para llevar a cabo una regresión logística con un número de variables que no fuera excesivo. Para ello se aceptaron aquellos metabolitos con un VIP score por encima de 1,5. En la figura 35 se muestra el valor del VIP score de cada metabolito seleccionado. La comparación de los niveles promedios de estas moléculas puede encontrarse en el anexo 4.

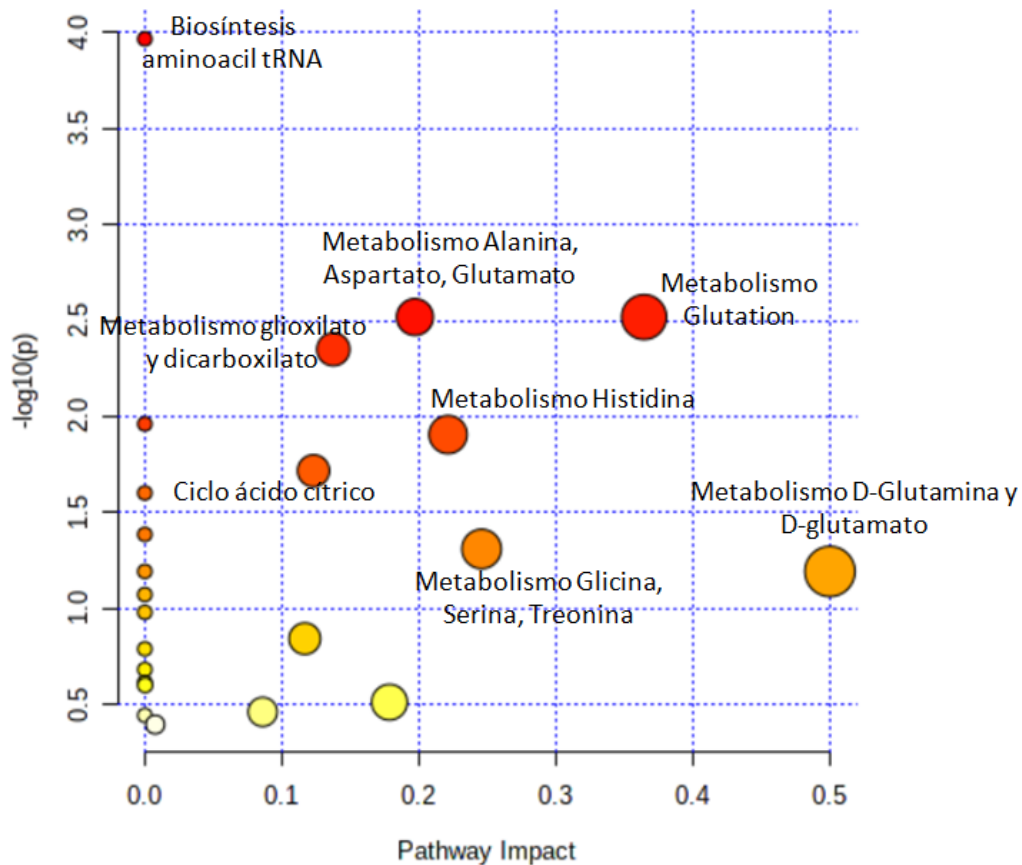


Figura 34. Análisis de las rutas metabólicas alteradas en muestras de tejido prostático (estudio de agresividad). El eje horizontal presenta los valores de impacto de la vía (basados en la centralidad de intermediación relativa), y el eje vertical los valores p respectivos (basados en la prueba hipergeométrica). El color y el tamaño de cada círculo indican su valor p y el valor de impacto de la vía, respectivamente.

El análisis comparativo entre medias de las integrales de los grupos se muestra en la tabla 26. Puede observarse que en el análisis univariante no se hallaron diferencias significativas en la comparación de medias de ningún metabolito con VIP score mayor de 1,5 en el modelo.

Resultados

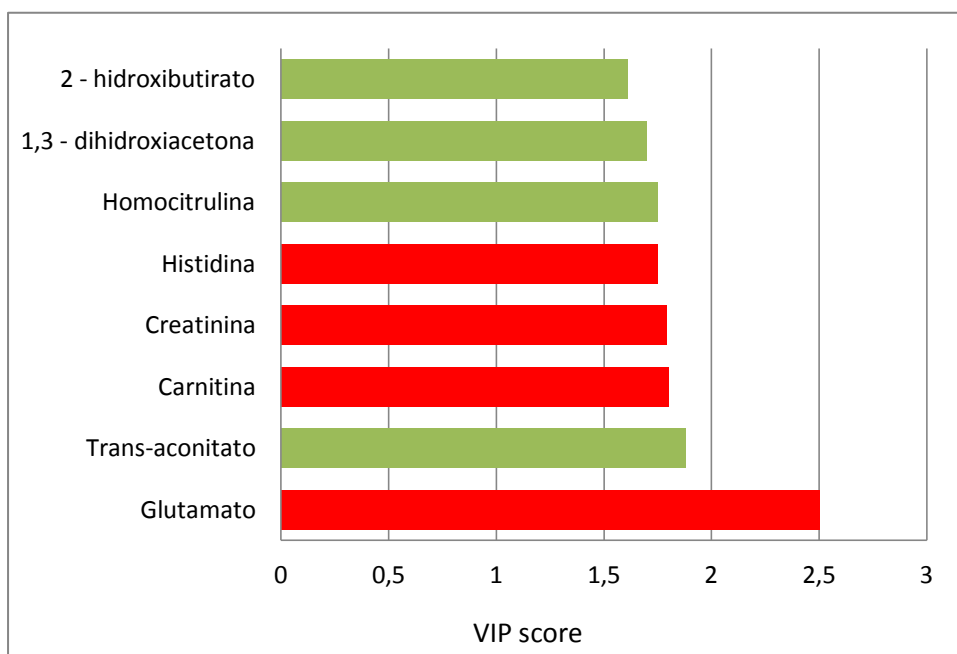


Figura 35. Valores VIP score de los metabolitos con mayor contribución al modelo discriminatorio PLS-DA entre Gleason 6+7 frente a Gleason 8+9+10 según la histología del cilindro HR-MAS. El color de las barras indica la dirección del cambio metabólico en función de la agresividad tumoral valorada como Gleason (verde= metabolitos con mayor concentración en casos de baja agresividad, rojo= metabolitos con mayor concentración en casos de mayor agresividad).

Tabla 26. Análisis univariante. Diferencias de áreas promedios entre los metabolitos que más contribuyeron a la discriminación del modelo (Gleason 6-7 frente a Gleason 8 o más, según histología del cilindro HR-MAS).

METABOLITOS	GLEASON 6-7 SEGÚN CILINDRO HR-MAS	GLEASON 8 O MÁS SEGÚN CILINDRO HR-MAS	p-valor*
Glutamato	38,41 +/- 20,37	43,22 +/- 23,29	0,73
Trans-acetonitato	0,88 +/- 0,82	0,63 +/- 0,60	0,45
Carnitina	5,92 +/- 4,63	16,11 +/- 17,72	0,20
Creatinina	2,02 +/- 1,68	1,98 +/- 0,76	0,58
Histidina	2,07 +/- 1,12	2,40 +/- 1,60	0,42
Homocitrulina	22,85 +/- 13,13	14,84 +/- 9,68	0,12
1,3-dihidroxiacetona	1,04 +/- 0,85	0,94 +/- 0,64	0,73
2-hidroxibutirato	24,48 +/- 14,58	18,66 +/- 10,36	0,28

Valores mostrados como media +/- desviación estándar

*Test U de Mann-Whitney

A pesar de no hallar diferencias en el univariante, por ser los metabolitos con más peso dentro del PLS-DA, se decidió incluirlos todos para calcular la regresión logística binaria (tabla 27).

Tabla 27. Análisis multivariante. Regresión logística binaria incluyendo los metabolitos con más influencia en el PLS-DA.

METABOLITO	OR	IC- 95%	p-valor*
Glutamato	0,91	0,82 - 1,02	0,14
Trans-aconitato	0,29	0,01 - 5,42	0,40
Carnitina	1,22	0,95 - 1,56	0,11
Creatinina	2,38	0,47 - 12,02	0,29
Histidina	3,51	0,68 - 18,05	0,13
Homocitrulina	0,88	0,75 - 1,03	0,13
1,3-dihidroxiacetona	1,25	0,24 - 6,46	0,79
2-hidroxiacetona	1,01	0,91 - 1,14	0,73

OR: Odds ratio, IC: Intervalo de confianza

* Regresión logística binaria

Los resultados de la regresión logística binaria señalan que ninguna de las variables metabólicas estudiadas presentó niveles de significación estadística, y por tanto se puede deducir que ningún metabolito tenía relación de forma independiente con el grado de Gleason en el cilindro HR-MAS.

5.4.6 Modelos con variables clínicas y perfil metabólico, capacidad de la metabolómica por HR-MAS para construir un modelo que permita valorar la agresividad del cáncer de próstata

A continuación, se comprobó si alguna variable clínica podía influir como predictora en el grado Gleason del cilindro HR-MAS. Se utilizaron las mismas variables que se venían utilizando sobre la patología prostática, intentado establecer la diferencia entre grupos. Los casos excluidos para el PCA y el PLS-DA seguían excluidos en este análisis.

En el análisis univariante se comprobó que los pacientes con Gleason 8 o mayor en el cilindro HR-MAS tenían una media de edad más alta, además de un mayor porcentaje de casos con tacto rectal sospechoso y con ecografía sugestiva de

Resultados

malignidad (tabla 28). Otras variables como el IMC, el PSA y su fracción de densidad de PSA, también tenían tendencia a diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, aunque sin alcanzarlas. Estas variables con diferencias entre grupos o con tendencia a las diferencias se incluyeron para el análisis multivariante.

Tabla 28. Análisis univariante. Diferencias entre características clínicas de los dos grupos a estudio (casos Gleason 6-7 frente a Gleason 8 o mayor en el cilindro HR-MAS).

VARIABLE	GLEASON 6-7	GLEASON 8 O MAYOR	p-valor
EDAD en años(media +/- DE)	63,33 +/- 8,77	72,60 +/- 9,35	0,03*
IMC	34,05 +/- 4,97	29,56 +/- 5,39	0,19*
PSA en ng/mL (mediana, intervalo)	10 (4-66)	21 (4-1446)	0,11^
Densidad de PSA (mediana, intervalo)	0,33 (0,06-1,78)	0,60 (0,16-3,90)	0,21 ^
Cociente de PSA	0,11 +/- 0,08	0,09 +/- 0,04	0,30*
Vol prostático en cc (media +/- DE)	37,03 +/- 22,84	38,26 +/- 24,23	0,99*
Tacto rectal sospechoso (n (%))	2 (18,2%)	13 (86,7%)	< 0,001 ⁺
Sospecha en ecografía (n (%))	6 (54,5%)	14 (93,3%)	0,02 ⁺

DE: Desviación estándar, IMC: Índice de masa corporal, DE: Desviación estándar, PSA: Antígeno prostático específico, Vol: Volumen

* U de Mann-Whitney ^Prueba de la mediana ⁺Chi-cuadrado

Tabla 29. Análisis multivariante. Regresión logística binaria incluyendo las variables clínicas con tendencia a diferencias estadísticamente significativas en el análisis univariante previo (casos Gleason 6-7 frente a Gleason 8 o mayor en el cilindro HR-MAS).

VARIABLE	OR	IC- 95%	p
Edad	1,46	0,87 - 2,44	0,14*
IMC	0,82	0,53 - 1,28	0,40*
PSA	1,15	0,87 - 1,53	0,30*
Densidad de PSA	1,12	0,95 - 1,25	0,40*
Tacto rectal sospechoso	2,6	1,83 - 6,69	0,01*
Ecografía sospechosa	1,25	1,05 - 6,86	0,88*

OR: Odds ratio, IC: Intervalo de confianza, IMC: Índice de masa corporal, PSA: Antígeno prostático específico

* Regresión logística binaria

En el análisis multivariante se comprobó que sólo el tacto rectal sospechoso quedaba dentro del modelo, relacionándose de forma independiente con el hecho de tener un Gleason 8 o mayor en el cilindro HR-MAS (tabla 29). El amplio intervalo de

confianza que aparece en esta variable en la regresión, puede deberse, como se comentó anteriormente, al relativo pequeño tamaño de la muestra en los dos grupos a estudio.

También se procedió a realizar un análisis multivariante incluyendo los metabolitos más influyentes del PLS-DA, y la variable clínica más influyente (tacto rectal sospechoso). Este análisis se muestra en la tabla 30.

Tabla 30. Análisis multivariante. Regresión logística binaria incluyendo variables clínicas y metabolitos (casos Gleason 6-7 frente a Gleason 8 o mayor en el cilindro HR-MAS).

METABOLITO	OR	IC- 95%	p-valor*
Glutamato	0,91	0,82 - 1,02	0,14
Trans-aconitato	0,29	0,01 - 5,42	0,40
Carnitina	1,22	0,95 - 1,56	0,11
Creatinina	2,38	0,47 - 12,02	0,29
Histidina	3,51	0,68 - 18,05	0,13
Homocitrulina	0,88	0,75 - 1,03	0,13
1,3-dihidroxiacetona	1,25	0,24 - 6,46	0,79
2-hidroxibutirato	1,01	0,91 - 1,14	0,73
Tacto rectal sospechoso	2,3	1,06 - 2,7	0,02

OR: Odds ratio, IC: Intervalo de confianza, PSA: Antígeno prostático específico

* Regresión logística binaria

En el análisis multivariante ningún metabolito quedó dentro del modelo, ya que ninguno alcanzó una significación con $p < 0,05$. Algunos como la carnitina, la histidina o la homocitrulina quedaron cerca, y tal vez con una muestra mayor se habría alcanzado una $p < 0,05$. El tacto rectal sí se mantuvo dentro del modelo, con $p = 0,02$.

También se compararon las tres curvas ROC, aquella obtenida con los metabolitos con mayor VIP score en el PLS-DA, otra con las variables clínicas, y otra que incluía los metabolitos más las variables clínicas (figura 36).

Resultados

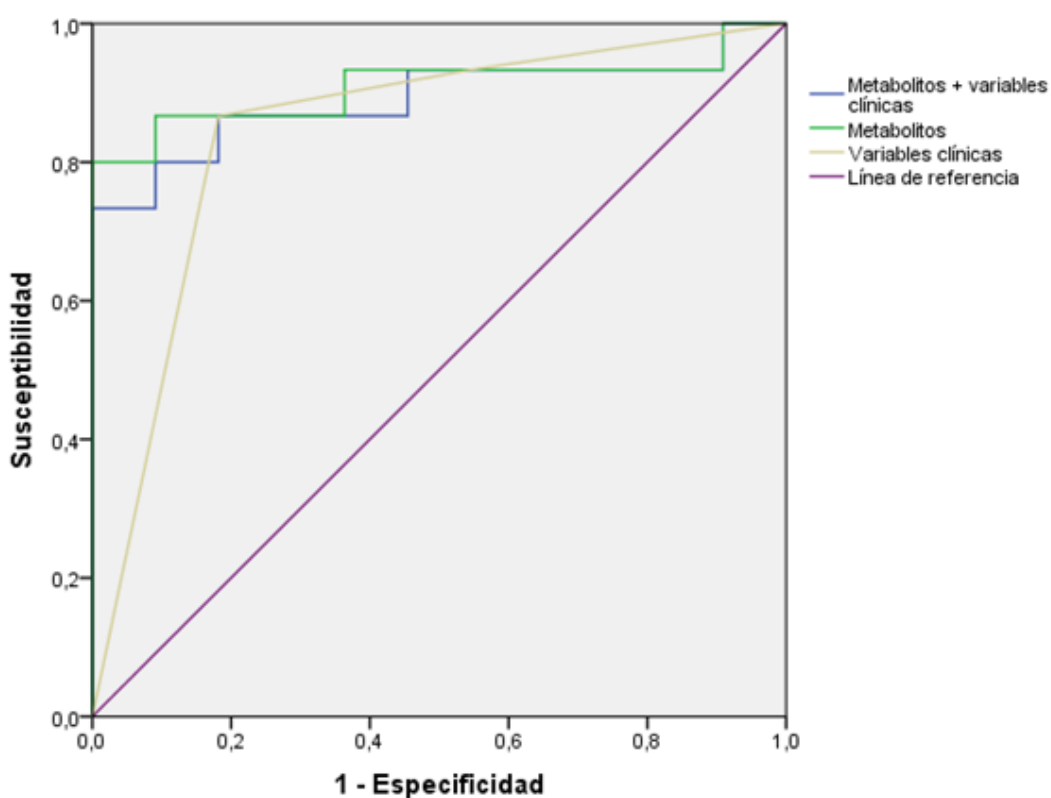


Figura 36. Curvas ROC obtenidas para los diferentes modelos multivariantes ensayados con el objetivo de construir un modelo que permita valorar la agresividad del cáncer de próstata.

La matriz de confusión de las 3 curvas se expone a continuación (tabla 31). En ella puede comprobarse que el área bajo la curva es ligeramente superior para los modelos con metabolitos, aunque con valores muy similares de sensibilidad, especificidad y valores predictivos.

Tabla 31. Resultados de las curvas ROC en los tres modelos calculados a partir de diferentes variables con el objetivo de construir un modelo que permita valorar la agresividad del cáncer de próstata.

MODELO	AUC	IC 95% AUC	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Variables clínicas	0,84	0,67 - 0,99	86%	82%	86%	81%
Metabolitos	0,89	0,75 - 0,99	87%	73%	82%	80%
Variables clínicas y metabolitos	0,90	0,78 - 0,96	87%	73%	82%	80%

AUC: Área bajo la curva, IC: Intervalo de confianza, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo

El área bajo la curva de las tres curvas se comparó, entre todas ellas y dos a dos. Comparando las tres curvas a la vez, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas, con $p=0,23$. En la comparación dos a dos, tampoco hubo diferencias significativas entre la curva de "Metabolitos + variables clínicas" y la de "Metabolitos", con $p=0,17$; ni entre "Metabolitos y variables clínicas" y la de "Variables clínicas", $p=0,69$. Entre la curva de "Metabolitos" y la de "Variables clínicas", el valor obtenido $p=0,56$ no mostraba significatividad en las diferencias.

En cuanto al tacto rectal sospechoso, se mostró como la única variable clínica influyente para predecir la presencia de Gleason 8 o más en el cilindro HR-MAS. El conjunto de metabolitos más influyentes en el PLS-DA arrojaron una curva ligeramente mejor que la formada por el tacto rectal, aunque sin diferencias estadísticas entre ellas y con resultados muy similares en cuanto a sensibilidad o especificidad.

5.5 CAPACIDAD DE LA METABOLÓMICA POR HR-MAS PARA CONSTRUIR UN MODELO QUE PERMITA VALORAR LA RECIDIVA BIOQUÍMICA EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA

Otro de los objetivos de esta tesis fue establecer si, mediante el perfil metabólico del tejido prostático, podía establecerse un modelo predictor de recidivas bioquímicas.

5.5.1 Selección de la muestra: capacidad de la metabolómica por HR-MAS para construir un modelo que valore la recidiva bioquímica

De los 107 casos con tumor en la biopsia estándar o en el cilindro HR-MAS, 90 hombres recibieron algún tipo de tratamiento. La distribución de estos varones en función del tratamiento recibido puede observarse en la tabla 14.

De los casos que recibieron tratamiento, 16 tuvieron una recidiva bioquímica, con una media hasta la recidiva de $25,68 \pm 15,39$ meses, y una mediana de 25 (13-36) meses. Los otros 74 varones tratados, no habían tenido recidiva al final del periodo de seguimiento de este estudio.

Resultados

De los casos *outliers*, el paciente 41 no tuvo cáncer, por lo que no influyó para este análisis. Los casos 52 y 86 sí fueron varones enfermos, pero dada su característica de *outliers*, comentada previamente, fueron excluidos para el análisis. El caso 185, sin tumor en ninguna muestra, no influyó para el presente análisis de varones enfermos y tratados. De esta forma, quedaron incluidos para el análisis de este apartado 16 varones con recidiva bioquímica y 72 sin recidiva.

5.5.2 Análisis no supervisado: PCA, capacidad de la metabolómica por HR-MAS para construir un modelo que valore la recidiva bioquímica en pacientes tratados

A continuación, se muestra el PCA correspondiente a los dos grupos. Puede comprobarse que no existe una separación espontánea en la distribución de ambos. Los casos con recidiva, aunque se agrupan en su mayoría en los dos cuadrantes derechos, también lo hacen de forma heterogénea por todo el diagrama de puntos. Lo mismo sucede con los casos sin recidiva bioquímica.

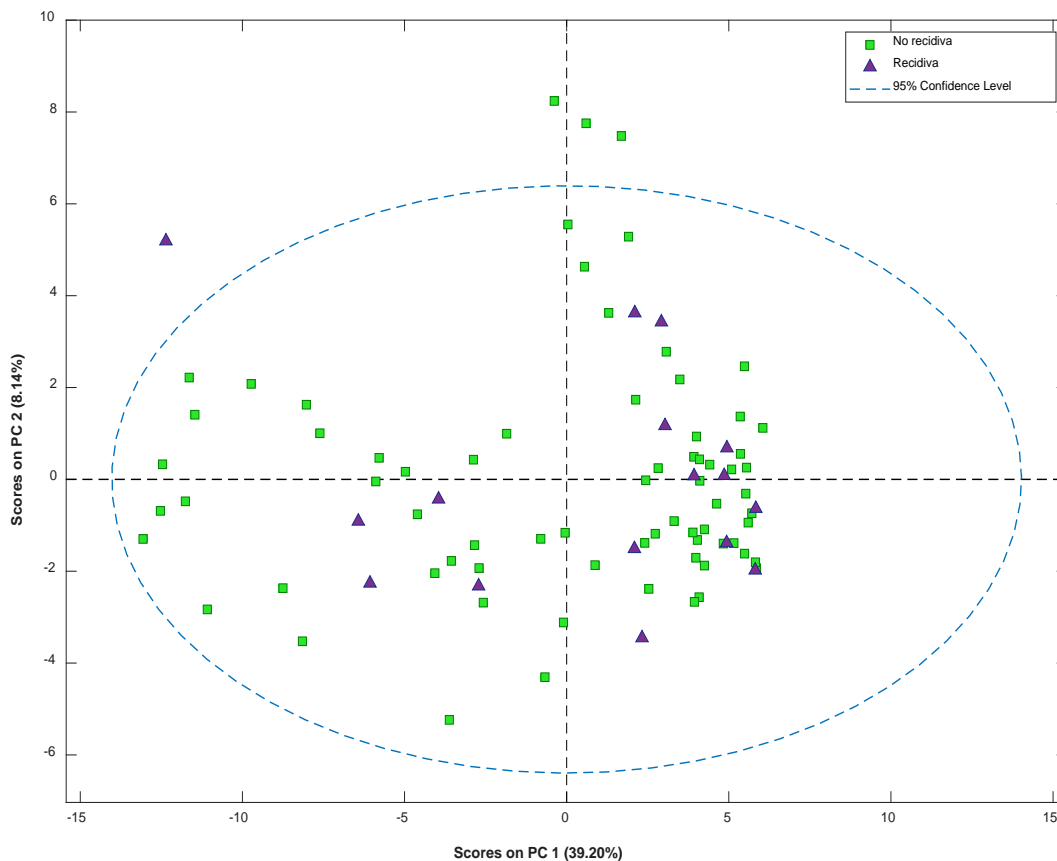


Figura 37. Diagrama de puntos obtenido del análisis PCA de los espectros de ^1H -HR-MAS PRESAT de las muestras de tejido prostático en casos con recidiva bioquímica (triángulos morados) y los casos sin recidiva bioquímica (cuadrados verdes), dentro de los pacientes diagnosticados de cáncer y que recibieron tratamiento.

5.5.3. Análisis supervisado: PLS-DA, capacidad de la metabolómica por HR-MAS para construir un modelo que valore la recidiva bioquímica en pacientes tratados

Para comprobar la diferente distribución en el diagrama según recidiva bioquímica, se realizó un análisis supervisado, preestableciendo los grupos y comprobando si de esta manera existía alguna tendencia de separación entre grupos. Se incluyeron los mismos casos que para el PCA. El diagrama de puntos se muestra en la figura 38. En él se observa que existe una cierta, aunque no marcada, separación entre grupos. Los casos con recidiva tienden a distribuirse en su mayoría en el cuadrante superior derecho, no obstante, algunos de ellos también ocupan espacios en otros cuadrantes.

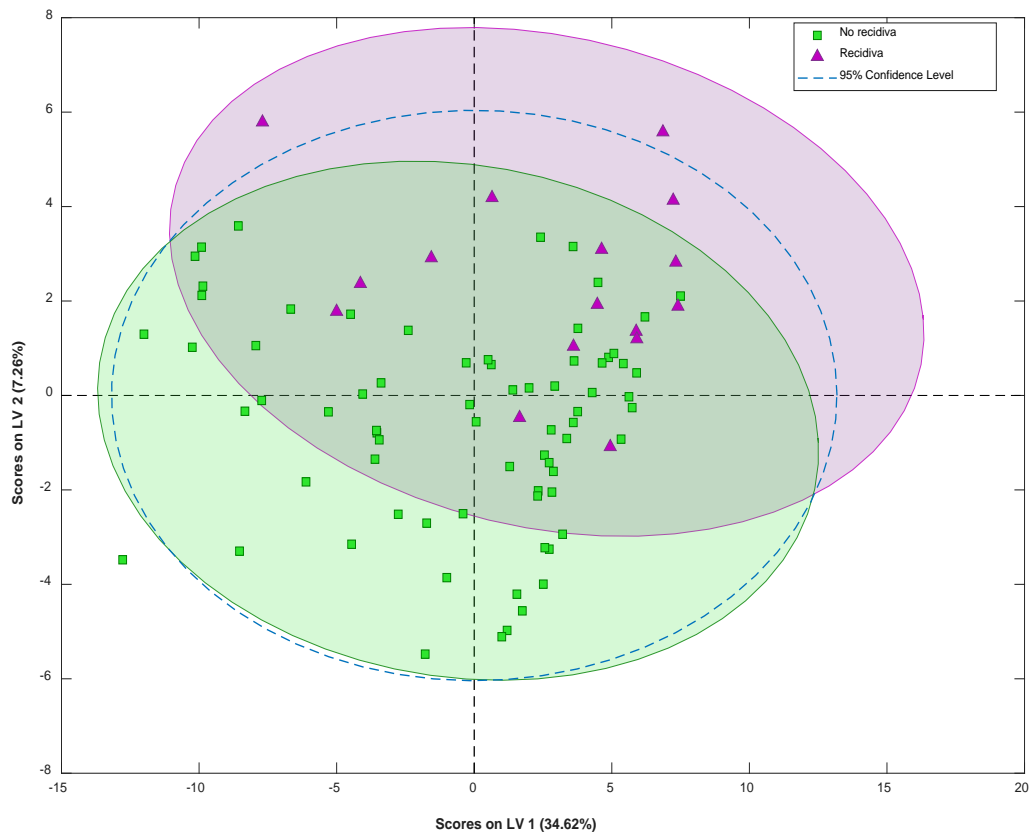


Figura 38. Diagrama de puntos obtenido del análisis PLS-DA de los espectros de ¹H-HR-MAS PRESAT de las muestras de tejido de próstata agrupadas como casos con recidiva bioquímica (triángulos morados) y los casos sin recidiva bioquímica (cuadrados verdes). Las elipses coloreadas representan el intervalo de confianza del 95% para ese grupo.

Además, los casos sin recidiva se distribuyen de manera heterogénea por toda la elipse que representa el intervalo de confianza al 95%. Así pues, en el PLS-DA se comprobó una cierta tendencia a la separación entre grupos, aunque existía una especie de "zona gris" donde se solapaban casos con y sin recidiva bioquímica. Tal vez, una mayor muestra en el grupo con recidiva, habría ayudado a saber si la separación se mostraba más llamativa, o si por el contrario más casos se distribuían en la "zona gris".

5.5.4. Validación cruzada: modelo metabólico que valore la recidiva bioquímica

Se procedió a evaluar el modelo derivado del PLS-DA que contribuía a la separación entre varones que, habiendo recibido tratamiento para el cáncer, habían o no desarrollado recidiva bioquímica durante el seguimiento.

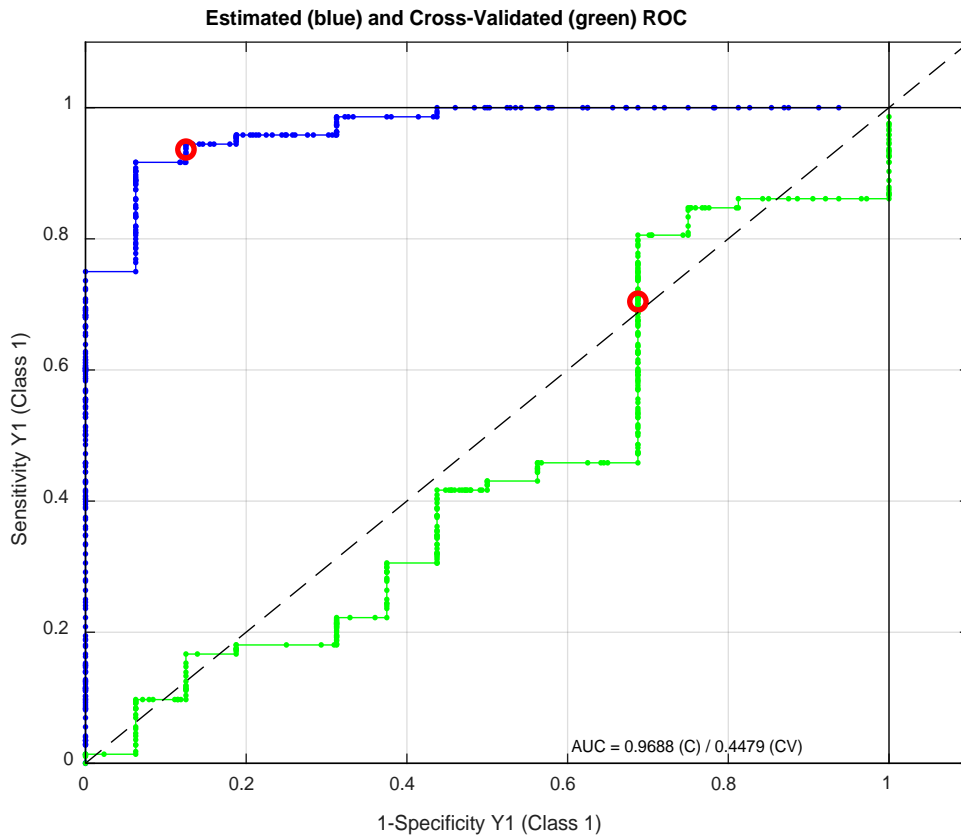


Figura 39. Curva ROC obtenida de la validación cruzada del modelo PLS-DA que discrimina entre casos con y sin recidiva bioquímica, dentro de los varones que recibieron algún tipo de tratamiento para el cáncer de próstata. La línea azul corresponde a los datos tratados y la línea verde, a la validación cruzada.

El resultado de la validación cruzada de los datos obtenidos del PLS-DA se muestra en la figura 39 con la curva ROC. Los resultados obtenidos muestran que la curva de validación cruzada (en color verde) presenta una diferencia respecto a la línea que corresponde a los datos estimados (azul). El valor del área bajo la curva fue de 0,45, clasificando a la curva ROC como mala. No se expone la matriz de confusión dado la mala predicción del modelo que traduce el valor del área bajo la curva.

5.5.5. Perfil metabólico y vías relacionadas con la recidiva bioquímica

Tabla 32. Metabolitos con VIP score por encima de 1 en tejido y las rutas metabólicas implicadas (estudio de recidivas bioquímicas con HR-MAS).

METABOLITO	RUTA METABÓLICA
O-fosfoetanolamina	Metabolismo de los ácidos grasos
Etanol	Metabolismo de la glicólisis
Succinato	Ciclo del ácido tricarboxílico
Ascorbato	Metabolismo de la glicólisis
Cisteína	Metabolismo de los aminoácidos
Etanolamina	Metabolismo de los ácidos grasos
Uridina	Metabolismo de las pirimidinas
Glicerol	Metabolismo de la glicólisis
Formato	Metabolismo de la microbiota intestinal
Glicina	Metabolismo de la glicina
1,3-dihidroxiacetona	Metabolismo de la glicólisis
Carnitina	Metabolismo de los aminoácidos
Lactato	Metabolismo de la glicólisis
Tirosina	Metabolismo de los aminoácidos
α -glucosa	Metabolismo de la glicólisis
Piruvato	Metabolismo del piruvato (pirimidinas)
Creatina	Metabolismo de los aminoácidos
Serina	Metabolismo de la serina
Ibuprofeno	Metabolismo glicerofosfolípido
Acetoína	Ciclo del ácido tricarboxílico
Sn-glicerol-3-fosfolina	Metabolismo glicerofosfolípido
Putrescina	Biosíntesis de poliaminas
Creatina fosfato	Metabolismo de los aminoácidos
Metionina	Metabolismo de los aminoácidos
Colina	Metabolismo glicerofosfolípido
Glucosa	Metabolismo de la glicólisis
Hipoxantina	Metabolismo de las purinas

Después de construir el modelo discriminante, se intentó establecer cuáles eran las regiones del espectro que más influían en el modelo, aunque en la validación cruzada se comprobó que éste no tenía buena capacidad predictiva. En el PLS-DA se comprobó una cierta tendencia a la separación entre grupos, aunque con una zona de solapamiento entre grupos. Con el presente análisis se pretendió establecer qué metabolitos o vías metabólicas contribuían de forma más significativa a la tendencia de separación en el PLS-DA. En la tabla 32 se muestran los metabolitos con VIP score por encima de 1 en el PLS-DA, y la ruta metabólica a la cual pertenecen. Los niveles promedios de estos metabolitos comparando el grupo con y sin recidiva bioquímica

pueden observarse en el anexo 4. En la figura 40 aparecen representadas las vías metabólicas más influyentes en este análisis.

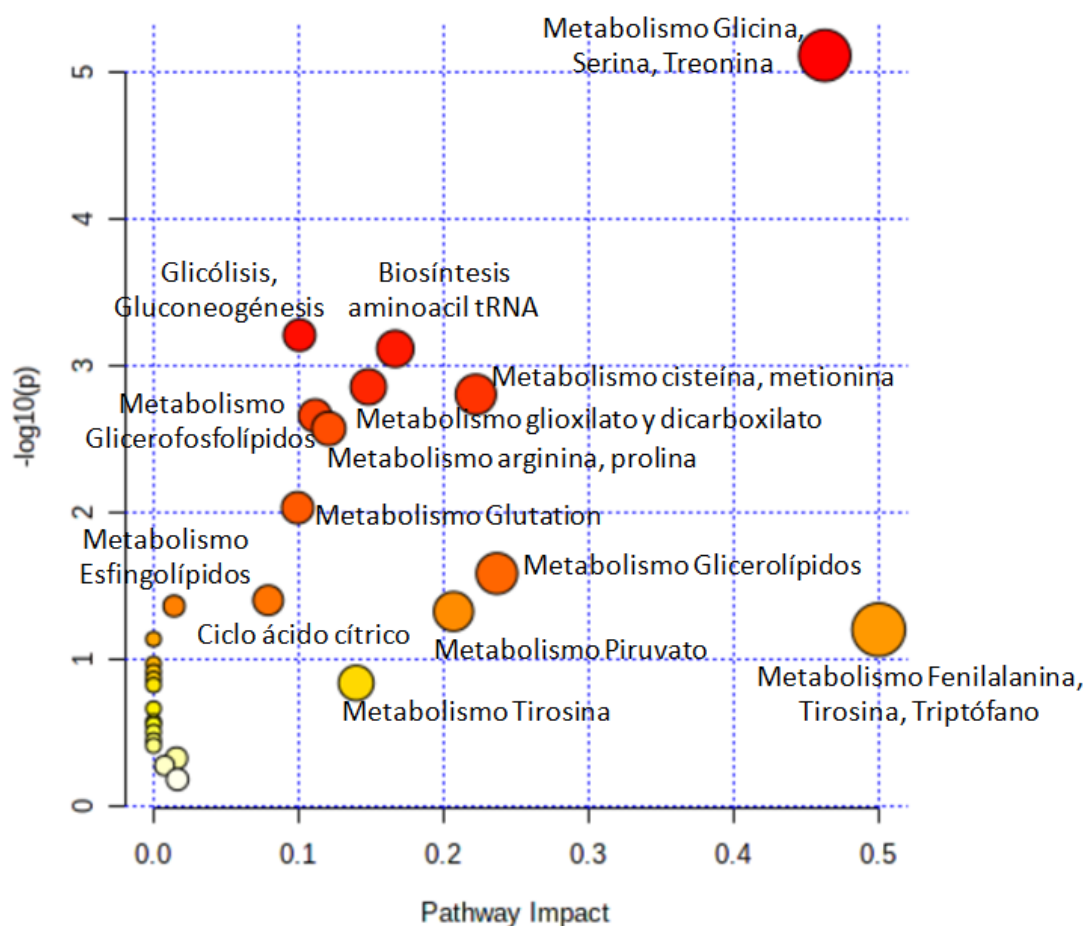


Figura 40. Análisis de las rutas metabólicas alteradas en muestras de tejido prostático (estudio de recidivas bioquímicas). El eje horizontal presenta los valores de impacto de la vía (basados en la centralidad de intermediación relativa), y el eje vertical los valores p respectivos (basados en la prueba hipergeométrica). El color y el tamaño de cada círculo indican su valor p y el valor de impacto de la vía, respectivamente.

Para intentar optimizar el modelo del PLS-DA, se intentaron seleccionar sólo los metabolitos más influyentes en el mismo, creando un modelo con aquellas moléculas que mostraban un VIP score mayor de 1,5. En la figura 41 se representa el valor del VIP score de cada uno de estos metabolitos seleccionados, un total de 9.

Resultados

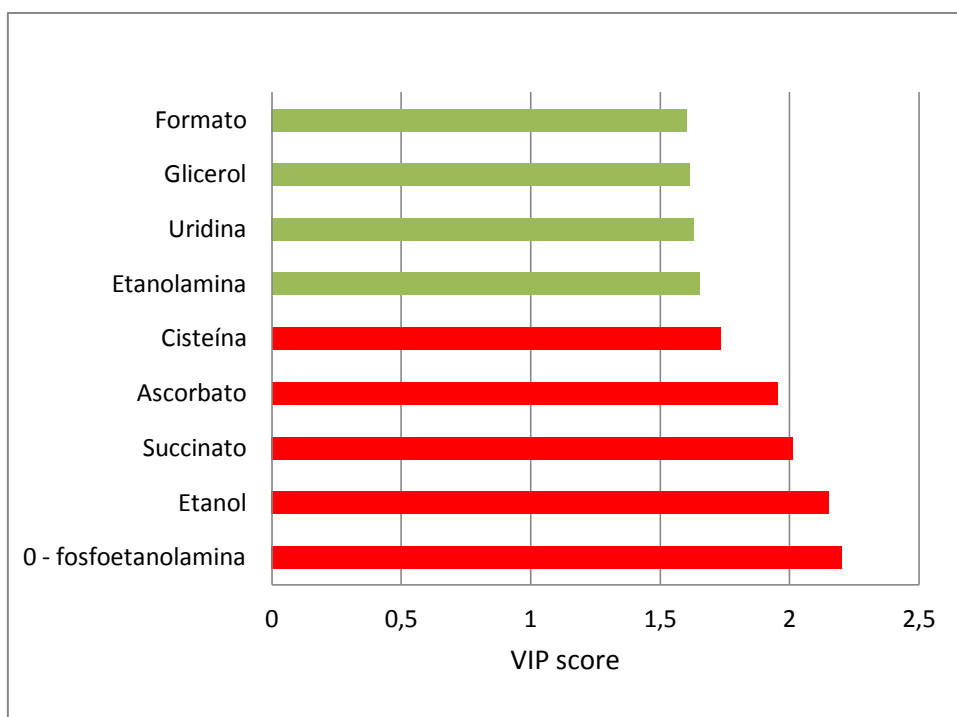


Figura 41. Valores VIP score de los metabolitos seleccionados con mayor contribución al modelo discriminatorio PLS-DA entre casos con y sin recidiva bioquímica según el perfil metabolómico del cilindro HR-MAS. El color de las barras indica la dirección del cambio metabólico en función de la recidiva bioquímica (verde= metabolitos con mayor concentración en casos sin recidiva, rojo= metabolitos con mayor concentración en casos con recidiva).

Por otra parte, se llevó a cabo un análisis comparativo entre medias de las integrales de los dos grupos, el cual se muestra en la tabla 33. Se hallaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles promedios de O-fosfoetanolamina, siendo mayor su concentración en los casos con recidiva bioquímica. Otros metabolitos como el etanol o el ascorbato también presentaban diferencias importantes entre ambos grupos, aunque sin alcanzar la significación estadística, tal vez por la alta variabilidad que muestran en los niveles promedios, como reflejan las desviaciones estándar de las muestras.

Tabla 33. Análisis univariante. Diferencias de niveles promedios entre los casos con y sin recidiva bioquímica durante el seguimiento.

METABOLITOS	CASOS CON RECIDIVA	CASOS SIN RECIDIVA	p-valor*
O-fosfoetanolamina	22,18 +/- 9,55	16,97 +/- 9,48	0,04
Etanol	9,58 +/- 4,44	8,30 +/- 5,61	0,17
Succinato	1,10 +/- 0,92	0,77 +/- 0,53	0,22
Ascorbato	8,86 +/- 3,84	6,97 +/- 4,22	0,08
Cisteína	8,68 +/- 5,74	6,52 +/- 5,93	0,25
Etanolamina	6,70 +/- 2,72	7,23 +/- 4,60	0,96
Uridina	4,54 +/- 3,72	6,01 +/- 5,26	0,27
Glicerol	19,69 +/- 9,36	24,57 +/- 24,24	0,92
Formato	0,26 +/- 0,12	0,32 +/- 0,26	0,77

Valores mostrados como media +/- desviación estándar

*Test U de Mann-Whitney

Posteriormente se llevó a cabo el análisis multivariante, donde volvieron a incluirse los metabolitos más influyentes en el modelo, que se muestra en la tabla 34. Así, a mayores niveles de ascorbato y de cisteína, mayor probabilidad de que el sujeto desarrolle una recidiva bioquímica. Por otra parte, los niveles bajos de uridina y glicerol también se relacionaron con una mayor probabilidad de tener una recidiva bioquímica tras tratamiento. Lo mismo sucedió con el formato, aunque con una OR muy baja, como se muestra en la tabla.

Tabla 34. Análisis multivariante. Regresión logística binaria incluyendo los metabolitos con mayor valor VIP score en el PLS-DA.

METABOLITO	OR	IC- 95%	p-valor*
O-fosfoetanolamina	1,09	0,98 - 1,22	0,10
Etanol	1,05	0,90 - 1,22	0,52
Succinato	3,66	0,69 - 19,40	0,12
Ascorbato	1,64	1,11 - 2,42	0,01
Cisteína	1,28	0,62 - 0,98	0,03
Etanolamina	1,17	0,88 - 1,55	0,27
Uridina	0,69	0,51 - 0,93	0,01
Glicerol	0,93	0,88 - 0,99	0,02
Formato	0,01	0,01 - 0,30	0,02

OR: Odds ratio, IC: Intervalo de confianza

* Regresión logística binaria

5.5.6. Modelos con variables clínicas y perfil metabólico, capacidad de la metabolómica por HR-MAS para predecir recidiva bioquímica

En la siguiente parte de este análisis se intentó comprobar qué variables clínicas podían influir en un modelo discriminatorio para diferenciar entre casos con y sin recidiva bioquímica. Se cogieron las variables que podían relacionarse con la patología prostática y se comprobó la diferencia entre grupos. Los casos no incluidos para el análisis metabólico, tanto PCA como PLS-DA expuestos previamente, seguían estando excluidos en este análisis.

En el análisis univariante se comprobó que el cociente de PSA, el tacto rectal sospechoso y la sospecha en ecografía tenían tendencia a la significación estadística, motivo por el cual se incluyeron en el análisis multivariante (tabla 35).

Tabla 35. Análisis univariante. Diferencias entre características clínicas de los dos grupos a estudio (casos con y sin recidiva bioquímica).

VARIABLE	RECIDIVA SÍ	RECIDIVA NO	P
EDAD en años(media +/- DE)	67,53 +/- 9,69	68,76 +/- 8,70	0,49*
IMC	29,78 +/- 4,15	29,16 +/- 4,50	0,46*
PSA en ng/mL (mediana, intervalo)	11,5 (7-1446)	9 (3-237)	0,78^
Densidad de PSA (mediana, intervalo)	0,35 (0,13-3,20)	0,26 (0,06-24,80)	0,95 ^
Cociente de PSA	0,10 +/- 0,08	0,12 +/- 0,06	0,20*
Vol prostático en cc (media +/- DE)	34,92 +/- 13,70	39,19 +/- 19,32	0,43*
Tacto rectal sospechoso (n (%))	9 (56,2%)	23 (32,9%)	< 0,08 ⁺
Sospecha en ecografía (n (%))	12 (75%)	42 (58,3%)	0,21 ⁺

DE: Desviación estándar, IMC: Índice de masa corporal, DE: Desviación estándar, IMC: Índice de masa corporal, PSA: Antígeno prostático específico, Vol: Volumen

* U de Mann-Whitney ^Prueba de la mediana ⁺Chi-cuadrado

En el análisis multivariante se observó que ninguna variable clínica era predictora de forma independiente con el hecho de desarrollar recidiva bioquímica (tabla 36).

Tabla 36. Análisis multivariante. Regresión logística binaria incluyendo las variables clínicas con tendencia a diferencias estadísticamente significativas en el análisis univariante previo (casos con y sin recidiva bioquímica).

VARIABLE	OR	IC- 95%	p-valor*
Cociente de PSA	0,05	0,01 - 263,43	0,49
Tacto rectal sospechoso	2,35	0,60 - 9,21	0,21
Sospecha en ecografía	1,14	0,24 - 5,24	0,86

OR: Odds ratio, IC: Intervalo de confianza

* Regresión logística binaria

Del mismo modo, se procedió a realizar un análisis multivariante incluyendo los metabolitos que tendían a ser más influyentes del modelo PLS-DA y las variables clínicas que aparecían con tendencia a la significación estadística en el análisis univariante (tabla 37). Aunque en la regresión logística sólo con las variables clínicas, ninguna presentó una $p < 0,05$, se aceptó que tal vez esto sucediera por la escasa muestra en el grupo de recidiva. A pesar de esto, se consideró interesante su inclusión en el modelo combinado de variables clínicas y metabolitos.

Tabla 37. Análisis multivariante. Regresión logística binaria incluyendo variables clínicas y metabolitos (casos con y sin recidiva bioquímica).

METABOLITO	OR	IC- 95%	p-valor*
O-fosfoetanolamina	1,11	0,98 - 1,26	0,09
Etanol	1,05	0,89 - 1,23	0,55
Succinato	5,29	0,80 - 34,76	0,08
Ascorbato	1,80	1,17 - 2,76	0,007
Cisteína	1,26	0,57 - 0,97	0,03
Etanolamina	1,24	0,91 - 1,68	0,16
Uridina	0,63	0,44 - 0,91	0,01
Glicerol	0,91	0,85 - 0,98	0,02
Formato	0,01	0,01 - 0,21	0,01
Cociente de PSA	0,01	0 - 21,20	0,25
Tacto rectal sospechoso	2,82	0,36 - 21,96	0,32
Sospecha en ecografía	0,28	0,03 - 2,55	0,26

OR: Odds ratio, IC: Intervalo de confianza, PSA: Antígeno prostático específico

* Regresión logística binaria

En la regresión logística se muestra que permanecen dentro del modelo de forma estadísticamente significativa los mismos metabolitos que en el caso del

Resultados

multivariante sólo con metabolitos: el ascorbato, la cisteína, la uridina, el glicerol y el formato. Ninguna de las tres variables clínicas tenía relación estadísticamente significativa con la variable dependiente, recidiva bioquímica.

A continuación, se procedió a calcular las curvas ROC de tres modelos predictores distintos: sólo con metabolitos, sólo con variables clínicas y el que combinaba variables clínicas y metabolitos. El área bajo la curva correspondiente al modelo optimizado, formado sólo por metabolitos con VIP score alto, es mejor que la derivada del PLS-DA. Los resultados pueden observarse en la figura 42 y en la tabla 38.

Tabla 38. Resultados de las curvas ROC en los tres modelos calculados.

MODELO	AUC	IC 95% - AUC	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
VARIABLES CLÍNICAS	0,66	0,52 - 0,80	10%	80%	20%	70%
METABOLITOS	0,87	0,79 - 0,95	25%	93%	44%	84%
VARIABLES CLÍNICAS Y METABOLITOS	0,88	0,80 - 0,96	50%	91%	57%	88%

AUC: Área bajo la curva, IC: Intervalo de confianza, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo

En la tabla se observa que las variables clínicas son poco útiles para predecir la recidiva bioquímica. Sin embargo, los metabolitos seleccionados tras la optimización del PLS-DA, arrojan buenos valores de especificidad y valor predictivo negativo, pudiendo ser relevantes para localizar a los casos sin recidiva. Sin embargo, la sensibilidad y valores predictivos de los modelos creados a partir de la metabolómica, resultaron ser subóptimos, por lo que no puede afirmarse una buena capacidad de los mismos para clasificar de forma correcta los casos con recidiva. También se compararon las curvas ROC, todas entre sí y dos a dos. Así pues, al comparar el AUC de las tres curvas, se hallaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,02$). Al hacer comparaciones dos a dos, el área bajo la curva de "Metabolitos + variables clínicas" tenía diferencias significativas con el área de "Variables clínicas" ($p=0,006$), pero no con la de "Metabolitos" ($p=0,59$). Del mismo modo, entre la curva de "Metabolitos" y la de "Variables clínicas", también se hallaron diferencias ($p=0,01$).

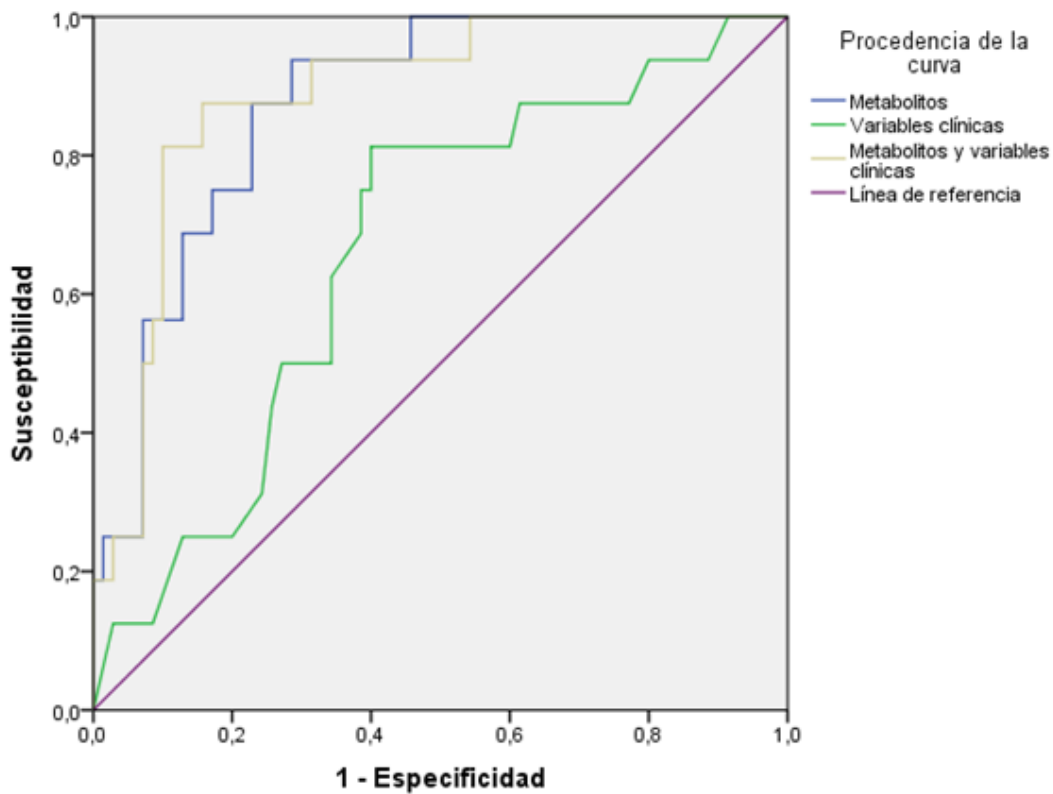


Figura 42. Curvas ROC obtenidas de los diferentes modelos multivariantes construidos para la predicción de recidiva bioquímica.

Así pues, se comprobó que, para predecir los casos de recidiva bioquímica, tenían buena área bajo la curva los modelos que incluyen a los metabolitos más influyentes en el PLS-DA, mientras que, en este contexto, las variables clínicas no tienen papel predictor. Además, los modelos sólo con metabolitos y aquel con metabolitos y variables clínicas, tuvieron casi idéntica área bajo la curva (0,87 y 0,88 respectivamente), y similar representación gráfica de la curva.

5.6 CAPACIDAD DE DIAGNOSTICAR CÁNCER DE PRÓSTATA MEDIANTE PERFIL METABOLÓMICO EN ORINA

Como se comprobó previamente, la metabolómica mediante HR-MAS es capaz de establecer un perfil metabólico específico y un modelo discriminante para distinguir aquellos casos con cáncer en la muestra tisular con respecto a aquellos casos sin tumor. Con el PLS-DA se obtuvo un modelo con un área bajo la curva ROC de 0,87, similar a la curva derivada de los metabolitos más influyentes junto con las variables clínicas. Además, metabolitos como el citrato, el glicerol-3-fosfolina, la glicina, carnitina o la 0-fosfolina, se mostraron como metabolitos con peso en el modelo discriminatorio para distinguir cáncer de próstata en el tejido medido por HR-MAS.

No obstante, para obtener una muestra tisular de próstata debemos llevar a cabo un método invasivo, como es la biopsia transrectal explicada previamente en esta tesis. Una vez establecida la capacidad discriminatoria de la metabolómica en tejido prostático canceroso, sería interesante conocer si, con un método menos invasivo, la metabolómica también es capaz de establecer perfiles metabólicos y modelos específicos de cáncer de próstata. De esta forma, podría valorarse ese método poco invasivo como herramienta útil para el diagnóstico de la enfermedad.

Así pues, el planteamiento fue utilizar la orina como muestra para obtener biomarcadores de cáncer de próstata, utilizando RMN para hallar perfiles metabólicos diferenciales. La orina es un maremágnum de metabolitos, los cuales se encuentran en diferentes cantidades en función de muchos factores, como por ejemplo la alimentación, la toma de fármacos o las características genéticas del individuo. Para intentar conseguir muestras de orina que recogiesen líquido prostático, se decidió llevar a cabo un masaje transrectal previo a la micción espontánea, como ya se explicó en el apartado de material y métodos. A pesar de lo incómodo de la exploración, este método sigue siendo mucho menos agresivo que una biopsia, por lo que se consideró óptimo como método no invasivo. En caso de conseguir un modelo discriminatorio de cáncer con el estudio metabolómico de la orina, podría intentar establecerse como una herramienta diagnóstica no invasiva del cáncer de próstata.

En el punto 5.2.5 se expusieron las rutas metabólicas implicadas con el cáncer de próstata según nuestros resultados. Observamos perturbaciones en el metabolismo de aminoácidos, glucosa, metabolismo glicerofosfolípido y del glioxilato carboxilato así como en el ciclo TCA y en la biosíntesis de aminoacil tRNA. En orina se intentaría concluir si existen metabolitos de estas vías que ayudasen a discriminar entre diferentes grupos, en función del objetivo perseguido en cada subanálisis.

5.6.1 Análisis y asignación de espectros

El estudio incluyó el análisis por RMN de 201 muestras de orina obtenidas por micción espontánea tras masaje prostático. En este análisis, el paciente 185 (excluido de todos los análisis con HR-MAS debido a la mala relación señal/ruido y a la mala calidad de la resolución de la multiplicidad de las señales) se incluyó para los estudios en orina, pues en la medición de la muestra de orina no se produjeron los problemas que existieron con el tejido. Se trataba de un varón sin cáncer en el estudio histológico de las muestras biopsiadas, y como tal fue clasificado en los siguientes resultados.

En el caso del análisis de la orina, fue el paciente 149 el que no pudo incluirse, ya que la muestra presentó un espectro de RMN artefactado y de baja calidad. Se trataba de un varón sin neoplasia, ni el cilindro HR-MAS ni en la biopsia estándar. Siendo considerado dentro del grupo de sanos, no se contó con su perfil metabólico para el cálculo de los modelos en orina.

En este bloque de análisis en orina, no importó la discordancia entre la histología del cilindro HR-MAS y la de la biopsia estándar. Como se aceptó que la orina recogía el estado patológico o no de cada paciente, independientemente del cilindro donde se encontrase el tumor, en caso de tumor en cualquiera de las muestras (cilindro HR-MAS o biopsia estándar), se etiquetó al paciente como enfermo. Así pues, se recogieron un total de 107 casos enfermos y 93 casos sanos para este análisis.

Resultados

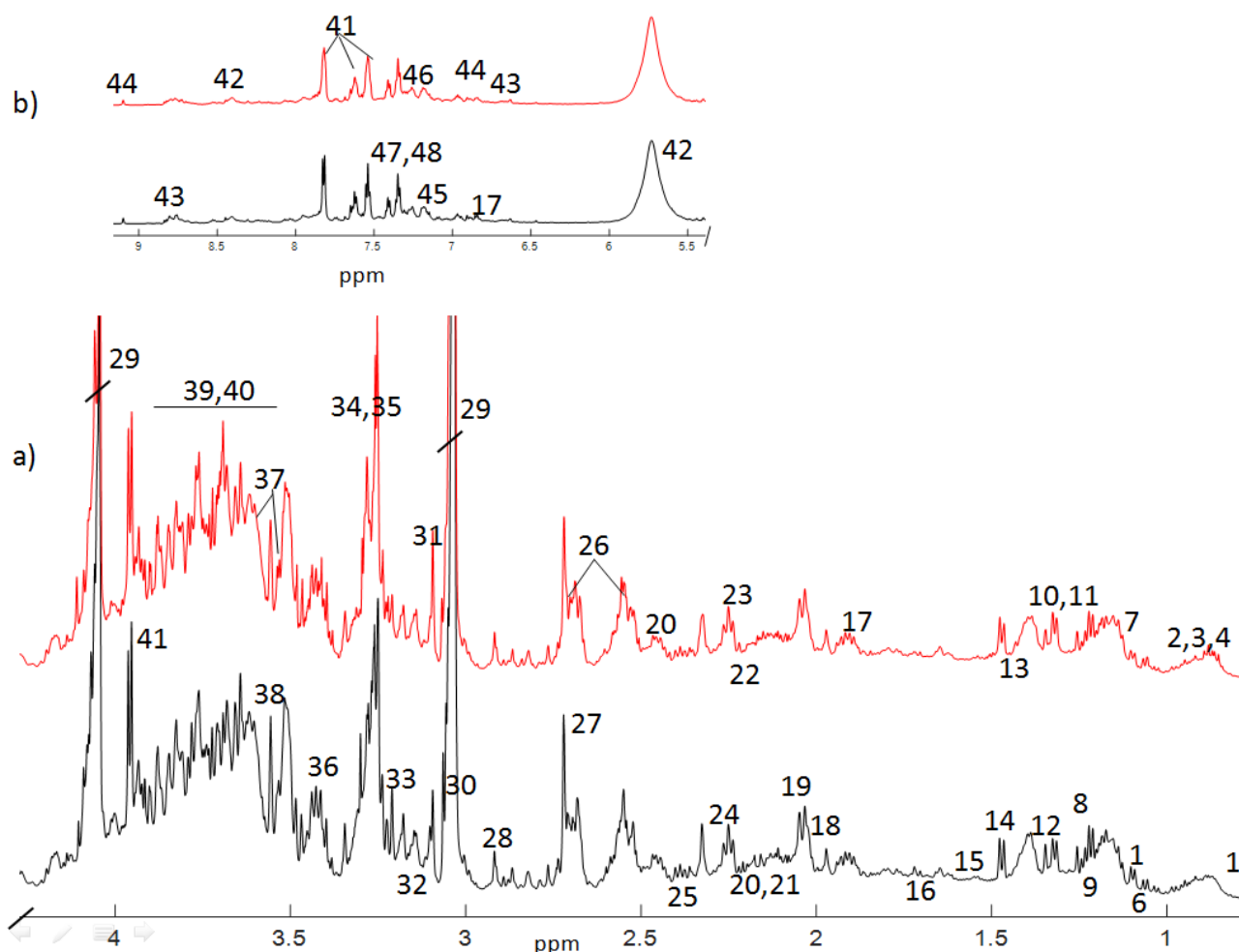


Figura 43. Asignación de las señales más representativas en un espectro ^1H -RMN

PRESAT, adquirido a 600MHz, para una muestra de orina de un sujeto sano (negro) y con tumor (rojo) de próstata en el momento del diagnóstico, medida a 310K. a) Región alifática del espectro ($\delta=0.5\text{-}4.5$ ppm) y b) región aromática ($\delta=5.50\text{-}9.50$ ppm). Asignación de algunos de los picos más intensos del espectro: 1,3-metil-2-oxovalerato; 2, isoleucina; 3, leucina; 4, valina; 5, isobutirato; 6, metilsuccinato; 7, hidroxibutirato; 8, fucosa; 9, metilmalonato; 10, treonina; 11, lactato; 12, 2-hidroxibutirato; 13, 2-fenilpropionato; 14, alanina; 15, arginina; 16, lisina; 17, N-acetilserotonina; 18, acetate; 19, prolina; 20, glutamina; 21, glutamato; 22, O-acetilcarnitina; 23, acetoin; 24, acetoacetate; 25, succinato; 26, citrato; 27, sarcosina; 28, N-metilhidantoína; 29, creatinina; 30, cisteína; 31, cis-aconitato; 32, etanolamina; 33, O-fosfocolina; 34, betaína; 35, N-óxido de trimetilamina; 36, taurina; 37, mio-inositol; 38, glicina; 39, ribosa; 40, manitol; 41, hipurato; 42, urea; 43, 3-hidroxiquinurenina; 44, gentisato; 45, histidina; 46, indol-3-lactato; 47, fenilalanina; 48, fenilacetilglicina; 42, hipoxantina; 43, trigonelina; 44, formato.

De esta forma, se identificaron un total de 75 metabolitos. En la figura 43 se muestran los espectros promedio ^1H PRESAT de las muestras de orina, tanto para los pacientes sanos como para los pacientes con tumor de próstata. Cada señal o pico corresponde inequívocamente a un tipo de molécula o metabolito. Al igual que sucedía en el caso del HR-MAS, un metabolito puede presentar varias señales en diferentes

partes del espectro, una por cada grupo magnéticamente activo. El área contenida bajo cada pico es directamente proporcional a la concentración del metabolito en la muestra.

5.6.2. Análisis no supervisado: PCA, capacidad para diagnosticar cáncer de próstata mediante perfil metabólico en orina

Para el primer análisis que se llevó a cabo tras medir los espectros en orina, se aceptó como enfermo a cualquier varón con algún cilindro tumoral en cualquiera de las muestras recogidas (en la figura 10, los englobados dentro de las columnas biopsia - cilindro +, biopsia + cilindro -, biopsia + cilindro +). El resto de casos (biopsia - cilindro -), se aceptaron como casos sanos.

En primer lugar, se llevó a cabo un análisis no supervisado, para evaluar la agrupación espontánea de los dos grupos sin tener en cuenta la clasificación de los pacientes dentro de un grupo preestablecido. Como ya se ha comentado, el objetivo del análisis no supervisado (PCA) es detectar la presencia de *outliers*, justificando posteriormente su inclusión o exclusión en el estudio; y por otra parte comprobar la separación espontánea de los grupos, en este caso sanos y enfermos de cáncer.

Las muestras identificadas como *outliers* para los análisis en orina fueron la 16 (enfermo) y la 110 (sano). Para buscar una posible razón por la cual estas dos muestras se comportaron como *outliers*, se llevó a cabo una revisión de la historia clínica. Con ello se intentó encontrar alguna justificación a partir de las variables clínicas para entender esta distribución alejada del resto de casos de la muestra.

El paciente 16 fue biopsiado en 2015, con diagnóstico de adenocarcinoma de próstata Gleason 7 (3+4) en 2 de los 10 cilindros obtenidos en la biopsia estándar, mientras que en el cilindro HR-MAS no se hallaron células tumorales tras el estudio histológico. En el momento de la biopsia tenía un PSA de 9,4 ng/mL y un volumen prostático de 18,5 cc. Este varón fue intervenido de prostatectomía radical laparoscópica, siendo el resultado anatomopatológico de la pieza quirúrgica un adenocarcinoma Gleason 7 (4+3), afectando tanto a la zona central como a la

Resultados

periférica. Este paciente se mantuvo con un PSA indetectable durante el seguimiento posterior.

El paciente 110 fue biopsiado en 2016, con diagnóstico de ausencia de lesiones malignas en todos los cilindros obtenidos. El PSA el momento de la biopsia era de 13,32 ng/mL, y el volumen prostático de 30,07 cc. Aunque existía una zona sospechosa de tumor en la ecografía, el tacto rectal no resultaba sospechoso para malignidad. Durante el seguimiento no fue diagnosticado de cáncer de próstata.

De esta forma, tras revisar las historias clínicas se comprobó que no existía ninguna variable clínica que justificase el comportamiento de estos dos casos como *outliers*. No obstante, dado su comportamiento como muestras extremas, debían ser excluidas para los posteriores análisis en orina. Dado el claro comportamiento como *outliers*, en este caso se obvió la representación gráfica de las muestras extremas en el gráfico T^2 de Hotelling, como sí se hizo previamente en el análisis con las muestras medidas mediante HR-MAS.

Además de los dos *outliers*, también fue excluida para el análisis la muestra 149 que, como se dijo, no pudo ser cuantificada. De este modo, para comprobar la capacidad de la metabolómica para hallar perfiles en orina que diferencien entre casos enfermos y sanos, se contó con 106 casos enfermos, y 92 casos sanos.

En este análisis no supervisado, el diagrama de puntos (figura 44) muestra una ausencia de separación espontánea entre los dos grupos, con zonas solapadas. Puede comprobarse que tanto los enfermos como los sanos se distribuyen de forma heterogénea en los cuatro cuadrantes.

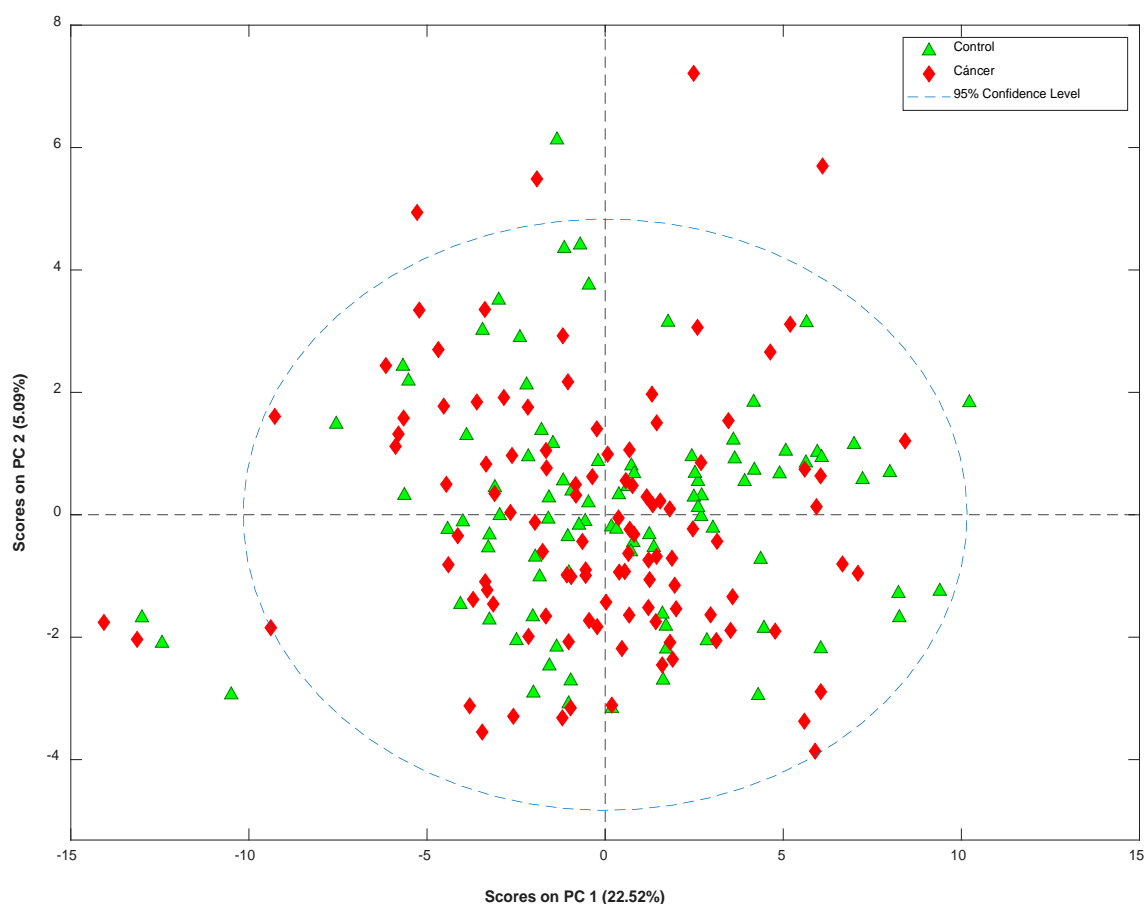


Figura 44. Diagrama de puntos obtenido del análisis PCA de los espectros de ^1H PRESAT de las muestras de orina para los casos enfermos y sanos. Los triángulos verdes representan los casos sanos, y los rombos rojos los casos enfermos. Puede observarse que no existe una agrupación espontánea de los dos grupos.

5.6.3. Análisis supervisado: PLS-DA, capacidad para diagnosticar cáncer de próstata mediante perfil metabólico en orina

A pesar de que con el PCA no se observó ninguna distribución espontánea diferente entre los dos grupos, se calculó un modelo PLS-DA para comprobar si al asignar a cada muestra la pertenencia a uno u otro grupo, se podía forzar la separación de las muestras. Para este análisis seguían excluidas las muestras anteriormente citadas, 16, 110 y 149. El diagrama de puntos correspondiente con el PLS-DA se observa en la figura 45.

Resultados

Puede comprobarse en la figura cierta tendencia a la separación de las muestras, ocupando muchos casos sanos el cuadrante inferior izquierdo y muchos casos enfermos el cuadrante superior derecho. A pesar de todo, existe una zona de solapamiento importante en el centro del diagrama, donde coinciden casos de ambos grupos.

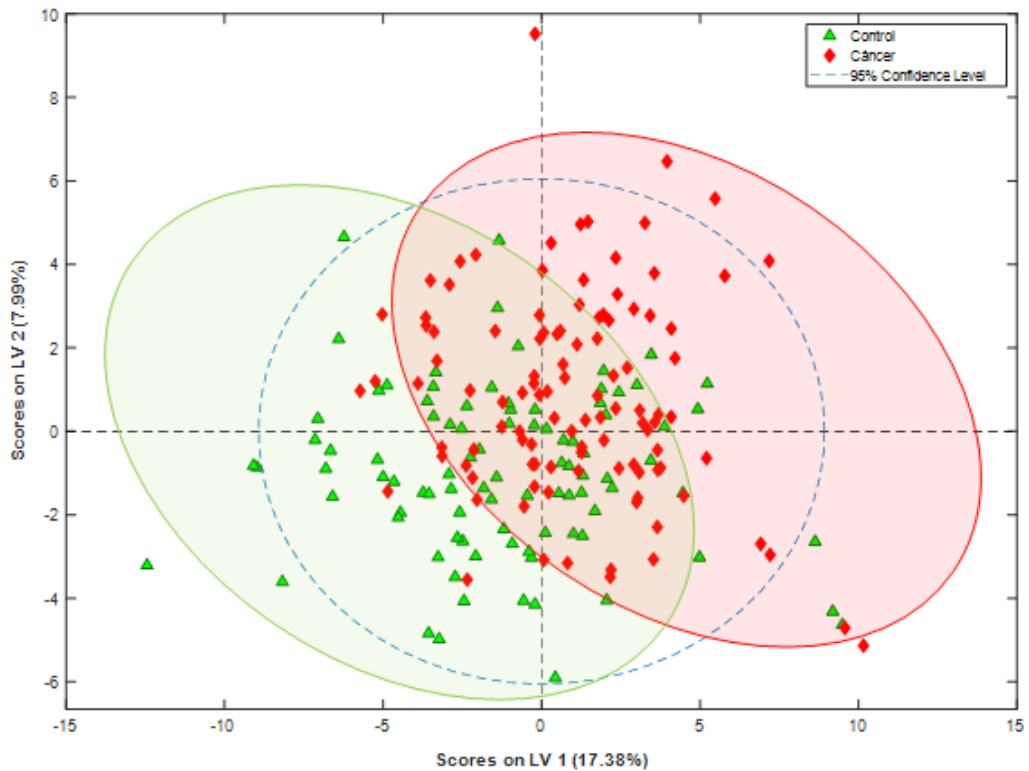


Figura 45. Análisis en orina. Diagrama de puntos del PLS-DA, casos enfermos y sanos. Los triángulos verdes representan los casos sanos y los rombos rojos los casos enfermos. Las elipses se han proyectado para visualizar mejor la distribución de las muestras, pero no tienen ningún significado estadístico.

Como se comprueba observando el diagrama de puntos, el modelo derivado del PLS-DA no es bueno para discriminar entre enfermos y sanos en función del perfil metabólico en orina. Esto se corrobora al observar la curva ROC del modelo (figura 46). En ella se observa un área bajo la curva alrededor de 0,6, lo cual traduce que la capacidad del modelo para distinguir un caso entre enfermo o sano es aleatoria, y por lo tanto no tienen capacidad alguna para discriminar. En estos casos, es necesario un proceso de optimización del modelo, intentado ser más restrictivos a la hora de

seleccionar metabolitos útiles para comprobar la capacidad discriminatoria del modelo.

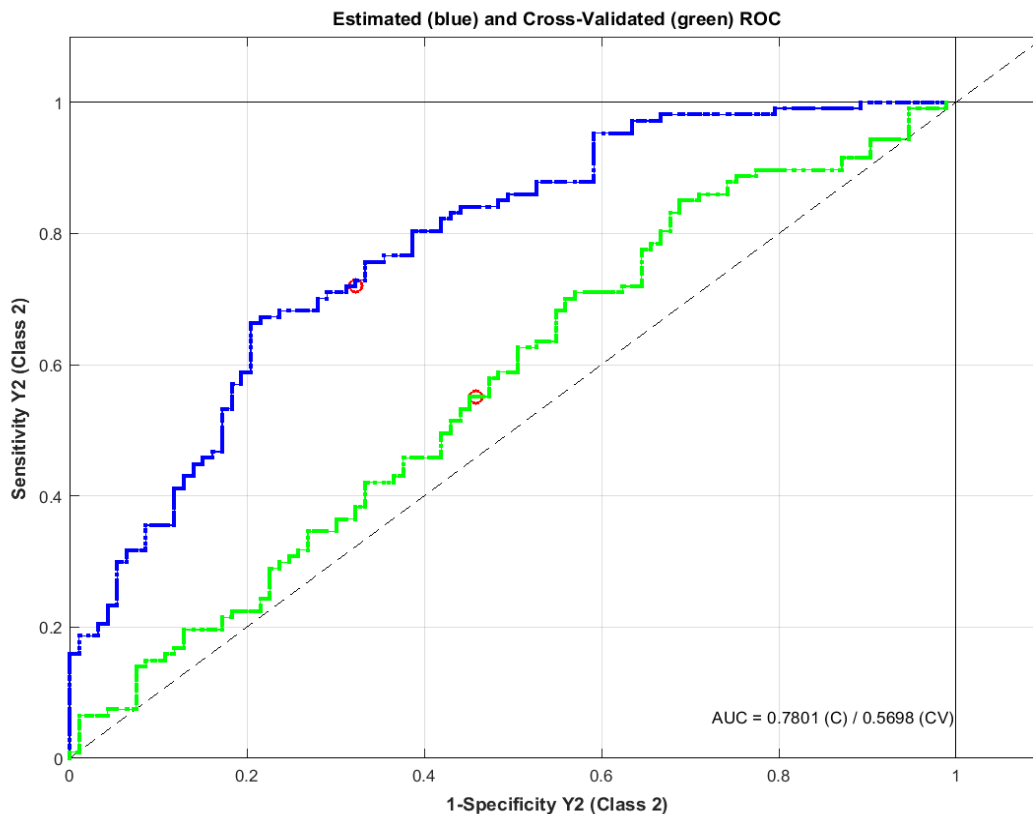


Figura 46. Curvas ROC obtenidas del modelo PLS-DA que discrimina entre enfermos y sanos según perfil metabólico en orina. La línea azul corresponde a los datos tratados y la línea verde, a la validación cruzada.

5.6.4 Optimización del modelo, capacidad para diagnosticar cáncer de próstata mediante perfil metabólico en orina

Con los datos obtenidos hasta el momento, se comprobó que los modelos obtenidos no eran capaces de distinguir entre hombres con y sin cáncer, en base a los metabolitos presentes en orina tras masaje prostático. Dado el buen modelo obtenido con sonda HR-MAS al medir el perfil metabólico en tejido, se intentó llevar a cabo una optimización del modelo en orina, estudiando sólo los metabolitos más influyentes en el PLS-DA. Para ello, fueron seleccionados todos los metabolitos con VIP score por encima de 1 en orina. Según nuestros resultados, un total de 28 moléculas cumplían con este criterio. La utilización de un gran número de metabolitos en estudios con biofluidos es un hecho frecuente, como se explicará en la discusión, ya que como se ha

Resultados

comentado la orina es el vehículo final donde desembocan elementos de un gran número de rutas metabólicas del organismo.

Aunque sólo 4 de estas moléculas coincidían con los metabolitos con VIP score por encima de 1 en tejido, se comprobó que todas ellas estaban relacionadas con las mismas rutas metabólicas que se vieron implicadas con la presencia de cáncer en el análisis en tejido. En el punto 5.9 de esta tesis se exponen de forma esquemática las rutas metabólicas implicadas con la presencia de tumor, tanto en tejido como en orina.

Tabla 39. Metabolitos con VIP score por encima de 1 en orina y las rutas metabólicas implicadas (estudio para distinguir enfermos y sanos). Se seleccionaron para lograr la optimización del modelo. En negro se muestran los metabolitos coincidentes con VIP score por encima de 1 en tejido.

METABOLITO	RUTA METABÓLICA
4 aminohipurato	Metabolismo de la glicina
Creatina fosfato	Metabolismo de aminoácidos
Trigonelina	Metabolismo del nicotinato y de la glicina
Colina	Metabolismo glicerofosfolípido
Cis-aconitato	Metabolismo del citrato (ciclo TCA)
Metilsuccinato	Ciclo TCA
Carnosina	Metabolismo aminoácidos
Lactato	Metabolismo de la glucosa
Piruvato	Metabolismo del piruvato (pirimidinas)
Arabinosa	Metabolismo de la glicólisis
Sucrosa	Metabolismo de la glicólisis
Isobutirato	Metabolismo de la serina
Metilmalonato	Metabolismo oxidativo de ácidos grasos
Ribosa	Metabolismo de la glicólisis
Treonina	Metabolismo de aminoácidos
Formato	Metabolismo de la microbioma intestinal
N-fenilacetilglicina	Metabolismo aminoácido (glicina, serina y treonina)
Quinurenina	Metabolismo de aminoácidos
Betaina	Metabolismo glicerofosfolípido
Manosa	Metabolismo de la glicólisis
2-furoilglicina	Metabolismo de aminoácidos
O-fosfocolina	Metabolismo glicerofosfolípido
Malonato	Ciclo TCA
Xantosina	Metabolismo de las purinas
Etanolamina	Metabolismo aminoácidos
2-hidroxitirato	Metabolismo de los ácidos grasos
Citrato	Ciclo TCA
3-hidroxiquinurenina	Metabolismo de aminoácidos

TCA: Ácido tricarbóxico

El hecho de que existan diferencias entre los metabolitos detectados en tejido y orina, aunque puedan participar en rutas metabólicas comunes, es lógico, ya que una misma molécula puede encontrarse en diferentes fases de un mismo ciclo según el medio en el que se encuentre, debido a ello sus concentraciones pueden variar entre el tejido y la orina, aunque realmente su presencia traduzca la implicación de un mismo ciclo o ruta metabólica. Se comprobó que las rutas metabólicas citadas en la tabla 39 eran las mismas que se establecieron en tejido durante en análisis con HR-MAS.

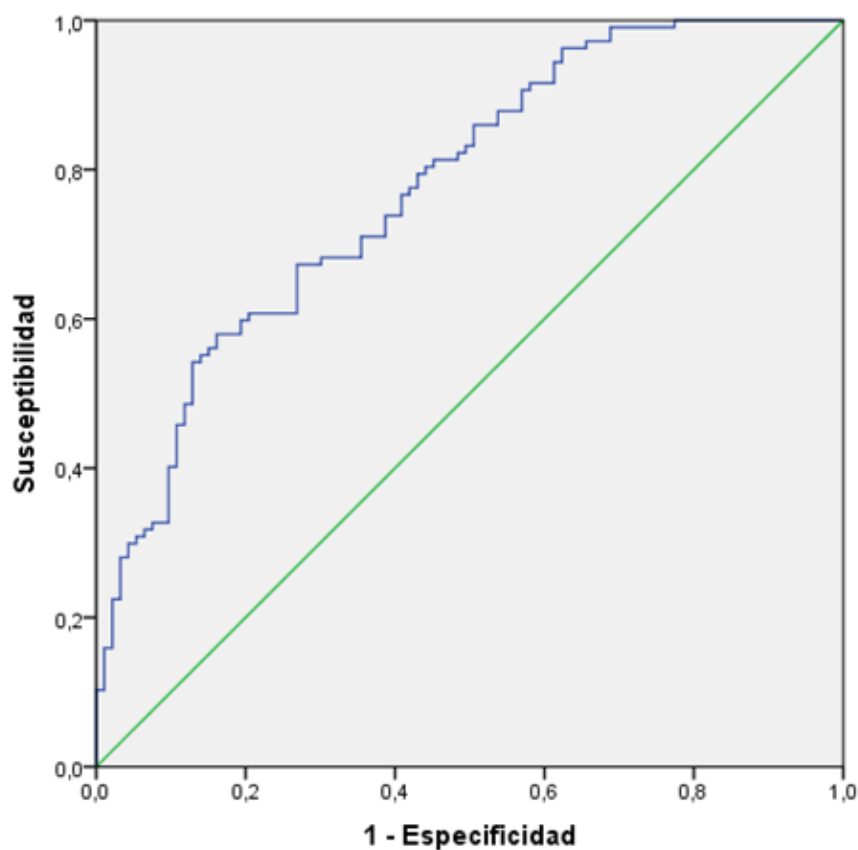


Figura 47. Curva ROC obtenida del modelo con los metabolitos en orina con VIP score por encima de 1 (curva azul), del análisis enfermos - sanos. En verde, la línea diagonal que divide el espacio ROC.

La curva ROC derivada del modelo con estos 28 metabolitos, se muestra en la figura 47. El área bajo la curva fue de 0,77, con una $p < 0,001$ y un intervalo de confianza al 95% de 0,71 - 0,83. La matriz de confusión del modelo se muestra en la tabla 40. Puede comprobarse una buena tasa de sensibilidad (72%) y una regular de especificidad (61%). Aunque estos primeros resultados tras la optimización eran

Resultados

esperanzadores, posteriormente se intentó mejorar el modelo con la adición de variables clínicas que influyeran en el diagnóstico de cáncer. Como ya se demostró en los análisis con HR-MAS, las variables clínicas tienen un papel importante en la localización de casos con cáncer.

Tabla 40. Matriz de confusión para el modelo derivado de los metabolitos en orina con VIP score por encima de 1 (análisis enfermos - sanos).

GRUPOS	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Enfermos	72%	61%	68%	57%

VPN: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo

5.6.5. Modelos con variables clínicas y perfil metabólico. Capacidad para diagnosticar cáncer de próstata mediante perfil metabólico en orina

Como se hizo previamente en otros análisis, nos dispusimos a establecer qué parámetros clínicos podrían influir de forma independiente en la clasificación como sanos o enfermos de la muestra. Los resultados, con los 3 pacientes excluidos del total de la muestra, se exponen a continuación (tabla 41).

Tabla 41. Análisis univariante. Diferencias entre las variables clínicas estudiadas (enfermos y sanos según histología de cilindro HR-MAS y de le biopsia estándar).

VARIABLE	ENFERMOS	SANOS	P
EDAD en años(media +/- DE)	68,72 +/- 8,49	65,22 +/- 6,66	0,003*
IMC	29,10 +/- 4,19	28,69 +/- 3,24	0,54*
PSA en ng/mL (mediana, intervalo)	10 (3-1446)	8 (4-67)	0,03^
Densidad de PSA (mediana, intervalo)	0,30 (0,06-24,8)	0,16 (0,04-1,83)	<0,001^
Cociente de PSA	0,11 +/- 0,06	0,15 +/- 0,07	<0,001*
Vol. prostático en cc (media +/- DE)	39,27 +/- 19,16	56,75 +/- 27,23	< 0,001*
Tacto rectal sospechoso (n (%))	43 (41,3%)	14 (15,9%)	< 0,001 [†]
Sospecha en ecografía (n (%))	68 (64,2%)	30 (32,6%)	< 0,001 [†]

DE: Desviación estándar, IMC: Índice de masa corporal, DE: Desviación estándar, IMC: Índice de masa corporal, PSA: Antígeno prostático específico, Vol.: Volumen

* U de Mann-Whitney ^Prueba de la mediana [†]Chi-cuadrado

Al igual que sucedió en el análisis HR-MAS, todas las variables, menos el IMC, tuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos, por lo que se procedió a calcular una regresión logística binaria con ellas (tabla 42). Finalmente, se comprobó que el volumen prostático con una OR de 0,97 y la sospecha tumoral por ecografía, con OR de 2,59, permanecían dentro del modelo con una $p < 0,05$. En el análisis con HR-MAS, el volumen prostático también se concluyó como variable influyente en el modelo discriminatorio. La diferencia es que, en el estudio con tejido, el tacto rectal también permaneció dentro del modelo, a diferencia del estudio en orina, donde fue la sospecha ecográfica.

Tabla 42. Análisis multivariante. Diferencias entre las variables clínicas estudiadas (enfermos y sanos según histología de cilindro HR-MAS y de le biopsia estándar).

VARIABLE	OR	IC- 95%	p
Edad	1,03	0,97 - 1,08	0,26*
PSA	1,01	0,97 - 1,04	0,61*
Densidad de PSA	1,17	0,45 - 3,01	0,74
Cociente de PSA	0,18	0,01 - 40,27	0,54*
Vol. prostático	0,97	0,95 - 0,99	0,005*
Tacto rectal sospechoso	1,40	0,46 - 4,24	0,54*
Sospecha en ecografía	2,59	1,02 - 6,55	0,04*

OR: Odds ratio, IC: Intervalo de confianza, PSA: Antígeno prostático específico, Vol: Volumen

* Regresión logística binaria

Posteriormente se calculó un modelo que incluyó a los 28 metabolitos derivados de la optimización del modelo en orina, y a las dos variables clínicas que se comprobaron como más influyentes en la predicción de cáncer. La curva ROC junto la evaluación de este modelo, del modelo sólo con variables clínicas y del modelo sólo metabolitos influyentes, se muestran a continuación (figura 48).

Resultados

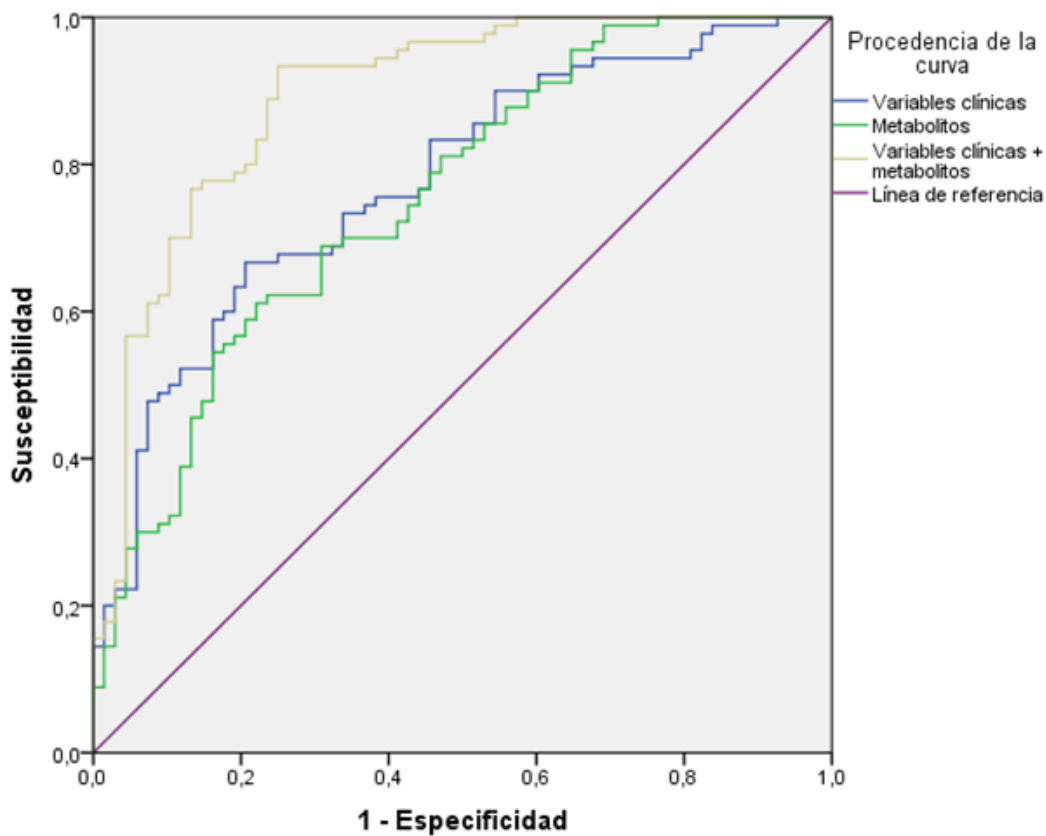


Figura 48. Curvas ROC obtenidas de los diferentes modelos multivariantes en orina para la detección de cáncer de próstata.

En la figura 48 se comprueba que las curvas sólo con metabolitos y sólo con variables clínicas eran muy similares, de hecho, no existía diferencia al comparar las áreas bajo la curva de las mismas con el comando *roccomp* ($p=0,64$). Sin embargo, al comparar la curva de "Metabolitos + variables clínicas" con cualquiera de las otras dos por separado, sí se demostraron diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,001$.

Añadir que en la tabla 43 puede observarse que el modelo con metabolitos y variables clínicas, presenta una sensibilidad del 89%, además de una tasa de verdaderos positivos y negativos del 82% y 83% respectivamente.

Tabla 43. Resultados de las curvas ROC en los tres modelos calculados.

MODELO	AUC	IC 95% - AUC	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Variables clínicas	0,77	0,70 - 0,84	73%	62%	71%	64%
Metabolitos	0,77	0,71 - 0,83	72%	61%	68%	57%
Variables clínicas y metabolitos	0,89	0,84 - 0,94	89%	75%	82%	83%

AUC: Área bajo la curva, IC: Intervalo de confianza, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo

5.7 CAPACIDAD PARA PREDECIR LA AGRESIVIDAD DEL CÁNCER DE PRÓSTATA MEDIANTE EL PERFIL METABÓLICO EN ORINA

En el apartado de HR-MAS ya se comprobó que la metabolómica aportaba un modelo que podía ayudar a predecir la existencia de tumores con Gleason 8 o mayores. A pesar de todo, el perfil metabólico en este contexto no era superior a la capacidad predictiva que podía tener, por ejemplo, la presencia de un tacto rectal sospechoso. Por lo tanto, los resultados, aunque prometedores, no arrojaban una superioridad de la metabolómica como herramienta útil para demostrar la existencia de tumores agresivos, en comparación con la exploración física. Como vimos en puntos anteriores, un conjunto numeroso de metabolitos en orina ha conseguido traducir la presencia de tumor con el estudio de los espectros metabólicos, por lo que, siguiendo la misma metodología, intentamos a continuación comprobar si también era posible predecir un Gleason alto con la huella metabólica en la orina.

5.7.1. Análisis no supervisado: PCA, capacidad para predecir la agresividad del cáncer de próstata mediante el perfil metabólico en orina

Para el presente análisis no supervisado, se mantuvieron fuera del mismo las mismas muestras que en punto anterior, por los mismos motivos (2 *outliers* y una muestra excluida). No obstante, el único caso relevante para este análisis fue el paciente 16, el cual tenía un Gleason 7 (3+4) en el estudio histológico de la biopsia

Resultados

estándar. Los casos 110 y 149 no presentaron tumor en ninguna de las muestras biopsiadas, por lo que no fueron relevantes para este apartado donde se comparan los Gleason.

Al igual que se hizo en el análisis con HR-MAS, para comparar casos menos agresivos con casos más agresivos de cáncer de próstata, se dividió a la muestra en casos con Gleason 6-7 frente a casos con Gleason 8 o mayor. Uno de los principales factores limitantes en el apartado con HR-MAS fue la escasa muestra, ya que no en todos los cilindros HR-MAS con tumor pudo especificarse el grado de Gleason, como ya se explicó. Debido a esto, la muestra utilizada en el estudio con HR-MAS no fue demasiado grande. Este problema fue menor en el caso de la orina, ya que en este contexto se aceptó el Gleason más alto que presentó el paciente en cualquiera de los cilindros biopsiados, ya fueran el cilindro HR-MAS o los cilindros de la biopsia estándar. Como se ha comentado, la orina traduce el estado metabólico de todo el sujeto, no depende de la medición del elemento estudiado como sucedía con el cilindro HR-MAS, motivo por el cual se aceptó el Gleason más alto. El hecho de tener una muestra más grande podría solucionar el posible sesgo de escasa muestra que, podía haber sido el motivo en el análisis HR-MAS de haber obtenido un modelo bueno, pero no mejor que el formado exclusivamente por el tacto rectal.

De esta forma, para el presente análisis se contó con un total de 72 casos con Gleason 6-7 y 34 casos con Gleason 8 o mayor. En el diagrama correspondiente al PCA puede comprobarse que no existe una disposición diferencial entre ambos grupos de manera espontánea (figura 49).

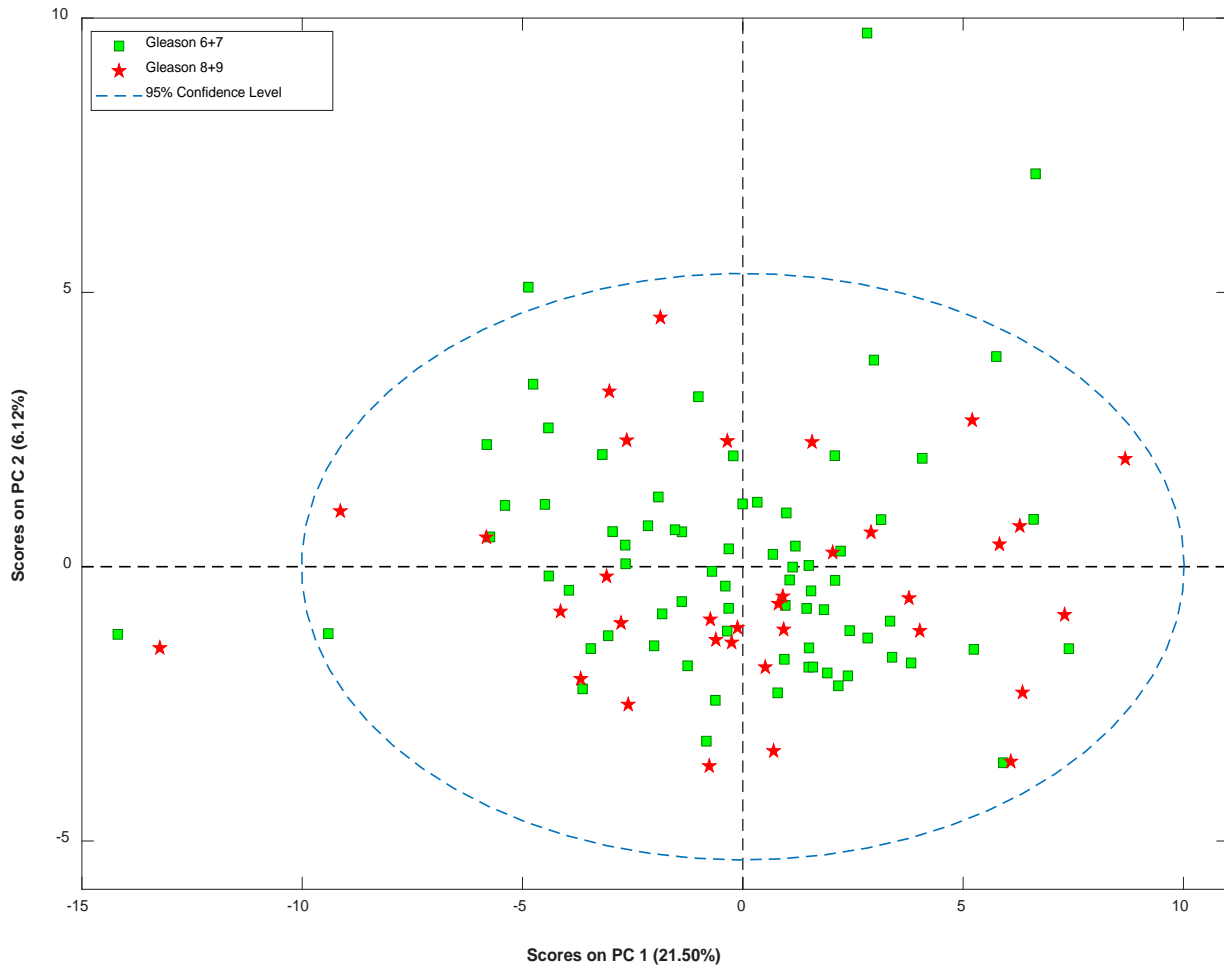


Figura 49. Diagrama de puntos obtenido del análisis PCA de los espectros de ^1H PRESAT de las muestras de orina para los casos con Gleason 6-7 frente a casos con Gleason 8 o mayor. Los cuadrados verdes representan los casos Gleason 6-7 y las estrellas rojas los casos con Gleason 8 o mayor. Puede observarse que no existe una agrupación espontánea de las dos muestras.

5.7.2. Análisis supervisado: PLS-DA, capacidad para predecir la agresividad del cáncer de próstata mediante el perfil metabólico en orina

A pesar de la falta de separación entre ambos grupos en el PCA, se procedió a calcular el PLS-DA, para comprobar si predeterminando la pertenencia a uno u otro grupo, se comprobaba separación entre ambos. En el diagrama de puntos de la figura 50 se observa que en el análisis supervisado tampoco existía una separación diferencial de los dos grupos.

Resultados

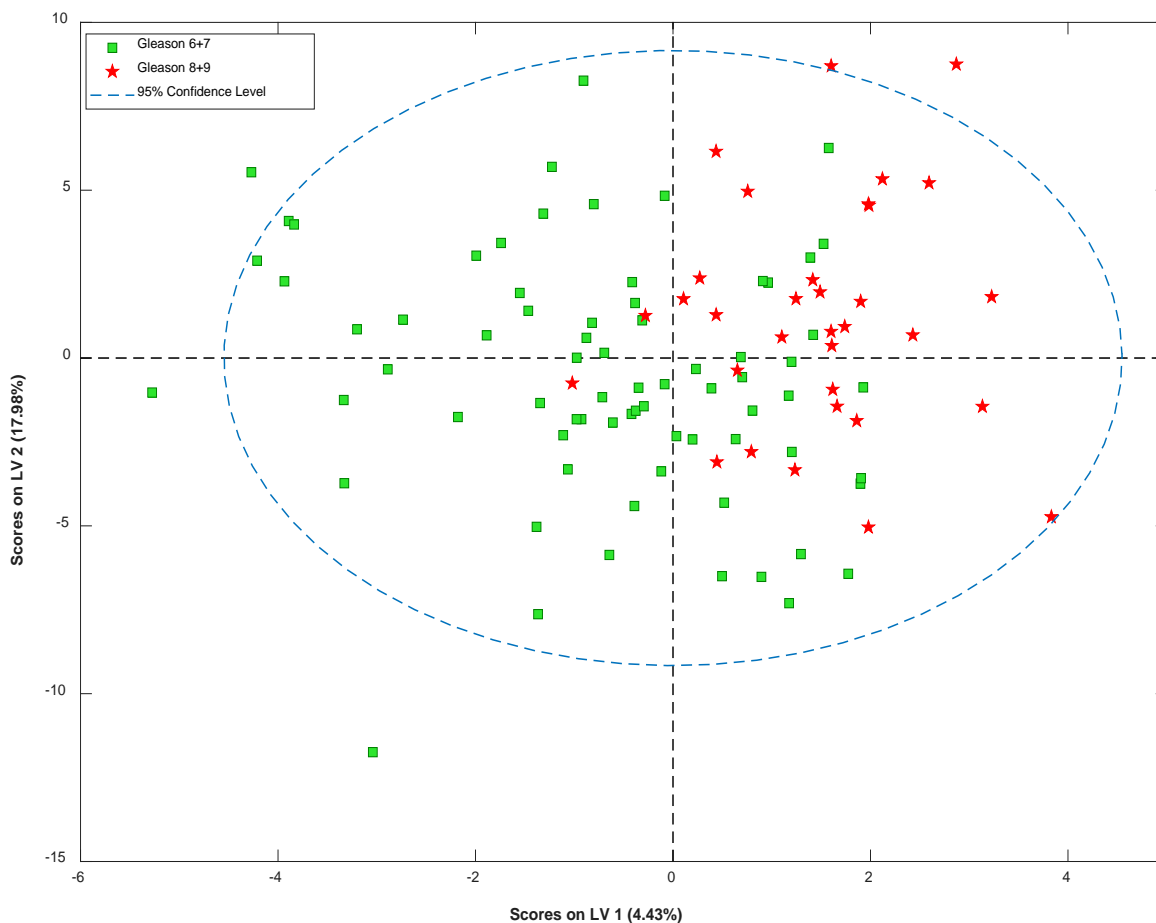


Figura 50. Diagrama de puntos obtenido del análisis PLS-DA de los espectros de 1H PRESAT de las muestras de orina para discriminar entre casos con Gleason 6-7 frente a casos con Gleason 8 o mayor. Los cuadrados verdes representan los casos Gleason 6-7 y las estrellas rojas los casos con Gleason 8 o mayor.

En la curva ROC derivada del PLS-DA se comprueba que el área bajo la curva es de 0,51, lo cual demuestra la capacidad aleatoria discriminatoria del modelo. Con los resultados obtenidos hasta el momento, se decidió proceder a la optimización del modelo, seleccionando las moléculas con VIP score por encima de 1 en el PLS-DA, comprobando si los metabolitos más influyentes conseguían discriminar mejor entre ambos grupos.

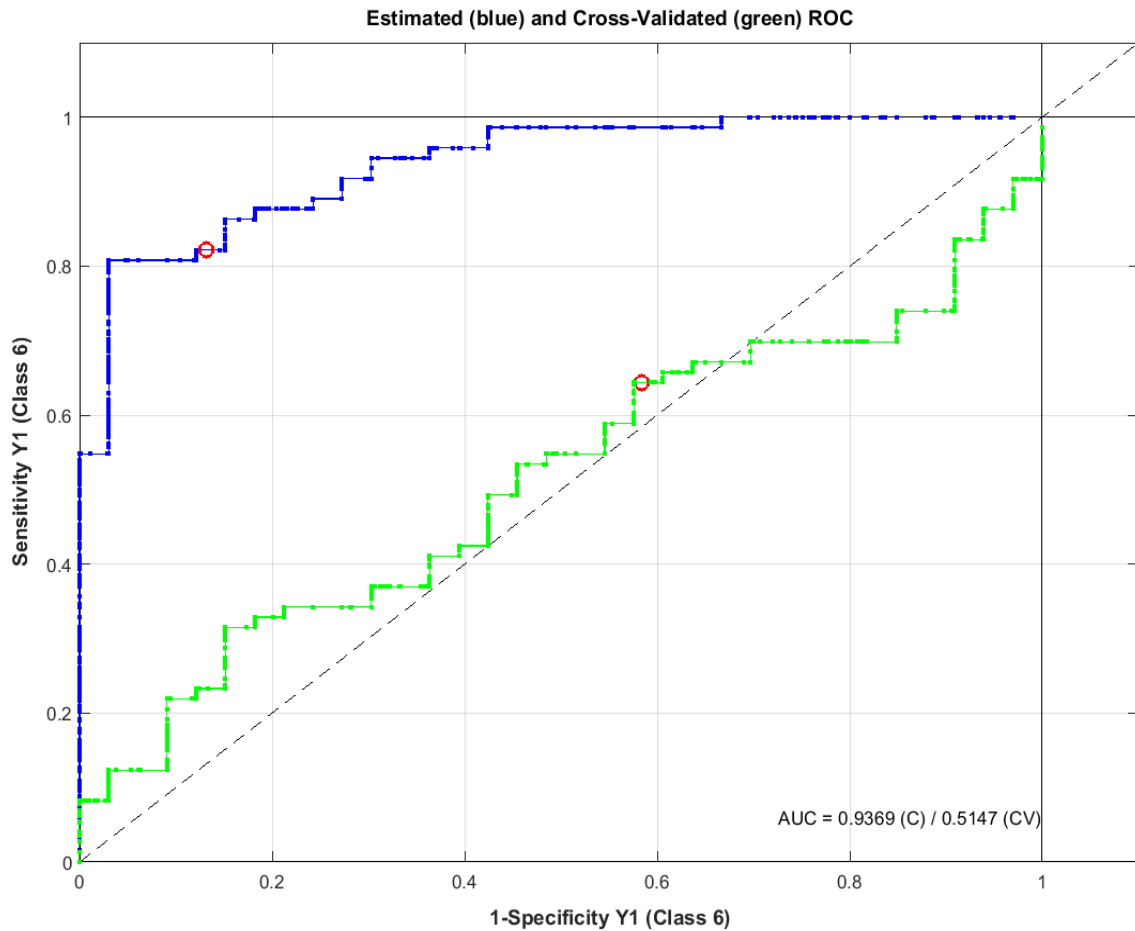


Figura 51. Curva ROC derivada modelo PLS-DA que discrimina entre Gleason 6-7 y Gleason 8 o mayor según perfil metabólico en orina. La línea azul corresponde a los datos tratados y la línea verde, a la validación cruzada.

5.7.3. Optimización del modelo, capacidad para predecir la agresividad del cáncer de próstata mediante el perfil metabólico en orina

Con los datos obtenidos se había comprobado que la huella metabólica en orina, con todos los espectros estudiados, no era capaz de distinguir entre los Gleason según la agrupación que establecimos. Siguiendo la misma metodología que en el análisis entre enfermos y sanos, se seleccionaron los metabolitos con VIP score por encima de 1 en el PLS-DA, se comprobó que las rutas metabólicas implicadas eran las mismas que en el PLS-DA, y se utilizaron estos metabolitos para crear un nuevo modelo.

Resultados

En la tabla 44 se muestran los 29 metabolitos con VIP score por encima de 1. En negrita se muestran los 7 que coinciden con el análisis HR-MAS sobre agresividad tumoral.

Tabla 44. Metabolitos con VIP score por encima de 1 en orina y las rutas metabólicas implicadas (estudio de agresividad tumoral según Gleason). Se seleccionaron para lograr la optimización del modelo. En negro se muestran los metabolitos coincidentes con VIP score por encima de 1 en tejido.

METABOLITO	RUTA METABÓLICA
Fenilalanina	Metabolismo de aminoácidos
Sucrosa	Metabolismo de la glicólisis
Manosa	Metabolismo de la glicólisis
Creatinina	Metabolismo de aminoácidos
Succinato	Ciclo TCA
Quinurenina	Metabolismo de aminoácidos
Creatina	Metabolismo de aminoácidos
Isobutirato	Metabolismo de la serina
Trigonelina	Metabolismo del nicotinato y de la glicina
Piridoxina	Metabolismo de las purinas
Indol-3-lactato	Metabolismo de la glicólisis
Taurina	Metabolismo del colesterol
Glucosa	Metabolismo de la glicólisis
O-Acetilcarnitina	Metabolismo de los ácidos grasos
Nicotinamida N-óxido	Metabolismo del nicotinato y nicotinamida
Metilsuccinato	Ciclo TCA
Urea	Ciclo de la urea
Imidazol	Metabolismo de los aminoácidos
Citrato	Ciclo TCA
Triptófano	Metabolismo del nicotinato y nicotinamida
2-hidroxiacetirato	Metabolismo de los ácidos grasos
4-aminohipurato	Metabolismo de la glicina/glutamato
Prolina	Metabolismo de aminoácidos
Carnosina	Metabolismo de aminoácidos
Betaína	Metabolismo glicerofosfolípido
Malonato	Ciclo TCA
Lactato	Metabolismo de la glicólisis
Glutamato	Metabolismo del glutamato
Alanina	Metabolismo de los aminoácidos

Ciclo TCA: Ciclo del ácido tricarboxílico

La curva ROC derivada del modelo con los 29 metabolitos se muestra en la figura 52. El área bajo la curva fue de 0,78, con una $p < 0,01$ y un intervalo de confianza al 95% de 0,69 - 0,87. Además, la sensibilidad del modelo fue del 35% y la especificidad del 87%. La matriz de confusión del modelo se expone en la tabla 45. Se comprueba

que, en este caso, el modelo es más útil para localizar sujetos con cáncer que no son Gleason 8 o mayor, dados los altos valores de especificidad y de valor predictivo negativo.

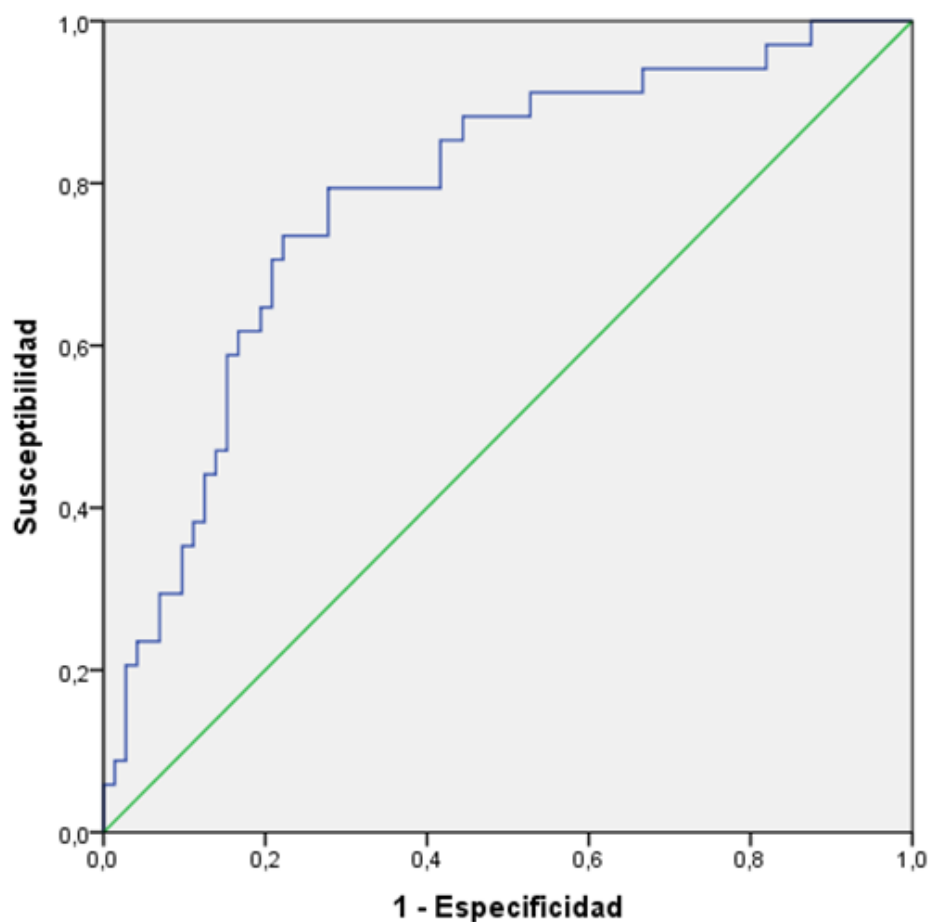


Figura 52. Curva ROC obtenida del modelo con los metabolitos en orina con VIP score por encima de 1 (curva azul), análisis Gleason 6-7 frente a Gleason 8 o mayor. En verde, la línea diagonal que divide el espacio ROC.

Tabla 45. Matriz de confusión para el modelo derivado de los metabolitos en orina con VIP score por encima de 1 (análisis Gleason 6-7 frente a Gleason 8 o mayor).

GRUPOS	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Gleason 8 o mayor	35%	87%	57%	74%

VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo

5.7.4. Modelos con variables clínicas y perfil metabólico. Capacidad para predecir la agresividad del cáncer de próstata mediante el perfil metabólico en orina

A continuación, estudiamos qué parámetros clínicos podrían influir de forma independiente en la clasificación como Gleason alto o bajo. Los resultados, con los 3 pacientes excluidos del total de la muestra, se exponen a continuación (tabla 46).

Tabla 46. Análisis univariante. Diferencias entre las variables clínicas estudiadas (Gleason 6-7 frente a 8 o mayor).

VARIABLE	GLEASON 6-7	GLEASON 8 O MAYOR	P
EDAD en años (media +/- DE)	67,01 +/- 8,17	71,88 +/- 8,28	0,006*
IMC	29,01 +/- 4,13	29,33 +/- 4,41	0,76*
PSA en ng/mL (mediana, intervalo)	9 (3-116)	17,5 (4-1446)	0,007^
Densidad de PSA (mediana, intervalo)	0,25 (0,06-24,80)	0,48 (0,10-10,80)	0,14^
Cociente de PSA	0,12 +/- 0,06	0,10 +/- 0,07	0,12*
Vol. prostático en cc (media +/- DE)	40,73 +/- 18,54	36,16 +/- 20,36	0,26*
Tacto rectal sospechoso (n (%))	17 (23,9%)	26 (78,8%)	< 0,001 ⁺
Sospecha en ecografía (n (%))	38 (52,8%)	30 (88,2%)	< 0,001 ⁺

DE: Desviación estándar, IMC: Índice de masa corporal, DE: Desviación estándar, IMC: Índice de masa corporal, PSA: Antígeno prostático específico, Vol.: Volumen

* U de Mann-Whitney ^Prueba de la mediana ⁺Chi-cuadrado

Todas las variables, menos el IMC, tuvieron diferencias estadísticamente significativas o tendencia a la diferencia ($p < 0,3$) entre los dos grupos, por lo que se procedió a calcular una regresión logística binaria con ellas (tabla 47). Finalmente, se comprobó que sólo el tacto rectal influía de forma independiente con el Gleason 8 o mayor, con una OR de 8,65. En el análisis HR-MAS sobre el Gleason, coincidió que sólo esta variable clínica se relacionaba de forma independiente con los tumores de alto riesgo. De esta forma, se utilizó al tacto rectal sospechoso como variable clínica para predecir la presencia de un Gleason elevado en la comparación de modelos.

Tabla 47. Análisis multivariante. Diferencias entre las variables clínicas estudiadas (Gleason 6-7 frente a 8 o mayor).

VARIABLE	OR	IC- 95%	p
Edad	1,02	0,95 - 1,09	0,54*
PSA	1,01	0,99 - 1,04	0,12*
Densidad de PSA	0,96	0,72 - 1,29	0,83*
Cociente de PSA	1,01	0,98 - 38,25	0,95*
Vol. prostático	0,99	0,96 - 1,02	0,66*
Tacto rectal sospechoso	8,65	2,11 - 7,56	0,003*
Sospecha en ecografía	1,68	0,32 - 8,85	0,53*

OR: Odds ratio, IC: Intervalo de confianza, PSA: Antígeno prostático específico, Vol: Volumen

* Regresión logística binaria

Posteriormente se calculó un modelo que incluyó a los 29 metabolitos derivados de la optimización del modelo en orina, y al tacto rectal como variable clínica predictora de Gleason elevado.

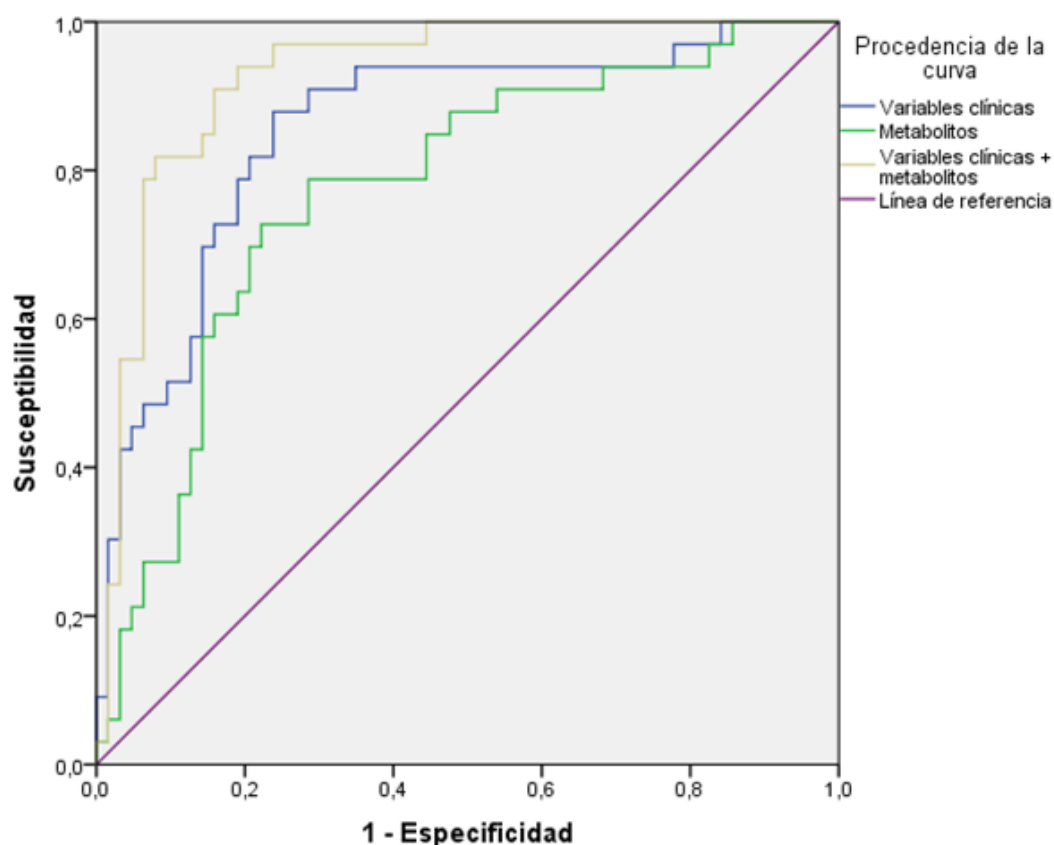


Figura 53. Curvas ROC obtenidas de los diferentes modelos multivariantes en orina para la predicción de la agresividad del tumor de próstata (Gleason 6-7 frente a 8 o mayor).

Resultados

La curva ROC (figura 53) junto la evaluación de este modelo (tabla 48), del modelo sólo con el tacto rectal, y del modelo sólo con metabolitos más influyentes en el PLS-DA, se muestran a continuación. Al comparar las 3 curvas entre sí, se encontraron diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,001$. También al comparar las dos mejores curvas, las del modelo con variables clínicas y metabolitos con la de variables clínicas, con $p = 0,01$. Por el contrario, no se hallaron diferencias al comparar la curva de variables clínicas con la curva de metabolitos, con $p = 0,21$.

Tabla 48. Resultados de las curvas ROC en los tres modelos calculados.

MODELO	AUC	IC 95% - AUC	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Variables clínicas	0,84	0,77 - 0,93	79%	81%	68%	87%
Metabolitos	0,78	0,69 - 0,87	35%	87%	57%	74%
Variables clínicas y metabolitos	0,92	0,87 - 0,98	82%	92%	84%	90%

AUC: Área bajo la curva, IC: Intervalo de confianza, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo

Puede observarse que el modelo con el tacto rectal es mejor que aquel sólo con metabolitos, con mayor área bajo la curva y mejores valores predictivos. A pesar de ser un mejor modelo, la comparación de curvas ROC no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambas ($p = 0,21$). No obstante, al combinar en un mismo modelo la variable clínica con la información metabólica, se alcanza un área bajo la curva de 0,92, y unos valores predictivos muy altos para clasificar de forma correcta a los Gleason 8 o mayor (84%) y a los Gleason 6-7 (90%), siendo éste mejor modelo que los otros dos (con $p < 0,001$) en la comparación de curvas ROC.

5.8 CAPACIDAD PARA PREDECIR LA RECIDIVA BIOQUÍMICA EN CÁNCER DE PRÓSTATA MEDIANTE EL PERFIL METABÓLICO EN ORINA

En el análisis con HR-MAS pudo comprobarse que, tras seleccionar las moléculas más influyentes en el PLS-DA, se obtenía un modelo bueno, aunque con valores regulares de sensibilidad y valor predictivo positivo. La combinación de metabolitos como la 0-fosfoetanolamina, el etanol, el succinato o el ascorbato, aportaban información útil para predecir el desarrollo de recidiva en pacientes que habían sido tratados. En este apartado las variables clínicas no se mostraron como influyentes. Al igual que se desarrolló en apartados anteriores, quiso comprobarse si en orina, con un número significativo de moléculas, podía construirse un modelo predictor bueno en el objetivo de localizar los casos de recidiva.

5.8.1 Análisis no supervisado: PCA, capacidad para predecir la recidiva bioquímica en cáncer de próstata mediante el perfil metabólico en orina

De los 91 casos que recibieron tratamiento, 16 tuvieron una recidiva bioquímica, con una media hasta la recidiva de 25,68 +/- 15,39 meses, y una mediana de 25 (13-36) meses. Para este apartado continuaron manteniéndose fuera los mismos casos que en los otros análisis en orina: 16, 110 y 149. El único varón con tumor era el caso 16, mientras que el 110 y 149 correspondían a sujetos sanos. El paciente 16 se trató mediante prostatectomía radical, sin tener recidiva bioquímica durante el seguimiento. Así pues, para el presente análisis quedaron incluidos 16 casos con recidiva bioquímica y 73 sin recidiva. A pesar de que uno de los grupos presentaba una escasa muestra, ya se demostró en el estudio con HR-MAS que podían establecerse conclusiones interesantes, por lo que se decidió seguir adelante con el presente análisis.

Resultados

En el diagrama correspondiente al PCA (figura 54), puede comprobarse una distribución aleatoria de las muestras de ambos grupos. No se puede apreciar agrupamiento de las muestras en los dos grupos de interés.

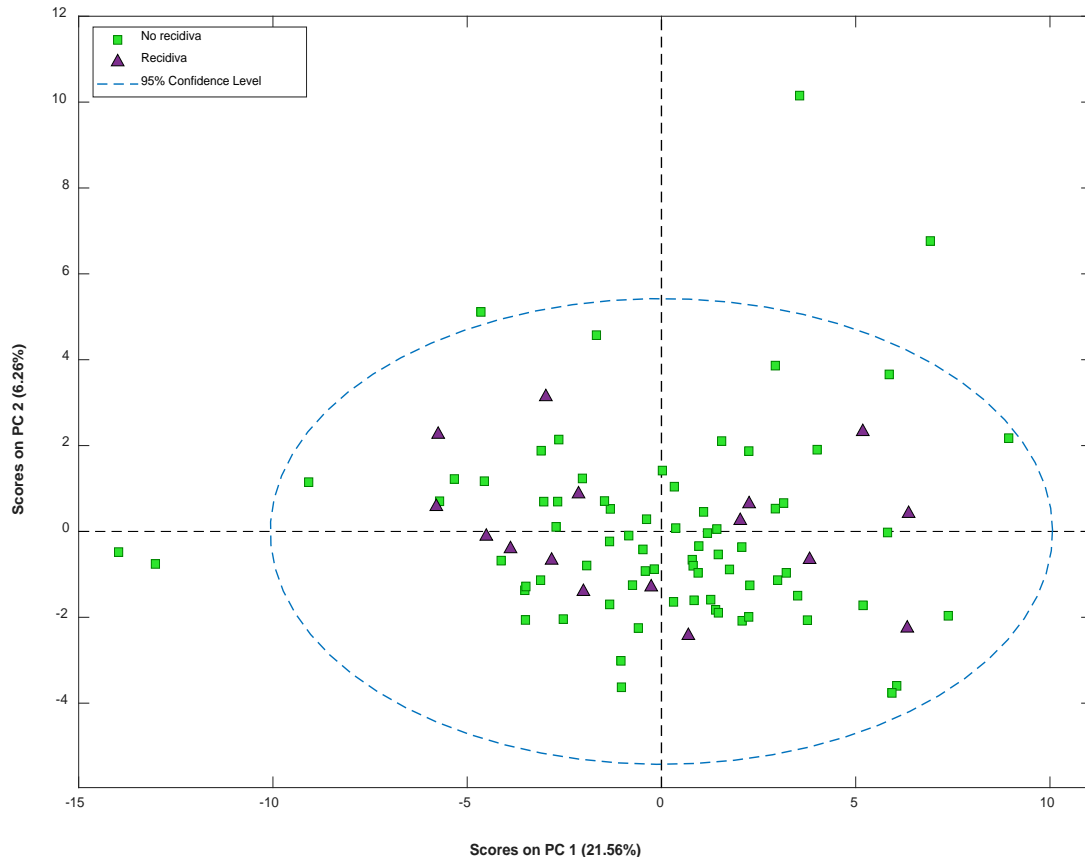


Figura 54. Diagrama de puntos obtenido del análisis PCA de los espectros de 1H PRESAT de las muestras de orina para casos con recidiva bioquímica frente a casos sin recidiva. Los cuadrados verdes representan a los casos sin recidiva, y los triángulos morados a los casos con recidiva. Puede observarse que no existe una separación espontánea de las dos muestras.

5.8.2. Análisis supervisado: PLS-DA, capacidad para predecir la recidiva bioquímica en cáncer de próstata mediante el perfil metabólico en orina

A continuación, se llevó a cabo el PLS-DA correspondiente a este apartado. En el diagrama de puntos de la figura 55 puede comprobarse que en el análisis supervisado tampoco había una distribución diferencial entre los casos de los dos grupos. Aunque existe cierta tendencia a ocupar el área del cuadrante superior derecho por parte de los sujetos con recidiva, éstos se distribuyen de forma heterogénea por todos los

cuadrantes, y existen algunas zonas de solapamiento entre casos de los dos grupos. Así pues, con todos los metabolitos estudiados en orina no presentan capacidad para diferenciar entre casos con y sin recidiva.

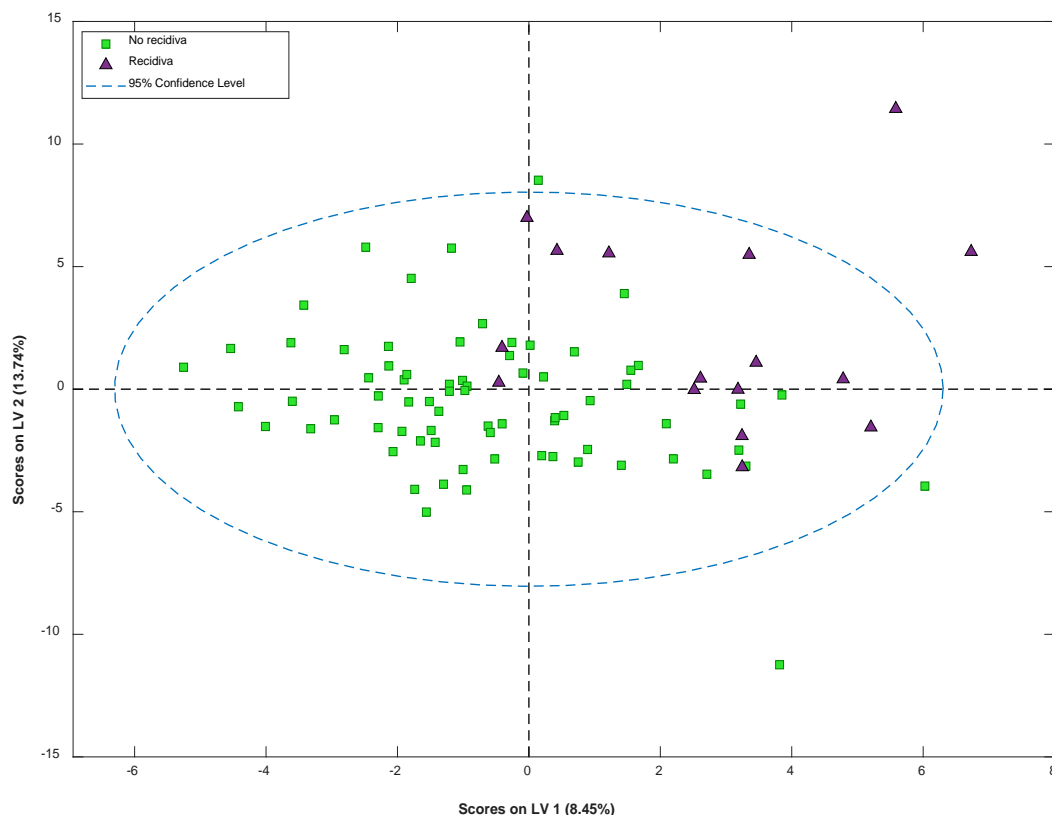


Figura 55. Diagrama de puntos obtenido del análisis PLS-DA de los espectros de ^1H PRESAT de las muestras de orina para casos con recidiva bioquímica frente a casos sin recidiva. Los cuadrados verdes representan a los casos sin recidiva, y los triángulos morados a los casos con recidiva.

En la curva ROC derivada del PLS-DA se comprueba que el área bajo la curva es de 0,43, lo cual demuestra la mala capacidad discriminadora del modelo. Con los resultados obtenidos hasta el momento, se decidió proceder a la optimización del modelo, seleccionando las moléculas con VIP score por encima de 1 en el PLS-DA, comprobando si los metabolitos más influyentes conseguían discriminar mejor entre ambos grupos.

5.8.3 Optimización del modelo, capacidad para predecir la recidiva bioquímica en cáncer de próstata mediante el perfil metabólico en orina

Como se hizo previamente para conseguir la optimización del modelo, se intentaron recoger un número de metabolitos significativo y que fueran influyentes en la distinción entre grupos.

Tabla 49. Metabolitos con VIP score por encima de 1 en orina y las rutas metabólicas implicadas (estudio de recidiva bioquímica). Se seleccionaron para lograr la optimización del modelo. En negro se muestran los metabolitos coincidentes con VIP score por encima de 1 en el análisis HR-MAS.

METABOLITO	RUTA METABÓLICA
Creatina	Metabolismo de los aminoácidos
3-hidroxiquinurenina	Metabolismo de los aminoácidos
2-fenilpropionato	Metabolismo de los ácidos grasos
Prolina	Metabolismo de los aminoácidos
Trimetilamina N-óxido	Metabolismo de los aminoácidos
N-acetilserotonina	Metabolismo de los aminoácidos
Trigonelina	Metabolismo del ácido nicotínico/Ácido carboxílico
Manosa	Metabolismo de la glicólisis
Glucosa	Metabolismo de la glucosa
Arabinosa	Metabolismo de la glicólisis
Urea	Ciclo de la urea
Sucrosa	Metabolismo de la glicólisis
Acetoacetato	Metabolismo glicerofosfolípido
Metilmalonato	Oxidación de ácidos grasos
2-hidroxiacetato	Metabolismo de los ácidos grasos
Betaína	Metabolismo glicerofosfolípido
Mio-inositol	Metabolismo del inositol
Fucosa	Metabolismo de la glicólisis
Acetoína	Ciclo TCA
3-hidroxiacetato	Metabolismo de los ácidos grasos
N-metilhidantoína	Ciclo de la urea
Tirosina	Metabolismo de los aminoácidos
Metanol	Metabolismo de la glicólisis
Taurina	Metabolismo de los aminoácidos
Carnosina	Metabolismo de los aminoácidos

Ciclo TCA: Ciclo del ácido tricarbóxico

En la tabla 49 se muestran los 25 metabolitos con VIP score por encima de 1. En negrita, los 4 que coinciden con el análisis HR-MAS sobre recidivas.

La curva ROC derivada del modelo con los 25 metabolitos se muestra en la figura 56. El área bajo la curva fue de 0,95, con una $p < 0,01$ y un intervalo de confianza al 95% de 0,89 - 0,99. Además, la sensibilidad del modelo fue del 80% y la especificidad del 98%. La matriz de confusión del modelo se expone en la tabla 50. Puede comprobarse que, tras el proceso de optimización, el modelo tiene una gran capacidad predictiva como muestra la curva ROC. Además, presenta unos porcentajes muy altos de sensibilidad, especificidad y valores predictivos, como se muestra en la tabla 50.

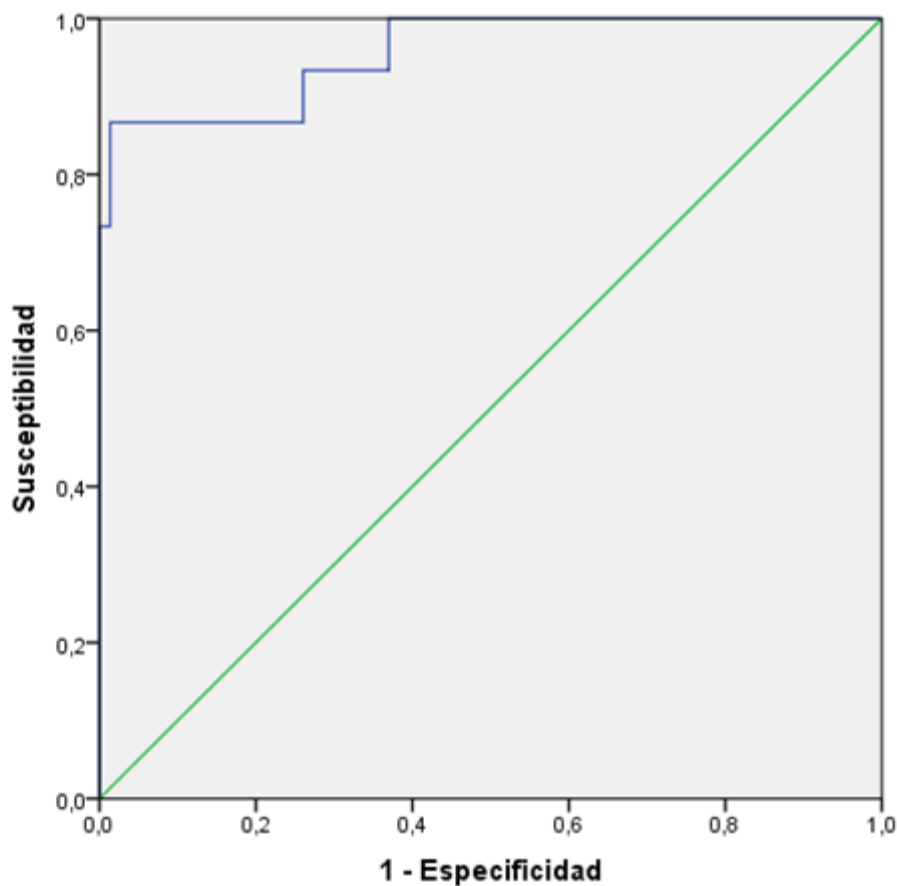


Figura 56. Curva ROC obtenida del modelo con los metabolitos en orina con VIP score por encima de 1 (curva azul), análisis de recidivas bioquímicas. En verde, la línea diagonal que divide el espacio ROC.

Tabla 50. Matriz de confusión para el modelo derivado de los metabolitos en orina con VIP score por encima de 1 (análisis enfermos - sanos).

GRUPOS	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Recidivas bioquímicas	80%	98%	92%	96%

VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo

5.8.4. Modelos con variables clínicas y perfil metabólico. Capacidad para predecir la agresividad del cáncer de próstata mediante el perfil metabólico en orina

Posteriormente se calcularon las variables clínicas que podrían influir en predecir casos con y sin recidiva (tabla 51). Se utilizaron para el cálculo las mismas variables que en el resto de la tesis. Los casos excluidos previamente lo continuaron estando para este análisis.

Tabla 51. Análisis univariante. Diferencias entre las variables clínicas estudiadas (análisis de recidivas bioquímicas).

VARIABLE	CON RECIDIVA	SIN RECIDIVA	P
EDAD en años(media +/- DE)	67,53 +/- 9,69	68,85 +/- 8,69	0,47*
IMC	29,55 +/- 4,27	29,13 +/- 4,41	0,58*
PSA en ng/mL (mediana, intervalo)	13 (7-1446)	10 (3-237)	0,77^
Densidad de PSA (mediana, intervalo)	0,42 (0,13-3,20)	0,26 (0,06-24,80)	0,76^
Cociente de PSA	0,10+/- 0,08	0,12 +/- 0,06	0,26*
Vol prostático en cc (media +/- DE)	35,25 +/- 14,12	39,27 +/- 19,25	0,46*
Tacto rectal sospechoso (n (%))	9 (60%) 6 (40%)	24 (33,8%) 47(66,2%)	0,05 ⁺
Sospecha en ecografía (n (%))	12 (80%) 3 (20%)	43 (58,9%) 30 (41,1%)	0,12 ⁺

DE: Desviación estándar, IMC: Índice de masa corporal, DE: Desviación estándar, IMC: Índice de masa corporal, PSA: Antígeno prostático específico, Vol: Volumen

* U de Mann-Whitney ^Prueba de la mediana ⁺Chi-cuadrado

En el análisis univariante se comprueba que no existía diferencia entre los dos grupos con ninguna variable clínica, aunque el cociente de PSA, el tacto rectal sospechoso y la ecografía sospechosa tendían a las diferencias estadísticamente significativas con una $p < 0,3$. Estas 3 se seleccionaron para el análisis multivariante que se muestra en la tabla 52. Finalmente, ninguno de ellas permaneció de forma significativa dentro del modelo.

Tabla 52. Análisis multivariante. Diferencias entre las variables clínicas estudiadas (análisis de recidivas bioquímicas).

VARIABLE	OR	IC- 95%	p
Cociente de PSA	0,10	0,01 - 25,38	0,61*
Tacto rectal sospechoso	2,31	0,58 - 9,11	0,23*
Sospecha en ecografía	1,50	0,29 - 7,65	0,62*

OR: Odds ratio, IC: Intervalo de confianza, PSA: Antígeno prostático específico, Vol: Volumen

* Regresión logística binaria

El área bajo la curva del modelo creado con estas 3 variable clínicas fue de 0,66. Este dato, juntos con los resultados de la regresión logística, expresan la escasa capacidad predictiva de las variables clínicas en el intento por intentar establecer qué casos tratados desarrollarán recidiva bioquímica. Este hecho, sumado al buen modelo derivado de la optimización de metabolitos, hizo que no calculásemos el modelo combinado con metabolitos y variables clínicas, ya que éstas últimas no iban a aportar capacidad predictiva al mismo.

5.9 PERFIL METABÓLICO Y VÍAS METABÓLICAS EN ORINA RELACIONADAS CON EL CÁNCER DE PRÓSTATA

Las vías metabólicas implicadas con el cáncer de próstata ya fueron descritas tanto en el apartado de tejido como en el de orina, observando que, a pesar de tratarse de metabolitos distintos en los análisis de tejido y de orina, las vías metabólicas eran las mismas. En la figura 57 se muestran las rutas metabólicas implicadas con la presencia de cáncer de próstata, tanto en tejido como en orina. En ella puede comprobarse, además, si las moléculas se encontraron aumentadas o disminuidas en los casos con neoplasia en comparación con los casos sanos, además de

Resultados

representar el resto de moléculas de las vías metabólicas implicadas que no fueron establecidas como significativas en nuestros resultados.

6. DISCUSIÓN

6.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE UNA MUESTRA DE PACIENTES SOMETIDOS A BIOPSIA TRANSRECTAL DE PRÓSTATA EN NUESTRO HOSPITAL

En este estudio se analizó una muestra poblacional del departamento de salud número 5 de la Comunidad Valenciana que acudían a la realización de una biopsia transrectal de próstata. En el periodo de reclutamiento se recogieron muestras de tejido y de orina de 201 varones, con una media de edad de 67,2 años. Además, de los 201 casos, se diagnosticó cáncer de próstata en 105 (52,2%), y el resultado fue negativo para malignidad en los otros 96 (47,8%). Estos datos no traducen que la eficacia diagnóstica de nuestro servicio sea del 52,2%, ya que los casos incluidos para este estudio no fueron consecutivos, sino a criterio del urólogo que realizaba la biopsia. En estudios publicados por nuestro grupo, con el protocolo de biopsia seguido para esta tesis, el rendimiento diagnóstico en primera biopsia fue entre un 32,4% y un 40%, similar a otros estudios (171).

Aunque no podemos afirmar que la muestra aportada es representativa en cuanto al porcentaje diagnóstico habitual, sí lo es en lo referente a las características clínicas. En una muestra de nuestro centro, con 2.601 casos de biopsias prostáticas, la media de PSA se encontraba entre 19-20 ng/mL (con gran variabilidad como en la presente tesis), la de volumen prostático entre 54-82 cc, la de edad entre 65-66 años, y el porcentaje de tacto rectal sospechoso alrededor del 19-22% (171). En el trabajo que presentamos, la media de PSA fue de 23,2 ng/mL, la de volumen prostático de 47,1 cc, la de edad 67,2 años, y el porcentaje de tacto rectal sospechoso un 28,4%.

En cuanto a las comorbilidades que presentaban los varones biopsiados, cabe destacar los porcentajes elevados de hombres en la muestra con IMC alto (43,7%), hipertensión arterial (53,7%), diabetes (18,4%), o dislipemia (47,3%). Con anterioridad ha sido descrito que la obesidad se relaciona con una mayor probabilidad de tener cáncer de próstata y de que sea un subtipo agresivo (7). La explicación que se da a este hecho es que muchos de estos individuos presentan una alteración de los niveles

Discusión

circulantes de hormonas sexuales esteroideas, hecho de sobra conocido en la oncogénesis del cáncer de próstata (172).

El estado de resistencia a la insulina presente en los pacientes diabéticos también se ha relacionado de forma estrecha con el cáncer de próstata (7). La situación de hiperglucemia se ha documentado como una fuente de energía importante para la proliferación de células tumorales. Además, el estado hiperglucémico se ha vinculado en estudios genéticos a procesos cancerígenos como la apoptosis, el estrés oxidativo y daño del ADN, todos ellos conocidos como precursores de formas agresivas de cáncer (173, 174). Se ha descrito, además, que los pacientes con cáncer de próstata de alto riesgo tienen unos mayores niveles séricos de insulina que aquellos con bajo riesgo, y que estos pacientes tienen aumentada la producción de productos finales de glucosilación avanzada, los cuales promueven la carcinogénesis (175, 176). Todos estos ejemplos de la estrecha relación entre el estado de hiperglucemia o hiperinsulinemia y el cáncer de próstata, pueden explicar la alta prevalencia de DM en nuestra muestra de varones biopsiados.

Otro factor epidemiológico recogido, y que refleja que la muestra reclutada es representativa de un grupo habitual de pacientes en la práctica diaria, es la edad. La media de edad de los pacientes de este estudio fue de 67,2 años, similar a otros estudios presentados por nuestro grupo en el contexto de diagnóstico de cáncer de próstata (171, 177, 178). Sacardin demostró que el riesgo de tener cáncer de próstata aumenta de forma significativa a partir de los 50 años en varones sin antecedentes familiares de cáncer de próstata, y a partir de los 40 años en los casos de hombres con antecedentes de familiares de primer grado con esta neoplasia (179).

Otra forma de comprobar si la muestra que presentamos refleja un grupo representativo de varones en ese rango de edad, es comparar las comorbilidades que presentaron los varones que acudían a la biopsia de próstata con otros varones en ese rango de edad que fueron recogidos en otros estudios de nuestra área. En un trabajo publicado en 2019 por nuestro grupo sobre varones que consultaban por disfunción eréctil, el 45% presentaban hipertensión arterial (53,7% en la actual muestra), 36% dislipemia (47% este estudio) , 27% diabetes mellitus (18% en nuestra muestra), 8%

neumopatía (10% en el actual trabajo) o 10% cardiopatía (9% entre este estudio)(180). En otro estudio de nuestro grupo con pacientes de nuestra área, con edades alrededor de 70 años y con tumor vesical, las prevalencias de hipertensión estaban entre 45-54%, dislipemia entre 37-52%, diabetes 21-31%, neumopatía 14-21%, o cardiopatía 8-20% (181). Estos datos de prevalencia, de nuevo similares a los de la muestra que presentamos en este estudio, refleja que los varones recogidos presentan unas comorbilidades dentro de lo habitual para nuestra área sanitaria.

Otros factores importantes con la epidemiología del cáncer de próstata no fueron recogidos para el análisis descriptivo de nuestro trabajo. Por ejemplo, la dieta rica en carnes rojas procesadas se ha visto como posible factor promotor del cáncer de próstata; debido a que estos alimentos contienen altas concentraciones de hidrocarburos aromáticos y aminos mutagénicas. Todo esto conlleva peroxidación lipídica y daño del ADN por radicales libres (182). Otros factores de riesgo descritos como la frecuencia eyaculatoria, el alcohol o ciertos tratamientos farmacológicos, tampoco fueron recogidos en nuestra muestra.

6.2 CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS Y CLÍNICAS DE UNA MUESTRA DE PACIENTES SOMETIDOS A BIOPSIA TRANSRECTAL DE PRÓSTATA EN NUESTRO HOSPITAL

Como se ha comentado, el 47,8% de los varones biopsiados estaban libres de carcinoma prostático, mientras que un 52,2% tenía cáncer. De los pacientes con carcinoma, un 13,3% tuvieron un Gleason 6, un 54,2% Gleason 7, un 9,5% Gleason 8, y un 22,8% Gleason 9. Estos datos no concuerdan con otros publicados por nuestro grupo y por otros, por ejemplo sobre varones sometidos a segundas biopsias, donde el 53% fueron Gleason 6, el 30% Gleason 7, y un 17% Gleason 8 o mayor (177,178). Como se ha dicho, la muestra de nuestro estudio no representa con fidelidad la práctica clínica habitual en lo referente al rendimiento diagnóstico en la biopsia transrectal, ya que los casos recogidos no fueron consecutivos. El urólogo encargado de realizar las biopsias pudo incluir para el estudio a pacientes en los que creía con más probabilidad de tener cáncer, de ahí el hecho de que en nuestra muestra sean abundantes los casos

Discusión

con Gleason 8 o mayor. Este aspecto puede estar también en relación con el alto porcentaje de casos con tacto rectal sospechoso o con ecografía sospechosa en nuestra muestra, debiendo tenerse esto en cuenta a la hora de interpretar los resultados.

Un dato de nuestros resultados que debe comentarse es la pérdida de información en cuanto al Gleason en el cilindro que previamente había sido medido mediante HR-MAS. De los 55 cilindros medidos y posteriormente clasificados como tumorales, sólo se pudo concluir el Gleason en 26 de ellos. Aunque la condición ideal hubiese sido obtener el Gleason de todos ellos, algunas muestras se encontraban artefactadas por el proceso de manipulación y ultracongelación. Este hecho produjo que estas muestras tuvieran estructuras tumorales retraídas y colapsadas, con lo que existía un riesgo aumentado de dar falsos positivos o de clasificar con un Gleason superior al que podría ser real. Cabe destacar un caso de Gleason 10 (5+5) en el cilindro HR-MAS, correspondiente a un varón con una clasificación Gleason 9 (5+4) en el estudio histológico de la biopsia estándar. Las guías clínicas de la Asociación Europea de Urología describen los detalles a tener en cuenta en el procesamiento histopatológico de las muestras prostáticas biopsiadas, como por ejemplo incluir un máximo de 3 cilindros por cartucho, empleo de esponjas o papel para mantener los cilindros estirados, o cortar los bloques en 3 niveles (140). Aunque en el Servicio de Anatomía Patológica se procesaron por igual las muestras derivadas de la biopsia estándar y las muestras que provenían del Laboratorio de Metabólica, el procesamiento de las muestras para su medición con HR-MAS justifican que estuvieran de algún modo artefactadas. Como se mostrará más adelante, existen varios estudios donde se compararon perfiles metabólicos en función del Gleason, no describiendo los autores si tuvieron que descartar muestras por no poder establecer en Gleason de manera óptima en el estudio histológico (120-122, 183-185).

Otros parámetros clínicos recogidos y relacionados con la patología tumoral son el PSA y densidad de PSA. Sobre los niveles de PSA, como se ha comentado previamente, la media en ng/mL fue de 23,2 +/- 105,5. Esta media puede considerarse

como algo más elevada de lo normal, por el mismo motivo explicado anteriormente sobre el por qué se recogieron porcentajes altos de tumores agresivos. Así, en un estudio publicado por nuestro grupo con más de 660 varones biopsiados, la media de PSA en primera biopsia fue de $9,3 \pm 6,3$ ng/mL, bastante inferior a lo registrado en este estudio (177). En otra serie publicada por nuestro grupo sobre pacientes con sospecha de tumores agresivos (con infiltración de vesículas seminales), la media de PSA fue más similar a la actual $21,6 \pm 23,9$ ng/mL (178). Datos publicados en 2016 sobre el Registro Nacional de Cáncer de Próstata en España, mostraron que en aquellos varones con cáncer sobre los que se realiza un tratamiento curativo, la media de PSA al diagnóstico oscilaba entre $8,76 \pm 16,97$ y $13,21 \pm 15,88$ ng/mL (186). Lo mismo sucede con la media de densidad de PSA, siendo de $0,6 \pm 2,1$ en nuestro estudio, e inferior en otras muestras recogidas por nuestro grupo en el contexto de práctica clínica habitual: $0,2 \pm 0,18$ (177). El hecho de que las desviaciones estándar de nuestros datos de PSA fueran tan amplias, hizo que utilizásemos la comparación de medianas, en vez de medias, en el análisis comparativo de los resultados.

También se recogieron datos sobre el volumen prostático y el porcentaje de cilindros afectados en la biopsia. La media de volumen prostático fue de $47,1 \pm 24,7$ cc, muy similar a datos del Registro Nacional sobre casi 2500 casos de varones con cáncer de próstata, siendo ésta de $44,57 \pm 32,6$ cc (186). El dato del volumen prostático es importante en lo referente al diagnóstico del cáncer de próstata. Diversos estudios han demostrado que la tasa de detección de cáncer prostático con biopsia transrectal aumenta en próstatas más pequeñas (178, 187). El volumen prostático tiene un doble efecto en la detección del cáncer de próstata ya que, por una parte, la proporción de tejido obtenido es menor en las próstatas grandes, por lo que al mismo volumen tumoral la probabilidad de biopsiar la zona del tumor es menor en una próstata grande que en una pequeña. Por otra parte, el crecimiento benigno de la próstata aumenta las cifras de PSA, por lo que los falsos positivos (sospecha de cáncer con biopsia negativa) en la detección del cáncer cuando la indicación sea la elevación de este marcador, será mayor en las próstatas grandes. A pesar de presentar en la muestra un porcentaje alto de varones con cáncer, no hemos observado un volumen prostático menor del habitual, como se ha citado.

Discusión

En cuanto al porcentaje de cilindros afectados en nuestra muestra, un 31,4% de los casos positivos con carcinoma tenían igual o menos del 20% de los cilindros positivos, y un 49,5% tenían entre el 20 y el 60% de los cilindros positivos. Estos datos se aproximan a lo habitual en cualquier biopsia transrectal, ya que en datos españoles, sobre una muestra de 2332 biopsias positivas, la media de porcentaje osciló entre un 30 y un 38,7% (186).

En los análisis comparativos según subtipos de tumor, puede comprobarse que varones con carcinomas Gleason 8-9 tenían medias más altas de PSA, densidad de PSA, o más casos con tacto rectal sospechoso o ecografía sospechosa, entrando estos datos dentro de lo esperado. En un estudio sueco que recogía más de 11.000 casos de biopsias, aquellos varones con Gleason 6 tenían en su mayoría valores de PSA entre 3 y 5 ng/mL, aquellos con Gleason 7 entre 5 y 10 ng/mL, y aquellos con Gleason 8 o mayor tenían en su mayoría valores de PSA por encima de 10 ng/mL (188). En nuestro grupo, la media de PSA en casos con Gleason 8 o 9 es de 77,26 ng/mL, probablemente porque el urólogo que llevó a cabo las biopsias intentó añadir al estudio casos con tumores agresivos, guiándose entre otros por los niveles elevados de PSA.

En los resultados también se ha recogido el manejo que llevaron los pacientes diagnosticados de carcinoma (tabla 14). Como se explicó en la introducción, el manejo de esta patología puede variar de forma importante, según factores como la edad, características propias del tumor o prioridades del paciente. En nuestra muestra, la mayoría de hombres diagnosticados de cáncer fueron tratados con cirugía (38,31%), seguida de radioterapia (27,10%). En el otro extremo, sólo hubo un caso de braquiterapia y dos de observación. Datos recogidos de toda España muestran que, de 4.087 varones reclutados con carcinoma de próstata, 2.714 (66%) (en estadio localizado o localmente avanzado) recibieron tratamiento con intención curativa (cirugía, radioterapia o braquiterapia) (186, 189). Estos porcentajes son similares a los nuestros, donde un 66,34% recibieron manejo con intención curativa. Aunque la elección por una terapia u otra debe ser individualizada en cada caso, se ha descrito que factores se relacionan con una u otra terapia. Así, el perfil de paciente que opta por radioterapia o por braquiterapia suele ser de más edad, con mayor PSA, mayor

porcentaje de cilindros positivos en la biopsia, y una puntuación de Gleason más alta, en comparación con los que optan por cirugía (186).

6.3. HUELLA METABÓLICA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA EN TEJIDO. RESULTADOS PUBLICADOS DIFERENCIANDO ENTRE CASOS CON Y SIN CÁNCER

Uno de los principales objetivos de este estudio fue establecer el perfil metabólico de tejido prostático afecto de carcinoma. Este tema es de reciente interés en la comunidad urológica, ya que como se comentó en la introducción, el método actual para concluir un diagnóstico de cáncer de próstata se basa en la biopsia transrectal, una técnica invasiva y con complicaciones asociadas. La búsqueda por parte de las ciencias ómicas de biomarcadores que, de forma independiente o con parámetros clínicos, ayuden a la toma de decisiones en este contexto, es un objetivo ambicioso y en auge durante los últimos años. Aunque en el ámbito de la investigación básica han sido varios los estudios publicados, el conocimiento de la huella metabólica del cáncer de próstata es un tema desconocido dentro de la comunidad urológica.

Los primeros trabajos sobre metabolómica en cáncer de próstata se remontan dos décadas atrás. Cheng y Swanson, con dos publicaciones cada uno, fueron los primeros autores en intentar establecer un perfil metabólico específico en tejido prostático canceroso, y compararlo con tejido prostático sano (111, 118-120, 190). Es característico de estos primeros estudios, la búsqueda de un único o unos pocos biomarcadores que fueran útiles en la tarea del diagnóstico. El hecho de buscar uno o pocos metabolitos con el fin de diagnosticar, es una forma de "simplificar" el modelo predictor, y con esta filosofía vieron la luz los primeros trabajos sobre el tema. No obstante, una de las grandes ventajas de la metabolómica es el gran número de moléculas que se pueden cuantificar tras llevar a cabo la medición de las muestras, hecho que permite trabajar con abundante información, pudiendo crear modelos con numerosas moléculas sin incrementar la dificultad del procesamiento de los casos. De

Discusión

ahí que los trabajos posteriores utilizaron un mayor número de metabolitos en sus nomogramas.

Para el estudio de Cheng en 2001 se recogieron muestras de tejido con Gleason 6, Gleason 7 y sin tumor. A pesar del importante punto débil de este estudio, con una muestra de sólo catorce casos, los autores concluyeron un descenso significativo de los niveles de citrato y espermina en las muestras con tumor. En el trabajo se estudia una correlación lineal de estos metabolitos con el riesgo de tener cáncer, observando que a mayor cantidad de citrato y espermina, menos riesgo de cáncer de próstata ($r^2 = -0,75$, $p=0,0001$)(118). Se ha hipotetizado que la reducción de citrato se debe al agotamiento del zinc en las células con cáncer de próstata, ya que el zinc previene la oxidación del citrato en el ciclo de Krebs (191). La espermina también se ha demostrado como un metabolito importante en la próstata por su efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las células cancerosas en estudios in vitro(192). Ambos se secretan de forma fisiológica en la luz glandular prostática sana, y en el estudio de Cheng se concluyó que, en tejido tumoral donde desaparecen los lúmenes prostáticos normales, las concentraciones de estos metabolitos están disminuidas (118).

El mismo grupo publicó en 2005 un estudio sobre 199 muestras extraídas de 82 piezas de prostatectomía. Tomando como referencia la histología del cilindro medido por HR-MAS, dividen la muestra en casos (enfermos) y controles (sanos). Destacan la fosfocolina y la colina como los componentes principales del modelo que construyen, diferenciando entre tejido tumoral (ambas moléculas elevadas) y tejido sano, además de obtener una precisión de clasificación del 92,3% y un área bajo la curva de 0,98 (119). Añadir que en este estudio consiguió establecer una correlación lineal entre estos dos marcadores y los niveles de PSA (a mayores niveles de colina y fosfocolina, mayores niveles de PSA), y estudiaron la capacidad predictiva en el Gleason, como se expondrá más adelante(119). Tanto la colina como la fosfocolina son compuestos intermedios en la síntesis de la fosfatidilcolina en los tejidos. Ésta última se ha descrito elevada en muchos tipos de tumores, suprimiendo la capacidad inmune del huésped (117).

El grupo de Swanson et al. confirmaron en su estudio los niveles elevados de compuestos de colina en 54 muestras de tejido prostático canceroso. En tejido sano se observaron niveles de nuevo bajos de citrato y poliaminas. Destacar además que la taurina, el mio-inositol y el scilo-inositol se relacionaron con tejido tumoral, teniendo niveles más elevados que en tejido sano (120). Afirmaban también que, dentro de tejido benigno, la predominancia de glándulas o de tejido estromal variaba el perfil metabólico obtenido. De esta forma, en tejido predominantemente glandular la relación citrato/creatina era más alta que en tejido predominantemente estromal ($p=0,001$), o que en muestra con menos de un 20% de glándulas ($p=0,017$) (120). La taurina, citada en el trabajo de Swanson, es un ácido aminoetano-sulfónico que ha sido descrito el ámbito del cáncer de próstata como inhibidor de genes relacionados con la transición tisular epitelial-mesenquimatoso. La inhibición de este tipo de genes como la N-cadherina, vimentina, TWIST1, o SNAIL, favorece el desarrollo de enfermedad metastásica (193). Por su parte, el mio-inositol y el scilo-inositol (precursores del ascorbato), elevados en el trabajo de Swanson, son derivados de los fosfatos de inositol, que intervienen como mensajeros de transducción de señales celulares en tumores (194).

Los niveles de lactato y alanina también se han observado como aumentados en tejidos con cáncer de próstata. En un estudio con 20 muestras tumorales, se encontraron diferencias significativas con los compuestos de colina y el lactato, siendo más elevados que en tejido sano (111). La alanina también fue notoriamente mayor en los tejidos cancerosos que en el tejido estromal. Aunque los autores hipotetizan que los aumentos de lactato y alanina pueden derivar de la hipoxia sucedida durante el manejo de las muestras, las grandes concentraciones de ambos metabolitos parecen ser indicativos de cáncer prostático(111). Además, al comparar diferentes tipos de tejido sano (estromal y glandular), las concentraciones de ambos no difirieron. Vías activas durante el crecimiento tumoral, como la regulación al alza del VEGF o del factor inducible por hipoxia HIF-1 α podrían justificar el aumento de alanina y lactato (195).

Los modelos descritos por los autores previos, fueron reproducidos y confirmados en los trabajos de Van Asten y Tessem, predominando los compuestos derivados de colina, el lactato y la alanina, como marcadores de tejido prostático

Discusión

canceroso (196, 197). Algunos autores evaluaron además las relaciones de metabolitos para usarlas como indicadores de tumor, estudiando fosfocolina/glicerofosfocolina (sensibilidad 73%, especificidad 81%); fosfocolina/fosfoetanolamina (sensibilidad 73%, especificidad 81%), fosfoetanolamina/etanolamina (sensibilidad 50%, especificidad 77%); y glicerofosfoetanolamina/etanolamina (sensibilidad 64%, especificidad 81%) (198, 199). Como puede comprobarse, todos estos modelos resultaron más útiles para clasificar de forma correcta casos sanos que casos enfermos. Todas estas moléculas son precursoras o productos de degradación de membranas de los fosfolípidos, e indican proliferación celular, estado proapoptótico, y enzimas activadas en estados preneoplásicos (200).

Otra clase de moléculas encontradas en muestras tisulares malignas son los ácidos grasos poliinsaturados omega-6, que incluyen el ácido linoleico, ácido γ -linolénico, dihomo-ácido linoleico y el ácido araquidónico(199) . Las conclusiones del estudio de Stenman en 2009 sugirieron que estos componentes se acumulaban en tejido maligno, y no en el sano. Estos resultados corroboraban otros estudios que afirmaban potentes efectos estimulantes de los ácidos grasos en el desarrollo y agresividad tumoral del cáncer de próstata, por su efecto directo en la muerte celular, degradación mitocondrial y de la membrana celular, y la renovación celular acelerada en regiones ricas en lípidos (201).

En los últimos años se han seguido sucediendo las publicaciones donde se ha intentado caracterizar el perfil metabólico del cáncer de próstata en tejido. No obstante, la tónica habitual ha seguido siendo estudios con muestras pequeñas. Keshari y Komoroski , con 49 y 21 casos recogidos respectivamente, llegaron a conclusiones muy similares en sus trabajos, concluyendo que metabolitos derivados del ciclo de la colina, están implicados con el cáncer de próstata (183, 202). La colina interviene en el metabolismo glicerofosfolipídico, desdoblándose en glicerolfosfocolina y fosfocolina, ambos sustratos energéticos para las células tumorales. Otro de los productos derivados de la colina, la betaína, acaba aumentando los niveles de sarcosina, uno de los primeros compuestos que la metabolómica relacionó con el cáncer de próstata (185). Otros metabolitos destacados por estos autores son la etanolamina y la fosfoetanolamina, alcoholes que también intervienen en el

metabolismo fosfolípido y que se encontraban aumentados en casos con cáncer de próstata (183, 202). Estas sustancias son utilizadas por las células para la síntesis de esfingolípidos, estando presente en las membranas celulares y en diferentes etapas del metabolismo celular, como en el metabolismo mitocondrial o en la síntesis de colina (198).

Uno de los trabajos más recientes es el del grupo de Madhu, el cual utilizó 16 muestras en su estudio, comparando tejido de pacientes con cáncer tratados con antiandrógenos frente a casos sanos (111, 203). Además de volver a observar la colina aumentada en casos tumorales, también lo estaban la alanina y el lactato, corroborando los resultados de otros grupos. El lactato es un producto de degradación del metabolismo de la glicólisis, proveniente del piruvato, mientras que la alanina interviene en el metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada, sirviendo de sustrato para la obtención de energía mediante el ciclo de Krebs (185).

El estudio más reciente que intenta relacionar el perfil metabólico medido por HR-MAS con la presencia o ausencia de cáncer de próstata es el de Dudka et al. Con muestras tisulares de 16 pacientes, obtienen 59 muestras sanas y 70 con cáncer. Con una metodología muy similar a la seguida en esta tesis, concluyen que el modelo con fosfocolina, glutamato, hipoxantina, arginina y α -glucosa es suficiente para discernir entre tejido sano y enfermo (185). Al igual que en la metodología seguida en nuestro estudio, utilizaron los metabolitos con VIP score más elevado, obteniendo un modelo con varias moléculas. Este trabajo es diferente a los primeros que se publicaron, en el sentido de que se utilizan metabolitos diferentes a los clásicos (colina y derivados, citrato, lactato y ácidos grasos), y también porque no se busca una molécula o relación de moléculas única que sea un biomarcador útil, sino que se intenta utilizar un grupo de metabolitos con el fin de establecer la huella del cáncer de próstata en tejido.

El resumen de los estudios comentados previamente puede observarse en la tabla 53.

Como se comentará más adelante en esta discusión, las publicaciones más recientes en el campo de metabolómica y cáncer de próstata se centran en otros aspectos, como por ejemplo hallar perfiles metabólicos específicos que se relacionen

Discusión

con la agresividad o el grado tumoral, con el riesgo de recidiva de bioquímica o con la presencia de tejido estromal con riesgo de malignización. Así pues, la publicación de trabajos sobre metabolómica en cáncer de próstata ha ido evolucionando con el tiempo, pasando de los primeros estudios donde simplemente quería establecerse el perfil metabólico específico de la neoplasia en tejido, hasta la búsqueda de biomarcadores en biofluidos o la búsqueda de perfiles metabólicos tisulares que tengan implicaciones pronósticas, y que por lo tanto puedan influir en el manejo y seguimiento de los pacientes.

Tabla 53. Estudios en los que se ha utilizado una sonda de HR-MAS para distinguir entre tejido con y sin cáncer de próstata.

AÑO	AUTOR	MUESTRAS INVESTIGADAS	METABOLITOS AUMENTADOS *	METABOLITOS DISMINUIDOS *
2001	Cheng(118)	14 pacientes, 14 muestras Enfermos VS sanos		Citrato Espermina
2003	Swanson(120)	26 pacientes, 54 muestras Enfermos VS sanos	Compuestos de colina Taurina/Creatina Mio-inositol Scilo-inositol	Citrato Poliaminas
2005	Cheng (119)	82 pacientes, 199 muestras Enfermos VS sanos Metabolitos VS PSA	Colina Fosfocolina	
2006	Swanson (111)	20 pacientes, 60 muestras Enfermos VS sanos	Fosfocolina + Glicerolfosfocolina Colina total Lactato Alanina	
2008	Van Asten (196)	48 pacientes, 40 muestras Enfermos VS sanos	Colina total/Citrato Colina/Creatina (Glicerolfosfocolina + Fosfocolina) /Creatina (Colina total+Creatina) /Citrato Lactato/Alanina	Citrato/Creatina
2008	Tessem (197)	82 pacientes, 98 muestras Enfermos VS sanos	Compuesto de colina Lactato Alanina	Citrato Poliaminas
2008	Swanson (198)	22 pacientes, 47 muestras Enfermos VS sanos	Fosfocolina Glicerolfosfocolina Fosfoetanolamina Glicerolfosforiletanolamina	Etanolamina
2009	Stenman(199)	27 pacientes, 81 muestras Enfermos VS sanos	Fosfocolina/Glicerolfosfocolina Fosfocolina/fosfoetan	Ninguno

			olamina Fosfoetanolamina/etanolamina Glicerolfosfoetanolamina/etanolamina Ác. grasos poliinsaturados	
2011	Keshari (183)	49 pacientes, 14 muestras benignas VS 22 Gleason 3+3 o 3+4 VS 13 Gleason 4+3 o mayor	Colina + creatinina Fosfocolina Glicerolfosfocolina Fosfoetanolamina Glicerolfosfoetanolamina	Citrato
2011	Komoroski (202)	21 pacientes, 21 muestras Enfermos VS sanos	Fosfocolina Glicerolfosfocolina Fosfoetanolamina Glicerolfosfoetanolamina	
2016	Madhu (203)	16 pacientes, 16 muestras Enfermos tratados con Degarelix VS sanos	Lactato Alanina Colina total	Ninguno
2020	Dudka (185)	16 pacientes, 129 muestras Enfermos VS sanos	Fosfocolina Glutamato Hipoxantina Arginina α -glucosa	Ninguno

* Primer grupo con respecto al segundo

6.4. HUELLA METABÓLICA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA EN TEJIDO. APORTACIONES RELEVANTES DE NUESTROS RESULTADOS

El trabajo actual presenta una serie de aspectos que lo diferencian de los estudios publicados previamente, y que le dotan de un mayor interés. El primero de ellos es la importante muestra recogida, con más de 200 casos. Como se ha mostrado en la tabla 53, el resto de estudios publicados tienen muestras pequeñas, algunos con pocas decenas de sujetos. Además de esto, otros autores extraen varias muestras de un mismo paciente. En la tabla 53 se observa que sólo los trabajos de Cheng, Komoroski y Madhu, extrajeron una muestra por paciente (118, 202, 203). En el resto, utilizaban tejido de diferentes áreas de la próstata de un mismo paciente, de forma que, de un mismo paciente con cáncer, extraían muestras con y sin tumor, dependiendo de la afectación tumoral o no de distintas áreas de la próstata. En

Discusión

nuestro análisis utilizamos sólo una muestra por paciente, e intentamos establecer en el análisis de enfermos y sanos si la presencia de tumor en un área de la próstata distinta del cilindro HR-MAS, podía influir en el perfil metabólico de éste. Este intento por conocer si la presencia de tumor en un área prostática diferente al cilindro medido podía influir en éste, sólo se ha llevado a cabo una vez, con un grupo escaso de 47 muestras derivadas de 22 pacientes (122).

Otro punto que diferencia nuestros resultados de los publicados hasta ahora es el uso de variables clínicas. Aunque algún trabajo ha utilizado alguna variable clínica aislada, como el PSA o la densidad de PSA (119, 191), en esta tesis se han analizado un gran número de variables clínicas, siendo todas ellas utilizadas en la práctica clínica habitual para el diagnóstico del cáncer de próstata. Además, se ha intentado integrar la información aportada por las variables clínicas con la información aportada por los espectros, obteniendo conclusiones importantes combinando ambas áreas.

6.4.1 Metabolitos destacados

Centrándonos en el caso concreto de los metabolitos con peso en la discriminación entre enfermos y sanos, es importante resaltar al glicerol-3-fosfolina. Se trata de una enzima clave en la biosíntesis de lípidos, que cataliza el paso inicial de síntesis de gliacilglicerol y fosfolípidos (204). Diferentes estudios han sugerido que la sobreexpresión de isoformas de esta enzima se relacionan con estados de resistencia a la insulina, obesidad, y alteración de la respuesta inmune (205-207). De sobra es conocido que los fosfolípidos son los principales componentes de las membranas celulares, y la alteración de su metabolismo está muy relacionado con el desarrollo de tumores, como se comentó en la introducción (147). Aunque nuestro estudio no es el primero hasta la fecha que describe la relación del glicerol-3-fosfolina con el cáncer de próstata en análisis con HR-MAS (111, 120, 183), es de destacar la alta odds ratio en el análisis multivariante de nuestros resultados (apartado 5.2.5). Pellon-Maison et al., mediante técnicas de bioinformática describieron una expresión aumentada de RNA mensajero de glicerol-3-fosfato acetiltransferasa-2, una enzima del grupo que estamos tratando, en casos con cáncer de próstata. De este modo, el 65% de las muestras tisulares con cáncer de próstata tenían una expresión aumentada de esta enzima, y

alrededor de un 30% una expresión moderada (208). Su presencia conllevaba un aumento en la tasa de proliferación celular y una resistencia a la apoptosis (208). Aunque pocos trabajos han relacionado enzimas de este grupo con el cáncer de próstata, sí que se han descrito asociaciones con otras neoplasias. Por ejemplo, Brockmoller et al. describieron, en un estudio de proteómica, la asociación entre la presencia de esta enzima y el cáncer de mama, siendo mayores sus niveles de expresión en tejido mamario tumoral frente a tejido mamario sano (209).

Otros metabolitos a destacar son la glicina y los derivados del glutamato, ambos aminoácidos aumentados en los grupos tumorales de nuestros modelos. La glicina interviene en la síntesis de ADN, fosfolípidos, colágeno y elastina (210). Hace décadas que se describió su papel citoprotector en el contexto de la muerte celular por necrosis (211). Este proceso, desencadenado por la alteración de la permeabilidad mitocondrial inducida por el calcio, está regulado en parte por la glicina. Por su parte, la vía del metabolismo del glutamato es una de las vías clave para el crecimiento de las células tumorales (212). El glutatión, derivado de la glutamina, es un importante regulador del estrés oxidativo. De hecho se han descrito estrategias para el tratamiento de neoplasias, consistentes en reducir el glutatión, inhibiendo así la capacidad antioxidante característica de las células cancerosas, lo que conduciría a niveles elevados de radicales libres en el interior de las células tumorales, conllevando esto a la muerte celular en dichas células (213). En el caso concreto de células tumorales prostáticas, el tratamiento específico con chalconas como la Flavokawina A, ha demostrado alterar la vía de la glutamina, produciendo la muerte celular mediante el mecanismo anteriormente descrito (214). Además, algunas enzimas del ciclo del glutamato se han descrito como predisponentes al cáncer de próstata, como la glutaminasa II. Ésta se encontraría aumentada en los casos de tumor prostático, mejorando las relaciones entre metabolitos de las células estromales y favoreciendo el desarrollo de células malignas (215).

A destacar también el metabolismo del inositol, dentro de la familia de las vitaminas B. Se trata de un poliol o polialcohol, que forma parte de las membranas celulares. Algunos estudios han descrito como el mio-inositol interviene en la estabilización de enzimas que actúan como precursoras del estrés oxidativo, como por

Discusión

ejemplo la proteinkinasa D1 (216), conllevando una disminución de la concentración de inositol una mayor actividad de estas enzimas. La presencia de inositol y sus derivados se ha descrito como supresor tumoral en cánceres de ovario, tiroides, mama, vejiga y próstata(217). El inositol y sus derivados son capaces de desfosforilar sustratos de lípidos y proteínas que se encuentran en las membranas de las células neoplásicas (218). Zhang et al, profundizaron más en la relación entre el inositol y el cáncer de próstata, concluyendo que algunos derivados del inositol como el inositol polifosfato fosfatasa-4, regulan el receptor de andrógenos en las células prostáticas. En células prostáticas de ratones observaron que el derivado del inositol modula la actividad transcripcional del receptor de andrógenos, además de suprimir rutas de señalización tumoral. La pérdida del derivado del inositol parecía contribuir al perfil transcripcional dependiente del receptor de andrógenos en el cáncer de próstata (217). Otros autores han publicado resultados en la misma dirección que los anteriores (216, 219, 220). En nuestros resultados, dentro de la vía metabólica del inositol, apareció como molécula relevante el ascorbato. A diferencia del mio-inositol y otras moléculas de esta ruta que se vieron como reguladoras y estabilizadoras de estados preneoplásicos, el ascorbato apareció en nuestros resultados en mayor concentración en enfermos respecto a sanos. Sólo un trabajo ha relacionado hasta el momento el ascorbato con el cáncer de próstata, y lo ha hecho en la misma dirección que nuestros resultados (185). Se desconoce el porqué de este hecho, diferenciándose el ascorbato del resto de moléculas de su ruta metabólica (las cuales se encuentran en mayor concentración en casos sanos).

En cuanto al citrato, desde hace décadas se ha descrito la relación entre sus niveles y la malignidad o benignidad del tejido prostático (221). Esta sal derivada del ácido cítrico, se comprobó en los estudios de Cooper como estaba elevada en tejido prostático sano, y muy disminuida en tejido prostático tumoral (222). Fue a partir de 1988 cuando se describió el potencial papel de técnicas de resonancia magnética para diagnosticar cáncer de próstata a partir de niveles de citratos (223). La relación entre los niveles de citrato y la presencia de tumor parecen estar influidos por los niveles de zinc y la oxidación. Las células epiteliales glandulares prostáticas normales son productoras de citrato, existiendo en ellas una alta acumulación de zinc. El zinc inhibe

la oxidación del citrato y permite que se mantengan elevados los niveles intracelulares. Por su parte, las células tumorales prostáticas pierden su capacidad para acumular zinc, probablemente debido a la pérdida de actividad del transportador de zinc. Esta incapacidad acarrea una oxidación del citrato y una disminución en sus niveles intracelulares, lo cual conlleva un aumento en la producción de ATP y del metabolismo en general en las células tumorales (221). También se han descrito los bajos niveles de citrato en mitocondrias que intervienen en la lipogénesis típica de muchos tumores (224). En publicaciones recientes se han corroborado estos datos, tanto en tejido prostático de ratas como en humanos (118, 120, 196, 197, 215). Además, los niveles bajos de citrato no sólo se han objetivado en tejido, sino también en suero y en líquido seminal de varones con cáncer de próstata (225). El citrato se ha descrito como un elemento relevante no sólo en el caso del cáncer de próstata, sino que sus niveles se han comprobado disminuidos en otros tipos de neoplasias, siendo un metabolito frecuente en los estudios que han intentado establecer perfiles o modelos metabólicos característicos en tumores(117). Así pues, nuestros resultados van completamente en la línea de lo descrito hasta el momento, ya que observamos que en los espectros los niveles de citrato eran mayores en los sanos. Este metabolito fue incluso el que presentaba un mayor VIP score en el análisis de enfermos-sanos según cilindro HR-MAS, lo cual mostraba la importancia del mismo dentro del modelo del PLS-DA.

Otra ruta metabólica implicada es la de la oxidación de los ácidos grasos. La carnitina es una amina sintetizada en hígado, riñones y cerebro a partir de dos aminoácidos, la lisina y la metionina. Los niveles de esta amina se han visto elevados en varones con cáncer de próstata y en casos con factores de riesgo asociados a esta neoplasia, como es el caso de hombres con obesidad (226). Algunos autores han descrito que la presencia de carnitina se relaciona con la capacidad de células tumorales prostáticas para metabolizar lípidos destinados a su crecimiento, sobre todo en estados avanzados de la enfermedad (227). Así pues, sus niveles están relacionados con los de los ácidos grasos intracelulares, y este hecho ha servido como diana de algunas terapias experimentales en el cáncer de próstata. Algunas nanopartículas derivadas de plantas como la witaferina A, han demostrado una regulación negativa del ARN mensajero y de diferentes proteínas que intervienen en la síntesis de carnitina

Discusión

y de ácidos grasos (228). Aunque nuestros resultados van en la línea de lo publicado hasta el momento (226-229), Baci et al. concluyeron en 2019 resultados contrarios a los descritos hasta el momento, afirmando que una molécula derivada de la carnitina, la acetil-L-carnitina, tenía propiedades antiangiogénicas y antiinflamatorias en las células prostáticas, disminuyendo el riesgo de cáncer de próstata (230). A pesar de esta controversia, queda claro que la síntesis de carnitina, promovida en el contexto de lipogénesis, aumenta la oxidación de mitocondrias y activa la señalización de vías oncogénicas en el cáncer de próstata (144). La presencia de otras moléculas derivadas de la oxidación de ácidos grasos, como el malonato o el metilmalonato, también se han visto elevadas en tejidos con cáncer de próstata (185).

Así pues, puede comprobarse que parte de los metabolitos destacados en nuestros resultados son útiles para corroborar las conclusiones de otros autores, por ser moléculas coincidentes con sus resultados y por ir en la misma dirección en cuanto a concentraciones aumentadas o disminuidas en casos con tumor. No obstante, nuestras conclusiones no sólo aportan la reproducibilidad de otros estudios con una muestra mucho más grande, sino que también hemos conseguido arrojar un número de metabolitos no relacionados hasta el momento, y que pueden servir para futuras investigaciones. Por ejemplo, entre nuestros metabolitos obtenidos destacan un gran número de azúcares que pueden incluirse dentro del metabolismo de carbohidratos diferente a la glicólisis. Con anterioridad ha sido descrito que las células tumorales prostáticas exhiben una glicólisis elevada para la obtención de energía y producción de biomasa. Un nivel elevado de fenotipo glicolítico, y enzimas de la glicólisis reguladas por el receptor de andrógenos como GLUT1, HK1, HK2 y PFK2, se han relacionado con fases avanzadas de la enfermedad (151). En investigaciones futuras sería interesante comprender si existe sobreexpresión de transportadores transmembrana como sucede en la glicólisis (como por ejemplo) el GLUT-1), lo cual sucede en células tumorales prostáticas y que podrían ser objetivo de dianas terapéuticas.

Además de carbohidratos no descritos hasta el momento, nuestros resultados también arrojaron aminoácidos nuevos en la caracterización de la huella metabólica de esta neoplasia. La valina, tirosina o fenilalanina son aminoácidos de cadena corta cuya presencia en tejido ha sido relacionada con el cáncer de próstata, todos ellos como

precursores de diferentes moléculas del ciclo de Krebs (185). Según nuestras conclusiones, aminoácidos como la cistationina, ha podido ser descrito como reflejo de presencia de tumor en tejido prostático. Otro aminoácido, como la creatinina, proveniente de la reacción de la creatina fosfato con ADO y protones para obtener energía, se vio como diferencial entre casos con y sin tumor. Futuros estudios de validación externa serían interesantes para corroborar nuestros resultados en este sentido.

Por último, comentar también como influyente a la serina y su metabolismo, presente en nuestros resultados en tejido, y como se comentará posteriormente, también en orina. Ningún estudio con HR-MAS había relacionado la presencia de serina con el cáncer de próstata, aunque sí algunos derivados de la misma como la glicina y la sarcosina. Añadir que, rutas como las del metabolismo de pirimidinas o del nicotinato, descritas por otros autores como importantes en la huella metabólica del tumor en tejido, no se reflejaron como tal en nuestros resultados (185).

Así pues, con los datos de este apartado queda demostrado que mediante una sonda HR-MAS es posible detectar la huella metabólica específica que el cáncer de próstata deja en el tejido prostático. Además de ello comprobamos que, incluyendo dos variables clínicas (el volumen prostático y el tacto rectal sospechoso) al modelo predictor con los metabolitos más influyentes detectados por la metabolómica, somos capaces de predecir mejor la presencia o ausencia de tumor en tejido. De esta forma, estas conclusiones abrieron la puerta al resto de resultados de este trabajo. Sabíamos que el cáncer de próstata tenía un perfil metabólico propio en tejido, pero, ¿este perfil podía obtenerse en cualquier localización de la próstata? ¿existían diferencias en este perfil en función del grado de agresividad tumoral? Este perfil claramente establecido en tejido, ¿se observaba también en orina?

6.5 PERFIL METABÓLICO EN TEJIDO PARA PREDECIR LA AGRESIVIDAD DEL CÁNCER DE PRÓSTATA. RESULTADOS PUBLICADOS

Otro de los objetivos de este estudio fue hallar perfiles metabólicos específicos para cada tipo de Gleason, con el objetivo de poder diferenciar mediante análisis HR-MAS entre casos con diferente agresividad tumoral. Este hecho es de suma importancia, ya que el comportamiento de las neoplasias prostáticas es muy diferente en función de su grado de Gleason, como se explicó en la introducción de esta tesis. En el caso del cáncer de próstata, el manejo de la enfermedad según los grados de Gleason es completamente diferente, pudiendo optar por un manejo conservador; por una vigilancia activa; o por tratamientos neoadyuvantes o más radicales en grados de Gleason altos (94, 100). La búsqueda de biomarcadores en este sentido viene sucediendo durante los últimos años, y la metabolómica ha intentado arrojar algo de luz al asunto.

Los primeros trabajos en metabolómica con este propósito surgieron en 2003 a partir del estudio de Swanson (120). En un trabajo donde se reclutaron 26 pacientes, se intentó separar casos con Gleason 6, frente a Gleason 7 o mayor. Se recogieron 8 varones con Gleason 6, y 5 con Gleason igual o mayor de 7. La colina apareció significativamente más elevada en casos con Gleason alto, mientras que el citrato y las poliaminas se encontraban más disminuidas en estos casos en comparación con los Gleason bajos (120). No se hallaron diferencias estadísticamente significativas, probablemente por la escasa muestra de casos reclutados.

Posteriormente, Stenman reclutó una muestra mayor, con 41 casos, intentando comparar los Gleason 6 y 7 (122). Estos autores utilizan relaciones de metabolitos, no niveles de metabolitos únicos, para extraer conclusiones. De esta forma, usan para normalizar los resultados los niveles de creatina, un ácido orgánico nitrogenado con el que clásicamente no han existido diferencias de concentración entre tejido prostático sano y tumoral. De esta forma, corroboran los hallazgos de Swanson, y establecen que la relación colina/creatina es mayor en los casos de Gleason 7 frente a los Gleason 6 (área bajo los picos, $2,33 \pm 1,86$ ppm frente a $1,71 \pm 1,87$ ppm, respectivamente). Por

el contrario, la relación mio-inositol/scilo-inositol se encontraba más disminuida en los Gleason 7 frente a los Gleason 6 (área bajo los picos, 4,28+/-1,55 ppm frente a 5,34+/-1,75 ppm, respectivamente). Los niveles de mio-inositol/scilo inositol también resultaron inferiores en tejido sano con respecto a tejido tumoral (122).

Keshari et al., con una muestra de 49 pacientes, los dividió en 3 grupos, uno con casos sanos, otro con Gleason 3+3 y 3+4, y otro con Gleason 4+3 o superiores. De nuevo los metabolitos derivados de la colina, pertenecientes al metabolismo glicerolfosfolípido, fueron útiles para distinguir entre tumores más o menos agresivos en base al Gleason (183).

Otro grupo que publicó sobre los diferentes perfiles metabólicos según Gleason fue el de Selnaes, comparando en este trabajo todos los grados de Gleason entre sí, recogiendo un total de 40 muestras provenientes de 13 varones. En total, de las 40 muestras consiguieron reclutar 10 Gleason 6, 7 Gleason 7, 6 Gleason 8, y 8 Gleason 9, 31 muestras tumorales en total. Tras medir el tejido con sonda HR-MAS, concluyen una correlación lineal entre los niveles de (colina+creatina+espermina) /citrato y el grado de Gleason. Estos resultados los reproducen tanto *ex vivo* (con la sonda HR-MAS), como *in vivo*, realizando una RMN a varones que van a ser intervenidos de prostatectomía radical, siendo este hecho el punto fuerte del estudio (121).

Por su parte, los estudios de Giskeodegard y Hansen coincidieron en los metabolitos disminuidos en casos con tumores agresivos: citrato y espermina. Aunque el primero de ellos utilizó el Gleason para definir la agresividad tumoral, el segundo aporta como novedad con respecto al resto de publicaciones que utiliza los niveles de expresión del gen TMPRSS2-EG, el cual ha sido propuesto como marcador de cáncer de próstata agresivo (184, 231). La espermina es uno de los productos finales del ciclo de la urea, a partir de la biosíntesis de poliaminas derivadas de este ciclo. Su función es importante para la supervivencia celular, ya que se encarga de estabilizar el ADN y las histonas, protegiendo al material genético de las nucleasas y manteniendo la transcripción. Los niveles bajos en células tumorales traducirían una proliferación celular descontrolada y disregulada, típica de los procesos neoplásicos. En cuanto al citrato, sus niveles bajos en cáncer de próstata se han relacionado con el hecho de que

Discusión

este componente es útil para la biosíntesis de lípidos, necesaria para la proliferación celular, como ya se ha comentado (223). En nuestros resultados, el citrato aparecía aumentado en casos sanos, tanto en tejido como en orina, coincidiendo con los resultados publicados.

Dentro de los trabajos publicados en esta línea, sólo en uno se utilizó la clasificación de la ISUP para etiquetar la agresividad tumoral, dividiendo una muestra grande de 394 pacientes en dos grupos: grados de la ISUP 1 y 2 frente a 3 o mayor (123). En este estudio, además de relacionar los metabolitos típicos derivados de la colina con tumores agresivos, también el mio-inositol y la valina se encontraron aumentados. El mio-inositol, es un producto del metabolismo del inositol, derivado del metabolismo de la glicólisis, estando descrito como aumentado en los procesos tumorales agresivos. Por su parte, la valina interviene en el metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada, suministrando succinato al ciclo de Krebs, produciendo así un aumento de energía en la célula(185). El modelo con los derivados de la colina, el mio-inositol y la valina mostró una precisión diagnóstica del 73% en este estudio (123).

Por último, el trabajo de Cheng et al. utiliza como marcadores de agresividad tumoral la invasión perineural y el TNM tras prostatectomía radical. Como sucedía con otros trabajos que habían clasificado la agresividad según Gleason, la colina y fosfocolina aumentados fueron los metabolitos que se relacionaron con el cáncer de próstata agresivo (119).

Por otro lado, el estudio de Stenman relacionó el perfil metabólico con el grado de división celular de varios tumores. Con 149 muestras neoplásicas, concluyeron que la relación (glicerolfosfocolina + colina)/creatina se encontraba aumentada en los casos con alta división celular, en comparación con los de baja división (122). En otro sentido, tomando la invasión perineural el tumor como un marcador de agresividad, sobre un grupo de 199 muestras tisulares se concluyó que niveles elevados de colina y fosfocolina predicen de forma independiente dicha invasión (119).

A continuación, se muestra la tabla 54 con un resumen de los estudios en los que se ha utilizado una sonda de HR-MAS para distinguir la agresividad del cáncer de próstata.

Tabla 54. Estudios en los que se ha utilizado una sonda de HR-MAS para distinguir estudiar la agresividad del cáncer de próstata.

AÑO	AUTOR	MUESTRAS INVESTIGADAS	METABOLITOS AUMENTADOS	METABOLITOS DISMINUIDOS*
2003	Swanson(120)	26 pacientes, 13 muestras Gleason 7 o mayor VS Gleason 6	Colina*	Citrato Poliaminas
2005	Cheng (119)	82 pacientes, 199 muestras Invasión perineural y TNM	Colina Fosfocolina	
2011	Stenman (122)	40 pacientes, 149 muestras Gleason 7 VS Gleason 6	Colina/Creatina*	Mio-inositol/scilo-inositol
2011	Keshari (183)	49 pacientes, 14 benignas VS 22 Gleason 3+3 o 3+4 VS 13 Gleason 4+3 o mayor	Fosfocolina y glicerolfosfocolina aumentados en alto grados respecto a bajo grado	
2013	Selnaes(121)	13 pacientes, 40 muestras Todos los Gleason	(Colina+creatina+espermina)/Citrato **	Ninguno
2013	Giskeodegard (184)	48 pacientes, 158 muestras Gleason 6 VS Gleason 7 o mayor	(Colina+creatina+p oliaminas)/citrato	Citrato Espermina
2016	Hansen (231)	41 pacientes, 129 muestras tumorales TMPRSS2-ERG alto VS bajo	Ninguno	Citrato Espermina
2018	Vandergrift(123)	394 pacientes, 394 muestras Grados ISUP 1-2 VS 3-4	Mio-inositol Glicerolfosfocolina Fosfocolina Valina	Ninguno
2020	Dudka (185)	16 pacientes, 70 muestras Gleason 6 VS Gleason 7 o mayor	Glutamato, Fosfocolina, Hipoxantina, Arginina y α -glucosa	Ninguno

* Primer grupo con respecto al segundo

**Gleason altos respecto a bajos

6.6 PERFIL METABÓLICO EN TEJIDO PARA PREDECIR LA AGRESIVIDAD DEL CÁNCER DE PRÓSTATA. RELEVANCIA DE NUESTROS RESULTADOS

Como se ha discutido en el punto anterior, los estudios publicados hasta el momento para comprobar si la metabolómica puede ayudar a distinguir entre los diferentes grados de Gleason, son escasos, por lo que consideramos que nuestros resultados son interesantes por arrojar algo más de luz sobre el tema. Además, nuestro estudio presenta una serie de puntos fuertes con respecto a los trabajos publicados hasta el momento. El primero de ellos es que hemos incluido todos los grados de Gleason, aunque para el análisis estadístico se categorizaron en dos grupos. Otros autores, probablemente debido a la escasa muestra que tenían, se limitaron a incluir sólo algunos Gleason, por ejemplo 6 y 7 (118, 122). Añadir que, como se dijo anteriormente, para este trabajo se ha recogido sólo una muestra por paciente, lo cual pensamos que puede ser más distintivo del perfil metabólico representativo que otros casos en los que de un mismo varón, se han extraído diferentes muestras tisulares para medir por HR-MAS (120-123). Aunque podría pensarse que medir diferentes muestras de un mismo varón es más representativo del perfil metabólico real, la mayoría de estudios etiquetan casos sanos y enfermos a partir un mismo paciente, según haya tumor o no en ese área concreta de próstata. Esto podría ser criticado, si se acepta la hipótesis de que los casos con tumor pueden afectar el metabolismo a distancia de áreas sanas.

Además de todo lo anterior, nuestro estudio presenta un número abundante de metabolitos (24 con VIP score por encima de 1 y 8 con VIP score por encima de 1,5) que hemos podido correlacionar con el Gleason, frente al resto de estudios en los que escasamente se han podido relacionar dos o tres metabolitos (usando valores de corte de VIP score similares a los nuestros), utilizando además la relación entre ellos para extraer conclusiones. Sobre el uso de variables clínicas para construir un modelo, como hemos hecho en nuestro trabajo, pocos autores las han incluido en sus modelos en los estudios de cáncer de próstata, y ninguno lo ha hecho para intentar relacionar un modelo con el Gleason (119, 191).

Por lo tanto, analizando nuestros resultados, podemos comprobar que la metabolómica obtuvo un modelo con buena discriminación entre individuos con Gleason distintos. En el PLS-DA se comprobó una disposición distinta de los casos en función de su perfil metabólico, incluso algún caso de Gleason 6-7 que se dispuso en la localización de Gleason 8 o mayor, se comprobó con la revisión de la historia clínica que eran casos con factores desfavorables durante el seguimiento, dejando abierta la posibilidad de que la metabolómica pueda predecir perfiles agresivos de la enfermedad. Esto ya se ha demostrado, por ejemplo, en tumores cerebrales, donde se ha comprobado que la metabolómica predice cambios metabólicos que predicen a los cambios histológicos agresivos (117). A pesar de estos resultados, hemos detectado al tacto rectal como una variable clínica que resulta ser útil para detectar la presencia de Gleason 8 o mayor, y tras analizar su modelo predictor, es muy similar al que puede aportar la metabolómica.

El principal problema que encontramos en este apartado fue la escasa muestra, ya que no en todos los cilindros HR-MAS se pudo obtener el Gleason. El hecho de tener una muestra pequeña puede ser el motivo de la falta de diferencias en el análisis de promedios de niveles de metabolitos entre los dos grupos, observándose falta de diferencias estadísticamente significativas, o intervalos de confianza muy amplios, a pesar de obtener un modelo derivado del PLS-DA bueno como se comprobó en la validación cruzada. Otro aspecto influido por la escasa muestra fue la agrupación en dos grupos de toda la muestra, cuando lo ideal hubiera sido dividir cada Gleason por separado con una muestra más grande. En el diseño de este análisis se planteó la agrupación llevada a cabo pensando en similitudes clínicas de los diferentes grados de Gleason. A pesar de todo, los resultados en este apartado fueron prometedores, siendo interesante comprobar si se reproducían, o incluso mejoraban, al analizar la agresividad tumoral obteniendo el perfil metabólico de la orina, con una muestra mucho más grande. Posteriormente nos propondríamos estudiar en orina el perfil metabólico, comprobando si con una muestra mayor, se reproducía o mejoraba la buena discriminación del modelo en tejido.

6.6.1 Metabolitos destacados y vías metabólicas en tejido relacionadas con la agresividad cáncer de próstata. Nuestros resultados.

El primero de los metabolitos a destacar dentro de este apartado es el 2-hidroxiacetato, compuesto que se engloba dentro de la vía de la cetosis (derivada de la glicólisis), y habiendo sido descrito como un biomarcador de la resistencia a la insulina (232). Entre los escasos metabolitos relacionados con la agresividad del cáncer prostático, no se había descrito previamente el 2-hidroxiacetato. Sí que se han intentado correlacionar sus niveles con la respuesta a la terapia de deprivación androgénica en este tumor, dada su relación con el metabolismo graso y la resistencia a la insulina. A pesar de que está demostrado un aumento de la insulina en ayunas en varones con bloqueo hormonal, no se observaron cambios en el 2-hidroxiacetato tras la instauración de este tratamiento en estos pacientes (232). Alguna molécula similar, y que participa en las mismas vías, como es el 3-hidroxiacetato, ha sido descrita como marcador de cáncer de próstata metastásico, por lo que moléculas de la misma familia se han relacionado con perfiles agresivos de la enfermedad (233). Incluso, en programas de quimioprevención tumoral mediante dieta, se ha descrito la disminución de hidroxiacetatos para lograr una reducción del riesgo del cáncer de próstata(234) .

Otro compuesto a destacar es la 1,3-dihidroxiacetona, perteneciente a la vía glicolítica(235). Esta vía ha sido relacionada de forma clara con el cáncer de próstata, como se comentó previamente. La alteración de las enzimas glucolíticas GLUT1, HK1, HK2 y PFK2, conlleva un aumento de compuestos como la 1,3-dihidroxiacetona(236). Aunque este hecho se ha relacionado con el cáncer de próstata, nunca antes se había establecido relación entre este metabolito y el cáncer de próstata de alto riesgo.

Por otra parte, la homocitrulina es un aminoácido derivado del ciclo de la urea, y que se excreta en grandes cantidades en orina. Este aminoácido, que a priori podría parecer inespecífico, no se ha descrito previamente como biomarcador de cáncer de próstata, sino en otras enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide o genéticas, como el síndrome de hiperornitinemia hiperamonemia(237). En el contexto del cáncer de próstata, el metabolismo de los aminoácidos representa una fuente de

carbono y nitrógeno en el ciclo del ácido tricarboxílico, produciendo NADPH. La glutamina se convierte en glutamato a través de la glutaminasa, y luego en α -cetoglutarato, que ingresa en el ciclo del ácido tricarboxílico, produciendo energía en forma de ATP celular, siendo utilizado por las células tumorales para su proliferación. Los receptores de andrógenos alterados en células prostáticas tumorales, se han comprobado como facilitadores para la acumulación de aminoácidos en el interior de las células, lo cual facilita la producción de ATP, además de la síntesis de nucleótidos, proteínas y lípidos (160, 161). Así pues, estos mecanismos descritos de metabolismo aumentado de aminoácidos en células tumorales podrían estar relacionados con nuestros hallazgos, donde comprobamos niveles aumentados de homocitrulina (como molécula de desecho en el ciclo de la urea) y de histidina en casos de tumores de alto riesgo.

En cuanto a la carnitina, ya se describió previamente como importante en la huella metabólica del cáncer de próstata. Esta amina sintetizada en diferentes órganos a partir de lisina y metionina, se ha descrito elevada en pacientes con fases avanzadas de la enfermedad (144, 150). La presencia de carnitina parece traducir la capacidad de las células tumorales de sintetizar ácidos grasos para su rápido crecimiento, mecanismo que podría justificar su presencia aumentada en Gleason 8 o mayor. La síntesis de ácidos grasos, de forma independiente con los niveles lipídicos circulantes, es un sello distintivo de cáncer de próstata. La ácido graso sintetasa, igual que otras enzimas lipogénicas y modificadoras de lípidos (ACAC, acetyl-CoA lipasa y SCD) se sobreexpresa en cáncer de próstata (151, 152). En concreto, la ácido graso sintetasa es una enzima citosólica que promueve la síntesis *de novo* de la cadena larga del palmitato. Este último y sus derivados son promotores de lípidos estructurales que se utilizan en la síntesis de membranas de células tumorales, además de ser un almacén de energía útil para la proliferación celular (150).

La creatinina, es el producto final del metabolismo de la creatina, encontrándose en grandes cantidades en los músculos y excretándose con la orina. Aunque en un principio se describió la ausencia de diferencia entre casos con y sin tumor, la creatinina ha sido utilizada posteriormente como biomarcador de cáncer de próstata, midiendo niveles incluso en saliva (238). Independientemente de la excreción

Discusión

renal de creatinina, los niveles de la misma se han visto elevados en varones con cáncer de próstata agresivo (238-240). La creatinina podría ser un biomarcador del metabolismo de la homocisteína y del metabolismo de un carbono, ambos implicados en la metilación, síntesis y reparación del ADN. Niveles aumentados de creatinina traducen una reducción de la disponibilidad de grupos de un carbono, y por lo tanto cierta predisposición de desarrollo de neoplasias (240). Algunos autores incluso han defendido el uso de los niveles de creatinina sérica en nomogramas para predecir la presencia de cáncer prostático (240).

El glutamato ya ha sido descrito previamente como molécula importante en el metabolismo del cáncer de próstata, en la vía de la glutaminólisis. La glutaminólisis representa una fuente de carbono y nitrógeno para las células tumorales. La glutamina se convierte en glutamato a través de la glutaminasa, y luego en α -cetoglutarato, que ingresa en el ciclo del ácido tricarboxílico, produciendo energía en forma de ATP celular. Adicionalmente, la glutamina contribuye a la acumulación de carbono mitocondrial para el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial y para la síntesis de nucleótidos, proteínas y lípidos(160). Una publicación reciente de Dudka et al, recogiendo una muestra de tejido con 59 casos sanos y 70 enfermos, con una metodología muy similar a la utilizada en esta tesis, confirman que un modelo con glutamato, fosfocolina, hipoxantina, arginina y α -glucosa, es predictor de agresividad en el cáncer de próstata. En este trabajo, los autores definieron un cáncer de próstata agresivo aquel con un Gleason igual o mayor de 7 (185). El glutamato también se ha relacionado con la actividad tumoral en la próstata, demostrando que los niveles intracelulares de glutamato disminuyen al tratar a los pacientes con antiandrógenos en desarrollo como la proxalumatida (241).

Por otra parte, en nuestros resultados encontramos otros metabolitos con VIP score por encima de 1 que no habían sido descritos hasta el momento en relación con la agresividad tumoral. Uno de ellos es el trans-aconitato, el cual se encuentra estrechamente relacionado con el citrato en el ciclo de Krebs. Se trata de un intermediario de la aconitasa, una proteína con hierro no hemo que cataliza el paso de citrato a isocitrato para la obtención de energía. El principal aspecto novedoso de nuestros metabolitos aportados, es a nivel de los aminoácidos. Aunque algunos como

el 2-hidroxiisovalerato o la lisina ya habían sido descritos por otros autores como aumentados en casos con Gleason altos, en nuestro PLS-DA también se vieron como influyentes otros como el glutatión, la leucina, la cistationina o la histidina, todos ellos productores de energía y/o precursores del succinato y de otras moléculas del ciclo de Krebs (185).

6.7 PERFIL METABÓLICO EN TEJIDO PARA PREDECIR LA RECIDIVA BIOQUÍMICA. RELEVANCIA DE NUESTROS RESULTADOS

Uno de los objetivos de esta tesis fue establecer si, mediante el perfil metabólico del tejido prostático, podía establecerse un modelo predictor de recidivas bioquímicas en aquellos casos de varones con cáncer de próstata que recibieron tratamiento. Los criterios aceptados para clasificar a un paciente como recidiva bioquímica fueron los utilizados en la práctica clínica habitual, expuestos en la introducción de esta tesis.

En caso de poder establecer una huella metabólica diferencial entre varones con cáncer que tienen una recidiva bioquímica tras tratamiento, podría realizarse un seguimiento más estrecho de éstos en la práctica clínica. Como ya se explicó en el apartado de tratamientos de la introducción, el hecho de desarrollar una recidiva bioquímica tras tratamiento conlleva unas implicaciones terapéuticas y de seguimiento en estos pacientes, por lo que sería interesante conocer qué sujetos tienen predisposición a alcanzar esta fase de la enfermedad. El perfil metabólico mediante sonda HR-MAS ya se vio anteriormente como útil en la distinción de casos con y sin tumor y en el de casos con Gleason alto y bajo, por lo que nos propusimos en este apartado comprobar la capacidad predictiva también para los casos con recidiva bioquímica.

Existen en la práctica clínica diferentes nomogramas que utilizan variables clínicas para intentar predecir este estado de la enfermedad, como se expondrá más adelante(242). En nuestros resultados, arrojamamos un modelo derivado del PLS-DA donde no existía una separación clara de la muestra en diferentes grupos, en función

Discusión

de su estado de recidiva bioquímica. No obstante, al seleccionar los metabolitos más influyentes, obtuvimos un modelo con buena capacidad discriminatoria (área bajo la curva de 0,87), demostrándose superior a aquel formado por variables clínicas.

Existen pocos trabajos publicados sobre metabolómica en tejido y recidiva bioquímica en cáncer de próstata. El primero de ellos fue el de Maxeiner en 2010 (124). En él, se recogen 16 casos consecutivos de varones que tuvieron una recidiva bioquímica tras prostatectomía radical, y los comparan con otros 16 casos sin recidiva. Los autores identifican 27 regiones influyentes en un PCA que son comunes en ambos grupos, y de ellas varias regiones que discriminan entre ambos grupos, creando un modelo con una precisión del 78% para predecir la recidiva bioquímica tras cirugía. Los metabolitos implicados con la recidiva bioquímica fueron la espermina, glutamina, mio-inositol, fosforil colina, scilo-inositol y el glutamato. Como metodología, utilizaron un análisis de correlación canónica, estudiando la relación bidireccional para descubrir la correlación entre dos conjuntos de datos(124).

La media de seguimiento tras tratamiento en este estudio fue de 47 meses, similar al nuestro (124). Para esta tesis, el periodo de reclutamiento y seguimiento fue de 4 años, sin llegar a alcanzar muchos pacientes un tiempo de seguimiento tras tratamiento que permitiese desarrollar una recidiva bioquímica, dada la historia natural del cáncer de próstata. En caso de un mayor seguimiento, habríamos conseguido una muestra mayor en el grupo de recidiva, siendo ésta una de las limitaciones de nuestro análisis. A pesar de todo, consideramos que nuestros resultados son interesantes en este punto, en primer lugar por la escasa literatura publicada hasta el momento sobre el tema, y en segundo lugar por haber localizado 9 metabolitos mediante HR-MAS que son capaces de crear un modelo con alta especificidad y valor predictivo negativo para predecir recidivas bioquímicas (93% y 84% respectivamente). Ninguno de los metabolitos con VIP score alto derivados de nuestro PLS-DA coinciden con los propuestos por Maxeiner en su publicación (124).

Otras dos publicaciones en esta línea son los trabajos de Braadland y Vandergrift (123, 243). El primero de ellos recogió una muestra de 110 pacientes intervenidos de

prostatectomía radical, 50 desarrollaron recidiva bioquímica y 60 no. Comprobaron mediante análisis de supervivencia que altas concentraciones intratumorales de espermina y citrato se relacionaban con casos libres de recidiva bioquímica; mientras que altos ratios de (colina total+creatina) /espermina y de (colina total+creatina) /citrato se asociaban con periodos cortos de tiempo hasta desarrollar la recidiva. Además, la espermina y la relación (colina total + creatina)/espermina se relacionaban de forma independiente en su análisis multivariante con el desarrollo de recidiva (243).

Por su parte, en el estudio de Vandergrift se recogieron de forma retrospectiva datos de 185 pacientes, de donde se extrajeron 365 muestras de prostatectomías por carcinoma, 15 muestras correspondientes a hiperplasia benigna y 14 muestras benignas provenientes de biopsia prostática. En este caso, los autores intentaron establecer un perfil metabólico diferente según agresividad tumoral (comparando grados de la ISUP), y estudiar la predicción mediante metabolómica de la recidiva bioquímica. Además de concluir concentraciones elevadas de mio-inositol, glicerolfosfocolina, fosfocolina y valina en muestras de grados de la ISUP altos, fueron capaces de establecer un modelo para predecir la recidiva. Con una tasa de verdaderos positivos del 83% para localizar recidivas, los metabolitos más influyentes fueron la colina, fosfocolina, glicerofosfocolina y glutamato; mientras que niveles altos de mio-inositol mostraban de forma significativa un menor riesgo de recidiva durante el seguimiento (123).

6.7.1 Metabolitos destacados y vías metabólicas en tejido relacionadas con la recidiva bioquímica. Nuestros resultados.

Sobre las rutas metabólicas más influyentes derivadas de nuestro PLS-DA, se comprobó que aminoácidos como la cisteína, elementos de la glicólisis como el glicerol, nucleósidos como la uridina o moléculas del ciclo del inositol como el ascorbato, estaban relacionados con los casos que desarrollaban recidiva bioquímica. Todos ellos han sido desarrollados en esta discusión, menos la uridina, perteneciente al metabolismo de la pirimidina, y ya descrita en algún trabajo como elevada en el casos con cáncer de próstata (185). La uridina confiere rigidez a la estructura del ARN, contribuyendo a su estabilización, a su actividad de decodificación y a la formación de

enlaces peptídicos. Su medición mediante análisis epitranscriptómico ha sido propuesto como marcador específico de cáncer de próstata (244) .

Así pues, con este apartado de la tesis, se observó que la metabolómica mediante HR-MAS es una buena herramienta para clasificar de forma correcta a los casos sin recidiva bioquímica. Se comprobó que las vías metabólicas de aminoácidos como la cisteína, de alcoholes como el glicerol, de nucleósidos como la uridina, o de sales cálcicas como el ascorbato, pueden relacionarse con la recidiva bioquímica en cáncer de próstata. Además, por lo visto en los resultados de modelos con variables clínicas, éstas no fueron capaces de predecir el estado de recidiva. Por lo tanto, el modelo aportado por la metabolómica mediante HR-MAS es superior al de las variables clínicas, y puede ayudar en la predicción del desarrollo de recidiva bioquímica en cáncer de próstata.

6.8 PERFIL METABÓLICO EN TEJIDO PARA PREDECIR LA PRESENCIA DE CÁNCER EN CUALQUIER LOCALIZACIÓN DE LA PRÓSTATA

Siguiendo con otro de los objetivos de esta tesis, se intentó establecer si, mediante el análisis metabólico con sonda HR-MAS de un cilindro de tejido, somos capaces de localizar el tumor no sólo en el tejido sometido a RMN, sino también en cualquier otra localización dentro de la próstata. El hecho de que exista una huella metabólica específica de cáncer en tejido con tumor podría parecer, a priori, un resultado lógico. No obstante, pensando en futuras aplicaciones clínicas, es mucho más interesante imaginar un perfil metabólico característico del tumor que se detectara, no sólo en tejido tumoral, sino incluso en tejido sano dentro del mismo órgano con afectación tumoral en otra localización. La hipótesis es que el metabolismo celular tumoral podría influir a distancia en áreas sanas dentro de la próstata. Si se confirmara esta hipótesis, podrían llevarse a cabo biopsias prostáticas mucho menos agresivas, con por ejemplo la toma de un solo cilindro de tejido, ya que con el estudio metabólico del mismo podría establecerse el diagnóstico del cáncer localizado a distancia.

Con el diseño de la presente tesis hemos sido capaces de estudiar este hecho, ya que contamos con el estudio histológico tanto de los cilindros HR-MAS como de los cilindros de la biopsia estándar. Ya se vio anteriormente que el tejido tumoral medido con sonda HR-MAS es distinto del sano, pero, ¿qué ocurre con los casos que tienen tejido medido con HR-MAS sano en la histología, pero con tumor en alguno de los cilindros de la biopsia estándar? Así pues, el grupo de interés a estudio para este punto es el que aparece en la tabla 10 como "biopsia +, cilindro -" compuesto por 51 casos (25,4% de la muestra).

Como se observa en el apartado de resultados, en el PLS-DA que obtuvimos se comprueba que la localización del grupo de interés dentro del diagrama de puntos era muy similar al de los casos sanos, sin tumor en ninguno de los cilindros. En caso de haber hallado de un perfil metabólico en el grupo de interés más cercano a los casos con tumor en el cilindro HR-MAS, habría sido interesante calcular un modelo predictor, para comprobar si sólo con una muestra de próstata puede diagnosticarse tumor en cualquier área dentro del órgano, reduciendo así la invasividad de la biopsia.

Dos autores han utilizado la localización de la muestra dentro del órgano como variable a tener en cuenta en sus resultados. El trabajo de Giskeodegard ya fue citado al revisar los estudios sobre la agresividad tumoral. Sobre 158 muestras provenientes de prostatectomía radical de 48 pacientes, concluyeron que niveles altos de colina, poliaminas y creatina, y niveles bajos de espermina y citrato, se relacionaban con tumores con Gleason 7 o mayor. Además de esto, como las muestras tisulares eran cortes axiales de las próstatas, pudieron estudiar el factor distancia entre el tumor y las zonas sanas adyacentes. Tomaron muestras de tejido de 3 mm, tanto de las zonas con tumor en la histología como de las zonas adyacente sin tumor. Las concentraciones de espermina, alanina, citrato e isoleucina, eran diferentes entre el tejido tumoral y el sano adyacente, sin aparente influencia en el perfil metabólico de la zona sana por la zona tumoral cercana (184).

Por su parte, el grupo de Stenmnan también obtuvo resultados en función de la localización tumoral. Utilizaron 149 muestras de 40 pacientes, obtenidas tras prostatectomía. Comprobaron que la distancia al tumor más cercano afectaba al perfil

Discusión

metabólico del tejido sano, de forma que conforme más cerca se encontraba el tumor, más alta era la relación colina/creatina, y más baja la relación mio-inositol/scillo-inositol. Aunque esta relación alcanzó la significación estadística, la correlación fue muy débil (122).

Así pues, a pesar del diferente diseño y método, los trabajos publicados en este contexto van en la línea de nuestros resultados, ya que el perfil metabólico del tejido sano medido por HR-MAS parece ser diferente del tumoral, independientemente de la presencia neoplásica en otra localización del órgano. Según el trabajo de Stenman, sí existía cierta correlación entre distancia al tumor y metabolismo del tejido sano, de forma que en un análisis de correlación así lo demuestran, aunque los autores citan como limitación de sus resultados una correlación débil, por lo que estos datos deben interpretarse con cautela(122).

En nuestros resultados, tras observar el PLS-DA, se comprueba que el grupo proyectado no difiere de los sanos, y que por lo tanto el modelo derivado del perfil metabólico de tejido no diferencia entre el hecho de tener tumor en otra localización dentro del órgano y no tener tumor. Algunos puntos se podrían discutir en relación a esta falta de separación entre grupos para la localización a distancia del tumor. El primero de ellos es que, para este estudio, fue registrada la localización de cada uno de los diez cilindros de la biopsia estándar, pero no la localización del cilindro HR-MAS. Por lo tanto, el factor distancia no se tuvo en cuenta para este análisis. Tal vez el perfil metabólico podría ser más cercano al tumoral cuanto más cerca de esa zona tumoral se encontrase el tejido sano, y más distinto conforme más alejado se encontrase del tumor. Es por ello que, finalmente, hemos tratado de desarrollar una huella metabólica de cáncer de próstata en orina. De esta forma, la localización exacta del tumor no sería un factor importante a considerar, además de tratarse de un método menos invasivo.

6.9 BIOMARCADORES METABÓLICOS DE CÁNCER DE PRÓSTATA EN ORINA

Los cambios en la concentración de metabolitos en los diferentes fluidos corporales son un reflejo de los estados fisiológicos y patológicos de un individuo. El metaboloma en cualquier muestra biológica, representa el producto final de lo que se conoce como "cascada ómica", y da lugar al estado de salud o enfermedad del sujeto en cuestión. Así pues, las firmas metabólicas obtenidas a partir de biofluidos pueden ser un enfoque útil para identificar biomarcadores no invasivos y caracterizar los mecanismos moleculares asociados a condiciones patológicas. Con esa idea nos movimos en este trabajo, desarrollando todos los subapartados del análisis en orina (245).

Las muestras de orina ofrecen algunas ventajas para la realización de estudios metabolómicos, ya que pueden ser recolectadas de forma no invasiva(246). Sin embargo, en el análisis metabólico de la orina se han descrito varias limitaciones, siendo la principal la presencia de componentes urinarios abundantes y diluidos, que pueden resultar en la no detección de metabolitos poco representados en la muestra o en la identificación errónea de algunas moléculas (246, 247). Como se ha comentado previamente, la orina es el vehículo final que transporta metabolitos provenientes de abundantes vías metabólicas, las cuales son modificadas en función de la alimentación, tratamientos farmacológicos del paciente o perfil genético, lo cual puede dificultar la interpretación de los perfiles metabólicos. A pesar de este hecho, son varios los estudios que han demostrado la utilidad de la metabolómica para detectar biomarcadores para el cáncer de próstata. Es característico de estos estudios el uso de abundantes metabolitos para construir modelos predictivos, dado el carácter de vehículo final de abundantes rutas metabólicas. Como se comentó previamente, esto diferencia los estudios metabólicos en orina de los llevados a cabo en tejido, donde normalmente se utilizan modelos con escaso número de moléculas. Un resumen de las publicaciones de metabolismo en orina sobre cáncer de próstata puede observarse más adelante en la tabla 55.

6.9.1 Metabolismo en orina para diagnosticar cáncer de próstata

La mayoría de los estudios han tenido como objetivo la identificación de desregulaciones metabólicas que pudieran proporcionar biomarcadores relevantes en la práctica clínica habitual. La mayoría de los trabajos se han centrado en la caracterización de las diferencias metabólicas entre muestras de orina de individuos sanos (229, 248-252) o con hiperplasia benigna (247, 253, 254) y pacientes con cáncer de próstata. En general, se ha utilizado en los estudios la metabolómica basada en espectrometría de masas como método analítico (8 trabajos), y sólo uno se llevó a cabo utilizando espectroscopia de RMN para analizar las muestras de orina (253).

El estudio realizado por Liang et al., incluyó 223 pacientes sanos y 236 con cáncer, destacando en sus conclusiones la utilidad de 3 metabolitos: 5-hidroxi-L-triptófano, hipurato y el ácido glicocólico, como posibles marcadores en el diagnóstico precoz del cáncer de próstata. Obtuvieron para su modelo un área bajo la curva muy buena, de 0,95 (248). Probablemente la molécula más llamativa en este trabajo fue el 5-hidroxi-L-triptófano, el cual se encuentra involucrado en el metabolismo del triptófano, una vía que se ha asociado con la capacidad de varios tumores para evadir la respuesta inmunitaria antitumoral (255, 256). Otro metabolito involucrado en esta vía es el ácido quinurénico, el cual mostró un valor diagnóstico moderado (área bajo la curva de 0,62) en el estudio de Gkotsos et al., para la detección de cáncer de próstata utilizando muestras de orina obtenidas tras masaje prostático(249).

Otro metabolito a resaltar, que se ha investigado extensamente como posible biomarcador en orina, es la sarcosina. Ésta es un producto intermedio en la síntesis y degradación de la glicina. En 2009, Srrekumar et al. identificaron la sarcosina como un posible marcador de cáncer de próstata, estando incluso relacionada con la progresión del tumor, y siendo detectable en niveles más altos en orina en casos con tumor en comparación con pacientes sin tumor (91). Del mismo modo, Kahn et al. concluyeron en 2013 que los niveles de sarcosina son significativamente más elevados en sedimentos urinarios de pacientes con cáncer de próstata en comparación con individuos sanos (257). En suero, el grupo de Kumar también encontró mayores niveles de sarcosina en un grupo de pacientes con carcinoma prostático (258, 259). En estos

estudios se demostró que la sarcosina, en combinación con otros metabolitos, puede diferenciar con precisión pacientes con cáncer de próstata de individuos sanos (precisión del 90,2%)(259), y también diferenciar entre casos con cáncer y con hiperplasia benigna de próstata (sensibilidad del 87,7% y especificidad del 85,5%)(258). Además, los autores demostraron que la metabolómica proporciona mejores predicciones que los niveles séricos de PSA para la discriminación entre pacientes con cáncer de próstata y pacientes sanos, así como entre individuos con cáncer y con hiperplasia benigna. Sin embargo, el papel de la sarcosina como biomarcador metabólico en el contexto del cáncer de próstata sigue siendo controvertido, dados los resultados contradictorios obtenidos en estudios posteriores. En un estudio de casos y controles publicado por Ankerst et al., se investigó el uso de la sarcosina como biomarcador para la detección precoz del carcinoma prostático en muestras de suero, entre un grupo de pacientes con cáncer y un grupo control. Estos autores concluyeron que no había diferencias en los niveles de sarcosina al comparar ambos grupos(260). Además, en otro estudio de Derezinski, donde se encontraron niveles más altos de sarcosina sérica en pacientes con neoplasia en comparación con pacientes sanos, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en las muestras de orina (261). Del mismo modo, Pérez-Rambla et al., encontraron niveles elevados de este metabolito en pacientes con cáncer en comparación con pacientes diagnosticados de hiperplasia benigna, aunque esas diferencias no alcanzaron la significación estadística (253).

Más allá de la alteración en los niveles de sarcosina, el grupo de Pérez-Rambla también identificó alteraciones en los niveles urinarios de 6 metabolitos que facilitaron la discriminación del perfil metabolómico entre pacientes con carcinoma y con hiperplasia benigna (253). Entre los hallazgos más importantes, los pacientes con cáncer de próstata mostraron niveles disminuidos de glicina, un metabolito implicado en el metabolismo de un carbono y asociado a la transformación celular y a la génesis celular (262). De forma contraria, el grupo de Struck-Lewicka informó de niveles más disminuidos de glicina en muestras de orina en el grupo de enfermos en comparación con los sanos (250). Los resultados de este estudio mostraron alteraciones en los niveles urinarios de metabolitos asociados al ciclo de Krebs, además de purinas, glucosa, y otros del metabolismo de aminoácidos y del ciclo de la urea. Estos hallazgos

Discusión

coinciden con los obtenidos por Fernández-Peralbo et al., donde variaciones en los niveles de 28 metabolitos involucrados en el metabolismo de aminoácidos, purinas y pirimidinas, además del triptófano, se identificaron como elevados al comparar el perfil metabólico en orina de sujeto enfermos con sanos (251). Los resultados de este estudio conllevaron un modelo predictor de alta capacidad discriminatoria, con una sensibilidad del 88,4% y una especificidad del 92,9%.

En nuestros resultados, utilizamos un total de 28 moléculas para construir el modelo diagnóstico de cáncer de próstata en orina. Aunque la capacidad discriminatoria del conjunto de éstos era similar a la de las variables clínicas, al combinar variables clínicas y metabolitos se alcanzó un modelo con un área bajo la curva de 0,89, y con buena capacidad para detectar a los casos con tumor, con una sensibilidad del 89%. Así pues, los resultados de esta tesis se aproximan a los del trabajo publicado hasta el momento en este contexto con los valores más óptimos en su modelo, utilizando el mismo número de metabolitos en el análisis y con parámetros de calidad del modelo muy similares. (251).

Así pues, según nuestros resultados, el perfil metabólico en orina es útil para diagnosticar cáncer de próstata si se combina con dos variables clínicas fáciles de obtener en la práctica clínica, como son el volumen prostático y la sospecha tumoral ecográfica. Las vías metabólicas que se relacionaron con el cáncer de próstata en el análisis con HR-MAS, se han visto también en orina, aunque con metabolitos distintos. Nuestros resultados arrojan un conjunto de 28 biomarcadores que, obtenidos de forma no invasiva, se relacionan con la presencia de cáncer de próstata. El uso exclusivo de las variables clínicas, o del perfil metabólico por separado, aún siendo buenos modelos, no alcanzan los valores de área bajo la curva, y tasa de verdaderos positivos/negativos y sensibilidad del modelo combinando a ambos.

6.9.2 Metabolismo en orina según agresividad tumoral y según recidiva bioquímica

Se han identificado cambios en el perfil metabólico al comparar muestras de orina en pacientes con cáncer de próstata de alto y de bajo riesgo. Heger et al. realizaron un estudio centrado en la caracterización de diferencias en niveles de

expresión de proteínas entre dos grupos de riesgo diferentes de pacientes que habían sido intervenidos de prostatectomía radical (263). Las dos cohortes experimentales (con 15 sujetos cada una) se dividieron en función de la presencia de márgenes quirúrgicos positivos (considerando tumores muy agresivos) o negativos (considerando tumores poco agresivos) para carcinoma. El análisis condujo a la identificación de 3 proteínas con diferentes niveles de expresión. Entre ellas, destaca la enzima glucolítica lactato deshidrogenasa C (LDHC), la cual desempeña un papel clave en el metabolismo tumoral (relacionada con los niveles de lactado), se detectó a niveles más altos en pacientes con márgenes positivos (263). Más allá del cáncer de próstata, también se ha observado un aumento de la expresión de LDHC en otros tumores, como melanoma, pulmón o mama (264). Además, se ha demostrado que esta enzima se encuentra involucrada en la invasión tumoral y en la migración de células tumores en carcinoma mamario (265).

En general, los estudios publicados (tabla 55) concluyen que el perfil metabólico en orina de los pacientes con cáncer de próstata es significativamente diferente del de individuos sanos; y también existe diferencia según agresividad tumoral (caso de alto/bajo riesgo). En conjunto, alteraciones en los niveles de metabolitos involucrados en el ciclo de Krebs, triptófano, aminoácidos de cadena ramificada, ácidos grasos y nucleótidos han sido descritas. Una limitación común en este tipo de trabajos es el tamaño muestral pequeño, a excepción del estudio de Liang, donde recogieron 469 muestras de orina (248). Por lo tanto, más análisis y estudios de validación serían necesarios para aceptar estas conclusiones e intentar su aplicación en la práctica clínica. En el caso concreto de la recidiva bioquímica, ningún estudio que utilice el análisis metabólico en orina ha sido publicado hasta el momento, siendo los resultados de esta tesis los primeros expuestos en esta línea.

Tabla 55. Estudios de metabolómica centrados en el análisis de orina para identificar biomarcadores en cáncer de próstata (ordenados cronológicamente).

AÑO	AUTOR	MUESTRAS INVESTIGADAS	METABOLITOS AUMENTADOS	METABOLITOS DISMINUIDOS *
2015	Heger (263)	30 casos tumorales, 15 cáncer de alto riesgo VS 15 de bajo riesgo	CDK6, M2BP, LDHC	
2015	Struck-Lewicka (250)	64 casos, 32 con cáncer VS 32 sanos	Diferencias significativas en 82 metabolitos	
2016	Fernández-Peralbo (251)	72 casos, 43 con cáncer y 29 sanos	7-metilguanina	27 moléculas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos
2017	Pérez-Rambla (253)	115 casos, 64 con cáncer de próstata y 51 con hiperplasia benigna	Aminoácidos de cadena ramificada Glutamato Pseudouridina	Glicina Dimetilglicina Fumarato 4-imidazol-acetato
2017	Puhka (229)	9 casos, 3 pre-prostatectomía VS 3 post-prostatectomía VS 3 sanos		Pre-prostatectomía frente a los otros grupos: Glucoronato Isobutiril-L-carnitina D-ribosa-5-fosfato
2017	Gkotsos (249)	101 casos, 52 con cáncer VS 49 sanos		Ácido quinurénico
2017	Liang (248)	469 casos, 236 con cáncer VS 233 sanos	Ácido glicocólico Hipurato Ácido quenodeoxicólico	Ácido taurocólico 5-hidroxi-L-triptófano
2018	Clos-García (247)	45 casos, 31 con cáncer VS 14 sanos	Diferencias en 76 metabolitos y 7 enzimas del ciclo de la urea, ciclo de Krebs y metabolismo de hormonas esteroideas, leucotrieno, prostaglandinas, linolenato, purinas, glicerolfosfolípidos y triptófano	

* Primer grupo con respecto al segundo

**Gleason altos respecto a bajos

CDK6: quinasa ciclina dependiente 6, M2BP: proteína de unión a galectina-3, LDHC: lactato deshidrogenasa C, FABP-5: proteína de unión a ácidos grasos-5, AMBP-1: alfa-1-microglobulina/bikunina, CHMP: proteína corporal multivesicular cargada

6.10 UTILIDAD DE LOS NOMOGRAMAS CLÍNICOS Y MODELOS PREDICTIVOS EN CÁNCER DE PRÓSTATA

6.10.1 Modelos utilizados en la práctica clínica habitual

El uso de nomogramas es un hecho común en la práctica clínica habitual para pacientes con cáncer de próstata, por lo que más adelante en esta discusión se llevará a cabo la comparación de algunos de los más frecuentes con los modelos obtenidos en esta tesis.

Los nomogramas como representación gráfica inteligible de modelos matemáticos multivariantes complejos, son una realidad incuestionable en el ámbito científico del cáncer de próstata. De hecho, los modelos de análisis multivariante convencionales basados en modelos de regresión logística o regresión de riesgos proporcionales de Cox, con sus habituales tablas de medición de asociación de variables predictivas y variable resultado mediante odds ratio y hazard ratio, han dado paso en la actualidad a la representación gráfica de todo ello en forma de nomogramas (242). En este enfoque la finalidad deja de ser medir la asociación de variables independientes y variable dependiente, para abrir paso a la estimación de una puntuación, que finalmente se transformará en una probabilidad de que ocurra el evento que se está estudiando (266).

Algunos principios básicos para que un modelo o nomograma sean implementados en la práctica clínica habitual son: la correcta discriminación, la utilidad clínica o una buena calibración. Sobre la calibración, ésta característica pretende evidenciar si las probabilidades que asigna el modelo predictivo de ocurrir un determinado evento, se corresponden con la realidad de que ocurra ese evento. Ello se suele expresar mediante curvas de calibración sobre un eje de coordenadas. En el eje de abscisas se sitúan las probabilidades asignadas por el modelo y en el eje de ordenadas la frecuencia real de aparición del evento. En estas curvas se dibuja la nube de puntos sobre el gráfico ubicando cada subgrupo de pacientes en la coordenada definida por la probabilidad asignada por el modelo de aparición del evento y la realidad observada para ese grupo de pacientes. De este modo, un modelo bien

Discusión

calibrado será aquel en el que la curva de calibración que recorre la nube de puntos trazada por los diferentes subgrupos, discorra por la bisectriz del ángulo (242, 266).

Uno de los principios básicos de los nomogramas y modelos es la discriminación, haciendo referencia a la capacidad para separar los casos de los controles. Este parámetro se estudia mediante el análisis del área bajo la curva de rendimiento diagnóstico, a partir de los modelos construidos mediante regresión logística o mediante regresión de Cox. En las curvas ROC, el área bajo la curva indica la probabilidad de que dada una pareja de sujetos, uno afectado por el evento a estudio y el otro no, cuál es la probabilidad de que el modelo asigne más riesgo/probabilidad de tener el evento al que lo tiene frente al que no lo tiene (267). Una explicación detallada de las curvas ROC puede encontrarse en el anexo III.

Otro aspecto crucial es la utilidad clínica, siendo una de las piedras angulares que limita el uso y difusión de los nomogramas y modelos predictivos multivariantes. En muchas ocasiones, los modelos publicados aparentan ser potencialmente interesantes, pero acaban teniendo escasa trascendencia en la práctica clínica habitual. Aunque se han descrito diferentes percepciones de la utilidad de los modelos en cáncer de próstata, en función por ejemplo del grado de subespecialización del clínico (268), existen hoy en día herramientas objetivas para evidenciar y cuantificar la utilidad clínica de estos modelos. Actualmente el elemento más utilizado para evaluar la utilidad clínica son las curvas de decisión de Vickers, las cuales permiten visualizar de un modo gráfico el beneficio clínico neto obtenido al escoger un determinado punto de corte de la predicción (beneficio expresado como la relación entre verdaderos positivos y falsos positivos para cada punto de corte)(269).

El último punto a tener en cuenta hace referencia a la sencillez del modelo, siendo un elemento clave para su implementación en la práctica diaria. Si el diseño del modelo o nomograma es farragoso, restará capacidad de implementación. A pesar de todo, en la era digital actual, la mayoría de los modelos en cáncer de próstata están presentes en "APP" para teléfonos inteligentes o directamente en páginas web (270).

Descritos los principios básicos de cualquier modelo o nomograma ideal, se muestran a continuación los modelos aceptados en la práctica clínica actual sobre diagnóstico y agresividad tumoral en cáncer de próstata:

- Pre-diagnóstico: probabilidad de padecer un cáncer de próstata de alto riesgo (Gleason >7)

En este ámbito se han descrito diferentes modelos a partir de los estudios Prostate Cancer Prevention Trial (PCPT), Reduction by DUtasteride of prostate Cancer Events (REDUCE), modelo canadiense Sunnybrook, European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC), y Asian Medical Center:

- PCPT (271).
- REDUCE (272, 273).
- Sunnybrook (82) .
- PCPT (274).
- Asian Medical Center (275).

- Pre-prostatectomía: estimación del estadio patológico

Dentro de este área disponemos de las tablas de Partin, y del nomograma procedente del Memorial Sloan-Kattering Cancer Center (MSKCC)

- Tablas de Partin (276).
- Nomograma-MSKCC (277, 278).

- Pre-prostatectomía: estimación de supervivencia libre de metástasis (SLM), supervivencia libre de recidiva bioquímica (SLRB), supervivencia global (SG) y supervivencia cáncer específica (SCE)

En este grupo se engloban modelos basados en el CAPRA-score de la Universidad de California, nomogramas del MSKCC, John Hopkings, y la provincia de Quebec en Canadá.

- SLRB, SLM, SCE y SG, basado en CAPRA-score (279).

Discusión

- SLRB a 5 y 10 años, SCE a 10 y 15 años, basado en nomogramas MSKCC(280).
- SLRB a 3, 5, 7, y 10 años, basado en la serie del John Hopkings (281).
- SG a 10 años, basado en la serie de Quebec (282).

- Pre-braquiterapia: estimación de SLRB

- Modelo del MSKCC para estimar SLRB a 5 años (283).

- Pre-radioterapia externa: estimación de SG

- Modelo basado en la serie de Quebec para estimar SG a 10 años (282).

- Post-prostatectomía: estimación de SLRB y SLM

De nuevo existen diferentes series y objetivos en este grupo:

- SLRB a 2 años, modelo de la Universidad de Hamburgo (284).
- SLRB a 2, 5, 7 y 10 años, modelo del MSKCC (285).
- SLRB a 3, 5, 7 y 10 años, modelo del John Hopkings (281). SLRB y SLM a 5, 10, 15 y 20 años, modelo del Virginia Mason Medical Center (286, 287).

- Post-recidiva: estimación de SLRB y SCE

Se distinguen dos posibilidades en el tratamiento post-recidiva:

- SLRB-6 años tras radioterapia de rescate (288).
- SCE-2, 3, 4 y 5 años en hormonoterapia tras prostatectomía (289).

- CPRC: Estimación de SG

Existen tres modelos predictores en este contexto:

- SG-1 y 2 años, en CPRC (290).
- SG-1, 2, 3, 4 y 5 años, en CPRC (291).
- SG-6, 12 y 14 meses, en CPRC (292).

6.10.2 Marcadores presentes y futuros en la práctica clínica

Además de disponer de los modelos anteriormente citados y ligados directa o indirectamente con la agresividad del cáncer de próstata, existen marcadores relacionados con la enfermedad y con implementación presente o cercana al uso en la práctica clínica habitual (293). Estos marcadores han sido utilizados como variables independientes en determinados modelos. Los que han irrumpido de forma más reciente son los siguientes:

- **PCA3:** Es un antígeno específico de cáncer de próstata (*prostate cancer antigen 3*). Se trata de un ARN no codificante específico de próstata, altamente sobreexpresado en casos con cáncer de próstata. Su cuantificación se obtiene a partir de la primera micción tras masaje prostático. Actualmente su uso está aprobado para mejorar la indicación de biopsia tras una primera biopsia negativa, aunque también se ha descrito su uso en primera biopsia, exponiéndose un nomograma que incluye al PCA3 en la indicación de primera biopsia (294). Los modelos que han incluido al PCA3 han ganado en más de un 7% la precisión diagnóstica, mientras que se ha descrito un ahorro de un 55% de biopsias "innecesarias"(294). Un grupo español incluso llegó a exponer, mediante densidad de probabilidad, puntos de cortes en un nomograma que utilizaba al PCA3 para la identificación de cáncer prostático de alto riesgo(295).
- **Coeficiente PHI (*Prostate Health Index*):** El proPSA es una isoforma del PSA Libre. Su determinación en sangre se contrasta con PSA total y PSA libre mediante una fórmula matemática de la que se obtiene el Coeficiente PHI. Este parámetro ya ha sido incluido en la actualidad en nomogramas para la estimación del riesgo de cáncer prostático en primera biopsia con prometedores resultados(296), así como en la estimación de cáncer de alto riesgo, si bien todavía no implementado en formato de nomogramas. Lughezzani et al. describieron que el coeficiente PHI predecía mejor (área bajo la curva 0,68) que el PSA total y el PSA libre (áreas de 0,51 y 0,64 respectivamente) la presencia de cáncer en la biopsia, con una precisión predictiva del 75,2% (296).
- **4K score test:** Se trata de un modelo construido a partir de la determinación sanguínea de 4 calicreínas, el PSA total, PSA libre, PSA intacto y la calicreína

humana 2. Inicialmente se construyó un nomograma útil para determinar el riesgo de biopsia positiva para cáncer con prometedores resultados (297). Los autores de este estudio obtuvieron modelos con áreas bajo la curva de 0,68 y 0,72 utilizando edad y PSA; y edad, PSA y tacto rectal, respectivamente. Al añadir el 4K score test, el área bajo la curva de su modelo ascendió a 0,84, además de establecer puntos de corte para su implementación en la práctica clínica(297). No obstante, en los últimos años se ha centrado la investigación y su implementación clínica en la capacidad para predecir cáncer de próstata de alto riesgo, con bastantes buenos resultados. Parekh et al. describieron un modelo que incluía el 4K con un área bajo la curva de 0,82 para diagnosticar casos de Gleason 7 o mayores, con una reducción de biopsias consideradas "innecesarias" del 30-58% (298).

- *Cell Cycle Progression (CCP), Prolaris® score*: En este modelo, la predicción se establece tras el análisis histológico de la biopsia de la pieza de prostatectomía, investigando en ella 31 genes relacionados con el ciclo celular y con la progresión de la enfermedad. También se analizan 15 genes controles, en total 46. Este modelo se ha comparado con el CAPRA-score, mostrándose superior en sus estimaciones tras prostatectomía radical y tras radioterapia externa. Tras prostatectomía radical, se ha demostrado que por cada punto de aumento del CCP, se multiplicaba por 2,1 el riesgo de recidiva bioquímica (299). Por otra parte, tras radioterapia, se ha descrito que cada punto de más en el CCP multiplicaba por 2,55 el riesgo de progresión, incluso se llegó a relacionar con el riesgo de muerte cáncer específica a 10 años tras radioterapia (300). Así pues, el CCP se ha comprobado como útil para la estratificación del riesgo de progresión en pacientes con cáncer de próstata tratado.
- Polimorfismo de un único nucleótido (single nucleotide polymorphisms, SNPs): Los SNPs son variaciones de una de las bases del ADN (adenina, timina, citosina o guanina) en una secuencia concreta del genoma, presentes al menos en un 1% de la población. Son identificables en saliva, y se han descrito en el contexto del cáncer de próstata en su asociación a la predicción de supervivencia libre de recidiva bioquímica tras prostatectomía. En este contexto, Morote et al. describieron un modelo con 5 variables clínicas (PSA, Gleason, estadio,

afectación ganglionar y estado del margen quirúrgico), además de con 3 SNPs (KLK2, SULT1A1 y TLR4), mejorando la predicción neta de SLRB en un 23% tras añadir los SNPs al modelo. El modelo presentaba un área bajo la curva de 0,78, un valor predictivo positivo del 80% y un valor predictivo negativo del 74% (301). También se ha descrito la predicción de los SNPs para la recidiva precoz tras prostatectomía. Añadiendo 4 SNPs (KLK3, KLK2, SULT1A1 y BGLAP) a un modelo predictivo sólo con variables clínicas, el área bajo la curva pasó de 0,72 a 0,76, mostrando una mejoría de la capacidad predictiva de recidiva bioquímica a 5 años tras prostatectomía (302). A pesar de estos resultados, el uso de los SNPs en la práctica clínica habitual no es todavía una realidad.

- *SelectMDX*[®]: Se trata de un test en orina, la cual debe ser recogida con micción espontánea tras masaje prostático digital. Mediante la identificación del ARNm de dos genes, DLX1 y HOXC6, se establece un riesgo de biopsia prostática positiva para carcinoma. Incluye, además, variables clínicas para predecir la positividad de la biopsia: edad, PSA, densidad de PSA, tacto rectal sospechoso, historia de biopsia previa, y antecedentes familiares. Van Neste et al. publicaron el estudio de validación de este modelo en 2016 (303). Tras examinar múltiples marcadores urinarios en dos cohortes de pacientes en los que se indicó biopsia prostática (83% biopsia inicial y 17% biopsia repetida), se encontró que DLX1 y HOXC6 fueron la mejor combinación de marcadores en orina para la detección del cáncer de próstata de alto grado. Estos dos genes dieron lugar a una escala de riesgo en combinación con los factores clínicos citados. El principal punto fuerte del SelectMDX es su alto valor predictivo negativo, del 99% para el cáncer de próstata de alto riesgo y del 98% para el de riesgo intermedio(303, 304).

6.11 COMPARACIÓN DE NUESTROS MODELOS EN ORINA CON LOS MARCADORES Y MODELOS DESCRITOS

Los modelos en orina obtenidos para la presente tesis se han observado como útiles en el objetivo de discriminar las condiciones clínicas que hemos propuesto. No

Discusión

obstante, la interpretación de estos resultados debe llevarse a cabo teniendo en cuenta que la muestra que hemos utilizado para este trabajo es heterogénea. Se han incluido desde pacientes metastásicos, a pacientes con cáncer localizado. Además, el hecho de que la inclusión de pacientes no fuera consecutiva o aleatorizada, sino que se produjera según criterio del urólogo que realizaba las biopsias, puede que influyese en la heterogeneidad de la muestra, intentando incluir, por ejemplo, casos claramente tumorales. Esta condición podría considerarse una limitación del trabajo, o al menos, un hecho a tener en cuenta en la interpretación de resultados.

En los siguientes apartados se comparan nuestros modelos en orina con marcadores y modelos utilizados en la práctica clínica. No obstante, debe tenerse en cuenta que la comparación no puede ser estricta, ya que, para una comparación estrecha, las poblaciones de nuestros modelos y las de los modelos que vamos a comparar deberían ser homogéneas. Un ejemplo es el PCA3, cuyo estudio de validación se llevó a cabo con pacientes con PSA entre 2,5 y 10 ng/mL (294), por lo que para una comparación homogénea, sólo deberíamos haber utilizado para nuestros modelos a los pacientes con estos valores de PSA.

A pesar de todo, el objetivo de este apartado de la discusión es sencillamente comprobar qué capacidad predictiva tienen modelos y marcadores utilizados en la práctica clínica y nuestros modelos, intentando dar una pincelada de lo que sería una comparación entre modelos con poblaciones homogéneas.

6.11.1 Marcadores y modelos para predecir la presencia de cáncer

Comparando nuestros resultados con los publicados alrededor de los marcadores anteriores, podemos comprobar que los modelos obtenidos para la presente tesis son, en general, superiores a los descritos para los marcadores citados. El denominador común de nuestros modelos en orina con los biomarcadores utilizados en la práctica clínica, es que todos se obtienen mediante métodos no invasivos, intentado obviar la biopsia para alcanzar el diagnóstico de cáncer, o intentado disminuir el número de biopsias innecesarias a pacientes con bajo riesgo de tener cáncer de próstata. Así pues, el área bajo la curva del modelo en orina con los metabolitos más influyentes derivados del PLS-DA, fue de 0,77 y de 0,89 cuando se

utilizaban también variables clínicas. La principal diferencia de nuestro modelo en orina, con los modelos expuestos que son utilizados en la práctica clínica habitual, es que éstos utilizan uno o escasos biomarcadores en sus modelos (PCA3, proPSA, 4 calicreínas, etc), mientras que, en el modelo en orina en esta tesis, se utilizaron múltiples metabolitos. Esto, lejos de ser un obstáculo o un factor que dificulte la interpretación de los resultados, es una característica típica de los modelos en biofluidos aportados por la metabolómica, la cual es capaz de aportar abundantes metabolitos tras la medición de espectros.

Revisando el área bajo la curva de los marcadores comentados (tabla 56), observamos que en el caso del PCA-3, el modelo que lo incluye junto con variables clínicas, presenta un área bajo la curva de 0,78. El incremento del área bajo la curva al añadir el PCA-3 al modelo sólo con variables clínicas fue de 7,1% en el estudio de Hansen et al., pasando de un área de 0,71 a una de 0,78 (294).

En el caso del coeficiente PHI, Lughezzani et al. concluyeron que este marcador tenía un área bajo la curva de 0,68 como predictor individual para el diagnóstico de cáncer de próstata, y de 0,75 cuando se incluían variables clínicas en el modelo, valores bastante inferiores a los nuestros. Aunque en su estudio concluyen una mayor potencia del modelo con el coeficiente PHI, no existen diferencias importantes cuando se utilizan fracciones individuales del PSA dentro del modelo en vez del coeficiente PHI, como por ejemplo el PSA total (área bajo la curva de 0,71) o el PSA libre (0,73) (296).

En cuanto al *4K score test*, formado por la determinación de cuatro calicreínas en sangre, logró un modelo que alcanzaba un área bajo la curva de 0,83 para diagnosticar cáncer de próstata, sobre una cohorte de 740 varones que no habían sido sometidos a biopsia previamente. Los autores que describieron la utilidad de las cuatro calicreínas sólo utilizaron como características clínicas incluidas en el modelo la edad y el tacto rectal sospechoso (297).

Por otro lado, el *SelectMDX*[®] es el modelo utilizado en la práctica que recoge el mayor número de variables clínicas, junto con el ARNm de los genes DLX1 y HOXC6. Al combinar con estos genes la edad, PSA, densidad de PSA, tacto rectal sospechoso,

Discusión

historia de biopsia previa, y antecedentes familiares, se alcanza una modelo predictor de cáncer con un área bajo la curva de 0,90 (303). Existen publicaciones de grupos que han utilizado este test en la práctica clínica habitual, concluyendo que es útil incluso en varones con antecedentes de biopsia previa negativa y RMN multiparamétrica sin imágenes sugestivas de tumor, pero con alta sospecha clínica de tener una neoplasia. Además, concluyeron que el tacto rectal sospechoso es la variable clínica que más peso tiene dentro del modelo (304).

Otros marcadores y modelos que se han descrito para su uso en la práctica clínica, como el *Prolaris*[®] score o los SNPs se utilizan para predecir la progresión de enfermedad, por lo que no serán comentados dentro de este apartado.

Tabla 56. Valores de área bajo la curva de diferentes modelos utilizados en la práctica clínica para el diagnóstico de cáncer de próstata. Modelos con y sin variables clínicas.

MODELO PARA DIAGNÓSTICO DE CÁNCER DE PRÓSTATA	SÓLO VARIABLES CLÍNICAS*	VARIABLES CLÍNICAS Y MARCADOR*
Presente estudio, metabolómica en orina	0,78	0,87**
PCA3(294)	0,73	0,78
Coficiente PHI (296)	0,70	0,75
4K (297)	0,68	0,83
SelectMDX	No disponible	0,90

* Valor del área bajo la curva

**El modelo incluía sólo a los metabolitos más influyentes, con VIP score más alto

Así pues, puede observarse que los valores de nuestro modelo en orina para distinguir entre enfermos y sanos es superior a la mayoría de modelos utilizados en la práctica clínica habitual, presentando sólo una mayor área bajo la curva el SelectMDX. Como se observa en la tabla, todos los modelos utilizados en la práctica, además del biomarcador, utilizan variables clínicas como se ha hecho en esta tesis. Además, nuestro modelo también presentó una alta sensibilidad (89%), y valor predictivo positivo (82%) y negativo (83%), lo cual demuestra la robustez del modelo. A falta de

estudios complementarios sobre nuestros resultados, como por ejemplo una validación externa, podemos afirmar que nuestras conclusiones son prometedoras en el objetivo de diagnosticar cáncer de próstata mediante el perfil metabólico en orina.

6.11.2 Marcadores y modelos para predecir cáncer de próstata de alto riesgo (Gleason mayor de 7)

Para predecir la agresividad del cáncer de próstata en función del grado de Gleason, el área bajo la curva del modelo en orina derivado del PLS-DA fue muy buena, de 0,92 cuando se combinaban metabolitos con variables clínicas. Además, como se observa en la tabla 57, los valores de la matriz de confusión expresan la robustez del modelo.

Como se dijo anteriormente, en este ámbito se han descrito diferentes modelos a partir de los estudios *Prostate Cancer Prevention Trial (PCPT)*, *Reduction by Dutasteride of Prostate Cancer Events (REDUCE)*, modelos canadiense de Sunnybrook, *European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC)*, y el estudio del *Asian Medical Center de Seúl (242)*.

Los resultados del PCPT sobre 1211 varones, concluyeron que el PSA, los antecedentes familiares de cáncer prostático, y el tacto rectal sospechoso, se relacionaban con un mayor riesgo de tener un cáncer de próstata de alto riesgo. Por el contrario, el antecedente de una biopsia negativa, reducía el riesgo de enfermedad agresiva. Otros factores como la edad en el momento de la biopsia o la cinética de PSA no se relacionaron de forma independiente con el riesgo de tener un Gleason mayor de 7 (271). Este modelo, abierto de forma gratuita para su uso en la práctica clínica habitual, mostró un área bajo la curva de 70,2 (271).

Por su parte, los autores del estudio REDUCE (creado en un primer momento para comprobar si el dutasteride era un fármaco que reducía el riesgo de cáncer de próstata), también calcularon un modelo para predecir el cáncer de alto riesgo (272). En este nomograma se utilizan los cambios en los niveles de PSA, con un intervalo de seis meses entre determinaciones, para predecir la probabilidad de tener un Gleason

Discusión

alto. El modelo predictor se concluyó con un área bajo la curva de 0,70 para varones que tomaban dutasteride y de 0,65 para hombres que no lo tomaban (273).

El grupo de Nam et al. (Sunnybrook), estudiaron si 11 polimorfismos en genes candidatos a desarrollar tumores junto con niveles séricos del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) ayudaban a predecir la presencia de tumores de alto riesgo en varones con un PSA por encima de 4 ng/mL o con un tacto rectal sospechoso (82). Como variables clínicas utilizaron la edad, raza y tacto rectal, además de los niveles de PSA. Finalmente, sobre una muestra de 1031 hombres, los polimorfismos de los genes GST-T1 e IGF-1 se relacionaron con tumores de alto riesgo, con unas OR de 1,64 y 1,70 respectivamente. Estos autores no valoraron su modelo mediante validación cruzada (82).

Por otro lado, el grupo del Asian Center recogió una muestra de 1048 sujetos que acudieron a realizarse una primera biopsia de próstata, con un PSA entre 4 y 9,9 ng/mL. Calcularon dos nomogramas para predecir la presencia de un Gleason 8, uno con variables clínicas tipo edad, tacto rectal, PSA total y PSA libre; y otro nomograma donde añadían a estos factores la sospecha de tumor en la ecografía transrectal. No utilizaron ningún tipo de biomarcador. Comprobaron que el nomograma con los datos añadidos de la ecografía era bastante superior, con un área bajo la curva de 0,83 para predecir cáncer de alto riesgo (frente a 0,78 sin los datos ecográficos) (275).

Tabla 57. Áreas bajo la curva de diferentes modelos para predecir cáncer de próstata de alto riesgo (Gleason mayor de 7). Modelos con y sin variables clínicas.

MODELO PARA PREDECIR CÁNCER DE PRÓSTATA DE ALTO RIESGO (GLEASON MAYOR DE 7)	SÓLO VARIABLES CLÍNICAS*	VARIABLES CLÍNICAS Y MARCADOR*
Presente estudio, metabolómica en orina	0,78	0,92**
PCPT (271)	0,70	Sin marcador
REDUCE (272, 273)	0,70/0,65***	Sin marcador
Sunnybrook (82)	No disponible	No disponible
Asian Center (275)	0,83	Sin marcador

* Valor del área bajo la curva

**El modelo incluía sólo a los metabolitos más influyentes, con VIP score más alto

*** En tratamiento con dutasteride/Sin tratamiento con dutasteride

También contamos con otros nomogramas que predicen la agresividad del tumor, no en función del Gleason, sino en función del estadio patológico. Por un lado, las tablas de Partin, publicadas en 2012, y que han llegado a tener bastante difusión en la práctica clínica. Los autores de este nomograma utilizan el índice de concordancia para comprobar la robustez del modelo, un parámetro muy parecido al área bajo la curva. Concluyen un índice de concordancia para predecir extensión extraprostática de 0,70, para predecir afectación de vesículas seminales de 0,85, y para afectación ganglionar de 0,91(305).

Por último, en el nomograma del Memorial, se utilizó como definición de tumor poco agresivo o tumor indolente el volumen tumoral en piezas de prostatectomía radical, definiendo caso con tumor indolente aquel con menos de 0,5 cc de tumor en la pieza, y como caso de tumor significativo aquel con más de 0,5 cc de tejido tumoral. Sobre una muestra de 409 varones intervenidos de prostatectomía radical, se llegó a la conclusión de que nomogramas que incluían estadio clínico tumoral, PSA, grado de Gleason en biopsia, PSA y volumen tumoral en los cilindros biopsiados, podían predecir la presencia de cáncer agresivo o significativo, con un área bajo la curva de 0,79 (277).

Como puede comprobarse, los modelos más utilizados en la práctica clínica habitual para predecir la agresividad tumoral del cáncer de próstata, no utilizan biomarcadores (como sí ocurre con los modelos para el diagnóstico). Con nuestros resultados, aportamos un modelo con biomarcadores en orina, obtenidos de manera no invasiva, y con alta sensibilidad (82%) y especificidad (92%). Como se comentó en los resultados, añadiendo el tacto rectal como variable clínica, la capacidad predictiva del modelo con metabolitos en orina aumentó considerablemente.

En el análisis HR-MAS sobre agresividad tumoral ya se obtuvo un resultado esperanzador con el perfil metabólico, siendo bueno para discriminar casos con Gleason elevado. Al estudiar este hecho en orina, con el modelo combinado se comprobó una alta capacidad predictiva, siendo una posible explicación a este hecho que la muestra utilizada en orina fue más grande que con el tejido.

6.11.3 Modelos para predecir recidiva bioquímica en cáncer de próstata.

Dentro de este grupo se encuentran modelos basados en los estudios CAPRA-score de la Universidad de California, nomogramas del Memorial y el del John Hopkins (242) (tabla 58). Los nomogramas más utilizados son los que estiman el riesgo de recidiva bioquímica antes del tratamiento quirúrgico.

En primer lugar, el nomograma basado en el CAPRA-score, además de predecir la recidiva bioquímica, es útil también para la predicción de supervivencia libre de metástasis, la supervivencia cáncer específica y la supervivencia global. El grupo de la Universidad de California, tras revisar de forma retrospectiva un grupo de 1439 hombres sometidos a prostatectomía radical, calcularon el riesgo de tener una recidiva bioquímica en base al PSA preoperatorio, Gleason de la biopsia, estadio clínico, porcentaje de cilindros afectados en la biopsia, y edad. La escala del CAPRA-score va de 0 a 10, duplicando el riesgo de tener una recidiva bioquímica por cada dos puntos que se suman a la escala. Los autores utilizaron como validación del modelo el índice de concordancia, siendo éste relativamente bajo, de 0,66(279).

Por su parte, el grupo del Memorial creó un modelo para predecir la recidiva bioquímica y supervivencia cáncer específica a 5 y a 10 años tras prostatectomía radical. Sobre una muestra de 1978 hombres intervenidos, concluyen que, mediante el estadio clínico, PSA preoperatorio, Gleason en biopsia y porcentaje de cilindros afectados en biopsia, puede predecirse la recidiva bioquímica a 5 y 10 años tras tratamiento. El índice de concordancia fue mejor que el de grupo de California, de 0,79 (280).

El grupo del John Hopkins creó un modelo para calcular la posibilidad de recidiva bioquímica a 3, 5, 7 y 10 años después de la cirugía. Sobre una muestra de 2091 varones operados, con un 17% de recidivas bioquímicas, establecieron su modelo. Con sólo tres variables preoperatorias (PSA, estadio clínico y Gleason en biopsia), crearon un modelo con diferente riesgo de recidiva en función del tiempo transcurrido desde la prostatectomía. Para medir la robustez del modelo no utilizaron ni el área bajo la curva ni el índice de concordancia.

Tabla 58. Áreas bajo la curva de diferentes modelos para predecir recidiva bioquímica en cáncer de próstata. Modelos con y sin variables clínicas.

MODELO PARA PREDECIR RECIDIVA BIOQUÍMICA	SÓLO VARIABLES CLÍNICAS*	VARIABLES CLÍNICAS Y MARCADOR*
Presente estudio, metabolómica en orina	Sin significancia	0,95**
CAPRA-score (279)	0,66***	Sin marcador
MSKCC (280)	0,79***	Sin marcador
John Hopkins	No disponible	Sin marcador

* Valor del área bajo la curva

**El modelo incluía sólo a los metabolitos más influyentes, con VIP score más alto. Ninguna variable clínica se incluyó por no hallarse ninguna significativa

***El valor es el índice de concordancia, no el área bajo la curva

Como se comentó previamente, existen otros nomogramas que estiman el pronóstico de la enfermedad, en base a otros criterios como son la supervivencia global (grupo de Canadá(282)), o la supervivencia libre de metástasis. Otros grupos predicen la recidiva bioquímica en el contexto de tratamientos específicos, como son la radioterapia o la braquiterapia(283, 284).

Por lo tanto, observando nuestros resultados, a pesar de no hallar ninguna variable clínica que pueda predecir la recidiva bioquímica, el modelo sólo con los 25 metabolitos más influyentes en el PLS-DA resultó presentar una muy buena área bajo la curva, de 0,95, con valores también altos de sensibilidad (80%), especificidad (98%), valor predictivo positivo (92%) y negativo (96%). El principal punto débil de nuestro análisis fue la escasa muestra en el grupo de sujetos con recidiva. A falta de estudios de validación, se trata de resultados muy prometedores para la predicción de recidiva bioquímica.

6.12 PROYECCIONES DEL ESTUDIO. PERSPECTIVAS FUTURAS

Nuestro estudio presenta unas implicaciones claras. Hemos sido capaces de establecer perfiles metabólicos en tejido y en orina que son capaces de predecir la presencia de cáncer de próstata o factores pronósticos de la enfermedad. En el caso concreto del análisis HR-MAS en tejido, las conclusiones que aportamos en este apartado tienen un buen terreno de cultivo para futuras aplicaciones en el RMN *in vivo*. Ya se comentó en la introducción que la RMN multiparamétrica es una realidad en los algoritmos actuales para el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata. Dentro de la misma, se utiliza la espectroscopía para obtener información metabólica de la próstata, concretamente los niveles de creatina, colina y citrato, para estimar el riesgo de presencia de cáncer a raíz de un cociente. Con los metabolitos que aportamos en esta tesis, podrían realizarse futuros estudios para comprobar si, los metabolitos o rutas metabólicas que hemos relacionado con la presencia de cáncer en el análisis HR-MAS, igualan o mejoran la capacidad de detección tumoral en la RMN *in vivo*. Moléculas como el glicerol-3-fosfocolina, la glicina o la carnitina, se mostraron como muy influyentes en nuestros resultados en tejido, por lo que sería interesante comprobar la reproducibilidad de estos resultados en mediciones *in vivo*.

En cuanto a la orina, los resultados en esta tesis han sido muy optimistas y esperanzadores, con el afán de utilizar el perfil metabólico urinario como herramienta no invasiva para el diagnóstico del cáncer de próstata. Utilizando modelos con variables clínicas y metabolitos en orina, se ha comprobado una gran capacidad predictiva para localizar cáncer de próstata y para hallar casos con tumores agresivos o con riesgo de recidiva bioquímica. En la discusión se han comparado nuestros modelos con los utilizados de forma más frecuente en la práctica clínica habitual, comprobando en general, mejor capacidad predictiva con nuestros resultados (aceptando la heterogeneidad de nuestra muestra). Dadas nuestras conclusiones, el camino a seguir en futuras investigaciones es llevar a cabo una validación externa y comprobar los buenos resultados en poblaciones distintas a la nuestra. Si se comprueba una correcta

reproducibilidad de nuestros resultados en orina, podrían incluso realizarse estudios de práctica clínica habitual aplicando nuestros modelos.

Citar también la importancia de nuestros resultados en la fisiopatología del cáncer de próstata. En la figura 57 de esta tesis quedan plasmadas las rutas metabólicas que, según nuestros análisis en tejido y orina, hemos podido relacionar con la presencia d cáncer de próstata. Algunas de estas moléculas ya han sido descritas anteriormente, pero otras han sido descritas por primera vez en este trabajo como implicadas con el tumor. Futuros estudios en investigación básica tienen en la mano los metabolitos que presentamos para comprender mejor la fisiopatología del cáncer de próstata. Además, una vez establecida con claridad una ruta metabólica relacionada con el tumor, pueden intentarse hallar terapias dianas contra moléculas específicas de estas rutas.

7. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones del estudio fueron:

- PRIMERA: Los pacientes recogidos para este estudio reflejan el perfil clínico de los varones que habitualmente se someten a biopsia de próstata en nuestro entorno. Destaca en estos pacientes una media de edad alrededor de 67 años, presentando como comorbilidades de forma habitual hipertensión, diabetes o dislipemia.
- SEGUNDA: La metabolómica, mediante análisis HR-MAS, es capaz de hallar una huella metabólica específica de cáncer de próstata en tejido prostático, utilizando un cilindro tisular obtenido mediante biopsia transrectal. Se pueden obtener espectros de alta resolución por HR-MAS de muestras intactas de un cilindro de próstata de tan solo 5 mg; obtenido por mediante biopsia transrectal. Esta huella específica se basa en niveles de citrato, glicerol-3-fosfolina, glicina, carnitina, y 0-fosfolina
- TERCERA: No se ha obtenido un perfil metabólico específico en tejido sano que permita establecer la presencia de tumor en otra localización de la próstata en un mismo sujeto.
- CUARTA: La metabolómica es capaz de establecer un modelo predictor útil para diagnosticar cáncer de próstata mediante el perfil metabólico en orina, utilizando un total de 28 metabolitos. Las variables clínicas combinadas con metabolitos son útiles en este contexto, destacando moléculas del metabolismo glicerofosfolípido, la glicólisis, y el metabolismo de los aminoácidos.
- QUINTA: No hemos sido capaces de obtener un perfil metabólico específico en tejido que permita establecer la agresividad tumoral según grado de Gleason.
- SEXTA: Mediante análisis HR-MAS, la metabolómica es capaz de predecir el desarrollo de recidiva bioquímica en pacientes con cáncer de próstata que han recibido tratamiento. Metabolitos como la 0-fosfoetanolamina, etanol, succinato, ascorbato o cisteína, son útiles en este contexto.
- SÉPTIMA: Mediante el perfil metabólico en orina pueden construirse modelos con buena discriminación para predecir la presencia de tumores de próstata con Gleason 8 o mayor. Destacan en este punto moléculas del metabolismo de la glicólisis, del ciclo de Krebs y del metabolismo de aminoácidos.

Conclusiones

- OCTAVA: Mediante el perfil metabólico en orina puede construirse un modelo con buena discriminación para predecir el desarrollo de recidiva bioquímica. Las moléculas destacadas en este punto pertenecen con frecuencia al metabolismo de los aminoácidos, la glicólisis, y al metabolismo de los ácidos grasos.

- NOVENA: Mediante nuestros resultados se han establecido vías metabólicas clave involucradas en el cáncer prostático y su conexión con el metaboloma urinario para comprender mejor la biología del cáncer de próstata. Vías metabólicas como la glicólisis, el metabolismo del inositol, de las purinas, del nicotinato, de los glicerofosfolípidos, el ciclo de Krebs, o el metabolismo de los aminoácidos, se han relacionado con la biología del cáncer de próstata.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005;55(2):74-108.
2. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer.* 2018;103:356-87.
3. Abouassaly R, Thompson, I.M., Platz E.A., Klein E.A. Epidemiología, etiología y prevención del cáncer de próstata. In: Wein AJ, editor. *Campbell's Urology.* 3. 10 ed. Madrid: Editorial Panamericana; 2016. p. 2726-47.
4. Cassinello J, Arranz JA, Piulats JM, Sanchez A, Perez-Valderrama B, Mellado B, et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of metastatic prostate cancer (2017). *Clin Trans Oncol* 2017.
5. González Del Alba A, Méndez-Vidal MJ, Vazquez S, Castro E, Climent MA, Gallardo E, et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of advanced prostate cancer (2020). *Clin Trans Oncol* 2021;23(5):969-79.
6. Cassinello J, Arranz JA, Piulats JM, Sanchez A, Perez-Valderrama B, Mellado B, et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of metastatic prostate cancer (2017). *Clin Trans Oncol.* 2018;20(1):57-68.
7. Rawla P. Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol.* 2019;10(2):63-89.
8. Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, Lutz JM, De Angelis R, Capocaccia R, et al. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol.* 2008;9(8):730-56.
9. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
10. Global Burden of Disease Cancer C, Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* 2017;3(4):524-48.
11. Greene DR, Fitzpatrick JM, Scardino PT. Anatomy of the prostate and distribution of early prostate cancer. *Semin Surg Oncol.* 1995;11(1):9-22.
12. Tanagho EA. Anatomía del tracto genitourinario. In: Tanagho EA, McAninch, J.W., editor. *Urología genera de Smith.* 1. 14 ed. México DF: Manual Moderno; 2009. p. 1-16.
13. McAninch JW LT. *Urología general.* 18 ed: McGraw Hill; 2014.
14. McNeal JE. The prostate and prostatic urethra: a morphologic synthesis. *J Urol.* 1972;107(6):1008-16.
15. Epstein JI. Patología de las neoplasias prostáticas. In: Wein A, editor. *Campbell's Urology.* 3. 10 ed. Madrid: Editorial Panamericana; 2016. p. 2748-56.
16. Cornford P, Bellmunt J, Bolla M, Briers E, De Santis M, Gross T, et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Relapsing, Metastatic, and Castration-Resistant Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2017;71(4):630-42.
17. Epstein JI, Amin MB, Reuter VE, Humphrey PA. Contemporary Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: An Update With Discussion on Practical Issues to Implement the 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2017;41(4):e1-e7.
18. Epstein JI, Zelefsky MJ, Sjoberg DD, Nelson JB, Egevad L, Magi-Galluzzi C, et al. A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. *Eur Urol.* 2016;69(3):428-35.
19. Brierley A, et al. TNM classification of malignant tumors. UICC International Union Against Cancer. 8 ed 2016.

Bibliografía

20. Loeb S CH. Detección temprana, diagnóstico y estadificación del cáncer de próstata. In: Wein A KL, Novick AC, Partin AW, Peters CA, editor. *Campbell's Urology*. 3. 10 ed: Editorial Panamericana; 2016. p. 2785-92.
21. Panach-Navarrete J, Carratala-Calvo A, Valls-Gonzalez L, Sales-Maicas M, Martinez-Jabaloyas JM. Prostate Specific Antigen (PSA) use in a national health department. *Arch Esp Urol*. 2015;68(8):647-54.
22. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, 3rd, Buys SS, Chia D, Church TR, et al. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med*. 2009;360(13):1310-9.
23. Schroder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Zappa M, Nelen V, et al. Screening and prostate cancer mortality: results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up. *Lancet*. 2014.
24. Hugosson J, Roobol MJ, Mansson M, Tammela TLJ, Zappa M, Nelen V, et al. A 16-yr Follow-up of the European Randomized study of Screening for Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2019.
25. Cepeda Piorno J, Rivas del Fresno M, Fuente Martin E, Gonzalez Garcia E, Muruamendiaraz Fernandez V, Fernandez Rodriguez E. [Advantages and risks of the use of prostate-specific antigen (PSA) in the health-care area No. 4 of Gijon (Asturias)]. *Arch Esp Urol*. 2005;58(5):403-11.
26. Dellavedova T. Prostatic specific antigen. From its early days until becoming a prostate cancer biomarker. *Arch Esp Urol*. 2016;69(1):19-23.
27. Carter HB, Pearson JD, Metter EJ, Brant LJ, Chan DW, Andres R, et al. Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. *JAMA*. 1992;267(16):2215-20.
28. Catalona WJ. Clinical utility of measurements of free and total prostate-specific antigen (PSA): a review. *Prostate Suppl*. 1996;7:64-9.
29. Placer J, Planas J, Celma A, Morote J. Current role of protatic specific antigen (PSA) and its by-products in the diagnosis of prostate cancer. *Arch Esp Urol*. 2015;68(3):210-28.
30. Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Dodds KM, Coplen DE, Yuan JJ, et al. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N Engl J Med*. 1991;324(17):1156-61.
31. Gann PH, Hennekens CH, Stampfer MJ. A prospective evaluation of plasma prostate-specific antigen for detection of prostatic cancer. *JAMA*. 1995;273(4):289-94.
32. Baccaglini W, Cathelineau X, Araujo Glina FP, Medina LG, Sotelo R, Carneiro A, et al. Screening: Actual trends on PSA marker. When, who, how? *Arch Esp Urol*. 2019;72(2):98-103.
33. Bazinet M, Meshref AW, Trudel C, Aronson S, Peloquin F, Nachabe M, et al. Prospective evaluation of prostate-specific antigen density and systematic biopsies for early detection of prostatic carcinoma. *Urology*. 1994;43(1):44-51; discussion -2.
34. Benson MC, Whang IS, Pantuck A, Ring K, Kaplan SA, Olsson CA, et al. Prostate specific antigen density: a means of distinguishing benign prostatic hypertrophy and prostate cancer. *J Urol*. 1992;147(3 Pt 2):815-6.
35. Hodge KK, McNeal JE, Terris MK, Stamey TA. Random systematic versus directed ultrasound guided transrectal core biopsies of the prostate. *J Urol*. 1989;142(1):71-4; discussion 4-5.
36. Halpern EJ, Fauscher F, Rosenberg M, Gomella LG. Directed biopsy during contrast-enhanced sonography of the prostate. *AJR Am J Roentgenol*. 2002;178(4):915-9.
37. Ochiai A. Changes in the roles of transrectal ultrasonography for the diagnosis of prostate cancer. *J Med Ultraoson*. 2017;44(1):1-2.
38. Halpern EJ, Fauscher F, Forsberg F, Strup SE, Nazarian LN, O'Kane P, et al. High-frequency Doppler US of the prostate: effect of patient position. *Radiology*. 2002;222(3):634-9.
39. Hamper UM, Epstein JI, Sheth S, Walsh PC, Sanders RC. Cystic lesions of the prostate gland. A sonographic--pathologic correlation. *J Ultrasound Med*. 1990;9(7):395-402.

40. Al-Saeed O, Sheikh M, Kehinde EO, Makar R. Seminal vesicle masses detected incidentally during transrectal sonographic examination of the prostate. *J Clin Ultrasound*. 2003;31(4):201-6.
41. Shinohara K, Wheeler TM, Scardino PT. The appearance of prostate cancer on transrectal ultrasonography: correlation of imaging and pathological examinations. *J Urol*. 1989;142(1):76-82.
42. Purohit RS, Shinohara K, Meng MV, Carroll PR. Imaging clinically localized prostate cancer. *Urol Clin North Am*. 2003;30(2):279-93.
43. Frauscher F, Klauser A, Halpern EJ. Advances in ultrasound for the detection of prostate cancer. *Ultrasound Q*. 2002;18(2):135-42.
44. Scardino P. Update: NCCN prostate cancer Clinical Practice Guidelines. *J Natl Comp Canc Netw*. 2005;3 Suppl 1:S29-33.
45. Wolf JS, Jr., Bennett CJ, Dmochowski RR, Hollenbeck BK, Pearle MS, Schaeffer AJ, et al. Best practice policy statement on urologic surgery antimicrobial prophylaxis. *J Urol*. 2008;179(4):1379-90.
46. Walsh PC. Complication rates and risk factors of 5802 transrectal ultrasound-guided sextant biopsies of the prostate within a population-based screening program. *J Urol*. 2003;170(1):314.
47. Presti JC, Jr., Chang JJ, Bhargava V, Shinohara K. The optimal systematic prostate biopsy scheme should include 8 rather than 6 biopsies: results of a prospective clinical trial. *J Urol*. 2000;163(1):163-6; discussion 6-7.
48. Eskew LA, Bare RL, McCullough DL. Systematic 5 region prostate biopsy is superior to sextant method for diagnosing carcinoma of the prostate. *J Urol*. 1997;157(1):199-202; discussion -3.
49. Djavan B, Remzi M, Marberger M. When to biopsy and when to stop biopsying. *Urol Clin North Am*. 2003;30(2):253-62.
50. Djavan B, Milani S, Remzi M. Prostate biopsy: who, how and when. An update. *Can J Urol*. 2005;12 Suppl 1:44-8; discussion 99-100.
51. Drost FH, Osses D, Nieboer D, Bangma CH, Steyerberg EW, Roobol MJ, et al. Prostate Magnetic Resonance Imaging, with or Without Magnetic Resonance Imaging-targeted Biopsy, and Systematic Biopsy for Detecting Prostate Cancer: A Cochrane Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol*. 2019;30(2):253-62
52. Boesen L, Norgaard N, Logager V, Balslev I, Thomsen HS. Multiparametric MRI in men with clinical suspicion of prostate cancer undergoing repeat biopsy: a prospective comparison with clinical findings and histopathology. *Acta Radiol*. 2018;59(3):371-80.
53. Hara R, Jo Y, Fujii T, Kondo N, Yokoyama T, Miyaji Y, et al. Optimal approach for prostate cancer detection as initial biopsy: prospective randomized study comparing transperineal versus transrectal systematic 12-core biopsy. *Urology*. 2008;71(2):191-5.
54. Pelzer AE, Bektic J, Berger AP, Halpern EJ, Koppelstatter F, Klauser A, et al. Are transition zone biopsies still necessary to improve prostate cancer detection? Results from the tyrol screening project. *Eur Urol*. 2005;48(6):916-21; discussion 21.
55. Lindert KA, Kabalin JN, Terris MK. Bacteremia and bacteriuria after transrectal ultrasound guided prostate biopsy. *J Urol*. 2000;164(1):76-80.
56. Crawford ED, Haynes AL, Jr., Story MW, Borden TA. Prevention of urinary tract infection and sepsis following transrectal prostatic biopsy. *J Urol*. 1982;127(3):449-51.
57. Raaijmakers R, Kirkels WJ, Roobol MJ, Wildhagen MF, Schrder FH. Complication rates and risk factors of 5802 transrectal ultrasound-guided sextant biopsies of the prostate within a population-based screening program. *Urology*. 2002;60(5):826-30.
58. Rodriguez LV, Terris MK. Risks and complications of transrectal ultrasound guided prostate needle biopsy: a prospective study and review of the literature. *J Urol*. 1998;160(6 Pt 1):2115-20.

Bibliografía

59. Carrion DM, Gomez Rivas J, Alvarez-Maestro M, Martinez-Pineiro L. Biomarkers in prostate cancer management. Is there something new? *Arch Esp Urol*. 2019;72(2):105-15.
60. Carter HB, Albertsen PC, Barry MJ, Etzioni R, Freedland SJ, Greene KL, et al. Early detection of prostate cancer: AUA Guideline. *J Urol*. 2013;190(2):419-26.
61. Cheng L, Albers P, Berney DM, Feldman DR, Daugaard G, Gilligan T, et al. Testicular cancer. *Nature*. 2018;4(1):29.
62. Gonzalgo ML, Pavlovich CP, Lee SM, Nelson WG. Prostate cancer detection by GSTP1 methylation analysis of postbiopsy urine specimens. *Clin Cancer Res*. 2003;9(7):2673-7.
63. Kuzmin I, Gillespie JW, Protopopov A, Geil L, Dreijerink K, Yang Y, et al. The RASSF1A tumor suppressor gene is inactivated in prostate tumors and suppresses growth of prostate carcinoma cells. *Cancer Res*. 2002;62(12):3498-502.
64. Fuessel S, Wirth MP. New markers in prostate cancer: Genomics. *Arch Esp Urol*. 2019;72(2):116-25.
65. Comperat E. New markers in prostate cancer: Immunohistochemical. *Arch Esp Urol*. 2019;72(2):126-34.
66. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*. 2005;310(5748):644-8.
67. Hu R, Dunn TA, Wei S, Isharwal S, Veltri RW, Humphreys E, et al. Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res*. 2009;69(1):16-22.
68. Perner S, Hofer MD, Kim R, Shah RB, Li H, Moller P, et al. Prostate-specific membrane antigen expression as a predictor of prostate cancer progression. *Hum Pathol*. 2007;38(5):696-701.
69. Takayama TK, McMullen BA, Nelson PS, Matsumura M, Fujikawa K. Characterization of hK4 (prostase), a prostate-specific serine protease: activation of the precursor of prostate specific antigen (pro-PSA) and single-chain urokinase-type plasminogen activator and degradation of prostatic acid phosphatase. *Biochemistry*. 2001;40(50):15341-8.
70. Paliouras M, Borgono C, Diamandis EP. Human tissue kallikreins: the cancer biomarker family. *Cancer Lett*. 2007;249(1):61-79.
71. Catalona WJ, Partin AW, Slawin KM, Naughton CK, Brawer MK, Flanigan RC, et al. Percentage of free PSA in black versus white men for detection and staging of prostate cancer: a prospective multicenter clinical trial. *Urology*. 2000;55(3):372-6.
72. Malik G, Rojahn E, Ward MD, Gretzer MB, Partin AW, Semmes OJ, et al. SELDI protein profiling of dunning R-3327 derived cell lines: identification of molecular markers of prostate cancer progression. *Prostate*. 2007;67(14):1565-75.
73. Svatek RS, Karam JA, Roehrborn CG, Karakiewicz PI, Slawin KM, Shariat SF. Preoperative plasma endoglin levels predict biochemical progression after radical prostatectomy. *Clin Cancer Res*. 2008;14(11):3362-6.
74. de Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW, Hessels D, Kiemeny LA, Aalders TW, et al. DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res*. 2002;62(9):2695-8.
75. Hessels D, Klein Gunnewiek JM, van Oort I, Karthaus HF, van Leenders GJ, van Balken B, et al. DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol*. 2003;44(1):8-15; discussion -6.
76. Shaffer DR, Leversha MA, Danila DC, Lin O, Gonzalez-Espinoza R, Gu B, et al. Circulating tumor cell analysis in patients with progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13(7):2023-9.
77. Wang X, Yu J, Sreekumar A, Varambally S, Shen R, Giacherio D, et al. Autoantibody signatures in prostate cancer. *N Engl J Med*. 2005;353(12):1224-35.

78. Shi XB, Gandour-Edwards R, Beckett LA, Deitch AD, de Vere White RW. A modified yeast assay used on archival samples of localized prostate cancer tissue improves the detection of p53 abnormalities and increases their predictive value. *BJU Int.* 2004;94(7):996-1002.
79. Roach M, 3rd, Bae K, Speight J, Wolkov HB, Rubin P, Lee RJ, et al. Short-term neoadjuvant androgen deprivation therapy and external-beam radiotherapy for locally advanced prostate cancer: long-term results of RTOG 8610. *J Clin Oncol.* 2008;26(4):585-91.
80. Berney DM, Gopalan A, Kudahetti S, Fisher G, Ambroisine L, Foster CS, et al. Ki-67 and outcome in clinically localised prostate cancer: analysis of conservatively treated prostate cancer patients from the Trans-Atlantic Prostate Group study. *Br J Cancer.* 2009;100(6):888-93.
81. Wu HH, Lapkus O, Corbin M. Comparison of 34betaE12 and P63 in 100 consecutive prostate carcinoma diagnosed by needle biopsies. *Appl immunohistochem Mol Morphol.* 2004;12(4):285-9.
82. Nam RK, Zhang WW, Trachtenberg J, Jewett MA, Emami M, Vesprini D, et al. Comprehensive assessment of candidate genes and serological markers for the detection of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003;12(12):1429-37.
83. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105(30):10513-8.
84. Luo J, Duggan DJ, Chen Y, Sauvageot J, Ewing CM, Bittner ML, et al. Human prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: molecular dissection by gene expression profiling. *Cancer Res.* 2001;61(12):4683-8.
85. An G, Ng AY, Meka CS, Luo G, Bright SP, Cazares L, et al. Cloning and characterization of UROC28, a novel gene overexpressed in prostate, breast, and bladder cancers. *Cancer Res.* 2000;60(24):7014-20.
86. Kollermann J, Schlomm T, Bang H, Schwall GP, von Eichel-Streiber C, Simon R, et al. Expression and prognostic relevance of annexin A3 in prostate cancer. *Eur Urol.* 2008;54(6):1314-23.
87. Stephan C, Yousef GM, Scorilas A, Jung K, Jung M, Kristiansen G, et al. Hepsin is highly over expressed in and a new candidate for a prognostic indicator in prostate cancer. *J Urol.* 2004;171(1):187-91.
88. Hlavaty JJ, Partin AW, Shue MJ, Mangold LA, Derby J, Javier T, et al. Identification and preliminary clinical evaluation of a 50.8-kDa serum marker for prostate cancer. *Urology.* 2003;61(6):1261-5.
89. Han B, Mehra R, Lonigro RJ, Wang L, Suleman K, Menon A, et al. Fluorescence in situ hybridization study shows association of PTEN deletion with ERG rearrangement during prostate cancer progression. *Mod Pathol.* 2009;22(8):1083-93.
90. Shah RB, Chinnaiyan AM. The discovery of common recurrent transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2)-erythroblastosis virus E26 transforming sequence (ETS) gene fusions in prostate cancer: significance and clinical implications. *Adv Anat Pathol.* 2009;16(3):145-53.
91. Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, Khan AP, Cao Q, Yu J, et al. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature.* 2009;457(7231):910-4.
92. Mora MJ. Role of tissue markers on diagnosis, prognosis and monitoring of prostate cancer. *Arch Esp Urol.* 2015;68(3):250-66.
93. Barocas DA, Cowan JE, Smith JA, Jr., Carroll PR, Ca PI. What percentage of patients with newly diagnosed carcinoma of the prostate are candidates for surveillance? An analysis of the CaPSURE database. *J Urol.* 2008;180(4):1330-4; discussion 4-5.
94. Chandrasekar T, Herrera-Caceres JO, Klotz L. Active surveillance in intermediate risk prostate cancer. *Arch Esp Urol.* 2019;72(2):157-66.
95. Sandblom G, Varenhorst E, Rosell J, Lofman O, Carlsson P. Randomised prostate cancer screening trial: 20 year follow-up. *BMJ.* 2011;342:d1539.

Bibliografía

96. Brada M, Pijls-Johannesma M, De Ruyscher D. Proton therapy in clinical practice: current clinical evidence. *J Clin Oncol.* 2007;25(8):965-70.
97. Lu-Yao GL, Albertsen PC, Moore DF, Shih W, Lin Y, DiPaola RS, et al. Survival following primary androgen deprivation therapy among men with localized prostate cancer. *JAMA.* 2008;300(2):173-81.
98. Alvarez-Maestro M, Quesada Olarte J, Gomez Rivas J, Carrion DM, Juarez Soto A, Rios Gonzalez E, et al. High-risk prostate cancer. Optimal treatment. New evidences. *Arch Esp Urol.* 2019;72(2):203-10.
99. Barret E, Ganzer R, Salomon G, Fielder M, Celia A, Enikeev D, et al. Future of focal therapy for the treatment of prostate cancer- european section of urotechnology (ESUT) position. *Arch Esp Urol.* 2019;72(2):167-73.
100. Mottet N, Bellmunt J, Bolla M, Briers E, Cumberbatch MG, De Santis M, et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *Eur Urol.* 2017;71(4):618-29.
101. J M-SdT. Contribución al fenotipado molecular de tumores cerebrales preclínicos mediante estudios in vitro e in vivo [master's thesis]. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; 2013.
102. AM B. Resonancia magnética nuclear: Masson 1989. 178 p.
103. M D-H. Preservación del patrón metabólico de tejidos mediante fijación por irradiación con microondas focalizadas. Aplicación al estudio del tejido cerebral normal y patológico mediante espectroscopía HRMAS y metodologías de reconocimiento de patrones [Master's thesis]. Barcelona: Universitat Autonomy de Barcelona; 2013.
104. JM GS. Espectroscopia in vivo por resonancia magnética nuclear. Madrid: Eudema; 1991. 276 p.
105. Millis KK, Maas WE, Cory DG, Singer S. Gradient, high-resolution, magic-angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy of human adipocyte tissue. *Magn Reson Med.* 1997;38(3):399-403.
106. Moestue S, Sitter B, Bathen TF, Tessem MB, Gribbestad IS. HR MAS MR spectroscopy in metabolic characterization of cancer. *Curr Top Med Chem.* 2011;11(1):2-26.
107. Coen M, Wevers RA, Lindon JC, Blom HJ. High-resolution ¹H NMR spectroscopic investigation of a chick embryo model of neural tube development. *Magn Reson Chem.* 2009;47 Suppl 1:S62-7.
108. Opstad KS, Bell BA, Griffiths JR, Howe FA. Taurine: a potential marker of apoptosis in gliomas. *Br J Cancer.* 2009;100(5):789-94.
109. Santos CF, Kurhanewicz J, Tabatabai ZL, Simko JP, Keshari KR, Gbegnon A, et al. Metabolic, pathologic, and genetic analysis of prostate tissues: quantitative evaluation of histopathologic and mRNA integrity after HR-MAS spectroscopy. *NMR Biomed.* 2010;23(4):391-8.
110. Valonen PK, Griffin JL, Lehtimaki KK, Liimatainen T, Nicholson JK, Grohn OH, et al. High-resolution magic-angle-spinning ¹H NMR spectroscopy reveals different responses in choline-containing metabolites upon gene therapy-induced programmed cell death in rat brain glioma. *NMR Biomed.* 2005;18(4):252-9.
111. Swanson MG, Zektzer AS, Tabatabai ZL, Simko J, Jarso S, Keshari KR, et al. Quantitative analysis of prostate metabolites using ¹H HR-MAS spectroscopy. *Magn Reson Med.* 2006;55(6):1257-64.
112. Yang L, Wang Y, Cai H, Wang S, Shen Y, Ke C. Application of metabolomics in the diagnosis of breast cancer: a systematic review. *J Cancer.* 2020;11(9):2540-51.
113. McCartney A, Vignoli A, Biganzoli L, Love R, Tenori L, Luchinat C, et al. Metabolomics in breast cancer: A decade in review. *Cancer Treat Rev.* 2018;67:88-96.
114. Beger RD, Dunn W, Schmidt MA, Gross SS, Kirwan JA, Cascante M, et al. Metabolomics enables precision medicine: "A White Paper, Community Perspective". *Metabolomics.* 2016;12(10):149.

115. Chen R, Mias GI, Li-Pook-Than J, Jiang L, Lam HY, Chen R, et al. Personal omics profiling reveals dynamic molecular and medical phenotypes. *Cell*. 2012;148(6):1293-307.
116. Hadi NI, Jamal Q, Iqbal A, Shaikh F, Somroo S, Musharraf SG. Serum Metabolomic Profiles for Breast Cancer Diagnosis, Grading and Staging by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Sci Rep*. 2017;7(1):1715.
117. Dietz C, Ehret F, Palmas F, Vandergrift LA, Jiang Y, Schmitt V, et al. Applications of high-resolution magic angle spinning MRS in biomedical studies II-Human diseases. *NMR Biomed*. 2017;30(11).
118. Cheng LL, Wu C, Smith MR, Gonzalez RG. Non-destructive quantitation of spermine in human prostate tissue samples using HRMAS 1H NMR spectroscopy at 9.4 T. *FEBS Lett*. 2001;494(1-2):112-6.
119. Cheng LL, Burns MA, Taylor JL, He W, Halpern EF, McDougal WS, et al. Metabolic characterization of human prostate cancer with tissue magnetic resonance spectroscopy. *Cancer Res*. 2005;65(8):3030-4.
120. Swanson MG, Vigneron DB, Tabatabai ZL, Males RG, Schmitt L, Carroll PR, et al. Proton HR-MAS spectroscopy and quantitative pathologic analysis of MRI/3D-MRSI-targeted postsurgical prostate tissues. *Magn Reson Med*. 2003;50(5):944-54.
121. Selnaes KM, Gribbestad IS, Bertilsson H, Wright A, Angelsen A, Heerschap A, et al. Spatially matched in vivo and ex vivo MR metabolic profiles of prostate cancer -- investigation of a correlation with Gleason score. *NMR Biomed*. 2013;26(5):600-6.
122. Stenman K, Stattin P, Stenlund H, Riklund K, Grobner G, Bergh A. H HRMAS NMR Derived Bio-markers Related to Tumor Grade, Tumor Cell Fraction, and Cell Proliferation in Prostate Tissue Samples. *Biomark Insights*. 2011;6:39-47.
123. Vandergrift LA, Decelle EA, Kurth J, Wu S, Fuss TL, DeFeo EM, et al. Metabolomic Prediction of Human Prostate Cancer Aggressiveness: Magnetic Resonance Spectroscopy of Histologically Benign Tissue. *Sci Rep*. 2018;8(1):4997.
124. Maxeiner A, Adkins CB, Zhang Y, Taupitz M, Halpern EF, McDougal WS, et al. Retrospective analysis of prostate cancer recurrence potential with tissue metabolomic profiles. *Prostate*. 2010;70(7):710-7.
125. Bayet-Robert M, Loiseau D, Rio P, Demidem A, Barthomeuf C, Stepien G, et al. Quantitative two-dimensional HRMAS 1H-NMR spectroscopy-based metabolite profiling of human cancer cell lines and response to chemotherapy. *Magn Reson Med*. 2010;63(5):1172-83.
126. Emwas AH, Roy R, McKay RT, Ryan D, Brennan L, Tenori L, et al. Recommendations and Standardization of Biomarker Quantification Using NMR-Based Metabolomics with Particular Focus on Urinary Analysis. *J Proteome Res*. 2016;15(2):360-73.
127. Emwas AH, Al-Talla ZA, Kharbatia NM. Sample collection and preparation of biofluids and extracts for gas chromatography-mass spectrometry. *Methods Mol Biol*. 2015;1277:75-90.
128. Assfalg M, Bertini I, Colangiuli D, Luchinat C, Schafer H, Schutz B, et al. Evidence of different metabolic phenotypes in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(5):1420-4.
129. Ryan D, Robards K, Prenzler PD, Kendall M. Recent and potential developments in the analysis of urine: a review. *Anal Chim Acta*. 2011;684(1-2):8-20.
130. Jentzmik F, Stephan C, Miller K, Schrader M, Erbersdobler A, Kristiansen G, et al. Sarcosine in urine after digital rectal examination fails as a marker in prostate cancer detection and identification of aggressive tumours. *Eur Urol*. 2010;58(1):12-8; discussion 20-1.
131. Truong M, Yang B, Jarrard DF. Toward the detection of prostate cancer in urine: a critical analysis. *J Urol*. 2013;189(2):422-9.
132. Akin O, Sala E, Moskowitz CS, Kuroiwa K, Ishill NM, Pucar D, et al. Transition zone prostate cancers: features, detection, localization, and staging at endorectal MR imaging. *Radiology*. 2006;239(3):784-92.

Bibliografia

133. Vilanova JC, Luna-Alcala A, Boada M, Barcelo J. Multiparametric MRI. The role of MRI techniques in the diagnosis, staging and follow up of prostate cancer. *Arch Esp Urol*. 2015;68(3):316-33.
134. Vilanova JC, Barcelo J. Prostate cancer detection: magnetic resonance (MR) spectroscopic imaging. *Abdom Imaging*. 2007;32(2):253-61.
135. Verma S, Rajesh A, Futterer JJ, Turkbey B, Scheenen TW, Pang Y, et al. Prostate MRI and 3D MR spectroscopy: how we do it. *AJR Am J Roentgenol*. 2010;194(6):1414-26.
136. Franiel T, Hamm B, Hricak H. Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging and pharmacokinetic models in prostate cancer. *Eur Radiol*. 2011;21(3):616-26.
137. Delongchamps NB, Peyromaure M, Schull A, Beuvon F, Bouazza N, Flam T, et al. Prebiopsy magnetic resonance imaging and prostate cancer detection: comparison of random and targeted biopsies. *J Urol*. 2013;189(2):493-9.
138. Mozer P, Roupert M, Le Cossec C, Granger B, Comperat E, de Gorski A, et al. First round of targeted biopsies using magnetic resonance imaging/ultrasonography fusion compared with conventional transrectal ultrasonography-guided biopsies for the diagnosis of localised prostate cancer. *BJU Int*. 2015;115(1):50-7.
139. Abd-Alazeez M, Ahmed HU, Arya M, Charman SC, Anastasiadis E, Freeman A, et al. The accuracy of multiparametric MRI in men with negative biopsy and elevated PSA level--can it rule out clinically significant prostate cancer? *Urol Oncol*. 2014;32(1):45 e17-22.
140. Heidenreich A, Bastian PJ, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, van der Kwast T, et al. EAU guidelines on prostate cancer. part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent-update 2013. *Eur Urol*. 2014;65(1):124-37.
141. Talab SS, Preston MA, Elmi A, Tabatabaei S. Prostate cancer imaging: what the urologist wants to know. *Radiologic clinics of North America*. 2012;50(6):1015-41.
142. Futterer JJ. Imaging of recurrent prostate cancer. *Radiol Clin North Am*. 2012;50(6):1075-83.
143. Kimmelman AC. Metabolic Dependencies in RAS-Driven Cancers. *Clin Cancer Res*. 2015;21(8):1828-34.
144. Wu X, Daniels G, Lee P, Monaco ME. Lipid metabolism in prostate cancer. *Am J Clin Exp Urol*. 2014;2(2):111-20.
145. Rysman E, Brusselmans K, Scheys K, Timmermans L, Derua R, Munck S, et al. De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. *Cancer Res*. 2010;70(20):8117-26.
146. Currie E, Schulze A, Zechner R, Walther TC, Farese RV, Jr. Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metab*. 2013;18(2):153-61.
147. Giunchi F, Fiorentino M, Loda M. The Metabolic Landscape of Prostate Cancer. *Eur Urol Oncol*. 2019;2(1):28-36.
148. Nomura DK, Lombardi DP, Chang JW, Niessen S, Ward AM, Long JZ, et al. Monoacylglycerol lipase exerts dual control over endocannabinoid and fatty acid pathways to support prostate cancer. *Chem Biol*. 2011;18(7):846-56.
149. Ackerman D, Simon MC. Hypoxia, lipids, and cancer: surviving the harsh tumor microenvironment. *Trends Cell Biol*. 2014;24(8):472-8.
150. Kok DE, van Roermund JG, Aben KK, den Heijer M, Swinkels DW, Kampman E, et al. Blood lipid levels and prostate cancer risk; a cohort study. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2011;14(4):340-5.
151. Massie CE, Lynch A, Ramos-Montoya A, Boren J, Stark R, Fazli L, et al. The androgen receptor fuels prostate cancer by regulating central metabolism and biosynthesis. *EMBO J*. 2011;30(13):2719-33.
152. Fritz V, Benfodda Z, Rodier G, Henriquet C, Iborra F, Avances C, et al. Abrogation of de novo lipogenesis by stearoyl-CoA desaturase 1 inhibition interferes with oncogenic signaling and blocks prostate cancer progression in mice. *Mol Cancer Ther*. 2010;9(6):1740-54.

153. Priolo C, Pyne S, Rose J, Regan ER, Zadra G, Photopoulos C, et al. AKT1 and MYC induce distinctive metabolic fingerprints in human prostate cancer. *Cancer Res* 2014;74(24):7198-204.
154. Pelton K, Freeman MR, Solomon KR. Cholesterol and prostate cancer. *Curr Opin Pharmacol*. 2012;12(6):751-9.
155. Chen M, Zhang J, Sampieri K, Clohessy JG, Mendez L, Gonzalez-Billalabeitia E, et al. An aberrant SREBP-dependent lipogenic program promotes metastatic prostate cancer. *Nat Genet*. 2018;50(2):206-18.
156. Flaig TW, Salzman-Sullivan M, Su LJ, Zhang Z, Joshi M, Gijon MA, et al. Lipid catabolism inhibition sensitizes prostate cancer cells to antiandrogen blockade. *Oncotarget*. 2017;8(34):56051-65.
157. Babcook MA, Joshi A, Montellano JA, Shankar E, Gupta S. Statin Use in Prostate Cancer: An Update. *Nutr Metab Insights*. 2016;9:43-50.
158. Corbin JM, Ruiz-Echevarria MJ. One-Carbon Metabolism in Prostate Cancer: The Role of Androgen Signaling. *Int J Mol Sci*. 2016;17(8).
159. Affronti HC, Long MD, Rosario SR, Gillard BM, Karasik E, Boerlin CS, et al. Dietary folate levels alter the kinetics and molecular mechanism of prostate cancer recurrence in the CWR22 model. *Oncotarget*. 2017;8(61):103758-74.
160. Wise DR, Thompson CB. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem Sci*. 2010;35(8):427-33.
161. Wang Q, Bailey CG, Ng C, Tiffen J, Thoeng A, Minhas V, et al. Androgen receptor and nutrient signaling pathways coordinate the demand for increased amino acid transport during prostate cancer progression. *Cancer Res*. 2011;71(24):7525-36.
162. Katt WP, Cerione RA. Glutaminase regulation in cancer cells: a druggable chain of events. *Drug Discov Today*. 2014;19(4):450-7.
163. Gonzalez-Menendez P, Hevia D, Alonso-Arias R, Alvarez-Artime A, Rodriguez-Garcia A, Kinet S, et al. GLUT1 protects prostate cancer cells from glucose deprivation-induced oxidative stress. *Redox Biol*. 2018;17:112-27.
164. Sborov DW, Haverkos BM, Harris PJ. Investigational cancer drugs targeting cell metabolism in clinical development. *Expert Opin Investig Drugs*. 2015;24(1):79-94.
165. Zadra G, Photopoulos C, Tyekucheva S, Heidari P, Weng QP, Fedele G, et al. A novel direct activator of AMPK inhibits prostate cancer growth by blocking lipogenesis. *EMBO Mol Med*. 2014;6(4):519-38.
166. Rodriguez Alonso A, Gonzalez Blanco A, Barbagelata Lopez A, Pita Fernandez S, Suarez Pascual G, Bonelli Martin C, et al. Importance of PSA velocity and PSA density in the prediction of prostate cancer in TURP or open prostatectomy specimen of patients with previous negative prostate biopsy. *Actas Urol Esp* 2008;32(8):779-86.
167. Bjurlin MA, Taneja SS. Standards for prostate biopsy. *Curr Opin Urol*. 2014;24(2):155-61.
168. Bjurlin MA, Carter HB, Schellhammer P, Cookson MS, Gomella LG, Troyer D, et al. Optimization of initial prostate biopsy in clinical practice: sampling, labeling and specimen processing. *J Urol*. 2013;189(6):2039-46.
169. Molinie V, Baumert H. New markers in prostate biopsies. *Actas Urol Esp*. 2007;31(9):1009-24.
170. Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, Guo AC, Liang K, Vazquez-Fresno R, et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D608-D17.
171. Panach-Navarrete J, Garcia-Morata F, Valls-Gonzalez L, Martinez-Jabaloyas JM. Use of individual containers for prostate biopsy samples: Do we gain diagnostic performance? *Actas Urol Esp*. 2016;40(4):224-8.
172. Freedland SJ, Aronson WJ. Obesity and prostate cancer. *Urology*. 2005;65(3):433-9.
173. Venkateswaran V, Haddad AQ, Fleshner NE, Fan R, Sugar LM, Nam R, et al. Association of diet-induced hyperinsulinemia with accelerated growth of prostate cancer (LNCaP) xenografts. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(23):1793-800.

Bibliografía

174. Gennigens C, Menetrier-Caux C, Droz JP. Insulin-Like Growth Factor (IGF) family and prostate cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006;58(2):124-45.
175. Lehrer S, Diamond EJ, Stagger S, Stone NN, Stock RG. Serum insulin level, disease stage, prostate specific antigen (PSA) and Gleason score in prostate cancer. *Br J Cancer*. 2002;87(7):726-8.
176. Abe R, Yamagishi S. AGE-RAGE system and carcinogenesis. *Curr Pharm Des*. 2008;14(10):940-5.
177. Castello-Porcar A, Garcia-Morata F, Martinez-Jabaloyas JM. Prostate cancer detection rate at second and third biopsy. Predictive factors and risk groups for cancer diagnosis. *Arch Esp Urol*. 2014;67(7):605-14.
178. Panach-Navarrete J, Garcia-Morata F, Hernandez-Medina JA, Martinez-Jabaloyas JM. When to biopsy seminal vesicles. *Actas Urol Esp*. 2015;39(4):203-9.
179. Scardino PT. Early detection of prostate cancer. *Urol Clin North Am*. 1989;16(4):635-55.
180. Panach-Navarrete J, Morales-Giraldo A, Ferrandis-Cortes C, Garcia-Morata F, Pastor-Lence JC, Martinez-Jabaloyas JM. Is there a relationship between varicocele and testosterone levels? *Aging Male*. 2019:1-7.
181. Panach-Navarrete J, Valls-Gonzalez L, Sanchez-Cano E, Medina-Gonzalez M, Castello-Porcar A, Martinez-Jabaloyas JM. Comparison of three different antibiotic protocols in transurethral resection of bladder tumour and the possible infectious risk factors: A non-randomized, prospective study. *Can Urol Assoc J*. 2018;12(11):E466-E674.
182. Sinha R, Park Y, Graubard BI, Leitzmann MF, Hollenbeck A, Schatzkin A, et al. Meat and meat-related compounds and risk of prostate cancer in a large prospective cohort study in the United States. *Am J Epidemiol*. 2009;170(9):1165-77.
183. Keshari KR, Tsachres H, Iman R, Delos Santos L, Tabatabai ZL, Shinohara K, et al. Correlation of phospholipid metabolites with prostate cancer pathologic grade, proliferative status and surgical stage - impact of tissue environment. *NMR Biomed*. 2011;24(6):691-9.
184. Giskeødegård GF, Bertilsson H, Selnaes KM, Wright AJ, Bathen TF, Viset T, et al. Spermine and citrate as metabolic biomarkers for assessing prostate cancer aggressiveness. *PLoS One*. 2013;8(4):e62375.
185. Dudka I, Thysell E, Lundquist K, Antti H, Iglesias-Gato D, Flores-Morales A, et al. Comprehensive metabolomics analysis of prostate cancer tissue in relation to tumor aggressiveness and TMPRSS2-ERG fusion status. *BMC Cancer*. 2020;20(1):437.
186. Martinez-Jabaloyas JM, Castello-Porcar A, Gonzalez-Baena AC, Cozar-Olmo JM, Minana-Lopez B, Gomez-Veiga F, et al. Influence of demographic and tumour variables on prostate cancer treatment with curative intent in Spain. Results of the 2010 national prostate cancer registry. *Actas Urol Esp*. 2016;40(8):485-91.
187. Sajadi KP, Kim T, Terris MK, Brown JA, Lewis RW. High yield of saturation prostate biopsy for patients with previous negative biopsies and small prostates. *Urology*. 2007;70(4):691-5.
188. Palsdottir T, Nordstrom T, Karlsson A, Gronberg H, Clements M, Eklund M. The impact of different prostate-specific antigen (PSA) testing intervals on Gleason score at diagnosis and the risk of experiencing false-positive biopsy recommendations: a population-based cohort study. *BMJ Open*. 2019;9(3):e027958.
189. Cozar JM, Minana B, Gomez-Veiga F, Rodriguez-Antolin A, Villavicencio H, Cantalapiedra A, et al. National prostate cancer registry 2010 in Spain. *Actas Urol Esp*. 2013;37(1):12-9.
190. Cheng JY, Ng EM, Chen RY, Ko JS. Alcohol consumption and erectile dysfunction: meta-analysis of population-based studies. *Int J Impot Res*. 2007;19(4):343-52.
191. Dittrich R, Kurth J, Decelle EA, DeFeo EM, Taupitz M, Wu S, et al. Assessing prostate cancer growth with citrate measured by intact tissue proton magnetic resonance spectroscopy. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2012;15(3):278-82.
192. Smith RC, Litwin MS, Lu Y, Zetter BR. Identification of an endogenous inhibitor of prostatic carcinoma cell growth. *Nat Med*. 1995;1(10):1040-5.

193. Tang Y, Kim YS, Choi EJ, Hwang YJ, Yun YS, Bae SM, et al. Taurine Attenuates Epithelial-Mesenchymal Transition-Related Genes in Human Prostate Cancer Cells. *Adv Exp Med Biol.* 2017;975 Pt 2:1203-12.
194. Michaelis T, Helms G, Merboldt KD, Hanicke W, Bruhn H, Frahm J. Identification of Scyllo-inositol in proton NMR spectra of human brain in vivo. *NMR Biomed.* 1993;6(1):105-9.
195. Rudrabhatla SR, Mahaffey CL, Mummert ME. Tumor microenvironment modulates hyaluronan expression: the lactate effect. *J Invest Dermatol.* 2006;126(6):1378-87.
196. van Asten JJ, Cuijpers V, Hulsbergen-van de Kaa C, Soede-Huijbregts C, Witjes JA, Verhofstad A, et al. High resolution magic angle spinning NMR spectroscopy for metabolic assessment of cancer presence and Gleason score in human prostate needle biopsies. *MAGMA.* 2008;21(6):435-42.
197. Tessem MB, Swanson MG, Keshari KR, Albers MJ, Joun D, Tabatabai ZL, et al. Evaluation of lactate and alanine as metabolic biomarkers of prostate cancer using ¹H HR-MAS spectroscopy of biopsy tissues. *Magn Reson Med.* 2008;60(3):510-6.
198. Swanson MG, Keshari KR, Tabatabai ZL, Simko JP, Shinohara K, Carroll PR, et al. Quantification of choline- and ethanolamine-containing metabolites in human prostate tissues using ¹H HR-MAS total correlation spectroscopy. *Magn Reson Med.* 2008;60(1):33-40.
199. Stenman K, Hauksson JB, Grobner G, Stattin P, Bergh A, Riklund K. Detection of polyunsaturated omega-6 fatty acid in human malignant prostate tissue by 1D and 2D high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy. *MAGMA.* 2009;22(6):327-31.
200. Gillies RJ, Morse DL. In vivo magnetic resonance spectroscopy in cancer. *Annu Rev Biomed Eng.* 2005;7:287-326.
201. Kobayashi N, Barnard RJ, Henning SM, Elashoff D, Reddy ST, Cohen P, et al. Effect of altering dietary omega-6/omega-3 fatty acid ratios on prostate cancer membrane composition, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2. *Clin Cancer Res.* 2006;12(15):4662-70.
202. Komoroski RA, Holder JC, Pappas AA, Finkbeiner AE. ³¹P NMR of phospholipid metabolites in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Magn Reson Med.* 2011;65(4):911-3.
203. Madhu B, Shaw GL, Warren AY, Neal DE, Griffiths JR. Response of Degarelix treatment in human prostate cancer monitored by HR-MAS (¹H) NMR spectroscopy. *Metabolomics.* 2016;12:120.
204. Wendel AA, Lewin TM, Coleman RA. Glycerol-3-phosphate acyltransferases: rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis. *Biochimica et biophysica acta.* 2009;1791(6):501-6.
205. Collison LW, Murphy EJ, Jolly CA. Glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 regulates murine T-lymphocyte proliferation and cytokine production. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008;295(6):C1543-9.
206. Karlsson EA, Wang S, Shi Q, Coleman RA, Beck MA. Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 is essential for the immune response to infection with coxsackievirus B3 in mice. *J Nutr.* 2009;139(4):779-83.
207. Gimeno RE, Cao J. Thematic review series: glycerolipids. Mammalian glycerol-3-phosphate acyltransferases: new genes for an old activity. *J Lipid Res.* 2008;49(10):2079-88.
208. Pellon-Maison M, Montanaro MA, Lacunza E, Garcia-Fabiani MB, Soler-Gerino MC, Cattaneo ER, et al. Glycerol-3-phosphate acyltransferase-2 behaves as a cancer testis gene and promotes growth and tumorigenicity of the breast cancer MDA-MB-231 cell line. *PLoS One.* 2014;9(6):e100896.
209. Brockmoller SF, Bucher E, Muller BM, Budczies J, Hilvo M, Griffin JL, et al. Integration of metabolomics and expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAM) in breast cancer-link to patient survival, hormone receptor status, and metabolic profiling. *J Proteome Res.* 2012;11(2):850-60.
210. Weinberg JM, Bienholz A, Venkatachalam MA. The role of glycine in regulated cell death. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(11-12):2285-308.

Bibliografia

211. Gunter TE, Pfeiffer DR. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol.* 1990;258(5 Pt 1):C755-86.
212. Schulte ML, Fu A, Zhao P, Li J, Geng L, Smith ST, et al. Pharmacological blockade of ASCT2-dependent glutamine transport leads to antitumor efficacy in preclinical models. *Nat Med.* 2018;24(2):194-202.
213. Robey RB, Weisz J, Kuemmerle NB, Salzberg AC, Berg A, Brown DG, et al. Metabolic reprogramming and dysregulated metabolism: cause, consequence and/or enabler of environmental carcinogenesis? *Carcinogenesis.* 2015;36 Suppl 1:S203-31.
214. Wang K, Zhang W, Wang Z, Gao M, Wang X, Han W, et al. Flavokawain A inhibits prostate cancer cells by inducing cell cycle arrest and cell apoptosis and regulating the glutamine metabolism pathway. *J Pharm Biomed Anal.* 2020;186:113288.
215. Dorai T, Dorai B, Pinto JT, Grasso M, Cooper AJL. High Levels of Glutaminase II Pathway Enzymes in Normal and Cancerous Prostate Suggest a Role in 'Glutamine Addiction'. *Biomolecules.* 2019;10(1).
216. Wu S, Ma S, Yin X, Yi P, Liu J. An integrated PKD1-dependent signaling network amplifies IRE1 pro-survival signaling. *J Biol Chem.* 2019;294(29):11119-30.
217. Zhang B, Wang W, Li C, Liu R. Inositol polyphosphate-4-phosphatase type II plays critical roles in the modulation of cadherin-mediated adhesion dynamics of pancreatic ductal adenocarcinomas. *Cell Adh Migr.* 2018;12(6):548-63.
218. Agoulnik IU, Hodgson MC, Bowden WA, Ittmann MM. INPP4B: the new kid on the PI3K block. *Oncotarget.* 2011;2(4):321-8.
219. Zhang M, Suarez E, Vasquez JL, Nathanson L, Peterson LE, Rajapakshe K, et al. Inositol polyphosphate 4-phosphatase type II regulation of androgen receptor activity. *Oncogene.* 2019;38(7):1121-35.
220. Bidaux G, Gordienko D, Shapovalov G, Farfariello V, Borowiec AS, Iamshanova O, et al. 4TM-TRPM8 channels are new gatekeepers of the ER-mitochondria Ca²⁺ transfer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2018;1865(7):981-94.
221. Costello LC, Franklin RB, Narayan P. Citrate in the diagnosis of prostate cancer. *Prostate.* 1999;38(3):237-45.
222. Cooper JF, Imfeld H. The role of citric acid in the physiology of the prostate: a preliminary report. *J Urol.* 1959;81(1):157-64.
223. Halliday KR, Fenoglio-Preiser C, Sillerud LO. Differentiation of human tumors from nonmalignant tissue by natural-abundance ¹³C NMR spectroscopy. *Magn Reson Med.* 1988;7(4):384-411.
224. Bader DA, McGuire SE. Tumour metabolism and its unique properties in prostate adenocarcinoma. *Nat Rev Urol.* 2020;17(4):214-31.
225. Gregorio EP, Alexandrino AP, Schuquel ITA, da Costa WF, Rodrigues MAF. Seminal citrate is superior to PSA for detecting clinically significant prostate cancer. *Int Braz J Urol.* 2019;45(6):1113-21.
226. Dickerman BA, Ebot EM, Healy BC, Wilson KM, Eliassen AH, Ascherio A, et al. A Metabolomics Analysis of Adiposity and Advanced Prostate Cancer Risk in the Health Professionals Follow-Up Study. *Metabolites.* 2020;10(3).
227. Conte R, Valentino A, Di Cristo F, Peluso G, Cerruti P, Di Salle A, et al. Cationic Polymer Nanoparticles-Mediated Delivery of miR-124 Impairs Tumorigenicity of Prostate Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3).
228. Kim SH, Hahm ER, Singh KB, Shiva S, Stewart-Ornstein J, Singh SV. RNA-seq reveals novel mechanistic targets of withaferin A in prostate cancer cells. *Carcinogenesis.* 2020.
229. Puhka M, Takatalo M, Nordberg ME, Valkonen S, Nandania J, Aatonen M, et al. Metabolomic Profiling of Extracellular Vesicles and Alternative Normalization Methods Reveal Enriched Metabolites and Strategies to Study Prostate Cancer-Related Changes. *Theranostics.* 2017;7(16):3824-41.

230. Baci D, Bruno A, Cascini C, Gallazzi M, Mortara L, Sessa F, et al. Acetyl-L-Carnitine downregulates invasion (CXCR4/CXCL12, MMP-9) and angiogenesis (VEGF, CXCL8) pathways in prostate cancer cells: rationale for prevention and interception strategies. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):464.
231. Hansen AF, Sandsmark E, Rye MB, Wright AJ, Bertilsson H, Richardsen E, et al. Presence of TMPRSS2-ERG is associated with alterations of the metabolic profile in human prostate cancer. *Oncotarget*. 2016;7(27):42071-85.
232. Saylor PJ, Karoly ED, Smith MR. Prospective study of changes in the metabolomic profiles of men during their first three months of androgen deprivation therapy for prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18(13):3677-85.
233. Huang J, Mondul AM. Prospective serum metabolomic profiling of lethal prostate cancer. *Int J Cancer*. 2019;145(12):3231-43.
234. Kim H, Yokoyama W, Davis PA. TRAMP prostate tumor growth is slowed by walnut diets through altered IGF-1 levels, energy pathways, and cholesterol metabolism. *J Med Food*. 2014;17(12):1281-6.
235. Guzmán-Luna V, Olvera-Rodríguez L, Bustamante-Villalobos P, Saab-Rincón G. Characterization of a New Allelic Variant of Triosephosphate Isomerase from the LNCaP Human Prostate Cancer Cell Line: Enzyme Inhibition and Spectroscopic Studies. *Curr Enzym Inhib*. 2015;13(3):184-90.
236. Jin C, Zhu X, Wu H, Wang Y. Perturbation of phosphoglycerate kinase 1 (PGK1) only marginally affects glycolysis in cancer cells. *J Biol Chem*. 2020;295(19):6425-46.
237. Zheng Z, Mergaert AM, Fahmy LM, Bawadekar M, Holmes CL, Ong IM, et al. Disordered Antigens and Epitope Overlap Between Anti-Citrullinated Protein Antibodies and Rheumatoid Factor in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2020;72(2):262-72.
238. Farahani H, Alaei M, Amri J, Baghinia MR, Rafiee M. Serum and Saliva Concentrations of Biochemical Parameters in Men with Prostate Cancer and Benign Prostate Hyperplasia. *Lab Med*. 2020;51(3):243-51.
239. Maoujoud O, El Machtani S, Asseraji M, Atbib Y, Zajjari Y, Taoufik A, et al. Serum tumor markers in hemodialysis patients. *Int J Artif Organs*. 2014;37(2):126-32.
240. Weinstein SJ, Mackrain K, Stolzenberg-Solomon RZ, Selhub J, Virtamo J, Albanes D. Serum creatinine and prostate cancer risk in a prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(10):2643-9.
241. Qu F, Gu Y, Wang Q, He M, Zhou F, Sun J, et al. Metabolomic profiling to evaluate the efficacy of proxalutamide, a novel androgen receptor antagonist, in prostate cancer cells. *Invest New Drugs* 2020.
242. Borque A, Esteban LM, Sanz G, Rubio-Briones J, Gil Sanz MJ. Usefulness of clinical nomograms and predictive models for pca. Predictive clinical factors of tumor aggressiveness. *Arch Esp Urol*. 2015;68(3):267-81.
243. Braadland PR, Giskeødegård G, Sandsmark E, Bertilsson H, Euceda LR, Hansen AF, et al. Ex vivo metabolic fingerprinting identifies biomarkers predictive of prostate cancer recurrence following radical prostatectomy. *Br J Cancer*. 2017;117(11):1656-64.
244. Stockert JA, Weil R, Yadav KK, Kyprianou N, Tewari AK. Pseudouridine as a novel biomarker in prostate cancer. *Urol Oncol*. 2020; 116(8):1545-52.
245. Gómez-Cebrián N, Rojas-Benedicto A, Albors-Vaquer A, López-Guerrero JA, Pineda-Lucena A, Puchades-Carrasco L. Metabolomics Contributions to the Discovery of Prostate Cancer Biomarkers. *Metabolites*. 2019;9(3):1268-75.
246. Wu D, Ni J, Beretov J, Cozzi P, Willcox M, Wasinger V, et al. Urinary biomarkers in prostate cancer detection and monitoring progression. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017;118:15-26.
247. Clos-Garcia M, Loizaga-Iriarte A, Zuñiga-Garcia P, Sánchez-Mosquera P. Metabolic alterations in urine extracellular vesicles are associated to prostate cancer pathogenesis and progression. *J Extracell Vesicles*. 2018;7(1):1470442.

Bibliografía

248. Liang QL, H.; Xie, L.; Li, X.; Zhang, A. High-throughput metabolomics enables biomarker discovery in prostate cancer. *RSC Adv.* 2017;7:2587 - 93.
249. Gkotsos G, Virgiliou C, Lagoudaki I, Sardeli C, Raikos N, Theodoridis G, et al. The Role of Sarcosine, Uracil, and Kynurenic Acid Metabolism in Urine for Diagnosis and Progression Monitoring of Prostate Cancer. *Metabolites.* 2017;7(1).
250. Struck-Lewicka W, Kordalewska M, Bujak R, Yumba Mpanga A, Markuszewski M, Jacyna J, et al. Urine metabolic fingerprinting using LC-MS and GC-MS reveals metabolite changes in prostate cancer: A pilot study. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. J Pharm Biomed Anal.* 2015;111:351-61.
251. Fernández-Peralbo MA, Gómez-Gómez E, Calderón-Santiago M, Carrasco-Valiente J, Ruiz-García J, Requena-Tapia MJ, et al. Prostate Cancer Patients-Negative Biopsy Controls Discrimination by Untargeted Metabolomics Analysis of Urine by LC-QTOF: Upstream Information on Other Omics. *Sci Rep.* 2016;6:38243.
252. Fujita K, Kume H, Matsuzaki K, Kawashima A, Ujike T, Nagahara A, et al. Proteomic analysis of urinary extracellular vesicles from high Gleason score prostate cancer. *Sci Rep.* 2017;7:42961.
253. Pérez-Rambla C, Puchades-Carrasco L, García-Flores M, Rubio-Briones J, López-Guerrero JA, Pineda-Lucena A. Non-invasive urinary metabolomic profiling discriminates prostate cancer from benign prostatic hyperplasia. *Metabolomics.* 2017;13(5):52.
254. Davaliev K, Kostovska IM, Kiprijanovska S, Markoska K, Kubelka-Sabit K, Filipovski V, et al. Proteomics analysis of malignant and benign prostate tissue by 2D DIGE/MS reveals new insights into proteins involved in prostate cancer. *Prostate.* 2015;75(14):1586-600.
255. Amobi A, Qian F, Lugade AA, Odunsi K. Tryptophan Catabolism and Cancer Immunotherapy Targeting IDO Mediated Immune Suppression. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1036:129-44.
256. Santhanam S, Alvarado DM, Ciorba MA. Therapeutic targeting of inflammation and tryptophan metabolism in colon and gastrointestinal cancer. *Transl Res.* 2016;167(1):67-79.
257. Khan AP, Rajendiran TM, Ateeq B, Asangani IA, Athanikar JN, Yocum AK, et al. The role of sarcosine metabolism in prostate cancer progression. *Neoplasia.* 2013;15(5):491-501.
258. Kumar D, Gupta A, Mandhani A, Sankhwar SN. NMR spectroscopy of filtered serum of prostate cancer: A new frontier in metabolomics. *Prostate.* 2016;76(12):1106-19.
259. Kumar D, Gupta A, Mandhani A, Sankhwar SN. Metabolomics-derived prostate cancer biomarkers: fact or fiction? *J Proteome Res.* 2015;14(3):1455-64.
260. Ankerst DP, Liss M, Zapata D, Hoefler J, Thompson IM, Leach RJ. A case control study of sarcosine as an early prostate cancer detection biomarker. *BMC Urol.* 2015;15:99.
261. Dereziński P, Klupczynska A, Sawicki W, Pałka JA, Kokot ZJ. Amino Acid Profiles of Serum and Urine in Search for Prostate Cancer Biomarkers: a Pilot Study. *Int J Med Sci.* 2017;14(1):1-12.
262. Locasale JW. Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(8):572-83.
263. Heger Z, Michalek P, Guran R, Cernei N, Duskova K, Vesely S, et al. Differences in urinary proteins related to surgical margin status after radical prostatectomy. *Oncol Rep.* 2015;34(6):3247-55.
264. Koslowski M, Türeci O, Bell C, Krause P, Lehr HA, Brunner J, et al. Multiple splice variants of lactate dehydrogenase C selectively expressed in human cancer. *Cancer Res.* 2002;62(22):6750-5.
265. Kong L, Du W, Cui Z, Wang L, Yang Z, Zhang H, et al. Expression of lactate dehydrogenase C in MDA-MB-231 cells and its role in tumor invasion and migration. *Mol Med Rep.* 2016;13(4):3533-8.
266. Borque A, Rubio-Briones J, Esteban LM, Sanz G, Dominguez-Escrig J, Ramirez-Backhaus M, et al. Implementing the use of nomograms by choosing threshold points in predictive

- models: 2012 updated Partin Tables vs a European predictive nomogram for organ-confined disease in prostate cancer. *BJU Int.* 2014;113(6):878-86.
267. Fernando AB, Sanz G, Esteban LM, Sanz MJ, Martinez PG, de Jalon AG, et al. Current validity of nomograms for prostate cancer staging. *Arch Esp Urol.* 2006;59(10):989-1000.
268. Ross PL, Gerigk C, Gonen M, Yossepowitch O, Cagiannos I, Sogani PC, et al. Comparisons of nomograms and urologists' predictions in prostate cancer. *Semin Urol Oncol.* 2002;20(2):82-8.
269. Vickers AJ, Elkin EB. Decision curve analysis: a novel method for evaluating prediction models. *Med Decis Making.* 2006;26(6):565-74.
270. Borque A, Esparrago M, Sanchez-Martin F, Rubio-Briones J, Esteban LM, Sanz G. Urology and Web predictive resources. *Actas Urol Esp.* 2014;38(3):141-2.
271. Thompson IM, Ankerst DP, Chi C, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, et al. Assessing prostate cancer risk: results from the Prostate Cancer Prevention Trial. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98(8):529-34.
272. Nguyen CT, Isariyawongse B, Yu C, Kattan MW. The REDUCE metagram: a comprehensive prediction tool for determining the utility of dutasteride chemoprevention in men at risk for prostate cancer. *Front Oncol.* 2012;2:138.
273. Andriole GL, Bostwick D, Brawley OW, Gomella L, Marberger M, Montorsi F, et al. The effect of dutasteride on the usefulness of prostate specific antigen for the diagnosis of high grade and clinically relevant prostate cancer in men with a previous negative biopsy: results from the REDUCE study. *J Urol.* 2011;185(1):126-31.
274. Kransse R, Roobol M, Schroder FH. A graphical device to represent the outcomes of a logistic regression analysis. *Prostate.* 2008;68(15):1674-80.
275. Jeong IG, Lim JH, Hwang SS, Kim SC, You D, Hong JH, et al. Nomogram using transrectal ultrasound-derived information predicting the detection of high grade prostate cancer on initial biopsy. *Prostate Int.* 2013;1(2):69-75.
276. Eissa A, Elsherbiny A, Zoeir A, Sandri M, Pirola G, Puliatti S, et al. Reliability of the different versions of Partin tables in predicting extraprostatic extension of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Minerva Urol Nefrol.* 2019;71(5):457-78.
277. Kattan MW, Eastham JA, Wheeler TM, Maru N, Scardino PT, Erbersdobler A, et al. Counseling men with prostate cancer: a nomogram for predicting the presence of small, moderately differentiated, confined tumors. *J Urol.* 2003;170(5):1792-7.
278. Wang L, Hricak H, Kattan MW, Chen HN, Scardino PT, Kuroiwa K. Prediction of organ-confined prostate cancer: incremental value of MR imaging and MR spectroscopic imaging to staging nomograms. *Radiology.* 2006;238(2):597-603.
279. Cooperberg MR, Pasta DJ, Elkin EP, Litwin MS, Latini DM, Du Chane J, et al. The University of California, San Francisco Cancer of the Prostate Risk Assessment score: a straightforward and reliable preoperative predictor of disease recurrence after radical prostatectomy. *J Urol.* 2005;173(6):1938-42.
280. Stephenson AJ, Scardino PT, Eastham JA, Bianco FJ, Jr., Dotan ZA, Fearn PA, et al. Preoperative nomogram predicting the 10-year probability of prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98(10):715-7.
281. Han M, Partin AW, Zahurak M, Piantadosi S, Epstein JI, Walsh PC. Biochemical (prostate specific antigen) recurrence probability following radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. *J Urol.* 2003;169(2):517-23.
282. Walz J, Gallina A, Saad F, Montorsi F, Perrotte P, Shariat SF, et al. A nomogram predicting 10-year life expectancy in candidates for radical prostatectomy or radiotherapy for prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25(24):3576-81.
283. Kattan MW, Potters L, Blasko JC, Beyer DC, Fearn P, Cavanagh W, et al. Pretreatment nomogram for predicting freedom from recurrence after permanent prostate brachytherapy in prostate cancer. *Urology.* 2001;58(3):393-9.

Bibliografia

284. Walz J, Chun FK, Klein EA, Reuther A, Saad F, Graefen M, et al. Nomogram predicting the probability of early recurrence after radical prostatectomy for prostate cancer. *J Urol*. 2009;181(2):601-7; discussion 7-8.
285. Stephenson AJ, Scardino PT, Eastham JA, Bianco FJ, Jr., Dotan ZA, DiBlasio CJ, et al. Postoperative nomogram predicting the 10-year probability of prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *J Clin Oncol*. 2005;23(28):7005-12.
286. Suardi N, Porter CR, Reuther AM, Walz J, Kodama K, Gibbons RP, et al. A nomogram predicting long-term biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Cancer*. 2008;112(6):1254-63.
287. Porter CR, Suardi N, Kodama K, Capitanio U, Gibbons RP, Correa R, et al. A nomogram predicting metastatic progression after radical prostatectomy. *Int J Urol*. 2008;15(10):889-94.
288. Stephenson AJ, Scardino PT, Kattan MW, Pisansky TM, Slawin KM, Klein EA, et al. Predicting the outcome of salvage radiation therapy for recurrent prostate cancer after radical prostatectomy. *J Clin Oncol*. 2007;25(15):2035-41.
289. Porter CR, Gallina A, Kodama K, Gibbons RP, Correa R, Jr., Perrotte P, et al. Prostate cancer-specific survival in men treated with hormonal therapy after failure of radical prostatectomy. *Eur Urol*. 2007;52(2):446-52.
290. Smaletz O, Scher HI, Small EJ, Verbel DA, McMillan A, Regan K, et al. Nomogram for overall survival of patients with progressive metastatic prostate cancer after castration. *J Clin Oncol*. 2002;20(19):3972-82.
291. Svatek R, Karakiewicz PI, Shulman M, Karam J, Perrotte P, Benaim E. Pre-treatment nomogram for disease-specific survival of patients with chemotherapy-naïve androgen independent prostate cancer. *Eur Urol*. 2006;49(4):666-74.
292. Armstrong AJ, Garrett-Mayer E, de Wit R, Tannock I, Eisenberger M. Prediction of survival following first-line chemotherapy in men with castration-resistant metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2010;16(1):203-11.
293. Velonas VM, Woo HH, dos Remedios CG, Assinder SJ. Current status of biomarkers for prostate cancer. *Int J Mol Sci*. 2013;14(6):11034-60.
294. Hansen J, Auprich M, Ahyai SA, de la Taille A, van Poppel H, Marberger M, et al. Initial prostate biopsy: development and internal validation of a biopsy-specific nomogram based on the prostate cancer antigen 3 assay. *Eur Urol*. 2013;63(2):201-9.
295. Rubio-Briones J, Casanova J, Dumont R, Rubio L, Fernandez-Serra A, Casanova-Salas I, et al. Optimizing prostate cancer screening; prospective randomized controlled study of the role of PSA and PCA3 testing in a sequential manner in an opportunistic screening program. *Actas Urol Esp*. 2014;38(4):217-23.
296. Lughezzani G, Lazzeri M, Haese A, McNicholas T, de la Taille A, Buffi NM, et al. Multicenter European external validation of a prostate health index-based nomogram for predicting prostate cancer at extended biopsy. *Eur Urol*. 2014;66(5):906-12.
297. Vickers AJ, Cronin AM, Aus G, Pihl CG, Becker C, Pettersson K, et al. A panel of kallikrein markers can reduce unnecessary biopsy for prostate cancer: data from the European Randomized Study of Prostate Cancer Screening in Goteborg, Sweden. *BMC Med*. 2008;6:19.
298. Parekh DJ, Punnen S, Sjoberg DD, Asroff SW, Bailen JL, Cochran JS, et al. A multi-institutional prospective trial in the USA confirms that the 4Kscore accurately identifies men with high-grade prostate cancer. *Eur Urol*. 2015;68(3):464-70.
299. Cooperberg MR, Simko JP, Cowan JE, Reid JE, Djalilvand A, Bhatnagar S, et al. Validation of a cell-cycle progression gene panel to improve risk stratification in a contemporary prostatectomy cohort. *J Clin Oncol*. 2013;31(11):1428-34.
300. Freedland SJ, Gerber L, Reid J, Welbourn W, Tikishvili E, Park J, et al. Prognostic utility of cell cycle progression score in men with prostate cancer after primary external beam radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2013;86(5):848-53.

301. Morote J, Del Amo J, Borque A, Ars E, Hernandez C, Herranz F, et al. Improved prediction of biochemical recurrence after radical prostatectomy by genetic polymorphisms. *J Urol*. 2010;184(2):506-11.
302. Borque A, del Amo J, Esteban LM, Ars E, Hernandez C, Planas J, et al. Genetic predisposition to early recurrence in clinically localized prostate cancer. *BJU Int*. 2013;111(4):549-58.
303. Van Neste L, Hendriks RJ, Dijkstra S, Trooskens G, Cornel EB, Jannink SA, et al. Detection of High-grade Prostate Cancer Using a Urinary Molecular Biomarker-Based Risk Score. *Eur Urol*. 2016;70(5):740-8.
304. Quintana LM, Fernandez Pascual E, Linares Espinos E, Martinez-Ballesteros C, Martin-Vivas C, Rengifo Abbad D, et al. Initial experience with SelectMDx(R) in the diagnosis of prostate cancer in a real-world evidence clinical practice setting. *Actas Urol Esp*. 2020;44(6):400-7.
305. Eifler JB, Feng Z, Lin BM, Partin MT, Humphreys EB, Han M, et al. An updated prostate cancer staging nomogram (Partin tables) based on cases from 2006 to 2011. *BJU Int*. 2013;111(1):22-9.

9. ANEXOS

ANEXO I. PARÁMETROS ESPECTRALES

Los parámetros esenciales para interpretar la información de un espectro de RMN son los que se muestran a continuación:

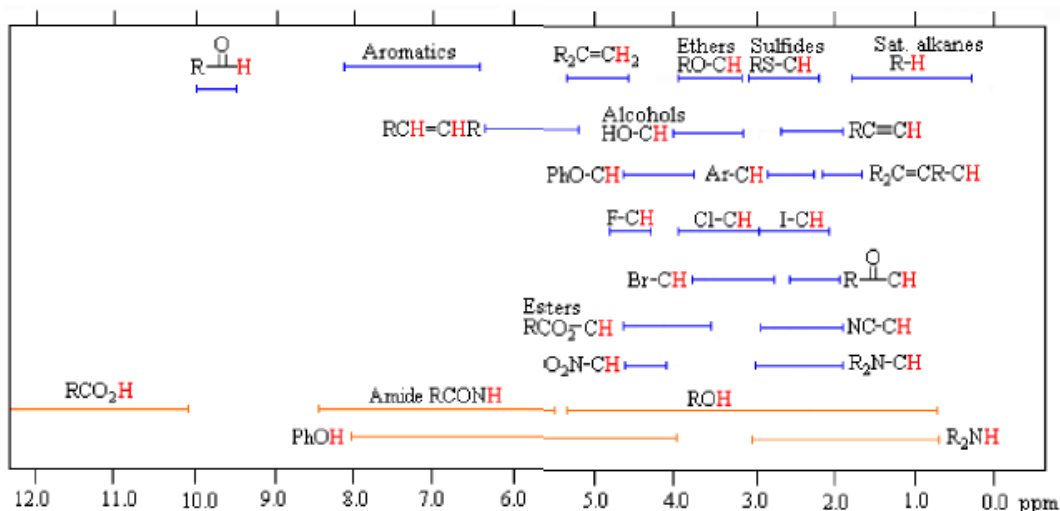
DESPLAZAMIENTO QUÍMICO

El desplazamiento químico (δ) permite usar la RMN para distinguir diferentes moléculas, incluso para distinguir entre diferentes átomos dentro de la misma molécula. Cada núcleo tiene una frecuencia de resonancia característica que depende del campo magnético y del entorno electrónico de la molécula considerada, que determina su posición en el espectro. Para poder comparar los distintos espectros obtenidos en diferentes campos magnéticos, el δ se expresa en partes por millón (ppm), calculándose mediante la siguiente ecuación (anexo I, ecuación 1) (1, 2).

Anexo I, ecuación 1. ν_s es la frecuencia de resonancia del núcleo de interés y ν_R es la frecuencia del núcleo elegido como referencia.

$$\delta = \frac{\nu_s - \nu_R}{\nu_R} \times 10^6$$

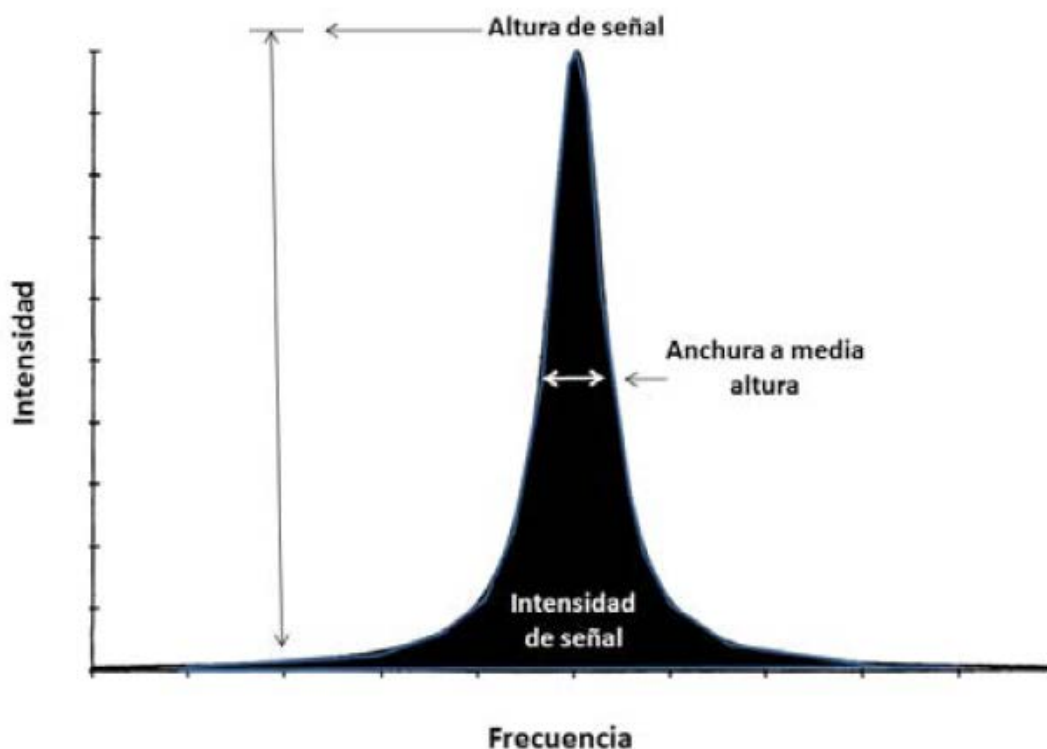
Mediante el cálculo de la escala en ppm, podrán compararse los espectros entre sí de forma independiente al campo magnético o al aparato utilizado para su medición. El δ dependerá de distintos factores, como por ejemplo el entorno químico del núcleo, el tipo de núcleo, el medio y los centros paramagnéticos cercanos al núcleo. En general, cuanto más "protegido" esté un núcleo por los electrones que lo rodean, más bajos serán sus valores de ppm (1).



Anexo I, figura 1. Principales desplazamientos químicos para un protón asociado a diferentes grupos funcionales. Tomada de (1)

ÁREA Y ANCHURA DE LA SEÑAL DE RESONANCIA

El área de la señal de resonancia puede medirse por integración o por mediciones relativas de las alturas de las resonancias de interés. Independientemente del método utilizado, el área estará relacionada con la concentración de núcleos que originan dicha resonancia. El área bajo la curva es directamente proporcional a la concentración de núcleos que originan dicha señal, y por tanto, proporcional a la concentración de dicha sustancia en la muestra. Por otro lado, la anchura de la resonancia a la mitad de su altura depende tanto de las condiciones instrumentales de la adquisición del espectro como de las características de la molécula estudiada y su entorno. En general, cuanto más estrecha sea la resonancia, mejor es la calidad de adquisición. Aunque este parámetro puede optimizarse experimentalmente, factores como la temperatura o el campo magnético hacen que diferentes resonancias procedentes de una misma muestra puedan tener anchuras de banda distintas. En aquellos casos con anchura de resonancia constante, los cambios en altura se consideran proporcionales a cambios de área, y por lo tanto de concentración (1, 3).



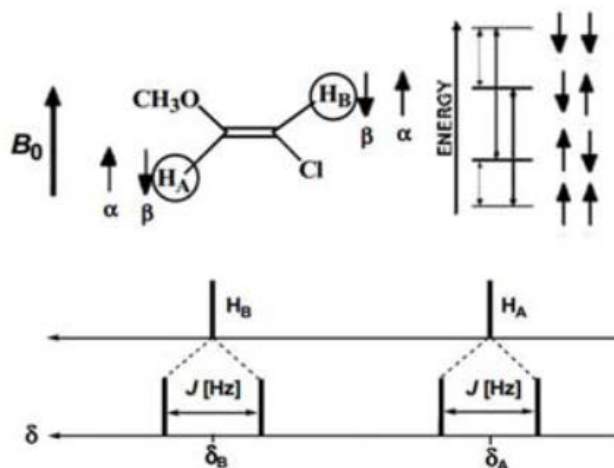
Anexo I, figura 2. Representación esquemática de una señal de espectro RMN, mostrando la altura de señal, la anchura a media altura y la intensidad de señal (área en negro). Adaptada de (4).

CONSTANTE DE ACOPLAMIENTO

La interacción de un núcleo concreto con otros núcleos vecinos puede alterar la forma con la que aparece una señal en RMN. Este hecho se conoce como interacción espín-espín, y se define como la influencia de espines vecinos en la multiplicidad de una determinada señal. La distancia entre señales de la resonancia de un núcleo y las que surgen de la interacción con otro, es la medida de la magnitud con la que cada espín nuclear influencia al otro, denominándose este fenómeno constante de acoplamiento. Se mide en Hz, y su símbolo es "J" (5).

En la figura 3 pueden observarse dos protones diferentes A y B. Cada protón podrá estar en dos estados de espín diferentes, α y β . El campo que sentirá H_A será diferente según H_B esté en uno u otro estado de espín, por lo que H_A aparecerá en dos desplazamientos diferentes. A H_B le sucederá lo mismo. Así pues, existirán 4 posibles transiciones electrónicas que darán lugar a 4 señales en el espectro. Cada señal se

desdoblará en otras dos centradas alrededor del valor de desplazamiento químico original δ_A y δ_B , separadas por "J" Hz.



Anexo I, figura 3. Esquema del origen de la multiplicidad de señal. Adaptado de http://web.uam.es/personal_pdi/ciencias/aurbano/determinacion_estructural/rmn/rmn_tema3.pdf

TIEMPO DE RELAJACIÓN T1 y T2

Después de un pulso de excitación, la señal detectable de RM va disminuyendo conforme el sistema recupera su estado de equilibrio mediante un doble proceso de transferencia de la magnetización. Por un lado, la relajación longitudinal o relajación espín-red, que se caracteriza por la constante de tiempo T_1 , y, por otro lado, la relajación transversal o relajación espín-espín caracterizada por una constante de tiempo T_2 .

La relajación T_1 hace referencia al aumento progresivo de la magnetización longitudinal detectable (M_2) tras un pulso de excitación, estando caracterizada por la constante de tiempo T_1 , la cual mide el tiempo que tarda el sistema en recuperar el 63,2% de la magnetización longitudinal inicial (M_0) tras aplicar un pulso de 90° o el 26,4% de ese valor aplicando un pulso de 180° . La relajación T_1 se relacionará con el intercambio de energía de los espines nucleares y su entorno celular. La ecuación 2 de este anexo muestra el cálculo correspondiente a esta relajación (1).

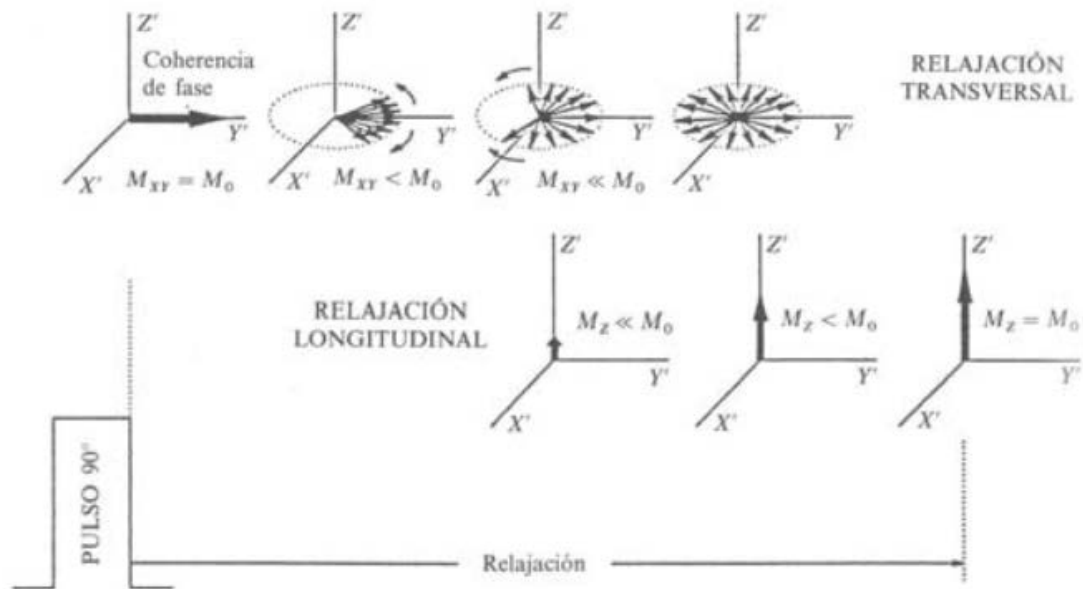
Anexo I, ecuación 2. Ecuación de relajación longitudinal.

$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{M_0 - M_z}{T_1}$$

La relajación T_2 hace referencia al proceso que describe la pérdida de coherencia de fase de la componente transversal (M_{xy}) de la magnetización M_0 , siendo T_2 la constante que indica el tiempo que tarda el sistema en perder 63,2% de la magnetización transversal inicial, siendo característico de cada sistema espín. Su ecuación se muestra a continuación (anexo I, ecuación 3). El T_2 se relaciona con la anchura de las resonancias de un espectro, de forma que cuanto menor es la anchura de una resonancia, mayor es la constante de tiempo T_2 del componente de espín representado por esa anchura de dicha resonancia (1, 2).

Anexo I, ecuación 3. Ecuación de relajación transversal.

$$\frac{dM_{xy}}{dt} = -\frac{M_{xy}}{T_2}$$



Anexo I, figura 4. Relajación transversal (T2) y longitudinal (T1). La componente del vector de magnetización M que es perpendicular al campo magnético principal B_0 es llamada magnetización transversal (M_{xy}). El conjunto de procesos mediante los que decae hasta prácticamente cero, por ejemplo, tras un giro de 90° en el que su valor se hace máximo, es llamado relajación transversal o relajación espín-espín, y se caracteriza por una constante de tiempo T_2 . La componente del vector de magnetización M que es paralela al campo magnético principal B_0 es llamada magnetización longitudinal (M_z). El conjunto de procesos mediante los que se recupera a la magnetización en equilibrio térmico M_0 , es llamado relajación longitudinal o relajación espín-red, y se caracteriza por una constante de tiempo T_1 . Imagen tomada de (2).

Referencias

1. J M-SdT. Contribución al fenotipado molecular de tumores cerebrales preclínicos mediante estudios in vitro e in vivo [master's thesis]. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; 2013.
2. JM GS. Espectroscopia in vivo por resonancia magnética nuclear. Madrid: Eudema; 1991. 276 p.
3. AM B. Resonancia magnética nuclear: Masson 1989. 178 p.
4. RS M. Obtaining an NRM spectrum. A complete introduction to modern NRM spectroscopy. New York: Wiley-Interscience; 1998.
5. M D-H. Preservación del patrón metabólico de tejidos mediante fijación por irradiación con microondas focalizadas. Aplicación al estudio del tejido cerebral normal y patológico mediante espectroscopía HRMAS y metodologías de reconocimiento de patrones [Master's thesis]. Barcelona: Universitat Autonomy de Barcelona; 2013.

ANEXO II: CONSENTIMIENTO INFORMADO Y APROBACIONES DE COMITÉS

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Se le ofrece la posibilidad de participar en el proyecto de investigación titulado “Análisis metabolómico en cáncer de próstata” que está siendo realizado por el Dr. Jose María Martínez Jabaloyas del Servicio de Urología y que ha sido ya evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Antecedentes:

El cáncer de próstata es un tumor muy frecuente y la detección temprana del mismo es muy importante para conocer cómo evolucionará la enfermedad. La supervivencia puede ser muy alta cuando los tumores están localizados en la próstata, pero cuando estos invaden otros tejidos, la enfermedad es más agresiva y la probabilidad de morir por esa enfermedad es mayor. Para diagnosticar estos tumores se utiliza la biopsia transrectal de próstata, obteniendo cilindros de tejido prostático que posteriormente son sometidos a un estudio anatomopatológico. La indicación de realizar una biopsia viene dada tanto por la exploración física (tacto rectal) como por los valores analíticos en sangre de un marcador específico de la próstata: el PSA. No obstante, a pesar del uso frecuente del PSA, muchas de las biopsias de próstata que se realizan son negativas por lo que se realizan un número importante de biopsias innecesarias. Por otra parte, es difícil, en el cáncer de próstata, predecir la agresividad tumoral, por lo que en ocasiones se trata de forma muy agresiva tumores de bajo grado de malignidad y que posiblemente no producirán la muerte del paciente, ya que con los marcadores actuales no se puede conocer con cierta exactitud cuál va a ser el comportamiento del tumor.

¿Cuál es el objetivo de este estudio?

El objetivo de este estudio es conocer si mediante análisis metabólico podemos predecir la existencia de un cáncer de próstata de modo que la detección de este tumor se pudiera realizar de forma más precisa de lo que se realiza actualmente. Además, queremos conocer si el perfil metabólico de la orina y el tejido prostático puede predecir el comportamiento tumoral.

¿Por qué se le ha pedido que participe?

Se le pide su participación en este estudio en el caso de que le haya sido indicada una biopsia transrectal de próstata ante la sospecha de padecer un cáncer de próstata.

¿En qué consiste su participación? ¿Qué tipo de pruebas o procedimientos se le realizarán?

Se le solicita permiso para utilizar con fines científicos muestras de orina y de tejido prostático.

La participación en el presente proyecto no supone ninguna alteración del diagnóstico de cáncer de próstata, ya que se seguirán los mismos procedimientos de igual forma que hasta ahora.

¿Cuáles son los riesgos generales de participar en este estudio?

No se espera ninguna complicación añadida a las que conlleva la biopsia de próstata transrectal que pueden ser, dolor, sangrado, infección urinaria, sangrado en el esperma, o retención urinaria.

Se realizará la extracción de tejido prostático en el momento que se extrae el tejido para el análisis anatomopatológico, de forma que simplemente consistirá en un pinchazo más con el ecógrafo transrectal para obtener un cilindro más de muestra.

La muestra de orina se obtendrá por micción espontánea tras masaje prostático, el cual se realizará durante el tacto rectal que se lleva a cabo de forma rutinaria previamente a la biopsia de próstata.

¿Cuáles son los beneficios de la participación en este estudio?

Es muy posible que los resultados obtenidos en esta investigación tengan poco valor diagnóstico o predictivo para usted, pero podrá ayudar a conocer mejor su enfermedad y mejorar el diagnóstico y seguimiento de futuros pacientes.

¿Qué pasará si decido no participar en este estudio?

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. En caso de que decida no participar en el estudio, esto no modificará el trato y seguimiento que de su enfermedad realicen ni su médico ni el resto del personal sanitario que se ocupa de su enfermedad. Así mismo, podrá retirarse del estudio en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones.

¿A quién puedo preguntar en caso de duda?

Es importante que comente con cualquiera de los investigadores de este proyecto los pormenores o dudas que surjan antes de firmar el consentimiento para su participación. Así mismo, podrá solicitar cualquier explicación que desee sobre cualquier aspecto del estudio y sus implicaciones a lo largo del mismo contactando con el investigador principal del proyecto, el Dr. Jose María Martínez Jabaloyas en el teléfono 9633862600 extensión 51240.

Confidencialidad:

Todos sus datos, así como toda la información médica relacionada con su enfermedad será tratada con absoluta confidencialidad por parte del personal encargado de la investigación. Así mismo, si los resultados del estudio fueran susceptibles de publicación en revistas científicas, en ningún momento se proporcionarán datos personales de los pacientes que han colaborado en esta investigación.

Tal y como contempla la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal, podrá ejercer su derecho a acceder, rectificar o cancelar sus datos contactando con el investigador principal de este estudio.

¿Qué pasará con las muestras biológicas obtenidas durante la investigación?

Anexo II

Durante su participación en este estudio, se le extraerá una muestra de próstata y orina.

Esta muestra será siempre utilizada con fines científicos, pudiéndose utilizar si usted así lo autoriza en el marco de otros proyectos de investigación que tengan como objetivo el estudio de su enfermedad y que previamente hayan sido evaluados y aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital.

Además, este material no será bajo ningún concepto ni en ningún momento motivo de lucro, bien sea por la venta del material o de los derechos para realizar estudios sobre los mismos.

Las muestras biológicas se conservarán en una colección en la Unidad Central de Investigación a cargo de uno de los investigadores colaboradores.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Proyecto titulado: Análisis metabolómico en cáncer de próstata

Investigador principal: Jose María Martínez Jabaloyas

Servicio: Urología

Yo, _____ he sido informado por el Dr.

_____, colaborador del proyecto de investigación arriba mencionado, y declaro que:

- He leído la Hoja de Información que se me ha entregado
- He podido hacer preguntas sobre el estudio
- He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas
- He recibido suficiente información sobre el estudio
- Comprendo que mi participación es voluntaria
- Comprendo que todos mis datos serán tratados confidencialmente
- Comprendo que puedo retirarme del estudio:

Cuando quiera

Sin tener que dar explicaciones

Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Autorizo a que las muestras obtenidas durante el proyecto de investigación sean utilizadas con fines científicos en otros proyectos de investigación que tengan por objeto el estudio de mi enfermedad y que hayan sido aprobados por el Comité de Ética de Investigación Clínica del

Hospital Clínico Universitario de Valencia

Sí No

Quiero que se me pida autorización previa para utilizar mis muestras biológicas para futuros proyectos de investigación

Sí No

Con esto doy mi conformidad para participar en este estudio,

Firma del paciente:

Firma del Investigador:

Fecha:

Fecha



Fundación Investigación del Hospital
Clínico Universitario de Valencia

En Valencia, a 12 de diciembre
2014

D. Josep Redón i Más, Presidente del Comité Científico Interno de la Fundación de Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia – Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA

CERTIFICA

Que el proyecto con título “Análisis metabólico en cáncer de próstata”, presentado por D. José M^a Martínez Jabaloyas perteneciente a esta institución, ha sido evaluado por este Comité en su reunión del día 12 de diciembre 2014, encontrándolo conforme con los requisitos de capacitación del solicitante, la adecuación del proyecto a los medios existentes, la adecuación de la memoria y el interés de los resultados del proyecto para el área de salud.

Y para que conste, se firma en la ciudad y fecha arriba indicadas

**INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA DEL HOSPITAL CLINIC
UNIVERSITARI DE VALENCIA**

D. Manuel Labiós Gómez, Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínic Universitari de Valencia

CERTIFICA

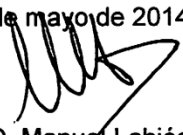
Que en este Comité, en su reunión de fecha 29 de mayo de 2014, y según consta en el acta de la misma, se han analizado los aspectos éticos y científicos relacionados al proyecto de investigación que lleva por título:

Análisis metabólico en cáncer de próstata.

Que será llevado a cabo en el Servicio de Urología y cuyo investigador principal es el Dr. José M^a Martínez Jabaloyas, acordando que reúne las características adecuadas referentes a información a los pacientes y cumplimiento de los criterios éticos para la investigación médica y biomédica establecidos en la ***Declaración de Helsinki*** (Junio 1964, Helsinki, Finlandia) de la Asamblea Médica Mundial, y sus revisiones (Octubre 1975, Tokio, Japón), (Octubre 1983, Venecia, Italia), (Septiembre 1989, Hong Kong), (Octubre 1996, Somerset West, Sudáfrica), (Octubre 2000, Edimburgo) y (Octubre 2008 Seúl, Corea) en la ***Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos del Hombre de la UNESCO*** y los acuerdos del ***Protocolo Adicional del Consejo de Europa para la protección de los Derechos del Hombre y de la dignidad del ser humano frente a la aplicaciones de la biología y de la medicina*** (París 12-1-1998, ratificado el 23-7-1999).

Lo que certifico a efectos oportunos.

Valencia, 29 de mayo de 2014


Fdo. : Dr. D. D. Manuel Labiós Gómez
Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica

Fdo.: Dr. Josep Redón i Más

ANEXO III: ANÁLISIS DE DATOS METABOLÓMICOS Y LA INTERPRETACIÓN DEL ANÁLISIS DE LAS CURVAS ROC

ANÁLISIS DE DATOS METABOLÓMICOS

El análisis de datos es una tarea fundamental para cualquier área en biomedicina, debido a la gran cantidad de información que aportan los instrumentos analíticos. El reconocimiento de patrones supervisados tiene como objetivo establecer un modelo de clasificación basado en datos experimentales para asignar muestras desconocidas a una clase de muestra previamente definida, en función de su patrón de características medidas. Los procedimientos de reconocimiento de patrones supervisados utilizan una estrategia común, independientemente de cuál sea el algoritmo aplicado:

- 1- Selección de una muestra conocida sobre la cual vamos a ser capaces de medir unas determinadas variables.
- 2- Selección de variables que contengan información para llevar a cabo la clasificación que se desea. Las variables que pueden llegar a ser un factor de confusión o de las cuales no se puede extraer información objetiva, deben ser eliminadas.
- 3- Construcción de un modelo utilizando el conjunto que se calificó como muestra. El modelo matemático derivará de un número de variables medidas en la muestra, las cuales constituyen diferentes categorías
- 4- Validación del modelo utilizando un conjunto de muestras independientes de la inicial. Con ellos se consigue evaluar la fiabilidad de la clasificación establecida.

Aunque existen diferentes métodos de reconocimiento de patrones, los que han sido utilizados en este trabajo (como análisis estadísticos multivariantes) son el Análisis de Componentes Principales (PCA) y el Análisis de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-

DA). Estos métodos de reconocimiento se aceptan como técnicas paramétricas, asumiendo que la distribución de la muestra es una distribución normal.

RECONOCIMIENTO DE PATRONES: ANÁLISIS NO SUPERVISADO (PCA)

El análisis de componentes principales (PCA) es un método de reducción de variables cuyo objetivo es simplificar la variabilidad contenida en una matriz de datos. Este método permite identificar tendencias o patrones en los datos, tales como subgrupos, o como *outliers*, representarlos gráficamente y observar cómo se distribuyen las muestras en función de la similitudes o diferencias de sus espectros (1).

En este análisis, dadas N observaciones y K variables, donde $K \gg N$, los datos originales se transforman en una combinación lineal de variables no correlacionadas entre sí denominadas componentes principales (PCs). No todas las PCs contienen la misma información (2). Las nuevas variables se van construyendo según el orden de importancia en cuanto a la variabilidad de información que se recoge del conjunto de muestras. Con esto se consigue reducir la dimensionalidad de los datos, facilitando su interpretación. Habitualmente, este análisis se realiza por grupos (por ejemplo, casos y controles) y se conservan sólo aquellos componentes que recogen la mayor parte de la variabilidad (1).

Para obtener las PCs, se analiza normalmente la matriz de varianza-covarianza y como medida de la cantidad de información incorporada en cada componente, se utiliza su varianza. Es decir, cuanto mayor sea su varianza, mayor es la información que lleva incorporada dicha componente. Por este motivo, se selecciona como primera componente aquella que tenga mayor varianza, mientras que la última componente elegida será la de menor varianza. La ventaja del PCA es que cuando las variables originales están muy correlacionadas entre sí, ocurre que la mayor parte de su variabilidad se puede explicar con muy pocas PCs (1,2).

INTERPRETACIÓN DEL PCA

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

- El *Score plot*: contiene la información sobre las filas (muestras) de la matriz original (X), donde cada punto corresponde a una observación, y resume la relación existente entre ellas. En el *score plot*, las muestras similares se sitúan cerca entre sí y las dispares se sitúan separadas. Una traducción al castellano de este término sería: diagrama de puntos.

- El *Loading plot*: contiene la información sobre las columnas (variables). En este caso, cada punto representa una de las regiones del espectro y su distribución explica la relación existente entre ellas. Una traducción al castellano sería: diagrama de cargas.

El *loading plot* permite interpretar la distribución espacial de las muestras en el *score plot* e identificar las variables responsables de los patrones observados. Ambos gráficos son complementarios y superponibles, lo que significa que la posición de las muestras en el *score plot* está determinada por las variables situadas en la misma posición en el *loading plot* (2-3).

IDENTIFICACIÓN DE OUTLIERS

El PCA, además, permite identificar los *outliers*. Conceptualmente son observaciones que no se ajustan al modelo de PCs (2-3). Estos pueden ser extremos o moderados:

- *Outliers* extremos: son muestras con valores atípicos situadas fuera del intervalo de confianza del 95%. Es posible identificarlos en el *score plot* con la ayuda del gráfico T2 de Hotelling. Este último es la generalización multivariante del test de la t-Student y permite identificar las muestras que cumplen la normalidad multivariante.

- *Outliers* moderados: son muestras que no se ajustan al modelo en términos de residuos, aparecen situados fuera del límite crítico del 0,05 representado en el gráfico DmodX (*distance to the model in the X-data*) (3).

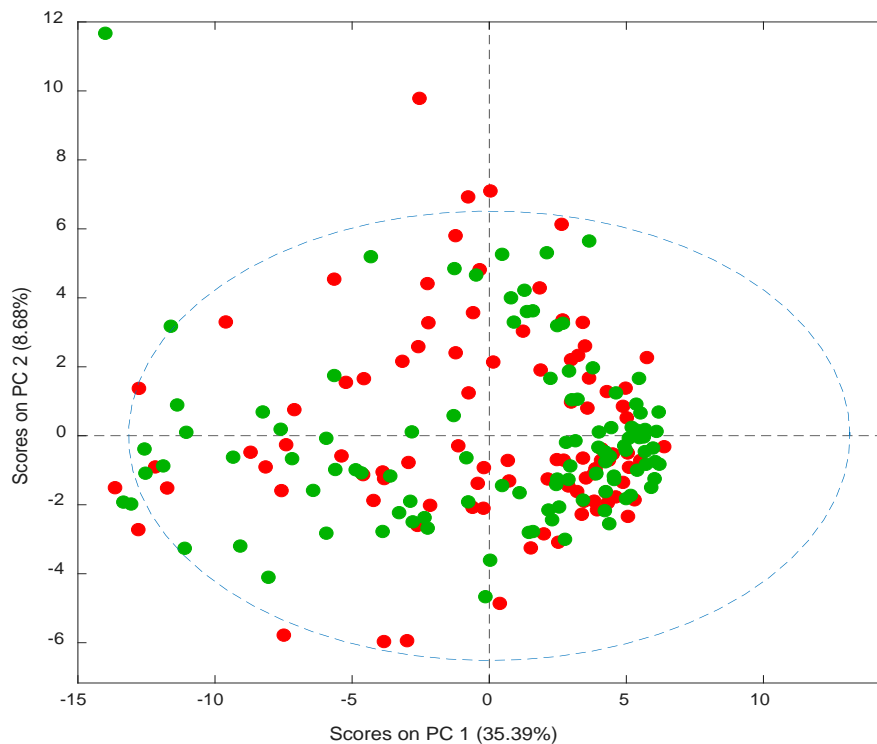
EJEMPLO DE ANÁLISIS NO SUPERVISADO, PCA

Para ejemplificar la forma de representar e interpretar un PCA, se dispone a continuación uno de los análisis llevados a cabo para esta tesis, en concreto el de casos-contróles tomando como referencia la histología de cualquiera de los cilindros recogidos (no sólo el medido por HR-MAS).

Anexo III

En el presente análisis se aceptaron como casos 105 individuos, y como controles 96. Aunque aceptamos que el perfil metabólico obtenido corresponde exclusivamente al cilindro medido, y que éste no tenía por qué coincidir con el resto de cilindros, queríamos comprobar si en los casos con tumor en la cualquier localización de la próstata se observaba un perfil metabólico sugestivo de tumor, aunque el cilindro medido por HR-MAS fuese una muestra sólo con tejido sano.

El diagrama de puntos muestra un solapamiento de casos entre los dos grupos. En rojo se representan las muestras correspondientes con tejido prostático sano (controles), y en verde las muestras correspondientes con tejido tumoral (casos). Puede observarse que no existe una agrupación espontánea de las dos muestras. Además, se identificaron varias muestras con un contenido metabólico muy diferente, correspondiente con los casos 41 (no carcinoma) y 52 (carcinoma). En la figura 1 se observa cómo quedaban muy alejados del intervalo de confianza del 95%. El porcentaje recogido en cada uno de los ejes del PCA hace referencia a la porción de variabilidad explicada sobre el total.



Anexo III, figura 1. Diagrama de puntos, PCA. En rojo los controles, en verde los casos.

ANÁLISIS DISCRIMINANTE: ANÁLISIS SUPERVISADO

El análisis discriminante, también conocido como reconocimiento supervisado de patrones, tiene por objeto proporcionar un modelo que discrimine entre dos clases o más con capacidad de predicción (2). Es decir, se persigue construir una regla de decisión que clasifique una observación nueva a uno de los grupos definidos con un cierto riesgo asociado.

Se puede considerar un análisis de regresión donde la variable dependiente es categórica (p.ej., 0, control; 1, caso) y las variables independientes son continuas (intensidad de las señales espectrales). Con este análisis se pretenden encontrar las relaciones lineales entre las variables continuas que mejor discriminen los grupos de estudio (1).

Los algoritmos utilizados en estos casos son:

- PLS-DA (*Partial Least Squares-Discriminant Analysis*): el objetivo es encontrar un modelo que separe en dos o más clases las observaciones en función de sus K variables. Este método permite minimizar la posible variabilidad existente dentro de cada grupo y mejorar, por tanto, la separación entre los grupos objeto de estudio. La construcción del modelo se realiza a partir de un conjunto de muestras de las que se conoce previamente a qué clase pertenecen.
- OPLS-DA (*Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis*): es una modificación del modelo PLS-DA basada en una mejor visualización e interpretación de los datos. Esta implementación se consigue separando en dos partes la variación observada, la relacionada linealmente con Y (variable de interés), denominada predictiva, y la no relacionada con Y , la ortogonal. Este modelo es análogo al PLS-DA, pero concentra toda la información discriminante en el primer componente (predictivo).

En cualquier análisis supervisado debe realizarse algún método de validación cruzada para saber el número de componentes óptimos a incluir en el modelo y si puede existir un sobreajuste del mismo. Los métodos de validación cruzada, los cuales calcularán el poder predictivo del análisis, se basan en la eliminación de grupos de

datos, el cálculo de un nuevo modelo a partir de los datos restantes y la predicción de los valores de los datos eliminados. Estos métodos se basan en la realización de muchas interacciones del mismo proceso y, a partir de los datos predichos y observados, se calcula el *predictive residual sum of squares* (PRESS). A partir de los resultados de todas las interacciones se calcula los valores de R²_Y y de Q² (se desarrollan en el siguiente punto). Este parámetro es un buen indicador para decidir hasta qué componente incluir en el modelo. Un aumento del R²_Y acompañado de una disminución o estabilización del valor de Q² significa que hay un sobreajuste del modelo.

INTERPRETACIÓN DEL PLS-DA

El número de componentes de los modelos PLS-DA/OPLS-DA se selecciona utilizando el criterio de la validación cruzada interna (3). Los datos se dividen en un número determinado de sub-grupos (normalmente 7) de forma aleatoria y se construye el modelo excluyendo cada vez uno de los subgrupos y utilizándolo posteriormente como test de validación. En base a este procedimiento se calculan los valores de R²_Y y Q², parámetros que definen al modelo discriminante. R²_Y es una medida cuantitativa de la bondad de ajuste del modelo y Q² representa la capacidad de predicción del modelo tras las 7 rondas de validación cruzada. Ambos valores oscilan entre 0 y 1, el valor de R²_Y es siempre superior al de Q². La calidad de los modelos es directamente proporcional a los valores de R²_Y y de Q². En los estudios metabolómicos se considera que un modelo discriminante es de buena calidad cuando $Q^2 > 0,5$ y la diferencia entre ambos parámetros no es superior a 0,2 – 0,3 (3). Estos modelos, además, proporcionan un listado con las *K*-variables empleadas en el modelo y su correspondiente valor de VIP (*Variable Important in the Projection*). Se considera que los descriptores con valores superiores de VIP (VIP>2), son los que contribuyen en mayor medida a la discriminación entre los grupos de estudio (4). Uno de los métodos más utilizados de validación cruzada interna es el enfoque de validación cruzada de dejar-uno-fuera (Leave-one-out), utilizado para esta tesis, donde en cada análisis el 10% de los datos se dejan fuera del entrenamiento y se usan para probar el modelo y para determinar la tasa de error de clasificación.

Uno de los problemas habituales en el análisis multivariante (PLS-DA, OPLSDA) es el sobreajuste (*overfitting*) (4). En los modelos con sobreajuste, el sistema encuentra una combinación de variables capaces de discriminar los grupos de estudio, pero no es generalizable a un conjunto externo de muestras. Este “problema de dimensionalidad” (5) es común en los estudios metabolómicos, ya que con frecuencia el número de variables es significativamente superior al número de observaciones y parte de estas variables son redundantes e irrelevantes. En estos casos se utiliza la selección de variables como estrategia para eliminar o reducir este sobreajuste.

La selección de variables se ha descrito como una importante herramienta en la búsqueda de biomarcadores (6). El objetivo es reducir el número de variables independientes (*buckets*), seleccionando únicamente aquellas que contribuyen de forma significativa a la discriminación entre los grupos y excluyendo las variables redundantes y no informativas (7). Con esta estrategia se pretende, además, incrementar la capacidad de predicción de los modelos y mejorar su interpretación. Se puede llevar a cabo siguiendo diferentes estrategias basadas en la información proporcionada por los propios modelos multivariantes (VIPs, coeficientes de regresión, etc.) (8).

Finalmente, dada la complejidad de los métodos supervisados de clasificación, es necesaria la validación de los mismos para evaluar la calidad y fiabilidad de los resultados obtenidos. Uno de los métodos de validación empleados son las curvas ROC.

VALIDACIÓN DEL MODELO: CURVAS ROC

Existen varios tipos de pruebas para realizar la validación cruzada, una de ellas es la de Venetian Blinds que consiste en repetir el modelo n veces dejando cada vez fuera el 10 % de las muestras de forma aleatoria. Los resultados se plasman en dos curvas ROC, la curva del modelo con todas las muestras y la curva de entrenamiento. La curva de entrenamiento debe aproximarse a la curva del modelo, pero siempre será inferior (8).

El área bajo la curva será un valor que oscile entre 0,5 y 1. Un valor de 0,5 sería aquel que se solapa con la línea diagonal entre los ejes X e Y, y traduciría una curva con nula capacidad predictiva donde los sujetos son clasificados aleatoriamente (8-9). Por el contrario, un área bajo la curva de 1 representaría una curva perfecta. Se acepta que un área bajo la curva de 1 a 0,9 traduce una capacidad predictiva excelente: de 0,9 a 0,8 muy buena o buena; de 0,8 a 0,7 capacidad justa; de 0,7 a 0,6 pobre: y de 0,6 a 0,5 mala. El área bajo la curva siempre va acompañada de un intervalo de confianza, normalmente del 95% (9).

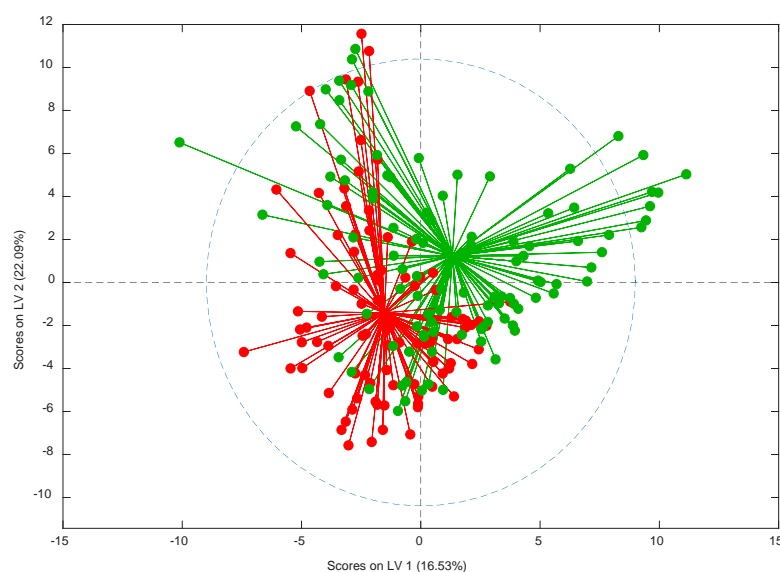
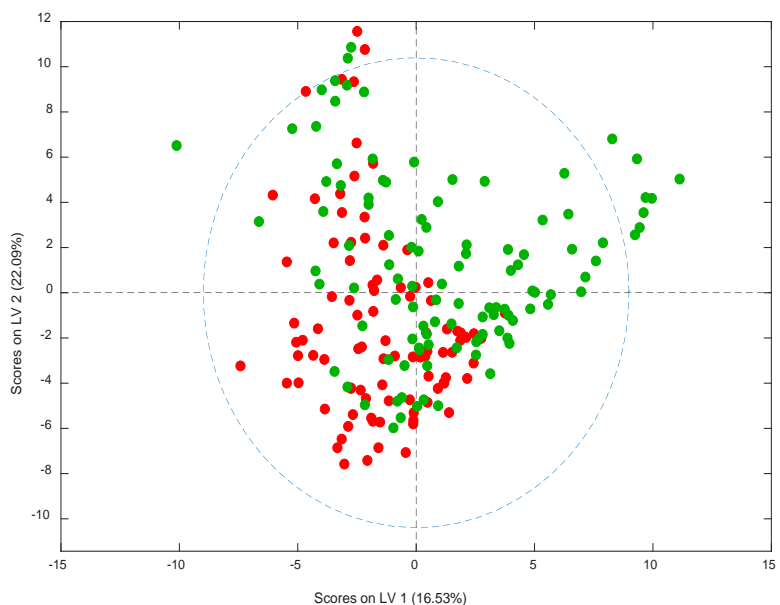
En la representación gráfica de la curva, se muestran los resultados de la validación, donde se expresa la variación del valor de sensibilidad frente a la especificidad para un sistema, según varía el umbral de discriminación. El punto de corte óptimo de la curva será aquel punto más cercano al extremo superior izquierdo del gráfico, considerando que éste tiene el mismo impacto para un resultado falso positivo que uno falso negativo (9).

El empleo de curvas ROC es el método más ampliamente aceptado y objetivo para evaluar el uso de biomarcadores.

EJEMPLO DE ANÁLISIS SUPERVISADO, PLS-DA

Siguiendo con el análisis de casos-controles citado anteriormente, se expone el ejemplo, en este caso del PLS-DA.

Una vez comprobado que las muestras no se agrupaban de forma espontánea en base a los criterios impuestos (presencia/ausencia de tumor), se procedió a construir un modelo discriminatorio PLS-DA, excluyendo del mismo las dos muestras que fueron comprobadas como extremas en el PCA. En los sistemas donde la separación entre grupos es compleja, como sucedió en nuestro caso, el análisis PLS-DA favorece la separación entre los grupos establecidos (figura 2).

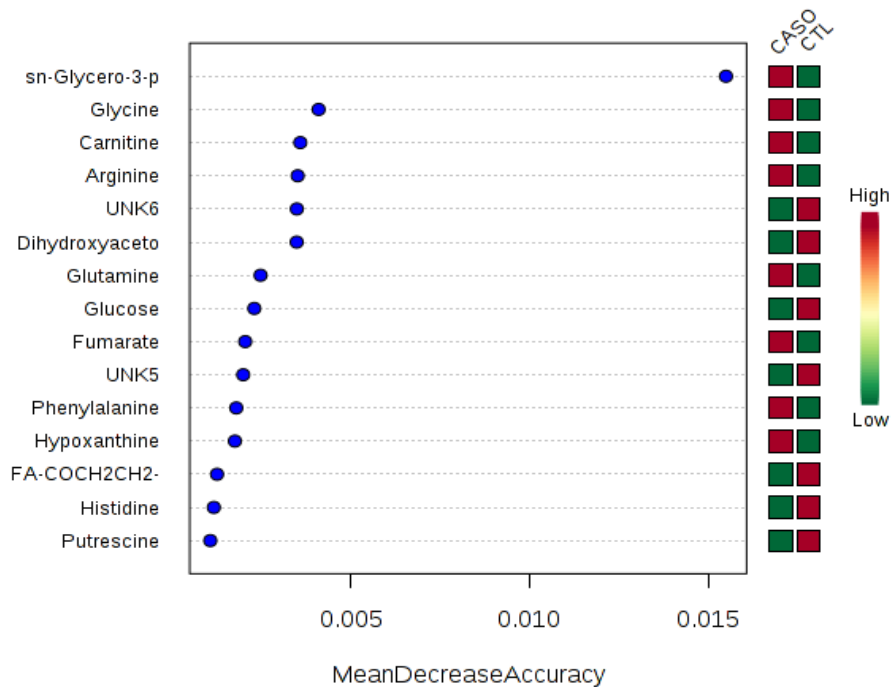


Anexo III, figura 2. A) Diagrama de puntos del PLS-DA, grupos separados en base a clasificación de tumor/ausencia de tumor en cualquiera de los cilindros sometidos a estudio histológico. B) Diagrama de puntos con proyecciones. Como puntos rojos se muestran los controles, y como puntos verdes los casos. Se comprueba una cierta tendencia a la agrupación espontánea, aunque con una zona en el área central del gráfico donde se mezclan casos sanos y enfermos.

Se emplearon 2 componentes principales del PLS-DA, que explican el 22% de la variabilidad total del modelo, y se procedió a construir un modelo que eliminase toda

Anexo III

la variabilidad no relacionada totalmente con nuestro criterio de clasificación. El resultado final del PLS-DA muestra que existe una cierta tendencia a la separación entre los dos grupos, de forma que los casos sin tumor tienden a agruparse en el cuadrante inferior izquierdo y los casos con tumor en el cuadrante superior derecho. No obstante, existe una zona de solapamiento o una zona "gris", donde se entremezclan varios casos sanos y enfermos



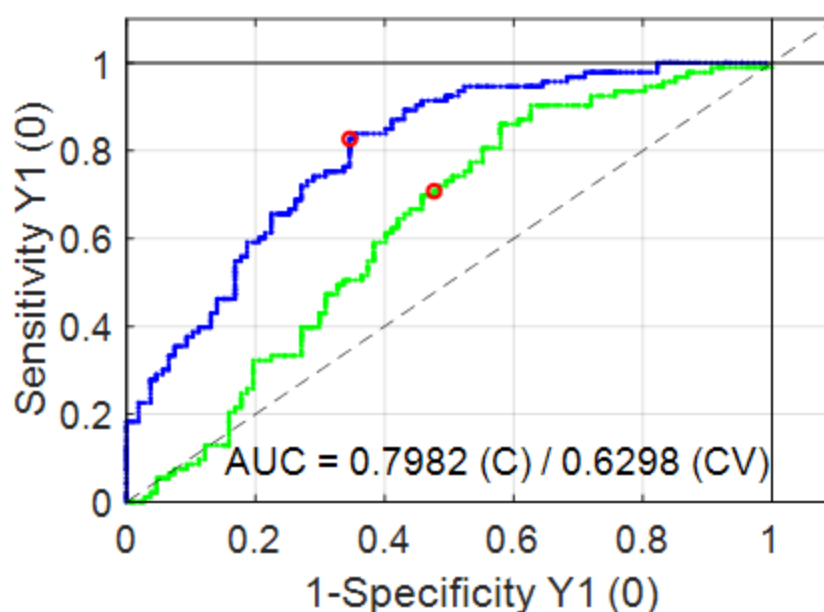
Anexo III, figura 3. Diagrama de cargas. Representación de las regiones con mayor contribución al modelo discriminador.

Una vez construido el modelo discriminante, el siguiente paso es la identificación de las regiones del espectro que más influyen en el modelo (es decir, las regiones del espectro que más contribuyen a la obtención del modelo discriminante). Para ello debe consultarse el diagrama de cargas del PLS-DA. De esta forma se comprobó que las regiones con mayor contribución al modelo discriminador son aquellas asociadas a metabolitos como el glicerol-3-fosfocolina, la glicina, carnitina, arginina, UNK6, o la dihidroxiacetona. Cabe destacar de manera especial al glicerol-3-fosfocolina, siendo un metabolito que más influye en la discriminación del modelo. Puede comprobarse en el diagrama de cargas que los pacientes con carcinoma tienen

unos niveles de este metabolito mucho más elevados que los sujetos sanos. Lo mismo sucede con la glicina, carnitina o arginina. Otros como el UNK6 o la dihidroxiacetona tienen niveles bajos en los varones enfermos y altos en los sanos, como se observa en la figura 3. Una vez localizadas las regiones, se procedió a la asignación e integración de la señal.

Otra forma de comprobar los metabolitos que más influyen en la discriminación del modelo es comprobando los VIP score. Normalmente se acepta como un metabolito con peso en la discriminación entre grupos aquel con un VIP score superior a 2.

Para evaluar el modelo obtenido que contribuye a la separación de los pacientes según su estratificación en casos con o sin tumor, se realizó una validación cruzada de los datos obtenidos en el modelo PLS-DA. El resultado de la validación se representa de forma gráfica con una curva ROC, que se muestra en la figura 5.



Anexo III, figura 5. Curva ROC obtenida de la validación cruzada del modelo PLS-DA que discrimina entre casos con y sin tumor, tomando como referencia cualquiera de los cilindros sometidos a estudio histológico. La línea azul corresponde a los datos tratados y la línea verde, a la validación cruzada.

Los resultados obtenidos muestran que la curva de validación cruzada (en color verde) presenta una diferencia importante respecto a la línea que corresponde a los datos estimados (color azul). El valor del área bajo la curva fue de 0,62, clasificando a la curva ROC como regular.

Además, la comparación de diferentes áreas bajo la curva no debe hacerse sólo visualmente, sino que existen diferentes métodos estadísticos para realizar comparaciones objetivas entre diferentes áreas. Realizando el cálculo manual, puede llevarse a cabo mediante fórmulas como las descritas por Hanley y MacNeil (10). Algunos programas estadísticos incluyen esta opción de cálculo. En el caso de esta tesis, la comparación de áreas bajo la curva se llevó a cabo con el comando `roccomp` del Stata (Stata Corp LLC), el cual acepta áreas bajo la curva diferentes en caso de obtener una $p < 0,05$ en la comparación.

Referencias

1. Marin, J. M. (2011). Analisis Multivariado de datos. <https://sites.google.com/site/ramolinacruz41/apuntes>.
2. Wehrens, R. (2011). Chemometrics with R: Multivariate Data Analysis in the Natural Sciences and Life Sciences. Springer.
3. Eriksson, L., Johansson, E., Kettaneh-Wold, N., Trygg, J., Wikstrom, C. & Wold, S. (2006b). Multi- and Megavariate Data Analysis, Part I, Basic Principles and Applications. Umetrics AB.
4. Saccenti, E., Hoefsloot, H. C. J., Smilde, A. K., Westerhuis, J. A. & Hendriks, M. M. W. B. (2013). Reflections on univariate and multivariate analysis of metabolomics data. *Metabolomics* 10, 361-374.
5. Vinaixa, M., Samino, S., Saez, I., Duran, J., Guinovart, J. J. & Yanes, O. (2012). A Guideline to Univariate Statistical Analysis for LC/MS-Based Untargeted Metabolomics-Derived Data. *Metabolites* 2, 775-95.
6. Hendriks, M. M. W. B., Eeuwijk, F. A. v., Jellema, R. H., Westerhuis, J. A., Reijmers, T. H., Hoefsloot, H. C. J. & Smilde, A. K. (2011). Data-processing strategies for metabolomics studies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 30, 1685-1698.
7. Quintas, G., Portillo, N., Garcia-Canaveras, J. C., Castell, J. V., Ferrer, A. & Lahoz, A. (2011). Chemometric approaches to improve PLS-DA model outcome for predicting human non-alcoholic fatty liver disease using UPLC-MS as a metabolic profiling tool. *Metabolomics* 8, 86-98.
8. Diaz, S. O., Barros, A. S., Goodfellow, B. J., Duarte, I. F., Galhano, E., Pita, C., Almeida Mdo, C., Carreira, I. M. & Gil, A. M. (2013). Second trimester maternal urine for the diagnosis of trisomy 21 and prediction of poor pregnancy outcomes. *J Proteome Res* 12, 2946-57.

9. Emwas AH, Roy R, McKay RT, Ryan D, Brennan L, Tenori L, et al. Recommendations and Standardization of Biomarker Quantification Using NMR-Based Metabolomics with Particular Focus on Urinary Analysis. *J Proteome Res.* 2016;15:360-73.
- 10 Hanley JA, McNeil BJ. A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. *Radiology.* 1983;148:839-43.

ANEXO IV: NIVELES PROMEDIOS DE METABOLITOS EN EL ESTUDIO

Anexo IV, Tabla 1. Niveles promedios de metabolitos (en ppm) entre diferentes grupos. Estudio entre enfermos y sanos en tejido. Los valores se expresan en media +/- desviación estándar. Se excluyen los mismos casos excluidos en el análisis desarrollado en los resultados. Comparación de medias mediante test T-Student (valor de p).

METABOLITO	TOTAL DE LA MUESTRA	ENFERMOS	SANOS	p
1,3-dihidroxiacetona	1,36 +/- 1,06	0,90 +/- 0,12	1,44 +/- 1,11	0,10
2-hidroxiacetona	18,36 +/- 10,30	20,63 +/- 11,49	17,45 +/- 9,69	0,05
2-oxoglutarato	2,66 +/- 1,76	2,44 +/- 1,59	2,75 +/- 1,83	0,27
2-fosfoglicerato	11,98 +/- 7,16	13,57 +/- 7,15	11,36 +/- 7,09	0,05
3-hidroxiacetona	10,49 +/- 5,50	10,82 +/- 4,69	10,37 +/- 5,72	0,60
Acetoína	10,43 +/- 11,12	6,96 +/- 6,12	11,82 +/- 12,31	<0,001
Ácidos grasos insat.	0,72 +/- 1,08	0,57 +/- 0,89	0,77 +/- 1,14	0,24
Alanina	10,76 +/- 5,77	12,99 +/- 6,50	9,87 +/- 5,22	0,01
Alfa-glucosa	0,36 +/- 0,55	0,30 +/- 0,34	0,38 +/- 0,61	0,33
Arginina	20,24 +/- 10,88	22,71 +/- 11,71	19,26 +/- 10,42	0,04
Ascorbato	7,31 +/- 4,20	8,91 +/- 4,49	6,67 +/- 3,92	0,01
Asparagina	5,12 +/- 2,84	5,23 +/- 2,73	5,08 +/- 2,89	0,74
Aspartato	6,63 +/- 4,11	7,60 +/- 4,73	6,25 +/- 3,79	0,03
Betaina	3,85 +/- 2,14	4,11 +/- 2,29	3,74 +/- 2,07	0,30
C18H3	6,37 +/- 70,98	1,71 +/- 2,27	8,21 +/- 83,82	0,56
Carnitina	6,41 +/- 7,70	10,53 +/- 11,64	4,75 +/- 4,48	0,01
Colina	5,57 +/- 3,51	6,99 +/- 4,91	5,01 +/- 2,59	0,01
Citrato	37,57 +/- 34,63	22,54 +/- 23,56	44,79 +/- 38,30	<0,001
Creatina	3,25 +/- 2,06	3,67 +/- 2,20	3,13 +/- 1,98	0,09
Creatinafosfato	20,80 +/- 12,78	20,78 +/- 10,60	20,81 +/- 13,59	0,99
Creatinina	2,63 +/- 1,99	2,24 +/- 1,27	2,78 +/- 2,20	0,03
Cistationina	21,68 +/- 12,69	19,53 +/- 11,68	22,53 +/- 13,02	0,13
Cisteína	8,25 +/- 5,28	8,55 +/- 5,49	8,13 +/- 5,21	0,61
Etanol	8,48 +/- 5,40	9,91 +/- 6,06	7,91 +/- 5,02	0,03
Etanolamina	7,39 +/- 4,31	7,20 +/- 4,10	7,47 +/- 4,40	0,67
FACH2n	124,81 +/- 155,19	99,86 +/- 132,79	134,72 +/- 162,61	0,12
FACH3	20,20 +/- 23,28	17,79 +/- 21,33	21,16 +/- 24,01	0,36
FACOCH2	15,78 +/- 16,16	12,87 +/- 13,69	16,91 +/- 16,93	0,08
FACOCH2CH	16,44 +/- 16,38	13,93 +/- 14,75	17,44 +/- 16,93	0,15
Formato	0,30 +/- 0,23	0,38 +/- 0,29	0,27 +/- 0,19	0,01
Fumarato	0,28 +/- 0,18	0,33 +/- 0,21	0,27 +/- 0,17	0,07
Glicerol-3-fosfocolina	11,90 +/- 10,46	17,76 +/- 12,42	9,39 +/- 8,54	<0,001
Glucosa	28,08 +/- 17,39	24,26 +/- 14,39	29,59 +/- 18,26	0,05
Glutamato	34,34 +/- 16,66	41,64 +/- 18,68	31,44 +/- 14,89	<0,001

Anexo IV

Glutamina	13,48 +/- 7,52	15,68 +/- 8,50	12,61 +/- 6,93	0,01
Glutati3n	25,07 +/- 13,18	26,70 +/- 13,69	24,42 +/- 12,97	0,27
Glicerol	23,83 +/- 25,03	26,45 +/- 23,60	22,79 +/- 25,58	0,35
Glicina	5,50 +/- 3,28	7,48 +/- 4,11	4,73 +/- 2,52	<0,001
Histidina	2,21 +/- 1,58	2,14 +/- 1,36	2,23 +/- 1,67	0,70
Homocitrulina	19,69 +/- 12,35	17,83 +/- 12,17	20,43 +/- 12,39	0,18
Hipoxantina	0,74 +/- 0,46	0,86 +/- 0,56	0,69 +/- 0,40	0,03
Inosina	9,59 +/- 5,65	9,96 +/- 5,98	9,44 +/- 5,52	0,56
Isoleucina	14,36 +/- 7,51	16,24 +/- 7,71	13,61 +/- 7,33	0,03
Isovalerato	36,34 +/- 29,67	36,87 +/- 29,68	36,13 +/- 29,77	0,87
Lactato	44,76 +/- 31,95	46,01 +/- 24,41	44,27 +/- 34,56	0,73
Leucina	19,41 +/- 9,51	22,17 +/- 10,05	18,31 +/- 9,09	0,01
Lisina	11,83 +/- 8,69	12,25 +/- 9,62	11,67 +/- 8,33	0,67
Metanol	3,94 +/- 4,60	4,19 +/- 4,88	3,83 +/- 4,49	0,62
Metionina	4,82 +/- 2,57	4,57 +/- 2,59	4,92 +/- 2,56	0,39
Mio-inositol	70,06 +/- 34,34	69,01 +/- 30,05	70,48 +/- 35,99	0,78
NAC	26,12 +/- 26,35	22,36 +/- 23,23	27,59 +/- 27,40	0,20
O-fosfocolina	16,50 +/- 10,11	22,06 +/- 11,67	14,15 +/- 8,46	<0,001
O-fosfoetanolamina	17,01 +/- 9,05	21,15 +/- 9,18	15,36 +/- 8,49	<0,001
Fenilalanina	4,31 +/- 3,41	5,05 +/- 5,14	4,01 +/- 2,37	0,15
Prolina	27,74 +/- 15,43	30,57 +/- 15,89	26,63 +/- 15,15	0,11
Propilenglicol	10,54 +/- 26,26	13,51 +/- 37,24	9,36 +/- 20,39	0,31
Putrescina	9,23 +/- 7,16	7,68 +/- 6,44	9,85 +/- 7,36	0,04
Piruvato	0,55 +/- 0,36	0,56 +/- 0,35	0,54 +/- 0,36	0,74
Scilo-inositol	0,88 +/- 1,16	0,84 +/- 0,96	0,90 +/- 1,23	0,78
Serina	7,97 +/- 4,66	9,55 +/- 5,66	7,35 +/- 4,06	0,01
Succinato	0,74 +/- 0,54	0,90 +/- 0,70	0,68 +/- 0,44	0,03
Taurina	22,96 +/- 13,93	23,79 +/- 13,79	7,61 +/- 5,47	0,60
Trans-aconitato	1,13 +/- 1,23	0,72 +/- 0,73	1,29 +/- 1,35	<0,001
Treonina	6,60 +/- 4,80	7,61 +/- 5,47	6,20 +/- 4,46	0,06
Trimetilamina	3,03 +/- 1,94	3,12 +/- 1,94	3,01 +/- 1,95	0,69
Tript3fano	3,86 +/- 2,56	3,91 +/- 2,75	3,84 +/- 2,48	0,87
Tiramina	3,14 +/- 2,02	3,01 +/- 1,79	3,19 +/- 2,10	0,54
Tirosina	3,17 +/- 1,99	3,42 +/- 2,23	3,07 +/- 1,88	0,27
Uridina	5,73 +/- 4,42	6,59 +/- 5,25	5,39 +/- 4,02	0,12
Valina	11,65 +/- 6,17	13,36 +/- 6,95	10,98 +/- 5,72	0,01

Anexo IV, Tabla 2. Niveles promedios de metabolitos (en ppm) entre diferentes grupos. Estudio entre Gleason 6-7 frente a 8-9 en tejido. Los valores se expresan en media +/- desviación estándar. Se excluyen los mismos casos excluidos en el análisis desarrollado en los resultados. Comparación de medias mediante test U de Mann-Whitney (valor de p).

METABOLITO	TOTAL DE LA MUESTRA	GLEASON 6-7	GLEASON 8 O MAYOR	p
1,3-dihidroxiacetona	0,98 +/- 0,72	1,04 +/- 0,85	0,94 +/- 0,64	0,74
2-hidroxiacetona	21,12 +/- 12,40	24,48 +/- 14,58	18,66 +/- 10,36	0,24
2-oxoglutarato	1,98 +/- 1,48	2,69 +/- 1,50	1,46 +/- 1,26	0,03
2-fosfoglicerato	11,70 +/- 6,44	13,29 +/- 7,01	10,53 +/- 5,96	0,28
3-hidroxiacetona	9,91 +/- 4,71	8,51 +/- 4,98	10,92 +/- 4,39	0,20
Acetoína	6,69 +/- 7,43	5,07 +/- 5,20	7,87 +/- 8,70	0,35
Ácidos grasos insat.	0,45 +/- 0,67	0,32 +/- 0,36	0,56 +/- 0,83	0,38
Alanina	12,43 +/- 6,41	13,16 +/- 8,04	11,90 +/- 5,15	0,63
Alfa-glucosa	0,33 +/- 0,36	0,24 +/- 0,19	0,41 +/- 0,44	0,20
Arginina	25,82 +/- 13,49	24,67 +/- 13,46	26,66 +/- 13,92	0,71
Ascorbato	8,52 +/- 4,42	8,01 +/- 6,05	8,90 +/- 2,89	0,66
Asparagina	5,68 +/- 2,91	6,35 +/- 2,49	5,19 +/- 3,18	0,32
Aspartato	7,82 +/- 5,33	8,44 +/- 6,60	7,37 +/- 4,37	0,62
Betaina	4,29 +/- 2,85	4,05 +/- 3,11	4,46 +/- 2,75	0,72
C18H3	2,70 +/- 3,04	3,59 +/- 4,43	2,05 +/- 1,17	0,20
Carnitina	11,80 +/- 14,51	5,92 +/- 4,63	16,11 +/- 17,72	0,49
Colina	7,84 +/- 6,31	8,21 +/- 7,57	7,57 +/- 6,92	0,80
Citrato	22,38 +/- 22,78	34,35 +/- 23,64	13,60 +/- 18,23	0,01
Creatina	3,80 +/- 2,14	3,39 +/- 2,01	4,09 +/- 2,26	0,41
Creatinafosfato	18,88 +/- 10,29	18,92 +/- 9,34	18,85 +/- 11,26	0,98
Creatinina	2,02 +/- 1,21	2,02 +/- 1,68	1,98 +/- 0,76	0,93
Cistationina	18,09 +/- 11,33	21,71 +/- 12,30	15,43 +/- 10,16	0,16
Cisteína	8,28 +/- 5,37	10,93 +/- 6,19	6,33 +/- 3,80	0,02
Etanol	10,25 +/- 7,59	13,09 +/- 10,19	8,17 +/- 4,21	0,15
Etanolamina	7,89 +/- 4,55	9,54 +/- 5,97	6,69 +/- 2,79	0,16
FACH2n	107,21 +/- 130,35	89,07 +/- 130,64	120,51 +/- 133,05	0,55
FACH3	21,61 +/- 22,05	22,79 +/- 26,09	20,75 +/- 19,51	0,82
FACOCH2	15,24 +/- 14,01	12,27 +/- 14,16	17,42 +/- 13,97	0,36
FACOCH2CH	16,52 +/- 15,34	13,49 +/- 14,40	18,74 +/- 16,11	0,40
Formato	0,34 +/- 0,26	0,36 +/- 0,35	0,32 +/- 0,19	0,67
Fumarato	0,30 +/- 0,20	0,26 +/- 0,21	0,33 +/- 0,19	0,35
Glicerol-3-fosfocolina	12,48 +/- 11,11	14,38 +/- 12,28	11,09 +/- 10,38	0,46
Glucosa	25,23 +/- 14,51	25,53 +/- 11,80	25,01 +/- 16,60	0,93
Glutamato	41,19 +/- 21,81	38,41 +/- 20,37	43,22 +/- 23,29	0,58
Glutamina	16,30 +/- 10,15	16,39 +/- 9,54	16,23 +/- 10,91	0,96
Glutación	29,27 +/- 16,81	27,69 +/- 12,32	30,43 +/- 19,81	0,69
Glicerol	30,22 +/- 24,32	41,12 +/- 31,22	22,23 +/- 14,08	0,04
Glicina	7,04 +/- 4,32	6,73 +/- 4,14	7,27 +/- 4,57	0,76

Anexo IV

Histidina	2,26 +/- 1,40	2,07 +/- 1,12	2,40 +/- 1,60	0,56
Homocitrulina	18,23 +/- 11,73	22,85 +/- 13,13	14,84 +/- 9,68	0,08
Hipoxantina	0,87 +/- 0,57	0,83 +/- 0,56	0,89 +/- 0,59	0,80
Inosina	10,99 +/- 7,49	7,88 +/- 4,34	13,27 +/- 8,58	0,04
Isoleucina	15,42 +/- 9,01	18,88 +/- 11,70	12,89 +/- 5,58	0,09
Isovalerato	30,94 +/- 25,33	33,55 +/- 29,06	29,03 +/- 23,09	0,66
Lactato	35,86 +/- 19,63	24,54 +/- 12,41	44,16 +/- 20,09	0,01
Leucina	21,53 +/- 12,50	24,88 +/- 16,19	19,07 +/- 8,73	0,24
Lisina	13,76 +/- 11,79	18,97 +/- 14,23	9,94 +/- 8,16	0,05
Metanol	4,70 +/- 3,83	4,51 +/- 3,06	4,84 +/- 4,41	0,83
Metionina	4,19 +/- 3,01	4,93 +/- 4,12	3,65 +/- 1,81	0,35
Mio-inositol	64,75 +/- 27,52	60,89 +/- 22,16	67,59 +/- 31,33	0,55
NAC	27,72 +/- 23,87	22,22 +/- 24,72	31,75 +/- 23,23	0,32
O-fosfocolina	22,95 +/- 11,71	19,80 +/- 9,47	21,78 +/- 13,37	0,67
O-fosfoetanolamina	20,33 +/- 9,83	18,40 +/- 10,54	21,75 +/- 9,39	0,40
Fenilalanina	5,96 +/- 7,09	8,01 +/- 10,23	4,47 +/- 3,03	0,29
Prolina	32,54 +/- 16,29	32,94 +/- 19,32	32,24 +/- 14,40	0,91
Propilenglicol	9,44 +/- 12,30	9,96 +/- 9,93	9,05 +/- 14,12	0,84
Putrescina	6,39 +/- 3,76	8,10 +/- 3,72	5,14 +/- 3,37	0,04
Piruvato	0,49 +/- 0,36	0,48 +/- 0,45	0,50 +/- 0,30	0,85
Scilo-inositol	1,37 +/- 1,19	0,98 +/- 0,92	1,65 +/- 1,31	0,15
Serina	9,51 +/- 5,90	8,85 +/- 4,15	9,99 +/- 7,02	0,63
Succinato	0,69 +/- 0,52	0,58 +/- 0,47	0,77 +/- 0,55	0,38
Taurina	18,08 +/- 9,79	21,52 +/- 10,96	15,57 +/- 8,33	0,12
Trans-aconitato	0,74 +/- 0,70	0,88 +/- 0,82	0,63 +/- 0,60	0,38
Treonina	7,93 +/- 6,32	7,49 +/- 5,70	8,26 +/- 6,92	0,76
Trimetilamina	2,70 +/- 2,05	2,53 +/- 2,01	2,82 +/- 2,15	0,72
Triptófano	4,37 +/- 3,37	3,87 +/- 2,96	4,74 +/- 3,70	0,53
Tiramina	2,93 +/- 2,06	2,21 +/- 1,50	3,46 +/- 2,30	0,13
Tirosina	3,55 +/- 2,49	3,34 +/- 3,19	3,69 +/- 1,93	0,73
Uridina	6,26 +/- 5,07	3,69 +/- 1,93	4,20 +/- 3,55	0,07
Valina	12,47 +/- 8,27	15,65 +/- 11,35	10,13 +/- 4,06	0,14

Anexo IV, Tabla 3. Niveles promedios de metabolitos (en ppm) entre diferentes grupos. Estudio entre casos con y sin recidiva bioquímica. Los valores se expresan en media +/- desviación estándar. Se excluyen los mismos casos excluidos en el análisis desarrollado en los resultados. Comparación de medias mediante test U de Mann-Whitney (valor de p).

METABOLITO	TOTAL DE LA MUESTRA	CON RECIDIVA	SIN RECIDIVA	p
1,3-dihidroxiacetona	1,19 +/- 1,08	1,59 +/- 1,69	1,11 +/- 0,89	0,28
2-hidroxiacetato	18,32 +/- 10,96	19,14 +/- 9,57	18,14 +/- 11,30	0,74
2-oxoglutarato	2,55 +/- 1,73	2,67 +/- 1,73	2,52 +/- 1,74	0,76
2-fosfoglicerato	12,89 +/- 6,84	13,66 +/- 6,33	12,72 +/- 6,98	0,62
3-hidroxiacetato	10,47 +/- 5,48	10,22 +/- 4,58	10,52 +/- 5,69	0,82
Acetoína	9,56 +/- 10,36	7,51 +/- 5,89	10,02 +/- 11,09	0,38
Ácidos grasos insat.	0,81 +/- 1,32	0,57 +/- 0,72	0,87 +/- 1,42	0,41
Alanina	11,39 +/- 6,52	12,12 +/- 6,40	11,22 +/- 6,58	0,62
Alfa-glucosa	0,41 +/- 0,74	0,34 +/- 0,40	0,43 +/- 0,80	0,66
Arginina	20,07 +/- 11,35	19,78 +/- 11,43	20,14 +/- 11,42	0,91
Ascorbato	7,31 +/- 4,20	8,86 +/- 3,84	6,97 +/- 4,22	0,08
Asparagina	5,24 +/- 2,90	5,57 +/- 2,87	5,16 +/- 2,92	0,61
Aspartato	6,61 +/- 4,14	7,24 +/- 3,84	6,47 +/- 4,21	0,50
Betaína	3,79 +/- 2,27	4,08 +/- 2,08	3,73 +/- 2,32	0,58
C18H3	1,44 +/- 2,19	1,12 +/- 0,90	1,51 +/- 2,38	0,52
Carnitina	7,32 +/- 9,41	10,36 +/- 11,40	6,64 +/- 8,86	0,15
Colina	6,11 +/- 4,40	6,07 +/- 3,20	6,12 +/- 4,64	0,97
Citrato	35,01 +/- 36,19	36,89 +/- 50,44	34,58 +/- 32,66	0,86
Creatina	3,27 +/- 2,17	3,42 +/- 2,25	3,24 +/- 2,16	0,76
Creatinafosfato	21,40 +/- 15,27	21,07 +/- 9,57	21,47 +/- 16,32	0,92
Creatinina	2,44 +/- 1,59	2,65 +/- 1,46	2,39 +/- 1,63	0,56
Cistationina	21,94 +/- 14,40	21,13 +/- 15,09	22,13 +/- 14,35	0,80
Cisteína	8,55 +/- 5,74	8,68 +/- 5,93	8,52 +/- 5,74	0,91
Etanol	8,53 +/- 5,41	9,58 +/- 4,44	8,30 +/- 5,61	0,17
Etanolamina	7,14 +/- 4,31	6,70 +/- 2,72	7,23 +/- 4,60	0,96
FACH2n	128,40 +/- 162,16	107,44 +/- 138,45	132,93 +/- 167,34	0,57
FACH3	21,20 +/- 24,92	17,22 +/- 20,77	22,06 +/- 25,77	0,48
FACOCH2	15,84 +/- 17,38	12,93 +/- 14,44	16,46 +/- 17,98	0,46
FACOCH2CH	18,80 +/- 17,81	13,97 +/- 15,45	17,41 +/- 18,31	0,48
Formato	0,31 +/- 0,24	0,26 +/- 0,12	0,32 +/- 0,26	0,77
Fumarato	0,30 +/- 0,20	0,30 +/- 0,20	0,30 +/- 0,21	0,89
Glicerol-3-fosfocolina	14,83 +/- 12,46	18,59 +/- 9,98	14,02 +/- 12,85	0,18
Glucosa	24,82 +/- 15,53	22,63 +/- 12,85	25,31 +/- 16,10	0,53
Glutamato	35,54 +/- 18,67	40,01 +/- 21,07	34,54 +/- 18,11	0,29
Glutamina	14,26 +/- 8,72	15,51 +/- 9,68	13,98 +/- 8,54	0,52
Glutati6n	23,56 +/- 11,57	25,04 +/- 11,09	23,23 +/- 11,72	0,57
Glicerol	23,69 +/- 22,32	19,69 +/- 9,36	24,57 +/- 24,24	0,92
Glicina	6,03 +/- 3,91	7,32 +/- 4,42	5,74 +/- 3,76	0,19
Histidina	2,13 +/- 1,42	1,96 +/- 1,37	2,16 +/- 1,44	0,59
Homocitrulina	20,23 +/- 13,43	21,88 +/- 17,40	19,86 +/- 12,50	0,59

Anexo IV

Hipoxantina	0,75 +/- 0,50	0,70 +/- 0,45	0,76 +/- 0,51	0,65
Inosina	9,11 +/- 5,52	8,95 +/- 5,29	9,15 +/- 5,61	0,89
Isoleucina	14,74 +/- 8,30	14,77 +/- 8,19	14,73 +/- 8,38	0,98
Isovalerato	36,23 +/- 27,05	37,74 +/- 18,20	35,89 +/- 28,74	0,80
Lactato	43,44 +/- 23,76	53,51 +/- 29,20	41,21 +/- 21,99	0,06
Leucina	19,82 +/- 10,67	19,93 +/- 9,90	19,79 +/- 10,90	0,96
Lisina	12,75 +/- 9,29	12,34 +/- 7,39	12,84 +/- 9,71	0,84
Metanol	3,56 +/- 4,42	2,91 +/- 3,03	3,71 +/- 4,68	0,51
Metionina	4,64 +/- 2,44	5,02 +/- 2,68	4,56 +/- 2,40	0,50
Mio-inositol	65,83 +/- 32,33	69,86 +/- 26,96	64,96 +/- 33,48	0,58
NAC	26,37 +/- 28,76	22,24 +/- 23,18	27,26 +/- 29,89	0,52
O-fosfocolina	17,85 +/- 11,47	19,54 +/- 8,46	17,47 +/- 12,05	0,51
O-fosfoetanolamina	17,92 +/- 9,66	22,18 +/- 9,55	16,97 +/- 9,48	0,04
Fenilalanina	4,21 +/- 2,75	3,96 +/- 2,24	4,26 +/- 2,86	0,69
Prolina	27,70 +/- 14,94	28,82 +/- 14,47	27,45 +/- 15,13	0,74
Propilenglicol	11,39 +/- 29,93	7,11 +/- 4,68	12,34 +/- 32,98	0,53
Putrescina	9,46 +/- 8,14	10,71 +/- 10,19	9,18 +/- 7,66	0,50
Piruvato	0,53 +/- 0,34	0,53 +/- 0,26	0,53 +/- 0,35	0,98
Scilo-inositol	0,78 +/- 1,25	0,69 +/- 0,89	0,80 +/- 1,32	0,76
Serina	8,05 +/- 4,70	9,09 +/- 3,63	7,82 +/- 4,90	0,33
Succinato	0,83 +/- 0,63	1,10 +/- 0,92	0,77 +/- 0,53	0,22
Taurina	22,52 +/- 14,23	24,95 +/- 12,96	21,98 +/- 14,53	0,45
Trans-aconitato	1,25 +/- 2,10	1,01 +/- 1,37	1,30 +/- 2,23	0,60
Treonina	6,40 +/- 4,43	6,74 +/- 3,15	6,32 +/- 4,68	0,73
Trimetilamina	2,94 +/- 2,01	3,07 +/- 2,05	2,88 +/- 2,01	0,72
Triptófano	3,91 +/- 2,49	3,66 +/- 2,58	3,97 +/- 2,48	0,65
Tiramina	3,04 +/- 1,97	2,76 +/- 1,51	3,10 +/- 2,06	0,53
Tirosina	3,24 +/- 2,11	3,50 +/- 1,86	3,18 +/- 2,16	0,58
Uridina	5,74 +/- 5,03	4,54 +/- 3,72	6,01 +/- 5,26	0,27
Valina	12,24 +/- 6,82	11,81 +/- 6,44	12,33 +/- 6,94	0,78

Anexo IV, Tabla 4. Niveles promedios de metabolitos (en ppm) entre diferentes grupos. Estudio entre enfermos y sanos en orina. Los valores se expresan en media +/- desviación estándar. Se excluyen los mismos casos excluidos en el análisis desarrollado en los resultados. Comparación de medias mediante test T-Student (valor de p).

METABOLITO	TOTAL DE LA MUESTRA	ENFERMOS	SANOS	p
2-Furoilglicina	4,80 +/- 4,99	5,04 +/- 5,02	4,15 +/- 3,93	0,16
2-hidroxi butirato	4,46 +/- 4,92	4,75 +/- 6,59	4,10 +/- 1,60	0,35
2-hidroxiisobutirato	2,87 +/- 1,10	2,77 +/- 0,92	3,03 +/- 1,25	0,09
2-fenilpropionato	7,74 +/- 4,47	7,46 +/- 4,27	7,85 +/- 4,54	0,54
3-hidroxi butirato	9,25 +/- 6,53	8,63 +/- 5,74	9,49 +/- 6,62	0,33
3-hidroxi quinurenina	3,99 +/- 2,14	3,75 +/- 1,83	4,15 +/- 2,29	0,17
3-metil-2-oxovalerato	6,28 +/- 2,62	6,27 +/- 2,61	6,29 +/- 2,65	0,96
4-aminohipurato	3,14 +/- 1,69	2,81 +/- 1,41	3,51 +/- 1,90	0,01
Acetato	1,20 +/- 0,62	1,20 +/- 0,59	1,20 +/- 0,66	0,99
Acetoacetato	3,98 +/- 1,90	3,85 +/- 1,86	4,13 +/- 1,94	0,31
Acetoína	3,72 +/- 1,81	3,75 +/- 1,81	3,69 +/- 1,83	0,81
Alanina	8,59 +/- 4,11	8,55 +/- 4,32	8,64 +/- 3,89	0,87
Arabinosa	17,23 +/- 7,59	16,34 +/- 6,01	18,25 +/- 9,01	0,08
Arginina	18,17 +/- 8,07	17,39 +/- 7,64	19,07 +/- 8,49	0,14
Betaína	10,94 +/- 14,29	9,66 +/- 1,75	12,42 +/- 16,69	0,18
Carnosina	6,49 +/- 4,92	6,96 +/- 5,27	5,95 +/- 4,44	0,15
Cis-aconitato	2,09 +/- 1,21	1,92 +/- 1,10	2,29 +/- 1,31	0,03
Citrato	48,37 +/- 28,35	50,82 +/- 31,78	45,56 +/- 23,65	0,18
Colina	4,09 +/- 2,01	3,79 +/- 1,91	4,42 +/- 2,06	0,02
Creatina	12,78 +/- 14,63	12,85 +/- 15,25	12,70 +/- 13,97	0,94
Creatinafosfato	16,27 +/- 12,23	17,70 +/- 15,47	14,63 +/- 51	0,06
Creatinina	155,84 +/- 69,92	156,03 +/- 59,74	155,62 +/- 80,41	0,96
Dimetilamina	3,20 +/- 5,51	3,28 +/- 5,78	3,12 +/- 5,22	0,83
Etanolamina	11,19 +/- 4,81	10,62 +/- 5,03	11,86 +/- 4,46	0,07
Formato	0,51 +/- 0,36	0,48 +/- 0,31	0,55 +/- 0,40	0,14
Fucosa	16,21 +/- 7,65	15,74 +/- 7,33	16,75 +/- 8,01	0,35
Fumarato	0,13 +/- 0,07	0,14 +/- 0,07	0,13 +/- 0,08	0,76
Gentisato	2,45 +/- 1,22	2,42 +/- 1,23	2,49 +/- 1,21	0,72
Glucosa	64,41 +/- 152,57	66,40 +/- 152,21	62,12 +/- 153,78	0,84
Glutamato	10,32 +/- 3,96	10,28 +/- 3,97	10,36 +/- 3,97	0,88
Glutamina	20,40 +/- 7,31	19,14 +/- 6,07	21,86 +/- 8,31	0,01
Glicina	9,81 +/- 5,08	9,62 +/- 4,74	10,01 +/- 5,67	0,59
Hipurato	66,53 +/- 56,55	69,35 +/- 59,16	63,29 +/- 53,52	0,45
Histidina	4,15 +/- 3,03	4,30 +/- 3,49	3,98 +/- 2,41	0,45
Hipoxantina	0,76 +/- 0,57	0,73 +/- 0,55	0,80 +/- 0,59	0,39
Imidazol	1,78 +/- 1,27	1,68 +/- 1,33	1,89 +/- 1,19	0,24
Indol-3-lactato	10,73 +/- 5,08	10,41 +/- 4,85	11,10 +/- 5,34	0,34
Isobutirato	1,32 +/- 1,90	1,47 +/- 2,45	1,14 +/- 0,92	0,20
Isoleucina	3,18 +/- 1,47	3,21 +/- 1,67	3,16 +/- 1,20	0,81
Quinurenina	4,84 +/- 2,22	4,97 +/- 2,10	4,69 +/- 2,36	0,37

Anexo IV

Lactato	7,10 +/- 5,12	7,57 +/- 6,07	6,56 +/- 3,69	0,16
Leucina	4,26 +/- 1,61	4,19 +/- 1,72	4,34 +/- 1,48	0,52
Malonato	1,33 +/- 1,62	1,43 +/- 2,10	1,20 +/- 0,76	0,32
Manosa	5,56 +/- 5,71	5,09 +/- 3,14	6,11 +/- 7,66	0,23
Metanol	3,41 +/- 2,27	3,29 +/- 2,30	3,55 +/- 2,24	0,40
Metilamina	1,28 +/- 1,72	1,21 +/- 1,87	1,35 +/- 1,52	0,57
Metilmalonato	6,97 +/- 3,46	7,12 +/- 3,57	6,80 +/- 3,35	0,51
Metilsuccinato	4,18 +/- 2,67	4,43 +/- 3,17	3,90 +/- 1,92	0,14
Mio-inositol	31,36 +/- 14,31	31,19 +/- 13,59	31,55 +/- 15,23	0,85
N-acetilserotonina	5,55 +/- 2,72	5,33 +/- 2,39	5,80 +/- 3,05	0,23
N-metilhidantoína	3,30 +/- 1,80	3,21 +/- 1,66	3,41 +/- 1,96	0,44
N-fenilacetilglicina	30,66 +/- 19,28	31,71 +/- 21,75	29,45 +/- 15,99	0,41
Nicotinamida N-óxido	0,97 +/- 0,55	0,96 +/- 0,56	0,99 +/- 0,54	0,72
O-Acetilcarnitina	7,05 +/- 4,43	6,94 +/- 4,84	7,19 +/- 3,92	0,69
O-Fosfocolina	8,19 +/- 6,81	7,37 +/- 6,19	9,13 +/- 7,38	0,07
Fenilalanina	7,09 +/- 6,64	6,62 +/- 5,65	7,62 +/- 7,62	0,28
Prolina	27,16 +/- 10,15	25,96 +/- 9,65	28,55 +/- 10,59	0,07
Piridoxina	3,71 +/- 2,60	3,80 +/- 2,67	3,61 +/- 2,53	0,61
Piruvato	1,27 +/- 0,66	1,31 +/- 0,77	1,22 +/- 0,52	0,36
Ribosa	27,52 +/- 16,18	25,48 +/- 13,19	29,86 +/- 18,87	0,06
Sarcosina	12,15 +/- 6,36	11,69 +/- 5,91	12,68 +/- 6,84	0,27
Succinato	1,24 +/- 0,85	1,17 +/- 0,94	1,31 +/- 0,72	0,24
Sucrosa	11,97 +/- 9,30	12,72 +/- 9,99	11,12 +/- 8,40	0,22
Taurina	21,84 +/- 16,72	21,85 +/- 19,65	21,83 +/- 12,63	0,99
Treonina	4,96 +/- 3,05	4,58 +/- 2,64	5,41 +/- 3,42	0,05
Trigonelina	7,64 +/- 5,31	8,19 +/- 6,01	7,01 +/- 4,32	0,10
Trimetilamina	0,59 +/- 0,41	0,58 +/- 0,39	0,61 +/- 0,44	0,69
Trimetilamina N-óxido	13,93 +/- 25,61	15,18 +/- 30,61	12,49 +/- 18,29	0,46
Triptófano	7,15 +/- 4,50	7,16 +/- 4,38	7,13 +/- 4,66	0,96
Tiramina	3,72 +/- 1,85	3,56 +/- 1,68	3,91 +/- 2,02	0,19
Tirosina	4,54 +/- 2,20	4,51 +/- 2,27	4,59 +/- 2,14	0,79
Urea	128,38 +/- 105,06	128,25 +/- 111,68	128,53 +/- 97,49	0,98
Uridina	2,30 +/- 1,52	2,22 +/- 1,51	2,38 +/- 1,53	0,47
Valina	3,50 +/- 1,13	3,39 +/- 1,09	3,62 +/- 1,17	0,14
Xantosina	4,12 +/- 2,65	3,85 +/- 2,45	4,43 +/- 2,84	0,12

Anexo IV, Tabla 5. Niveles promedios de metabolitos (en ppm) entre diferentes grupos. Estudio entre Gleason 6-7 frente a Gleason 8 o mayor en orina. Los valores se expresan en media +/- desviación estándar. Se excluyen los mismos casos excluidos en el análisis desarrollado en los resultados. Comparación de medias mediante test U de Mann-Whitney (valor de p).

METABOLITO	TOTAL DE LA MUESTRA	GLEASON 6-7	GLEASON 8 O MAYOR	p
2-Furoilglicina	5,04 +/- 5,02	5,43 +/- 5,44	4,21 +/- 3,93	0,24
2-hidroxiobutirato	4,75 +/- 6,59	4,30 +/- 4,78	5,72 +/- 9,36	0,30
2-hidroxiisobutirato	2,77 +/- 0,92	2,78 +/- 0,87	2,74 +/- 1,05	0,87
2-fenilpropionato	7,46 +/- 4,27	7,39 +/- 3,90	7,61 +/- 5,03	0,80
3-hidroxiobutirato	8,63 +/- 7,54	8,84 +/- 6,16	8,20 +/- 4,81	0,59
3-hidroxiquinurenina	3,75 +/- 1,83	3,66 +/- 1,87	3,94 +/- 1,74	0,47
3-metil-2-oxovalerato	6,27 +/- 2,61	6,14 +/- 2,50	6,55 +/- 2,85	0,45
4-aminohipurato	2,81 +/- 1,41	2,82 +/- 1,35	2,79 +/- 1,57	0,92
Acetato	1,20 +/- 0,59	1,15 +/- 0,53	1,30 +/- 0,69	0,21
Acetoacetato	3,85 +/- 1,86	3,71 +/- 1,47	4,11 +/- 2,49	0,41
Acetoína	3,75 +/- 1,81	3,53 +/- 1,29	4,20 +/- 2,56	0,16
Alanina	8,55 +/- 4,32	8,12 +/- 4,03	9,44 +/- 4,82	0,14
Arabinosa	16,34 +/- 6,01	16,23 +/- 5,87	16,59 +/- 6,36	0,77
Arginina	17,39 +/- 7,64	17,41 +/- 8,18	17,36 +/- 6,45	0,97
Betaína	9,66 +/- 11,75	9,62 +/- 10,18	9,76 +/- 14,72	0,95
Carnosina	6,96 +/- 5,27	7,26 +/- 5,80	6,33 +/- 3,94	0,40
Cis-aconitato	1,92 +/- 1,10	1,99 +/- 1,07	1,76 +/- 1,14	0,30
Citrato	50,82 +/- 31,78	49,63 +/- 33,20	53,33 +/- 28,87	0,41
Colina	3,79 +/- 1,91	3,90 +/- 2,11	3,57 +/- 1,40	0,41
Creatina	12,85 +/- 15,25	12,74 +/- 14,11	13,09 +/- 17,65	0,91
Creatinafosfato	17,70 +/- 15,47	18,36 +/- 17,82	16,30 +/- 8,70	0,52
Creatinina	156,03 +/- 59,74	160,42 +/- 59,28	146,72 +/- 60,51	0,27
Dimetilamina	3,28 +/- 5,78	3,24 +/- 5,73	3,37 +/- 5,96	0,91
Etanolamina	10,62 +/- 5,03	10,60 +/- 5,25	10,65 +/- 4,61	0,95
Formato	0,48 +/- 0,31	0,45 +/- 0,21	0,54 +/- 0,46	0,18
Fucosa	15,74 +/- 7,33	14,82 +/- 5,97	17,67 +/- 9,41	0,11
Fumarato	0,14 +/- 0,07	0,13 +/- 0,07	0,15 +/- 0,08	0,35
Gentisato	2,42 +/- 1,23	2,53 +/- 1,32	2,20 +/- 0,98	0,20
Glucosa	66,41 +/- 152,21	60,45 +/- 140,72	79,01 +/- 175,70	0,56
Glutamato	10,28 +/- 3,97	10,23 +/- 3,77	10,40 +/- 4,42	0,83
Glutamina	19,14 +/- 6,07	19,65 +/- 6,25	18,06 +/- 5,60	0,21
Glicina	9,62 +/- 4,74	9,16 +/- 4,31	10,62 +/- 5,47	0,13
Hipurato	69,35 +/- 59,16	67,68 +/- 56,89	72,87 +/- 64,45	0,67
Histidina	4,30 +/- 3,49	4,50 +/- 3,75	3,87 +/- 2,86	0,38
Hipoxantina	0,73 +/- 0,55	0,70 +/- 0,48	0,78 +/- 0,67	0,52
Imidazol	1,68 +/- 1,33	1,67 +/- 1,41	1,70 +/- 1,18	0,92
Indol-3-lactato	10,41 +/- 4,85	10,37 +/- 4,95	10,52 +/- 4,69	0,88
Isobutirato	1,47 +/- 2,45	1,26 +/- 1,90	1,91 +/- 3,33	0,20
Isoleucina	3,21 +/- 1,67	3,17 +/- 1,74	3,28 +/- 1,56	0,74
Quinurenina	4,97 +/- 2,10	4,85 +/- 2,03	5,24 +/- 2,27	0,37

Anexo IV

Lactato	7,57 +/- 6,07	6,95 +/- 3,80	8,90 +/- 9,14	0,12
Leucina	4,19 +/- 1,72	4,08 +/- 1,44	4,42 +/- 2,22	0,34
Malonato	1,43 +/- 2,10	1,60 +/- 2,47	1,08 +/- 0,86	0,24
Manosa	5,09 +/- 3,14	5,07 +/- 3,16	5,12 +/- 3,15	0,94
Metanol	3,29 +/- 2,30	3,40 +/- 2,23	3,04 +/- 2,46	0,45
Metilamina	1,21 +/- 1,87	1,01 +/- 1,32	1,65 +/- 2,66	0,19
Metilmalonato	7,12 +/- 3,57	6,96 +/- 3,29	7,44 +/- 4,14	0,52
Metilsuccinato	4,43 +/- 3,17	4,51 +/- 3,30	4,28 +/- 2,92	0,73
Mio-inositol	31,19 +/- 13,59	30,20 +/- 12,24	33,29 +/- 16,07	0,27
N-acetilserotonina	5,33 +/- 2,39	5,30 +/- 2,19	5,40 +/- 2,81	0,83
N-metilhidantoína	3,21 +/- 1,66	3,08 +/- 1,64	3,47 +/- 1,70	0,25
N-fenilacetilglicina	31,71 +/- 21,75	30,60 +/- 18,01	34,06 +/- 28,27	0,44
Nicotinamida N-óxido	0,96 +/- 0,56	0,92 +/- 0,53	1,04 +/- 0,62	0,28
O-Acetilcarnitina	6,94 +/- 4,84	6,74 +/- 4,43	7,37 +/- 5,67	0,53
O-Fosfocolina	7,37 +/- 6,19	7,46 +/- 6,60	7,18 +/- 5,31	0,83
Fenilalanina	6,62 +/- 5,65	6,27 +/- 5,42	7,36 +/- 6,14	0,35
Prolina	25,96 +/- 9	25,95 +/- 9,98	25,96 +/- 9,04	0,99
Piridoxina	3,80 +/- 2,67	3,61 +/- 2,52	4,21 +/- 2,95	0,27
Piruvato	1,31 +/- 0,77	1,32 +/- 0,86	1,28 +/- 0,55	0,81
Ribosa	25,48 +/- 13,19	26,32 +/- 13,35	23,71 +/- 12,85	0,34
Sarcosina	11,69 +/- 5,91	11,35 +/- 5,46	12,42 +/- 6,80	0,38
Succinato	1,17 +/- 0,94	1,21 +/- 1,10	1,08 +/- 0,43	0,51
Sucrosa	12,72 +/- 9,99	12,35 +/- 10,83	13,50 +/- 8,01	0,58
Taurina	21,85 +/- 19,65	22,75 +/- 22,74	19,93 +/- 10,52	0,49
Treonina	4,58 +/- 2,64	4,51 +/- 2,84	4,73 +/- 2,20	0,69
Trigonelina	8,19 +/- 6,01	8,50 +/- 6,59	7,52 +/- 4,54	0,43
Trimetilamina	0,58 +/- 0,39	0,58 +/- 0,40	0,57 +/- 0,38	0,89
Trimetilamina N-óxido	15,18 +/- 30,61	15,61 +/- 33,43	14,27 +/- 24,01	0,83
Triptófano	7,16 +/- 4,38	7,32 +/- 4,76	6,83 +/- 3,48	0,59
Tiramina	3,56 +/- 1,68	3,65 +/- 1,63	3,36 +/- 1,78	0,40
Tirosina	4,51 +/- 2,27	4,57 +/- 2,27	4,36 +/- 2,30	0,65
Urea	128,25 +/- 111,68	135,59 +/- 109,01	112,70 +/- 117,30	0,32
Uridina	2,22 +/- 1,51	2,22 +/- 1,35	2,23 +/- 1,83	0,96
Valina	3,39 +/- 1,09	3,38 +/- 1,01	3,40 +/- 1,25	0,91
Xantosina	3,85 +/- 2,45	3,78 +/- 2,22	3,99 +/- 2,89	0,69

Anexo IV, Tabla 6. Niveles promedios de metabolitos (en ppm) entre diferentes grupos. Estudio en orina entre casos con y sin recidiva bioquímica. Los valores se expresan en media +/- desviación estándar. Se excluyen los mismos casos excluidos en el análisis desarrollado en los resultados. Comparación de medias mediante test U de Mann-Whitney (valor de p).

METABOLITO	TOTAL DE LA MUESTRA	CON RECIDIVA	SIN RECIDIVA	p
2-Furoilglicina	4,93 +/- 5,07	4,50 +/- 3,93	5,02 +/- 5,29	0,72
2-hidroxi butirato	4,97 +/- 7,27	7,12 +/- 13,53	4,52 +/- 5,14	0,47
2-hidroxiisobutirato	2,77 +/- 0,94	2,82 +/- 0,93	2,76 +/- 0,94	0,82
2-fenilpropionato	7,48 +/- 4,01	8,28 +/- 5,20	7,31 +/- 3,73	0,39
3-hidroxi butirato	8,47 +/- 5,32	7,35 +/- 3,99	8,71 +/- 5,56	0,37
3-hidroxi quinurenina	3,72 +/- 1,87	4,37 +/- 1,90	3,58 +/- 1,85	0,14
3-metil-2-oxoalerato	6,12 +/- 2,53	5,82 +/- 2,36	6,18 +/- 2,58	0,61
4-aminohipurato	2,81 +/- 1,48	2,82 +/- 1,21	2,81 +/- 1,54	0,98
Acetato	1,21 +/- 0,62	1,25 +/- 0,62	1,20 +/- 0,63	0,79
Acetoacetato	3,88 +/- 1,92	4,32 +/- 2,78	3,79 +/- 1,70	0,32
Acetoína	3,72 +/- 1,83	4,22 +/- 2,41	3,61 +/- 1,68	0,24
Alanina	8,66 +/- 4,48	8,70 +/- 4,55	8,65 +/- 4,50	0,96
Arabinosa	16,31 +/- 5,75	17,87 +/- 6,64	15,98 +/- 5,54	0,25
Arginina	17,21 +/- 7,59	16,41 +/- 7,02	17,38 +/- 7,74	0,65
Betaína	9,88 +/- 12,29	7,23 +/- 5,73	10,44 +/- 13,23	0,36
Carnosina	7,41 +/- 5,55	6,16 +/- 3,88	7,67 +/- 5,83	0,34
Cis-aconitato	1,95 +/- 1,17	1,81 +/- 0,84	1,98 +/- 1,23	0,62
Citrato	52,82 +/- 31,52	49,56 +/- 21,95	53,51 +/- 33,27	0,66
Colina	3,84 +/- 1,91	3,38 +/- 1,48	3,94 +/- 1,98	0,31
Creatina	13,04 +/- 15,43	21,82 +/- 31,97	11,19 +/- 8,04	0,22
Creatinafosfato	18,20 +/- 16,69	13,78 +/- 7,24	19,13 +/- 17,96	0,26
Creatinina	154,66 +/- 62,58	156,80 +/- 39,09	154,21 +/- 66,70	0,84
Dimetilamina	3,79 +/- 6,31	3,45 +/- 4,65	3,86 +/- 6,63	0,82
Etanolamina	10,68 +/- 5,28	10,23 +/- 4,70	10,78 +/- 5,42	0,71
Formato	0,49 +/- 0,34	0,42 +/- 0,16	0,51 +/- 0,36	0,35
Fucosa	15,08 +/- 6,68	13,51 +/- 7,34	15,41 +/- 6,54	0,32
Fumarato	0,14 +/- 0,08	0,13 +/- 0,07	0,14 +/- 0,08	0,55
Gentisato	2,44 +/- 1,30	2,27 +/- 0,83	2,48 +/- 1,39	0,58
Glucosa	62,80 +/- 153,35	21,34 +/- 15,35	71,56 +/- 167,51	0,07
Glutamato	10,23 +/- 4,03	9,83 +/- 4,16	10,32 +/- 4,07	0,67
Glutamina	19,04 +/- 6,35	19,30 +/- 5,72	18,99 +/- 6,51	0,86
Glicina	9,86 +/- 4,79	9,04 +/- 4,02	10,04 +/- 4,95	0,46
Hipurato	70,92 +/- 60,76	74,23 +/- 81,17	70,22 +/- 56,24	0,81
Histidina	4,61 +/- 3,78	4,65 +/- 3,85	4,61 +/- 3,79	0,96
Hipoxantina	0,72 +/- 0,59	0,82 +/- 0,85	0,71 +/- 0,52	0,51
Imidazol	1,70 +/- 1,42	1,95 +/- 1,29	1,65 +/- 1,44	0,45
Indol-3-lactato	10,20 +/- 4,95	10,15 +/- 4,94	10,21 +/- 4,98	0,96
Isobutirato	1,25 +/- 1,80	0,75 +/- 0,30	1,36 +/- 1,96	0,23
Isoleucina	3,24 +/- 1,82	2,90 +/- 0,88	3,31 +/- 1,95	0,42
Quinurenina	4,95 +/- 2,15	5,05 +/- 2,35	4,93 +/- 2,12	0,84

Anexo IV

Lactato	7,73 +/- 6,57	6,33 +/- 3,49	8,03 +/- 7,03	0,36
Leucina	4,17 +/- 1,77	4,22 +/- 1,43	4,16 +/- 1,84	0,89
Malonato	1,55 +/- 2,31	1,24 +/- 0,55	1,61 +/- 2,53	0,57
Manosa	4,93 +/- 3,07	4,18 +/- 2,03	5,09 +/- 3,24	0,30
Metanol	3,23 +/- 2,42	2,72 +/- 2,84	3,34 +/- 2,33	0,37
Metilamina	1,28 +/- 2,04	1,03 +/- 1,27	1,34 +/- 2,17	0,59
Metilmalonato	7,15 +/- 3,61	7,98 +/- 4,70	6,97 +/- 3,35	0,32
Metilsuccinato	4,50 +/- 3,38	4,27 +/- 1,76	4,55 +/- 3,64	0,76
Mio-inositol	31,11 +/- 13,89	30,94 +/- 19,67	31,15 +/- 12,52	0,95
N-acetilserotonina	5,24 +/- 2,45	4,34 +/- 1,65	5,43 +/- 2,55	0,11
N-metilhidantoína	3,26 +/- 1,71	3,41 +/- 1,61	3,23 +/- 1,74	0,70
N-fenilacetilglicina	32,59 +/- 23,26	35,97 +/- 29,51	31,88 +/- 21,91	0,53
Nicotinamida N-óxido	0,95 +/- 0,57	1,05 +/- 0,66	0,92 +/- 0,55	0,44
O-Acetilcarnitina	6,79 +/- 4,97	7,69 +/- 7,48	6,60 +/- 4,32	0,44
O-Fosfocolina	7,19 +/- 6,23	7,41 +/- 5,54	7,14 +/- 6,41	0,88
Fenilalanina	6,52 +/- 5,73	7,25 +/- 4,86	6,37 +/- 5,92	0,59
Prolina	25,96 +/- 10,03	22,60 +/- 6,36	26,67 +/- 10,54	0,15
Piridoxina	3,82 +/- 2,70	3,01 +/- 1,56	3,99 +/- 2,86	0,07
Piruvato	1,28 +/- 0,64	1,18 +/- 0,54	1,30 +/- 0,66	0,50
Ribosa	25,29 +/- 14,15	22,91 +/- 12,30	25,80 +/- 14,54	0,47
Sarcosina	11,29 +/- 5,75	11,75 +/- 7,26	11,19 +/- 5,44	0,73
Succinato	1,18 +/- 1,01	1,04 +/- 0,48	1,20 +/- 1,09	0,58
Sucrosa	12,56 +/- 9,26	12,03 +/- 6,36	12,67 +/- 9,79	0,81
Taurina	22,15 +/- 21,03	17,24 +/- 9,35	23,18 +/- 22,66	0,32
Treonina	4,66 +/- 2,81	4,42 +/- 1,68	4,70 +/- 3,01	0,72
Trigonelina	8,34 +/- 6,12	6,21 +/- 3,76	8,79 +/- 6,45	0,13
Trimetilamina	0,54 +/- 0,31	0,52 +/- 0,24	0,55 +/- 0,32	0,74
Trimetilamina N-óxido	15,19 +/- 32,78	27,61 +/- 66,19	12,56 +/- 19,72	0,39
Triptófano	6,98 +/- 4,45	6,32 +/- 2,98	7,12 +/- 4,71	0,53
Tiramina	3,51 +/- 1,73	3,53 +/- 2,08	3,51 +/- 1,67	0,96
Tirosina	4,57 +/- 2,32	4,01 +/- 1,44	4,69 +/- 2,46	0,30
Urea	128,41 +/- 112,25	168,72 +/- 128,72	119,89 +/- 107,54	0,12
Uridina	2,10 +/- 1,48	2,25 +/- 1,22	2,07 +/- 1,53	0,68
Valina	3,41 +/- 1,10	3,35 +/- 1,02	3,42 +/- 1,12	0,83
Xantosina	3,97 +/- 2,55	4,46 +/- 3,11	3,86 +/- 2,43	0,41