



Programa de Doctorado 3139 Medicina

Tesis doctoral

**IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES
URINARIOS DEL CÁNCER DE PRÓSTATA
MEDIANTE ANÁLISIS METABOLÓMICO
POR RESONANCIA MAGNÉTICA**

Presentada por: Miguel Ángel Bonillo García

Dirigida por: Dr. José Luis Ruíz Cerdá

Dra. M^a Carmen Martínez Bisbal

Valencia, febrero 2023

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

Director (es) / Codirector (es):

1.- Apellidos y nombre: RUIZ CERDA, JOSE LUIS N.I.F. 19833930 H, Departamento/Instituto: Cirugía Centro: Facultad de Medicina y Odontología

2.- Apellidos y nombre: MARTÍNEZ BISBAL, MARIA CARMEN N.I.F. 33450785 E, Departamento/Instituto: Departamento de Química Física, Centro: Facultad de Química, Universitat de València

Directores, respectivamente, de la tesis doctoral: **"IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES URINARIOS DEL CÁNCER DE PRÓSTATA MEDIANTE ANÁLISIS METABOLÓMICO POR RESONANCIA MAGNÉTICA**

de D MIGUEL ÁNGEL BONILLO GARCÍA,

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

Fecha: 2 de febrero de 2023

Fdo.: JOSE LUIS RUIZ CERDA

Fdo.: MARIA CARMEN MARTÍNEZ BISBAL



MARIA
CARMEN|
MARTINEZ|
BISBAL

Firmado
digitalmente por
MARIA CARMEN|
MARTINEZ|BISBAL
Fecha: 2023.02.02
12:57:24 +01'00'

Director

Directora

**ESCUELA DOCTORAL
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

Agradecimientos

Aquí concluye un proyecto personal que comenzó hace años, demasiados quizás. Si defender una Tesis Doctoral en este momento de mi carrera, con casi 50 años, tuviera algo positivo, diría que relativizas lo que inicialmente te abrumaba y, al mismo tiempo, agradeces de una forma especial a todas aquellas personas que te han acompañado en esta aventura.

Para empezar, dar las gracias a mis directores de Tesis por la oportunidad que me brindaron hace unos años de adentrarme entonces en ese desconocido mundo que era la metabolómica. Reconozco que vuestra labor ha sido importante para finalizarla.

Agradecer a todos los que en algún momento me disteis un consejo o me ofrecisteis vuestra colaboración desinteresada, que con vuestro apoyo me animasteis a superar los momentos más difíciles.

A nivel personal, no sería lo que soy sin el ejemplo de mi padre, toda una lección de vida.

Para acabar, mención especial a la Dra. Marta Trassierra Villa, compañera de fatigas, madre de mis hijo/as, mi fuente de inspiración, de la que ya dijera en su momento, *“si existieran más personas como tú, el mundo sería un lugar mejor”*.

a Miguel, Emma y Maia,

Índice general

Índice de abreviaturas	i
Índice de figuras	v
Índice de tablas	ix
Introducción	1
Epidemiología del Cáncer de Próstata	1
Biomarcadores del Cáncer de Próstata	5
Limitaciones del PSA.....	7
Ausencia de biomarcadores de agresividad	9
Biomarcadores del CaP en orina.....	10
Metabólica	15
Metabólica en el Cáncer de Próstata.....	17
Diseño del estudio metabólico	21
Técnicas de análisis de la muestra biológica	25
Resonancia Magnética Nuclear	27
Principios básicos de la RMN.....	28
Tipos de experimentos con RMN.....	33
Análisis de datos	34
Hipótesis	35
Objetivos	37
Material y método	39
Selección de sujetos	39
Variables	40
Historia Clínica	40
Características Anatómo-patológicas.....	41
Grupo de riesgo	42
Recogida de las muestras biológicas	43
Procesado de la muestra	43
Almacenamiento de la muestra.....	43
Análisis metabólico de las muestras	44
Preparación de muestras y adquisición de ¹ H-RMN	44
Procesamiento de espectros de ¹ H-RMN y asignación de metabolitos.....	45
Metodología Bioestadística	46
Métodos quimiométricos	46
Interpretación biológica.....	52

Resultados	53
Análisis descriptivo de variables clínicas	53
Análisis descriptivo inicial no supervisado.....	56
Análisis discriminante	58
Estudio Univariante.....	58
Estudio Multivariante	63
Análisis rutas metabólicas	68
Optimización del modelo con variables clínicas.....	69
Análisis no discriminante.....	69
Análisis discriminante Multivariante.....	71
Discusión.....	77
Conclusión	87
Referencias Bibliográficas.....	89
Anexos.....	99
Anexo 1. Consentimiento informado para donación y almacenamiento de muestras orina	99
Anexo 2. Informe Comité Ético de Investigación Biomédica del IIS la Fe.....	105

Índice de abreviaturas

^{18}F -FDG	^{18}F -fluorodeoxiglucosa.
^{18}F -FCH	^{18}F -fluorocolina.
α_1 ACT	α_1 -antiquimotripsina.
α_1 AT	α_1 -antitripsina.
α_2 M	α_2 -macroglobulina.
%pPSA	porcentaje de proPSA.
Asp	Aspartato.
ASR(E)	Tasas Ajustadas por edad método directo (población estándar europea) por 100.000 habitantes.
ASR (W)	Tasas Ajustadas por edad método directo (población estándar mundial) por 100.000 habitantes.
APVP (%)	Indicador de los años potenciales de vida perdidos por esta causa en relación total de causas tumorales.
ADCP	Adenocarcinoma de Próstata.
AEU	Asociación Española de Urología.
AMACR	α -Metil-Coenzima A Racemasa.
ARNm	ARN mensajero.
ASA	Clasificación del estado físico según la Sociedad Americana de Anestesiología.
AUC	Área Bajo la Curva.
BM	Biomarcadores.
BPSA	PSA relacionado con HBP.
BT	Braquiterapia.
BxP	Biopsia transrectal de próstata.
CaP	Cáncer de Próstata.
CAPRA	Cancer of the Prostate Risk Assessment.
CE-MS	Electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas.
CNSP	Consejo Nacional de la Salud Prostática.
COPA	Cancer Outlier Profile Analysis.
CVa	Comunidad Valenciana.
CV	Validación Cruzada.
Da	Dalton.
DDS	4,4-Dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid.
DT	Desviación Típica.

EAU	Asociación Europea de Urología.
ECIS	European Cancer Information System.
EE. UU.	Estados Unidos.
EPCA	Antígeno Prostático Temprano.
ERG	Early Response Gene.
ERSPC	European Randomized Study of Screening for Cancer.
ETS	Oncogén del virus E26 de la eritroblastosis.
EUCAN	European Network of Cancer Registries.
EUROCARE	European Cancer Registry Based Study on Survival and Care of Cancer Patients.
FDR:	False Discovery Rate
FFPE	Pieza fijada en formol e incluida en parafina.
FID	Free Induction Decay. (señal de decaimiento libre de inducción).
FIVO	Fundación Instituto Valenciano de Oncología.
FISH	Hibridación Fluorescente In Situ.
fPSA	PSA libre.
GC-MS	Cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masas.
HBP	Hiperplasia Benigna de Próstata.
HGPIN	Neoplasia Intraepitelial Prostática de alto grado.
HR	Hazard Ratio.
HT	Hormonoterapia.
IARC	International Agency for Research on Cancer.
IMC	Índice de Masa Corporal.
INE	Instituto Nacional de Estadística.
ILPBQ	Intervalo Libre de Progresión Bioquímica.
IPA	Ingenuity Pathway Analysis.
iPSA	PSA inactivo.
ISUP	International Society of Urological Pathology.
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.
l.b.	Línea Base.
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.
log2FC	Logaritmos binarios fold-changes.
LOOCV	Leave-one-out cross-validation.
LV	Variable latente.
NGS	Next Generation Sequencing.
MAD	Desviación Absoluta de la Mediana.
MGB	Minor Groove Binding.
MS	Espectrometría de masas.

NCCN	National Comprehensive Cancer Network.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
p2PSA	Isoforma [-2]pPSA.
PAP	Fosfatasa Ácida Prostática.
PAR-2	Protease Activated Receptor-2.
PCA	Principal Component Analysis.
PC	Componentes Principales.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PET	Tomografía por Emisión de Positrones.
PIN	Neoplasia Intraepitelial Prostática.
PLCO	Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial.
PLS-DA	Partial Least Square Discriminant Analysis.
ppm	partes por millón.
pPSA	proPSA.
PSA	Antígeno Prostático Específico.
PSAD	PSA Densidad.
PSA-DT	PSA doubling time.
PSAV	PSA Velocidad.
PSMA	Antígeno de membrana específico de la próstata.
PTR	Prostatectomía Radical.
rBQ	Recurrencia Bioquímica
RE	Receptor estrógenos.
REDECAN	Red Española de Registros de Cáncer.
RF	Radiofrecuencia.
RLM-RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends.
RMN	Resonancia Magnética Nuclear.
RR	Riesgo Relativo.
RT	Radioterapia Externa.
RT-PCR	PCR con transcripción inversa.
RTUP	Resección Transuretral de Próstata.
SLE	Supervivencia Libre de Enfermedad.
SLPB	Supervivencia Libre Progresión Bioquímica.
SLPC	Supervivencia Libre de Progresión Clínica.
SLPM	Supervivencia Libre Progresión Metastásica.
SOP	Standard Operation Procedure.
STUI	Síntomas Tracto Urinario Inferior.
TC	Tomografía Computarizada.
TsA	Tasa Acumulada.
TsAj	Tasa Ajustada.
TsB	Tasa Bruta.
TR	Tacto Rectal.

U.E.	Unión Europea.
U.S.	United States.
VA	Vigilancia Activa.
VPP	Valor Predictivo Positivo.
VPN	Valor Predictivo Negativo.
Zn	Zinc.

Índice de figuras

Figura 1: Tasas estimadas de incidencia (en azul) y mortalidad (en rojo) de diferentes tipos de cáncer ajustadas por edad en la población Unión Europea, 2021 (por 100.000 habitantes).

Fuente: Globocan (<http://gco.iarc.fr>).

Figura 2: Incidencia estimada de los países de la Unión Europea (por 100.000 hab).

Fuente: Asociación Española Contra el Cáncer (www.epdata.es).

Figura 3: Evolución de los nuevos casos de CaP cada año en España.

Fuente: Asociación Española Contra el Cáncer (www.epdata.es).

Figura 4: Cascada Ómica. Genes y proteínas están sujetos a mutación, procesos de regulación epigenética y modificaciones post-traduccionales, respectivamente. Los metabolitos representan los productos finales de la cascada, los cuales están más cercanos al fenotipo (1).

Figura 5: Producción de citrato en una célula prostática normal. Adaptado de Lucarelli et al, 2015 (2).

Figura 6: Lipogénesis de novo y colesterogénesis en células CaP. Adaptado de Lucarelli et al, 2015 (2).

Figura 7: Aplicación de ¹⁸F-FCH PET/TC en la detección de CaP. Adaptado de Vali et al, 2015 (3).

Figura 8: Diagrama de flujo del proceso de trabajo en metabolómica.

Figura 9: Principios básicos de la RMN (1).

Figura 10: Transformación de las señales de decaimiento en un espectro monodimensional (1D). *Adaptación de Bothwell et al 2011 (1).*

Figura 11. Diagrama de puntuación (*scores*) y gráfico T^2 de *Hotelling* obtenido del análisis no dirigido PCA de los espectros de ^1H -RMN normalizados (respecto a la creatinina) de las muestras de orina de pacientes con CaP con recidiva bioquímica frente a los espectros de orina de pacientes sin recidiva.

Figura 12: Análisis *fold change*. Las variables significativas (puntos rosas) son aquellas cuyos FC están más allá del umbral de FC establecido, en este caso 2, tanto por encima como por debajo.

Figura 13: Análisis Univariante (Wilcoxon). Los círculos rosas representan los componentes por encima del umbral 0,1.

Figura 14:

- (A) Curvas ROC y AUC correspondiente, de los algunos metabolitos. La sensibilidad se muestra en el eje y, y la especificidad en el eje x.
- (B) Diagramas de caja de las concentraciones de los metabolitos seleccionados en ambos grupos de casos. La línea horizontal roja indica el punto de corte óptimo.

Figura 15: Variables significativas seleccionadas por *Volcano plot* con umbral de *fold-changes* (x) 2 y umbral de *t-test* (y) 0.1. Los círculos azules y rojo representan metabolitos por encima y por debajo del umbral, respectivamente.

Figura 16: Diagramas de cajas de las concentraciones de metabolitos (original y normalizado creatinina) que han mostrado diferencias significativas en el estudio univariante.

Figura 17. Selección del número de variables latentes a partir de valores de exactitud de la clasificación estimados mediante *VC leave-one-out*.

Figura 18. Representaciones gráficas obtenidas del modelo PLS-DA que discrimina entre las muestras de orina de CaP que no recidivan de las que sí recidivan.

Figura 19. Curvas ROC estimadas con el modelo PLS-DA que discrimina entre las muestras de orina de CaP que no recidivan de las que sí recidivan. La línea azul corresponde a los datos estimados y la línea naranja, 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.

Figura 20. Modelo PLS-DA frente al vector de regresión. El color de cada punto representa el AUC de cada variable en el estudio univariante previo.

Figura 21. Obtención de variables latentes tras la validación cruzada (mediante el método *leave-one-out*), teniendo en cuenta sólo aquellas variables cuyo VIP fue >1 (45 variables).

Figura 22. Representaciones gráficas obtenidas del modelo PLS-DA que discrimina entre las muestras de orina de CaP que no recidivan de las que sí recidivan, teniendo en cuenta sólo aquellas las 45 variables cuyo VIP fue >1 .

Figura 23. Curvas ROC estimadas con el modelo PLS-DA que discrimina entre las muestras de orina de CaP que no recidivan de las que sí recidivan. La línea azul corresponde a los datos estimados y la línea verde, a la VC. 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.

Figura 24. Modelo PLS-DA de las variables VIP >1 frente al vector de regresión. El color de cada punto representa el AUC de cada variable en el estudio univariante previo.

Figura 25. Representación gráfica de las AUC.

Figura 26. Diagrama de puntuación (*scores*) y gráfico T^2 de *Hotelling* obtenido del análisis no dirigido PCA de los espectros de $^1\text{H-RNM}$ normalizados (creatinina) junto a la variable clínica significativa (PSA) de las muestras de orina de pacientes con CaP con recidiva bioquímica frente a los de sin recidiva.

Figura 27. Obtención de variables latentes tras técnica de VC *leave-one-out*, teniendo en cuenta 117 variables y el PSA.

Figura 28. Representaciones gráficas obtenidas del modelo PLS-DA de los 117 metabolitos junto al PSA, que discrimina entre las muestras de orina de CaP que no recidivan de las que sí recidivan.

Figura 29. Curvas ROC estimadas con el modelo PLS-DA de los 117 metabolitos junto al PSA, que discrimina entre las muestras de orina de CaP que no recidivan de las que sí recidivan. La línea azul corresponde a los datos estimados y la línea verde, a la VC. 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.

Figura 30. Modelo PLS-DA con los VIP scores de los 117 metabolitos y el PSA. El color de cada punto representa el AUC de cada variable en el estudio univariante previo.

Figura 31. Obtención de variables latentes tras técnica de VC *leave-one-out*, teniendo en cuenta 35 variables con $VIP > 1$, incluyendo al PSA.

Figura 32. Representaciones gráficas obtenidas del modelo PLS-DA de las 35 variables con $VIP > 1$, incluyendo al PSA, que discrimina entre las muestras de orina de CaP que no recidivan de las que sí recidivan.

Figura 33. Curvas ROC estimadas con el modelo PLS-DA de las 35 variables con $VIP > 1$, incluyendo al PSA, que discrimina entre las muestras de orina de CaP que no recidivan de las que sí recidivan. La línea azul corresponde a los datos estimados y la línea naranja, a la VC. 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.

Figura 34. Modelo PLS-DA con los nuevos VIP scores de las 35 variables con $VIP > 1$, incluyendo al PSA. El color de cada punto representa el AUC de cada variable en el estudio univariante previo.

Figura 35. Resultado de ambos modelos discriminantes optimizados ($VIP > 1$) con (35 variables) y sin PSA (45 variables), donde se aprecia que comparten 32 metabolitos en común.

Índice de tablas

Tabla 1: Indicadores de incidencia estimada de CaP en la CVa.

Tabla 2: Principales metodologías de análisis utilizados en metabolómica.

Tabla 3: Clasificación TNM del CaP: Tumor primario (*solamente para ADCP*).

Tabla 4: Clasificación del grado histológico del CaP según reunión ISUP 2014.

Tabla 5: Criterios de D'Amico de riesgo de recurrencia bioquímica de CaP.

Tabla 6: Análisis univariante. Diferencias entre las variables clínicas estudiadas (pacientes con y sin recurrencia bioquímica de CaP).

Tabla 7: Componentes relevantes tras análisis *fold change*.

Tabla 8: Metabolitos relevantes tras Análisis Univariante (Wilcoxon).

Tabla 9: Resultado del estudio univariante de las concentraciones de metabolitos en orina previa a la intervención quirúrgica, de pacientes con CaP que recurren frente a los que no recurren.

Tabla 10: Resultado a partir de tablas de confusión calculadas por CV.

Tabla 11: Resultado del análisis de rutas metabólicas.

Tabla 12: Resultado a partir de tablas de confusión calculadas por CV.

Capítulo 1

Introducción

Epidemiología del Cáncer de Próstata

En la actualidad, la relevancia clínica del cáncer de próstata (CaP) está determinada por su gran impacto sanitario, económico y social. En este sentido, su importancia en salud pública se cuantifica al observar los datos epidemiológicos que indican que se trata de la neoplasia sólida no cutánea más frecuente en el varón y la tercera causa de muerte por cáncer, después del pulmonar y el colorrectal (4) (figura 1). A nivel mundial, se estima una prevalencia de cáncer a 5 años del diagnóstico de más de 44 millones, siendo los cánceres más prevalentes el cáncer de mama (7.790.717 (17,7%)), el cáncer colorrectal (5.253.335 (11,9%)) y el CaP (4.956.901 (11,2%)); en España dicha prevalencia se cifra en 259.788 para el año 2020 (5).

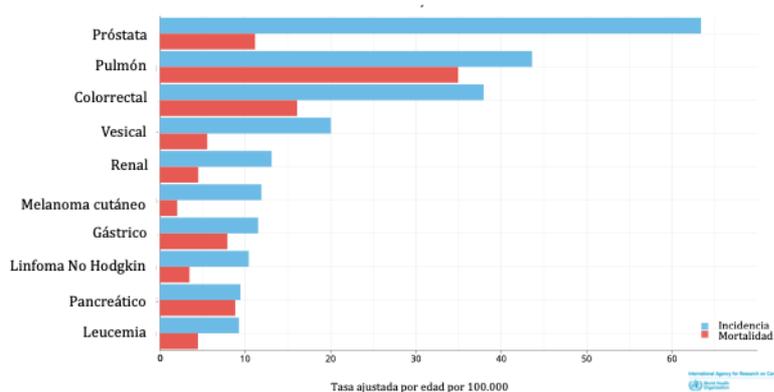


Figura 1: Tasas estimadas de incidencia y mortalidad de cáncer ajustadas por edad en la población Unión Europea, 2021 (por 100.000 habitantes).

Fuente: Globocan (<http://gco.iarc.fr>).

Aunque a nivel mundial el CaP es el segundo cáncer más diagnosticado en los hombres, en Europa y España es el primero en número de diagnósticos (470.000 en Europa en 2020 y 35.764 en España en 2021 (3,4). Se estima según la ECIS (*European Cancer Information System*) que, en los países de la U.E. en 2020, el CaP representó el 23,2% de todos los nuevos casos de cáncer (excluidos los cánceres de piel no melanoma) diagnosticados en hombres y el 9,9 % de todas las muertes debidas al cáncer en hombres (<https://ecis.jrc.ec.europa.eu>) (figura 2).

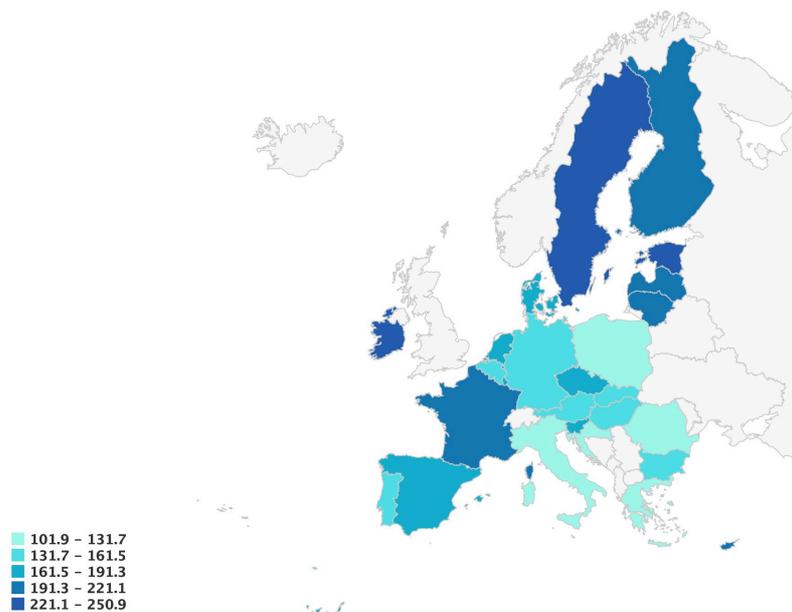


Figura 2: Incidencia estimada de los países de la Unión Europea (por 100.000 hab).
Fuente: Asociación Española Contra el Cáncer (www.epdata.es).

Según el primer registro nacional de CaP basado en un estudio epidemiológico, no intervencionista, no ligado a fármaco, de estimación de la incidencia del CaP en España realizado en 2010 por la Asociación Española de Urología (AEU), calculada por estimación directa en registros hospitalarios que cubren en su conjunto una proporción muy considerable de la población masculina del país (21.8%), existían 19.107 (18.713-19.504) casos nuevos anuales en la sanidad pública, 82,27 casos por 100.000 varones (6).

En España, al igual que en otros países occidentales, la incidencia aumentó desde principios de los años 90 a causa de la generalización de la determinación sérica del antígeno prostático específico (PSA) (7). Se estima que en España la tasa de incidencia ajustada a la población estándar europea pasó de 54,1 por 100.000 en el periodo 1993-97 a 96,4 en el periodo 2003-07. En este último, las tasas de incidencia ajustadas a la población mundial estándar variaron entre 44,1 por 100.000 en Granada y 73,8 por 100.000 en el País Vasco (8), siendo las diferencias un reflejo del diferente grado de utilización de la determinación sérica del PSA más que a diferencias reales en la incidencia (figura 3).



Figura 3: Evolución de los nuevos casos de CaP cada año en España.

Fuente: Asociación Española Contra el Cáncer (www.epdata.es).

En la Comunidad Valenciana (CVa) la incidencia estimada de cáncer realizada por el Sistema de Información Oncológico (SIO) para la población masculina de la CVa en el año 2010 establece que los tumores malignos más frecuentes son el de próstata con una tasa ajustada para población europea de 92,2 por 100.000 hombres, el de tráquea-bronquios y pulmón con una tasa ajustada de 64,3, el de vejiga con una tasa ajustada de 56,1 y el de colon/recto con una tasa ajustada de 60,4 (Tabla 1).

Tabla 1: Indicadores de incidencia estimada de CaP en la CVa.

Elaboración: Servicio de Estudios Epidemiológicos y Estadísticas Sanitarias.
Dirección General de Salud Pública.

Fuente: SIO Altas 2010.

-Tasas Bruta (TsB) y Ajustadas (TsAj) por 100.000 habitantes

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

Número Casos	TsB	TsA(%) 0-74 años	TsAj (P. Europea)	IC _{95%}	TsAj (P. Mundial)	IC _{95%}
2.859	112,4	8,3	92,2	(88,8; 95,6)	61,8	(59,4; 64,2)

Dos tipos de factores han sido involucrados en las tendencias temporales de la incidencia y la mortalidad del CaP. Por un lado, un incremento real debido a una mayor exposición a uno o más factores de riesgo. Por otro lado, este incremento en la detección de tumores existentes obedece al aumento de la determinación sérica del PSA (9) y de los procedimientos quirúrgicos como la resección transuretral de próstata (RTUP).

La supervivencia relativa a 5 años de los pacientes diagnosticados en el periodo 2003-2007 fue de 84,6%, la más elevada entre los tumores más prevalentes (10). En el periodo 1995-1999 fue de 75,4% (base de datos EUROCORE) (11). Este incremento de 8,2 puntos es el más elevado entre los tumores más frecuentes y, al menos en su mayor parte, es debido a la inclusión de una gran proporción de tumores de buen pronóstico en la casuística de la incidencia como consecuencia de la determinación indiscriminada del PSA y el consiguiente diagnóstico precoz, que anteriormente no se detectaban, elevando artificialmente los valores de esta supervivencia (12). Debido a esta misma razón, este es el cáncer que presenta una prevalencia más elevada en hombres, siendo la estimación para 2012 de casos diagnosticados en los últimos 5 años de 527,3 por cada 100.000 hombres. En números absolutos esto representó más de 102.000 hombres (13).

Biomarcadores del Cáncer de Próstata

Un biomarcador (BM) es una característica que es objetivamente medible y evaluable como indicador de un proceso biológico normal, procesos patogénicos o de respuesta terapéutica a un fármaco o intervención externa. El término BM es una abreviatura de marcador biomolecular y en el campo de la oncología, son aquellos producidos por el propio tumor o por el cuerpo en respuesta al tumor (14).

La evolución hacia un CaP clínicamente significativo es poco conocido, si bien se considera un proceso multifactorial. La edad avanzada presenta una fuerte relación con el CaP, con un aumento de la incidencia a partir de los 50 años, y constituye su principal factor de riesgo. Otros factores admitidos son el antecedente familiar de CaP y la raza negra (15,16), mientras que en la actualidad son controvertidos, el efecto de la actividad física, la actividad sexual, la exposición al cadmio, el hábito tabáquico, el consumo de alcohol, la dieta rica en grasas saturadas de origen animal y el consumo de carne roja (17).

Estudios recientes señalan la importancia de la base genética de la enfermedad, que condiciona tanto la susceptibilidad a la misma como la agresividad clínica (18). El CaP es una enfermedad genéticamente compleja, con múltiples factores determinantes que no sólo atañen a la presentación de la enfermedad sino también a su progresión y resultado terapéutico (19). Aproximadamente el 10% de CaP son hereditarios, asociados a una edad de aparición menor de 50 años, y si bien no se ha identificado un gen específico de susceptibilidad (18,20-24), se han observado, por ejemplo, mutaciones de los genes BRCA1/ BCRA2 (aumento de riesgo de cáncer de mama masculino, páncreas y próstata) y de los genes p53 y CHEK2 (síndrome de *Li-Fraumeni*) (25).

El aumento de las tasas de incidencia de CaP y el aumento de la esperanza de vida de la población actual pueden dar lugar a un número creciente de pacientes con CaP en riesgo de recurrencia bioquímica (rBQ), definido como aumento de las cifras de PSA tras PTR (el umbral que mejor predice la aparición de futuras metástasis es un PSA >0,4 ng/mL), con intervalos más largos de seguimiento y posterior muerte por CaP. Después de la prostatectomía radical (PTR), aproximadamente el 15-45% de los pacientes experimentan rBQ (26). La mayoría de ellas ocurren durante los primeros 5 años después de la PTR en pacientes sin tratamiento neoadyuvante o adyuvante (27). Sin embargo, incluso después de diez años de supervivencia libre de recurrencia, los pacientes todavía están en riesgo de rBQ.

Los intentos de predecir la rBQ después de la PTR a partir de la información clínica, de laboratorio y radiológica obtenida antes de la cirugía es un hecho desde hace décadas, reconociendo inicialmente que el grado de Gleason de la biopsia y el PSA inicial eran fuertes predictores de supervivencia libre de enfermedad después de la cirugía (28). El sistema de puntuación de CAPRA (*Cancer of the Prostate Risk Assessment*) combina PSA, suma de Gleason, estadio clínico del tumor, porcentaje de biopsias positivas y edad del paciente, también se ha aplicado a la predicción de rBQ, pero solo ha producido un área bajo la curva (AUC) de 0.78-0.81 (29). Una revisión sistemática confirmó la capacidad de este sistema de puntuación para predecir correctamente la supervivencia libre de recurrencia bioquímica a los 3 años después de la PTR, sin embargo, infraestimaba dicha supervivencia a 5 años (28).

Limitaciones del PSA

El PSA es un BM de diagnóstico, extensión y monitorización del CaP pero no de agresividad tumoral. Aunque su determinación sérica sigue siendo la herramienta más utilizada para la detección de CaP, su aplicación no está exenta de un número considerable de problemas como la baja especificidad, incapacidad para establecer un punto de corte por debajo del cual el riesgo de cáncer sea mínimo, y, sobre todo, el elevado número de CaP clínicamente insignificante diagnosticados y tratados que, de no haberlo hecho, no hubiera supuesto una mayor morbi-mortalidad del paciente.

Actualmente, no existe evidencia científica que demuestre que la determinación del PSA reduzca la mortalidad específica de pacientes sometidos a *screening* o diagnóstico precoz frente a varones control. En 2009, 2 estudios epidemiológicos fracasaron en dar respuesta a esta cuestión, uno norteamericano (PLCO, Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening *Trial*) (30) y otro europeo (ERSPC, *European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer*) (31). En consecuencia, la agencia que establece las políticas de medicina preventiva en los EE. UU. (*U.S. Preventive Services Task Force*) ha publicado una recomendación desaconsejando llevar a cabo el cribado del CaP basado en la determinación sérica del PSA (32).

El CaP localizado de baja agresividad presenta una tasa muy baja de progresión y mortalidad (33); sin tratamiento, el 95% de los pacientes fallecen por causas distintas al CaP y solo una minoría lo hacen por su enfermedad (34,35). El hecho de que PSA no sea capaz de diferenciar entre cánceres poco agresivos de los que sí lo son y que diagnosticar un cáncer de baja agresividad no equivale a ausencia completa de riesgo, hace que un 90% de pacientes opten por tratarse con cirugía o radioterapia, tratamientos no exentos de riesgo y cuyos efectos secundarios impactan negativamente sobre la calidad de vida (36).

La especificidad del PSA es subóptima y, como resultado de ello, alrededor del 75% de los hombres que se someten a una biopsia transrectal de próstata (BxP) porque tienen valores de PSA entre 4 y 10 ng/mL no padecen CaP. Uno de los desafíos decisivos consiste en discriminar entre hiperplasia benigna de próstata (HBP) y CaP. Por este motivo se desarrollaron nuevas fórmulas, basadas todas ellas en la cuantificación sérica de PSA, que en definitiva pretendían incrementar su especificidad con el objetivo de reducir el número de biopsias negativas para CaP, manteniendo una tasa de detección (sensibilidad) similar. Las principales son la densidad de PSA (PSAD), velocidad de PSA (PSAV) y las formas moleculares de PSA (α 1-antiquimotripsina (α 1ACT), que forma complejos PSA: α 1ACT, y la α 2-macroglobulina (α 2M), que forma complejos PSA: α 2M).

En este contexto, también se examinó la viabilidad de la estratificación del riesgo preoperatorio para la rBQ precoz mediante la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) para transcritos del PSA y el antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) en biopsias preoperatorias de médula ósea y muestras de sangre periférica, concluyendo que en CaP clínicamente localizada, la RT-PCR combinada de PSA/PSMA es un predictor independiente del tiempo hasta la rBQ después de la PTR (37).

Ausencia de biomarcadores de agresividad

Para abordar el problema del sobret ratamiento del CaP de bajo riesgo, se llevan a cabo programas de seguimiento activo con el objetivo de mantener a los pacientes sin tratamiento o bien diferirlo hasta que sea preciso, sin perder la ventana de curación (38).

La ausencia de BM de agresividad recomendados para la práctica clínica habitual obliga a realizar BxP repetidas para monitorizar si la enfermedad permanece estable o bien si progresa a un fenotipo más agresivo, lo que ocurre entre el 30-50% de los casos. Por otra parte, un BM de agresividad tumoral identificaría a pacientes con factores adversos que pudieran beneficiarse de un tratamiento adyuvante.

Por todo ello, es prioritario disponer de un BM que ayude a esclarecer las controversias en el manejo clínico del CaP. Se persiguen factores moleculares independientes del PSA, estadio clínico y del Gleason, que permitan una detección precoz y una mejor estratificación pronóstica de los CaP y, por tanto, una optimización de los posibles tratamientos. Especialmente, serían de utilidad aquellos que posibiliten y mejoren el diagnóstico precoz de tumores agresivos, y además lo hagan a partir de muestras biológicas obtenidas mediante procedimientos poco invasivos. En este sentido, la naturaleza de la orina la hace idónea para determinar tumores del tracto urinario, incluido el CaP, por lo que a priori constituye un candidato casi perfecto para el descubrimiento de nuevos BM y el desarrollo de pruebas para determinarlos e incorporarlos en la rutina clínica (39).

Biomarcadores del CaP en orina

La búsqueda de BM constituye una prioridad de investigación en el CaP cuyo objetivo es mejorar la detección, reducir el número de biopsias y fenotipar la agresividad tumoral (40). Esta búsqueda se ha intensificado, como decíamos con anterioridad, tras el posicionamiento de la *U. S. Preventive Services Task Force* en contra del uso del PSA como BM de cribado del CaP. Ante esta situación, se utilizan calculadoras de riesgos basadas en modelos predictivos de agresividad tumoral integrando la información del PSA, volumen prostático y resultado de BxP previa como la propuesta por la ERSPC (41).

En una revisión bibliográfica realizada por el grupo de Tosoain (42) y otra de la Fundación IVO (43), se actualiza los principales BM en orina tanto de diagnóstico como de pronóstico del CaP. No obstante, la necesidad de un tacto rectal previo, exploración tremendamente subjetiva entre los clínicos, y la naturaleza focal del CaP, pueden ser motivo de una elevada tasa de falsos negativos y, por tanto, la sensibilidad de las determinaciones “urinarias” serían inaceptablemente bajas hoy en día. Por este motivo, todavía no disponemos de ningún BM urinario que se pueda ofrecer a la población general en el diagnóstico del CaP, ni tampoco en la monitorización tras la cirugía para la vigilancia de rBQ (44).

ARN mensajeros

Los ARN mensajeros (ARNm) probablemente estén entre los BM del CaP más estudiados y reflejan con gran sensibilidad y precisión el estado funcional de la célula. Su determinación mediante técnicas de alto rendimiento como los *microarrays* de expresión y la PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), y más recientemente, la secuenciación masiva o *Next Generation Sequencing* (NGS), han hecho que se obtenga abundante información respecto a la expresión de multitud de genes que permite dirigir la búsqueda de nuevos BM en la dirección de procesos celulares muy relacionados con el cáncer (ciclo celular, apoptosis, ...) y su progresión (45).

PCA3

El gen $DD3^{PCA3}$ (abreviado como PCA3 en la literatura) es un ARN no codificante situado en el locus 9q21-22, que se expresa específicamente en las células prostáticas y se encuentra fuertemente expresado en más del 95% de los CaP, y a diferencia del PSA, no se encuentra alterado en HBP ni en prostatitis (46). Es necesario realizar un tacto rectal previo con la finalidad de que precipiten cuantas más células prostáticas posibles. Se ha utilizado para determinar la necesidad de una biopsia ante la sospecha de CaP (47-49) o como marcador pronóstico de agresividad biológica (50,51). Finalmente, basado en la literatura, los varones con $PCA3 < 20$ pueden obviar la repetición de una biopsia de próstata, con menos de un 20% de posibilidades de que desarrollen un cáncer posteriormente y aún menos de encontrar un CaP de alto grado (42).

TMPRSS2-ERG

Este gen de fusión implica a *TMPRSS2* y *ERG* (T2E), está presente en aproximadamente el 50% de los tumores prostáticos. Inicialmente, mostró gran expectación por su elevada especificidad, detectable por qRT-PCR y por FISH principalmente en muestras tisulares (52,53) y células tumorales circulantes (54) y orina (55). Sin embargo, sus implicaciones pronósticas actualmente están en controversia, pues a pesar de que la expresión de *ERG* se correlaciona con un mayor estadio tumoral, no demuestra una relación con la puntuación de Gleason, la supervivencia o la recaída bioquímica (56).

En este sentido, se ha propuesto la combinación de PCA3 y T2E para añadir un mayor valor predictivo a la calculadora de riesgo ERSPC, reduciendo considerablemente el porcentaje de biopsia prostática (57).

miARN

Los micro-ARN (miARN) son pequeñas moléculas (19-23 nucleótidos) de ARN no codificante de cadena sencilla, a las que se atribuyen numerosas funciones en la modulación de la expresión génica impidiendo su traducción (58). Las mutaciones o alteraciones epigenéticas en la región codificante o fallos de su procesamiento pueden afectar la expresión de los miARN. En la actualidad, a pesar de la posibilidad de su detección en la orina, existe una excesiva variabilidad de los miARN detectados y una falta de concordancia entre las publicaciones, lo que puede deberse a la heterogeneidad de las muestras urinarias, al pequeño número de paciente incluidos en los estudios y a las complejas redes regulatorias generadas por estas moléculas (43).

Alteraciones epigenéticas

La epigenética es el conjunto de cambios en el ADN que no alteran su estructura primaria, pero con impacto en la regulación de la expresión génica (59). La principal alteración epigenética implicada en el cáncer es la metilación en regiones ricas en citosina y guanina (islas CpG) de la región promotora de determinados genes, lo que causa un silenciamiento de estos.

En CaP se han detectado numerosos genes hipermetilados entre los que se incluyen GSTP-1, NKX-5, CLSTN-1, SPOCK2, SLC16A12, DPYS y NS1 (60), siendo la hipermetilación de GSTP-1 uno de los eventos genéticos iniciadores de la carcinogénesis del CaP y, por tanto, un posible BM en el diagnóstico temprano en muestras tisulares, como los obtenidos en la BxP (61). La traslación de estos mismos resultados en orina sugiere a la hipermetilación de GSTP-1 como un futuro BM en el CaP.

Proteómica

La proteómica estudia globalmente la estructura y función de proteínas haciendo uso de técnicas de alto rendimiento. Determina el perfil proteico diferencial entre distintas condiciones, generalmente CaP y muestras de sujetos sanos para el diagnóstico, o bien otras condiciones de interés pronóstico, por ejemplo, metástasis (62).

En resumen, en el contexto de CaP encontramos resultados publicados tras la determinación de anexina (63) o la metaloproteína MMP-9 (64,65) que han mostrado un valor predictivo independiente en el diagnóstico de CaP. No obstante, una sola proteína no capta toda la complejidad tumoral, de modo que enfoques más orientados a la identificación de paneles de BM aportarán una visión más precisa que soporte el manejo clínico del CaP (43).

Exosomas

Los exosomas (66) son vesículas extracelulares de pequeño tamaño (30-100 nm) implicadas en la comunicación intracelular, por lo que constituyen una excelente fuente de ARN específico y proteínas que nos puede dar una idea del devenir de las células tumorales. Todas las células secretan exosomas, aunque ciertos autores no pudieron aislar estas vesículas en pacientes sometidos a terapia de privación androgénica (67). Entre los resultados publicados, las proteínas exosomales TTGA3 e ITGB1, han sido propuestas como posibles BM en la detección de tumores metastásicos (68).

Metabolómica

La metabolómica es una herramienta de investigación emergente de gran potencial que se integra en la biología de sistemas. Estudia de forma sistemática las concentraciones y flujos del conjunto de metabolitos de pequeño peso molecular (<1.500 Da) generados por procesos celulares bajo unas circunstancias específicas (69). La información proporcionada da lugar al término *metaboloma* entendido como el conjunto de dichos metabolitos presentes en un fluido biológico, célula, tejido u órgano del organismo, bajo unas condiciones fisiológicas determinadas, reflejo de los procesos biológicos (70). Los metabolitos son el resultado final de los genes y reflejan el comportamiento celular de una forma más directa (figura 4).

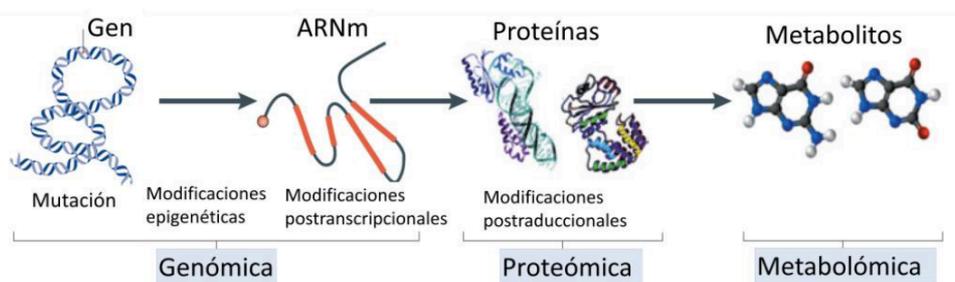


Figura 4: Cascada Ómica. Genes y proteínas están sujetos a mutación, procesos de regulación epigenética y modificaciones post-traduccionales, respectivamente. Los metabolitos representan los productos finales de la cascada, los cuales están más cercanos al fenotipo (1).

Se estima que el número de metabolitos que contiene el cuerpo humano, excluyendo las moléculas lipídicas, oscila entre 2500-6000. Este número se espera que cambie con el desarrollo de tecnologías de detección de metabolitos con más sensibilidad y más detalladas, aun así, es mucho menor que el número de genes (>30.000), ARN (>10⁵) o proteínas (>10⁶) que existen en el cuerpo humano (71).

En contraste con la genómica y la proteómica, la metabolómica aporta una información dinámica que refleja influencias del medio ambiente, de las alteraciones genómicas que condicionan la patogénesis y la progresión tumoral, y los escenarios patológicos en que viven las células en el momento de la recogida de las muestras. Es más, a diferencia de una proteína o de un transcrito, un metabolito es igual en todos los organismos (72).

Las dos plataformas tecnológicas más utilizadas para identificar y cuantificar metabolitos son: la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (MS), esta última casi siempre acoplada a otras técnicas de separación como la cromatografía líquida (LC-MS), la cromatografía de gases (GC-MS), o en menor medida, la electroforesis capilar (CE-MS). Los datos obtenidos son complejos y requieren de la quimiometría y métodos bio-informáticos para su correcta interpretación. El objetivo es lograr una huella bioquímica con valor diagnóstico, para posteriormente, identificar las sustancias que puedan ser utilizadas como potenciales BM que definan el contexto biológico o clínico y puedan ayudar a explicar los mecanismos relacionados con el daño tisular o la enfermedad.

Mediante el análisis comparativo de cambios en los perfiles de concentración de los metabolitos, los investigadores pueden identificar BM asociados a diferentes tipos de procesos biológicos, como enfermedades, reacciones a fármacos o respuesta dinámicas a estrés ambiental. En definitiva, el perfil metabólico refleja el estado fenotípico de un organismo de forma dinámica y ofrece una aproximación a los procesos finales reales en la cascada biológica (73).

En este sentido, la metabolómica es una herramienta muy útil en el estudio de determinadas patologías médicas, al identificar y caracterizar metabolitos tras el procesamiento de señales espectrales de muestras provenientes mayoritariamente de bio-fluidos o de tejidos de biopsias. Los avances en las técnicas bioquímicas al igual que en los métodos de análisis de datos, permitirán posteriormente su interpretación biológica. Así encontramos su aplicación en oncología traslacional en diversas neoplasias como el caso del cáncer de mama, próstata, colorrectal, pancreático, hepatobiliar, gástrico y cerebral (74).

Metabolómica en el Cáncer de Próstata

La evidencia científica apoya especialmente el uso de la metabolómica en la investigación de BM en el CaP frente a otras ciencias ómicas por diversos motivos, entre los que destacan el que el metabolismo intermediario de la próstata es único y diferente al del resto de células del organismo, que los cambios en las vías de señalización metabólica reflejan los cambios fenotípicos y funcionales de las células malignas (75) precediendo a su transformación neoplásica, y por último, que dichos cambios se visualizan *in vivo* mediante técnicas de imagen.

La presencia de elevadas concentraciones de zinc (Zn) en la próstata normal favorece la síntesis de citrato sobre su consumo al no completarse el ciclo de Krebs por la inhibición de la enzima *m-aconitasa* (figura 5). De tal forma que, a diferencia del resto de células del organismo, la próstata normal contiene concentraciones de citrato 20-70 veces superiores al plasma y en el fluido prostático 400-1.500 veces (40,76). Este bajo consumo de citrato provoca una situación de ineficiencia bioenergética.

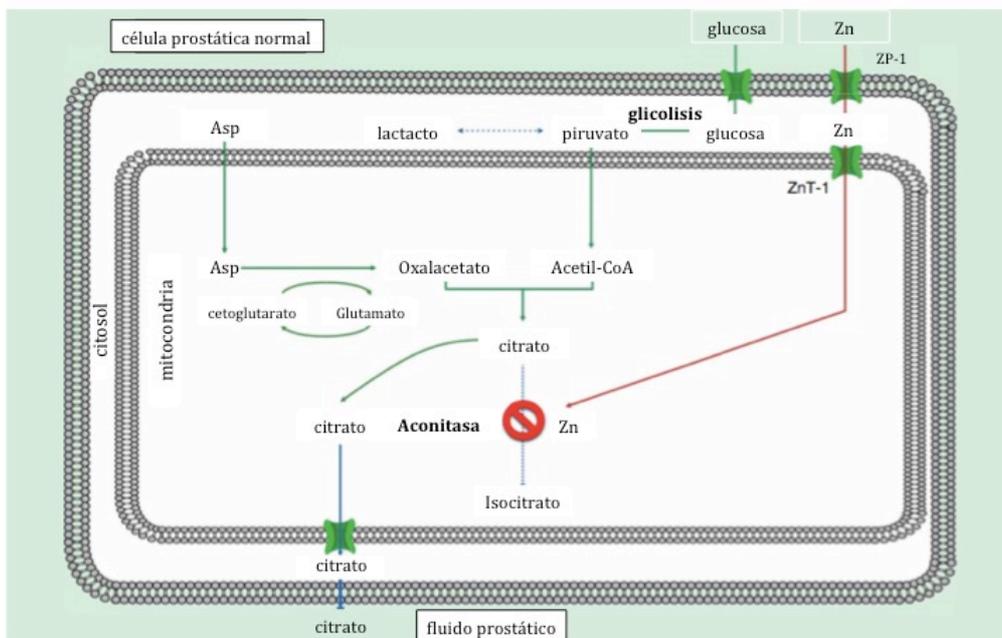


Figura 5: Producción de citrato en una célula prostática normal. Adaptado de Lucarelli et al, 2015 (2).

Otra circunstancia metabólica relevante observada en las células de CaP es el aumento de la biosíntesis lipídica para la proliferación celular, la formación de membranas y la señalización celular. En particular, la lipogénesis *de novo* y la colesterogénesis que se perpetúan por la conversión en el citosol de citrato a acetil-CoA por ATP citrato liasa (figura 6).

La transformación neoplásica de las células prostáticas necesita cambios metabólicos para cubrir las necesidades sintéticas y bioenergéticas (efecto *Warburg*) (77), invirtiéndose el metabolismo para generar gran cantidad de energía y así proliferar en condiciones de estrés (reprogramación metabólica) (78). De tal forma que, los niveles de citrato en las células cancerígenas son significativamente más bajos que en las normales (79).

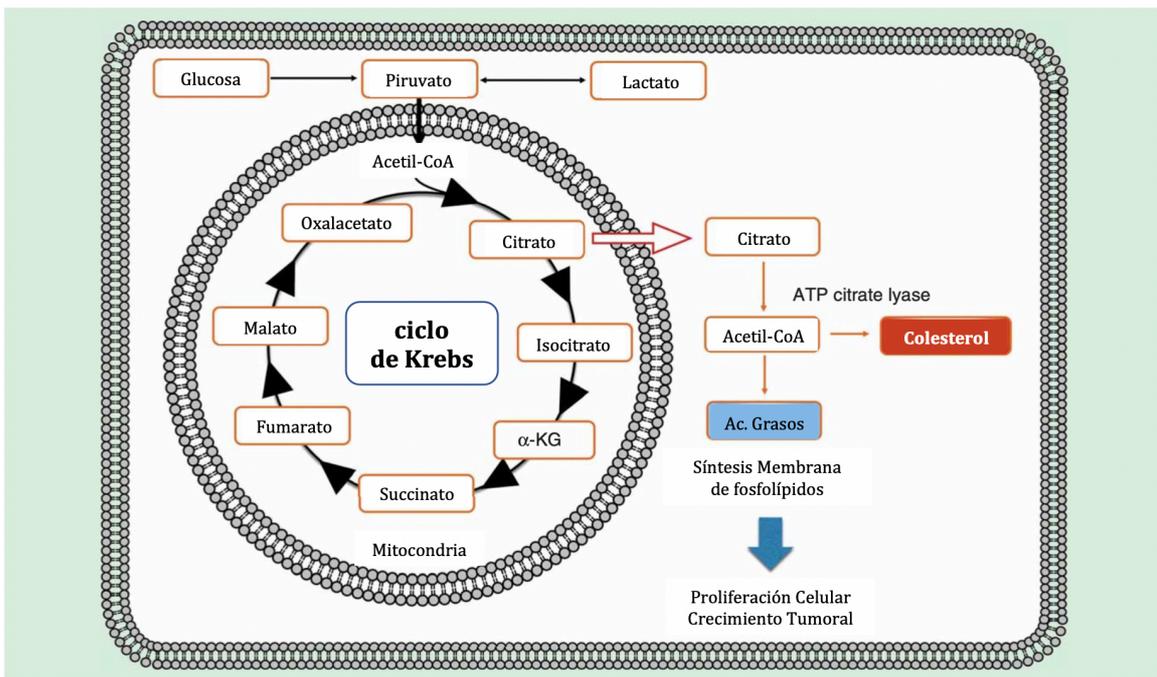


Figura 6: Lipogénesis de novo y colesterogénesis en células CaP. Adaptado de Lucarelli et al, 2015 (2).

En definitiva, si es posible detectar estas alteraciones en su fase inicial, se puede intervenir tempranamente y minimizar su proliferación y progresión. Este hecho tiene especial relevancia en el CaP por su crecimiento lento, puesto que, su detección precoz permite su completa curación. Esta es la base en la que se fundamenta la hipótesis de explorar estas transformaciones metabólicas como método de detección precoz, diagnóstico y tratamiento del CaP.

Estas alteraciones metabólicas han sido puestas de manifiesto mediante técnicas de imagen *in vivo*. La baja concentración de citrato de las células neoplásicas se asocia al aumento en los niveles de colina y creatinina. Lo relevante es que estos cambios no se producen en el tejido normal y que, a diferencia del PSA, tampoco en la HBP. Utilizando la información metabólica sobre el citrato y la colina (ratio citrato/colina) proporcionada por la espectroscopia con RMN *in vivo*, se detectan los focos de CaP y, localizando el espectro metabólico con la imagen anatómica de la RMN convencional (ambos, espectros e imagen de RMI se adquieren durante el mismo estudio, en la misma máquina), se puede dibujar un mapa intraglandular de las alteraciones metabólicas indicativas de la extensión del CaP en el paciente (80). De forma similar, encontramos la aplicación de la tomografía por emisión de positrones (PET) en el CaP por su capacidad de detectar el aumento del metabolismo de la glucosa y la colina en las células malignas mediante el trazador radioactivo ^{18}F -fluorodeoxiglucosa (^{18}F -FDG) y ^{18}F -fluorocolina (^{18}F -FCH) (3) (figura 7). El PET ofrece imágenes difusas y requiere normalmente el registro con otra técnica de imagen que proporcione un mayor detalle anatómico como el TAC (TC) o la RMI.

Diferentes metabolitos o proporciones de metabolitos han sido investigados como posibles BM de CaP. Principalmente, en estudios *in vitro* con muestras tisulares de BxP o especímenes de PTR. El CaP presenta un perfil metabólico propio consecuencia de la alteración de diferentes vías metabólicas que señalizan la transformación maligna respecto a los tejidos normales puesto de manifiesto por descenso de niveles Zn, citrato y poliaminas (espermina y putrescina), aumento de productos glicolíticos (lactato y alanina), y aumento de colina y fosfocolina resultado del aumento de síntesis de membranas y de la proliferación celular (81).

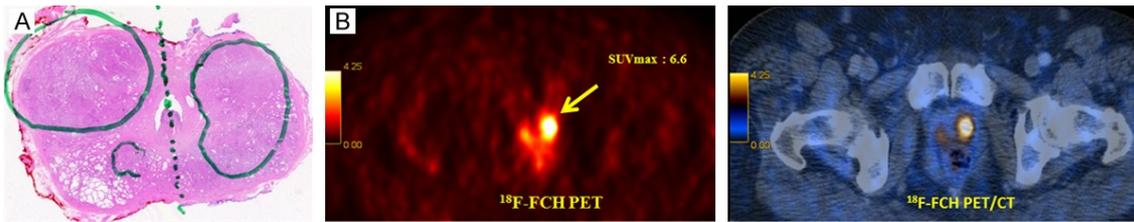


Figura 7: Aplicación de ^{18}F -FCH PET/TC en la detección de CaP.

Adaptado de Vali et al, 2015 (3).

(A) Pieza anatomopatológica: afectación neoplásica de ambos lóbulos prostáticos.

(B) ^{18}F -FCH PET/TC donde muestra la captación focal del radiotrazador en ambos lóbulos prostáticos, correlacionándose con hallazgo histopatológico.

En menor medida, se ha investigado si estas alteraciones metabólicas tisulares se reflejan en el líquido de secreción prostática y si pudieran sustituir a las matrices tisulares (82). Pero, aunque estos estudios han ayudado a incrementar el conocimiento en la biología del CaP, todavía no proporcionan una visión holística del estado neoplásico.

En resumen, debido a que las alteraciones metabólicas son el último paso de la respuesta celular frente a la enfermedad, la metabolómica tiene un papel fundamental en el descubrimiento de nuevos BM en el CaP. En este sentido, se han realizado diversos estudios para caracterizar el perfil metabólico del CaP, la mayoría en orina, plasma, fluidos prostáticos, tejidos y líneas celulares asociadas al CaP, donde se demuestran unos niveles disminuidos de citrato y poliaminas e incrementados de colina, lactato y ácidos amino (83).

Diseño del estudio metabolómico

Al igual que en otras áreas experimentales, una de las etapas más determinantes del estudio metabolómico de identificación de BM es el diseño del experimento. El objetivo del diseño es disponer de un conjunto de datos analíticos robustos y exactos, que permitan aislar las diferentes fuentes de varianza en los datos y obtener resultados estadísticamente significativos.

El diseño del estudio debe tener en cuenta todos los pasos relacionados con la recogida, preparación y almacenamiento de la muestra, la selección de la plataforma y técnica de análisis de los datos, control de calidad de la señal analítica, análisis estadístico (quimiométrico) y bioquímico para la interpretación de la información obtenida (figura 8). Del mismo modo, se debe controlar la presencia de posibles factores de confusión (p.ej. edad, sexo, raza, estilo de vida, actividad física, medicación, ...) que pudieran afectar al metaboloma. Finalmente, el diseño de un estudio en metabolómica clínica debe considerar aspectos éticos que garanticen la protección de los derechos, seguridad y bienestar de los sujetos voluntarios incluidos en él.

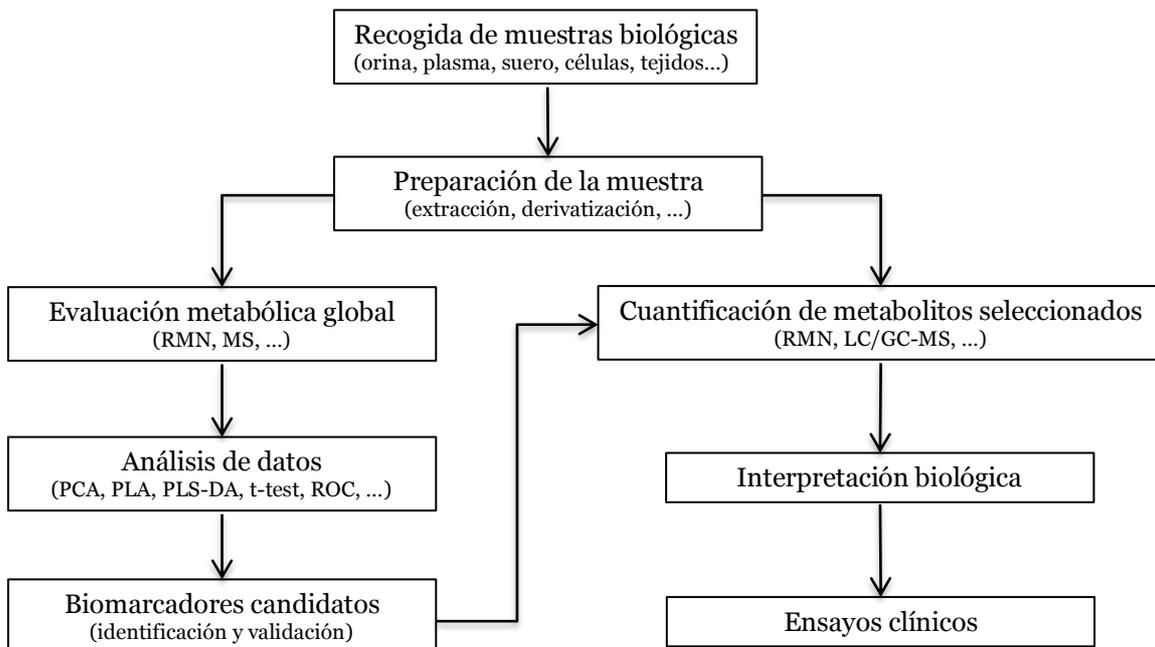


Figura 8: Diagrama de flujo del proceso de trabajo en metabolómica.

Las principales matrices biológicas utilizados en investigación clínica del cáncer son la orina, suero, plasma, células y tejidos. Todas ellas están reguladas de forma fisiológica por control homeostático, siendo sus perfiles metabólicos relativamente constantes dentro de especímenes sanos.

La orina, matriz metabólica utilizada en este estudio, es un producto final y contiene numerosos metabolitos solubles en agua generados por el metabolismo celular. La orina presenta ventajas respecto al resto, por su técnica de fácil recogida y no invasiva, su relativa estabilidad termodinámica, y su menor necesidad de preparación de la muestra. Sin embargo, la composición de las muestras de orina puede variar ampliamente entre individuos e incluso dentro del mismo individuo dependiendo del volumen urinario, agua y alimentos ingeridos y otras condiciones fisiológicas (p.ej., edad, género, peso, hábitos personales, efectos ambientales) (84,85). Uno de los estudios más relevantes, lo realizó en 2009 Sreekumar et al. (86), donde sugirió que la sarcosina (*N-metilglicina*), producto intermediario en la síntesis y degradación de la glicina, pudiera considerarse un BM urinario para el CaP, al encontrarse niveles muy elevados de este metabolito en la progresión hacia enfermedad metastásica, y no en la población sana, o al menos en concentraciones más bajas.

El plasma/suero revelan procesos endógenos como la comunicación interórgano, el metabolismo energético, inflamación y estado de enfermedad (87), y aunque está menos influido por la variación diurna u otros factores de confusión, su composición es más compleja al presentar un alto contenido proteico (88). La preparación de la muestra irá más enfocada a la precipitación de las proteínas mediante la utilización de disolventes orgánicos (acetronilo, metanol...) (89), si bien, la ultrafiltración sería un método adecuado cuando la RMN es la técnica de análisis (90). Los estudios realizados sobre esta matriz, utilizando LC-MS y ¹H-RMN, han revelado que además de encontrarse elevado el nivel de sarcosina en el CaP, se podría utilizar esta determinación para diferenciar entre alto y bajo grado tumoral (91,92), así como para la monitorización de la respuesta a tratamientos médicos (93).

Recogida de muestras biológicas

Como se ha descrito anteriormente, el estudio metabolómico debe estar estructurado para minimizar las fuentes de variación no biológicas. Así, el diseño debe describir de manera detallada las etapas de muestreo (p.ej. tiempo, instrumental analítico), alicuotado, almacenamiento de muestra y procesado. Estas etapas deben garantizar que el metabolismo se detenga de forma cuantitativa durante el procesado de la muestra, de manera que el análisis metabolómico de la muestra se pueda asociar al estado metabólico del sistema biológico en el momento de recogida de manera reproducible (94).

La recogida de muestras es una etapa crítica de cualquier estudio metabolómico. Una alteración de la composición de la matriz asociada al proceso de recogida de la muestra se reflejará en los datos analíticos obtenidos y, por consiguiente, afectará a la interpretación estadística y bioquímica. El procedimiento habitual de recogida y preparación de muestras incluye las etapas de muestreo, estabilización metabólica (*metabolic quenching*), almacenamiento y, en caso de estudios dirigidos, extracción del metabolito.

El *quenching* interrumpe el metabolismo inhibiendo enzimas endógenas, suprimiendo o reduciendo cambios en la composición de la matriz durante el proceso de recogida y preparación de la muestra. Debido a que la cinética de algunos metabolitos es extremadamente rápida, la falta o la selección de protocolos inapropiados pueden conducir a resultados sesgados (95). Por tanto, como regla general, el periodo de tiempo entre la recogida de muestra y el análisis debe ser tan corto como sea posible. Sin embargo, el análisis inmediato de las muestras es imposible en algunas ocasiones por lo que se requiere su almacenaje, que es posible gracias a que las muestras de orina humana permanecen estables más de 6 meses si se mantienen almacenadas entre -20 y -80°C (96).

Preparación de muestras biológicas

La preparación de las muestras consiste principalmente en la extracción de los metabolitos de las matrices biológicas. En general, la selección del proceso de preparación de la muestra se diseña teniendo en cuenta las características instrumentales de las diferentes plataformas analíticas, sustrayendo los componentes que puedan interferir en el análisis (94). Los metabolitos que se encuentran en bajas concentraciones requieren una concentración previa de la muestra en el procedimiento de extracción para conseguir llegar a los límites de detección de la técnica empleada en cada caso. La orina puede ser directamente analizada con diferentes técnicas analíticas con una mínima preparación de la muestra tras, por ejemplo, una centrifugación y dilución inicial de la muestra (97), debido a su escaso contenido en proteínas (98).

La detección de metabolitos relacionados con el CaP en orina se sustenta en la presencia de productos suspendidos que proceden bien, directamente de la orina o de las células prostáticas que se han desprendido (99). Desafortunadamente, la realidad es que el número de estudios es muy limitado.

Las muestras de orina se pueden recoger directamente de la primera orina tras una micción espontánea, o después de un masaje prostático, para estimular la liberación y el movimiento de los fluidos prostático y las células epiteliales en la uretra (100). Este último método de recogida podría afectar a la obtención de la muestra en sujetos individuales según el momento del día en que se recoja, desconociendo el impacto del masaje prostático sobre la muestra.

Por último, como motivación para continuar utilizando orina como matriz biológica idónea para la búsqueda de BM específicos de CaP, están los estudios con perros entrenados capaces de reconocer, olfateando la orina de los pacientes, el cáncer de pulmón, de vejiga, de mama y, más recientemente, el CaP (101). Esto indicaría la existencia de compuestos químicos en orina que podrían servir como huella metabólica del CaP. Sin embargo, estas moléculas y sus rutas metabólicas asociadas se desconocen por el momento.

Técnicas de análisis de la muestra biológica

Antes de empezar el diseño del estudio metabólico, en función de la información previa disponible acerca del problema biológico en cuestión, se puede abordar el experimento de una determinada manera u otra. Básicamente, existen dos tipos de enfoques:

- **Análisis dirigido o perfil metabólico (*metabolic profiling*):** Este tipo de análisis permite el análisis cuantitativo de un grupo de metabolitos predefinidos. La selección inicial del metabolito permite optimizar y validar todas las etapas del método analítico (toma de muestra, conservación, extracción, detección).
- **Análisis no dirigido o huella metabólica (*metabolic fingerprint*):** En este tipo de análisis, el objetivo es la detección del mayor número de metabolitos posibles presentes en la muestra biológica, obteniendo información tipo semicuantitativa. Este enfoque, se utiliza en estudios metabólicos de generación de hipótesis para, p.ej. la caracterización de fenotipos o, como en este estudio, para la identificación de patrones metabólicos característicos de la presencia o progresión de una enfermedad.

En la actualidad las técnicas más usadas son la espectroscopia por resonancia nuclear magnética (RMN) y la espectrometría de masas (MS). Ambas ofrecen información sobre un amplio rango de metabolitos en una única medición, determinando sus concentraciones sin tener que preseleccionar qué analitos determinar, y así poder ser usados para esclarecer la estructura del compuesto (102) (tabla 2). La espectroscopía de RMN es una técnica robusta, no destructiva que determina un gran número de metabolitos de forma fiable y reproducible, con una fase de preparación de muestra muy sencilla, y con un nivel de automatización muy alto. Sus principales limitaciones son, su baja sensibilidad, debido a las pequeñas diferencias de energía entre los niveles de espín nuclear que conduce a que las diferencias entre sus poblaciones sean muy reducidas, y la necesidad de un mayor volumen de muestra para el análisis.

La MS permiten analizar una gran cantidad de metabolitos con una sensibilidad muy superior a la de la RMN. Sin embargo, presenta como limitaciones la falta de estandarización de los métodos que conlleva a una variabilidad de los resultados, su poca robustez y el requerir una extensa preparación para la extracción de la matriz biológica con la consiguiente posible pérdida de ciertos compuestos en el proceso.

Tabla 2: Principales metodologías de análisis utilizados en metabolómica.

Técnicas		Ventajas	Inconvenientes
RMN	1D	Preparación mínima Adquisición rápida Altamente cuantitativo Alta reproducibilidad Posibilidad de diferentes secuencias No destructiva	Baja sensibilidad Alta superposición de picos
	2D	Identifica más metabolitos Posibilidad de información heteronuclear No destructiva	Menos cuantitativo
	HRMAS	De aplicación en tejidos intactos y células No destructiva, se puede hacer análisis posterior para identificar tejido/células	Baja sensibilidad
MS	GC-MS	Gran eficacia de separación Alta sensibilidad Bibliotecas espectrales	Preparación tediosa Limitada a componentes volátiles Análisis de datos difícil Baja reproducibilidad
	LC-MS	Detección de metabolitos Alta sensibilidad Alta selectividad	Supresión iónica Problema reproductibilidad
	CE-MS	Buena eficacia de separación	Supresión iónica Baja reproducibilidad

1D: Experimento RMN monodimensional;

2D: Experimento RMN bidimensional;

HRMAS: Espectroscopia de alta resolución por giro de ángulo mágico;

GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas;

LC-MS: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas;

CE-MS: Electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas.

Resonancia Magnética Nuclear

La RMN es una herramienta analítica importante en la determinación estructural de compuestos orgánicos, y permite la detección y cuantificación de los compuestos en una matriz biológica compleja. El núcleo más comúnmente utilizado es el protón (^1H) que está presente en la inmensa mayoría de moléculas relevantes para la vida. También se estudian otros núcleos como el ^{13}C , ^{15}N o ^{31}P solos o en combinación con el ^1H en experimentos heteronucleares. La espectroscopia por RMN se basa en el análisis de la transición entre niveles energéticos de los núcleos generados por la interacción con un campo magnético externo, siempre que dicha frecuencia coincida con la energía necesaria para dicha transición. A esta frecuencia se la denomina *frecuencia de Larmor*, y dependerá del tipo de núcleo, del entorno químico de éste, del tipo de núcleos presentes en sus cercanías y del campo magnético externo.

La respuesta a la transición entre estos niveles por la absorción de energía de radiofrecuencia (RF) puede ser detectada, amplificada y registrada en lo que sería una línea espectral o señal de resonancia, que representa un espectro de intensidad en función de la frecuencia. Los núcleos se encuentran en el seno de un campo magnético precesionando a una determinada frecuencia, y alineados con el campo magnético. Se provoca entonces sobre ellos una perturbación del campo magnético y se obtiene como decae la señal mientras los núcleos se recuperan de esa perturbación, volviendo al estado inicial bajo el efecto del campo magnético en el que están inmersos. Esa señal es la denominada FID (del inglés *free induction decay*) que es un registro de la señal en el dominio tiempo, y mediante la transformada de Fourier se obtiene el espectro, en el dominio frecuencias. De esta forma, se generan los espectros de RMN para compuestos con núcleos de momento magnético distinto de cero, entre los que se encuentran el ^1H , y otros como ^{13}C , ^{15}N y ^{31}P , ...

Principios básicos de la RMN

El análisis de espectroscopía de RMN requiere una preparación mínima de la muestra y debido a su alta reproductibilidad, naturaleza cuantitativa y amplio rango dinámico lineal se considera una técnica muy útil. Además, su condición no destructiva permite observar la dinámica de los metabolitos en la matriz biológica y almacenarlos para futuros análisis, o realizar análisis complementarios sobre la misma muestra. Sin embargo, los mayores obstáculos en el uso de la espectroscopía RMN en metabolómica son la baja sensibilidad (límite de detección 1-5 μM), el coste del material y la falta de automatización en la identificación de los metabolitos a través de base de datos relevantes.

La técnica se fundamenta en que los núcleos atómicos son capaces de absorber radiaciones de una determinada frecuencia en presencia de un campo magnético (300-800 MHz). En este sentido, sólo es posible estudiar aquellos núcleos atómicos con un número impar de protones y/o neutrones, es decir, magnéticamente activos por poseer, al igual que los electrones, espín por su carga positiva y un movimiento de rotación sobre un eje que hace que se comporten como pequeños imanes (103). Dentro de una molécula existen una diversidad de núcleos del mismo átomo o de diferentes átomos.

Los metabolitos son moléculas de bajo peso molecular, y presentan normalmente en el espectro de RMN diferentes picos, que provienen de los diversos núcleos, normalmente ^1H con diferente entorno químico. Estos picos se identifican (asignación de un espectro) mediante los desplazamientos químicos (posición de los diferentes picos según su frecuencia), multiplicidad de picos (desdoblamiento de las señales por interacción con otros núcleos vecinos), la integral (relacionada con la cantidad de núcleos que hay) y la constante de acoplamiento (distancia en hercios entre los picos que se han desdoblado), siendo muy difícil encontrar dos compuestos con las mencionadas características idénticas (69).

En ausencia de un campo magnético, los espines nucleares se orientan al azar (figura 9a). En cambio, cuando una muestra se coloca en el seno de un campo magnético (B_0), los núcleos con espín positivo se orientan la misma dirección del campo magnético, en un estado de mínima energía (espín α), mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del pulso de energía, en un estado de mayor energía (espín β) (figura 9b). Existen más núcleos en el estado α que en el β , y esta diferencia de energía establece las bases de la espectroscopia de RMN, dependiendo de la fuerza del B_0 aplicado. Cuanto mayor sea el campo magnético, mayor diferencia energética habrá entre los dos estados de espines y, por tanto, mayor resolución de la señal del espectro (figura 9c).

Tras la preparación de la matriz biológica a estudio, habitualmente como una solución uniforme en el interior de un tubo de cristal, se introduce en un campo electromagnético estático y constante mientras es irradiada brevemente por un pulso intenso de RF. En este momento, al alcanzar la frecuencia de resonancia, los núcleos en el estado de espín α tienden a ir al estado β . Cuando cesa la irradiación, los núcleos se relajan y vuelven a su estado inicial de equilibrio emitiendo ondas de RF, cuyos parámetros depende de las diferencias de energía (ΔE) entre los estados de espín α y β .

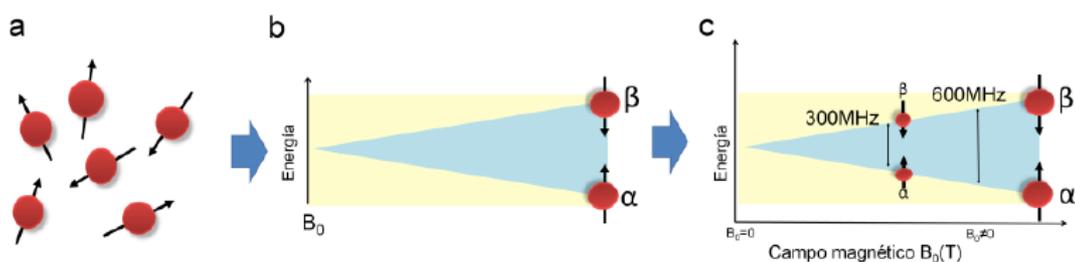


Figura 9: Principios básicos de la RMN (1).

(a) espines orientados al azar.

(b) muestras bajo un campo magnético (B_0), núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección que el campo magnético (espín α), núcleos con espín negativo se orienta en dirección opuesta a la del campo magnético, en un estado de mayor energía (espín β).

(c) dos estados de espín tienen la misma energía cuando el campo externo es cero, pero divergen a medida que el campo magnético aumenta; a mayor intensidad de campo, mayor separación energética entre los dos estados.

Esa señal de RF es en el dominio del tiempo, es decir, la intensidad de esta frecuencia disminuye por unidad de tiempo a medida que todos los núcleos vuelven a su estado inicial; se denomina señal de decaimiento libre de inducción (FID, *Free Induction Decay*), la cual proporciona información sobre la muestra irradiada. Esta señal es captada y posteriormente procesada por un ordenador que, mediante una transformación matemática, denominada transformada de Fourier, expresa la señal en intensidad respecto frecuencia (dominio de frecuencias), obteniendo así el espectro común de RMN (104) (figura 10). El área de cada pico en el espectro, denominada *integral*, es proporcional a la concentración de protones que conforman esa señal, lo que hace de la RMN una técnica analítica especialmente apropiada en metabolómica.

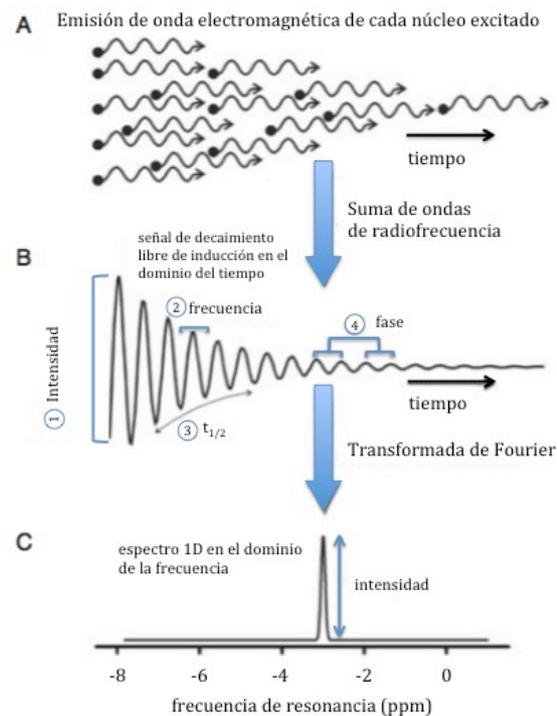


Figura 10: Transformación de las señales de decaimiento en un espectro monodimensional (1D).

Adaptación de Bothwell et al 2011 (1).

(A) núcleos (puntos negros) que han sido excitados a un estado de espín superior, los cuales se relajaran de nuevo con el tiempo (eje X) a un estado de menor energía a través de la emisión de fotones de radiación electromagnética (líneas onduladas).

(B) cuando estos fotones de radiación electromagnética son agregados a un conjunto de átomos de relajación, el decaimiento de la intensidad de señal emitida de la radiación electromagnética en el tiempo producirá la FID.

(C) transformación gráfica de intensidad del dominio del tiempo al de frecuencia.

Los núcleos de ^1H que forman las moléculas orgánicas, no se encuentran aislados, sino que están rodeados de electrones que se mueven generando un pequeño campo magnético inducido que se opone y protege parcialmente del campo magnético exterior al que se ven sometidos. El resultado de este hecho es que el campo magnético que realmente llega al núcleo es más débil que el campo externo, por tanto, se dice que el núcleo está protegido o “apantallado”. Este apantallamiento es muy importante desde el punto de vista experimental ya que el campo magnético efectivo que siente un protón dentro de una molécula es siempre menor que el campo externo y, por tanto, para que el núcleo entre en resonancia dicho campo externo debe ser mayor.

Si todos los ^1H de una molécula orgánica estuvieran apantallados de igual forma, todos entrarían en resonancia con la misma combinación de frecuencia y campo magnético. Sin embargo, los ^1H se hallan dentro de entornos electrónicos diferentes y, por tanto, se encuentran protegidos o apantallados de manera diferente. Por lo general, los efectos de protección de las nubes electrónicas que rodean a cada protón son diferentes, lo que provoca diferentes frecuencias de emisión. El resultado es un espectro de diversas frecuencias donde cada conjunto de núcleos específicos (cada grupo funcional) da origen a una señal única de RMN. Cada molécula está compuesta por protones que están en diferentes grupos funcionales. Así pues, un espectro de RMN es una gráfica de intensidad de señal en función de la frecuencia de la energía electromagnética que liberan los diversos núcleos de las moléculas de una muestra. Las variaciones en las frecuencias de absorción, que tienen lugar debido al distinto apantallamiento de los núcleos, reciben el nombre de *desplazamientos químicos* (δ), cuya unidad es ppm (partes por millón) (1).

Otro término importante a la hora de la identificación de compuestos en un espectro de RMN es la *multiplicidad* o número de picos de una señal, determinada por el entorno químico del núcleo de ^1H . Viene dada por la regla $n+1$, donde n es el número de protones equivalentes que desdoblan una señal (103). La multiplicidad en cada desplazamiento químico podrá denominarse: singlete (si se trata de un pico, s) si no se desdobra, doblete (2 picos, d), triplete (3, t), cuadruplete (4, q), [...], multiplete (varios, m).

Tanto el desplazamiento como la multiplicidad son dos características de cada grupo funcional dentro de cada molécula, es decir cada compuesto tendrá un conjunto de desplazamientos químicos con una determinada multiplicidad de para cada desplazamiento, esto nos dará información sobre qué molécula se trata.

Las distancias entre los picos de los multipletes dan información estructural. A la distancia entre los picos de un multiplete se le llama *constante de acoplamiento* (J_{ab}) entre los ^1H magnéticamente acoplados, y permite diferenciar los posibles isómeros de un compuesto (1). Este acoplamiento surge de la interacción de los diferentes estados espín a través de los enlaces químicos de una molécula, y resulta en la división de señales RMN. Este acoplamiento proporciona información detallada sobre la conectividad de los átomos en una molécula.

Tipos de experimentos con RMN

Experimento Monodimensional

Los experimentos monodimensionales (^1H -RMN 1D), como hemos desarrollado anteriormente, dan información sobre el número y tipo de ^1H diferentes que hay en la molécula. Su posición en el espectro (desplazamiento químico) está determinado por el entorno químico del núcleo, y por tanto da información de grupos funcionales a los que pertenecen o están cerca. Por último, la morfología de la señal da información de los ^1H cercanos acoplados escalarmente.

La buena reproducibilidad de los aspectos cuantitativos obtenidos, en combinación con los métodos estadísticos multivariantes, hace de la ^1H -RMN 1D una herramienta muy fiable (105). En este sentido, el límite de la detección puede reducirse hasta una décima de nanogramo con el uso de sondas *microcoil* (106). Sin embargo, puesto que la complejidad inherente a las matrices biológicas genera un gran número de picos en un pequeño rango de desplazamiento químico (~ 10 ppm), existe una probabilidad de superposición, especialmente en la región alifática (1-5 ppm). Como consecuencia, componentes potencialmente importantes con menor concentración quedan frecuentemente ocultos por picos mayores, y por lo tanto su detección es más complicada.

Otro de los obstáculos al analizar las muestras de bio-fluidos, es la intensa señal de la resonancia del agua en el espectro que distorsiona en gran medida la calidad del espectro resultante. La abundancia del agua en este tipo de muestras hace que sea la señal más intensa del espectro. Para poder observar debidamente los metabolitos relevantes, debemos suprimir la señal del agua utilizando secuencias de pulsos. Existen diferentes secuencias de pulsos que pueden suprimir en gran medida la señal del agua. Una de las más utilizadas por su sencillez y por producir un grado de supresión aceptable, es la que aplica un pulso de presaturación sobre la señal del agua durante 1-2 segundos. La irradiación es aplicada a la frecuencia del agua (~ 4.8 ppm) para hacer efectiva la supresión. Esta simple banda de radiofrecuencia es normalmente conocida como presaturación o PRESAT (107).

Análisis de datos

Una vez obtenidos los espectros de ^1H -RMN, deben procesarse antes de su asignación y cuantificación. Estas operaciones, conocidas como pre-procesado de los datos, que fundamentalmente consiste en la corrección de fase, línea base y desplazamiento químico.

El paso siguiente en el análisis de los datos consistirá en realizar diferentes operaciones para minimizar las variaciones consecuencia de otras circunstancias que no sean las puramente biológicas. Las operaciones más relevantes son el filtrado de datos, la normalización, la transformación de datos y el escalado.

Otra particularidad de los datos obtenidos a partir de una aproximación metabolómica es disponer de un número elevado de muestras, cada una de ellas con un número alto de variables, de tal modo que para ser representadas es necesario un proceso de reducción de su dimensionalidad. El análisis no supervisado más frecuentemente utilizado es el análisis de componentes principales (*Principal Component Analysis, PCA*), que permite analizar la estructura de los datos e identificar relaciones entre muestras y variables sin conocimiento previo de la clase a la que pertenecen las muestras. El análisis mediante PCA permite obtener una valoración global de asociaciones entre los objetos (muestras) analizadas y de su distribución en un espacio multidimensional, así como de las variables que contribuyen a la estructura observada, y la correlación entre ellas.

Si se dispone de información previa sobre las muestras es posible desarrollar modelos uni- o multivariantes supervisados. Uno de los métodos más empleados en análisis metabolómico es PLS-DA (*Partial Least Square Discriminant Analysis*), ya que es especialmente útil en el análisis de matrices de datos en las que existe una correlación importante entre variables (108).

Capítulo 2

Hipótesis

1.-El hecho de que la orina pueda contener metabolitos específicos del proceso biológico tumoral del CaP, distinguibles de los producidos por las células normales, nos sugiere la posibilidad de identificar una huella metabólica específica de aquellos pacientes que van a desarrollar una rBQ frente a aquellos que no.

2.-La espectroscopía de RMN permitirá la identificación de una huella metabólica en orina asociada a la futura rBQ en pacientes con CaP.

3.-La espectroscopía de RMN permitirá la identificación de metabolitos en orina que permitan estratificar los pacientes con CaP.

Capítulo 3

Objetivos

Identificar una huella metabólica específica mediante espectroscopía de RMN en orina de pacientes CaP previa a su intervención quirúrgica que pueda ayudar a discriminar aquellos pacientes con CaP que presentarán en el futuro una recaída bioquímica (rBQ).

Establecer una asociación entre las variables clínicas y los patrones metabolómicos en orina, que pueda ser utilizado como BM urinario de agresividad con el fin de permitir una mejor estratificación pronóstica de los pacientes con CaP y, por tanto, una optimización de los posibles tratamientos.

Capítulo 4

Material y método

Se trata de un estudio clínico analítico, abierto, observacional y prospectivo de una cohorte de varones diagnosticados de CaP mediante BxP transrectal los que posteriormente se le realizó una PTR laparoscópica.

Selección de sujetos

Los pacientes incluidos en este estudio pertenecían por sectorización hospitalaria al Servicio de Urología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia. A través de la información contenida en la lista de espera quirúrgica se identificaron a los enfermos diagnosticados de CaP que fueran a ser intervenidos mediante PTR (Código de diagnóstico CIE 10: C61) en el periodo comprendido entre febrero de 2012 y diciembre de 2015. Posteriormente, se les realizó un seguimiento mínimo de 5 años a la mayoría de ellos pacientes, para determinar en qué paciente se producía una rBQ.

Todos los pacientes incluidos en el estudio firmaron una hoja de consentimiento después de ser informados de los objetivos del estudio y otra para el almacenamiento de muestras en Biobanco. Ambos documentos fueron autorizados por el comité de Bioética de IIS la Fe (Anexo 1).

Variables

Historia Clínica

Para cada caso seleccionado se recogen datos personales del enfermo: edad, índice de masa corporal (IMC), comorbilidad y antecedentes hereditarios. También se recogen los datos de la exploración física, y datos bioquímicos como el PSA. Siguiendo las recomendaciones de las guías de la Asociación Europea de Urología (EAU), se utilizará la clasificación TNM (tumor, adenopatías y metástasis) del año 2009 (109) de la Unión Internacional Contra el Cáncer para unificar a los pacientes con teórica respuesta clínica similar (Tabla 3).

Tabla 3: Clasificación TNM del CaP: Tumor primario (*solamente para ADCP*) (110).

Tx	No se puede evaluar el tumor primario.	
T0	No hay evidencia de tumor primario.	
T1 Tumor no evidente clínicamente, no palpable ni visible mediante técnicas de imagen.	T1a	Tumor detectado como hallazgo fortuito en una extensión menor o igual al 5% del tejido resecado.
	T1b	Tumor detectado como hallazgo fortuito en una extensión mayor del 5% del tejido resecado.
	T1c	Tumor identificado mediante biopsia prostática.
T2 Tumor confinado en la próstata	T2a	El tumor abarca la mitad de un lóbulo o menos.
	T2b	El tumor abarca más de la mitad de un lóbulo, pero no ambos lóbulos.
	T2c	El tumor abarca ambos lóbulos.
T3 Tumor que se extiende más allá de la cápsula prostática.	T3a	Extensión extracapsular unilateral o bilateral, incluyendo afectación microscópica del cuello vesical.
	T3b	Tumor que invade la/s vesícula/s seminal/es.
T4	Tumor fijo o que invade estructuras adyacentes distintas de las vesículas seminales (esfínter externo, recto, músculos elevadores del ano y/o pared pélvica).	

Características Anatómo-patológicas

El sistema de gradación propuesto por Gleason y colaboradores (111) se basa en la realización de un examen del tejido prostático obtenido por BxP. El resultado es un índice de anormalidad, que puede adoptar valores entre 2 y 10 (National Institute for Health and Clinical Excellence 2008), siendo el grado 2 el menos agresivo y el 10 el más agresivo. Esta puntuación es el sumatorio de los dos patrones más frecuentes (patrón primario y secundario) encontrados en el tumor (Tabla 4). Cuando exista un tercer patrón, se informará el más frecuente como primario, y el de menor diferenciación de los restantes, como secundario, independientemente de su extensión (112–114).

Este sistema de clasificación, utilizado durante más de 50 años para pronosticar y guiar el tratamiento de pacientes con CaP, tras reuniones de consenso de la *International Society of Urological Pathology* (ISUP) (112) en 2005 y 2014, modificó de forma importante para actualizarlo a las prácticas diagnósticas y terapéuticas actuales, resumiéndolo a un sistema de agrupación de puntuación de Gleason que consistente en cinco grados donde la puntuación de Gleason 6 (3 + 3) se clasificó como grado 1, lo que reflejó mejor el comportamiento mayormente indolente de estos tumores. Otros aspectos relevantes fueron la eliminación del patrón cribiforme del grado 3 de Gleason, y que en los casos de Gleason 7, determinar si el grado 4 es el patrón primario o secundario, es decir, diferenciar entre (3+4) y (4+3), puesto que condiciona el consecuente abordaje terapéutico.

Tabla 4: Clasificación del grado histológico del CaP según reunión ISUP 2014 (112).

Grado de Gleason	ISUP
2-6	1
7 (3+4)	2
7 (4+3)	3
8 (4+4), (3+5) o (5+3)	4
9-10	5

Grupo de riesgo

El estadio clínico TNM es insuficiente para establecer el tratamiento más adecuado en pacientes con CaP localizado. Los pacientes diagnosticados de CaP en estadios clínicos localizados o localmente avanzados pueden encuadrarse en subgrupos de riesgo o pronóstico en función de los factores de riesgo conocidos, fundamentalmente PSA sérico y Gleason. La EAU propone una categorización de grupos de riesgo basada en la clasificación de D'Amico (115), agrupando así a los pacientes con riesgo similar de rBQ tras cirugía o RT (Tabla 5).

Tabla 5: Criterios de D'Amico de riesgo de recurrencia bioquímica de CaP (115).

Localizado			Localmente avanzado
Riesgo Bajo	Riesgo Intermedio	Riesgo Alto	
cT1–cT2a Gleason <7 PSA ≤10ng/mL.	cT2b Gleason=7 PSA >10 y ≤20ng/mL)	cT2c PSA >20ng/mL Gleason >7	Cualquier PSA Cualquier Gleason cT3-4 cN+

Se puede hacer una subestratificación adicional del grupo de riesgo intermedio y, específicamente, la *National Cancer Center Network* (NCCN) subdividen la enfermedad de riesgo intermedio en riesgo intermedio favorable y riesgo intermedio desfavorable, con características desfavorables que incluyen ISUP grado 3, y / o > 50% de núcleos de biopsia positivos y / o al menos dos factores de riesgo intermedio (116).

Recogida de las muestras biológicas

Procesado de la muestra

Las muestras de orina se recogieron en el Servicio de Urología del Hospital La Fe y posteriormente fueron procesadas y almacenadas en el Biobanco de este hospital. A los pacientes se les informó del proyecto de investigación, y voluntariamente firmaron el Consentimiento Informado para su inclusión en el estudio y otro para el almacenamiento de muestras. Del mismo modo, aquellos pacientes sometidos a una PTR laparoscópica, se les recogió una muestra de orina en las mismas condiciones, al mes de la intervención. El desarrollo de la plataforma de análisis metabólico para la identificación de biomarcadores de CaP fue aprobado por Comité Ético de Investigación Biomédica del IIS la Fe (Anexo 2) con número de registro 2014/ 0626.

Las muestras se obtuvieron de la orina de primera hora de la mañana recogidas por micción espontánea (30 mL) de pacientes en ayunas. Para asegurar la trazabilidad de las muestras, se pegó una etiqueta a cada bote de orina, con el nombre del paciente, la fecha y el momento de recogida. Por otra parte, se anotó en las hojas de información de las muestras: la colección a la que pertenecían las muestras (Urología CaP), la fecha y la hora de recogida, así como la forma de conservación hasta el alicuotado y el código de asignación del paciente de forma secuencial a la inclusión en el estudio. Este código contiene información de la fecha, la patología y número de registro: (día/mes/año-CaP-Nº Registro). Se creó una base de datos para el control de muestras, su codificación y trazabilidad.

Almacenamiento de la muestra

De cada muestra se procesaron 5 alícuotas de 3 mL que se conservaron en criotubos a -80°C en Biobanco de la Fundación IIS La Fe. Las alícuotas se identificaban con una etiqueta anonimizada con un código tal y como se explica en la sección anterior, para su trazabilidad y a su vez anonimización.

Análisis metabolómico de las muestras

Preparación de muestras y adquisición de ^1H -RMN

Las muestras de orina se descongelaron a temperatura ambiente (entre 20 y 30 minutos) y se centrifugaron durante 10 minutos a 6000c/min a 5°C. De cada muestra se tomaron 540 microlitros de orina y se transfirieron a un tubo de *ependorf*. Se añadieron 60 microlitros de tampón (1,5 M KH_2PO_4 , pH 7,4, 0,1% TSP en D_2O , NaN_3). El TSP (*3-(Trimethylsilyl)propanoic acid*) se utilizó como referencia de desplazamiento químico, y la azida sódica (NaN_3) para evitar el crecimiento de microorganismos durante el estudio. La mezcla se homogeneizó, y centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min a 5°C y se transfirieron 0,5 mL de la mezcla a un tubo de RMN de 5 mm, lo que permitirá asegurar la homogeneidad en el desplazamiento químico de los espectros de las diferentes.

La preparación de muestra, adquisición y el procesado de los espectros se llevó a cabo en colaboración con Bruker (Bruker Biospin GmbH). Se utilizó la plataforma de Bruker IVDr mediante RMN (In vitro Diagnostic Research Solutions) siguiendo los protocolos estándar para preparación de muestra, adquisición y procesado de espectros y cuantificación de metabolitos.

Los espectros se adquirieron en un espectrómetro Bruker de 600 MHz (Bruker GmbH, Rheinstetten, Alemania) con el programa TopSpin 3.5 (Bruker Biospin GmbH). Para cada muestra de orina, se adquirió un espectro de 1D ^1H utilizando la secuencia *noesy* para la eliminación de la señal de agua. Los experimentos se adquirieron a 300 K. Se programaron para cada muestra 32 scans con una anchura espectral de 20 ppm.

Preprocesamiento de espectros de ^1H -RMN y asignación de metabolitos

Después de la adquisición de espectros, habiéndose aplicado la transformada de Fourier sobre la FID, se corrigió la fase, la línea de base y el desplazamiento químico utilizando la referencia. La adquisición y el procesamiento de los espectros se llevó a cabo en colaboración con Bruker (Bruker Biospin GmbH). Se identificó y cuantificó el panel de metabolitos establecido en los procedimientos de Bruker, obteniéndose la concentración de cada uno de ellos en la orina. Los datos de concentración se utilizaron para el análisis quimiométrico.

Antes del análisis estadístico, se realizó una revisión razonada de los metabolitos detectados y cuantificados, y su posible sentido fisiológico. Tras el análisis, los siguientes metabolitos fueron excluidos del análisis al considerarse que provenían de hábito alimentario previos al día de la recogida: Cafeína, Trimetilamina, Acetaminofeno glucuronido, Oxipurinol, Paracetamol-glucuronido, Alopurinol y Furoilglicina (procedimiento de tostado del grano de café).

Los 117 metabolitos finalmente considerados en el estudio son los siguientes:

Creatinina, Creatina, D-Glucosa-beta, D-Galactosa-alfa, D-Lactosa, Alanina, Ácido láctico, Ácido acético, Ácido succínico, Ácido cítrico, Dimetilamina, Betaína, Glicina, Ácido fumárico, Ácido fórmico, 1-metilnicotinamida, N,N-Dimetilglicina, Taurina, Ácido hipúrico, Acetona, Ácido 3-hidroxi-butírico, Ácido acetoacético, Valina, Metionina, Arginina, 1-Metilhistidina, Sarcosina, Trigonina, Ácido benzoico, Ácido 4-aminobutírico, Ácido pirúvico, Ácido oxaloacético, D-manitol, D-manosa-alfa, Alantoína, Imidazol, Inosina, Ácido tartárico, Prolina betaína, Ácido D-mandélico, Ácido 2-oxoglutarico, Ácido 2-metilsuccínico, Ácido guanidinoacético, Propilenglicol, Etanol, Metanol, 1-metilguanidina, Ácido orótico, Ácido metilmalónico, Ácido 2-hidroxiisovalérico, Ácido 3-hidroxiisovalérico, Ácido etilmalónico, Ácido N-acetilaspártico, Ácido glutárico, Uridina, Ácido propiónico, L-isoleucina, DL-alloisoleucina, Leucina, Citrulina, Ácido 3-hidroxi-propiónico, Fenilalanina, Ácido fenilpirúvico, N-acetilfenilalanina, Neopterinina, Ácido fenilacético, Ácido 2-hidroxi-fenilacético, Ácido 3-feniláctico, Ácido 4-hidroxi-feniláctico, Ácido 2-oxoisocaproico, Ácido 2-oxoisovalérico, Ácido 3-metil-2-oxovalérico, 3-metilcrotonilglicina, Ácido uracilo, 2-hidroxi-4-metilvalérico, Ácido D-galactónico, Ácido N-isovaleroilglicina, Ácido 5-aminolevulínico, Ácido 4-hidroxi-fenilacético, Ácido 3-hidroxi-valérico, Ácido 3-hidroxi-glutarico, Ácido L-piroglutamico, Tigilglicina, Cistina, Ácido 4-hidroxi-fenilpirúvico, Ácido glutámico, Glutamina, Ácido glicólico, Citosina, Adenina, Ácido D-glucónico, Ácido 3-aminoisobutírico, Colina, Ácido Butírico, Succinilacetona, Ácido pantoténico, Tiramina, L-triptófano, Dihidrotimina, Dihidrouracilo, Timina, Ácido xanturénico, Ácido argininosuccínico, Ácido maleico, N-acetilglutamato, Ácido 3-metilglutacónico, 1-Metilhidantoína, Ácido sinigico, Ácido 4-hidroxihipúrico, Ácido 4-piridoxico, Ácido L-treónico, Ácido L-Citramalico, Ácido 1,3-Dimetilúrico, Ácido 3-hidroxi-3-metilglutarico, Timol, Teobromina, L-Fucosa-alfa.

Metodología Bioestadística

Métodos quimiométricos

Al igual que en otras *ómicas* (p.ej. genómica, proteómica), una característica de la mayoría de los estudios metabolómicos es la complejidad en la estructura de los conjuntos de datos obtenidos debido a su multidimensionalidad, colinealidad y al elevado número de factores ambientales o genéticos (muchos de ellos desconocidos) que afectan al perfil metabólico. Además, los metabolitos son el producto de reacciones bioquímicas en las que participan otros metabolitos, por lo que es lógico esperar un alto nivel de interdependencia entre ellos.

Los análisis metabolómicos pueden generar cientos de señales por cada muestra analizada, donde las matrices de datos obtenidas cada fila corresponde a una muestra y cada columna contiene la abundancia relativa de un compuesto detectado. Son matrices de gran dimensión, con más variables que observaciones y altamente colineales. Los métodos de análisis multivariantes permiten, de forma simultánea, reducir la dimensionalidad y analizar las asociaciones entre muestras y metabolitos.

Previo al análisis, es necesario realizar un pretratamiento de los datos para asegurar la calidad y facilitar la interpretación de los resultados. Generalmente, se realiza un *escalado* debido a que los rangos de medidas de las variables originales pueden ser muy dispares y se debe evitar que variables muy abundantes enmascaren el efecto de las variables con abundancia intermedia o baja. Este escalado reduce la importancia de las variables más abundantes y les da mayor importancia a las variables de abundancia intermedia y baja.

Análisis descriptivo inicial no supervisado

La concentración de cada metabolito en cada muestra se transfirió a *MetaboAnalyst 5.0* (117). La variación en las concentraciones observadas asociada a diferentes diluciones urinarias supone una de las principales fuentes de varianza en estudios de metabolómica. Con el objetivo de facilitar la comparación entre grupos de muestras, las intensidades de cada metabolito en cada muestra analizada se normalizaron utilizando dos factores de referencia: la concentración de creatinina, y la suma del total de intensidades. Además, la medida de espectros RMN permite la detección de un gran número de metabolitos presentes en la muestra a diferentes rangos de concentración (μM - mM). Esto hace necesario incluir en el pre-procesado de los datos un tratamiento dirigido a controlar el peso que metabolitos a altas concentraciones puedan presentar en un análisis multivariante.

Inicialmente, se realiza un análisis multivariante no supervisado mediante un PCA, cuyo objetivo es reducir la dimensión del conjunto de datos intentando conservar la mayor cantidad de información posible de manera que, posteriormente, se faciliten criterios de decisión sobre las muestras (p.ej. clasificaciones, detección de datos anómalos) o variables (p.ej. metabolitos asociados a un determinado subconjunto de muestras).

El PCA es una técnica basada en un algoritmo lineal que no requiere el uso de información relativa a la clase a la que pertenecen las muestras. Este método surgió de la necesidad de comprimir y extraer información de conjuntos de datos multivariantes en los que la información depende, no solo de un número de variables aisladas, sino de la relación entre variables. En un análisis PCA los datos se disponen en forma matricial con una estructura \mathbf{X} ($I \times J$) formada por I filas y J columnas, donde I es el número de muestras y J el número de variables metabólicas. Tras un centrado y, de manera opcional, un escalado de los datos, el PCA implica una transformación lineal de la matriz \mathbf{X} ($I \times J$) en un nuevo sistema de coordenadas ortogonales en el que los vectores de proyección de los datos, en el nuevo espacio de menor dimensionalidad, son las direcciones (ortogonales) de máxima varianza de los datos originales.

La distancia entre muestras representadas en un gráfico de puntuaciones (*scores*) refleja la diferencia entre estas muestras en el patrón descrito por el modelo (118). Los elementos de cada vector \mathbf{p} son los pesos o *loadings* de cada variable en ese componente principal. Cada nuevo componente principal calculado, explicará un porcentaje determinado, decreciente, de la varianza inicial de los datos de X .

Una de las ventajas de este tipo de análisis es la posibilidad de descomponer las grandes matrices de datos y visualizarlas en gráficos que resumen el comportamiento de las observaciones y de las variables. A partir del gráfico de dispersión de los *scores*, donde en cada eje está representado un componente principal, se pueden visualizar los *outliers*. La herramienta utilizada para su detección es la T^2 de *Hotelling* y es la generalización multivariante de la distribución t de *Student*. La T^2 calcula la distancia desde la proyección de una observación hasta el centro del hiperplano formado por las nuevas componentes. La elipse de T^2 de *Hotelling* al 95% provee una región por fuera de la cual se considera que las observaciones forman parte del 5% de los casos extremos. El gráfico de *loadings*, por su parte, también es un gráfico bidimensional en donde cada eje representa un componente y permite visualizar el peso que tienen las variables en cada uno.

El PCA permite identificar las principales fuentes de variabilidad en datos multivariantes. Sin embargo, con frecuencia el objetivo del estudio es el análisis de la asociación entre los perfiles metabólicos y una determinada clasificación de los objetos en p.ej. casos y controles, incluida en un vector \mathbf{y} , para el desarrollo de modelos predictivos o la identificación de posibles biomarcadores. En este caso los métodos de análisis supervisado ofrecen una mayor capacidad discriminante. Entre ellos, el análisis proyección sobre estructuras latentes, y su variante la proyección ortogonal sobre estructuras latentes, son dos de los más empleados en el análisis de matrices espectrales de RMN (119).

Análisis discriminante

Univariante

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).

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. El valor del AUC varía entre 0,5 y 1, siendo 0,5 el valor que refleja una nula capacidad predictiva y 1 un modelo con especificidad y sensibilidad iguales a 1. El AUC siempre va acompañada de un intervalo de confianza, normalmente del 95%.

En este estudio se incluyó el *autoescalado* (también conocido como escalado de varianza de unidad), de manera que la distribución de intensidades de cada metabolito en la matriz de datos final presenta una media igual a cero y una desviación estándar igual a uno. Además, el análisis univariante de la matriz de datos incluyó la comparación de las distribuciones entre los grupos utilizando los valor medio y mediana como estimadores y la prueba de Wilcoxon para identificar diferencias significativas entre los diferentes grupos (significancia 5%). Utilizando logaritmos binarios de *fold-change* (\log_2FC) se cuantificó la magnitud y la dirección de las diferencias. Los valores \log_2FC positivos o negativos significan sobreexpresión o subexpresión en los grupos de riesgo, respectivamente. Los resultados se resumieron en un diagrama de dispersión (*volcano plot*), para identificar rápidamente cambios en grandes conjuntos de datos compuestos por datos repetidos.

Multivariante

PLS-DA

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

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

Validación Cruzada

Dentro de las estrategias de CV habituales, la denominada k -fold CV es, probablemente, la más empleada. La k -fold CV divide el conjunto de muestras inicial en un número k de subconjuntos. A continuación, se extrae del conjunto utilizado para la calibración o aprendizaje (*train set*) del modelo uno de estos subconjuntos (*test set*), y se desarrolla un modelo PLS-DA utilizando los restantes $k-1$ subconjuntos (*train set*). Posteriormente, el modelo calculado se utiliza para la predicción de las muestras incluidas en el *test set*. Este proceso se repite iterativamente hasta que los k subconjuntos han sido incluidos una única vez en un *test set*.

La *leave-one-out cross-validation (LOOCV)* representa un caso singular de CV en el que k es igual al número de muestras del conjunto de datos. A partir de los valores estimados para el conjunto de muestras, se calcula el error de predicción del modelo (p.ej. número de muestras correctamente clasificadas, o el AUC).

El error obtenido se utiliza con dos objetivos complementarios: su optimización mediante la selección del número de LV del modelo, que proporcione un menor error de predicción, y la estimación de la capacidad de generalización del modelo seleccionado (120). Una limitación de esta aproximación es que el proceso para el cálculo del error de predicción utiliza parcialmente las muestras empleadas para la selección del modelo, por lo que está sesgado y proporciona valores potencialmente demasiado optimistas.

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

Interpretación biológica

El análisis de vías metabólicas combina los resultados de un potente análisis de enriquecimiento de vías con el análisis de topología de redes para ayudar a identificar las vías más relevantes involucradas en las condiciones en estudio. Existen muchas herramientas comerciales de software de análisis de vías como *Pathway Studio*, *MetaCore* o *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA), etc, que utilizan vías metabólicas KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) de alta calidad como base de conocimientos que integra métodos bien establecidos (análisis univariantes, análisis de sobrerrepresentación), así como algoritmos y conceptos novedosos en el análisis de vías metabólicas (*Global Test*, *Global Ancova*, o análisis de topología de red).

El análisis de enriquecimiento de vías generalmente se refiere al análisis cuantitativo que utiliza directamente los valores de concentración de compuestos, en comparación con las listas de compuestos utilizadas por el análisis de sobrerrepresentación. En consecuencia, es más sensible y tiene el potencial de identificar cambios sutiles pero consistentes entre los compuestos involucrados en la misma vía biológica. El análisis de enriquecimiento utilizado se basa en *GlobalTest*, donde los valores p se pueden aproximar en función de la distribución asintótica sin usar permutaciones (121). Se ha de tener en cuenta que, cuando los tamaños de muestra son pequeños, los valores de p pueden ser ligeramente menos precisos en comparación con los valores de p obtenidos mediante el uso de un método basado en la permutación. Sin embargo, dado que el enfoque de nuestro trabajo es identificar las vías más relevantes, es más importante el rango de la vía, no el valor p absoluto.

El análisis de topología es una herramienta computacional que conforma una parte integral para el análisis de una red metabólica; permite realizar un análisis de las redes biológicas, estudiando los parámetros estructurales de la misma, permitiendo derivar de allí conocimiento biológico (122). La estructura de las vías biológicas representa nuestro conocimiento sobre las complejas relaciones entre las moléculas dentro de una célula o un organismo vivo.

Capítulo 5

Resultados

Análisis descriptivo de variables clínicas

Durante el periodo entre febrero de 2012 y diciembre de 2015 se obtuvieron las orinas de 61 varones en el momento de la realización de una BxP transrectal, a los que finalmente se les realizó una PTR laparoscópica por el diagnóstico de CaP, en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

La edad media de los pacientes sometidos a PTR laparoscópica en el momento del diagnóstico de CaP fue de 66 años (48-74), con una media de PSA total de (7 ng/mL) (2,2-31) y un IMC medio de 26 (21-32).

Según la clasificación pTNM (109), el 70,5% (43/61) de los pacientes sometidos a una PTR se catalogaron como pT2N0M0, el 13,11% (8/61) como pT3aN0M0, el 8,1% (5/61) pT3bN0M0, el 4,9% (3/61) pT3bN1M0 y el 3,2% (2/61) como pT4N1M0.

En cuanto al grado histológico según la ISUP, encontramos que el 27,86% (17/61) de las piezas quirúrgicas presentaban un grado 1, el 32,78% (20/61) un grado 2, el 18,03% (11/61) un grado 3, el 14,75% (9/61) un grado 4 y el 4,91% (3/61) un grado 5.

En definitiva, si se categorizan a los pacientes intervenidos mediante PTR, basados en los grupos de riesgo de la clasificación de D'Amico (115), el 19,67% (12/61) son considerados como localizados de bajo riesgo, el 60,65% (37/61) de localizados de riesgo intermedio, el 18,03% (11/61) de localizados de alto riesgo y el 1,6% (1/61) de localmente avanzados.

Tras un seguimiento mínimo de 5 años (5-15) de todos los pacientes, la tasa de rBQ tras PTR fue de 27,86% (17/61); de los cuales 8 pertenecía al grupo de localizado de riesgo intermedio, 8 al alto y 1 al avanzado. Dicha rBQ se producía antes de los 12 meses en el 47% (8/17) de los pacientes, sin embargo, la tasa de mortalidad global fue de tan solo 4,9% (3/61) en el momento del análisis al final del seguimiento.

Si diferenciamos el grupo de pacientes que recidivaron de los que permanecieron libre de enfermedad al final del seguimiento (tabla 6), no encontramos diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la edad media o el IMC de los pacientes. Sin embargo, los que recurrieron tenían una mediana de PSA casi el doble de los que no recurrieron (13,2 frente 7,35 ng/mL). Del mismo modo, no existían grandes diferencias entre el estadiaje clínico o las características anatomopatológicas de la BxP, aunque, evidentemente, si las hubo en el estadiaje patológico y el ISUP de la pieza con un 29,50% (18/61) de infraestadiaje global entre la histología de la BxP y pieza quirúrgica; 20,45% (9/44) en el grupo de remisión y 52,95% (9/17) en el grupo de recidiva.

Tabla 6: Análisis univariante. Diferencias entre las variables clínicas estudiadas (pacientes con y sin recurrencia bioquímica de CaP).

	RECURRENCIA (17 pacientes)	LIBRE de ENFERMEDAD (44 pacientes)	p-valor
Edad Media (meses)	64,6 (48,1-72,1) *	65,04 (48,6-74,5) *	0,566
Seguimiento medio (meses)	69 (60-93) *	58 (57-183) *	0,187
IMC	26,9 ± 2,4**	26 ± 2,7**	0,466
PSA (ng/mL)	13,2 (4,14-31) *	7,35 (2,2-16,2) *	0,003
Estadíaje Clínico			
cT1a	0	1	0,311
cT1b	0	0	
cT1c	9	31	
cT2a	7	10	
cT2b	1	1	
cT2c	0	2	
cT3a	0	0	
cT3b	0	0	
cT4	0	0	
ISUP Biopsia			
1	4	20	0,150
2	6	16	
3	2	3	
4	3	5	
5	2	0	
Estadíaje Patológico			
pT2a	0	3	0,024
pT2b	0	5	
pT2c	7	28	
pT3a	2	5	
pT3b	7	3	
pT4	1	0	
N0	12	44	
N1	5	0	
ISUP Pieza			
1	0	18	<0,001
2	3	17	
3	5	6	
4	6	3	
5	3	0	
Márgenes positivos	13 (81,3%)	15 (33,3%)	0,001
Invasión linfovascular	13 (81,3%)	33 (73,3%)	0,738

* Mediana y rango.

** Media y desviación estándar.

Análisis descriptivo inicial no supervisado

En este primer análisis metabólico se quiso establecer la posible diferencia de huella metabólica entre los pacientes que presentan una rBQ de los que no, comenzando con un método de análisis no supervisado (PCA), con la finalidad de evaluar la variabilidad de los datos sin tener en cuenta la clasificación clínica de los pacientes. Se consideró rBQ aquellos pacientes que durante el seguimiento tras la PTR obtuvieran un incremento del valor del PSA $>0,4$ ng/mL.

Como decíamos anteriormente, el PCA tiene como objetivo describir la información metabólica de las muestras obtenidas, mediante nuevas variables no correlacionadas, llamadas componentes principales (PC), cuyo porcentaje recogido en cada uno de los ejes del PCA hace referencia a la porción de variabilidad explicada sobre el total. 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 decidir su inclusión/exclusión en el análisis posterior. En segundo lugar, el PCA permite determinar si los datos de una muestra se separan/agrupan espontáneamente, aunque sabemos que en poblaciones humanas es muy infrecuente dada la variabilidad de los individuos

En nuestro caso, como se muestra en el diagrama de puntuaciones o *scores*, la elección de dos componentes principales explica un 18% de la varianza de los datos, pero los dos grupos se presentan muy solapados, y no revela un agrupamiento significativo con clara diferenciación. Además, se identificaron varias muestras anómalas en ambos grupos (rBQ/ libre de enfermedad) mediante el análisis de los diagramas de *loadings* y del gráfico T^2 de *Hotelling*, con un contenido metabólico que se desviaba del comportamiento general del resto de conjunto de datos al caer fuera del nivel de confianza del 95%, pero no en la magnitud para poder excluirlas del análisis (figura 11).

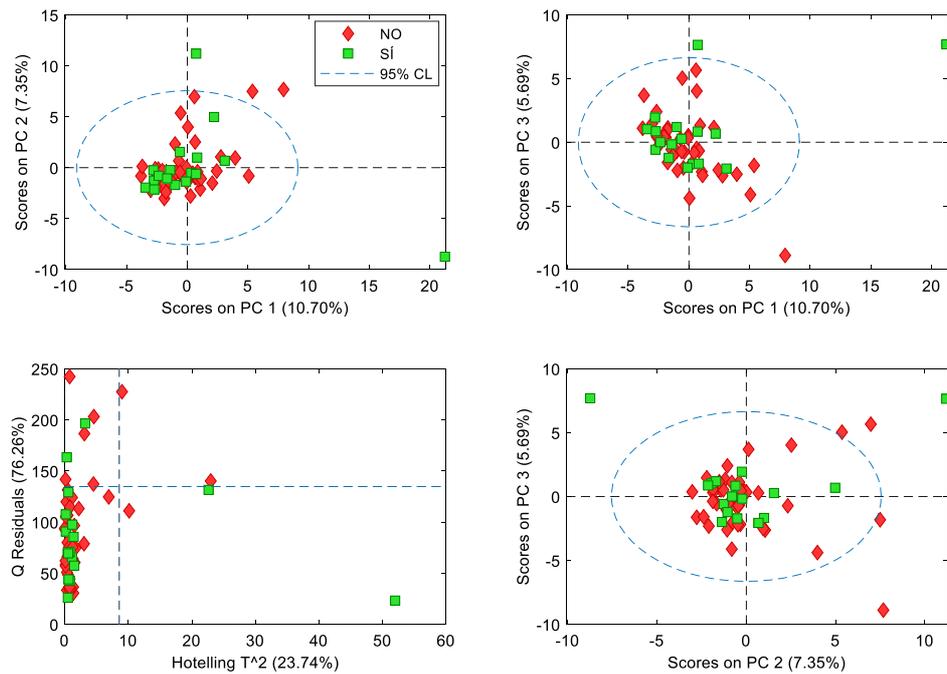


Figura 11. Diagrama de puntuación (*scores*) y gráfico T^2 de *Hotelling* obtenido del análisis no dirigido PCA de los espectros de ^1H -RNM normalizados (creatinina) de las muestras de orina de pacientes con CaP con recidiva bioquímica frente a los de sin recidiva.

Los rombos rojos representan los casos sin rBQ, y los cuadrados verdes los casos con rBQ. Puede observarse que no existe una separación espontánea de las dos muestras.

Análisis discriminante

Estudio Univariante

El objetivo principal de esta tesis doctoral es valorar si existen diferencias estadísticamente significativas en la huella metabólica de los pacientes con CaP intervenidos mediante una PTR que presenten una rBQ de los que no. El análisis metabólico mediante ^1H -RMN determinó 124 metabolitos adecuados en todas las muestras de orina de los pacientes previa a la intervención de los que se retiraron 7 al considerarse producto de hábito alimentario previo.

Se analizaron mediante el programa *MetaboloAnalyst 5.0* los 117 metabolitos presentes en las 61 muestras de orina recogidas obtenidas en ayunas el día de la BxP previa a la PTR. En primer lugar, se calculó el *log2 fold change* (FC) (figura 12), que indica cuánto cambia la concentración de cada determinado metabolito de la muestra con rBQ respecto al grupo libre de rBQ, y para ver si existe una variabilidad experimental, se asoció el p-valor (tabla 7).

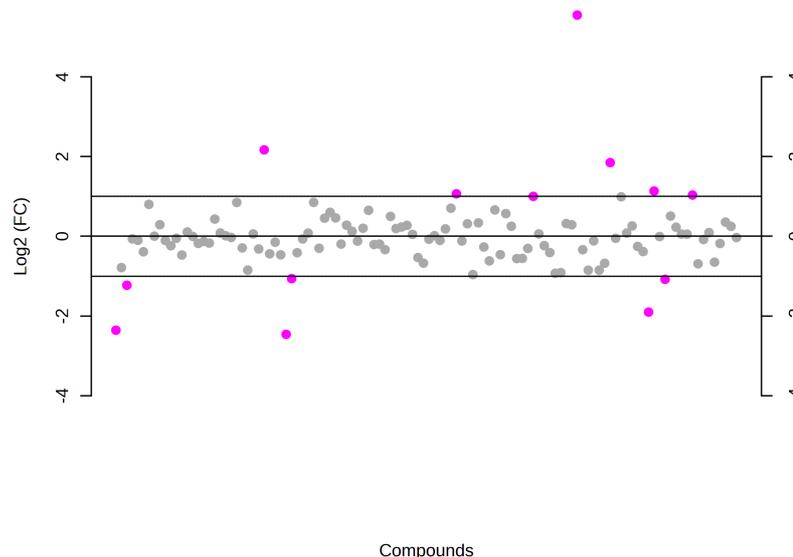


Figura 12: Análisis *fold change*. Las variables significativas (puntos rosas) son aquellas cuyos FC están más allá del umbral de FC establecido, en este caso 2, tanto por encima como por debajo.

Tabla 7: Componentes relevantes tras análisis *fold change*.

componentes	FC	log2(FC)
Glutamina	47,00	5,55
D-Manitol	0,18	-2,46
Creatina	0,19	-2,35
ácido Benzoico	4,49	2,16
Dihidrouracilo	0,26	-1,90
Colina	3,60	1,85
D-Galactosa-alfa	0,42	-1,22
Timina	2,19	1,13
ácido Maleico	0,47	-1,08
N-acetil Fenilalanina	2,09	1,00
D-Mannosa	0,47	-1,06
ácido 4-hidroxihipúrico	2,04	1,03
ácido 4-hidroxifenilacético	2,00	1,00

A continuación, proseguimos con el análisis univariante de la matriz de datos realizando la comparación de las distribuciones entre los grupos utilizando la prueba de Wilcoxon para identificar diferencias significativas (significancia 5%) (figura 13). Los metabolitos que mostraron diferencias estadísticamente significativas están resumidos en la tabla 8, junto el AUC correspondiente. El objetivo del análisis clásico de la curva ROC es evaluar el rendimiento de un solo metabolito. La curva ROC resume la sensibilidad y la especificidad de esa variable específica para clasificar los datos (figura 14).

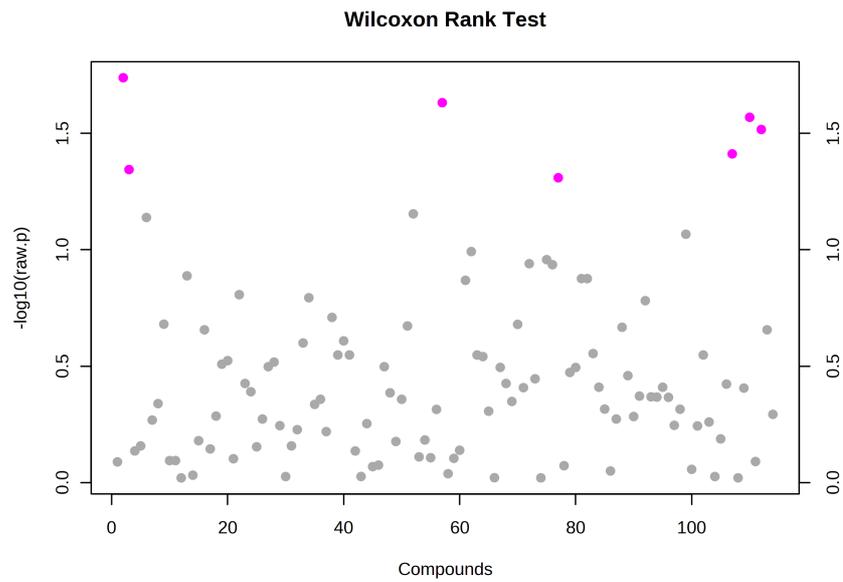


Figura 13: Análisis Univariante (Wilcoxon). Los círculos rosas representan los componentes por encima del umbral 0,1.

Tabla 8: Metabolitos relevantes tras Análisis Univariante (Wilcoxon).
(AUC: área bajo la curva ROC).

Metabolitos	p-valor	$-\log_{10}(p)$	AUC
D-Glucosa-beta	0,018231	1,7392	0,7527
DL-Aloisoleucina	0,023329	1,6321	0,5588
ácido 1,3-Dimetilúrico	0,026972	1,5691	0,6297
Timol	0,030422	1,5168	0,6804
ácido 4-Piridóxico	0,038721	1,4121	0,6297
D-Galactosa-alfa	0,045221	1,3447	0,6417
ácido 4-Hidroxifenilacético	0,049041	1,3094	0,7986
ácido N-Acetilaspártico	0,070087	1,1544	0,6510
ácido Láctico	0,072671	1,1386	0,5615
Timina	0,085734	1,0668	0,6029

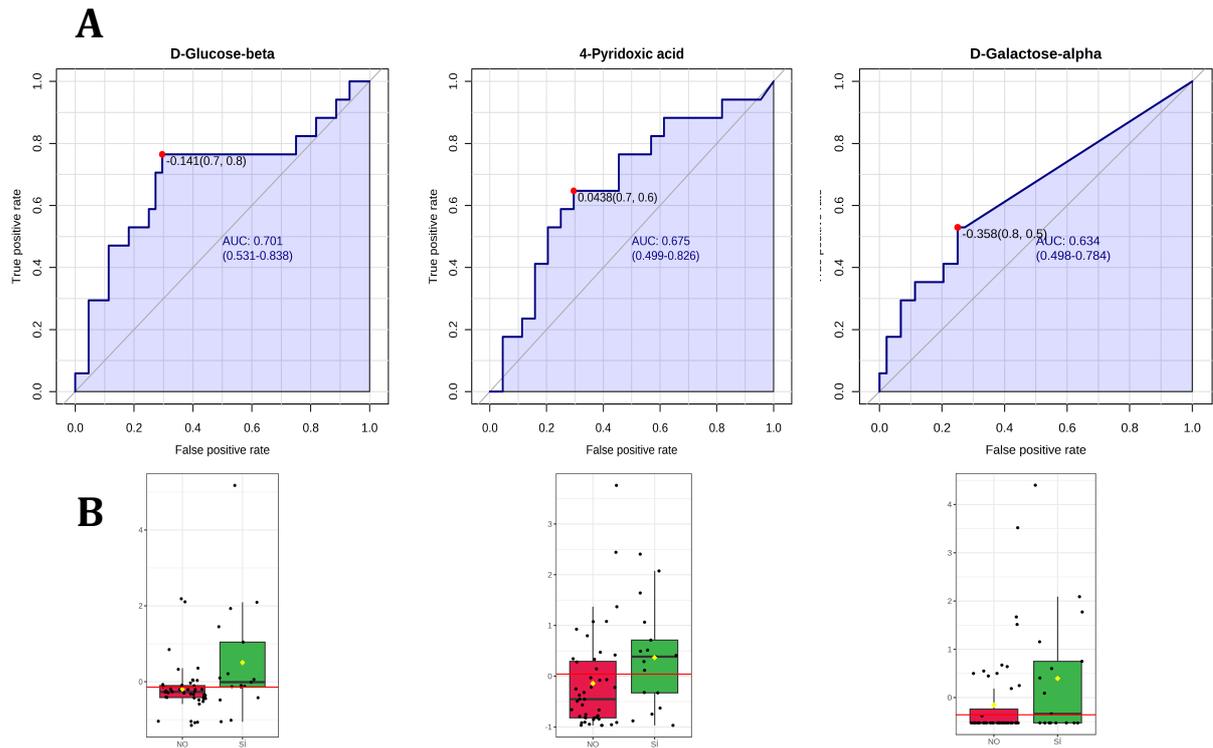


Figura 14:

(C) Curvas ROC y AUC correspondiente, de los algunos metabolitos. La sensibilidad se muestra en el eje y, y la especificidad en el eje x.

(D) Diagramas de caja de las concentraciones de los metabolitos seleccionados en ambos grupos de casos. La línea horizontal roja indica el punto de corte óptimo.

Finalmente, resultados se resumieron en un diagrama de dispersión (*volcano plot*) (figura 15) y en unos diagramas de cajas (figura 16), donde la concentración de α -D-galactosa se encontraba más elevada en el grupo de pacientes que presentan una rBQ, mientras que las del ácido 4-hidroxifenilacético y la timina, en una concentración más baja en los que recidivan (tabla 9).

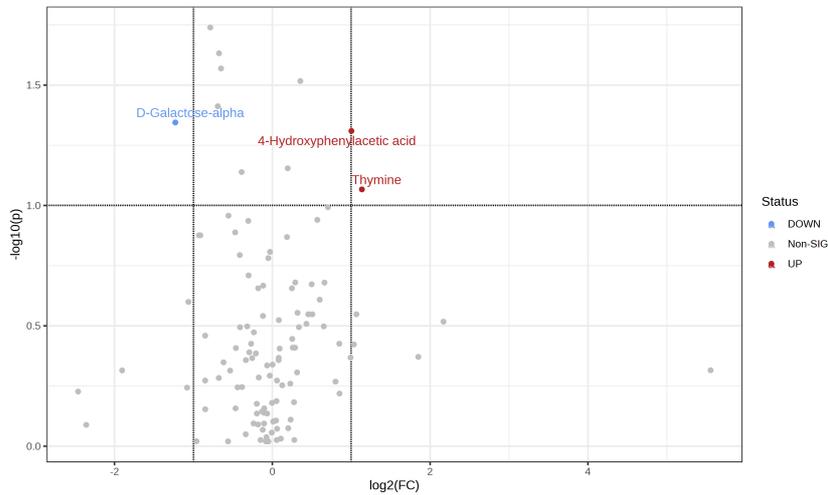


Figura 15: Variables significativas seleccionadas por *Volcano plot* con umbral de *fold-changes* (x) 2 y umbral de *t-test* (y) 0.1. Los círculos azules y rojo representan metabolitos por encima y por debajo del umbral, respectivamente.

Tabla 9: Resultado del estudio univariante de las concentraciones de metabolitos en orina previa a la intervención quirúrgica, de pacientes con CaP que recurren frente a los que no recurren.

(FC: fold-change) (AUC: área bajo la curva ROC).

componentes	FC	log2(FC)	raw.pval	-log10(p)	AUC
D-Galactosa-alfa	0,4265	-1,2292	0,045221	1,3447	0,697
ácido 4-hidroxifenilacético	2,0036	1,0026	0,049041	1,3094	0,667
Timina	2,1966	1,1353	0,085734	1,0668	0,678

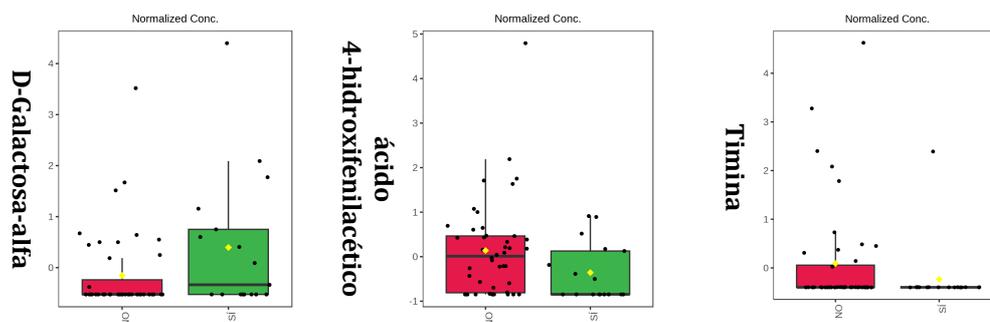


Figura 16: Diagramas de cajas de las concentraciones de metabolitos (original y normalizado creatinina) que han mostrado diferencias significativas en el estudio univariante.

Estudio Multivariante

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 entre ambos. Se construyó un modelo discriminante con las 61 muestras de orina, basado en los 117 metabolitos normalizados frente a la creatinina, que pudiera clasificar las muestras de orina de pacientes que recidivan frente a los que no recidivan.

Inicialmente, tras realizar un autoescalado (X) y centrado de la media (y), mediante la técnica de validación cruzada (VC) conocida como *leave-one-out*, se seleccionaron 3 variables latentes (LV), evitando el cálculo de un modelo sobreajustado sin capacidad de generalización para futuras muestras (figura 17). En el diagrama de puntos de la figura 18 se observa que en el análisis supervisado tampoco existía una separación diferencial de los dos grupos, cuya curva ROC correspondiente obtiene un AUC muy bajo (0,43) (figura 19) lo que traduce la capacidad estadísticamente no significativa del modelo para identificar rBQ. Con la intención de visualizar el sentido de relación de las variables basado en el valor del AUC de cada variable obtenido en el análisis univariante, representamos el valor VIP (*variable importance in the projection*) del modelo PLS-DA frente al vector de regresión (figura 20).

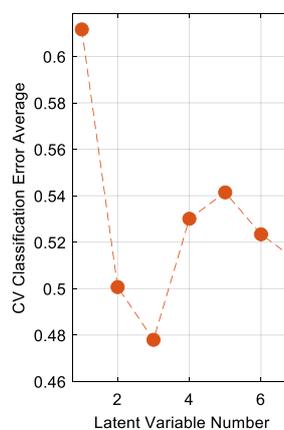


Figura 17. Selección del número de variables latentes a partir de valores de exactitud de la clasificación estimados mediante VC *leave-one-out*.

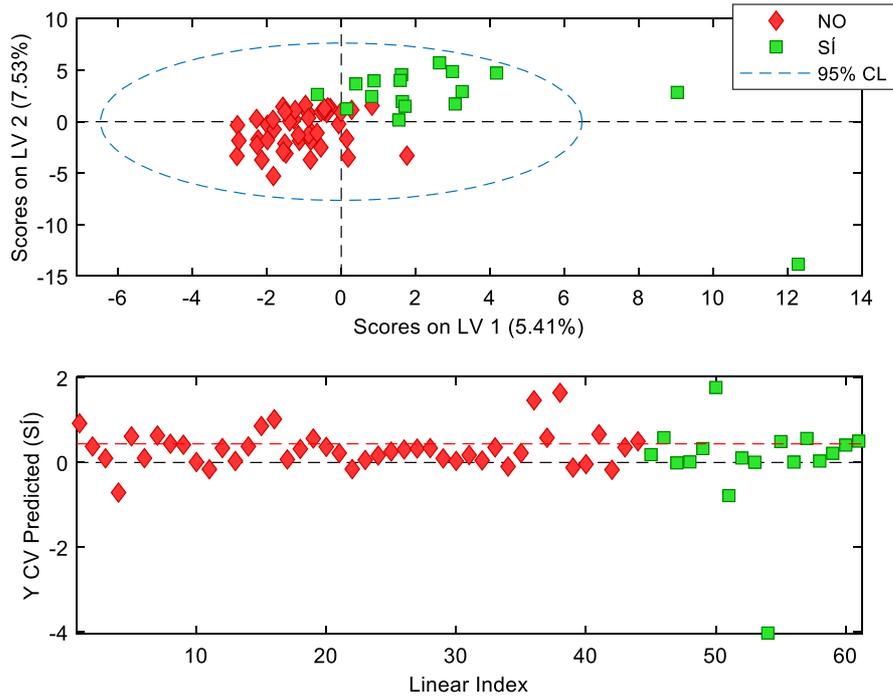


Figura 18. Representaciones gráficas obtenidas del modelo PLS-DA que discrimina entre las muestras de orina de CaP que no recidivan de las que sí recidivan.

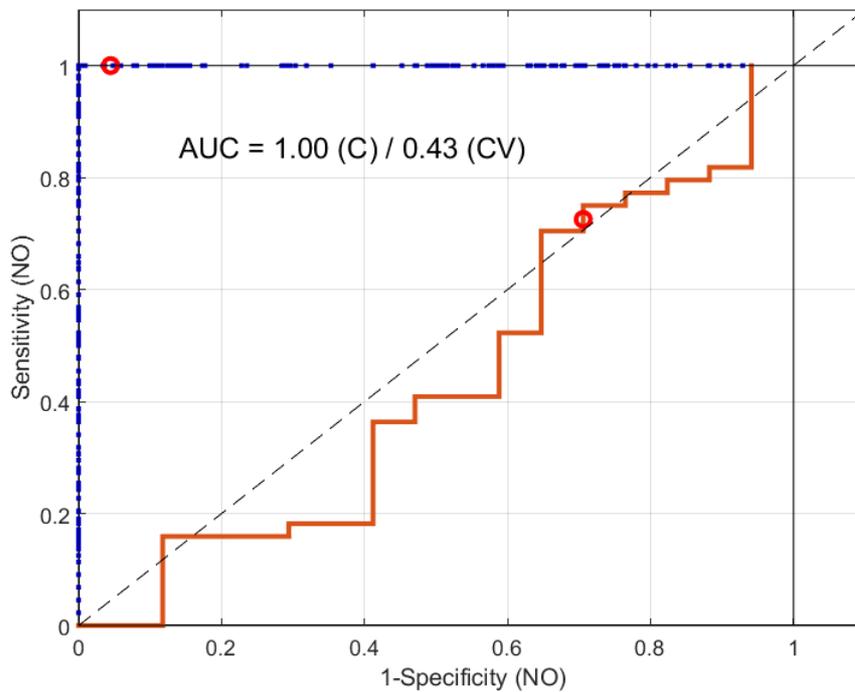


Figura 19. Curvas ROC estimadas con el modelo PLS-DA que discrimina entre las muestras de orina de CaP que no recidivan de las que sí recidivan. La línea azul corresponde a los datos estimados y la línea naranja, a la validación cruzada. Los límites seleccionados por el algoritmo PLS-DA para el cálculo de la sensibilidad y especificidad del modelo se muestran como un círculo rojo en cada una de las curvas.

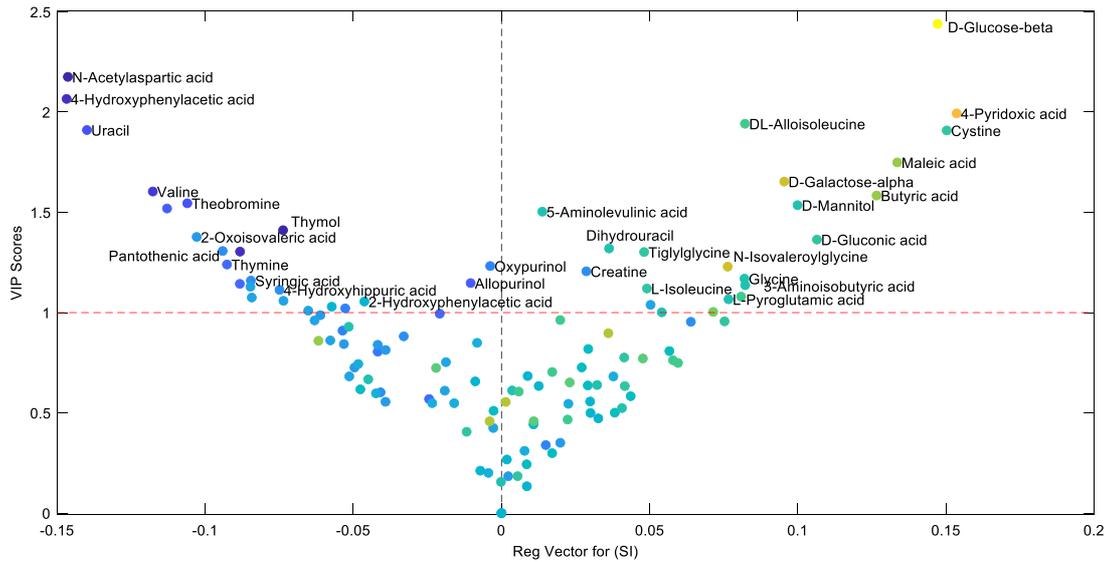


Figura 20. Modelo PLS-DA frente al vector de regresión. El color de cada punto representa el AUC de cada variable en el estudio univariante previo.

Dado que los resultados no fueron significativos, se decidió repetir el estudio multivariante siendo más restrictivos a la hora de seleccionar metabolitos, teniendo en cuenta sólo aquellas variables cuyo VIP fue >1 (45 metabolitos). En esta ocasión, se obtuvieron 2 LVs (figura 21). El diagrama de puntos de la figura 22 muestra cierta separación diferencial de los dos grupos y una mayor AUC (0,80) (figura 23), cuya tabla de confusión basada en CV (sensibilidad: 70,59%, especificidad: 84,09%, precisión: 80,33%) se resume en la tabla 10. Como mostrábamos anteriormente, representamos el modelo PLS-DA de las variables VIP >1 frente al vector de regresión obteniendo un nuevo valor VIP para cada metabolito (figura 24).

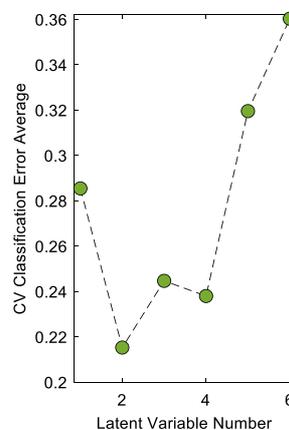


Figura 21. Obtención de variables latentes tras técnica de VC *leave-one-out*, teniendo en cuenta sólo aquellas 45 variables cuyo VIP fue >1 .

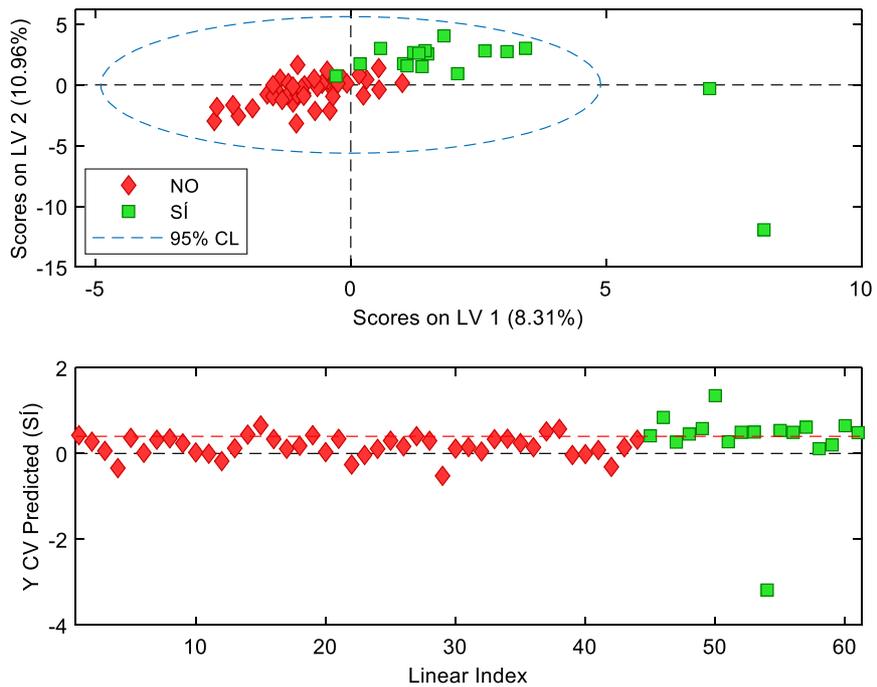


Figura 22. Representaciones gráficas obtenidas del modelo PLS-DA que discrimina entre las muestras de orina de CaP que no recidivan de las que sí recidivan, teniendo en cuenta sólo aquellas las 45 variables cuyo VIP fue >1.

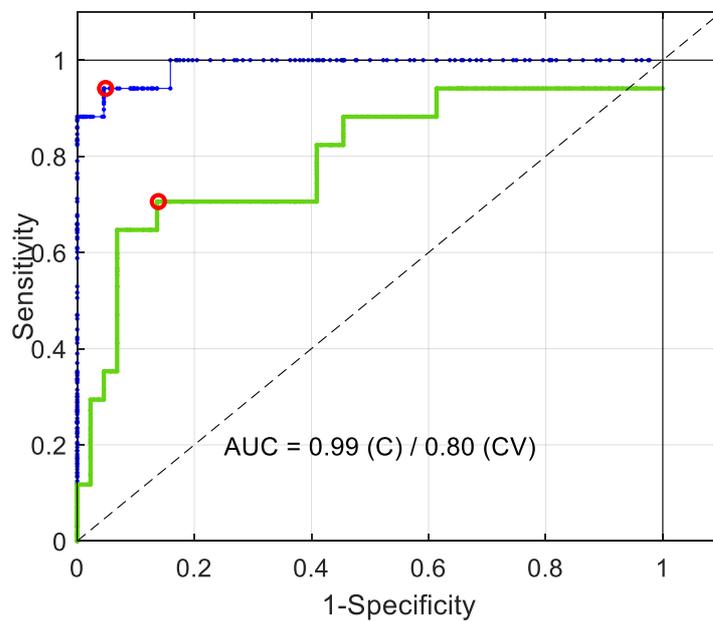


Figura 23. Curvas ROC estimadas con el modelo PLS-DA que discrimina entre las muestras de orina de CaP que no recidivan de las que sí recidivan. La línea azul corresponde a los datos estimados y la línea verde, a la VC. Los límites seleccionados por el algoritmo PLS-DA para el cálculo de la sensibilidad y especificidad del modelo se muestran como un círculo rojo en cada una de las curvas.

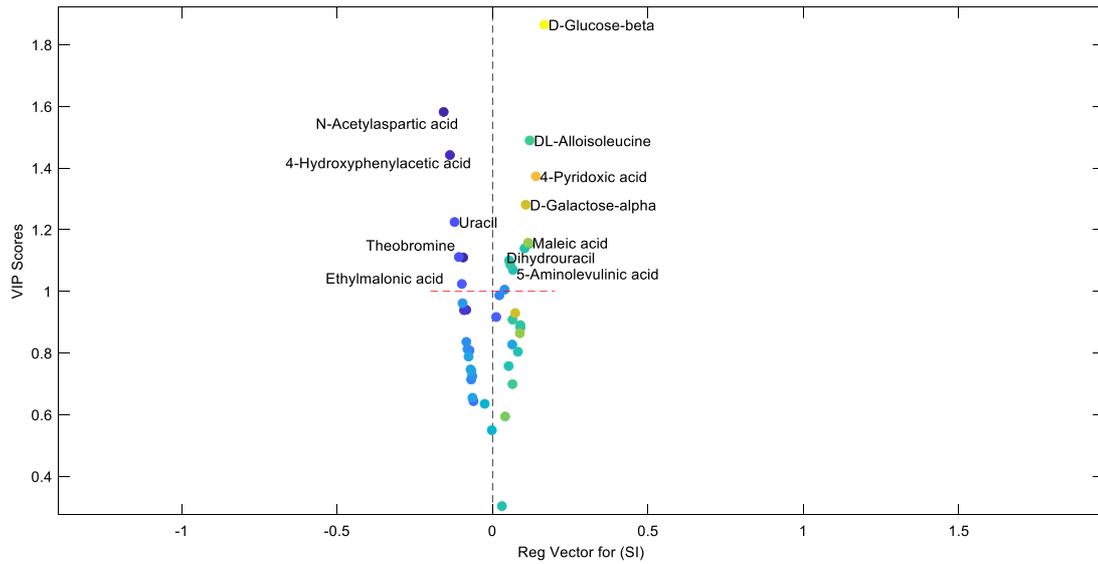


Figura 24. Modelo PLS-DA de las variables VIP >1 frente al vector de regresión. El color de cada punto representa el AUC de cada variable en el estudio univariante previo.

Tabla 10: Resultado a partir de tablas de confusión calculadas por CV. (IC: Intervalo de Confianza) (CV: Validación Cruzada).

	Valor	IC_{95%}
Sensibilidad	70,59%	44,04-89,69%
Especificidad	84,09%	69,93-93,36%
Valor Predictivo Positivo	63,16%	44,86-78,32%
Valor Predictivo Negativo	88,10%	77,80-93,99%
Precisión	80,33%	68,16-89,40%

Análisis rutas metabólicas

Con los datos obtenidos tras un primer análisis discriminante, aunque los modelos obtenidos no eran capaces de distinguir entre pacientes que presenta durante el seguimiento una rBQ de los que no, se realizó un análisis de rutas metabólicas seleccionando todos los metabolitos obtenidos en las 61 muestras de orina. Las principales rutas alteradas de resumen en la tabla 11. No obstante, su consideración no deja de ser parcial dado que son pocos los metabolitos afectados respecto al número total de cada ruta descrita, por lo que no se puede confirmar. Cuando realizamos el análisis de las rutas metabólicas, teniendo en cuenta solo las 45 variables con $VIP > 1$, los resultados no difieren significativamente con los obtenidos con el total de los metabolitos.

Tabla 11: Resultado del análisis de rutas metabólicas.

(Comp Total: el número total de compuestos en la ruta)

(Hits: número real de metabolitos afectados en el estudio actual).

(Raw p: valor de p original calculado a partir del análisis de enriquecimiento).

(Holm ajust: valor de p ajustado por el método de *Holm-Bonferroni*).

(FDR: valor de p ajustado usando *False Discovery Rate*).

(Impacto: valor de impacto de la vía calculado a partir del análisis de topología de la vía).

Metabolismo	Comp Totat	Hits	Raw p	$-\log_{10}(p)$	Holm ajust	FDR	Impacto
Galactosa	27	1	5,39E-02	1,27E+00	1,00E+00	7,55E-01	0,05
Vitamina B6	9	1	7,48E-02	1,13E+00	1,00E+00	7,55E-01	0,05
Glicolisis/ Glucogénesis	26	6	8,28E-02	1,08E+00	1,00E+00	7,55E-01	0,13
Glicerofosfolípidos	22	1	1,38E-02	8,59E-01	1,00E+00	7,55E-01	0,05
Pentosa Fosfato	36	1	1,42E-02	8,49E-01	1,00E+00	7,55E-01	0,03
Aminoazúcar	37	2	1,58E-02	8,02E-01	1,00E+00	7,55E-01	0,00
Pirimidina	39	6	1,76E-02	7,56E-01	1,00E+00	7,55E-01	0,20
Alanina-beta	21	3	1,98E-02	7,04E-01	1,00E+00	7,55E-01	0,06
ácidos grasos	39	1	2,20E-02	6,567-01	1,00E+00	7,55E-01	0,00

Optimización del modelo con variables clínicas

Otros de los objetivos de esta tesis doctoral fue valorar si podíamos establecer una asociación entre las variables clínicas, y los patrones metabolómicos en orina. Para ello, se añadió al análisis el valor del PSA al diagnóstico, al ser la única variable clínica prequirúrgica con nivel de significación estadística ($p=0,003$).

Análisis no discriminante

Tras la inclusión de la variable clínica más significativa (PSA), el diagrama de puntuaciones o *scores*, la elección de dos componentes principales explica un 18% de la varianza de los datos, similar al modelo original sin PSA, y al igual que en ese, las variables se concentran sin un agrupamiento significativo que establezca una clara diferenciación entre ambos grupos (rBQ/ libre de enfermedad) (figura 26). Observamos, además, que PSA es la variable aislada con mayor AUC (0,7734) del modelo superior al rendimiento de cualquier metabolito analizado; pero inferior al obtenido previamente con modelo PLS-DA previo con $VIP > 1$ (0,80) (figura 25).

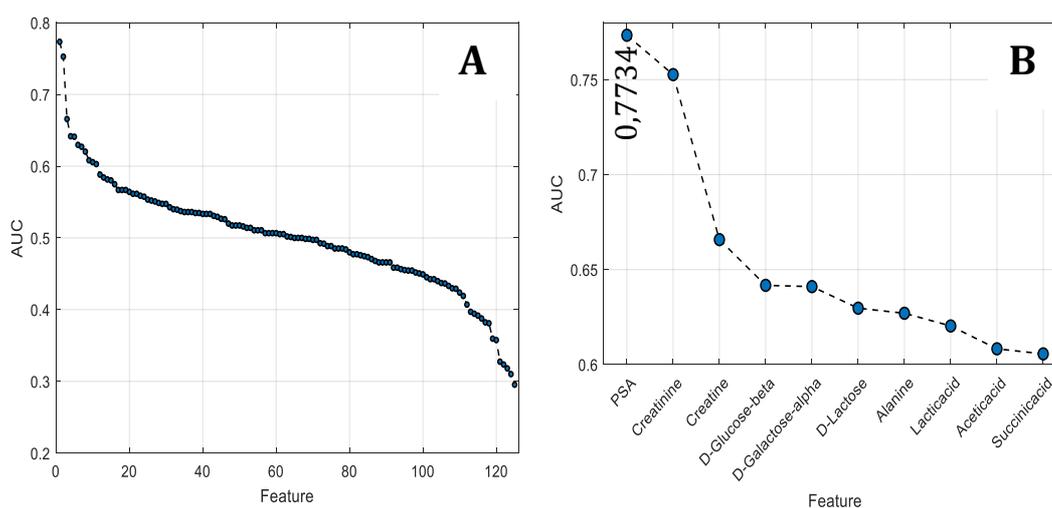


Figura 25. Representación gráfica de las AUC:
 (A) Los 117 metabolitos junto a variable clínica significativa (PSA).
 (B) Selección de las 10 variables con mayor AUC.

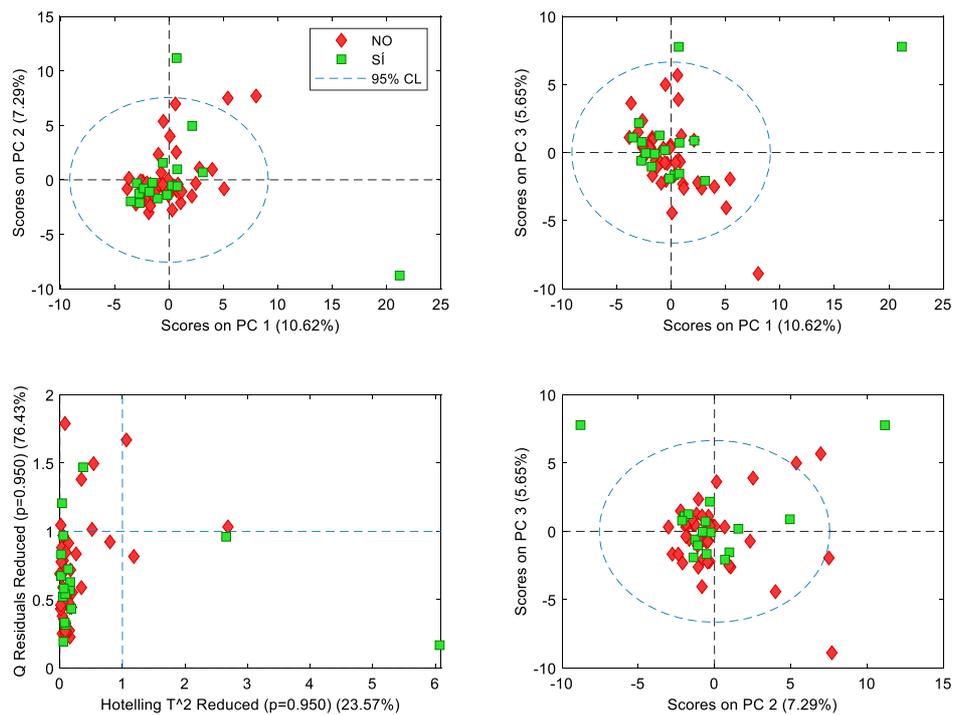


Figura 26. Diagrama de puntuación (*scores*) y gráfico T^2 de *Hotelling* obtenido del análisis no dirigido PCA de los espectros de ^1H -RMN normalizados (creatinina) junto a la variable clínica significativa (PSA) de las muestras de orina de pacientes con CaP con recidiva bioquímica frente a los de sin recidiva.

Los rombos rojos representan los casos sin rBQ, y los cuadrados verdes los casos con rBQ. Puede observarse que no existe una separación espontánea de las dos muestras.

Análisis discriminante Multivariante

Al igual que ocurriera previamente, tras los resultados no diferenciales del PCA, se realizó un modelo PLS-DA con las 61 muestras de orina, basado en los 117 metabolitos normalizados frente a la creatinina, pero esta vez junto a la variable clínica significativa PSA, con el objetivo de clasificar las muestras de orina de los 61 pacientes en los que recidivan frente a los que no recidivan.

De una manera similar, tras realizar un autoescalado (X) y centrado de la media (y), mediante la técnica de CV conocida como *leave-one-out*, se seleccionaron 4 LVs (figura 27). En el diagrama de puntos de la figura 28 se observa que el modelo no logra distinguir un caso entre rBQ frente a otro libre de progresión, con el consecuente bajo valor del AUC (0,58) (figura 29). Con la intención de visualizar el sentido de relación de las variables basado en el valor del AUC de cada variable obtenido en el análisis univariante, representamos el valor VIP modelo PLS-DA frente al vector de regresión (figura 30).

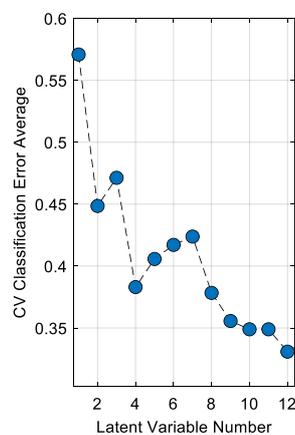


Figura 27. Obtención de variables latentes tras técnica de VC *leave-one-out*, teniendo en cuenta 117 variables y el PSA.

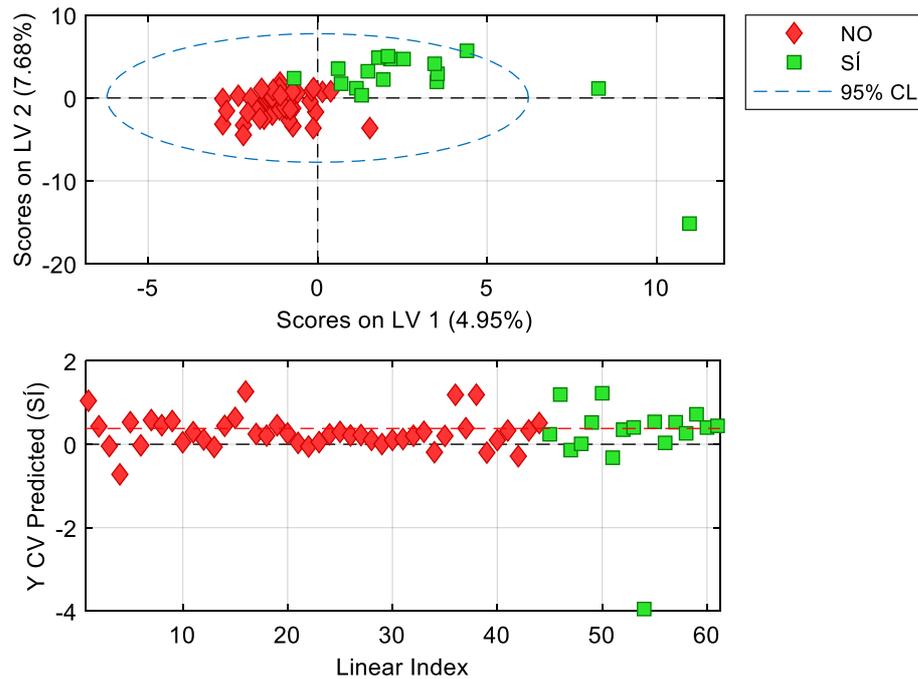


Figura 28. Representaciones gráficas obtenidas del modelo PLS-DA de los 117 metabolitos junto al PSA, que discrimina entre las muestras de orina de CaP que no recidivan de las que sí recidivan.

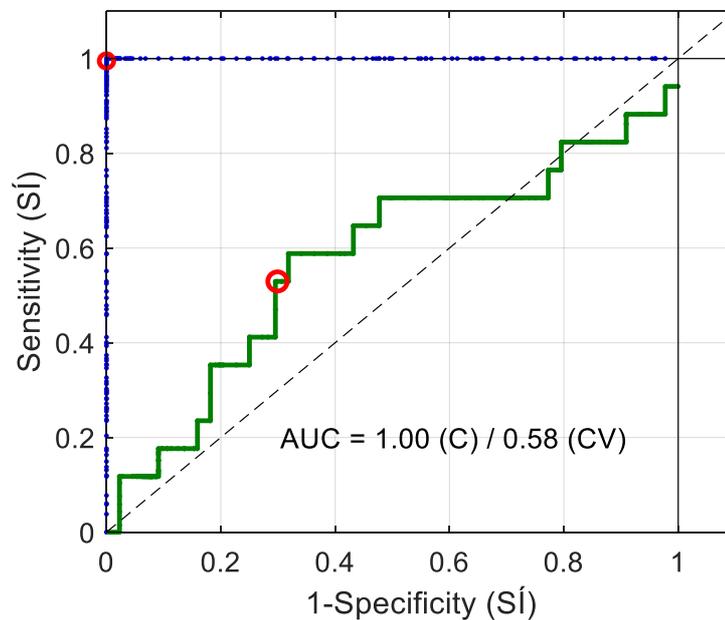


Figura 29. Curvas ROC estimadas con el modelo PLS-DA de los 117 metabolitos junto al PSA, que discrimina entre las muestras de orina de CaP que no recidivan de las que sí recidivan. La línea azul corresponde a los datos estimados y la línea verde, a la VC. Los límites seleccionados por el algoritmo PLS-DA para el cálculo de la sensibilidad y especificidad del modelo se muestran como un círculo rojo en cada una de las curvas.

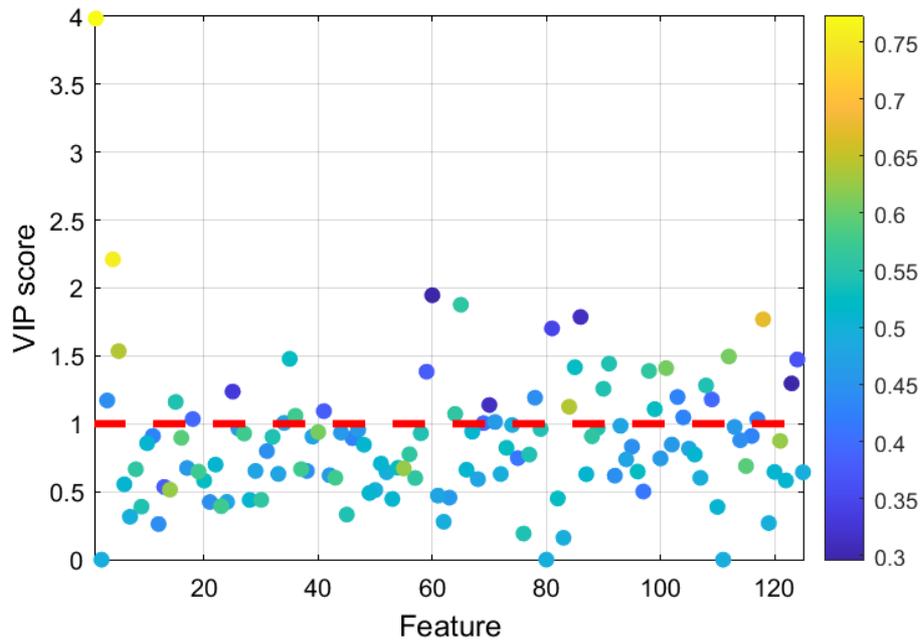


Figura 30. Modelo PLS-DA con los VIP scores de los 117 metabolitos y el PSA. El color de cada punto representa el AUC de cada variable en el estudio univariante previo.

Finalmente, se decidió optimizar el modelo con las 35 variables que obtuvieron un VIP >1, incluyendo al PSA. En esta ocasión, tras obtuvieron 2 LVs (figura 31). El diagrama de puntos de la figura 32 muestra cierto aumento de la capacidad de discriminación entre los dos grupos que se refleja en una mayor AUC (0,88) (figura 33), cuya tabla de confusión basada en CV (sensibilidad: 64,71%, especificidad 93,18%, precisión 85,25%) se resume en la tabla 12. Como mostrábamos anteriormente, representamos el modelo PLS-DA de las variables VIP >1 obteniendo un nuevo valor VIP para cada variable (figura 34).

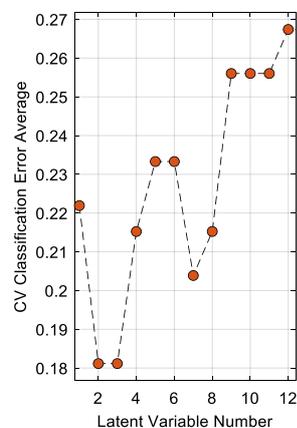


Figura 31. Obtención de variables latentes tras técnica de VC *leave-one-out*, teniendo en cuenta 35 variables con VIP >1, incluyendo al PSA.

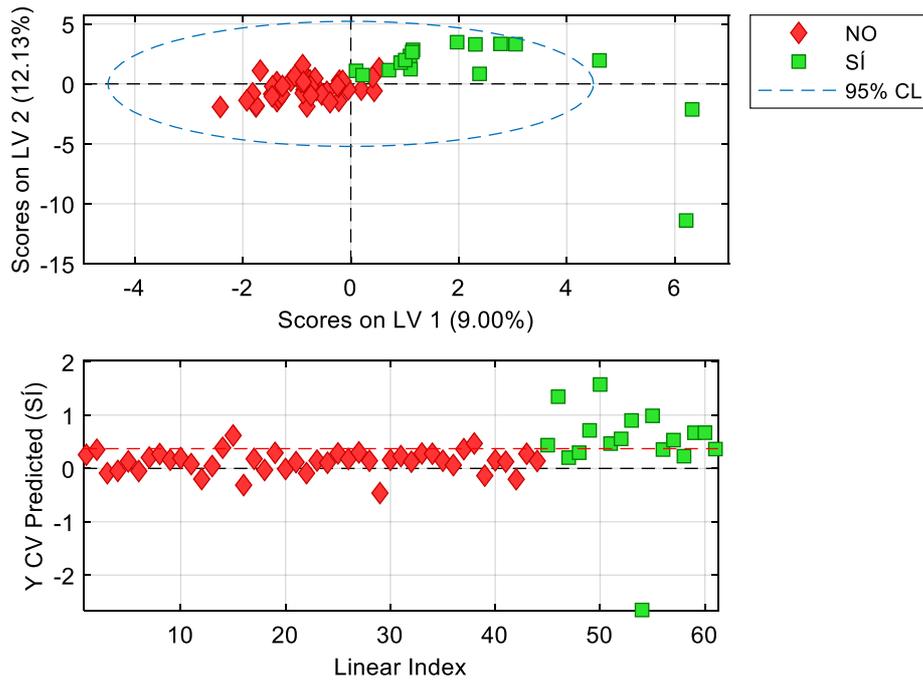


Figura 32. Representaciones gráficas obtenidas del modelo PLS-DA de las 35 variables con VIP >1, incluyendo al PSA, que discrimina entre las muestras de orina de CaP que no recidivan de las que sí recidivan.

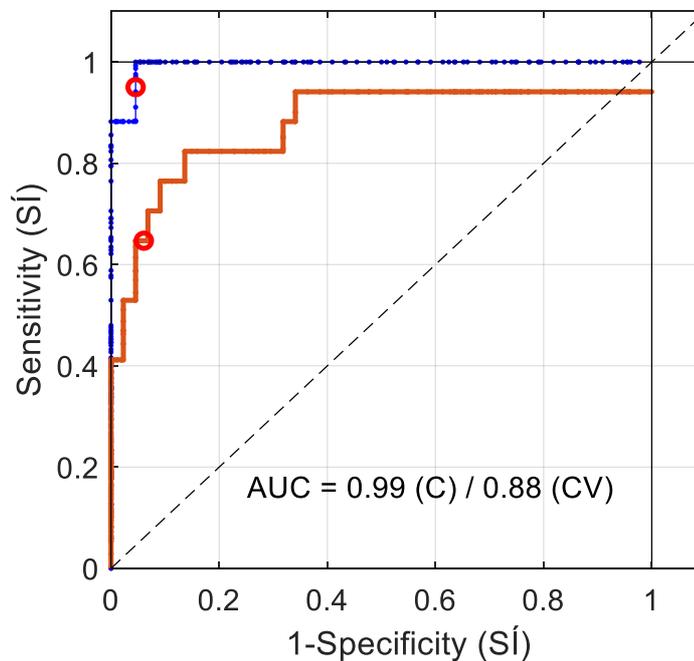


Figura 33. Curvas ROC estimadas con el modelo PLS-DA de las 35 variables con VIP >1, incluyendo al PSA, que discrimina entre las muestras de orina de CaP que no recidivan de las que sí recidivan. La línea azul corresponde a los datos estimados y la línea naranja, a la VC. Los límites seleccionados por 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.

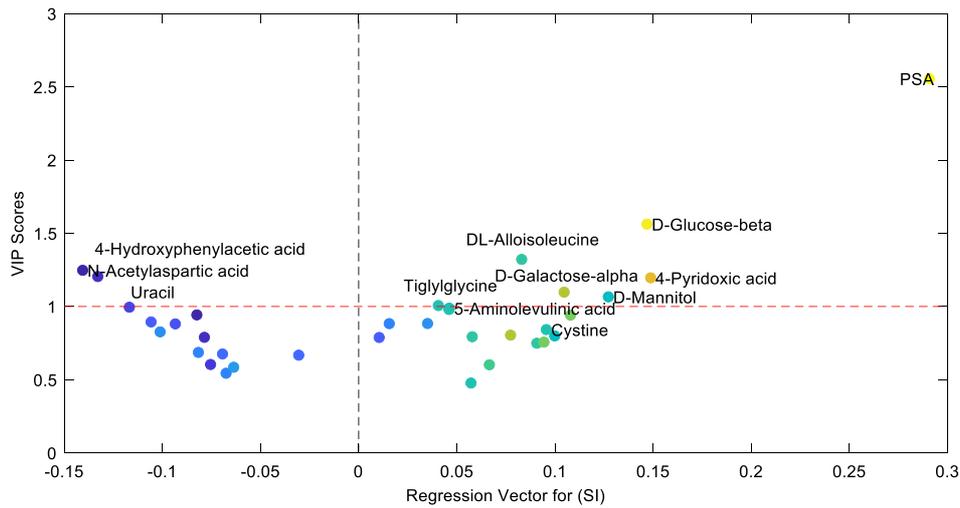


Figura 34. Modelo PLS-DA con los nuevos VIP scores de las 35 variables con VIP >1, incluyendo al PSA. El color de cada punto representa el AUC de cada variable en el estudio univariante previo.

Tabla 12: Resultado a partir de tablas de confusión calculadas por CV.
(IC: Intervalo de Confianza) (CV: Validación cruzada).

	Valor	IC_{95%}
Sensibilidad	64,71%	38,33-85,79%
Especificidad	93,18%	81,34-98,57%
Valor Predictivo Positivo	78,57%	53,79-92,03%
Valor Predictivo Negativo	87,23%	78,13-92,89%
Precisión	85,25%	73,83-93,02%

En definitiva, si comparamos los resultados de ambos modelos discriminantes (con y sin PSA) optimizados por $VIP > 1$, observamos que comparten 32 metabolitos (figura 35).

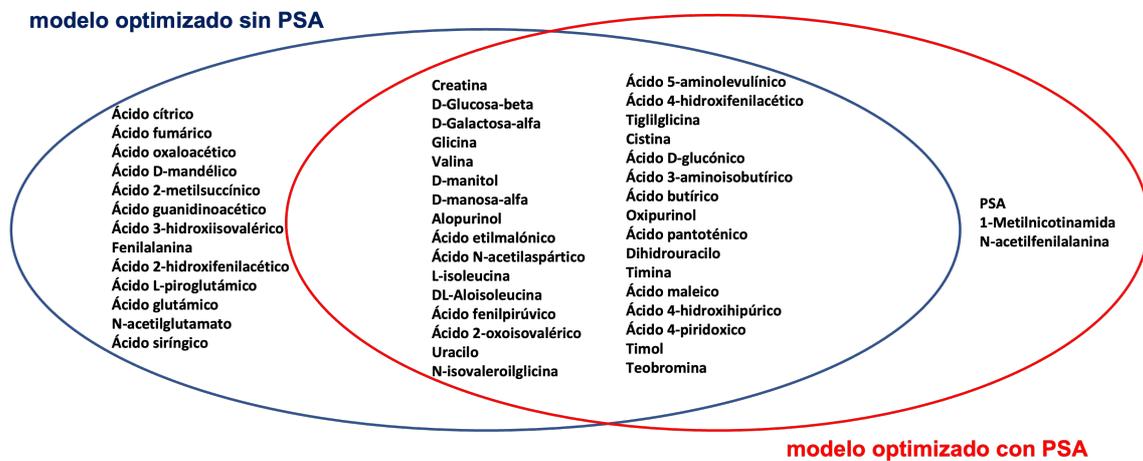


Figura 35. Resultado de ambos modelos discriminantes optimizados ($VIP > 1$) con (35 variables) y sin PSA (45 variables), donde se aprecia que comparten 32 metabolitos.

Capítulo 6

Discusión

El cáncer de próstata (CaP) es el segundo tumor más común y la quinta causa de muerte relacionada con el cáncer entre los hombres en todo el mundo. Tiene una tasa de crecimiento lenta y se diagnostica predominantemente cuando todavía está confinado dentro de la glándula prostática. Sin embargo, un subconjunto de CaP desarrolla una diseminación a distancia de la enfermedad, lo que ha generado una intensa investigación sobre la base molecular subyacente. Por lo contrario, en la población general la glándula prostática se agranda en asociación con la edad en condiciones no oncológicas que conocemos como hiperplasia prostática benigna (HPB).

La edad, los antecedentes familiares, la raza, el origen étnico, los factores genéticos, la geografía y el estilo de vida son factores de riesgo bien establecidos asociados a la patogénesis y progresión del CaP. Hay que destacar que el acceso a la atención médica y las campañas de diagnóstico precoz explican una mayor tasa de detección y un mejor pronóstico en los países desarrollados. La determinación de los niveles de PSA en sangre, el tacto rectal y la realización de BxP han sido clásicamente los métodos disponibles para el diagnóstico del CaP.

El PSA es una serina proteasa secretada por las células epiteliales de la próstata, cuyos valores normales suele aumentar significativamente en pacientes con CaP. Sin embargo, en ocasiones se trata de falsos positivos debido a que dicho incremento en el PSA es secundario a HBP, prostatitis u otras patologías prostáticas.

Como consecuencia, el PSA aislado no representa por sí mismo un BM específico de diagnóstico de CaP. Esto se debe a una serie de problemas, incluida la baja especificidad, la incapacidad de especificar un punto de corte por debajo del cual el cáncer es poco probable, la tasa de falsos negativos no triviales para la BxP, el sobrediagnóstico y el tratamiento excesivo de tumores relativamente indolentes con bajo potencial de morbilidad o muerte si no se trataran. En este sentido, la PTR es uno de los tratamientos curativos de primera línea que con mayor frecuencia se ofrecen a los hombres con CaP, especialmente en hombres con enfermedad clínicamente localizada y una esperanza de vida de al menos 10 años. A medida que dichos pacientes sobreviven cada vez más tiempo al CaP en estadio precoces con la consecuente mayor expectativa de vida, los resultados de calidad de vida relacionados con la salud se deben considerar a la hora de tomar decisiones terapéuticas, y valorar las posibles secuelas funcionales, que podrían mermar la calidad de vida del paciente, como la incontinencia urinaria y la disfunción eréctil.

Desde el punto de vista estrictamente oncológico, actualmente, existe controversia en cuanto a la valoración de la presencia de rBQ tras una PTR. Entre el 27% y el 53% de todos los pacientes sometidos a PTR desarrollan un aumento del PSA que cumpla criterios de rBQ (110). Si bien un aumento del nivel de PSA precede universalmente a la progresión local o a distancia, no siempre implica que esta elevación necesariamente acabe en enfermedad metastásica clínicamente significativa. De nuevo, se evidencia que la determinación aislada del PSA no posee la capacidad de discriminar por sí sola entre los pacientes que se beneficiarían de un tratamiento al retrasar la aparición de la enfermedad metastásica y/o la muerte, de aquellos a quienes la recaída no va a afectar su supervivencia global o calidad de vida.

En una reciente revisión sistemática y metaanálisis se valoró el impacto de la aparición de una rBQ tras PTR sobre el riesgo de desarrollar metástasis a distancia, mortalidad específica por CaP y mortalidad global, obteniendo un RR 1.03 (IC_{95%}: 1.004–1.06) a RR 2.32 (IC_{95%}: 1.45–3.71) (123), aunque este impacto en la supervivencia parece estar limitado a subgrupo de paciente con factores de riesgo clínicos específicos. Concluyen que los principales factores asociados a una peor supervivencia tras PTR fueron un tiempo de doblaje del PSA (PSA-DT) bajo y una puntuación de Gleason de la pieza quirúrgica; mientras que los factores asociados a una diseminación metastásica a distancia fueron, la presencia de márgenes positivos, un ISUP >2 en la pieza quirúrgica, estadiaje pT3a/b, un PSA-DT corto y un PSA elevado antes de RT de rescate.

En nuestra serie, todos los pacientes obtuvieron valores de PSA < 0,001 ng/mL al mes de la intervención quirúrgica, excepto el paciente que debutó con una enfermedad localmente avanzada (PSA 0,08 ng/mL). Destacamos que el diseño del estudio metabolómico comenzó en 2012, y que, durante un seguimiento mínimo de 5 años (57-183 meses), el 27,86% (17/61) presentaron una rBQ, definida por un valor de PSA > 0,04ng/ mL. No encontramos diferencias estadísticamente significativas en la edad media de los pacientes que recurrieron y los que no, ni tampoco en el estadiaje clínico (cT) o las características anatomopatológicas (ISUP) de la BxP; solamente la mediana de PSA fue casi el doble de los que no recurrieron (13,2 frente 7,35 ng/mL).

Sin embargo, tras la PTR se evidenciaron claras diferencias significativas en el estadiaje patológico (p 0,024), el grado ISUP de la pieza (p<0,001) y la presencia de márgenes quirúrgicos positivos (p 0,001). Este infraestadiaje de la BxP respecto a la anatomía patológica de la pieza quirúrgica del 29,50% (18/61) es congruente con lo publicado en la literatura (31,8-52%) (124), y refuerza la hipótesis del valor de nuevas herramientas predictivas, como la metabolómica, que puedan personalizar el tratamiento en función del pronóstico del CaP basado en las diferencias bioquímicas de las células neoplásicas.

Se ha popularizado la búsqueda de nuevos BM no invasivos en sangre u orina para mejorar la detección temprana de CaP, la predicción del riesgo y para aumentar la sensibilidad y la especificidad diagnóstica con la finalidad de estratificar a los pacientes en diferentes grupos de riesgo para un manejo óptimo. Así, encontramos que la medición de múltiples formas de calicreína en la sangre puede predecir el resultado de la biopsia en hombres previamente no examinados (125). El PCA3 varía significativamente con la orina de los pacientes con CaP (46) y tiene niveles razonables de sensibilidad y especificidad demostrados como biomarcador diagnóstico (126). Además, el factor de transcripción HOXC6 / DLX1, identificado por perfil de expresión génica, fue recomendado por la Asociación Europea de Urología en 2018 como una prueba para hombres asintomáticos con niveles elevados de PSA antes de la biopsia (127). Finalmente, a nivel genómico el gen de fusión TMRSS2: ERG es otro BM que se ha estudiado.

La metabolómica se ha convertido recientemente en una técnica para estudiar diferentes patologías debido a que los metabolitos son sensibles a las alteraciones dentro del organismo, así como a las variaciones externas en el medio ambiente, su estudio proporciona una descripción más completa y detallada del fenotipo. Los metabolitos son moléculas pequeñas con masa en el rango de masa de 80 a 1000 Da que son sustratos y productos de diferentes vías metabólicas. La espectroscopia de RMN es especialmente adecuada para estudios metabolómicos con potencial clínico debido a un bajo costo por muestra, sin necesidad de derivatización, alta reproducibilidad y su capacidad para cuantificar e identificar metabolitos conocidos y desconocidos, especialmente, para la caracterización de soluciones complejas (plasma, suero, tejido, orina, etc.) (128).

El uso de la orina para la realización de estudios metabolómicos tiene la ventaja de ser una técnica no invasiva, pero, sin embargo, su análisis puede estar afectado por la abundancia de componentes, el grado de dilución de la muestra, o estar artefactada por el hábito alimentario, fármacos que se eliminan por orina, lo que podría dificultar la interpretación de los perfiles metabólicos.

El CaP representa un modelo atractivo para el perfil de metabolitos debido al hecho de que, además de las características metabólicas asociadas con el desarrollo y la progresión del cáncer comunes a todas las neoplasias malignas (*efecto Warburg*), las células CaP pierden su capacidad de acumular zinc, que a su vez se supone que inhibe la capacidad de acumular citrato. Dado que esta característica es exclusiva de las células neoplásicas de la próstata, se puede plantear la hipótesis de que las alteraciones metabólicas dan lugar a una huella metabólica distintiva y específica de esta patología (129).

Sin embargo, la amplia variedad de BM propuestos en la literatura científica para proporcionar un diagnóstico precoz del CaP demuestra de alguna manera que ninguno de ellos alcanza plenamente el objetivo propuesto. Parece existir un consenso en la aceptación de que se precisan múltiples BM para poder mejorar la eficiencia diagnóstica general de metabolitos individuales, principalmente si se logra una interpretación multivariada de sus resultados. Sin embargo, todavía falta una comprensión clara de los procesos bioquímicos subyacentes que generan su variedad (130).

Nuestro grupo demostró en 2014 que la aplicación del análisis multivariante a los espectros de ^1H -RMN de muestras de orina puede ser un método adecuado y prometedor para la detección de CaP, al establecer un modelo capaz de clasificar correctamente muestras de pacientes con CaP frente los casos control, orina de pacientes con HBP (sensibilidad del 72%/especificidad del 100%) (131). En esta línea, Pérez-Rambla et al., encontraron diferencias entre el perfil metabólico de la orina de pacientes con CaP frente aquellos con HBP, destacando las concentraciones más altas de varios metabolitos como glutamato, aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) y uridina en el grupo de pacientes con CaP, mientras que las concentraciones de dimetilglicina, glicina, acetato de 4-imidazol y fumarato fueron más bajas en pacientes con CaP en comparación con aquellos con HBP (132). En esta línea, Zheng H. et. al., encontraron una asociación entre una menor concentración urinaria de la glicina y la progresión del CaP, sugiriendo la existencia de un metabolismo aumentado de glicina a sarcosina (133).

Un estudio reciente con una cohorte más numerosa de muestras de orina (>650) de pacientes con CaP e HBP, no se logró distinguir mediante el análisis multivariante diferencias entre los dos grupos desde el punto de vista metabolómico basado en RMN. No obstante, el análisis univariante sí reveló cambios significativos que discriminaban los metabolitos de la orina CaP de los de HBP. Los metabolitos en la orina de pacientes con CaP revelaron cambios en la vía relacionada con la biología del cáncer, destacando la glucólisis y el ciclo de la urea, cuyos metabolitos estaban disminuidos en la orina de los pacientes con CaP, postulando la noción de que el CaP reduce el gasto de nitrógeno y carbono para maximizar su uso en procesos anabólicos que apoyan el crecimiento de células cancerígenas (134).

La glutamina ejerce un papel importante en el aporte de carbono y nitrógeno para el metabolismo energético y la síntesis de proteínas para impulsar el crecimiento de las células tumorales (135); algunos autores encuentran que el nivel de glutamina en muestras de suero y orina tienden a disminuir conforme el CaP progresa mientras la concentración de glutamina y glutamato en muestras tisulares metastásica aumenta, sugiriendo que estos tejidos de CaP poseen una mayor captación de glutamina (136).

Si bien hemos observado que existen diferencias en la huella metabolómica entre la patología prostática benigna y la maligna, la hipótesis principal de esta tesis doctoral, motivado por la escasez de herramientas clínicas que predigan el comportamiento oncológico, es analizar si podíamos encontrar alguna diferencia en el perfil metabolómico en las muestras de orina entre los pacientes que recidivan o no durante el seguimiento, recogidas previamente a la intervención quirúrgica.

Desde el punto de vista del estudio quimiométrico, nuestros pacientes con CaP que recidivaron presentaron en el análisis univariante una mayor concentración estadísticamente significativa de α -D-galactosa, y menor de ácido 4-hidroxifenilacético y la timina en orina. Sin embargo, su interpretación biológica no queda clara en la literatura pues si bien unos autores concluyen que la elevación aberrante de dihidrotimina (metabolito intermedio de la timina en condiciones de anoxia) en plasma induce citotoxicidad, una mayor capacidad migratoria e invasividad, resistencia a la apoptosis y producción elevada de componentes de la matriz extracelular (137), otros autores muestran bajos niveles de dihidrotimina en plasma de pacientes con CaP, que atribuyen a que en el CaP se mantienen altos niveles de dihidrotimina en el interior de las células tumorales en lugar de liberarlas como exosomas (138).

La transformación maligna de los tejidos se ha asociado con una alteración de la glicosilación, al cambiar la estructura de carbohidratos de membrana y convertirse así en la causa principal de metástasis. Estas diferencias en la glicosilación de las proteínas se han observado dentro del tejido prostático patológico a diferencia de los normales, demostrando que los procesos neoplásicos intensifican la expresión de proteínas con los residuos de galactosa (139). Davitashvili E, et al., han publicado recientemente, que la expresión de lectinas específicas de galactosa en el citosol varía según el estadio de la patología prostática (HBP, HGPIN, CaP) pudiendo estar implicada en varios pasos de la progresión del tumor (140).

El 2-hidroxifenilacetato, sustrato de la enzima oxidorreductasas, está presente en todos los biofluidos, incluido próstata, riñón y vejiga. Akbari Z. et al, determinaron en un estudio transversal de que la concentración de 2-hidroxifenilacetato en pacientes diagnosticados de CaP estaba alterada respecto a sujetos sanos junto a otros metabolitos de la vía metabólica de la fenilalanina (141)

Nuestro modelo tras el análisis discriminante con los 45 metabolitos en orina que obtuvieron un $VIP > 1$, logra AUC (0,80) con una sensibilidad (70,59%), especificidad (84,09%) y precisión (80,33%) ajustado a CV. En este sentido, Clendinen CS et al, sugieren tras sus estudios metabolómicos realizados en suero de pacientes previos a la intervención quirúrgica, que hay cambios sistémicos significativos en múltiples rutas metabólicas entre los pacientes con rBQ y aquellos libres de enfermedad tras la cirugía, determinando 20 moléculas con capacidad de discriminar entre pacientes con rBQ y remisión con una precisión del 92,6%, una sensibilidad del 94,4% y una especificidad del 91,9%. Destacan alteraciones significativas en metabolitos asociados a ácidos nucleicos, como purinas y pirimidinas, correlacionándose positivamente con la rBQ, como marcadores para la transformación y progresión de las células neoplásicas.

Entre los estudios más relevantes de BM de recurrencia del CaP destacan, entre otros, el trabajo de Maxeiner quien identificó al fosfato de colina (fosforilcolina) como un importante componente del perfil metabólico en muestras tisulares que predice la recurrencia con un AUC de 0,78 (142). Este perfil se basó en los primeros nueve componentes principales de todos los metabolitos analizados y las loadings plots determinaron que el mio-Inositol y la espermina, ambos descritos previamente por Serkova et al. (143), en las secreciones prostáticas como huella metabólica para el diagnóstico de CaP, y el glutamato, componente descrito por Fan et al. (144), como la huella metabólica en plasma de agresividad, fueron los principales contribuyentes al perfil de recurrencia.

En este sentido, Stabler et al. (145), encontraron que la cisteína en plasma tenía un AUC de 0,82 como un marcador de recurrencia cuando se combinaba con el PSA, superando a otros dos metabolitos de la metionina: homocisteína (AUC, 0,78) y cistationina (AUC, 0,79). Cuando se combinaron estos tres metabolitos, el AUC fue de 0,86, lo que proporcionó una mayor capacidad para detectar la recurrencia sobre las variables clínicas aisladas.

Finalmente, decidimos optimizar el modelo discriminante incluyendo al PSA como la variable clínica más significativas en el análisis descriptivo inicial, reduciéndose a 35 variables que obtuvieron un VIP >1 (comparte 32 metabolitos con el modelo sin PSA), donde el diagrama de puntos muestra cierto aumento de la capacidad de discriminación entre los dos grupos que se refleja en una mayor AUC (0,88) con una sensibilidad (64,71%), especificidad (93,18%) y precisión (85,25%), similar a otros nomogramas aceptados como el de CAPRA que combina el PSA al diagnóstico, el estadiaje clínico, el grado de Gleason y el porcentaje del número de cilindros afectados de BxP, que logra un AUC (0,78-0,81) (146). Hay varios motivos por los que este nuevo modelo optimizado con la presencia del PSA pueda proporcionar una mayor especificidad y menor sensibilidad que el modelo discriminante previo:

- Selección del nivel de corte (*threshold*): un corte alto para una clasificación positiva provoca una alta especificidad y baja sensibilidad.
- Análisis sobre una población en la que hay una proporción de casos negativos hubiera sido mucho mayor que de positivos, que no es el caso de esta Tesis Doctoral, podría ocurrir que se aumente la especificidad sobre la sensibilidad.
- Sobreajuste del modelo (*model overfitting*): un sobreajuste de un modelo puede hacer que tenga una buena capacidad de ajuste de los datos que se usan para entrenar/desarrollar el modelo, pero baja capacidad de predicción para nuevos datos, y ahí puede ocurrir disminuya la sensibilidad.

En general, el haber determinado diferencias significativas entre pacientes recurrentes y no recurrentes en las concentraciones de otros metabolitos diferentes a los publicados que discriminaban un perfil metabólico diferencial entre HBP y CaP, sugiere que estos últimos podrían solo correlacionarse con la presencia de CaP, pero no necesariamente con la presencia de una rBQ el seguimiento posterior. No obstante, los BM más prometedores a ser candidatos para predecir la recurrencia de la enfermedad según la literatura reciente son la fosforilcolina, mioinositol, espermina, glutamato, cisteína, colina, creatina, glutamina y lípidos.

Nuestros hallazgos del perfil metabolómico en la orina prequirúrgica no logran discriminar con precisión a los pacientes con rBQ de aquellos que permanecerán libres de enfermedad tras la intervención quirúrgica. Las causas que podría justificar estos resultados podrían deberse bien a un insuficiente tamaño muestral que interfiera en el poder discriminante resultante al combinar un modelo clínico y metabolómico, bien a la falta de potencia estadística que minimiza el efecto. Otros factores que podrían haber artefactado nuestros resultados probablemente sea la presencia de variables confusoras no controladas, la falta de homogeneidad en las condiciones que cada paciente entregaba la muestra de orina o la alta variabilidad dentro de cada grupo del estudio.

Es importante tener en cuenta que, de los miles de metabolitos presentes en la orina, solo unos pocos cientos pudieron ser identificadas. Muchos metabolitos intermedios no pudieron ser identificados a pesar de los intentos de hacerlo. Además, las vías metabólicas de las que se obtuvieron una mayor concentración de metabolitos pueden que no sean necesariamente las únicas vías alteradas en los pacientes que desarrollan una rBQ. Las limitaciones inherentes de los métodos de RMN, sensibilidad relativamente baja/ superposición de espectros, podrían compensarse con el uso conjunto de otras plataformas metabolómicas (LC-MS), aunque la ionización y la supresión de iones pueden seguir dificultando la identificación de los componentes.

Capítulo 7

Conclusión

Estudios previos han identificado perfiles metabólicos con capacidad discriminativa entre la patología prostática benigna (HBP) y patología maligna (CaP). No obstante, dicha evidencia en la literatura sugiere que la metabolómica podría permitir una predicción más certera del desarrollo de una rBQ después de PTR que los criterios clínicos existentes.

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

1. La metabolómica, como técnica analítica sistemática en rápido crecimiento, examina los metabolitos en sistemas complejos, consecuencia de procesos celulares específicos, y proporciona patrones fenotípicos sensibles y dinámicos que reflejan de una forma más exacta los cambios celulares y moleculares durante el inicio y la progresión del cáncer.
2. El diseño de nuestro estudio, la sistematización en la recogida de muestras previa a la cirugía aumenta la potencia estadística de los resultados al disminuir el efecto de errores sistemáticos y aleatorios asociados a la etapa analítica.
3. La buena reproducibilidad de los aspectos cuantitativos obtenidos, en combinación con los métodos estadísticos multivariantes, hace de la $^1\text{H-RMN}$ una herramienta muy fiable.

4. Nuestro modelo metabolómico en orina con todos los metabolitos detectados no logra ser discriminante de forma significativa entre los pacientes con rBQ de aquellos que permanecerán libres de enfermedad.
5. Nuestro modelo clínico-metabolómico optimizado con el PSA y los 35 metabolitos en orina con una mayor contribución en el modelo, presenta una buena capacidad de discriminación para predecir el desarrollo de recidiva bioquímica. Los componentes destacados en este punto pertenecen al metabolismo de la Galactosa, vitamina B6, glicolisis/ glucogénesis y glicerofosfolípidos, entre otros.
6. Nuestros resultados deben completarse con muestras más amplias y estratificadas, que logren una huella metabólica validada externamente. El conjunto de metabolitos identificados servirá para desarrollar un BM urinario para el diagnóstico no invasivo de CaP y su correlación con la agresividad tumoral de este.
7. Consideramos su potencial traslación a la práctica clínica habitual junto con otras variables aceptadas, como el nivel de PSA sérico, el estadio clínico y el grado del tumor, determinando la rentabilidad de la cirugía radical, ya que los consecuentes riesgos asociados (incontinencia urinaria y disfunción eréctil) no estarían justificados si supiéramos de antemano que la cirugía tiene poca probabilidad de lograr la remisión de la enfermedad.

Capítulo 8

Referencias Bibliográficas

1. Vázquez Fresno R. Estudio metabolómico de biomarcadores nutricionales en estudio de intervención mediante resonancia magnética nuclear. Intervención con alimentos, complementos y patrones alimentarios. Universidad de Barcelona; 2015.
2. Lucarelli G, Rutigliano M, Galleggiante V, Giglio A, Palazzo S, Ferro M, et al. Metabolomic profiling for the identification of novel diagnostic markers in prostate cancer. 2015;
3. Vali R, Loidl W, Pirich C, Langesteger W, Beheshti M. Imaging of prostate cancer with PET/CT using (18)F-Fluorocholine. *Am J Nucl Med Mol Imaging*. 2015;5(2):96-108.
4. Tao Z, Shi A, Wang K, Zhang W. Epidemiology of prostate cancer : current status. 2015;805-12.
5. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). LAS CIFRAS DEL CANCER EN ESPAÑA 2022. 2022;
6. Gómez-Veiga F, Rodríguez-Antolín A, Villavicencio H. Registro nacional de cáncer de próstata 2010 en España. 2014;37(1):12-9.
7. Larrañaga N, Galceran J, Ardanaz E, Franch P, Navarro C, Sánchez MJ, et al. Prostate cancer incidence trends in Spain before and during the prostate-specific antigen era: Impact on mortality. *Annals of Oncology*. 2010;21(SUPPL.3).
8. Forman D, Bray F, Brewster D. Cancer Incidence in Five Continents. *IARC Sci Publ*. 2014;X(164):881-906.
9. Potosky AL, Miller BA, Albertsen PC, Kramer BS. The role of increasing detection in the rising incidence of prostate cancer. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1995;273(7):548-52.
10. De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO CARE-5-a population-based study. *Lancet Oncol*. 2013;2045(13):1-12.
11. Sant M, Allemani C, Santaquilani M, Knijn A, Marchesi F, Capocaccia R. EURO CARE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary. *Eur J Cancer*. 2009;45(6):931-91.
12. Verdecchia A, Guzzinati S, Francisci S, De Angelis R, Bray F, Allemani C, et al. Survival trends in European cancer patients diagnosed from 1988 to 1999. *Eur J Cancer*. 2009;45(6):1042-66.
13. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*. 2013;132(5):1133-45.

14. Atkinson A.J. J, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth DF, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. Vol. 69, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2001. p. 89-95.
15. Ferrís-i-Tortajada J, García-i-Castell J, Berbel-Tornero O, Ortega-García JA. Constitutional risk factors in prostate cancer. *Actas Urol Esp*. 2011;35(5):282-8.
16. Ferrís-I-Tortajada J, Berbel-Tornero O, Garcia-I-Castell J, López-Andreu JA, Sobrino-Najul E, Ortega-García JA. Non dietetic environmental risk factors in prostate cancer. *Actas Urol Esp*. 2011;35(5):289-95.
17. Discacciati A, Wolk A. Lifestyle and dietary factors in prostate cancer prevention. *Recent Results Cancer Res*. 2014;202:27-37.
18. Schaid DJ. The complex genetic epidemiology of prostate cancer. *Hum Mol Genet*. 2004;13 Spec No:R103-21.
19. Ostrander EA, Udler MS. The role of the BRCA2 gene in susceptibility to prostate cancer revisited. Vol. 17, *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2008. p. 1843-8.
20. Easton DF, Schaid DJ, Whittemore AS, Isaacs WJ. Where are the prostate cancer genes?--A summary of eight genome wide searches. *Prostate*. 2003;57(4):261-9.
21. Simard J, Dumont M, Labuda D, Sinnott D, Meloche C, El-Alfy M, et al. Prostate cancer susceptibility genes: lessons learned and challenges posed. *Endocr Relat Cancer*. 2003;10(2):225-59.
22. Ostrander E a., Kwon EM, Stanford JL. Genetic susceptibility to aggressive prostate cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2006;15(10):1761-4.
23. Langeberg WJ, Isaacs WB, Stanford JL. Genetic etiology of hereditary prostate cancer. *Front Biosci*. 2007;12:4101-10.
24. Ostrander EA, Johannesson B. Prostate cancer susceptibility loci: Finding the genes. En: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2008. p. 179-90.
25. Stanford JL, Ostrander E a. Familial prostate cancer. *Epidemiol Rev*. 2001;23(1):19-23.
26. Han M, Partin AW, Pound CR, Epstein JI, Walsh PC. LONG-TERM BIOCHEMICAL DISEASE-FREE AND CANCER-SPECIFIC SURVIVAL FOLLOWING ANATOMIC RADICAL RETROPUBIC PROSTATECTOMY The 15-Year Johns Hopkins Experience Patient Population and Inclusion Criteria.
27. Liesenfeld L, Kron M, Gschwend JE, Herkommer K. Prognostic Factors for Biochemical Recurrence More than 10 Years after Radical Prostatectomy. *Journal of Urology*. 2017 ene 1;197(1):143-8.
28. Zietman AL, Edelstein RA, Coen JJ, K Babayan BR, Krane RJ. RADICAL PROSTATECTOMY FOR ADENOCARCINOMA OF THE PROSTATE: THE INFLUENCE OF PREOPERATIVE AND PATHOLOGIC FINDINGS ON BIOCHEMICAL DISEASE-FREE OUTCOME.
29. May M, Knoll N, Siegsmund M, Fahlenkamp D, Vogler H, Hoschke B, et al. Validity of the CAPRA Score to Predict Biochemical Recurrence-Free Survival After Radical Prostatectomy. Results From a European Multicenter Survey of 1,296 Patients. *Journal of Urology*. 2007 nov;178(5):1957-62.

30. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, Buys SS, Chia D, Church TR, et al. Prostate cancer screening in the randomized prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial: Mortality results after 13 years of follow-up. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104(2):125-32.
31. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TLJ, Ciatto S, Nelen V, et al. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med.* 2009;360(13):1320-8.
32. Moyer V. Screening for prostate cancer: US Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med.* 2012;157(2):120-34.
33. Cooperberg MR, Broering JM, Carroll PR. Time trends and local variation in primary treatment of localized prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(7):1117-23.
34. Johansson JE, Andrén O, Andersson SO, Dickman PW, Holmberg L, Magnuson A, et al. Natural history of early, localized prostate cancer. *JAMA : the journal of the American Medical Association.* 2004;291(22):2713-9.
35. Wilt TJ, Brawer MK, Jones KM, Barry MJ, Aronson WJ, Fox S, et al. Radical prostatectomy versus observation for localized prostate cancer. *N Engl J Med.* 2012;367(3):203-13.
36. Cooperberg MR, Broering JM, Kantoff PW, Carroll PR. Contemporary trends in low risk prostate cancer: risk assessment and treatment. *J Urol.* 2007;178(3 Pt 2):S14-9.
37. Mitsiades CS, Lembessis P, Sourla A, Milathianakis C, Tsintavis A, Koutsilieris M. Molecular staging by RT-PCR analysis for PSA and PSMA in peripheral blood and bone marrow samples is an independent predictor of time to biochemical failure following radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer.
38. Filson CP, Marks LS, Litwin MS. Expectant management for men with early stage prostate cancer. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(4):265-82.
39. Knepper M a. Common sense approaches to urinary biomarker study design. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(6):1175-8.
40. Ukimura O, Coleman JA, De La Taille A, Emberton M, Epstein JI, Freedland SJ, et al. Contemporary role of systematic prostate biopsies: Indications, techniques, and implications for patient care. Vol. 63, *European Urology.* 2013. p. 214-30.
41. Massouh S, Aliaga A, Reyes D, Román J, Vega A, Walton-Díaz ;, et al. GENOMIC BIOMARKERS IN PROSTATE CANCER: WHICH, WHEN AND WHAT FOR? [Internet]. Available from: <https://revistasacademicas.cl/schu>
42. Tosoian JJ, Ross AE, Sokoll LJ, Partin AW, Pavlovich CP. Urinary Biomarkers for Prostate Cancer. *Urologic Clinics of North America.* 2016;43(1):17-38.
43. Fernandez-Serra A, Casanova-Salas I, Rubio L, Calatrava A, García-Flores M, García-Casado Z, et al. Actualización en el diagnóstico del cáncer de próstata en orina. Papel actual de los marcadores urinarios. *Arch Esp Urol.* 2015;68(3):240-9.
44. Urquidi V, Rosser CJ, Goodison S. Molecular diagnostic trends in urological cancer: biomarkers for non-invasive diagnosis. *Curr Med Chem.* 2012;19(22):3653-63.
45. Wei JT. Urinary biomarkers for prostate cancer. *Curr Opin Urol.* 2015;25(1):77-82.

46. Bussemakers MJG, van Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HFM, Schalken JA, et al. DD3: A new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res.* 1999;59(23):5975-9.
47. De Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW, Hessels D, Kiemeny LA, Aalders TW, et al. DD3PCA3, a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res.* 2002;62(9):2695-8.
48. 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.* 2013;
49. Sokoll LJ, Ellis W, Lange P, Noteboom J, Elliott DJ, Deras IL, et al. A multicenter evaluation of the PCA3 molecular urine test: Pre-analytical effects, analytical performance, and diagnostic accuracy. *Clinica Chimica Acta.* 2008;389(1-2):1-6.
50. Haese A, de la Taille A, van Poppel H, Marberger M, Stenzl A, Mulders PFA, et al. Clinical Utility of the PCA3 Urine Assay in European Men Scheduled for Repeat Biopsy. *Eur Urol.* 2008;54(5):1081-8.
51. Nakanishi H, Groskopf J, Fritsche HA, Bhadkamkar V, Blase A, Kumar SV, et al. PCA3 Molecular Urine Assay Correlates With Prostate Cancer Tumor Volume: Implication in Selecting Candidates for Active Surveillance. *Journal of Urology.* 2008;179(5):1804-10.
52. Tomlins S a, 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.
53. Attard G, Clark J, Ambrosine L, Fisher G, Kovacs G, Flohr P, et al. Duplication of the fusion of TMPRSS2 to ERG sequences identifies fatal human prostate cancer. *Oncogene.* 2008;27(3):253-63.
54. Attard G, Swennenhuis JF, Olmos D, Reid AHM, Vickers E, A'Hern R, et al. Characterization of ERG, AR and PTEN gene status in circulating tumor cells from patients with castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res.* 2009;69(7):2912-8.
55. Laxman B, Tomlins S a, Mehra R, Morris DS, Wang L, Helgeson BE, et al. Noninvasive detection of TMPRSS2:ERG fusion transcripts in the urine of men with prostate cancer. *Neoplasia.* 2006;8(10):885-8.
56. Pettersson A, Graff RE, Bauer SR, Pitt MJ, Lis RT, Stack EC, et al. The TMPRSS2:ERG rearrangement, ERG expression, and prostate cancer outcomes: a cohort study and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012;21(9):1497-509.
57. Leyten GHJM, Hessels D, Jannink S a, Smit FP, De Jong H, Cornel EB, et al. Prospective multicentre evaluation of PCA3 and TMPRSS2-ERG gene fusions as diagnostic and prognostic urinary biomarkers for prostate cancer. *Eur Urol.* 2014;65(3):534-42.
58. Casanova-Salas I, Rubio-Briones J, Fernández-Serra A, López-Guerrero JA. MiRNAs as biomarkers in prostate cancer. *Clinical and Translational Oncology.* 2012;14(11):803-11.
59. Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.* 2009;23(7):781-3.

60. Chung W, Kwabi-Addo B, Ittmann M, Jelinek J, Shen L, Yu Y, et al. Identification of novel tumor markers in prostate, colon and breast cancer by unbiased methylation profiling. *PLoS One*. 2008;3(4).
61. Bernardini S, Miano R, Iori R, Finazzi-Agrò E, Palmieri G, Ballerini S, et al. Hypermethylation of the CpG islands in the promoter region of the GSTP1 gene in prostate cancer: A useful diagnostic and prognostic marker? *Clinica Chimica Acta*. 2004;350(1-2):181-8.
62. Rehman I, Azzouzi AR, Catto JWF, Allen S, Cross SS, Feeley K, et al. Proteomic analysis of voided urine after prostatic massage from patients with prostate cancer: A pilot study. *Urology*. 2004;64(6):1238-43.
63. Schostak M, Schwall GP, Poznanović S, Groebe K, Müller M, Messinger D, et al. Annexin A3 in Urine: A Highly Specific Noninvasive Marker for Prostate Cancer Early Detection. *Journal of Urology*. 2009;181(1):343-53.
64. Roy R, Louis G, Loughlin KR, Wiederschain D, Kilroy SM, Lamb CC, et al. Tumor-specific urinary matrix metalloproteinase fingerprinting: Identification of high molecular weight urinary matrix metalloproteinase species. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(20):6610-7.
65. Roobol MJ, Haese A, Bjartell A. Tumour markers in prostate cancer III: biomarkers in urine. *Acta Oncol*. 2011;50 Suppl 1:85-9.
66. Dijkstra S, Birker IL, Smit FP, Leyten GHJM, De Reijke TM, Van Oort IM, et al. Prostate cancer biomarker profiles in urinary sediments and exosomes. *Journal of Urology*. 2014;191(4):1132-8.
67. Mitchell PJ, Welton J, Staffurth J, Court J, Mason MD, Tabi Z, et al. Can urinary exosomes act as treatment response markers in prostate cancer? *J Transl Med*. 2009;7:4.
68. Bijnsdorp I V, Geldof AA, Lavaei M, Piersma SR, van Moorselaar RJA, Jimenez CR. Exosomal ITGA3 interferes with non-cancerous prostate cell functions and is increased in urine exosomes of metastatic prostate cancer patients. *J Extracell Vesicles*. 2013;2:1-10.
69. Wishart DS. Advances in metabolite identification. *Bioanalysis*. 2011;3(15):1769-82.
70. Kell DB. Metabolomics, modelling and machine learning in systems biology – towards an understanding of the languages of cells. *{FEBS} Journal*. 2006;273(5):873–894.
71. Tomita M, Kami K. Systems Biology, Metabolomics, and Cancer Metabolism. *Science (1979)*. 2012;336(6084):990-1.
72. Kell DB. Metabolomics, modelling and machine learning in systems biology – towards an understanding of the languages of cells. *{FEBS} Journal*. 2006;273(5):873–894.
73. Lindon JC, Holmes E. A Survey of Metabonomics Approaches for Disease Characterisation. En: *The Handbook of Metabonomics and Metabolomics*. 2007. p. 413-42.
74. Bezabeh T, Ijare OB, Nikulin AE, Somorjai RL, Smith IC. MRS-based Metabolomics in Cancer Research. *Magn Reson Insights*. 2014;1-14.
75. Griffin JL, Shockcor JP. Metabolic profiles of cancer cells. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(July):551-61.
76. Costello LC, Franklin RB. The intermediary metabolism of the prostate: a key to understanding the pathogenesis and progression of prostate malignancy. *Oncology*. 2000;59(4):269-82.

77. Costello LC, Franklin RB. The clinical relevance of the metabolism of prostate cancer; zinc and tumor suppression: connecting the dots. *Mol Cancer*. 2006;5:17.
78. Deberardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. 2016;(May).
79. Eidelman E, Twum-Ampofo J, Ansari J, Siddiqui MM. The metabolic phenotype of prostate cancer. Vol. 7, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2017.
80. Kobus T, Wright AJ, Weiland E, Heerschap A, Scheenen TWJ. Metabolite ratios in ¹H MR spectroscopic imaging of the prostate. *Magn Reson Med*. 2015;73(1):1-12.
81. Roberts MJ, Schirra HJ, Lavin MF, Gardiner R a. Metabolomics: A novel approach to early and noninvasive prostate cancer detection. *Korean J Urol*. 2011;52(2):79-89.
82. Serkova NJ, Gamito EJ, Jones RH, O'Donnell C, Brown JL, Green S, et al. The metabolites citrate, myo-inositol, and spermine are potential age-independent markers of prostate cancer in human expressed prostatic secretions. *Prostate*. 2008;68(6):620-8.
83. Lima AR, Bastos MDL, Carvalho M, Pinho PG De. *Translational Oncology and Biomarker Discovery in Human Prostate Cancer: an Update in Metabolomics Studies*. *TRANON*. 2016;9(4):357-70.
84. Lauridsen M, Hansen SH, Jaroszewski JW, Cornett C. Human urine as test material in ¹H NMR-based metabolomics: Recommendations for sample preparation and storage. *Anal Chem*. 2007;79(3):1181-6.
85. Saude EJ, Adamko D, Rowe BH, Marrie T, Sykes BD. Variation of metabolites in normal human urine. *Metabolomics*. 2007;3(4):439-51.
86. 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.
87. Kuligowski J, Perez-Guaita D, Sanchez-Illana A, Leon-Gonzalez Z, de la Guardia M, Vento M, et al. Analysis of multi-source metabolomic data using joint and individual variation explained (JIVE). *Analyst*. 2015;140(13):4521-9.
88. Chan ECY, Pasikanti KK, Hong Y, Ho PC, Mahendran R, Raman Nee Mani L, et al. Metabonomic profiling of bladder cancer. Vol. 14, *Journal of Proteome Research*. 2015. p. 587-602.
89. Bruce SJ, Tavazzi I, Parisod V, Rezzi S, Kochhar S, Guy PA. Investigation of human blood plasma sample preparation for performing metabolomics using ultrahigh performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem*. 2009;81(9):3285-96.
90. Tiziani S, Emwas AH, Lodi A, Ludwig C, Bunce CM, Viant MR, et al. Optimized metabolite extraction from blood serum for ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anal Biochem*. 2008;377:16-23.
91. Koutros S, Meyer TE, Fox SD, Issaq HJ, Veenstra TD, Huang WY, et al. Prospective evaluation of serum sarcosine and risk of prostate cancer in the prostate, lung, colorectal and ovarian cancer screening trial. *Carcinogenesis*. 2013;34(10):2281-5.
92. Kumar D, Gupta A, Mandhani A, Sankhwar SN. Metabolomics-Derived Prostate Cancer Biomarkers: Fact or Fiction? *J Proteome Res*. 2015;14(3):1455-64.

93. 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. 2012;(Lc):3677-86.
94. Beckonert OP, Keun HC, Ebbels TMD, Bundy JG, Holmes E, Lindon JC, et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc.* 2007;2(11):2692-703.
95. Teahan O, Gamble S, Holmes E, Waxman J, Nicholson JK, Bevan C, et al. Impact of analytical bias in metabonomic studies of human blood serum and plasma. *Anal Chem.* 2006;78(13):4307-18.
96. Gika HG, Theodoridis GA, Wilson ID. Liquid chromatography and ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry fingerprinting of human urine. Sample stability under different handling and storage conditions for metabonomics studies. *J Chromatogr A.* 2008;1189(1-2):314-22.
97. Wong MCY, Lee WTK, Wong JSY, Frost G, Lodge J. An approach towards method development for untargeted urinary metabolite profiling in metabonomic research using UPLC/QToF MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008;871(2):341-8.
98. Kemperman RF, Horvatovich PL, Hoekman B, Reijmers TH, Muskiet FA, Bischoff R. Comparative urine analysis by liquid chromatography-mass spectrometry and multivariate statistics: method development, evaluation, and application to proteinuria. *J Proteome Res.* 2007;6(1):194-206.
99. Drake RR, White KY, Fuller TW, Igwe E, Clements MA, Nyalwidhe JO, et al. Clinical collection and protein properties of expressed prostatic secretions as a source for biomarkers of prostatic disease. *J Proteomics.* 2009;72(6):907-17.
100. Truong M, Yang B, Jarrard DF. Toward the detection of prostate cancer in urine: a critical analysis. *J Urol.* 2013;189(2):422-9.
101. Taverna G, Tidu L, Grizzi F, Torri V, Mandressi A, Sardella P, et al. Olfactory system of highly trained dogs detects prostate cancer in urine samples. *Journal of Urology.* 2015;193(4):1382-7.
102. Gebregiworgis T, Powers R. Application of NMR Metabolomics to Search for Human Disease Biomarkers. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2012;15(8):595-610.
103. Skoog D, Holler F, Crouch S. Principles of instrumental analysis. Belmont, CA: Thomson Brooks/ Cole; 2007.
104. Bothwell JHF, Griffin JL. An introduction to biological nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biological Reviews.* 2011;86(2):493-510.
105. Serkova NJ, Niemann CU. Pattern recognition and biomarker validation using quantitative ¹H-NMR-based metabolomics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2006;6(5):717-31.
106. Raftery D. High-throughput NMR spectroscopy. *Anal Bioanal Chem.* 2004;378(6):1403-4.
107. Gueron M, Plateau P, Decorps M. Solvent Signal Suppression in NMR. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc.* 1991;23:135-209.
108. Lindon JC, Nicholson JK. Spectroscopic and statistical techniques for information recovery in metabonomics and metabolomics. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif).* 2008;1:45-69.

109. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours. Vol. 10, Clinical Oncology. 2009.
110. N. Mottet (Chair), P. Cornford (Vice-chair), R.C.N. van den Bergh, E. Briers. European Association of Urology. Guidelines on Prostate Cancer. 2022;
111. Gleason DF, Mellinger GT. Prediction of Prognosis for Prostatic Adenocarcinoma by Combined Histological Grading and Clinical Staging. *Journal of Urology*. 1974 ene;111(1):58-64.
112. Epstein JI, Allsbrook WCJ, Amin MB, Egevad LL. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2016;40(2):244-52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26492179>
113. 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. *European Urology*. 2015;
114. Shen MM, Abate-Shen C, Kregel S, Kiriluk KJ, Rosen AM, Cai Y, et al. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *PLoS One*. 2013;8(2):244-52.
115. 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* [Internet]. 2005;173(6):1938-42. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2948569&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
116. Preisser F, Cooperberg MR, Crook J, Feng F, Graefen M, Karakiewicz PI, et al. Intermediate-risk Prostate Cancer: Stratification and Management. Vol. 3, *European urology oncology*. NLM (Medline); 2020. p. 270-80.
117. Xia J, Wishart DS. Using metaboanalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2016;2016:14.10.1-14.10.91.
118. Trygg J, Holmes E, Lundstedt T. Chemometrics in metabonomics. Vol. 6, *Journal of Proteome Research*. 2007. p. 469-79.
119. Zubiri Gaitán A. Análisis metabolómico no dirigido en dos líneas de conejo seleccionadas de forma divergente para grasa intramucular. 2018.
120. Westerhuis JA, Hoefsloot HCJ, Smit S, Vis DJ, Smilde AK, Velzen EJJ, et al. Assessment of PLS-DA cross validation. *Metabolomics*. 2008 mar;4(1):81-9.
121. Goeman JJ, Bühlmann P. Analyzing gene expression data in terms of gene sets: Methodological issues. *Bioinformatics*. 2007 abr 15;23(8):980-7.
122. Ma J, Shojaie A, Michailidis G. A comparative study of topology-based pathway enrichment analysis methods. *BMC Bioinformatics*. 2019 nov 4;20(1).
123. van den Broeck T, van den Bergh RCN, Arfi N, Gross T, Moris L, Briers E, et al. Prognostic Value of Biochemical Recurrence Following Treatment with Curative Intent for Prostate Cancer: A Systematic Review. Vol. 75, *European Urology*. Elsevier B.V.; 2019. p. 967-87.
124. Abedi AR, Basiri A, Shakhssalim N, Sadri G, Ahadi M, Hojjati SA, et al. The Discrepancy between Needle Biopsy and Radical Prostatectomy Gleason Score in Patients with Prostate Cancer. *Urol J*. 2021;18(4):395-9.

125. Russo GI, Regis F, Castelli T, Favilla V, Privitera S, Giardina R, et al. A Systematic Review and Meta-analysis of the Diagnostic Accuracy of Prostate Health Index and 4-Kallikrein Panel Score in Predicting Overall and High-grade Prostate Cancer. Vol. 15, *Clinical Genitourinary Cancer*. Elsevier Inc.; 2017. p. 429-439.e1.
126. Cui Y, Cao W, Li Q, Shen H, Liu C, Deng J, et al. Evaluation of prostate cancer antigen 3 for detecting prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2016 may 10;6.
127. van den Broeck T, van den Bergh RCN, Arfi N, Gross T, Moris L, Briers E, et al. Prognostic Value of Biochemical Recurrence Following Treatment with Curative Intent for Prostate Cancer: A Systematic Review. Vol. 75, *European Urology*. Elsevier B.V.; 2019. p. 967-87.
128. Tan CH, Wang J, Kundra V. Diffusion weighted imaging in prostate cancer. *Eur Radiol*. 2011 mar;21(3):593-603.
129. Lima AR, Pinto J, Barros-Silva D, Jerónimo C, Henrique R, Bastos M de L, et al. New findings on urinary prostate cancer metabolome through combined GC-MS and ¹H NMR analytical platforms. *Metabolomics* [Internet]. 2020;16(6):70. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11306-020-01691-1>
130. Amante E, Cerrato A, Alladio E, Capriotti AL, Cavaliere C, Marini F, et al. Comprehensive biomarker profiles and chemometric filtering of urinary metabolomics for effective discrimination of prostate carcinoma from benign hyperplasia. *Sci Rep*. 2022 dic 1;12(1).
131. Zaragoza P, Ruiz-Cerdá JL, Quintás G, Gil S, Costero AM, León Z, et al. Towards the potential use of ¹H NMR spectroscopy in urine samples for prostate cancer detection. *Analyst* [Internet]. 2014;139(16):3875. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4AN00690A>
132. Pérez C, Leonor R, Carrasco P, García M. Non-invasive urinary metabolomic profiling discriminates prostate cancer from benign prostatic hyperplasia. *Metabolomics*. 2017;0(0):0.
133. Zheng H, Dong B, Ning J, Shao X, Zhao L, Jiang Q, et al. NMR-based metabolomics analysis identifies discriminatory metabolic disturbances in tissue and biofluid samples for progressive prostate cancer. *Clinica Chimica Acta*. 2020 feb 1;501:241-51.
134. Bruzzone C, Loizaga-Iriarte A, Loizaga-Iriarte A, Sánchez-Mosquera P, Gil-Redondo R, Astobiza I, et al. ¹H NMR-Based Urine Metabolomics Reveals Signs of Enhanced Carbon and Nitrogen Recycling in Prostate Cancer. *J Proteome Res*. 2020 jun 5;19(6):2419-28.
135. Altman BJ, Stine ZE, Dang C v. From Krebs to clinic: Glutamine metabolism to cancer therapy. Vol. 16, *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2016. p. 619-34.
136. Dasgupta S, Putluri N, Long W, Zhang B, Wang J, Kaushik AK, et al. Coactivator SRC-2' dependent metabolic reprogramming mediates prostate cancer survival and metastasis. *Journal of Clinical Investigation*. 2015 mar 2;125(3):1174-88.
137. Benedetti I, Reyes N. Transición epitelial-mesenquimal en la progresión del adenocarcinoma prostático. *Iatreia*. IATREIA. 2015;28(4):420-33.
138. Wu D, Pengyu L. Alterations of plasma exosomal proteins and metabolites are associated with the progression of castration-resistant prostate cancer. 2022.

139. Compagno D, Gentilini LD, Jaworski FM, Pérez IG, Contrufo G, Laderach DJ. Glycans and galectins in prostate cancer biology, angiogenesis and metastasis. Vol. 24, *Glycobiology*. Oxford University Press; 2014. p. 899-906.
140. Davitashvili E, Burjanadze G, Dachanidze N, Koshoridze M, Koshoridze N. Some Biological Effects of Galactose-Specific Lectins from Prostate Tissue with Different Pathologies in Tumor Cells Model In vitro. Vol. 9, *J Urol Res*. 2022.
141. Akbari Z, Dijojin RT, Zamani Z, Hosseini RH, Arjmand M. Aromatic amino acids play a harmonizing role in prostate cancer: A metabolomics-based cross-sectional study. *Int J Reprod Biomed*. 2021 ago 1;19(8):741-50.
142. 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.
143. Serkova NJ, Gamito EJ, Jones RH, O'Donnell C, Brown JL, Green S, et al. The metabolites citrate, myo-inositol, and spermine are potential age-independent markers of prostate cancer in human expressed prostatic secretions. *Prostate*. 2008 may 1;68(6):620-8.
144. Fan Y, Murphy TB, Byrne JC, Brennan L, Fitzpatrick JM, Watson RWG. Applying random forests to identify biomarker panels in serum 2D-DIGE data for the detection and staging of prostate cancer. *J Proteome Res*. 2011 mar 4;10(3):1361-73.
145. Stabler S, Koyama T, Zhao Z, Martinez-Ferrer M, Allen RH, Luka Z, et al. Serum methionine metabolites are risk factors for metastatic prostate cancer progression. *PLoS One*. 2011;6(8).
146. Beckmann K, O'Callaghan M, Vincent A, Roder D, Millar J, Evans S, et al. Australian validation of the Cancer of the Prostate Risk Assessment Post-Surgical score to predict biochemical recurrence after radical prostatectomy. *ANZ J Surg*. 2018 mar 1;88(3):E183-8.

Capítulo 9

Anexos

Anexo 1. Consentimiento informado para donación y almacenamiento de muestras orina



Consentimiento informado para la donación voluntaria de muestras biológicas para investigación al biobanco del... (1 de 6)

1. Identificación y descripción del procedimiento

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

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

2. Objetivo

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

3. Condiciones de la donación

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

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

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

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

4. Consecuencias previsibles de su realización

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

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

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

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



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

(2 de 6)

5. Derecho de revocación del consentimiento

La decisión de donar sus muestras es totalmente voluntaria. Usted puede negarse a donarlas e incluso puede revocar su consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación y sin que ello tenga ninguna repercusión en la atención médica que recibe en el Centro.

Si revoca el consentimiento que ahora presta, la parte de las muestras que no se hayan utilizado en la investigación, podrá decidir que sean destruidas o anonimizadas. Tales efectos no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo antes de la revocación de su consentimiento.

6. Riesgos

La donación de sangre apenas tiene efectos secundarios; lo más frecuente es la aparición de pequeños hematomas en las zonas de punción que desaparecen transcurridos 1 ó 2 días.

7. Protección de datos personales y confidencialidad

Los datos personales y de salud obtenidos de su historia clínica o equivalente serán incorporados y tratados en una base de datos que cumple con las garantías que establece la legislación sanitaria y sobre protección de datos de carácter personal.

La cesión a otros centros de investigación, públicos o privados, de sus muestras o de sus derivados, así como de la información contenida en las bases de datos vinculada a las mismas y a su estado de salud, se realizará mediante un procedimiento de disociación, esto es, suprimiendo la información personal que la identifica y sustituyéndola por un código.

Es posible que en el desarrollo de un proyecto de investigación se genere mucha información genética de sus muestras. Si los resultados fueran relevantes desde el punto de vista científico, la información obtenida, desligada de cualquier dato que pueda permitir su identificación por medios razonables, podría ser remitida para su inclusión en bases científicas y demás medios de difusión de contenido científico a los que tendrán acceso, con carácter restringido, investigadores científicos.

El biobanco en el que se custodiarán sus muestras forma parte de la Red Valenciana de Biobancos cuya coordinación es llevada a cabo por el Centro Superior de Investigación de Salud Pública de la Comunitat Valenciana.

Como consecuencia de lo anterior, el ente coordinador de la Red Valenciana de Biobancos, esto es, el Centro Superior de Investigación en Salud Pública de la Comunitat Valenciana, tendrá acceso a sus datos personales y a la información clínica asociada a la muestra donada voluntariamente, con el único fin de cumplir con las labores atribuidas a la Red Valenciana de Biobancos en virtud de la legislación vigente. En particular, el eventual acceso a sus datos personales por parte de la Red Valenciana de Biobancos tendrá como finalidad poder coordinar de la manera más eficiente posible desde el punto de vista científico la información obtenida por los biobancos adscritos a la Red Valenciana de Biobancos, mediante la gestión y coordinación del Sistema de Gestión de la Información de la Red Valenciana de Biobancos, así como la coordinación de las actividades desarrolladas por los biobancos, todo ello de acuerdo con la normativa aplicable.

Podrá ejercitar sus derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición, para lo cual tiene en el biobanco el correspondiente formulario de solicitud. En dicho escrito, deberá adjuntar copia de su DNI para que el Centro responsable de sus datos pueda comprobar su identidad.

8. Seguro

Los profesionales de enfermería que colaboran con el biobanco tienen un seguro de responsabilidad civil con _____, concertado con _____
 Poliza Nº: _____ que cubre el acto profesional, en este caso la extracción, y por tanto también las extracciones realizadas con fines de investigación.



RED VALENCIANA DE BIOBANCOS

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



EJEMPLAR PARA EL BIOBANCO

Declaración de consentimiento

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

DNI y nº de SIP

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

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

DECLARO

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

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

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

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

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

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

Una/s muestra/s de

Que puedo incluir restricciones sobre el uso de las mismas:

CONSIENTO

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

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

A completar por el donante:

Fdo.: D./Dª
 DNI:

A completar por el profesional de salud

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

En a de de 20.....

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

EJEMPLAR PARA EL DONANTE

Declaración de consentimiento

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

DNI y nº de SIP

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

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

DECLARO

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

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

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

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

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

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

Una/s muestra/s de

Que puedo incluir restricciones sobre el uso de las mismas:

CONSIENTO

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

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

A completar por el donante:

Fdo.: D./Dª
DNI:

A completar por el profesional de salud

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

En a de de 20.....



RED VALENCIANA DE BIOBANCOS

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



EJEMPLAR PARA EL CENTRO

Declaración de consentimiento

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

DNI y nº de SIP

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

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

DECLARO

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

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

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

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

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

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

Una/s muestra/s de

Que puedo incluir restricciones sobre el uso de las mismas:

CONSIENTO

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

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

A completar por el donante:

Fdo.: D./Dª
 DNI:

A completar por el profesional de salud

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

En a de de 20.....

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

Revocación del consentimiento

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

A completar por el donante:

Fdo.: D./Dª
DNI:

A completar por el profesional de salud

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

En a de de 20.....



Anexo 2. Informe Comité Ético de Investigación Biomédica del IIS la Fe.



DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

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

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado en su sesión de fecha **5 de mayo de 2015**, el Proyecto de Investigación titulado "**ACCION PREPARATORIA: ANCAPRO. ANALISIS MULTIPLATAFORMA EN LA DETECCION DE CANCER DE PROSTATA DE ACUERDO A LA CARGA TUMORAL.**", con nº de registro **2014/0626**.

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

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

Miembros del CEIB:

Presidente:

Dr. JUAN SALOM SANVALERO (Unidad de Circulación Cerebral Experimental)

Vicepresidente:

Dr. JOSE VICENTE CERVERA ZAMORA (Hematología)

Secretario:

D. SERAFIN RODRIGUEZ CAPELLAN (Asesor jurídico)

Miembros:

Dr. SALVADOR ALIÑO PELLICER (Catedrático Farmacólogo Clínico)
 Dra. BELEN BELTRAN NICLOS (Medicina Digestiva)
 Dra. INMACULADA CALVO PENADES (Reumatología Pediátrica)
 Dr. JOSE VICENTE CASTELL RIPOLL (Director de Investigación)
 Dra. REMEDIOS CLEMENTE GARCIA ((Medicina Intensiva) (Miembro CBA))
 Dra. MARIA JOSE GOMEZ-LECHON MOLINER (Investigadora del Grupo Acreditado en Hepatología Experimental)
 Dr. RAMIRO JOVER ATIENZA (Doctor en biología-Universidad de Valencia- Unidad de Bioquímica y Biología Molecular)
 Dr. JAVIER PEGAN GARCIA (Investigador del Grupo Acreditado multidisciplinar para el estudio de la Infección Grave)
 Dr. ALFREDO PERALES MARIN (Jefe de Servicio - Obstetricia)
 Dr. JOSE LUIS PONCE MARCO (Unidad de Cirugía Endocrino Metabólica)
 Dr. JOSE LUIS VICENTE SANCHEZ (Jefe de sección-Unidad de Reanimación)
 Dra. PILAR SAENZ GONZALEZ (Neonatología)
 Dr. MELCHOR HOYOS GARCIA (Gerente del Departamento de salud nº 7-La Fe)
 Dra. BEGOÑA POLO MIQUEL (Gastroenterología Pediátrica)
 Dr. ISIDRO VITORIA MIÑANA (Pediatria)



Comisión de Investigación

Valencia a 10 de Junio de 2014.

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

INFORMA:

Que el Proyecto de Investigación titulado: "ACCION PREPARATORIA: ANCAPRO. ANALISIS MULTIPLATAFORMA EN LA DETECCION DE CANCER DE PROSTATA DE ACUERDO A LA CARGA TUMORAL" que presenta el Dr. **José Luis Ruiz** del Servicio de Urología del Hospital La Fe de Valencia, contiene elementos objetivos suficientes en cuanto a la Hipótesis, Planteamientos y Plan de Trabajo que, a juicio de esta Comisión, permiten pronunciarse **positivamente** en cuanto a su viabilidad.



José Vicente Castell Ripoll
Presidente de la Comisión de Investigación



Dr. José Luis Ruiz Cerda
Servicio de Urología

Asunto: Autorización Inicio Estudio.

Valencia, 10 de Junio de 2015.

Adjunto le remito copia de los Informes Científico y Ético de Investigación, en el que se acuerda informar **favorablemente** sobre el Proyecto de Investigación titulado "ACCION PREPARATORIA: ANCAPRO. ANALISIS MULTIPLATAFORMA EN LA DETECCION DE CANCER DE PROSTATA DE ACUERDO A LA CARGA TUMORAL", por usted presentado.

A la vista de los dictámenes emitidos, dicho Proyecto, puede iniciarse y llevarse a cabo.

Atentamente,



José Vicente Castell Ripoll
Director General