

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE  
LOS ALIMENTOS “JOSÉ MATAIX VERDÚ”

EL SERVICIO DE ONCOLOGÍA MÉDICA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA  
DEL COMPLEJO HOSPITALARIO DE JAÉN

EL DEPARTAMENTO DE MEDICINA EXPERIMENTAL, UNIVERSIDAD DE  
LLEIDA-INSTITUT DE RECERCA BIOMÈDICA (UDL-IRBLLLEIDA)

PROGRAMA DE DOCTORADO NUTRICIÓN HUMANA Y  
CIENCIA DE LOS ALIMENTOS



**UNIVERSIDAD  
DE GRANADA**

**PERFIL METABOLÓMICO PLASMÁTICO  
EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA**

TESIS DOCTORAL

RICARDO COLLADO MARTÍN

2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Ricardo Collado Martín  
ISBN: 978-84-9163-233-7  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/46941>

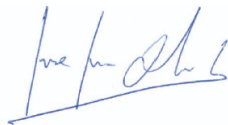
D. José Luis Quiles Morales. Catedrático de la Universidad de Granada, Departamento de Fisiología.

D. Pedro Sánchez Rovira. Jefe de Servicio de Oncología Médica del Complejo Hospitalario de Jaén.

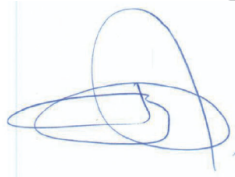
**CERTIFICAN:**

Que los trabajos de investigación que se exponen en la Memoria de Tesis Doctoral: **“Perfil metabolómico plasmático en pacientes con cáncer de mama”**, han sido realizados bajo nuestra dirección por el licenciado en Medicina D. Ricardo Collado Martín y lo encontramos conforme para ser presentado y aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Granada con el Tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos el presente en Granada a tres de Marzo de dos mil diecisiete.



Dr. D. José Luis Quiles Morales



Dr. D. Pedro Sánchez Rovira





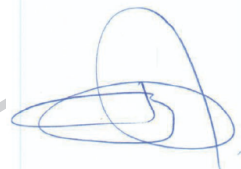
El doctorando Ricardo Collado Martín y los directores de la tesis Dr. D. José Luis Quiles Morales, y la Dr. D. Pedro Sánchez Rovira, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

En Granada, a 3 de Marzo de dos mil diecisiete

Directores de la Tesis



JOSÉ LUIS QUILES MORALES



PEDRO SÁNCHEZ ROVIRA

Doctorando



RICARDO COLLADO MARTÍN



1531





MEMORIA QUE PRESENTA EL LDO. RICARDO COLLADO MARTÍN PARA  
ASPIRAR AL GRADO DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

ESTA TESIS DOCTORAL HA SIDO REALIZADA BAJO LA DIRECCIÓN DE:

Dr. D. José Luis Quiles Morales

Dr. D. Pedro Sánchez Rovira

Ldo. D. Ricardo Collado Martín

Granada, 2017



Gracias a todos los que han hecho posible este trabajo

A mis directores de tesis

A María del Carmen Ramírez Tortosa, Catedrática de Bioquímica y  
Biología Molecular Departamento de Bioquímica y Biología Molecular,  
Facultad de Farmacia

Al Servicio de Oncología Médica del Complejo Hospitalario de Jaén.

Al Departamento de Medicina Experimental de la Universidad de Lleida.  
Institut de Recerca Biomèdica (UdL-IRBLleida).

A mi familia y amigos.

A María.





**ÍNDICE**

## **ÍNDICE GENERAL**

<b>17</b>	ABREVIATURAS
<b>23</b>	RESUMEN
<b>27</b>	JUSTIFICACIÓN
<b>31</b>	INTRODUCCIÓN:
<b>33</b>	Aspectos generales del cáncer de mama
<b>33</b>	Epidemiología descriptiva del cáncer de mama
<b>33</b>	1.2 Factores de riesgo
<b>34</b>	1.2.1 Antecedentes personales de cáncer de mama
<b>34</b>	1.2.2 Historia familiar
<b>34</b>	1.2.3 Historia ginecológica
<b>35</b>	1.2.4 Dieta
<b>35</b>	1.2.5 Patrón mamográfico
<b>35</b>	1.2.6 Radiación
<b>36</b>	1.2.7 Actividad física
<b>36</b>	1.3 Factores pronósticos y predictivos
<b>37</b>	1.3.1 Factores pronósticos
<b>37</b>	1.3.1.1 Estado ganglionar
<b>37</b>	1.3.1.2 Tamaño
<b>37</b>	1.3.1.3 Tipo histológico
<b>38</b>	1.3.1.4 Grado histológico
<b>38</b>	1.3.1.5 Invasión vascular y linfática
<b>39</b>	1.3.1.6 Metástasis en médula ósea
<b>39</b>	1.3.1.7 Células tumorales circulantes
<b>39</b>	1.3.1.8 Edad



<b>39</b>	1.3.1.9 Embarazo
<b>39</b>	1.3.1.10 Proliferación
<b>40</b>	1.3.1.11 p53 y otros genes mutados
<b>41</b>	1.3.2 Factores pronósticos moleculares: perfiles genómicos
<b>41</b>	1.3.2.1 Subtipo Luminal (A, B)
<b>42</b>	1.3.2.2 Subtipo HER2
<b>42</b>	1.3.2.3 Subtipo triple negativo y/o “Basal Like”
<b>43</b>	1.3.2.4 Otros perfiles de expresión génica
<b>43</b>	1.3.3 Factores predictivos
<b>43</b>	1.3.3.1 Estado hormonal
<b>44</b>	1.3.3.2 HER2
<b>45</b>	1.3.3.3 $\mu$ PA/PAI
<b>45</b>	1.3.3.4 Susceptibilidad genética
<b>45</b>	1.4 Clínica y diagnóstico del cáncer de mama
<b>46</b>	1.5 Tratamiento
<b>46</b>	1.5.1 Tratamiento local/locorregional
<b>46</b>	1.5.1.1 Cirugía
<b>46</b>	1.5.1.2 Radioterapia
<b>47</b>	1.5.2 Tratamiento sistémico
<b>47</b>	1.5.2.1 Hormonoterapia
<b>48</b>	1.5.2.2 Quimioterapia
<b>48</b>	1.5.2.3 Terapia anti-HER2
<b>50</b>	1.5.2.4 Terapias dirigidas a VEGF
<b>50</b>	Ciencias “-ómicas”
<b>50</b>	2.1 Potencialidad de las ciencias “-ómicas” en el cáncer: pronóstico y diagnóstico
<b>51</b>	2.2 Limitaciones de las ciencias “-ómicas”
<b>52</b>	Metabolómica

<b>52</b>	3.1 Definición
<b>53</b>	3.2 Análisis metabolómico
<b>56</b>	3.2.1 Espectroscopía de RMN
<b>57</b>	3.2.1.1 Espectroscopía bidimensional
<b>57</b>	3.2.1.2 Espectroscopía de alta resolución por ángulo mágico
<b>57</b>	3.2.2 Espectroscopía de masas
<b>59</b>	3.2.3 Reconocimiento de patrones
<b>59</b>	3.2.3.1 Análisis de componentes principales
<b>59</b>	3.2.3.2 Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales
<b>59</b>	3.2.3.3 Análisis lineal discriminante
<b>60</b>	3.2.3.4 Análisis por vecinos cercanos
<b>60</b>	3.2.3.5 Redes neuronales
<b>60</b>	3.3 Metabolómica y medicina
<b>61</b>	3.4 Metabolómica aplicada a la oncología
<b>62</b>	3.4.1 Metabolómica como biomarcador en la oncología
<b>62</b>	3.4.1.1 El metaboloma del cáncer
<b>62</b>	3.4.1.2 Diagnóstico de cáncer
<b>63</b>	3.4.1.3 Evaluación de la respuesta al tratamiento
<b>64</b>	3.4.1.4 Novedades terapéuticas
<b>64</b>	3.4.2 El futuro de la metabolómica en la oncología
<b>65</b>	3.5 Metabolómica y cáncer de mama
<b>66</b>	3.5.1 Implicaciones clínicas
<b>66</b>	3.5.1.1 Diagnóstico y estadiaje
<b>68</b>	3.5.1.2 Diferencias entre normal, benigno o maligno
<b>68</b>	3.5.1.3 Factores pronósticos y predictivos
<b>69</b>	3.5.2 Eficacia del tratamiento y nuevos fármacos diana
<b>70</b>	3.5.3 Predicción y detección de toxicidad

<b>70</b>	3.5.4 Biofluidos
<b>70</b>	3.6 Metabolómica y cáncer de mama con muestras de suero
<b>71</b>	3.6.1 Metabolómica y cáncer de mama con muestras de suero como método diagnóstico
<b>73</b>	HIPÓTESIS
<b>77</b>	OBJETIVOS
<b>81</b>	MATERIAL Y MÉTODOS
<b>83</b>	1. Diseño experimental
<b>83</b>	2. Población de estudio
<b>83</b>	2.1 Criterios de inclusión de las pacientes
<b>84</b>	2.2 Criterios de exclusión de las pacientes
<b>85</b>	2.3 Pérdidas durante el seguimiento
<b>85</b>	3. Consideraciones éticas
<b>85</b>	4. Variables clínicas e histopatológicas
<b>85</b>	4.1 Variables clínicas
<b>86</b>	4.2 Variables histopatológicas
<b>87</b>	4.3 Datos de seguimiento
<b>87</b>	5. Análisis metabólico
<b>87</b>	5.1 Extracción de plasma de sangre periférica
<b>87</b>	5.2 Envío de las muestras
<b>88</b>	5.3 Preparación de las muestras
<b>88</b>	5.4 Separación y detección de los metabolitos
<b>89</b>	5.5 Análisis de datos e identificación de metabolitos
<b>91</b>	RESULTADOS
<b>93</b>	1. Análisis de variables clínicas e histopatológicas
<b>93</b>	2. Separación y detección de metabolitos

<b>95</b>	3. Análisis de datos
<b>95</b>	3.1 Análisis de componentes principales (PCA)
<b>96</b>	3.2 Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA)
<b>96</b>	3.3 Influencia de las variables en la firma metabolómica
<b>98</b>	3.4 Análisis de “Random Forest”
<b>99</b>	4. Identificación de los metabolitos alterados y vías metabólicas implicadas
<b>104</b>	5. Análisis por curvas de rendimiento diagnóstico
<b>109</b>	DISCUSIÓN
<b>117</b>	CONCLUSIONES
<b>121</b>	BIBLIOGRAFÍA
<b>151</b>	ANEXO I
<b>155</b>	ANEXO II
<b>165</b>	ANEXO III
<b>183</b>	ANEXO IV
<b>187</b>	ANEXO V
<b>199</b>	ANEXO VI





## **ABREVIATURAS**

El contenido de esta tesis incluye una serie de abreviaturas y anglicismos que se han empleado, dada su frecuencia de uso en la literatura científica consultada. Exponemos, a continuación, las manejadas en este trabajo:

### **A**

AC: doxorubicina, ciclofosfamida

AD: doxorubicina, docetaxel

AJCC: American Joint Committee for Cancer Staging

AKT: proteína quinasa B

ASAT: aspartato amino transferasa

ATM: gen ataxia telangiectasia

ALAT: alanina amino transferasa

AUC: área bajo la curva

### **B**

BCAA: aminoácidos de cadena ramificada

BRCA1: breast cancer 1

BRCA2: breast cancer 2

BSGC: biopsia selectiva del ganglio centinela

### **C**

cADN: microarray de ácido desoxirribonucleico complementario

Ccr: Aclaramiento de creatinina

CDH1: cadherina 1

CHEK2: serina/treonina proteína kinasa 2

CISH: hibridación *in situ* cromogénica

CMF: ciclofosfamida, metotrexate, 5-Fluorouracilo

COX-2: ciclooxigenasa 2

## **E**

EC: epirrubicina, ciclofosfamida.

EGFR: epidermal growth factor receptor

ESI: fuente de ionización por electrospray

## **F**

FAlc: Fosfatasa alcalina

FC: Fold change

FEC: 5 fluorouracilo, epirrubicina, ciclofosfamida

FISH: hibridación *in situ* fluorescente

FTIR: Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier

## **G**

G1: grado 1 de respuesta de la escala Miller y Payne

G2: grado 2 de respuesta de la escala Miller y Payne

G3: grado 3 de respuesta de la escala Miller y Payne

G4: grado 4 de respuesta de la escala Miller y Payne

G5: grado 5 de respuesta de la escala Miller y Payne

GC: cromatografía de gases

## **H**

HDMB: base de datos del metaboloma humano

HER2: HER2/c-neu o c-erbB-2, factor de crecimiento epidérmico

HR-MAS: espectroscopía de RMN de alta resolución por giro de ángulo mágico

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

## **I**

IMC: índice de masa corporal

IGF1R: Insulin like growth factor 1 receptor



IUAPC: Interntional Union of Pure and Applied Chemistry

## **K**

KNN: Análisis por vecinos cercanos

## **L**

LA: Luminal A

LB: Luminal B

LC: cromatografía líquida

LDA: Análisis lineal discriminante

LNS: límite superior de la normalidad

## **M**

mDa: millidalton

MS: espectroscopía de masas

MS/MS: tándem de espectrómetros de masas

mTOR: mammalian target of rapamycin

m/z: relación entre la masa y la carga

## **N**

NX: vinorelbina, capecitabina.

## **P**

PAAF: Punción y aspiración por aguja fina

PAI: inhibidor 1 del activador del plasminógeno

PALB2: Partner and localizer of BRCA2

PARP: Polimerasa ADP-Ribosa

PLS-DA: Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales

PCA: análisis de componentes principales

PI3K: fosfoinositol-3-quinasa

Ppm: partes por millón

PTEN: gen que codifica la enzima catalizadora la reacción de hidrólisis del grupo fosfato del carbono 3 del fosfatidilinositol-3, 4, 5-trisfosfato.

## **Q**

QN: quimioterapia neoadyuvante

Q-TOF: combinación de espectrómetro de cuadrupolo con espectrómetro de tiempo de vuelo.

## **R**

RB: gen del retinoblastoma

RE: receptores de estrógeno

RMN: espectroscopía de resonancia magnética nuclear

ROC: curva de rendimiento diagnóstico

RP: receptores de progesterona

RPc: respuesta patológica completa

## **S**

SG: supervivencia global

SLE: supervivencia libre de enfermedad

## **T**

TAC: docetaxel, doxorubicina, ciclofosfamida

TNM: Tumor, node, metastases

TOF: espectrómetros de tiempo de vuelo

## **U**

μPA: activador del plasminógeno tipo uroquinasa

UPLC: cromatografía líquida de ultra-alta resolución



**RESUMEN**



## **RESUMEN**

### **Introducción**

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente entre las mujeres y surge como resultado del avance en el desarrollo de la carcinogénesis, un proceso vinculado a unos profundos cambios metabólicos y moleculares, mediante los cuales una célula normal se transformará en maligna.

Por otro lado, el término metabolómica, hace referencia al estudio, identificación y cuantificación del conjunto de metabolitos presentes en células, tejidos o fluidos biológicos productos de las reacciones metabólicas en los seres vivos, cuya cuantificación proporciona un amplio conocimiento del estatus bioquímico. Los perfiles metabolómicos permiten la identificación de metabolitos en tejidos y en biofluidos, cuyos niveles se ven alterados ante la existencia de una patología neoplásica, proporcionando un nexo de unión que nos facilite información acerca de la oncogénesis.

Por tanto, la dependencia del tumor de su huésped conforma el racional biológico bajo el que se sostiene nuestra investigación metabolómica, en este caso, centrada en el diagnóstico del cáncer de mama, destacando, además la ventaja de haberse llevado a cabo sobre muestras de suero, lo que conlleva poder evitar complicaciones propias de las técnicas clásicas invasivas para la obtención de material biológico, como pueden ser las hemorragias, infecciones o, incluso, la diseminación tumoral. Los resultados obtenidos podrán, posteriormente, aplicarse en el screening y diagnóstico del cáncer de mama.

### **Hipótesis**

Los estudios mediante espectrometría de masas pueden permitir confirmar la existencia de un perfil metabolómico fisiológico-patológico, propio del cáncer, siendo éste directamente detectable a través del análisis del propio suero de las pacientes. Esto permitirá obtener una herramienta diagnóstica no invasiva, que aportará un mejor conocimiento de esta enfermedad.

### **Objetivos**

De tal forma, los objetivos de este estudio consisten en seleccionar y optimizar los métodos de análisis metabolómicos más avanzados para el examen de muestras procedentes de suero, y así, integrando los datos obtenidos de múltiples plataformas analíticas, podemos identificar una firma que nos permita el diagnóstico de cáncer de mama de forma no invasiva.

### **Material y Métodos**

El diseño experimental de este estudio comprende el examen de muestras de plasma procedente de mujeres sanas ( $n = 20$ ) y pacientes con cáncer de mama ya diagnosticadas ( $n = 91$ ) utilizando un análisis metabolómico por espectrometría de masas con técnicas de separación de cromatografía líquida.

Para la identificación de metabolitos se utilizó la base de datos PCDL de Agilent (Agilent Technologies, Barcelona, España). Finalmente, se realizó un análisis multivariante y un algoritmo Random Forest que nos permitió obtener una firma metabólica, la cual permitirá obtener un diagnóstico de cáncer de mama.

### **Resultados y Discusión**

El estudio metabolómico realizado, ha permitido diferenciar, de una forma correcta y segura, a las pacientes con cáncer de mama de los sujetos control sanos.

Mediante el algoritmo supervisado de predicción Random Forest se consiguió clasificar con una

precisión del 100%, tanto a las muestras de las pacientes con cáncer de mama, como a aquéllas pertenecientes a los controles sanos. Por lo tanto, el error resultante de clase y el método de medida de predicción “out-of-bag” para ambos grupos fue de 0.

Por otro lado, durante el estudio, se objetivaron distintos metabolitos en diferente concentración, al comparar el plasma de los controles sanos con el de las pacientes con cáncer. De estos metabolitos, un total de 1269, fue posible identificar 35 de ellos en base a su masa exacta, tiempo de retención y distribución isotópica.

Una vez establecidos estos metabolitos, se pudo relacionar su presencia con la promoción del crecimiento celular, ya que estos metabolitos son mediadores tanto en la transducción de señales, como en la síntesis de biomoléculas esenciales.

Así mismo, mediante los resultados obtenidos del algoritmo Random Forest, del tests de significación, así como de la proporción esperada de falsos positivas obtenidas mediante el “False discovery rate”, se identificaron varios metabolitos estrechamente asociados al cáncer de mama.

### **Conclusión general**

Se han expuesto y optimizado métodos analíticos, reproducibles y eficientes basados en técnicas de espectrometría de masas para el análisis metabolómico de muestras biológicas obtenidas mediante métodos poco invasivos. De esta forma, los resultados obtenidos, presentan unos biomarcadores que se posicionan como una nueva alternativa no invasiva para el diagnóstico del cáncer de mama.







## JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama continúa siendo la neoplasia más frecuente en el sexo femenino, ostentando, además, la primera causa de muerte por cáncer en la mujer. El diagnóstico temprano ha demostrado un aumento significativo en las tasas de supervivencia a largo plazo para dicha enfermedad (Stotter AT y cols., 1989). Actualmente, la mamografía es el procedimiento de detección más aceptable y eficaz en la localización del cáncer de mama, y fue recomendado por el Grupo de Trabajo de Servicios Preventivos de Estados Unidos (USPSTF) para mujeres de más de 40 años de edad (USPSTF, 2002). Sin embargo, debido a la alta tasa de falsos positivos de esta prueba, el USPSTF revisó su recomendación, aconsejando una disminución en la frecuencia de su realización (Warner E., 2011). Otras técnicas de análisis de imágenes, tales como la ecografía y la resonancia magnética, también se han utilizado para la detección del cáncer en la mama. Desafortunadamente, aún con la inclusión de estos métodos exploratorios, seguimos encontrando hasta un 20% de pacientes con cáncer de mama, que no son diagnosticadas de forma temprana (Astley SM. 2004).

Los biomarcadores en plasma o suero (tales como los antígenos y los patrones de proteínas) son prometedores; sin embargo, todavía están lejos de un uso clínico diario. Algunos marcadores tumorales, tales como CA15.3, CA27.29 se recomiendan sólo para el seguimiento terapéutico, pero no para el screening (Chan DV y cols., 1997). Por tanto, la necesidad de nuevos biomarcadores más precisos, coste-eficientes y no invasivos, que se puedan utilizar de forma individual o en combinación con otros métodos existentes, sigue siendo un objetivo fundamental y urgente a alcanzar para un diagnóstico más rentable del cáncer de mama.

En este sentido, como un enfoque alternativo para el descubrimiento de biomarcadores, aparece la metabolómica, la cual permite la identificación de moléculas de pequeño y bajo peso molecular en tejidos y fluidos biológicos, productos de las reacciones metabólicas en los seres vivos. La ausencia o presencia de alguno de estos metabolitos, así como la concentración relativa entre ellos, puede ser un indicador de estados de enfermedad (Lindon JC y cols., 2004).

Los avances en el campo de la metabolómica están siendo utilizados actualmente en una gran variedad de aplicaciones clínicas y farmacológicas dentro de la medicina, siendo su empleo dentro de la oncología una práctica emergente, ya que los avances en espectrometría de masas (MS) y resonancia magnética nuclear (RMN) han permitido el estudio, identificación y cuantificación de metabolitos a una escala inimaginable, lo que ha permitido descubrir la importancia de este estatus bioquímico en la regulación del cáncer (Zhang J y cols., 2012).

Un número creciente de estudios en metabolómica han contribuido a mejorar el conocimiento del cáncer de mama (Mishra P y cols., 2015). Muchos de los estudios se han centrado en identificar niveles alterados de metabolitos en células o tejidos de cáncer de mama, relacionando dichos cambios con sus rutas metabólicas (Bathen TF y cols., 2007). Un estudio reciente, utilizando perfiles metabólicos de numerosas líneas celulares cancerosas, encontraron una correlación entre la proliferación del cáncer de mama y la vía de la biosíntesis de la glicina (Jain M y cols., 2012). Previamente, diferencias entre líneas celulares epiteliales normales y células provenientes de metástasis de cáncer de mama se objetivaron mediante diferencias en la regulación de los ácidos grasos y glicolisis, utilizando RMN y MS (Yang y cols. 2007). De forma más reciente, se demostró la utilización del lactato como sustrato metabólico actual en las células cancerosas (Kennedy KM y cols., 2013), y una disminución de la fosforilación oxidativa en la relación con la progresión de la enfermedad (Shaw PG y cols., 2013).

En lo que se refiere a los estudios llevados a cabo en muestras de tejido tumoral, sabemos que éste puede ser diferenciado del tejido normal circundante basándose en espectroscopia de RMN de alta resolución por giro de ángulo mágico (HR-MAS) con una sensibilidad del 83% y una especificidad del 100%. Se encontraron algunos metabolitos sobrepresados, como la colina y la glicina, en tumores mayores de 2 cm. (Sitter y cols., 2006). En un estudio basado en la utilización de RMN, un modelo

estadístico multivariante basado en 67 metabolitos procedentes de la orina, consiguió identificar a las pacientes con cáncer con especificidad del 93% (Slupsky CM y cols., 2010). Factores pronósticos del cáncer de mama, como los receptores hormonales, pueden ser predichos en muestras de tejidos mediante HR-MAS, pudiendo caracterizar a aquellas pacientes triple negativas (Cao MD y cols., 2014). Al igual que la relación entre el glutamato-glutamina se correlacionó significativamente con la condición de expresión de receptores de estrógenos (Budzcies J y cols., 2015). Últimamente, mediante la utilización de MS, se ha conseguido diferenciar dentro de las misma muestra de tumor, distintas subpobalaciones microscópicas del tumor, con las implicaciones pronósticas que esto puede conllevar (Balluff B y cols., 2015).

En lo concerniente a la utilización de muestras de suero, pacientes con cáncer de mama avanzado pueden ser diferenciados de pacientes en estadios tempranos mediante la utilización de RMN, hasta con una sensibilidad del 72% (Oakman y cols., 2011). También se demostró una diferencia en el perfil lipídico en aquellas pacientes con enfermedad avanzada (Cui M y cols., 2015). Para la identificación de la recurrencia en cáncer de mama, se publicó un modelo basado en 11 biomarcadores hallados mediante la utilización de GC-MS y RMN con una sensibilidad del 86% y una especificidad del 84% (Asiago VM y cols., 2010). En pacientes ya intervenidas, Tenori obtuvo un perfil metabólico con el que podía identificar pacientes con receptores hormonales negativos y más riesgo de recaída (Tenori L y cols., 2015). En 2012 se publicó un estudio con 28 pacientes, en el cual mediante la utilización de la RMN y la LC-MS, construyeron un modelo que identificó al 80% de los pacientes cuyos tumores no respondieron a la quimioterapia neoadyuvante. Wei en 2013 publicó una firma metabólica, en la cual mediante la utilización de cuatro metabolitos, intentaba predecir la respuesta al tratamiento neoadyuvante (Wei S y cols., 2013). En ese mismo año, y con un número pequeño de sujetos, se publicaron diferencias en el perfil lipídico de pacientes enfermas, con una sensibilidad del 98,1% y una especificidad del 96% (Qiu Y y cols., 2013). Más recientemente, se ha publicado un trabajo en el cual, mediante la combinación de espectroscopia de masa asociada a una cromatografía de gases, se intenta discriminar un perfil de ocho metabolitos que permita diferenciar distintos subtipo moleculares de cáncer de mama mediante la expresión de HER2 y receptores hormonales, con un área bajo la curva de 0,83 (95% CI 0.847-0.939) (Fan Y y cols., 2016).

Por lo tanto, basándonos en los trabajos expuestos anteriormente, el análisis metabólico realizado en muestras de suero, se plantea como una aproximación novedosa en el estudio del cáncer de mama, ya que el propio espectro obtenido, en sí mismo, representará la huella dactilar de la enfermedad. De tal forma, el conjunto de datos obtenidos, servirá para identificar potenciales biomarcadores y esto permitirá establecer un modelo diagnóstico.

En este sentido, la temática del proyecto requirió durante años de un aprendizaje y formación especial del doctorando en aspectos bioquímicos que nada tienen que ver con su quehacer profesional diario. Para ello se aprovechó la relación directa o indirecta con grupos de investigación de referencia en estos campos así como la visita a centros de investigación pioneros en el campo de la metabolómica, donde el doctorando recibió la formación específica del análisis metabólico por MS y se realizaron los experimentos correspondientes.

De tal forma, el trabajo de Tesis Doctoral que se presenta, se concibió como una aproximación metabólica al estudio del cáncer de mama, con el fin de superar la dicotomía que predomina en la panorámica actual entre lo alcanzado en un laboratorio y lo conseguido en el paciente, o dicho de otra forma, reduciendo las distancias que existen entre lo logrado por la investigación básica y su aplicación clínica.





## INTRODUCCIÓN

### 1. Aspectos generales del cáncer de mama

#### 1.1. Epidemiología descriptiva del cáncer de mama

El cáncer de mama femenino constituye un importante problema de salud pública. En España, es el tumor maligno más prevalente entre las mujeres con una prevalencia estimada a los 5 años de 104210 casos. Esto supone, por ello, alrededor del 29% de todos los tumores incidentes en este grupo de población, si exceptuamos el cáncer de piel no melanoma. De esta manera, el cáncer de mama consigue posicionarse en uno de los tumores más frecuentemente diagnosticados en la población española general, con 25.215 casos nuevos en el año 2012 (GLOBOCAN, 2012).

Si a partir de estos datos realizamos una estimación de su incidencia ajustada, vemos como ésta se situaría en 93,6 casos/ 100.000 habitantes para los tres años posteriores. Es decir, la posibilidad actual de que una mujer española desarrolle un cáncer de mama antes de cumplir 75 años se aproxima a un 5% (en Europa un 8%) (Olier-Garate y cols., 2009). Esto se traduce en la posibilidad que de cada veinte mujeres, habrá una de ellas que padecerá un cáncer de mama antes de esa edad.

Por otro lado, si analizamos su mortalidad, el cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer en la mujer, lo que representa el 15,5% del total de muertes por cáncer femenino, y la tercera en la población global, por detrás de las neoplasias de intestino grueso y pulmón. En 2012 murieron 6.075 mujeres españolas a consecuencia del cáncer de mama (GLOBOCAN, 2012), cifra que ascendió hasta 6.477 en 2013 (<http://www.ine.es/prensa/np0215.htm>), lo que supone un repunte del 3%. Sin embargo, hay una variación de su incidencia en relación a la edad; de tal forma que ésta ha disminuido en las mujeres mayores de 45 años y ha aumentado en las mujeres de menor edad (Pollán M, 2010).

Con lo cual, a modo de resumen, podemos decir que, según las últimas estadísticas disponibles, en 2012 se diagnosticaron 25.215 pacientes con cáncer de mama, con una mortalidad de 6.075 pacientes, por lo que su prevalencia en los últimos 5 años es de 104.210 casos.

#### 1.2 Factores de riesgo

El cáncer de mama es una enfermedad de etiología multifactorial. Dicha complejidad dificulta considerablemente el diseño de estrategias eficaces de prevención de esta enfermedad, particularmente porque, en la actualidad, los especialistas son incapaces de establecer un riesgo individual objetivo para cada paciente, ya que es desconocida la interacción entre los distintos factores de riesgo. A continuación exponemos los principales factores de riesgo asociados al desarrollo de un cáncer de mama (tabla 1).

<ul style="list-style-type: none"><li>• Antecedentes personales de cáncer de mama</li><li>• Historia Familiar</li><li>• Historia Ginecológica</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Dieta</li><li>• Patrón mamográfico</li><li>• Radiación</li><li>• Actividad física</li></ul>
---	---

Tabla1. Principales factores de riesgo asociados al desarrollo del cáncer de mama.

### 1.2.1 Antecedentes personales de cáncer de mama.

La enfermedad mamaria benigna aumenta la probabilidad de desarrollar cáncer de mama. El riesgo es mayor para las lesiones proliferativas y aumentan aún más si cursan con atipias (Colditz GA y cols., 2006). Lo mismo ocurre si se ha padecido un tumor *in situ* o un carcinoma invasor previo (Li CL y cols., 2006). También se ha descrito el incremento del riesgo de recaída con existencia de necrosis tumoral (Rodrigues N y cols., 2002). Así mismo, la recaída local puede relacionarse con el grado histológico, el tamaño tumoral y la afectación de los márgenes, lo que se conoce como “Índice de Van Nuys” (Silverstein MJ y cols., 1996). Actualmente, se añade la edad a estos parámetros denominándose “Índice de Van Nuys modificado” (Di Saverio S y cols., 2008).

### 1.2.2 Historia Familiar

El cáncer de mama tiene un claro componente genético. Tener un familiar de primer grado con cáncer de mama duplica el riesgo. La proporción de cánceres de mama, en cuyo desarrollo son decisivos los factores hereditarios, se estima en torno a un 5-10%, (Gayther SA y cols., 1998).

El estudio de familias con múltiples casos de cáncer de mama y ovario mediante el análisis de ligamiento permitió la localización e identificación de dos genes de susceptibilidad de alta penetrancia. El primer gen caracterizado es conocido como Breast Cancer 1 (BRCA1) y se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 (17q21) (Miki Y y cols., 1994). El gen Breast Cancer 2 (BRCA2), localizado en el cromosoma 13 (13q12), fue identificado en familias con cáncer de mama masculino y sin ligamiento a 17q (Wooster R y cols., 1994). El riesgo de desarrollar un cáncer de mama a lo largo de la vida en portadoras de mutación en BRCA1 es superior al 60% y mayor del 50% en portadoras de la mutación en BRCA2 (Antoniou AC y cols., 2006).

Otros genes de alta penetrancia que incrementan el riesgo de cáncer de mama son p53, PTEN, ATM (Colditz GA y cols., 2006).

### 1.2.3 Historia ginecológica

El cáncer de mama aumenta exponencialmente con la edad, como ocurre con todos los carcinomas. Sin embargo, la pendiente de incremento se ralentiza tras la menopausia, debido a la caída de estrógenos circulantes. Los factores reproductivos modulan la exposición hormonal a lo largo de la vida. La menarquia temprana, la menopausia tardía y la nuliparidad o la edad tardía al primer embarazo son los principales factores reproductivos. El embarazo tiene un doble efecto a corto y largo plazo, ya que se asocia a un incremento del riesgo inicial, ligado al aumento de las hormonas circulantes, pero constituye un factor de protección a largo plazo, debido a la maduración del tejido mamario, que se traduce en una tasa menor de proliferación (Domitrescu RG y cols., 2004; Colditz GA y cols., 2006). La lactancia materna prolongada constituye otro factor de protección, al igual que la ooforectomía temprana (Colditz GA y cols., 2006).

Con respecto al uso de anticonceptivos orales, parece incrementarse el riesgo durante la ingesta de los mismos, sobre todo si su uso dura 10 años o más, aunque no influye de la misma forma en todos los grupos poblacionales (Hou N y cols., 2013). Este incremento parece mayor en los tumores con receptores hormonales negativos (Rosemberg y cols., 2010), en especial en las mujeres entre 25 y 64 años con neoplasias triple negativas que habían iniciado la toma de los mismos antes de los 18 años (Ma H y cols., 2010). Se ha demostrado en estudios observacionales que la terapia hormonal sustitutiva con estrógenos eleva el riesgo de cáncer de mama. Este efecto parece desaparecer al abandonar su uso y el riesgo es mayor en usuarias de estrógenos combinados con progesterona (Ravdin PM y cols. 2007).

#### **1.2.4 Dieta**

Como ya se ha mencionado, el cáncer es causado por la interacción entre factores genéticos y ambientales. Entre los últimos, la dieta ha atraído una considerable atención, dado que es un factor modificable, y por lo tanto ofrece la posibilidad de diseñar estrategias preventivas.

La dieta supone la exposición a una gran variedad de compuestos cancerígenos y anticancerígenos. Existen datos que sugieren que un alto consumo de grasa puede incrementar el riesgo, aunque los estudios epidemiológicos no son concluyentes (Turner LB., 2011). Resultados en animales de experimentación señalan que el exceso de riesgo estaría ligado al consumo de grasas poliinsaturadas, mientras que los ácidos omega-3 y el aceite de oliva disminuyen la ocurrencia de tumores mamarios (Thiebaut AC y cols., 2007).

El consumo de alcohol aumenta la frecuencia de cáncer de mama (Suzuki R y cols., 2010). En un metanálisis de 38 estudios epidemiológicos se estimó el riesgo de cáncer de mama en relación proporcional a la ingesta etílica con respecto a las mujeres abstemias (Longnecker MP. 1994).

La soja y otros alimentos que contienen fitoestrógenos son compuestos con débil actividad estrogénica que podrían interferir igualmente con la acción y el metabolismo de los estrógenos endógenos. Por el momento, los estudios experimentales y epidemiológicos existentes arrojan resultados contradictorios que no permiten extraer conclusiones (Hilakivi-Clarke L y cols., 2010; Dong JY y cols., 2011).

Se ha propuesto que el consumo de frutas, verduras y alto consumo de fibra podría jugar un papel protector, ya que la fibra inhibe la reabsorción de estrógenos en el tracto digestivo. Algunos estudios de casos y controles corroboran dicho efecto, aunque los estudios prospectivos no han demostrado su papel protector (Colditz GA. y cols 2006).

#### **1.2.5 Patrón mamográfico**

A diferencia de la mayoría de factores de riesgo en la neoplasia de mama, la densidad mamaria es variable según la influencia de otros factores y además, este cambio puede ser monitorizado mediante la mamografía o la resonancia. En cuanto a dicho factor de riesgo existe un componente hereditario de elevada importancia como demuestran los resultados de los estudios llevados a cabo con gemelos monocigóticos y dicigóticos, que estiman que la heredabilidad es responsable del 63% de las variaciones en la densidad mamaria entre individuos. También pueden modificar la densidad mamaria factores externos como la terapia hormonal sustitutiva combinada, que aumenta la densidad mamaria y también el riesgo de cáncer de mama, o la obesidad que se correlaciona inversamente con la densidad mamográfica y con el riesgo de cáncer de mama. Estos datos se restringen a las mujeres premenopausicas ya que, una vez más, la edad sobredimensiona el efecto de estos dos factores (Yaffe M y cols., 2005).

A pesar de todo, hoy en día, se considera que las mujeres, con un patrón denso en la mamografía, tienen un riesgo de 4 a 6 veces mayor que aquellas con mamas de predominio graso (Pettersson A y cols., 2011)

#### **1.2.6 Radiación.**

La exposición a radiaciones ionizantes, principalmente en los primeros años de vida y en la adolescencia, cuando la glándula mamaria está desarrollándose, es un importante factor de riesgo (Colditz GA. y cols 2006). De tal forma, las pacientes que han recibido durante la infancia un tratamiento con radioterapia en la región torácica, especialmente para el linfoma de Hodgkin, tienen un riesgo relativo de 7 a 17 veces mayor (Moskowitz CS y cols., 2014).

La proporción de presentación es mayor a menor edad en el momento de la exposición, existiendo una latencia para el desarrollo del cáncer de mama, y una relación con la dosis de radiación recibida (Ng AK y cols., 2009). Sin embargo, la asociación de irradiación a dosis reducidas (como la recibida en las pruebas de imagen diagnósticas) con la aparición de un cáncer de mama es mucho más controvertida (Nelson HD y cols., 2009).

### 1.2.7 Actividad física

El ejercicio físico es un factor protector (Colditz GA. y cols., 2006). Durante la adolescencia, la actividad física contribuye a reducir el riesgo retrasando la menarquía y retrasando el nivel de hormonas biodisponibles (Domitrescu RG y cols., 2004). En mujeres adultas, la actividad física actuaría disminuyendo el número de ciclos ovulatorios, los niveles de estrógenos y previniendo la obesidad (Friedenreich CM y cols., 2010).

### 1.3 Factores pronósticos y predictivos

Entendemos como factor pronóstico aquél que determina o se correlaciona con la historia natural de la enfermedad, sin intervención del tratamiento adyuvante sistémico, siendo, por tanto, reflejo de la agresividad del propio cáncer. Su valor relativo es mejor determinado en los pacientes no tratados.

En cambio, factor predictivo es cualquier valor asociado al grado de respuesta de un tratamiento específico. Su utilidad clínica suele mayor que la de los factores pronóstico, dada su importancia a la hora de decidir un tratamiento. Algunos factores comparten el carácter pronóstico y predictivo, como es el caso de la expresión de HER2, que confiere peor pronóstico clínicos en los pacientes tratados de modo convencional, aunque su amplificación es predictiva de respuesta a trastuzumab, con lo cual los casos que reciben este tratamiento mejoran su pronóstico (Rojo A y cols., 2008) (tabla 2).

FACTORES PRONÓSTICOS	FACTORES PREDICATIVOS	FACTORES PRONÓSTICOS MOLECULARES
Estado ganglionar Tamaño Tipo histológico Grado histológico Invasión vascular y linfática Metástasis en médula ósea Células tumorales circulantes Edad Embarazo Proliferación p53	Estado hormonal HER2 $\mu$ PA/PAI Susceptibilidad genética	Subtipo Luminal (A, B) Subtipo HER2 Subtipo triple negativo y/o Basal Like Otros perfiles de expresión génica

Tabla 2. Factores pronósticos y predictivos.



### **1.3.1 Factores pronósticos**

#### **1.3.1.1 Estado ganglionar**

La presencia o ausencia de metástasis ganglionar axilar es el factor pronóstico independiente más importante en el cáncer de mama operado. Esta importancia ha sido confirmada por el metanálisis del EBCTCG (Early Breast Cancer Trialist's Collaborative Group). La supervivencia libre de recaída a los 10 años y la supervivencia global fue peor en pacientes con afectación axilar frente a los que no la tenían: 29.5 % versus 54.5 % y 39.8 % versus 63.2 %, respectivamente (Lonning PE y cols., 2007).

La evaluación rutinaria de la linfadenectomía precisa de la disección y examen patológico de al menos seis ganglios del nivel II de la axila (Blancas I y cols., 2006). Conocida la morbilidad asociada a la linfadenectomía axilar, debemos recordar el papel de la técnica del ganglio centinela como alternativa a las linfadenectomías completas. Actualmente la biopsia selectiva de ganglio centinela (BSGC) es un procedimiento aceptado para la adecuada estadificación axilar del cáncer de mama que permite seleccionar un subgrupo de pacientes susceptible de cirugía conservadora en la axila (Pinero A y cols., 2007). Asimismo, la identificación de metástasis ganglionares por esta técnica ya se recoge en el actual sistema de estadificación TNM (Edge SB y cols., 2010; Veronesi U y cols., 2009) y diversos estudios prospectivos (Veronesi U y cols., 2010; Giuliano AE y cols., 2010) y meta-análisis (Pepels MJ y cols., 2011) han confirmado su seguridad.

#### **1.3.1.2 Tamaño**

Después del estado ganglionar, el diámetro del tumor primario puede considerarse el factor pronóstico más importante, con muy buena correlación con la incidencia de metástasis ganglionares y tasa de supervivencia (Seidman JD y cols., 1995). Las pacientes cuyo tumor mide 2 cm. o menos tienen un pronóstico y una supervivencia significativamente mayor comparada con las pacientes con tumores más grandes (Chia SK y cols., 2004). Sin embargo, este patrón no se cumple en todos los subtipos de cáncer de mama y hay neoplasias de pequeño tamaño con afectación axilar extensa cuya tasa de mortalidad es mayor que la de tumores de tamaño superior, lo que se relaciona con una enfermedad con un comportamiento biológico más agresivo (Wo NY y cols., 2011).

No obstante, la correcta medición del tumor es esencial y debe ser muy precisa, puesto que va a modificar el estadio tumoral. Las asociaciones de patólogos europeos y americanos recomiendan la medición microscópica total y del componente infiltrante para el estadio. La medición exacta del tamaño tumoral debe de ser considerada obligatoria en los informes de anatomo-patológicos (Behjatnia B y cols., 2010).

#### **1.3.1.3 Tipo histológico**

La mayoría de las neoplasias mamarias se originan en el epitelio de los conductos galactóforos, por ello se denominan carcinomas ductales. El resto se desarrollan en las estructuras acinares de los lobulillos mamarios, recibiendo la denominación de carcinomas lobulillares. Alrededor del 80% de los tumores invasivos de mama pertenecen a la variedad ductal, suponiendo el carcinoma lobulillar entre el 5-15% según las series. La tasa de recaída y el pronóstico de ambos se considera similar (Rakha EA y cols., 2009), pero el grado de diferenciación parece no ser importante en este último (Sinha PS y cols., 2000).

Existen otros subgrupos reconocidos con pronóstico particular. Los carcinomas pobremente diferenciados, en anillo de sello, carcinoma inflamatorio (Tai P y cols., 2005), así como los carcinosarcomas, son considerados como neoplasias agresivas y de baja frecuencia de presentación (Li CI y cols., 2005).

Dentro de los de mejor pronóstico están el carcinoma tubular, cribiforme invasivo, mucinoso, adenóide quístico y papilar duro. Algunos de estos tipos como los mucinosos, lobulares o tubulares presentan mayormente expresión de receptores estrogénicos, mientras que otros como los medulares y el comedocarcinoma, rara vez. Algunas publicaciones han intentado relacionar determinadas histologías con subtipos moleculares, como por ejemplo el carcinoma lobular y el subtipo molecular Luminal A (Jung SY y cols., 2010) y el carcinoma medular con el subtipo Triple negativo (Marginean F y cols., 2010) y la mutación del gen BRCA-1 (Mangia A y cols., 2011).

#### **1.3.1.4 Grado histológico**

La determinación del grado histológico es una herramienta que ha demostrado una buena correlación con el pronóstico clínico (Henson DE y cols., 1991). El sistema de gradación más utilizado es el de Scarff-Bloom-Richardson, que combina criterios arquitecturales (formación de túmulos) con citológicos (pleomorfismo nuclear y conteo mitótico). A cada uno de los tres factores anteriormente señalados se les asignaba una puntuación de 1 a 3, correspondiendo a su presencia en leve, moderado o marcado grado. Por tanto, podía ser alcanzada una calificación total de 3 a 9 para un determinado tumor. Una calificación de 3 a 5 etiquetaba a los carcinomas como un tumor de grado I (bien diferenciado), 6 ó 7 como grado II (moderadamente diferenciado), y 8 ó 9 como grado III (poco diferenciado).

A pesar de haber sido diseñado, en principio, para el carcinoma ductal infiltrante, este sistema está recomendado emplearlo en cualquier subtipo histológico de carcinoma de mama infiltrante, exceptuando el carcinoma medular (Rosai J 2004).

#### **1.3.1.5 Invasión vascular y linfática**

En los pacientes sin afectación ganglionar linfática, la invasión vascular linfática es un predictor de mal pronóstico, de recurrencia precoz y metástasis a distancia (Lee AH y cols., 2006). En aquellos con afectación adenopática, la invasión vascular linfática es un marcador de alto riesgo de muerte indicando mayor probabilidad de fracaso terapéutico (Lauria R y cols., 1995). La invasión vascular linfática por células tumorales, de forma histológica, es objetivable en, aproximadamente, el 15% de los carcinomas ductales infiltrantes de mama y en casi el 10% de los tumores sin afectación ganglionar. Indica un pronóstico desfavorable en términos de recaída local y reducción de la supervivencia global, por eso se recomienda su evaluación en el estudio anátomo-patológico de la pieza tumoral (Hoda SA y cols., 2006).

Se ha intentado comparar la invasión vascular venosa e invasión vascular linfática y determinar cuál de las dos representa un indicador de mal pronóstico. Para ello se han utilizado técnicas inmunohistoquímicas para comprobar la expresión de CD34 y CD31 para invasión vascular venosa y de podoplanina/D2-40 (marcadores de vasos linfáticos) para la invasión vascular linfática. Se ha confirmado la asociación, estadísticamente significativa en el análisis multivariante, de invasión vascular linfática con metástasis ganglionares axilares, mayor tamaño tumoral, desarrollo de metástasis a distancia, recurrencia loco-regional y peor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global (Mohammed RA y cols., 2007; Mohammed RA y cols., 2011).

En pacientes con cáncer de mama triple negativo no se vieron cambios en invasión vascular linfática y/o invasión vascular venosa con respecto a otros subtipos tumorales. Sin embargo, se observó una mayor frecuencia de metástasis viscerales en este subgrupo, lo que ratifica un diferente comportamiento biológico (Kuroda H y cols., 2010).

### **1.3.1.6 Metástasis en médula ósea**

Basándose en diferentes estudios hay autores que la definen como un predictor independiente de mal pronóstico (Wiedswang G y cols., 2003). Sin embargo todos reconocen la heterogeneidad en el diagnóstico y la necesidad de estudios prospectivos para evaluar si la erradicación de las micrometástasis en esta localización se correlaciona con una mayor supervivencia libre de recaída y supervivencia global (Fehm T y cols., 2008).

Dado que su uso no está estandarizado, no se recomienda aún su valoración rutinaria protocolizada (Goldhirsch A y cols., 2007).

### **1.3.1.7 Células tumorales circulantes**

La determinación de células tumorales circulantes (definido como 5 ó más células en 75 ml de sangre periférica) se ha visto útil en el grupo de pacientes con cáncer de mama metastático, dado que su valor predictor de supervivencia global (SG) y supervivencia libre de enfermedad (SLE) es mayor que el de las pruebas de imagen convencionales (Cristofanelli M y cols., 2006). Sería, por tanto, de gran utilidad para la estratificación del riesgo y la monitorización temprana de la respuesta al tratamiento (Andreopoulou E y cols., 2010).

En cambio en pacientes con cáncer de mama precoz su significado es desconocido. En un estudio del MD Anderson Cancer Center, de casi 100 pacientes con tumores T1 y T2, se objetivaron células tumorales circulantes en el 31%, pero no hubo correlación ni con el tamaño tumoral, ni con la afectación ganglionar, ni con el grado histológico, ni con la expresión de receptores hormonales y tampoco con la expresión de HER2 (Krishnamurthy S y cols., 2010).

### **1.3.1.8 Edad**

El significado pronóstico de la edad y del estado menopáusico ha sido tan estudiado como controvertido. Casi todos los estudios sugieren que las mujeres jóvenes con cáncer de mama, particularmente aquellas menores de 35 años, presentan una mayor asociación con otros factores pronósticos negativos, condicionando por ello unos resultados peores (Dubsky PC y cols., 2002). Incluso en mujeres entre 39 y 41 años sometidas a screening mamográfico no se observó disminución de mortalidad por cáncer a los 10 años con respecto a las que no participaban en él (Moss SM y cols., 2006). Se ha evidenciado en pacientes jóvenes con tumores sin expresión de receptores hormonales ni de HER2 (aunque el tamaño tumoral sea subcentimétrico) un mayor riesgo de recurrencia, demostrándose estadísticamente la independencia de la edad como factor pronóstico (Kwon JH Y Cols., 2010).

### **1.3.1.9 Embarazo**

En general, el cáncer de mama que debuta durante el embarazo es considerado más agresivo, pues posee menor expresión de receptores hormonales y mayor de HER2. Hay que tener en cuenta que su valor está influido, además, por otros factores, como que afecta al grupo de mujeres jóvenes (peor pronóstico) y que suele realizarse un diagnóstico más tardío por quedar oculto en los cambios gestacionales/puerperales (Rojo A y cols., 2008).

### **1.3.1.10 Proliferación**

La capacidad de la célula para dividirse es la que determina su potencial de crecimiento y diseminación del tumor. Existen numerosos marcadores de proliferación, y destacamos:

Índice mitótico: consiste en calcular el promedio de figuras mitóticas aparecidas por campo de gran aumento. Su valor pronóstico ha sido determinante para ser incluido dentro de los sistemas de gradación histológica.

Índice de captación de timidina: se calcula mediante el conteo de números de núcleos que captan timidina tritiada tras un periodo de incubación con la misma. Se estima, así, el número de células que sintetizan ADN y las células que se encuentran en fase S y G2M.

Fracción de células en fase S: mediante la citometría de flujo es posible evaluar la proporción de células de un tumor que se encuentran en fase de síntesis de ADN, y, por lo tanto, mayor contenido de ADN.

Ki-67: El Ki-67 es un anticuerpo específico dirigido frente a un antígeno nuclear expresado en células en fase proliferativa G1, S, M y G2 del ciclo celular. La sobreexpresión de este antígeno nuclear se asocia con un pronóstico menos favorable, sobre todo, para el cáncer de mama precoz (Yerushalmi R y cols., 2010). En la actualidad las investigaciones sobre su posible papel como indicador pronóstico aumentan. Desde que Perou identificó por primera vez diversos subtipos de cáncer de mama con diferentes patrones de expresión génica basados en agrupaciones de genes (Perou CM y cols., 2000) y que la expresión de las agrupaciones de genes de alta proliferación se correlacionaban con las variables inmunohistoquímicas de proliferación del tumor, como Ki-67, y con el pronóstico, se establecieron subtipos tumorales diferentes dentro del grupo con expresión de receptores hormonales. El subtipo Luminal A expresa con mayor intensidad los genes de la agrupación de receptores hormonales y presenta baja expresión de genes asociados a proliferación como Ki-67 (Hu Z y cols., 2006) y, como consecuencia, mejor pronóstico que el subtipo Luminal B. En una publicación de Sotiriou, utilizando variables clínico-patológicas del tumor, inmunohistoquímica y perfiles de expresión génica, se establece ya la diferenciación entre subtipos Luminal A y Luminal B según el nivel de Ki-67 (Sotiriou C y cols., 2009). Esta observación se confirmó en otra publicación en la cual se medían receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (RP), expresión de Her2-neu y Ki-67 por inmunohistoquímica (comúnmente realizado en nuestra práctica clínica diaria en las muestras anatómo-patológicas), distinguiendo subtipos Luminal A y Luminal B y relacionando a este último con peor supervivencia libre de recaída y peor supervivencia específica por cáncer de mama, a pesar de recibir tratamiento complementario. En particular, en las mujeres que sólo habían recibido tamoxifeno, existía una diferencia de alrededor del 20% en la supervivencia específica por cáncer de mama a los 10 años entre subtipos luminales (Cheang MC y cols., 2009).

#### **1.3.1.11 p53 y otros genes mutados**

El gen p53 se localiza en el cromosoma 17p13 y codifica la síntesis de una proteína implicada en el control del ciclo celular, la apoptosis y el mantenimiento de la estabilidad génica. La mutación de este gen, se considera un factor de mal pronóstico por determinar pérdida de la función supresora, y es la alteración génica más común y descrita en mayor número de tumores.

En un artículo sobre pacientes sin afectación ganglionar en lo referente a la expresión de p53 mutada como indicador pronóstico, estratificando por subtipos tumorales y teniendo en cuenta los subgrupos pronósticos de riesgo establecidos en el Consenso de Saint Gallen, se confirmó su potencia independiente, junto a la negatividad de la expresión de receptor de progesterona, en el análisis multivariante. En el subanálisis por subtipos tumorales intrínsecos (Luminal A, Luminal B, HER2 y Triple negativo) y grupos de riesgo del Consenso de Saint Gallen, hubo diferencias significativas en supervivencia libre de enfermedad a los cinco años según el nivel de p53 (Jung SY y cols., 2011).

Otras mutaciones menos comunes identificadas en relación con el cáncer de mama, ocurren en los genes serina/reonina proteína kinasa (CHEK2), ataxia telangiectasia (ATM), cadherina 1 (CDH1), fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) o Partner and localizer of BRCA2 (PALB2). En

concreto, las mujeres con síndrome de Cowden, que se debe a una mutación en el gen PTEN, tienen un 50% de probabilidades de padecer cáncer de mama a lo largo de la vida, así como de desarrollar neoplasias malignas en otras localizaciones como el tiroides o endometrio (Hobert JA y cols., 2009).

### **1.3.2 Factores pronósticos moleculares: perfiles genómicos**

A pesar de todos los criterios que hemos expuesto anteriormente, quedan aún dilemas importantes por aclarar. Uno de los más importantes afecta al grupo de pacientes ya intervenidas con ganglios libres, colectivo que será sometido en un alto porcentaje de casos a tratamiento sistémico sin necesidad real de él. En este grupo no se puede calcular con certeza el riesgo real de recidiva, siendo, por tanto, necesario desarrollar nuevos factores de supervivencia y recaída que eviten el sobretratamiento y efectos tóxicos innecesarios.

En este contexto es donde los perfiles genéticos tendrán su principal relevancia. El problema de los pacientes que con características clinicopatológicas similares tienen evoluciones completamente distintas, sugiere que deben existir características moleculares subyacentes que determinan su comportamiento.

Los primeros estudios sobre el heterogéneo perfil genético, molecular y clínico del cáncer de mama se lo debemos a dos patólogos: Charles Perou (Universidad de Stanford-California) y Therese Sorlie (Hospital Montebello-Oslo) (Perou CM y cols., 2000; Sorlie T y cols., 2001). Utilizando técnicas de microarrays de DNA descubrieron distintos patrones de expresión génica que asimilaron a diferentes subtipos tumorales con diferente pronóstico. Variaciones en el crecimiento celular, en la actividad específica de vías de señalización intracelular y en la composición celular de los tumores se reflejaban en correspondientes variaciones en la expresión de diferentes grupos de genes. Se desarrolló, entonces, una clasificación genética que permitía clasificar a los tumores según su comportamiento biológico y pronóstico en: Luminal A (LA), Luminal B (LB), HER2 y Triple negativo (TN). Éste último se puede subdividir en Basal y Normal (o no “Basal-Like”) según la expresión de EGFR y/o citoqueratinas 5 y 6 (CK 5/6). La clasificación inmunohistoquímica se ha ido perfilando progresivamente por lo que diversos estudios, realizados a lo largo de los años, han utilizado definiciones variables en el subgrupo Luminal B y no han diferenciado a los tumores Triple Negativo de los “Basal-Like”.

#### **1.3.2.1 Subtipo Luminal (A, B)**

Este subtipo tiene un patrón de expresión génica similar al epitelio luminal de la mama. Se caracteriza por la expresión de receptores de estrógeno y de progesterona y de genes asociados a la activación de receptores de estrógeno como LIV1, TFF1/ pS2 y ciclina D1, además de citoqueratinas luminales (CK 8/18).

Diferenciamos dos subtipos: Luminal A (LA) y B (LB). Los LA generalmente tienen alta expresión de receptor de estrógeno y de genes que regulan su expresión, muy baja o ausencia de expresión de c-erbB2 y, baja expresión de genes de proliferación, incluyendo Ki-67. Representan el 40% de los cánceres de mama (Millikan RC y cols., 2008). Según Jung los carcinomas lobulillares invasivos serían el prototipo de este subtipo molecular (Jung SY y cols., 2010). Por el contrario los tumores Luminales B tienden a ser de alta proliferación (alta expresión de Ki-67), suelen tener p53 mutada y, en general baja expresión de receptor de estrógeno y de genes relacionados con su expresión (Sotiriou C y cols., 2009). Representan en torno al 10% de los cánceres de mama luminales (Millikan RC y cols., 2008).

### 1.3.2.2 Subtipo Her 2

Supone entre un 6 y un 20% del global (Blows FM y cols., 2010; Del Casar JM y cols., 2008). Sin embargo, no todos los tumores con expresión de este gen o de la proteína Her2-neu detectada por inmunohistoquímica pertenecen a este subtipo, ya que los tumores Luminales B también lo expresan.

Este subtipo se caracteriza, además, por expresar otros genes próximos a c-erbB2 en el genoma, como GRB7, además de altos niveles de expresión de activadores de la transcripción como GATA4 (Bertucci F y cols., 2004). Por otro lado, muestran baja expresión de genes luminales y, por tanto de CK 8 y 18 y de genes reguladores de la expresión de receptores de estrógeno y de genes “basal-like” (Perou CM y cols., 2000).

El 75% de los tumores presentan un alto grado de diferenciación y más del 40% mutaciones de p53. Desde su denominación todos los estudios han confirmado repetidamente su mal pronóstico y su agresividad biológica (Carey LA y cols., 2006). Sin embargo, gracias al demostrado beneficio de las terapias anti-HER2 su pronóstico ha mejorado (Salmón DJ y cols., 2001; Piccart-Gebhart MJ y cols., 2005; Geyer CE y cols., 2006). Muestran, además, alta sensibilidad a quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclina y taxanos, encontrando mayores tasas de respuesta patológica completa que los subtipos luminales (Bhargava R y cols., 2010); sin embargo, sí hay una disminución de la supervivencia libre de recaída y de supervivencia global con respecto a los tumores luminales (Voduc KD y cols., 2010).

Por otra parte, se ha observado también mayor riesgo de diseminación en SNC con respecto a los subtipos luminales y Triple Negativo (Bertos NR y cols., 2011) y mayor proporción de recaídas viscerales y loco-regionales que los luminales (Voduc KD y cols., 2010).

### 1.3.2.3 Subtipo triple negativo y/o basal like

Definimos como subtipo triple negativos a aquellos tumores que no expresan receptores ni de estrógenos, ni de progesterona, ni de HER2. En un paso más allá, denominamos Basal-Like a los tumores triple Negativo que, además, expresan CK 5/6 y/o EGFR (Dawson SJ y cols., 2009), lo que supone alrededor del 80% de los tumores triple negativos (Perou CM 2011). Las neoplasias que no expresan ninguno de los cinco marcadores se denominan “Normal-Like” o “no Basal-Like” y parecen ser discretamente menos agresivas que las Basal-Like (Dawson SJ y cols., 2009). Presenta una estrecha relación con el carcinoma medular y metaplásico, pero, también, con otros subtipos histológicos infrecuentes más favorables, como el adenoide quístico y secretor (Cadoo KA y cols., 2012).

Los tumores Basal-Like expresan un patrón semejante al de las células epiteliales basales con citoqueratinas basales de alto peso molecular como CK 5/6, 14 y 17, y EGFR, c-kit, vimentina, P-cadherina, fascina, caveolinas 1 y 2, y p63. Se ha observado un incremento de la actividad mitótica con alta expresión de Ki-67, mutaciones de p53 hasta en la mitad de los casos, marcado pleomorfismo nuclear y atipia, alto grado nuclear (Parise CA y cols., 2009), necrosis central, múltiples células en apoptosis e infiltración linfocítica estromal (Carey LA y cols., 2007). Se ha evidenciado también la falta de función de la proteína RB1, la cual es crítica en la regulación del ciclo celular. Estas células son deficitarias en actividad del gen del retinoblastoma (RB) y p53, por lo que tienden a un crecimiento rápido al no funcionar el mecanismo de supresión tumoral (Perou CM 2011).

Se han encontrado, también, asociación de este subtipo con mutaciones de BRCA 1 (Mangia y cols., 2011). Específicamente en mujeres portadoras de la mutación que desarrollan un cáncer de mama, hasta en el 80% de los casos es Basal-Like (Perou CM 2011). La asociación con la vía BRCA tiene importantes implicaciones terapéuticas con la introducción de los inhibidores de la Polimerasa ADP-Ribosa (PARP). Éstos impiden la reparación de la vía alterada en las células deficientes de BRCA, produciendo un efecto sintético letal en las células alteradas (Tutt A y cols., 2010).



#### 1.3.2.4 Otros perfiles de expresión génica

El reciente desarrollo de nuevas tecnologías y, en particular, el uso de microarrays de ácido desoxirribonucleico complementario (cADN) permiten el análisis simultáneo de miles de genes y el establecimiento de una clasificación más refinada del cáncer de mama basada en la expresión génica que persiguen una mayor exactitud en la predicción de riesgo de recaída y muerte por cáncer de mama.

El Netherlands Cancer Institute de Amsterdam definió un método de clasificación genético consistente en 70 genes relacionados con la proliferación, invasión, metástasis, integridad del estroma y angiogénesis. La determinación de su expresión precisa muestra en fresco de tejido tumoral (MammaPrint). Este perfil predecía la recaída en mujeres con cáncer de mama sin afectación ganglionar en menores de 55 años (van de Vijver MJ y cols., 2002). Se validó en pacientes de varios centros europeos, discriminando entre bajo y alto riesgo de recaída y, resultando un factor pronóstico independiente (Buyse M y cols., 2006).

Wang y sus colaboradores seleccionaron un conjunto de 76 genes, denominado “firma de Rotterdam”, capaz de predecir la recaída en un pequeño grupo de enfermas de diferente edad, grado, tamaño tumoral y estado de receptores hormonales, sin afectación ganglionar. Esta firma también fue validada en una muestra independiente de 180 casos de cáncer de mama sin afectación ganglionar, demostrando valor pronóstico en tiempo a la recaída y supervivencia global (Wang Y y cols., 2005).

Otra aproximación posible es la clasificación por agrupaciones de genes según el “modelo de respuesta cicatricial”, separando grupos de riesgo según la correlación entre la respuesta cicatricial y el comportamiento biológico del tumor (Chang HY y cols., 2005).

El “Genomic Grade Index” (GGI) está basado en un grupo de 97 genes, expresados diferencialmente entre los cánceres de mama de alto y bajo grado que están asociados a la progresión del ciclo celular y a la proliferación tumoral (Sotiriou C y cols., 2006).

Paik y su equipo, en un estudio publicado en 2004, identificaron una escala de recurrencia basada en 21 genes estudiados en muestras parafinadas (Oncotype DxR) según la cual, las pacientes con expresión de receptores de estrógeno y sin afectación ganglionar, fueron clasificadas en bajo, intermedio y alto riesgo de recurrencia (Paik S y cols., 2004). Se ha sugerido que pudiera complementarse con el programa *Adjuvant online!* (Olivotto IA y cols., 2005) para decidir de forma más precisa la necesidad o no de quimioterapia complementaria (Paik S y cols., 2008). En un estudio con inclusión de pacientes con y sin afectación ganglionar se demostró como mayor predictor de recaída que las variables clínicas estándar incluidas en el programa *Adjuvant online!* (Goldstein LJ y cols., 2008).

Otros grupos de genes estudiados con capacidad pronóstica han sido: la ratio HOXB13 versus IL17BR en pacientes tratadas con tamoxifeno (Ma XJ y cols., 2004), genes relacionados con la secuenciación de la mutación de p53 (Miller LD y cols., 2005) y genes relacionados con la activación del estroma (Farmer P y cols., 2009).

De tal forma, hoy en día, a la hora de tomar una decisión en una paciente con unas características fenotípicas concretas, además de las particularidades clínico-patológicas, también podemos ayudarnos de algunas de estas plataformas ya disponibles comercialmente (Coates AS y cols., 2015).

### 1.3.3 Factores predictivos

#### 1.3.3.1 Estado hormonal

La expresión de receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP) tiene como principal utilidad su valor predictivo de respuesta al tratamiento hormonal. De todas formas, también es conocido su sig-

nificado pronóstico, pues el grupo de RE positivo posee a corto plazo mayores tasas de supervivencia libre de enfermedad (SLE) que el grupo RE negativo, desapareciendo estas diferencias en seguimientos a largo plazo.

En la actualidad, la determinación de receptores de estrógeno y progesterona es imprescindible por su indiscutible preponderancia a la hora de tomar decisiones terapéuticas. A día de hoy las técnicas inmunohistoquímicas son las más utilizadas en nuestros hospitales, a raíz de que progresivas publicaciones hayan avalado su sensibilidad, especificidad y reproducibilidad (Allred DC y cols., 2009). La Sociedad Americana de Oncología (ASCO) también ha realizado sus recomendaciones sobre dicha evaluación (Hammond ME y cols., 2010).

Sobre lo que no hay discusión es sobre su capacidad de predicción de respuesta a la terapia hormonal. La reducción de los niveles de receptor estrogénico, la negatividad o baja expresión de receptor de progesterona y la positividad del receptor HER2 se asocian con una menor probabilidad de respuesta a cualquier tipo de terapia endocrina (Rastelli F y cols., 2008). Los tumores que sobreexpresan HER2 son resistentes al tratamiento hormonal y requieren el bloqueo de la vía de HER2, además de la privación estrogénica (Parise CA y cols., 2009).

Estudios moleculares han demostrado que la capacidad de respuesta endocrina está influenciada en gran medida por los receptores interrelacionados con las vías estrogénicas intracelulares. El diálogo entre el receptor HER2 y el receptor de estrógeno se ha puesto de manifiesto en diferentes publicaciones (Osborne CK y cols., 2005). La interacción entre ambos podría explicar la resistencia a Tamoxifeno (Lipton A y cols., 2002) y el beneficio de los inhibidores de la aromatasa o de la adición de Trastuzumab al tratamiento hormonal en algunas pacientes hormonosensibles (Kaufman B y cols., 2009).

### **1.3.3.2 HER2**

El oncogen *c-erbB2* forma parte de la familia de EGFR y se encuentra amplificada en el 18-20% de los carcinomas de mama. Está ubicado en el cromosoma 17 y se encarga de la síntesis de una proteína con actividad tirosínquinasa (Her 2-neu) que se sobreexpresa en este tipo de tumores.

Se ha demostrado su valor tanto pronóstico (mayores tasas de recurrencia y mortalidad) como predictivo, ya que además de predecir la respuesta a trastuzumab en enfermedad metastásica, adyuvancia y neoadyuvancia (Slamon DJ y cols., 1987; Piccart-Gebhart MJ y cols., 2005; Pérez E. 2007) al igual que lapatinib (Geyer y cols. 2006), podemos considerar que pudiera predecir parcialmente la respuesta a regímenes de quimioterapia que contengan antraciclinas. Así, la proximidad entre el receptor HER2 y el de la topoisomerasa II ha llevado a postular que la amplificación del gen de la topoisomerasa, en pacientes con expresión de Her2-neu, sería el responsable de la sensibilidad a las antraciclinas, pudiendo utilizarse como biomarcador (Larsimont D y cols., 2008). Sin embargo este punto debería validarse en estudios prospectivos. Por otro lado, también ha comunicado que dentro de estos pacientes, aquéllos que además son hormonosensibles, pudieran presentar cierta resistencia al tratamiento con tamoxifeno. (Gago FE y cols., 2006).

Se considera que está sobreexpresado si se observa positividad de 3 cruces (3+) en la determinación por inmunohistoquímica de la expresión de la proteína HER2 en las células tumorales o, en casos de menor positividad (2+), si el FISH es positivo, es decir, si se observan amplificación de las copias del gen *c-erbB2* en las células tumorales. Se han utilizado en su medición tanto técnicas morfológicas como la técnica inmunohistoquímica en las muestras de tejido tumoral mamario (Masood S y cols. 2002). La hibridación *in situ* cromogénica (CISH) es el método más moderno utilizado para su determinación (Ross JS y cols. 2009) y se ha validado comparativamente con hibridación *in situ* fluorescente (FISH) e inmunohistoquímica (Shah S y cols., 2009).



Su determinación está universalmente aceptada en la práctica clínica y se reconoce imprescindible para la aproximación terapéutica (Flores YN y cols. 2011).

Otro punto de extraordinario interés es la discordancia en la expresión de c-erbB2 o HER2 entre el tumor primario y la metástasis. Ya en 1997 se observó una discrepancia del 31% en la expresión de receptores de estrógeno, de progesterona y de Her2-neu, entre tumor primario y metástasis (Kuukasjarvi T y cols., 1997). Diferentes publicaciones han observado esta diferencia en diversa proporción, recomendando la realización de biopsia en la localización metastásica, siempre que sea factible (Idirisinghe PK y cols., 2010).

### **1.3.3.3 $\mu$ PA/PAI**

El activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y su inhibidor, PAI-1, han demostrado poder predictivo significativo, con especial utilidad en el grupo de ganglios negativos. Los niveles altos (medidos sobre extractos titulares usando técnicas de ELISA) indican un alto riesgo de recidiva y necesidad de adyuvancia, mientras que si permanecen bajos el pronóstico es excelente y podrá ahorrarse el tratamiento sistémico (Harbeck y cols., 2004).

En un estudio retrospectivo francés, con 169 mujeres sin afectación ganglionar seguidas durante siete años, se vio que el 57 % presentaban niveles altos de uPA /PAI-1. Se encontró correlación de este parámetro con la supervivencia libre de recaída y la recaída a distancia, pero no con la recaída loco-regional (De Cremoux P y cols., 2009).

Aunque se reconoce su importancia, la gran limitación de este marcador es la necesidad de disponer de una sustancial cantidad de tejido congelado para realizar su determinación, pues a día de hoy todavía no disponemos de técnicas inmunohistoquímicas para su evaluación (Harbeck N y cols., 2011).

### **1.3.3.4 Susceptibilidad genética**

De forma global, la susceptibilidad genética heredada supone alrededor del 10% de casos de cáncer de mama. Los genes implicados en mayor número de casos son BRCA1 (responsable del 20-40% de casos hereditarios) y BRCA2 (10-30%).

La implicación pronóstica y predictiva de este grupo de tumores se basa en que los tumores con mutación de BRCA1 suelen ser pobremente diferenciados, RE/RP/Her2 negativos, con fenotipo basal, EGFR negativos, con escaso componente de carcinoma *in situ*, e hipersensibles a esquemas de tratamiento basados en platino e inhibidores de PARP-1 (de Soto JA y cols., 2006)

## **1.4 Clínica y diagnóstico del cáncer de mama**

Gracias a los programas de cribado precoz, cada vez son más las mujeres diagnosticadas en estadios iniciales y asintomáticos (Miller AB y cols., 2014), pero en el resto de casos, el hallazgo más frecuente es una tumoración en la mama que puede o no ir acompañada de dolor. Además, este grupo de mujeres sintomáticas pueden presentar alteraciones en el pezón como una retracción del mismo o alteraciones en la epidermis de la mama.

Los síntomas deben ser evaluados a través de una triple aproximación que consiste en la exploración física, el diagnóstico por imagen y, finalmente, la biopsia. La técnica recomendada para la realización de la biopsia es la punción con aguja gruesa, que permite extraer una muestra del tumor que debe ser analizado y caracterizado por un anatomopatólogo para la caracterización definitiva. Cuando dicho

análisis de resultados no concluyentes con respecto a los síntomas, es recomendable llevar a cabo una biopsia escisional en el área en la que la tumoración es palpable (DeVita VT y cols., 2011).

Actualmente existe un elevado grado de consenso en cuanto a las características de las unidades clínicas en las que la patología mamaria debe ser controlada y tratada. Dichas unidades deben ser multidisciplinarias y estarán formadas por cirujanos, cirujanos plásticos, especialistas en diagnóstico por imagen, oncólogos clínicos, especialistas en consejo genético, anatomopatólogos, ginecólogos y profesionales de salud mental.

## **1.5 Tratamiento**

El tratamiento del cáncer de mama consiste en la integración de una serie de actuaciones que involucran a varios especialistas y servicios médicos, entre ellos, los servicios de Cirugía, Anatomía Patológica, Radioterapia Oncológica, Medicina Nuclear y Oncología Médica (Wilson AR y cols., 2013).

Desde el punto de vista de las opciones terapéuticas, podemos dividir las, de una forma didáctica, en un tratamiento local/locorregional o un tratamiento sistémico.

### **1.5.1 Tratamiento local/locorregional**

#### **1.5.1.1 Cirugía**

Dentro de la esfera del tratamiento locorregional se encuentra la cirugía, siendo la escisión tumoral amplia o lumpectomía con bordes quirúrgicos libres, el tratamiento de elección para la mayoría de las mujeres con cáncer de mama en estadios I y II (Schnitt SJ y cols., 2015). En pacientes con tumores de mayor tamaño, en las que la escisión tumoral con bordes quirúrgicos libres no garantiza un buen resultado estético, carcinomas mamarios multicéntricos o en pacientes que no toleran suficientemente la radioterapia, la mastectomía radical modificada es la técnica quirúrgica indicada. Ambas estrategias registran similares tasas de supervivencia a largo plazo (Schwartz GF, 2006).

En cuanto a la afectación ganglionar axilar, la disección de los ganglios linfáticos axilares está indicada en las mujeres que presentan afectación regional en esta zona. Sin embargo, el desarrollo y la práctica de la inspección de los ganglios linfáticos centinela, junto con las técnicas de biopsia, están permitiendo la reducción de la linfadenectomía, más aún teniendo en cuenta que, la mayoría de los cánceres de mama, son diagnosticados en estadios precoces (Gebruers N y cols., 2015).

#### **1.5.1.2 Radioterapia**

Otra modalidad de tratamiento para el control locorregional es la radioterapia, la cual se basa en la utilización de radiaciones ionizantes. Esta modalidad de tratamiento administrada tras un tratamiento quirúrgico conservador de la mama, reduce el riesgo de recidiva local en un 15% durante los 10 años siguientes y el de muerte en un 4% en 15 años (Bartelink H y cols., 2015).

Por otro lado, el grupo de trabajo EBCTCG (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group) publicó en el año 2014 un metanálisis de 22 ensayos clínicos randomizados relacionados con la radioterapia después de la mastectomía y la cirugía axilar, obteniendo unos resultados similares a los previos, de tal forma, había una reducción del riesgo de recidiva local del 10% a los 10 años, y de muerte en un 8% a los 10 años (McGale P y cols., 2014).

En lo que se refiere a pacientes con carcinoma no invasivo, la radioterapia ha demostrado disminuir el riesgo de recurrencia local, después de una tumorectomía, ofreciendo tasa de supervivencia similares a la mastectomía (Morrow M y cols., 2015).

### **1.5.2 Tratamiento sistémico**

Después del tratamiento local, la terapia sistémica, según su orden de administración, se clasificará en:

**Terapia adyuvante.** La terapia adyuvante se define como la administración de tratamiento sistémico después de haber sido eliminado el tumor primario mediante un tratamiento local radical. Se ofrece con intención curativa, y su objetivo es el de eliminar la enfermedad residual microscópica, reduciendo, de esta manera, el riesgo de recurrencia y aumentando la supervivencia de las pacientes.

**Terapia neoadyuvante.** Es aquella que se administra antes del tratamiento local con cirugía o radioterapia. Entre sus objetivos se encuentra la eliminación de la enfermedad micrometastásica, y la disminución de la masa del tumor primario, permitiendo, así, un tratamiento local conservador.

Si nos encontramos en el contexto de una enfermedad avanzada, la cual es tratable, pero no curable, el tratamiento sistémico se presenta como el enfoque primordial.

#### **1.5.2.1 Hormonoterapia**

La hormonoterapia representa la primera y más exitosa terapia molecular específica desarrollada hasta el momento. El efecto de esta estrategia terapéutica es claramente dependiente de las características moleculares de las células ya que, en mujeres con tumores mamarios que no sobre-expresan receptores hormonales, la hormonoterapia es ineficaz. La utilización de un agente u otro, vendrá marcado por el estado menopáusico de la paciente.

Como terapia adyuvante, en las pacientes premenopáusicas, el utilización de tamoxifeno, a dosis de 20 mg por día durante un periodo de 5-10 años, es el tratamiento estándar; pudiendo realizar un cambio a letrozol, un inhibidor de la aromatasas en las pacientes que comienzan a ser postmenopáusicas durante los primeros 5 años del tamoxifeno (Goss PE y cols., 2003). El valor de añadir una supresión ovárica, no queda tan claro, debiendo considerarlo en conjunto con la paciente, tras evaluar los beneficios y los posibles efectos secundarios (Francis PA y cols. 2015). En las enfermas postmenopáusicas, tanto el tamoxifeno como los inhibidores de la aromatasas son opciones válidas, permitiendo éstos últimos aumentar el intervalo libre de enfermedad, pero sin un impacto significativo en la supervivencia global (Bliss JM y cols., 2012).

La experiencia con hormonoterapia como tratamiento neoadyuvante es menor que con la quimioterapia, siendo también las tasas de respuestas patológicas completas menores. Esta opción se puede convertir en una alternativa óptima a la quimioterapia neoadyuvante; sobre todo, en aquellas pacientes postmenopáusicas con receptores hormonales positivos. Parece claro que los inhibidores de la aromatasas son superiores o, al menos, tan eficaces, como el tamoxifeno en reducir el tamaño clínico del tumor, pero evitando los efectos secundarios del antiestrógeno. Se desconoce la duración óptima del tratamiento hormonal neoadyuvante; no obstante, parece recomendable no utilizar el tratamiento menos de seis meses para poder obtener la respuesta máxima (Ellis MJ y cols., 2001; Smith IE y cols., 2005).

En el escenario de las pacientes metastásicas, en el caso de que sean premenopáusicas, la ablación ovárica junto con tamoxifeno, es el tratamiento de elección. En las mujeres postmenopáusicas hay

datos que apoyan el uso de fulvestrant, tamoxifeno e inhibidores de la aromatasa (Johnston SR y cols., 2013). Igualmente, la combinación de everolimus con exemestano, tras progresión a un inhibidor de la aromatasa no esteroideo, en pacientes HER2 negativas, ha conseguido demostrar un aumento de la supervivencia libre de progresión de 5 meses (Piccart M y cols., 2014).

### **1.5.2.2 Quimioterapia**

La quimioterapia es un tratamiento sistémico basado en el empleo de drogas que interfieren en diversos procesos celulares relacionados con la división celular, por tanto, estas drogas poseen una actividad citotóxica.

Dentro de la terapia adyuvante, este tipo de tratamiento se recomienda, como norma general, en las pacientes triples negativas, HER2 y luminal A de alto riesgo, siendo los regímenes más utilizados aquéllos que contienen taxanos y/o antraciclinas. Además, habría que añadir que hay autores que sugieren que la secuencia taxanos-antraciclinas puede ser más efectiva (Earl HM y cols., 2014). La duración recomendada varía entre 12 y 24 semanas, dependiendo del riesgo individual y el esquema elegido.

En el contexto de la neoadyuvancia, dentro de los estudios aleatorizados con los regímenes más óptimos, destacamos el de Smith (Smith IC y cols., 2002), en el cual se demostró que la administración con docetaxel secuencial obtenía el doble de respuestas completas patológicas. En el estudio del Nacional Surgical adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP B27) (Bear HD y cols., 2003) se objetivó un aumento de la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global con la incorporación docetaxel a los esquemas de neoadyuvancia. En el estudio fase III De Gianni (Gianni L y cols., 2002) y en el estudio de la MD Anderson (Green MC y cols., 2005) se evidenció la utilidad de añadir paclitaxel a los esquema de tratamiento utilizados en este contexto. En el estudio Geparduo (Von Minckwitz G y cols., 2005) y Gepartrio (Von Minckwitz G y cols., 2008), se comparó la eficacia en la incorporación de antraciclinas y docetaxel, obteniendo en el primero de los estudios unas tasas de respuestas patológicas completas del 14,3% y, en el segundo, del 17%. Estas combinaciones se han venido conformando en posteriores estudios (Toi M y cols., 2008; Iwata H y cols., 2011).

En lo que se refiere a los estudios de dosis densas e intensificación, fuera del contexto de ensayos clínicos, no se recomiendan de forma actual, debido al modesto impacto en la supervivencia global y recurrencia (Gampenrieder SP y cols., 2013).

En el escenario metastático, las recomendaciones generales, siguen manteniendo el uso de tratamiento secuencial con agentes únicos, reservando la combinación de quimioterapia para aquellos casos con afectación visceral, enfermedad altamente sintomática o rápidamente progresiva (Dear RF y cols., 2013). Igualmente, aunque los taxanos pueden ser los agentes utilizados en primera línea, no han conseguido demostrar un beneficio superior a las antraciclinas, por lo que las preferencias del paciente y la toxicidad provocada, deben ser tenidos en cuenta a la hora de utilizar uno u otro agente (Piccart-Gebhart MJ y cols., 2008). Por otro lado, la capecitabina, también, ha mostrado resultados consistentes en primera y segunda línea (Blum JL y cols., 2012). En lo que se refiere a la vinorelbina, ésta ha demostrado resultados iguales o superiores a paclitaxel o docetaxel en las pacientes HER2, cuando se combina con trastuzumab (Andersson M y cols., 2010). La eribulina, por su parte, ha demostrado un aumento de la supervivencia global en aquellas pacientes muy pretratadas (Kaufman PA y cols., 2012).

### **1.5.2.3 Terapia anti-HER2**

Dentro del campo de la adyuvancia, la combinación de trastuzumab y quimioterapia en pacientes con sobreexpresión de HER2 produce un aumento del 9% en la supervivencia global a los 10 años, y

un aumento de la supervivencia libre de enfermedad del 10% a largo plazo (Pérez EA y cols., 2014), habiéndose convertido el año de duración en el tiempo estándar de tratamiento (Pivot X y cols., 2013).

Dentro del tratamiento neoadyuvante, tenemos estudios con trastuzumab, lapatinib y pertuzumab. En lo que se refiere al trastuzumab, el primero de los estudios, es el realizado en la MD Anderson Cancer Center (Buzdar AU y cols., 2005). Dicho estudio finalizó con 42 pacientes debido a la alta tasa de respuestas completas patológicas encontrada en la rama con trastuzumab: 26.3%, frente a 65.2% ( $p=0.016$ ). Otro ensayo es el estudio Nohah (Gianni L y cols., 2007), en el cual se mostró un aumento significativo de la tasa de respuesta completa patológica en el grupo que recibió trastuzumab (38% versus 20%;  $p=0.003\%$ ). El ensayo fase III Geparquattro (Uncht M y cols., 2008), demostró unas tasas incrementadas de la tasa de respuesta completa patológica en las pacientes con trastuzumab de 45.5% versus 19.5%.

En lo que se refiere al lapatinib, los siguientes estudios (Neo-Allto, Cherlob, Nsabp-41 y el Geparquinto) compararon la eficacia de trastuzumab con lapatinib. Excepto el Geparquinto, ninguno de ellos mostró diferencias en la tasa de respuesta completa patológica entre ambos agentes. Lapatinib, de todas formas presentó más toxicidad debido a la diarrea (grado 3- grado 4 en el 12-36%). En los pacientes Her2 positivos, el estudio Geparquinto mostró mayores tasas de tasa de respuestas completas patológicas de trastuzumab en comparación con lapatinib (30% vs 23% con una  $p<0.04$ ) (Untch y cols., 2012). Neo-Allto, Cherlob y el Nsabp-41 demostraron que la combinación de trastuzumab y lapatinib mejoraban los resultados de eficacia, aunque los resultados del Nsabp no fueron estadísticamente significativos. La combinación alcanzó unas tasas de respuesta completa patológicas entorno a un 50%, sin asociar efectos cardiacos adversos relevantes (Baselga J y cols., 2012; Guarnieri V y cols., 2012; Robidoux A y cols., 2012).

Pertuzumab es un anticuerpo monoclonal que bloquea la dimerización de HER2 con otros miembros de la familia Erb. En el fase II NeoSphere, 417 pacientes con tumores Her2 positivo y tumores >2cm fueron randomizadas en cuatro brazos de tratamiento: docetaxel más trastuzumab (A), docetaxel más trastuzumab más pertuzumab (B), trastuzumab más pertuzumab sin quimioterapia (C) y docetaxel más pertuzumab (D). El brazo que obtuvo la mayor tasa de respuesta completa patológica fue el brazo B con un 46% (Gianni L y cols., 2012). En el estudio Tryphaena, otro fase II, la combinación de pertuzumab y trastuzumab se dio en los tres brazos, obteniendo en todos los brazos unas tasas de respuesta completa patológica en torno al 60%, según la quimioterapia recibida (Schneeweiss A y cols., 2011).

Por lo tanto, actualmente, ya disponemos de, mínimo, cuatro drogas para inhibir la vía de HER2 (trastuzumab, lapatinib, pertuzumab y trastuzumab emtansina). Nuevas sustancias están investigación, como el ertumaxomab, un anticuerpo monoclonal biespecífico cuyas dianas son el HER2 y CD3 y el Neratinib, el cual es un inhibidor tirosín Kinasa que bloquea HER1 y HER2 de forma irreversible. A su vez, aparecen también, tratamientos dirigidos a HER 2 y al receptor de insulina 1, e inhibidores de HSP-90 (Gampenrieder SP y cols., 2013).

En las pacientes metastásicas, el estudio Ma.31 demostró un aumento de la supervivencia libre de progresión de 11.4 meses versus 8.8 meses al comparar un taxano con trastuzumab, respecto a la misma combinación con lapatinib (Gelmon KA y cols., 2012). El estudio Cerebel comparó trastuzumab y lapatinib en combinación, ambos, con capecitabina, objetivando un menor número de eventos en el sistema nervioso central y una mejor supervivencia libre de progresión en el brazo de trastuzumab (Pivot X y cols., 2012). Por otra parte tenemos el estudio Cleopatra (Swain SM y cols., 2013). En este estudio se evidenció un aumento de la supervivencia libre de progresión y, a un año, con la combinación trastuzumab + pertuzumab + docetaxel comparado con docetaxel + trastuzumab en primera línea.

Con respecto al TD-M1, éste ha conseguido demostrar, en segunda línea, un aumento de supervivencia, tanto global como libre de progresión (Wildiers H y cols. 2013).

#### 1.5.2.4 Terapias dirigidas a VEGF

En el contexto de la neoadyuvancia con bevacizumab se han publicado, de forma simultánea, dos estudios, el del GeparQuinto (pacientes Her2 negativas) (Bear H.D. y cols., 2012) y el del Nsabp B-40 (Von Minckwitz G y cols., 2012). Ambos fase III demostraron una mejora en la tasa de respuesta completa patológica al añadir bevacizumab (18% versus 15% y 35% versus 28%). Estas diferencias se pueden explicar por los diferentes números de ciclos recibidos, las diferencias en la dosis de quimioterapia y las diferencias en los criterios de inclusión de las pacientes con receptores hormonales positivos.

En las pacientes metastásicas, bevacizumab en combinación con quimioterapia, como terapia de primera o de segunda línea, parece ofrecer, únicamente, un beneficio moderado en supervivencia libre de progresión, y ningún beneficio en la supervivencia global. Esto puede ser debido a que la ausencia de factores predictivos conocidos para la eficacia de bevacizumab, hace difícil su uso. Por tanto, bevacizumab sólo se debería considerar como una opción en casos seleccionados, no recomendándose después de una primera o segunda línea de tratamiento (Cardoso F y cols. 2014).

## 2. Ciencias “-ómicas”

### 2.1 Potencialidad de las ciencias “-ómicas” en el cáncer: Pronóstico y diagnóstico

El interés suscitado en la biomedicina por comprender y poder anticipar los cambios en los fenotipos de una enfermedad, ha contribuido en los últimos años, al desarrollo de instrumentos de detección analítica que se caracterizan por su habilidad para identificar y/o cuantificar miles de moléculas biológicas, abriendo, así, la posibilidad de obtener la información de todo el genoma de un individuo en un corto periodo de tiempo. Sin embargo, si nos conformásemos sólo con este tipo de análisis, únicamente se nos permitiría entender las enfermedades de carácter genético. Esto ha obligado a que las investigaciones biomédicas hayan seguido descendiendo en la cascada de información (genómica → transcriptómica → proteómica → metabonómica → fenotipo) con el fin de poder anticiparse a todas las causas de una enfermedad. De tal forma, se ha posibilitado la oportunidad de conseguir una cantidad significativa de información en lo concerniente a las proteínas y metabolitos que se pueden hallar en los tejidos o en los biofluidos. Este conocimiento nos proporciona las bases para el entendimiento y asimilamiento de los mecanismos que subyacen en gran cantidad de patologías, enfermedades y otro tipo de alteraciones.

De tal forma, el termino “-ómicas”, es un neologismo que hace referencia a una visión holística del conjunto de moléculas en la biología. Por ello, en la oncología, así como en otro tipo de enfermedades, las tecnologías “-ómicas” abren la posibilidad a la identificación de genes, proteínas o metabolitos que pueden servir de biomarcadores para la detección del comienzo de una enfermedad, es decir, su diagnóstico; o bien, para la monitorización de la evolución de la misma. Una vez conocido un biomarcador, o una combinación de ellos, y quedando establecidos los métodos para su detección y seguimiento, se nos abre una puerta a la mejora en el diagnóstico, pronóstico y manejo de los pacientes, de tal forma que el descubrimiento de los biomarcadores, y sus rutas de señalización, nos pueden permitir sentar las bases para el desarrollo de nuevos tratamientos; o bien, permitirnos un uso más racional del arsenal terapéutico actual, bien sea la quimioterapia estándar, o las nuevas terapias biológicas y agentes antidiaria (figura 1).



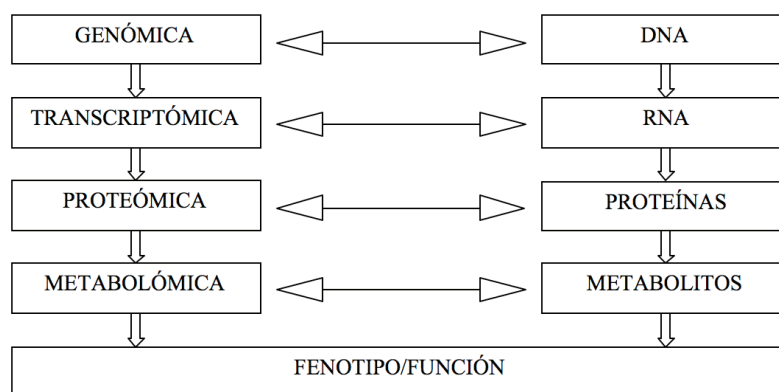


Figura 1. Ciencias “-ómicas”.

## 2.2 Limitaciones de las ciencias -ómicas

No obstante, estas herramientas no están exentas de impedimentos que entorpecen su inclusión en la práctica clínica habitual. Así, la complejidad en término de número de moléculas estudiadas, la falta de consenso en la terminología utilizada, y la dificultad para el manejo de la gran cantidad de información que proporcionan las nuevas técnicas de detección, hacen que la aplicación de estos conocimientos teóricos no sea tan rápida como cabría esperar.

En lo que se refiere al estudio de moléculas, la genómica se encarga de todas las secuencias de nucleótidos, incluyendo genes estructurales, secuencias reguladoras y DNA no codificante en los cromosomas de un organismo. La proteómica se ocupa de la identificación de las proteínas, con la combinación de 20 aminoácidos, y la determinación de sus papeles en las funciones fisiológicas y fisiopatológicas. Por último, la metabolómica se centra en el estudio de las pequeñas moléculas como los lípidos, azúcares, hormonas, metabolitos secundarios, etc, siendo el número de metabolitos en el ser humano desconocido, y estando estimado un mínimo de 2000 ó 3000, y un máximo de alrededor 20.000, todo esto en comparación con los 23.000 genes ó las 60.000 proteínas conocidas.

En lo que respecta a la falta de consenso, un ejemplo claro lo tenemos a nivel de la genómica, en la cual el gen que codifica a la colín -Kinasa, es presentada por tres símbolos diferentes (CHKA, CHK y CKI), siendo todos ellos aceptados y utilizados de forma arbitraria en la literatura ([www.uniprot.org/uniprot/P35790](http://www.uniprot.org/uniprot/P35790)). El mismo problema ocurre con las proteínas, ya que la misma puede tener varios accesos numéricos en las bases de datos (Casado Vela J y cols., 2011); e igual ocurre con la nomenclatura designada para las pequeñas moléculas, en la cual coexisten tanto los términos de la química orgánica tradicional como los de la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC).

Por ello, para intentar combinar toda la información obtenida por las distintas ciencias “-ómicas”, será necesario la estandarización de términos y el desarrollo de herramientas bioinformáticas que puedan ayudar a integrar la información y facilitar la interpretación; de tal forma que la integración funcional de la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica en estudios comparativos de sujetos sanos y enfermos, facilitarán el conocimiento de la enfermedad oncológica desde una perspectiva global. Esto incluirá no sólo alteraciones genéticas, sino también modulaciones enzimáticas y su conversión en alteraciones metabólicas, que no son tan obvias cuando sólo se estudian los cambios genéticos. Como consecuencia, esta mejora en el entendimiento de estas nuevas y fundamentales diferencias entre la célula sana y la tumoral, podrán ser trasladadas a la mejora de la práctica clínica y al manejo del paciente (Nicholson JK y cols., 1999).

### 3. Metabolómica

#### 3.1 Definición

El término metabolómica (Fiehn O. 2001), como rama de las ciencias *-ómicas*, hace referencia al estudio, identificación y cuantificación del conjunto de metabolitos presentes en células, tejidos o fluidos biológicos, productos de las reacciones metabólicas en los seres vivos, cuya cuantificación proporciona un amplio panorama del estatus bioquímico. La ausencia o presencia de alguno de estos metabolitos, así como la concentración relativa entre ellos, puede ser un indicador de estados de enfermedad o de factores de predisposición a ella.

Los metabolitos, por tanto, son moléculas de bajo y medio peso molecular (<1500 Dalton) que intervienen en los procesos celulares y nos revelan cómo está funcionando el metabolismo en un organismo determinado en un ser vivo. Nos referimos a los lípidos, azúcares, aminoácidos, hormonas, metabolitos secundarios, etc, siendo, por tanto, el término “metaboloma” (Oliver SG y cols., 1998), el utilizado para referirse al conjunto completo de moléculas que se puede encontrar en un sistema biológico.

Por otro lado, también hay que diferenciar el término “metabolómica” del de “metabonómica”, los cuales se utilizan en la literatura de forma intercambiable (tabla 3). Nicholson and Lindon (Nicholson JK y cols., 1999) definieron hace unos años estos conceptos:

Mientras que la metabolómica se centra en la descripción analítica, caracterizando y cuantificando todas las moléculas de bajo peso molecular de un sistema biológico; la metabonómica es más general, y se centra en el conocimiento global de la respuesta metabólica de los seres vivos para mantener su homeostasis ante un estímulo fisiopatológico o a una modificación genética. A pesar de las diferencias en los conceptos iniciales, la metodología y filosofía de ambas ciencias son muy similares, convirtiéndolas en disciplinas convergentes muy difíciles de distinguir. Esto ha hecho que los términos “metabolómica” y “metabonómica” sean usados intercambiamente en el mundo científico marcado principalmente por razones históricas.

CONCEPTO	DESCRIPCIÓN	AUTOR
<b>Metabolómica</b>	Análisis completo del metaboloma de un sistema biológico que se encuentra en unas condiciones determinadas.	Fiehn O, 2001
<b>Metaboloma</b>	Conjunto de moléculas de bajo peso molecular (metabolitos) que se encuentran en el interior o son secretadas por una célula o tejido.	Oliver SG y cols., 1998
<b>Metabonómica</b>	Medida cuantitativa multiparamétrica de las respuestas metabólicas de los sistemas vivos multicelulares a lo largo del tiempo, tras la aplicación de estímulos fisiopatológicos o modificaciones genéticas.	Nicholson JK y cols., 1999

Tabla 3. Conceptos aplicados en metabolómica.



La metabolómica se ha convertido en los últimos años en una de las ramas más importante de la bioquímica y de la biología molecular, ya que, mientras la genómica y la proteómica nos indican “lo que podría haber pasado”, la metabolómica nos indica “lo que realmente ha pasado y está pasando”. La razón es que no tiene necesariamente que existir una relación cuantitativa directa entre la concentración de RNA mensajero y la función enzimática. Esto hace que el impacto que puedan tener estas dos variables sobre la concentración de metabolitos sea inexacto. Sin embargo, en el caso contrario, al ser final de las vías de señalización, la metabolómica puede probar más que los clásicos desórdenes metabólicos, y aparece como el mejor indicador de la monitorización de cambios en el genoma y de la disregulación de genes transcritores específicos, siendo por tanto, la ciencia que mejor puede caracterizar los fenotipos de los seres vivos (Bathen TF y cols., 2007).

### 3.2 Análisis metabolómico

Este desarrollo viene emparejado a la evolución de las técnicas espectroscópicas de alta resolución, junto a los métodos de reconocimiento de patrones que serán necesarios para poder interpretar la información metabólica contenida en las muestras biológicas. En los casos de muestras obtenidas de individuos sanos y afectados por alguna enfermedad, el objetivo del análisis es identificar las diferencias entre las dos clases, mediante el análisis de los metabolitos endógenos encontrados en tejidos o fluidos biológicos. Para ello, a través de técnicas espectroscópicas de alta resolución, se obtendrá una matriz de datos metabólicos que contendrá toda la información bioquímica de una muestra biológica. Debido a su complejidad, la interpretación de esta matriz de datos requerirá del uso de herramientas estadísticas multivariantes que destacarán aquellas diferencias que sean realmente significativas entre las clases y por consiguiente biomarcadores del proceso estudiado.

El origen del campo de la identificación metabólica puede marcarse a principio de los años 70, cuando el desarrollo de las técnicas de separación cromatográficas permitieron la cuantificación de pequeñas moléculas en biofluidos como la orina (Pauling L y cols., 1971).

Poco después, la espectroscopia RMN de protón fue usada por vez primera como herramienta analítica en estudios metabólicos, donde un conjunto de compuestos entre los que se encontraban el lactato, la creatina o la alanina, fue detectado en una suspensión de glóbulos rojos (Brown FF y cols., 1977). Durante los años 80, el análisis de los numerosos metabolitos detectados en los espectros de resonancia magnética impulsó el desarrollo de nuevas técnicas para clasificar las muestras en función de su estatus biológico (Bales JR y cols., 1984; Gartland KP y cols., 1940; Nicholson JK y cols., 1989). De esta forma, el concepto de huella metabólica (Fiehn O. 2002) nace al aplicar técnicas estadísticas multivariantes en la interpretación de los cada vez más complejos datos espectroscópicos de muestras biológicas (tabla 4). Por lo tanto, lo que se busca es comparar los distintos espectros de las distintas muestras, aplicando métodos de reconocimiento de patrones, sin necesidad de conocer la naturaleza de los picos de los espectros, y por lo tanto, de los metabolitos involucrados. De esta forma se vería cómo se agrupan las muestras, y nos permitiría separar individuos sanos de enfermos, y, al mismo tiempo, podríamos definir grupos a los que asignamos diversos factores de riesgo, en relación a la enfermedad estudiada (Ryan D y cols., 2006).

Otra aproximación es el perfil metabolómico (Fiehn O. 2001), que consiste en seleccionar el conjunto de metabolitos con los que queremos trabajar, en general, los relacionados con una determinada ruta, y analizar cómo evoluciona. Normalmente es posible identificarlos y cuantificarlos de forma relativa. En el caso en que conozcamos qué metabolitos son clave en el proceso, podremos particularizar el tratamiento de muestra y utilizar la técnica de medida más conveniente para identificarlos y cuantificarlos de forma absoluta (Dunn WB y cols., 2005).

CONCEPTO	DESCRIPCIÓN	AUTOR
<b>Huella Metabólica</b>	Medida global de los metabolitos presentes en un sistema biológico (“metabolic fingerprint”) o consumidos o secretados por el mismo con el objetivo de detectar diferencias entre muestras.	Fiehn O. 2002
<b>Perfil Metabolómico</b>	Identificación y cuantificación de un número limitado predeterminado de metabolitos relacionados entre sí (por presentar similitudes físico-químicas o por participar en una ruta metabólica concreta).	Fiehn O. 2001

Tabla 4. Conceptos aplicados en análisis metabolómico

Los datos metabólicos son obtenidos principalmente a través de RMN y MS. Si comparamos ambos métodos, MS presenta una mayor sensibilidad en comparación con la RMN. Además, esta técnica suele llevar acoplada otros métodos de pre-separación de las muestras como cromatografía gaseosa (Morris M y cols., 2005; Yang J y cols., 2004), cromatografía líquida (Wilson ID y cols., 2005), electroforesis capilar (Soga T y cols., 2003) o movilidad iónica. Así mismo, otros métodos analíticos como la Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR) o la HPLC, que como herramientas metabolómicas presentan la desventaja de proporcionar un nivel de detalle insuficiente para la identificación molecular, pueden acoplarse al MS como métodos de pre-separación (Gamache PH y cols., 2004; Kaderbhai NN y cols., 2003). Por el contrario, la RMN por medio de la espectroscopía de ángulo mágico (HR-MAS) es la única técnica capaz de realizar análisis sobre tejidos intactos. Así mismo, la espectroscopia bidimensional de RMN es muy útil en la identificación de las sustancias bioquímicas a través de la conectividad entre señales.

Por otro lado, como dijimos antes, los datos espectrales resultan de una enorme complejidad como para ser analizados manualmente. La interpretación de los datos obtenidos requerirá el uso de una serie de herramientas estadísticas multivariantes supervisadas y no supervisadas. Tras la adquisición de los espectros por RMN o MS, será necesario realizar un pretratamiento de las señales con el fin de evitar varianzas propias de la adquisición y hacer los análisis posteriores más robustos. Una vez preprocesados los datos espectrales, se podrá comenzar el análisis estadístico. Como primer paso, generalmente se ejecuta un análisis multivariante no supervisado; principalmente un análisis de componentes principales (PCA). El PCA destacará las regiones espectrales que están sometidas a una mayor variabilidad (posibles biomarcadores) o que presenten señales no reproducibles (posibles contaminaciones), e identificará las muestras que se diferencian en exceso del conjunto general (posibles “outliers”). El análisis no supervisado permitirá filtrar los datos, mejorando su robustez y a través de él se podrá identificar los posibles biomarcadores, que serán validados a través de un análisis multivariante supervisado o un modelado posterior (Figura 2)

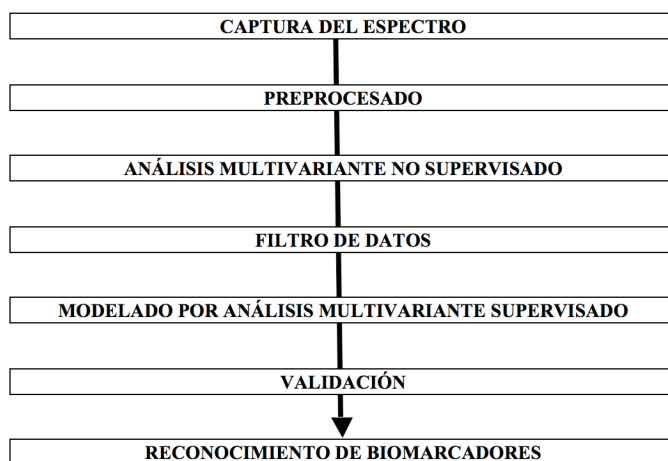


Figura 2. Diagrama del análisis metabolómico.

Así pues, estos métodos han contribuido de forma muy significativa al incremento de estudios en metabolómica. La verdadera razón de este suceso, es que estas tecnologías han permitido la identificación y la cuantificación de cientos de metabolitos en cortos periodos de tiempo; sin embargo, como se comentó anteriormente, aún hoy, continúan existiendo varias limitaciones que enlentecen el desarrollo. Así, sabemos que sólo un bajo porcentaje de los metabolitos pueden ser identificados y monitorizados con la tecnología disponible hoy en día. A esto hay que añadir que la metabolómica no sólo se centra en el conocimiento de los metabolitos naturales del ser humano, sino que también se centra en la identificación de fármacos y sustancias. Por último, hay que tener en cuenta, que, al contrario que en la proteómica, la identificación de metabolitos no está unida a la información genética, lo cual, no contribuye al esclarecimiento de los mismos. A pesar de que todas estas limitaciones dificultan la creación de bases de datos, en la actualidad ya se disponen de algunas de ellas. Algunas de las más empleadas se destacan en la Tabla 5. En dichas bases de datos se confronta la masa obtenida a partir de los valores proporcionados por el espectrómetro de masas y las masas teóricas de los metabolitos contenidos en dichas bases de datos.

NOMBRE	INFORMACIÓN	AUTOR
<b>KEGG</b>	La Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto recopila datos sobre sustancias químicas y reactividad de compuestos relacionados con los seres vivos de cinco bases de datos distintas: Compound, Glycan, Reaction, Rpair, y Enzyme. Permite enlazar con más de 20 bases de datos. (www.genome.jp/ligand/)	Kanehisa M, 1997
<b>METLIN</b>	Contiene información sobre la fórmula molecular y estructural de los metabolitos (espectros de masas y espectros de fragmentación), además del enlace a otras bases de datos (KEGG, HMDB, PubChem, LipidMaps). (metlin.scripps.edu/).	Smith CA y cols., 2005
<b>LipidMaps</b>	Se enfoca a sustancias de carácter lipídico. Ofrece información sobre su clasificación, nomenclatura y estructura. Contiene dos bases de datos primarias, una con información estructural (LMSD) y la otra con asociación de los lípidos a proteínas (LMPD). Contiene enlaces con otras bases de datos relacionadas (Cell Migration Gateway, Functional Glycomics Gateway, Omics Gateway, Pathway Interaction Database, RNAi Gateway, Signaling Gateway, Structural Genomics Knowledgebase). (www.lipidmaps.org).	Sud M y cols., 2007.
<b>HMDB</b>	Es una base de datos que contiene información detallada sobre los metabolitos del cuerpo humano. A través de ella se puede obtener información química, clínica y bioquímica del compuesto seleccionado, de forma directa o por medio de enlaces con otras bases de datos (KEGG, PubChem, MetaCyc, ChEBI, PDB, Swiss-Prot, y GenBank). (www.hmdb.ca).	Wishart DS y cols., 2007
<b>PubMed</b>	Contiene la descripción e información estructural de millones de compuestos químicos. Dentro de esta base de datos se encuentran tres bases de datos primarias: de compuestos (puros y mezclas), de sustancias (mezclas, extractos y sustancias no caracterizadas) y bioensayos (artículos referentes a bioactividades de moléculas investigadas). Contiene enlaces a más de 20 bases de datos adicionales. (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).	Bolton E y cols., 2008
<b>MassBank</b>	Es una base de datos focalizada en el espectro de masas de alta resolución de metabolitos. Entre las bases de datos a las que se puede acceder a través de ella se encuentran KEGG, KNapSack y LipidBank. (www.massbank.jp)	Horai H y cols., 2010

Tabla 5. Principales bases de datos para la identificación de metabolitos.

### 3.2.1 Espectroscopia de RMN

La Resonancia Magnética Nuclear (Lindon JC y cols., 2007) es un fenómeno basado en la existencia de núcleos con momento dipolar magnético no nulo. La espectroscopía de RMN se basa en que no todos los núcleos de un mismo isótopo resuenan a la misma frecuencia debido a que estos núcleos están rodeados por una nube de electrones diamagnéticos la cual generará un campo magnético local opuesto al campo magnético principal. Esta modificación dependerá de la distribución de elec-

trones alrededor del núcleo y, por tanto, de la estructura química molecular. Esta pequeña modificación de la señal de resonancia de los núcleos se conoce como desplazamiento químico del spin. Las señales de núcleos individuales pueden mostrar desdoblamiento debidos al acoplamiento indirecto espín-espín. Para dos núcleos con espín  $\frac{1}{2}$  como es el caso de los protones, las líneas de resonancia de cada protón se desdoblarán en un doblete, dos líneas correspondientes a las dos posibles orientaciones del protón adyacente respecto al campo magnético. Extendiendo la cadena de acoplamientos, cada componente de un doblete puede desdoblarse, a su vez, en otro doblete, formando tripletes, dobles dobletes, etc. De esta forma, el acoplamiento indirecto espín-espín es un parámetro evaluable para la distinción entre isómeros y para las medidas de conformación molecular.

Es, por tanto, un procedimiento muy robusto y versátil que permite la medida de un gran número de metabolitos de forma fiable y repetitiva, partiendo de un proceso de acondicionamiento de muestra muy sencillo, y con un nivel de automatización muy alto. El campo magnético de los equipos de RMN utilizados en metabolómica es, en general, muy alto (superior a 10 teslas), y existen sondas que permiten la medida en flujos, así como en materiales semisólidos.

### **3.2.1.1 Espectroscopía bidimensional**

En la RMN unidimensional una molécula está caracterizada por la amplitud espectral representada en un eje de frecuencias. Este método permite la determinación de la composición de una muestra solamente si no se observan solapamiento de señales en el espectro. Como solución al solapamiento de señales, a mediados de los años 70 se desarrolló un método de espectroscopía de RMN bidimensional (Aue Wp y cols., 1976). El espectro bidimensional obtenido dará un mapa bidimensional, donde las señales espectrales serán representadas en función de dos dimensiones de frecuencia. Una señal cruzada en este mapa indicará que durante la secuencia de pulsos se ha producido una transferencia de magnetización entre un par de espines. El análisis de este mapa bidimensional ayudará a identificar los metabolitos presentes en las muestras estudiadas.

### **3.2.1.2 Espectroscopía de alta resolución por ángulo mágico**

La espectroscopía de RMN de alta resolución por giro de ángulo mágico (HR-MAS) es una técnica que permite la adquisición de espectros de alta resolución de tejidos y células al compensar los mecanismos de ensanchamiento de señal, de tal forma que en el tratamiento teórico de muestras líquidas homogéneas, estos efectos se incluyen como pequeñas modificaciones, pero cuando nos encontramos con células o tejidos, implican una consideración especial al ser dependientes de la posición de la muestra. El campo magnético local creado por el acoplamiento dipolar y la susceptibilidad heterogénea variará según la posición de la muestra.

### **3.2.2 Espectroscopía de masas**

La espectroscopia de masa (MS) (Watson JT y cols., 2007; Wilson ID y cols., 2007) es una técnica microanalítica que puede ser usada selectivamente para detectar y determinar la cantidad de un determinado analito en una muestra. Esta técnica se basa en identificar las partículas ionizadas en estado gaseoso a través de su relación masa/carga, la masa del ión dividido por el número de cargas que posee. De esta forma, los espectrómetros de masas, haciendo uso de campos magnéticos o de una combinación de campos eléctricos y magnéticos, podrán modificar la posición de estas partículas, obteniendo un espectro de la relación masa/carga. Normalmente la separación iónica se lleva a cabo mediante cuatro métodos: sector magnético, transformada de Fourier de la resonancia del ciclotrón del ión, cuadrupolo y tiempo de vuelo, siendo estas dos últimas las más utilizadas en aplicaciones metabólicas.

Los espectrómetros de tiempo de vuelo (TOF) miden el tiempo requerido por un ión para viajar desde la fuente de iones al detector. Como todos los iones recibirán la misma energía cinética durante la aceleración, las diferentes velocidades corresponderán a diferentes valores de su relación masa/carga.

Los espectrómetros de cuadrupolo (Q) hacen uso de campos eléctricos oscilantes para selectivamente estabilizar o desestabilizar los iones que pasan a través de un campo cuadrupolar de radiofrecuencia creado por cuatro placas paralelas. De esta forma, solamente se permite pasar en un determinado tiempo a los iones con un determinado valor de la relación masa/carga.

Uno o más de uno de estos analizadores (del mismo o diferente tipo) pueden ser acoplados para crear un tándem de espectrómetros de masas (MS/MS). Estas asociaciones proporcionan múltiples posibilidades en el diseño de experimentos. Por ejemplo, una de las combinaciones más comunes es el Q-TOF, donde utilizamos un cuadrupolo, que nos permitirá pasar únicamente los iones con un valor de la relación masa/carga determinado, y un espectrómetro de tiempo de vuelo que analizará los fragmentos de dicho ión.

La sensibilidad y selectividad de la espectroscopía de masas la convierten en una técnica ideal para la detección de metabolitos. No obstante, el análisis metabolómico requerirá de un fraccionamiento de las muestras previo a la MS. Por lo tanto, cuando hablamos de análisis metabolómico por espectroscopía de masas, realmente nos estamos refiriendo a la combinación de la espectroscopía de masas con técnicas de separación como son la cromatografía de gases (GC) o cromatografía líquida (LC). Las técnicas de GC-MS y LC-MS permiten analizar una gran cantidad de metabolitos a sensibilidades muy superiores a las de la RMN y, además, eligiendo el método de separación adecuado, se consigue una gran selectividad, proporcionando una comprensión mayor del metaboloma. GC-MS es útil para metabolitos volátiles o aquellos que se hacen volátiles por derivación química como aminoácidos, ácidos grasos y otros ácidos orgánicos, mientras que la LC-MS es más útil para el análisis de metabolitos no volátiles como los compuestos fosforilados (Wen T y cols., 2013). Dentro de esta última está la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o la cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UPLC). El uso de HPLC-MS en estudios metabolómicos ha experimentado un gran desarrollo en los últimos años frente a otras técnicas como la cromatografía gaseosa, al requerir una preparación menos compleja de muestras. Muestras biológicas acuosas como la orina requerirán una mínima preparación. El análisis de muestras más complejas como el plasma requerirá métodos de preparación más exhaustivos para prevenir la degradación de la columna del cromatógrafo. Las muestras retenidas por el HPLC pasarán al espectrómetro ionizadas mediante un electrospray. Dado que algunos analitos ionizarán mejor en modo positivo y otros en modo negativo, un estudio metabolómico completo requerirá el análisis por ambos métodos de ionización. No obstante, la generalización del HPLC-MS para análisis metabolómicos aún guarda una serie de cuestiones por resolver. Uno de los problemas es que no todas las moléculas se ionizarán de la misma manera, provocando diferencias de sensibilidad aún cuando los componentes estén presentes en la misma concentración molar. Esto complica el análisis de muestras complejas como la orina o el plasma, donde no todos los componentes son conocidos.

No obstante, mediante un análisis metabolómico por HPLC-MS detectaremos de una forma rápida biomarcadores discriminantes entre las muestras, lo complicado será determinar qué moléculas son estos biomarcadores. En la tabla 6 se presentan ventajas e inconvenientes de la MS en el uso de la metabolómica.

VENTAJAS	INCONVENIENTES
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta sensibilidad y selectividad en cualquiera de sus métodos utilizados.</li> <li>• Adecuado para la obtención de huellas y perfiles metabolómicos.</li> <li>• Medidas seguras de masa/carga ideales para la identificación de metabolitos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La sensibilidad depende de la eficiencia de la ionización.</li> <li>• Más eficaz cuando se acopla a técnicas de separación.</li> <li>• Protocolo de preparación de muestras más laboriosos.</li> </ul>

Tabla 6. Ventajas e inconvenientes de la MS para su uso en metabolómica.

### 3.2.3 Reconocimiento de patrones

Los métodos quimiométricos o de reconocimiento de patrones nos permiten extraer la información relevante de la compleja matriz de datos metabólicos. Estos métodos podemos dividirlos en dos vertientes, métodos no-supervisados y métodos supervisados. Los métodos no supervisados se encargan de reducir la complejidad de una manera robusta, produciendo representaciones gráficas fácilmente interpretables. En los métodos supervisados, un conjunto de muestras de clase conocida son utilizadas para construir y entrenar un modelo matemático que será evaluado con un conjunto independiente de muestras. Entre los métodos no supervisados destaca el Análisis de Componentes Principales (PCA), mientras que entre los supervisados diversas técnicas como el Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA), el Análisis Lineal Discriminante (LDA), el Análisis por Vecinos Cercanos (KNN) o las redes neuronales han sido utilizados con éxito en los estudios metabolómicos.

#### 3.2.3.1 Análisis de Componentes Principales

PCA es una de las técnicas exploratorias más comunes en el análisis metabolómico (Trygg J y cols., 2007; Eriksson L y cols., 2005) al poder representar datos espectrales en un espacio de baja dimensionalidad. Los componentes principales son autovectores de la diagonalización de la matriz de covarianza de la matriz de datos original. De esta forma, el primer componente principal consistirá en una combinación lineal de todas las variables espaciales ponderadas para explicar el máximo de la varianza total del espacio original; el segundo componente principal será ortogonal al primero y explicará el máximo de la varianza residual, y así con el resto hasta que la varianza total esté explicada.

#### 3.2.3.2 Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales

El Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA) es un método de regresión lineal supervisada basado en la combinación de una matriz de observables (datos espectrales) y una matriz de valores cualitativos. El objetivo del PLS-DA es encontrar variaciones relevantes en la matriz de observables que presenten un máximo de covarianza con el vector de información. PLS-DA proporciona un método gráfico de fácil comprensión para identificar las regiones espectrales que marcan una separación entre clases, mostrando la bondad de la separación y la significancia estadística del resultado (Berenton RG, 2007).

#### 3.2.3.3 Análisis lineal discriminante

El Análisis Lineal Discriminante (LDA) se trata de otra técnica común en la interpretación de datos metabolómicos (Hewer R y cols., 2006). A través del LDA se obtendrán funciones discriminantes,



combinaciones lineales de las variables originales seleccionadas para maximizar las diferencias entre los grupos de muestras analizadas. De esta forma, si las muestras analizadas están divididas en dos grupos, la función discriminante será una línea. Si tenemos tres grupos obtendremos un plano y para más de tres clases obtendremos hiperplanos de dimensión  $n-1$ , siendo  $n$  el número de grupos.

El LDA al tratarse de un método estadístico supervisado, donde el usuario proporciona al algoritmo información sobre la clase de cada muestra, es necesario que el modelo construido se valide con un conjunto externo de muestras con el fin de demostrar su robustez.

### **3.2.3.4 Análisis por vecinos cercanos**

La regla de los vecinos cercanos (KNN) (Fix E y cols., 1989) es uno de los métodos supervisados más básicos para la clasificación de muestras. Para calificar un objeto de clase desconocida se computa la distancia al resto de los objetos. La clase del objeto a una distancia más corta es seleccionada asignando esa misma clase al objeto desconocido. Primeramente se construirá el modelo con una parte de las muestras, y finalmente será validado con el resto de muestras.

### **3.2.3.5 Redes neuronales**

La aplicación de redes neuronales artificiales para el procesamiento de datos está caracterizada por una analogía con la neurona biológica. Una red está formada por una red de capas de nodos, en cada uno de los cuales se realiza una operación sencilla con varias entradas para producir una única salida (Venables W y cols., 2008).

## **3.3 Metabolómica y medicina**

Los avances en el campo de la metabolómica están siendo utilizados actualmente en una gran variedad de aplicaciones clínicas y farmacológicas dentro de la medicina. Así, se han venido aplicando con éxito en las distintas etapas del desarrollo de nuevos fármacos, ya sea en la detección y selección de nuevas sustancias activas; en la medida de los cambios metabólicos generados por ellas; en la toxicidad del principio activo o en la comprobación de los efectos sobre la salud del medicamento en poblaciones (Wishart DS y cols., 2008).

También tiene un enorme potencial en la monitorización de intervenciones nutricionales, a partir de la medida del cambio provocado por un determinado alimento sobre determinados grupos de metabolitos, especialmente los triglicéridos y el colesterol.

La metabolómica se ha revelado, también, muy eficaz en la monitorización de los trasplantes de órganos sólidos, ya que a partir de una muestra de orina o suero, permiten analizar la evolución de un conjunto de metabolitos que indican en estadios incipientes, si se producirá o no el rechazo del órgano implantado.

Otro ámbito de aplicación es en la medicina personalizada. Actualmente, cuando se elige un tratamiento para una persona enferma, se conoce muy poco sobre su fenotipo y sobre las probables reacciones frente al tratamiento elegido. El conocimiento de las variables metabolómicas debería servir para predecir la reacción de un ser vivo a la administración de medicamentos, de tal manera que el tratamiento podría particularizarse para cada individuo.

Una de las contribuciones más importantes de la metabolómica estaría dirigida a la detección de factores de riesgo poblacionales. A partir de un análisis de orina o suero, se pretendería conocer para un determinado individuo, qué factores de riesgo presenta, y a qué tipo de enfermedades está predisuesto.



Y, finalmente, otro ámbito de aplicación emergente es en lo referente al diagnóstico y tratamiento de enfermedades metabólicas, neurológicas, y especialmente oncológicas.

### 3.4 Metabolómica aplicada a la oncología

De los principales papeles que intervienen en la cancerinogénesis, uno de los más importantes recae sobre los cambios en el RNA y los niveles de expresión y regulación de las proteínas (Chari R y cols., 2010). Sin embargo, los recientes avances en MS han permitido el estudio, identificación y cuantificación de compuestos de bajo y medio peso molecular a una escala inimaginable, lo que ha permitido descubrir la importancia de este estatus bioquímico en la regulación del cáncer. Y es que, aunque la reprogramación del metabolismo energético como una de las características emergentes del cáncer (Hanahan D y cols., 2011) se conoce desde hace relativamente poco, Warburg identificó el metabolismo alterado del cáncer, descubriendo que las células neoplásicas utilizan la glicolisis anaerobia en lugar de la fosforilación oxidativa para producir la energía que necesitan, incluso en presencia de oxígeno, un fenómeno conocido como el efecto Warburg (Warburg O y cols., 1924). Otras vías importantes alteradas en el metabolismo del cáncer serán la glutaminólisis, como fuente clave de precursores del ácido tricarboxílico; y las implicaciones de la piruvato kynasa mediante la canalización de la conversión de fosfoenolpiruvato en piruvato (Vermeersch KA y cols., 2013).

Se sabe, por tanto, que las células neoplásicas sufren unos cambios significativos en su metabolismo que conllevan a una transformación total de su medio ambiente (Boros LG y cols., 2013). Esto permite que la evaluación metabolómica se pueda realizar *in vitro* e *in vivo*, utilizando células, fluidos o tejidos. Los biofluidos constituyen las muestras más sencillas para trabajar, y se han publicado estudios con suero, plasma, orina, líquido ascítico, saliva, lavado bronquioalveolar, bilis, secreciones prostáticas y líquido cefalorraquídeo. La gran mayoría de investigaciones se llevan a cabo con suero, plasma u orina (Lindon JC y cols., 2003), quizás porque estos fluidos poseen el mayor potencial para proveer de información relacionada con el estado de salud del organismo. Los metabolitos de la sangre y de la orina reflejan el resultado del estado de la enfermedad así como la respuesta del huésped a dicha agresión. Se requieren pequeños volúmenes de muestra, y cuando son almacenados a bajas temperaturas, ambos tipos de muestra, orina y suero, pueden permanecer inalterables durante largos periodos de tiempo; de tal forma, que los análisis posteriores no se verán alterados por esta condición; encontrándose, incluso, menos variaciones diurnas y entre sujetos en las muestras de suero. Por tanto, los perfiles metabolómicos basados en muestras de suero y orina se han utilizado con fines diagnósticos en una gran variedad de tumores, incluyendo vejiga, renal, hepático, colon, mama, próstata y ovario (Davis VW y cols., 2011).

Por otro lado, la utilización de muestras de tejido tumoral, siempre que se consiga material suficiente, conlleva más dificultad y es más costoso debido a su gran heterogeneidad. A esto se une que las células estromales y las células epiteliales que rodean a las células tumorales pueden contaminar el perfil metabolómico, sesgando así los resultados si se comparan con muestras puras de tejido tumoral. Las técnicas de microdissección pueden solucionar este problema, purificando la muestra, pero esto requiere un incremento significativo del equipo utilizado y de la experiencia. Debido a la alta susceptibilidad que presentan las rutas metabólicas a influencias exógenas, hay que ser muy cuidadoso en la metodología de extracción de las muestras, y en su posterior conservación a bajas temperaturas.

En cuanto a las técnicas analíticas, como se ha comentado anteriormente, se cuenta con la MS y la RMN, siendo éstas las dos técnicas más usadas en el análisis metabolómico. El espectro de datos de la RMN y de la MS proveniente tanto de los tejidos tumorales como de los biofluidos, contiene cientos de señales de metabolitos endógenos y son altamente redundantes. Para ello los sets de datos los reducen a entre 100 y 500 segmentos espectrales, y sus respectivas intensidades de señales son introducidas directamente en programas estadísticos (Dettmer K y cols., 2007). El primer paso del análisis metabolómico facilita el reconocimiento de modelos, o la categorización dentro de grupos,

como “normal” vs “cáncer” o “respondedores” vs “no respondedores”, basándose en la diferencia de espectros. La interpretación de los marcadores nos muestra información sobre las relaciones entre las muestras, e ilustra tendencias y agrupamientos. En el siguiente paso, las regiones específicas que son responsables de la formación de grupos en el primer paso, son identificadas y unidas a metabolitos específicos basados en sus características químicas por RMN. El último paso del análisis consiste en la cuantificación y asociación de biomarcadores con respecto a características particulares como el grado del tumor o la respuesta a terapias. Según el tamaño del grupo, se podrán utilizar métodos estadísticos como la *t* de Student o ANOVA.

### **3.4.1 Metabolómica como biomarcador en la oncología**

Los biomarcadores son ampliamente utilizados en la medicina clínica como factores pronósticos o predictivos. Como ejemplos en la oncología están los receptores hormonales y el Her2 en el cáncer de mama. De forma general, los biomarcadores metabolómicos en oncología se utilizan, bien para la detección de la propia enfermedad, o bien para evaluar la respuesta a los tratamientos, lo cual, se suele hacer de forma preclínica utilizando animales o cultivos celulares, seguido de una posterior validación en biofluidos o tejidos tumorales (Nagrath D y cols., 2011)

#### **3.4.1.1 El metaboloma del cáncer.**

La información disponible en lo que respecta al metaboloma tumoral es cada vez más amplia. Usando una metodología estándar, la metabolómica del cáncer muestra niveles elevados de fosfolípidos (caracterizados por una elevación de los componentes que contienen colina y fosfocolina), incremento de la capacidad glicolítica, incremento de la función glutaminolítica y sobreexpresión de isoenzimas de la glucolisis, como la piruvato-quinasa tipo 2 (Glunde K y cols., 2006).

Igualmente, el perfil metabolómico lipídico está documentado con hasta un 83% de sensibilidad para discernir entre pacientes con cáncer y controles, utilizando para ello la RMN en muestras sanguíneas (Bathen TF y cols., 2000).

Sin embargo, a pesar de lo comentado, continúan existiendo grandes lagunas en lo que al conocimiento del metaboloma del tumor se refiere. Así, entre los distintos tipos de tumores, los perfiles pueden variar con respecto a muchos metabolitos, incluyendo alanina, citrato, glicina, nucleótidos y lípidos, haciendo muy difícil el poder extrapolar conocimientos de un tipo de tumor a otro (Griffin JL y cols., 2004).

#### **3.4.1.2 Diagnóstico de cáncer**

Todas las ciencias “-ómicas” han utilizado una gran variedad de plataformas experimentales de reconocimiento de patrones para el diagnóstico de diferentes tipos de tumores. Quizás la mejor aplicación hasta ahora de la metabolómica en el diagnóstico del cáncer, sea en el de la mama. Varios estudios con RMN, analizando biopsias de mama, han identificado hasta 30 metabolitos endógenos en el tejido mamario. Se han encontrado niveles altos de fosfocolina, y bajos de glicerofosfocolina y glucosa, en comparación con tumores benignos o tejido sano. De tal forma, cuando 91 muestras de tumores de mama fueron comparados con 48 muestras de tejidos sanos adyacentes mediante RMN, se detectó un fenotipo maligno con una sensibilidad del 83% y una especificidad del 100% para el tamaño tumoral, la afectación ganglionar, el estado hormonal y la histología (Bathen TF y cols., 2007). Esto demostraría in vivo que ante una imagen sospechosa de cáncer de mama en una paciente, el 68% de las biopsias podrían ahorrarse detectando los niveles de colina (Jacobs MA y cols., 2004).

De forma muy similar al cáncer de mama, el cáncer de próstata se caracteriza por un perfil metabólico con altos niveles de compuestos de colina y fosfocolina y un incremento de lactato y alanina como productos de glucólisis (Swanson MG y cols., 2006). El fluido prostático de los pacientes con cáncer de próstata se caracteriza por mostrar bajos niveles de citrato y elevados de fosfato de espermina, comparado con sujetos sanos. De hecho, en un estudio con 28 pacientes con cáncer y 33 controles, se objetivó que la detección en el fluido prostático de citrato y fosfato de espermina, se correlacionaban con el grado de diferenciación descrito por Gleason, además de superar al PSA en el diagnóstico de cáncer (Kline EE y cols., 2006).

Con respecto a los tumores cerebrales, células *in vitro* procedentes de meningiomas, neuroblastomas y glioblastomas han mostrado patrones metabólicos que reflejan diferencias en alanina, glutamato, creatina, fosforilcolina y treonina entre los distintos subtipos histológicos. Estas diferencias metabólicas podrían ser de utilidad a la hora de localizar los lugares de biopsias más rentables, constituyendo, así, un mapa metabólico para procedimientos ablativos (Dowling C y cols., 2008).

Se han investigado también diferencias metabólicas entre mujeres sanas y aquellas con cáncer epitelial de ovario, llegando a obtener perfiles metabólicos que diferencian mujeres con cáncer de mujeres premenopáusicas o de mujeres con enfermedades benignas de ovario en el 100% de los casos. Estas diferencias se corresponden con vías responsables de la regulación del metabolismo de la pirimidina (Fujwaki R y cols., 2000).

Estos y otros resultados muestran, pues, el potencial de la metabolómica en el campo del diagnóstico del cáncer, con una mayor sensibilidad y menos agresividad que las técnicas hasta ahora utilizadas.

#### **3.4.1.3 Evaluación de respuesta al tratamiento**

El uso de la metabolómica para evaluar el efecto de los tratamientos, tanto como marcador predictivo de eficacia como marcador farmacodinámico, se ha demostrado *in vitro* en la quimioterapia y en la hormonoterapia. El uso de la RMN en cultivos celulares de glioma humano consiguió predecir la respuesta al tratamiento previo al mismo utilizando la 1-(2-cloroetilo)-3-ciclohexyl-1-nitrosurea (El-Dereby W y cols., 1997). Igualmente, la respuesta de las células endometriales a la exposición hormonal, en este caso, tamoxifeno, objetivó un cambio en los nucleótidos dosis dependiente, sugiriendo que el tamoxifeno podría modificar la transcripción del RNA (Griffin JL y cols., 2003).

También se han realizado investigaciones *in vivo* como por ejemplo los cambios metabólicos producidos por las nitrosureas en células de melanoma y cáncer de pulmón en ratones (Morvan D y cols., 2007). Durante la fase de inhibición del crecimiento, las muestras tumorales mostraron un incremento significativo de glucosa, glutamina, aspartato, y metabolitos derivados de la serina, al igual que un descenso en succinato, lo que sugería un reducción de la síntesis de nucleótidos y de las vías de reparación del DNA. La recuperación del crecimiento reflejó una adaptación del metabolismo que incluía la activación de los sistemas de producción de energía y el incremento en la síntesis de nucleótidos.

Igualmente, en el cáncer de próstata, el citrato se ha posicionado como un buen marcador de sensibilidad. Una alta puntuación según un perfil metabólico obtenido y el tamaño tumoral, fue predictivo de recaída en 15 de los 16 pacientes reclutados para el estudio (Pucar D y cols., 2004).

Por lo tanto, hay un esfuerzo por todos los profesionales implicados en el tratamiento del cáncer en conseguir afianzar el uso de la metabolómica en la evaluación de la respuesta al tratamiento en oncología. Los intermediarios del metabolismo de la fosforilcolina han demostrado ser un potencial biomarcador para la monitorización de la eficacia del tratamiento en una gran variedad de cánceres humanos. Así, por lo general, un descenso en los compuestos de colina suele ir correlacionado con una respuesta a la quimioterapia o a la radioterapia, y puede constituirse en marcador temprano de

eficacia, detectándose, antes, incluso, que las tradicionales respuestas por imagen del cáncer de próstata, mama, cerebrales y linfomas no Hodgkin.

#### **3.4.1.4 Novedades terapéuticas**

El esfuerzo en el desarrollo de los tratamientos oncológicos de los últimos años se ha encaminado hacia el desarrollo de drogas que medien específicamente en rutas aberrantes que intervengan en el proceso de crecimiento, proliferación y metastatización. Los biomarcadores se han venido utilizando de forma progresiva para el desarrollo de dichos agentes, de tal forma que nos han ayudado a identificar, validar y optimizar dianas y agentes terapéuticos; determinar y confirmar mecanismos de acción y, por supuesto, predecir y monitorizar respuestas al tratamiento, toxicidad y resistencias. Ejemplos actuales de este uso de la metabolómica, lo tenemos en el desarrollo de los inhibidores de tirosin-kinasa, agentes proapoptóticos y los inhibidores de las proteínas de choque térmico.

Una hipótesis explorada ha sido el tratamiento con agentes diana como inhibidores de señales de transducción, lo que resultó en distintos perfiles metabólicos entre células sensibles y resistentes. Así, el imatinib, un inhibidor tirosin-kinasa del oncogen BCR-ABL, demostró una disminución de la proliferación celular y una inducción a la apoptosis en la leucemia mieloide crónica (Fan G y cols., 2000). Metabólicamente, imatinib inhibe la síntesis de macromoléculas requeridas para la supervivencia de la célula mediante la supresión de sustratos básicos (Serkova N y cols., 2005). Utilizando la RMN, se ha investigado el metabolismo de la glucosa de las leucemias mieloides crónicas BCR-ABL positivas tratadas con imatinib, demostrando un descenso de la glucosa por inhibición de la glucólisis, al igual que se ha objetivado una disminución significativa de los niveles de fosfocolina, lo que se ha relacionado con una disminución en la proliferación celular (Gottschalk S y cols., 2004). También se han comunicado resistencias metabólicas a imatinib, de tal forma que un descenso en la oxidación de la glucosa mitocondrial y unos niveles altos de fosfocolina fueron indicativos de resistencia al fármaco y progresión (Serkova N y cols., 2005). Estos datos indican que los perfiles metabólicos pueden proveer de un método para monitorizar los cambios en el metabolismo celular que reflejen de forma temprana una resistencia a los agentes antitumorales.

La apoptosis tiene un papel fundamental en los tratamientos de quimioterapia y radioterapia, y su ausencia está bien correlacionada con mecanismos de resistencia (Schmitt CA y cols., 1999). Múltiples nuevos agentes antitumorales relacionados con la apoptosis están en desarrollo hoy en día. Un agente ya conocido es el FK866. Los efectos metabólicos observados consisten en un aumento del bifosfonato de fructosa, con el consiguiente descenso del pH como resultado de ciclo glucolítico incompleto. Otras alteraciones son compatibles con cambios en la síntesis de guanilato, los niveles de pirimidina y metabolismo de fosfolípidos, etc. Todos estos cambios conducen a vías de señalización aberrantes que finalmente dan como resultado la apoptosis (Muruganandham M y cols., 2005).

Otra aplicación de la metabolómica es en el área de los inhibidores de las proteínas de choque térmico. Aunque los mecanismos de acción no están bien dilucidados, los datos sugieren esta familia de agentes podrían inducir la destrucción celular relacionados con los oncogenes (Neckers L. 2007). En un estudio de pacientes con cáncer de colon tratados con inhibidores de Hsp90, se observó un aumento de fosfocolina y de la razón fosfomonoéster/fosfodiéster, valina y fosfoetanolamina, todo ello compatible con alteraciones fosfolípídicas. A la vista de estos resultados, se podrían utilizar los cambios metabólicos como biomarcadores farmacodinámicos de los inhibidores Hsp 90 (Chung YL y cols., 2003).

#### **3.4.2 El futuro de la metabolómica en la oncología**

La metabolómica es una nueva disciplina que abarca la evaluación de los metabolitos de forma comprensiva, reconociendo sus patrones y realizando análisis estadísticos. Los biomarcadores son ampliamente utilizados en la clínica habitual para pronosticar o predecir el estado de la enfermedad. La

metabolómica debería ser utilizada para identificar biomarcadores, incluyendo huellas metabólicas, perfiles o firmas que caractericen la evolución del cáncer. Utilizando esta tecnología, se podría, eventualmente, ser capaz de diagnosticar la enfermedad de forma temprana, que es cuando, realmente, puede llegar a ser curable; determinando, así, la agresividad del cáncer para ayudarnos a determinar el pronóstico, la terapia y predecir la eficacia de las drogas.

El uso de la metabolómica como herramienta diagnóstica ha sido validado en el caso del cáncer de próstata (Huan T y cols., 2016). El precedente de esta tecnología ómica incluye el diagnóstico y el pronóstico del cáncer de colon, utilizando los microarrays, y el diagnóstico del cáncer de ovario con perfiles séricos de proteínas (Buckhaults P y cols., 2001; Petricoin EF y cols., 2002). Por otro lado, otras publicaciones demuestran ya la utilización de perfiles metabólicos en el cáncer de ovario analizando muestras de tejido, e incluso plasma (Gaul DA y cols., 2015).

El diagnóstico del cáncer de páncreas también ha sido posible *in vivo* analizando el ciclo de la glucosa (Boros LG y cols., 2005). Estudios actuales ya están evaluando el uso de los biofluidos, como por ejemplo, saliva en el cáncer oral (Ishikawa S y cols., 2016); las secreciones pancreáticas y plasma en el cáncer de páncreas (Di Gangi y cols., 2016); orina en cáncer gástrico (Chan AW y cols 2016) y el líquido pleural, el lavado bronquioalveolar o incluso el esputo, en el cáncer de pulmón (Cameron SJ y cols., 2016). Si se pueden encontrar patrones patognomónicos y se pueden validar en estos fluidos, la metabolómica puede ahorrar tiempo, costes y esfuerzo a la hora de obtener un diagnóstico definitivo en situaciones en la que otras pruebas diagnósticas no son concluyentes. Además, la metabolómica tomará un papel destacado en el campo del screening poblacional, particularmente en aquellos tumores cuyos metabolitos se secretan o se producen en biofluidos accesibles (Pasikanti KK y cols., 2010; Qiu Y y cols., 2010; Wei J y cols., 2010).

De forma similar a otras estrategias, como la individualización en el tratamiento, la metabolómica también se está aplicando en la investigación preclínica y clínica y a la evaluación de valores predictivos. Así, una forma *in vivo* de metabolómica, es el PET, con el uso de la glucosa radioactiva, colina, o la timidina como metabolito activo. Por ejemplo, en los tumores del estroma recurrentes, el PET con fluorodesoxiglucosa fue superior respecto a la tomografía convencional a la hora de evaluar la respuesta a imatinib (Holdsworth CH y cols., 2007). También se ha visto que cambios en el PET con fluorodesoxiglucosa han sido predictores de respuesta a tratamientos citotóxicos estándar en cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, tumores germinales y de cuello de útero (Bokemeyer C y cols., 2002; Avril N y cols., 2005; Pio BS y cols., 2006; de Geus-Oei LF y cols., 2007; Kidd Ea y cols., 2007). En hematología, las patologías malignas en la cuales las pruebas de imagen PET con fluorodesoxyglucosa son útiles; en cambio, sí son subsidiarias de análisis con células tumorales circulantes con glucosa marcada con <sup>13</sup>C Esta manera de evaluar los tratamientos, también puede ser aplicada a las células tumorales de los tumores sólidos.

Por lo tanto, la metabolómica está ya preparada para servir de marcador farmacodinámico de nuevos agentes, y también puede ayudar a caracterizar efectos secundarios. Por ejemplo, puede utilizarse como biomarcador de toxicidad renal, hepática y pulmonar utilizando varios metabolitos como la glucosa, el lactato, lipoproteínas y aminoácidos, los cuales pueden aumentar o disminuir, proveyendo así, de un patrón asociado a una disfunción orgánica (Serkova NJ y cols., 2006).

Con lo cual, aunque la metabolómica ha experimentado un gran desarrollo, y se ha empezado a utilizar en la toma de decisiones clínicas, le queda todavía un largo camino por recorrer, junto con la necesidad de conseguir integrarla junto a las demás ciencias ómicas para conseguir caracterizar el espectro total de la patología oncológica.

### 3.5 Metabolómica y cáncer de mama

El cáncer de mama es el la neoplasia más frecuente entre las mujeres, y surge como resultado del

avance en el desarrollo de la carcinogénesis, un proceso vinculado a unos profundos cambios metabólicos mediante los cuales una célula normal se transformará en maligna.

A pesar de los múltiples avances en el screening, diagnóstico, seguimiento y tratamientos, muchas pacientes fallecerán de forma secundaria a la enfermedad avanzada. Es verdad que el desarrollo de nuevas técnicas quirúrgicas, radioterápicas y tratamientos sistémicos, bien sean agentes diana, endocrinos o quimioterápicos, han mejorado la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global (EBCTCG, 2005); sin embargo, aún se siguen requiriendo muchas mejoras que se puedan aplicar a la clínica habitual.

Un punto crítico para el desarrollo consiste en la búsqueda de nuevas estrategias que se focalicen en la biología del tumor más que en la carga tumoral, reconociendo así el cáncer como una enfermedad heterogénea con distintos subgrupos e individualizando las evaluaciones clínicas y los tratamientos, y es que la existencia de un cáncer de mama específico en un individuo determinado conlleva una interacción compleja y dinámica entre tumor y huésped. Un ejemplo claro lo tenemos en el estudio de Borgan (Borgan E y cols., 2010), el cual mediante la combinación de los DNA microarrays y el estudio metabólico mediante la RMN demostró, cómo incluso dentro de un mismo subgrupo, como eran pacientes Luminal A, había diferencias en términos de menores niveles de glucosa y mayores de alanina, lo que sugería disparidad en la actividad glicolítica, y contribuiría así una clasificación más refinada.

Por tanto, el fenotipo metabólico maligno y la dependencia del tumor de su huésped, conforman el racional biológico bajo el que se sostiene la investigación metabólica en el cáncer. Esto va a poder permitir una aproximación clínica al cáncer de mama, particularmente en el screening, diagnóstico, estadiaje, así como marcador para predecir resultados, respuestas a terapias y toxicidades.

### **3.5.1 Implicaciones clínicas**

#### **3.5.1.1 Diagnóstico y estadiaje**

En términos de diagnóstico de cáncer de mama, el principal problema continúa siendo la dependencia de disponibilidad de tejido procedente de la paciente, lo cual lleva vinculado la supeditación de habilitar distintas técnicas como son la punción con aguja fina, la biopsia, o bien, la extirpación completa del tumor. A esto habría que sumarle un personal experimentado que ejecutara dichos procedimientos, así como el riesgo derivado de la realización de dichas técnicas. No se debe olvidar que posteriormente hay que realizar una labor morfológica e inmunohistoquímica, la cual se desarrolla por un patólogo. Este estudio consume mucho tiempo y recursos, y no deja de ser dependiente del profesional que manipula y estudia la muestra.

Otro de los principales problemas reside en la diferenciación exacta de los tejidos malignos respecto a los tejidos normales y benignos (tabla 7), seguido de intentar discriminar las características que van a representar a las células tumorales, como son el estado de los receptores hormonales (receptores de estrógenos y progesterona), HER2, invasión linfovascular, grado de diferenciación o afectación ganglionar (tabla 8). Estos rasgos, junto con otros datos como la edad de la paciente y el tamaño del tumor, van a ayudar en el cáncer de mama temprano a estimar el riesgo de recaída de la enfermedad; al igual que aportarán, tanto en la enfermedad temprana como avanzada, a definir una estrategia de tratamiento y predecir el beneficio de dicho tratamiento.



ESTUDIO	TEJIDO	MALIGNO	BENIGNO	METABOLITOS
Sitter et al (2006) (2010)	Biopsia	85	18	Glicerofosfocolina Fosfocolina Colina
Gribbestad et al (1997)	Biopsia	16	16	Colina Glucosa Lactato Taurina Succinato
Mackinnon et al (1997)	Punción	82	106	Colina Creatina
Cheng et al (1998)	Biopsia	19	20	Colina Fosfatidilcolina
Bathen et al (2007)	Biopsia	91	48	Glicerofosfocolina Fosfocolina Colina Glucosa Lactato Taurina Mioinositol Creatina Myo-inositol
Mountford et al (2001)	Punción	83	57	Colina Creatina

Tabla 7. Distinción entre tejidos benignos y malignos mediante el estudio metabólico.

ESTUDIO	FACTORES
Lean et al. (2004)	Receptores de estrógeno Receptores de progesterona Grado tumoral
Bathen et al. (2007)	Receptores de estrógeno Receptores de progesterona Grado tumoral Afectación ganglionar axilar
Sitter et al. (2006)	Afectación ganglionar axilar
Mountford et al. (2001)	Invasión vascular
Budzies et al. (2013)	Receptores de estrógeno
Xiaohu et al. (2014)	Receptores de estrógeno

Tabla 8. Determinación de factores pronósticos y predictivos mediante el estudio metabólico.

### 3.5.1.2 Diferencias entre normal, benigno o maligno

Sitter (Sitter B y cols., 2006) utilizando glicerofosfocolina, fosfocolina y colina consiguió discriminar entre diferentes muestras de tumor con una sensibilidad del 82% y una especificidad del 100%. A continuación, comparó un panel de metabolitos (colina, creatinina, beta-glucosa, mio-inositol, fosfocolina y taurina), con tipo de tumor, tamaño y afectación ganglionar. Hubo pocas diferencias en las concentraciones de metabolitos, no obstante, los niveles de colina y glicina fueron mayores en los tumores mayores de 2 cm. En un artículo posterior, los autores comunicaron la relación entre bajas concentraciones de glicina con pacientes de buen pronóstico y altas concentraciones en pacientes de mal pronóstico. En pacientes metastáticos o en aquellos tuvieron una recaída se encontraron bajos niveles de taurina/glicina y glicerofosfocolina/glicina comparando con aquellas enfermas que permanecían sanas 5 años después de la cirugía. Estos resultados mostraron el papel que pueden jugar estos metabolitos en el pronóstico y la recaída (Sitter B y cols., 2010).

Gribbestead (Gribbestead IS y cols., 1999) observó en el tejido tumoral presentaba alteraciones con bajos niveles de glucosa y latos de colina. Otros cambios observados fueron incrementos de los niveles de lactato, taurina y succinato, y reducción de los niveles de fosfocreatina.

Mackinnon (Mackinnon WB y cols., 1997) examinó 218 muestras por PAAF de 191 pacientes con cáncer invasivo, *in situ* o con patología benigna. Utilizando los picos espectrales atribuibles a la colina y la creatina, consiguieron distinguir entre los tejidos benignos y los malignos con una sensibilidad del 95% y una especificidad del 96%.

Cheng (Cheng LL y cols., 1996) utilizando patrones de fosfocolina consiguió, también, distinguir el tejido tumoral del tejido sano circundante en el cáncer de mama. Bathen (Bathen TF y cols., 2007) basándose en distintos metabolitos como la glucosa, lactato, creatinina, myo-inositol, taurina, glicerofosfocolina, fosfocolina y colina consiguió distinguir entre tejido tumoral y sano. Este mismo autor en un estudio posterior (Bathen TF y cols., 2013) con pacientes intervenidas, demostró, mediante el estudio en muestras de tejidos, un perfil metabólico basado en la fosfocolina que diferencia al tejido tumoral del tejido sano circundante. Este descubrimiento tendría aplicación durante las cirugías de cáncer de mama, para reducir el número de reintervenciones, además de disminuir el número de ocurrencias locales. Mountford (Mountford CE y cols. 2001) utilizando la RMN en muestras de PAAF, distinguió tejido maligno del benigno con una exactitud del 93%.

Más recientemente, Qiu (Qiu Y y cols., 2013) presentó los resultados de un estudio en el que mediante tres metabolitos estudiado en el plasma de pacientes con cáncer de mama, dos glicerofosfocolinas y una lisofosfatidilcolina (lysoPC a C16:0, PC ae C42:5 y PC aa34:2), estableció una ecuación diagnóstica con la que diferenciaba con éxito las pacientes enfermas de las sanas con una sensibilidad del 98,1% y una especificidad del 96%.

### 3.5.1.3 Factores pronósticos y predictivos

Lean (Lean C y cols., 2004), a partir de muestras de tejidos obtenidas por PAAF de cáncer de mama, predijo el estado de los receptores de estrógeno, progesterona y grado de diferenciación con una sensibilidad del 91.1%, 90.9% y 96.2% respectivamente; al igual que con una especificidad del 89.5%, 86.3% y 95.2%.

Bathen (Bathen TF y cols., 2007) comparó resultados histopatológicos con resultados obtenidos de modelos de predicción por RMN. El modelo se verificó en un número limitados de pacientes, con una clasificación correcta en 11/12 para receptores hormonales, 8/12 para afectación ganglionar y 9/12 para el grado.

Sitter (Sitter B y cols., 2006) mostró que podía predecirse la afectación ganglionar a partir de los datos



obtenidos por RMN de la muestra de tumor primario. Mountford (Mountford CE y cols., 2001), también, consiguió predecir la afectación ganglionar con una sensibilidad del 96% y especificidad del 97%. Igualmente consiguió con la invasión vascular: sensibilidad del 82% y especificidad del 100%. Cheng (Chen LE y cols., 1996) desarrolló un modelo preclínico de afectación ganglionar, utilizando incrementos de metabolitos como el lactato, creatinina/lisina, glutamato/glutamina en tejido tumoral. Esta rápida evaluación añadiría eficiencia y podría eliminar los errores a la hora de manipulación de los tejidos dependientes de los técnicos y patólogos.

Budzcies (Budzcies J y cols., 2013), estudiando el tejido tumoral de pacientes con receptores de estrógeno positivos y negativos mediante GC, obtuvo cambios en 19 metabolitos, que incluyeron el incremento de beta-alanina, 2-hidroxiglutarato glutamato y xantina; y el descenso de glutamina en los tejidos de pacientes con RE negativos. La beta-alanina demostró la diferencia más significativa para diferenciar entre RE negativos y RE positivos.

Tang y cols (Tang X y cols., 2014) publicaron diferencias metabólicas entre las pacientes con cáncer de mama y receptores de estrógenos positivos respecto a aquéllas que los presentaban negativos. De tal forma, las pacientes con receptores de estrógenos negativos presentaron notables diferencias en las necesidades energéticas, potencial redox y catabolismo de las proteínas, que se correlacionaba con un incremento en la biosíntesis de glutatión, producción de NAD+ y señales de proliferación.

### **3.5.2 Eficacia del tratamiento y nuevos fármacos diana**

El progresivo conocimiento y asimilación de las distintas rutas metabólicas en cáncer de mama no sólo han permitido un avance en el campo del diagnóstico, sino que también han permitido un importante desarrollo en la terapéutica.

Sterin (Sterin M y cols., 2001) evaluó los niveles de fosfolípidos en cánceres de mama tratados con fármacos como el paclitaxel, vincristina, doxorrubicina y metotrexato. Se encontró una correlación entre los efectos citotóxicos de los agentes antimetabólicos y los cambios metabólicos. Los agentes antimicrotúbulos (paclitaxel, vincristina y colchicina) causaron incrementos intracelulares de glicerofosfolina que no estaban relacionados con cambios en la composición de la membrana celular de fosfolípidos. Este efecto se amplificaba si el tratamiento se sincronizaba con la fase G2 del ciclo celular. Estos resultados apuntan a la existencia e una interacción entre el metabolismo de los fosfolípidos y los microtúbulos.

Belouche-Babari (Belouche-Babari M y cols., 2005) utilizando un inhibidor de de MAPK quinasa, demostró en líneas celulares de cáncer de mama y colon, una disminución de los niveles de fosfolina. Muruganandham (Muruganandham M y cols., 2005) utilizando inhibidores de la síntesis de NAD, objetivó cambios en la vía apoptótica, incluyendo incrementos de la fructosa-bi-fosfonato y descenso del pH y NAD, resultantes del ciclo incompleto de la glicolisis.

Glunde (Glunde K y cols., 2004) demostró que la fosfolipasa y la lisofosfolipasa cumplen un papel fundamental en el metabolismo aberrante de la fosfolípidocolina, detectado en las células del cáncer de mama. Estas enzimas se convierten así en potenciales diana para la terapia antineoplásica del cáncer de mama, porque la fosfolina y el total de metabolitos que contiene colina se correlacionan con la malignidad que se le da a un cáncer de mama. De tal forma, inhibidores de la colina kinasa se han utilizado como terapéutica (Ramírez de la Molina A y cols., 2002).

Por otro lado, recientemente, Cao (Cao B y cols., 2013) ha demostrado la importancia que tienen los cambios metabólicos en el papel de la resistencia que las células tumorales del cáncer de mama desarrollan frente a un agente antineoplásico, como es la adriamicina. De tal forma, el tratamiento con adriamicina conlleva un lento descenso en la glicolisis y en las vías metabólicas de la biosíntesis de proteínas, purinas, pirimidinas y glutatión. Se sugiere que este enlentecimiento del metabolismo y

el agravamiento del estrés oxidativo se relacionan con la resistencia a la adriamicina. Utilizando esta información, se podrían descubrir marcadores metabólicos medibles que nos informarían de forma temprana de la resistencia a fármacos.

### **3.5.3 Predicción y detección de toxicidad**

La metabolómica también puede utilizarse como una herramienta para el estudio de la toxicología clínica, complementado, así, a la farmacogenómica en su papel de predecir la eficacia y la toxicidad de los agentes quimioterápicos, endocrinos y diana. Mismos agentes quimioterápicos pueden inducir diferentes toxicidades en pacientes con cáncer de mama incluso con misma densidad de dosis. Si se pudiese predecir esta toxicidad, se podría hacer una mejor selección de estos agentes. Así las dosis podrían ser individualizadas, y los pacientes podrían evitar tratamientos inefectivos para ellos y toxicidades excesivas. Evaluaciones basales pretratamiento podrían predecir la toxicidad. Medidas seriadas durante el tratamiento podrían poner de manifiesto una toxicidad temprana, pudiendo llegar a evitar la aparición de los signos y síntomas secundarios a dicha toxicidad (Oakman C y cols., 2011).

### **3.5.4 Biofluidos**

Clásicamente, el análisis metabolómico del cáncer de mama se ha realizado a través de muestras de tejido o citologías. El gran reto consiste en confirmar si los perfiles metabólicos son detectables en biofluidos más fáciles de obtener como el suero, la saliva (Sugimoto M y cols., 2010) o la orina, tal y como refleja el estudio de Slupsky (Slupsky CM y cols., 2010), en el cual mediante RMN, obtiene un modelo estadístico multivariante basado en 67 metabolitos obtenidos de la orina para la detección de cáncer de mama en estadios tempranos con una especificidad del 93%.

Actualmente, la relación existente entre el tumor y el huésped tanto en las fases iniciales de la enfermedad como en el diagnóstico y el pronóstico vienen dados por características del tumor como son el tamaño, grado de diferenciación, estado hormonal, afectación ganglionar etc. Sin embargo, en la práctica clínica se hallan individuos que con particularidades similares evolucionarán de forma diferente después de la intervención. El huésped puede jugar un papel principal en estos acontecimientos. Esto se basa en los estudios de enfermedad micrometastásica, más específicamente, en las células tumorales circulantes y en la infiltración medular, demostrando que no todos los pacientes con enfermedad medible desarrollarán enfermedad clínicamente evidente (Braun S y cols., 2005; Xenidis N y cols., 2003). La interacción crítica entre tumor y huésped es dinámica y multifactorial, con dependencia de la inmunidad del huésped y de las características del estroma. Esta interacción puede ser capturada en una señal metabólica.

### **3.6 Metabolómica y cáncer de mama con muestras de suero**

El entendimiento del cáncer de mama ha mejorado de forma sustancial debido al creciente número de estudios de metabolómica publicados hasta la fecha; sin embargo, la mayoría de ellos se han centrado en identificar alteraciones metabólicas en células o tejidos (Yang C y cols., 2007), lo cual suele conllevar técnicas invasivas que llevan aparejadas complicaciones propias como el sangrado, infecciones o la diseminación tumoral. En cambio, el análisis de biofluidos, en este caso muestras de suero, puede llegar a resultar mucho más atractivo desde el punto de vista que el clínico, que está más acostumbrado a trabajar con este tipo de elementos, ofreciendo facilidad para su obtención con una mínima preparación. Otro aspecto importante a la hora de decantarse por el suero en vez del tejido tumoral es porque la señal metabólica capturada deriva tanto del tejido tumoral como del individuo, detalle fundamental, si se considera que en el marco de la oncología el comportamiento de la enfermedad y la eficacia del tratamiento van a variar debido tanto a las características del propio tumor, como por las peculiaridades del anfitrión.

En la detección de la enfermedad de forma temprana hay resultados publicados mediante la combinación de la RMN y MS (Gu H y cols., 2011).

En enfermas ya diagnosticadas, Oakman y cols. han publicado datos en las que las pacientes con cáncer de mama metastático pueden ser diferenciadas de las enfermas con estadios tempranos con una sensibilidad del 72% utilizando muestras de suero estudiadas por RMN (Oakman C y cols., 2013). Posteriormente, este mismo grupo de investigadores han publicado un nuevo estudio en 2014 (Tenori L., 2014), en el que de forma retrospectiva comparaban el espectro metabólico de pacientes metastásicas con aquellas con la enfermedad en un estadio inicial e intervenidas, y que, además, fueran RE negativos. De tal forma obtienen un modelo predictivo con una sensibilidad del 90% y una especificidad del 67%. Además, se objetiva que las posibilidades de recaída se correlacionan con bajos niveles de histidina y altos niveles de glucosa.

También se ha comparado el perfil metabólico de las pacientes con el riesgo de recaída obtenido por el *Adjuvantonline!*, objetivando que la metabolómica identificó más pacientes con bajo riesgo de recaída que dicha plataforma informática: de una *n* 44 pacientes, 23 fueron de bajo riesgo según *Adjuvantonline!* y 31 mediante metabolómica. Esto demuestra el papel de la metabolómica en la evaluación de la enfermedad micrometastásica en el cáncer de mama temprano (Oakman C y cols., 2011).

Recientemente Jobard ha publicado un estudio en el que demuestra las diferencias en un perfil metabólico realizado mediante RMN, según el cual utilizando 9 metabolitos (histidina, acetoacetato, glicerol, piruvato, glicoproteínas, manosa, glutamato y fenilalanina) permite distinguir perfiles metabólicos en suero en pacientes con cáncer de mama metastático de pacientes con enfermedad temprana, con una sensibilidad del 89,8% y una especificidad del 79,3% (Jobard E y cols., 2014).

Por otro lado, se ha obtenido un modelo predictivo para la identificación de la recurrencia del cáncer de mama utilizando la detección de 11 biomarcadores, incluyendo tirosina y colina, mediante RMN y GC-MS obteniendo una sensibilidad del 86% y una especificidad del 84% (Asiago VM y cols., 2010), lo cual permite predecir a un 55% de las pacientes que recaerán, trece meses antes de que la recurrencia sea diagnosticada clínicamente, además de permitir la detección del cáncer de mama metastático antes que la detección por el marcador tumoral sérico Ca 27,29.

La metabolómica también se ha aplicado a muestras de suero en pacientes con cáncer de mama metastático para explorar la respuesta al tratamiento. De tal forma, Tenori y cols. (Tenori L y cols., 2012) analizaron las muestras de suero de 500 pacientes antes y durante el tratamiento con paclitaxel y un agente anti-HER2, en este caso lapatinib, contra un placebo. Utilizando el análisis mediante RMN, el estudio demostró que en el subgrupo de pacientes con enfermedad HER-2 tratadas con paclitaxel-lapatinib mostraron diferencias significativas en los perfiles metabólicos en cuanto el tiempo hasta la progresión y supervivencia global.

Finalmente, se han publicado también perfiles metabólicos en pacientes con cáncer de mama ancianas, de tal forma, que se ha visto que aquellas consideradas frágiles en función de escalas geriátricas, presentan un perfil basado en alteraciones de aminoácidos como la serina, triptófano, hidroxiprolina e histidina y sus derivados (Corona G y cols., 2014).

### **3.6.1 Metabolómica y cáncer de mama con muestras de suero como método diagnóstico**

De todos es conocido que, en los últimos años, los avances tecnológicos han permitido profundizar en el conocimiento de la biología de muchas enfermedades oncológicas, no siendo una excepción el caso del cáncer de mama. Sin embargo, dicho progreso no se ha traducido, en la mayoría de las ocasiones, en un cambio en el tratamiento, en la prevención o, centrándonos ya en nuestro estudio, en el diagnóstico.

De tal forma, cuando actualmente se realiza el diagnóstico clínico de los tumores de mama, éstos suelen presentar ya un tamaño medio de 2 a 2,5 cm (Singletary SE y cols., 2002), lo que les hace ser propensos a clasificarlos dentro del estadio III, convirtiéndolos ya en tumores que pueden mostrar metástasis en los ganglios linfáticos axilares. Esto demuestra la carencia que existe, en este momento, en la disponibilidad de una prueba diagnóstica de alta precisión. Así, el estudio estándar del que se dispone, la mamografía, tiene una sensibilidad de un 54% a un 77% (Guth U y cols., 2008). Otras herramientas de diagnóstico como la ecografía, la tomografía computarizada y la resonancia magnética son ligeramente más sensibles, pero no son coste-eficientes.

Por tanto, nuevos métodos diagnósticos que puedan ser utilizados, bien individualmente, o bien, en combinación con otras modalidades de diagnóstico existentes, se precisan con urgencia para conseguir una detección rentable del cáncer de mama. En este sentido, la metabolómica es capaz de proveer de biomarcadores diagnósticos más precisos, coste-efectivos y que además, en el caso de muestras de suero, sean obtenidos de forma menos invasiva.

En este sentido, se han publicado algunos estudios con muestras poblacionales pequeñas y con más o menos éxito. De tal forma, en 2011, mediante la combinación de la MS y RMN ya se intentó una separación entre sujetos sanos y enfermos (Gu Hy cols., 2011). En los resultados comunicados por Qiu (Qiu Y cols., 2013) se analizó un panel de lípidos en plasma de 55 pacientes con cáncer de mama y 25 controles sanos, lo cual le permitió obtener una ecuación diagnóstica, según la cual, se distinguían los pacientes sanos de los enfermos con una sensibilidad del 98,1% y una especificidad del 96%.

Otra aplicación ha sido la demostrada por Shen J y cols. (Shen J y cols., 2013), los cuales utilizando la MS en muestras de suero de 60 pacientes con cáncer de mama y 60 controles sanas, objetivaron más de 300 metabolitos, de los cuales 117 eran diferentes según las pacientes fueran de raza afroamericana o de raza caucásica, y 78 según fueran casos con enfermedad o sanas. La mayoría de estos metabolitos fueron aminoácidos, ácidos grasos y lisolípidos. Se observó, además, que muchos de los aminoácidos presentaban, de forma estadísticamente significativa, niveles menores en plasma en las pacientes con cáncer de mama, especialmente en aquéllas triple negativas. También se pudo verificar que los niveles plasmáticos de ácidos grasos relacionados con la beta-oxidación fueron estadísticamente superiores en las pacientes con cáncer de mama, indicando, por tanto, una sobreexpresión de esta reacción.

Rasmus, mediante cientos de metabolitos analizados por RMN, comunicó un modelo diagnóstico capaz de predecir un mayor riesgo de desarrollo del cáncer de mama en un sujeto, con un intervalo comprendido entre los 2-5 años posteriores al haber recogido la muestra, mostrando unos niveles de sensibilidad y especificidad, por encima de 80% (Bro R y cols., 2015).

Más recientemente, se ha publicado un modelo basado en 5 metabolitos, que incluyen la taurina, hipotaurina, alanina, aspartato y glutamato, mediante el cual se pueden diagnosticar pacientes con cáncer de mama en estadio temprano con un AUC de 0.934, y para todos los estadios, con un AUC de 0.968 (Huang S y cols., 2016).

De tal forma, se constata que la mayor parte de la producción bibliográfica en relación al uso del plasma como recurso para el estudio del cáncer de mama, ha perseverado en aspectos muy dispares de la enfermedad como es el estudio de sus diferentes subtipos, qué procesos se llevan a cabo durante el desarrollo de la metastización o, incluso, en la evaluación de diferentes terapias empleadas. Permanece mucho más reducido el aspecto enfocado al diagnóstico de la enfermedad. Aún así, incluso dentro de las publicaciones dirigidas en este sentido, destaca como todos los estudios están realizados con poblaciones pequeñas, en los que, además, no se consideran como factor de influencia, variables clínicas habituales en la práctica clínica diaria (edad, comorbilidad asociada, mediación conocmitante, etc) o mucho menos estudio alguno basado en población española.





## **HIPÓTESIS**

La hipótesis de este trabajo es la siguiente:

Los estudios mediante espectrometría de masas pueden permitir confirmar la existencia de un perfil metabolómico patofisiológico, propio del cáncer, siendo éste directamente detectable a través del análisis del propio suero de las pacientes. Esto permitirá obtener una herramienta diagnóstica no invasiva, que aportará un mejor conocimiento de esta enfermedad.









## **OBJETIVOS**

Los objetivos de esta Tesis Doctoral son los siguientes:

1. Exponer y optimizar los métodos de análisis metabolómicos más avanzados para el análisis de muestras procedentes de suero, de tal forma que, integrando los datos obtenidos de múltiples plataformas analíticas, se pueda conocer el espectro de los metabolitos detectados.
2. Seleccionar las herramientas bioinformáticas más adecuadas para conseguir un adecuado procesamiento de la información, en función de la técnica analítica utilizada y la muestra biológica estudiada, para poder diseñar y aplicar el análisis estadístico más apropiado en función de los datos metabolómicos obtenidos.
3. Utilizar la información obtenida para probar que existe una firma metabólica del cáncer, y que, además, ésta puede ser detectada en el plasma. Esto permitirá diferenciar a pacientes con cáncer de mama de sujetos sanos, de manera estadísticamente significativa.







## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Diseño experimental

Se trata de un estudio observacional y analítico, que pretende establecer una potencial firma meta-bolómica, a través de la identificación de metabolitos circulantes, con el objetivo de obtener una herramienta que nos permita diferenciar sujetos sanos, de sujetos con cáncer de mama, siendo obvias las implicaciones diagnósticas que de esta situación derivarían.

El diseño de este estudio comprende una cohorte de sujetos sanos y otra de pacientes enfermas, con cáncer de mama, pertenecientes al Complejo Hospitalario de Jaén.

Para el análisis de los metabolitos circulantes se extrajeron muestras de sangre total, tanto de los controles sanos, como de las pacientes con cáncer de mama, siendo el momento de la extracción, en éstas últimas, el previo al inicio del tratamiento quimioterápico. Posteriormente, se recopiló y analizó la información relevante disponible en cada caso, dando lugar a una base de datos que incluyó la información relativa a la evolución de la enfermedad oncológica y los parámetros clínicos de cada una de las participantes del estudio (figura 3).

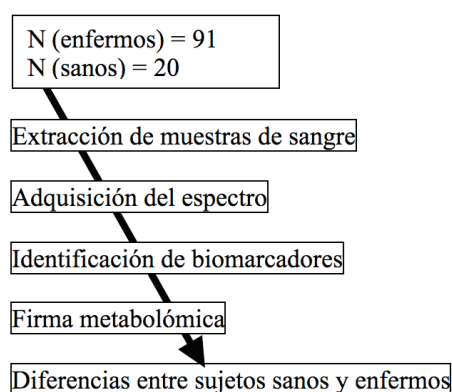


Figura 3. Esquema del diseño experimental del estudio

### 2. Población a estudio

Dada la complejidad de los datos obtenidos a partir de un análisis metabolómico con reconocimiento de patrones, no existe hasta el momento ningún método estadístico estandarizado para el cálculo del tamaño muestral, por lo que nos remitimos a estudios previos llevados a cabo (Wei S y cols., 2012).

Las pacientes participantes en el estudio fueron reclutadas en las consultas externas del Servicio de Oncología del Hospital Médico-Quirúrgico de Jaén, después de su valoración previa en el comité de tumores de cáncer de mama. Así mismo, los controles sanos fueron escogidos entre el personal sanitario voluntario del Complejo Hospitalario. De tal forma, definimos los sujetos controles como aquellas mujeres que no presentaban, en el momento del estudio, ningún tipo de neoplasia ginecológica, tras examen clínico y mamográfico, siendo, además, del mismo rango de edad, zona geográfica y actividad hormonal que los casos reclutados.

#### 2.1 Criterio de inclusión de las pacientes

En el caso de las pacientes, los criterios de inclusión y exclusión aplicados para su selección fueron los siguientes:

- 1.- Mujeres diagnosticadas de cáncer de mama invasivo confirmado mediante biopsia incisional o con trucut.
- 2.- Estadio funcional de 0 a 2 en la escala de ECOG.
- 3.- Presentar, como mínimo, una lesión medible según se define en los criterios para la evaluación de la respuesta de los tumores sólidos: al menos, 20 mm, si se realiza la medida con técnicas convencionales (mamografía o resonancia magnética); o bien, con diagnóstico histológico documentado de cáncer de mama invasivo operable.
- 4.- Ausencia de tratamiento previo para cáncer de mama.
- 5.- Edad mínima de 18 años y sin edad máxima de participación.
- 6.- Esperanza de vida de al menos 6 meses.
- 7.- Función orgánica adecuada, que abarca los índices siguientes:
  - 7.1- Reserva medular adecuada: RAN (recuento absoluto de neutrófilos)  $\geq 1,5$  mil/mm<sup>3</sup> plaquetas  $\geq 100$  mil/mm<sup>3</sup> y hemoglobina  $\geq 9$  g/dl.
  - 7.2.- Función hepática: bilirrubina, FALc (fosfatasa alcalina), ASAT (aspartato amino transaminasa) y ALAT (alanina amino transferasa)  $\leq$  LNS (límite superior de la normalidad).
  - 7.3.- Función renal: Aclaramiento de creatinina (Ccr)  $\geq 45$  ml/minuto.
- 8.- Función cardíaca normal, a juzgar por la exploración física y el electrocardiograma. La fracción de eyección del ventrículo izquierdo deberá ser  $> 55\%$ , de acuerdo con las técnicas de medicina nuclear o el ecocardiograma.
- 9.- Cumplimiento terapéutico y proximidad geográfica que faciliten un seguimiento adecuado.
- 10.- Las mujeres en edad fértil deberán seguir un método anticonceptivo fiable durante y hasta 3 meses después del tratamiento; se exigirá una prueba negativa de embarazo en suero y no estar en periodo de lactancia materna.

## **2.2 Criterios de exclusión de las pacientes**

Fueron excluidas del estudio aquellas pacientes que cumplieron alguno de los siguientes criterios:

- 1.- Tratamiento previo, de cualquier naturaleza, para el cáncer de mama.
- 2.- Enfermedad general grave asociada (p. ej., infección activa, incluyendo VIH, o enfermedad cardíaca) que, en opinión del oncólogo médico responsable, ponga en peligro la salud de la paciente o su capacidad para completar el estudio o cualquier otra enfermedad que pueda empeorar con la quimioterapia o los posibles tratamientos de apoyo.
- 3.- Antecedentes de arritmias aurículo-ventriculares y/o insuficiencia cardíaca congestiva, o de ambas, aun cuando se hallen bajo control médico, o bloqueo cardíaco activo de segundo o de tercer grado. Antecedentes de infarto de miocardio en los seis meses anteriores al reclutamiento o hipertensión arterial no controlada o maligna.



4.- Antecedentes de hipersensibilidad a los fármacos quimioterápicos o de reacciones alérgicas a alguno de sus componentes.

5.- Neuropatía sensorial o motora de severidad > grado 1.

6.- Pacientes gestantes.

7.- Segunda neoplasia maligna primaria, a excepción de carcinoma *in situ* del cuello uterino o de un cáncer de piel no melanoma, tratado correctamente. Sólo se permitirían los casos de neoplasias malignas previas si hubiera sido diagnosticada y tratada definitivamente como mínimo 5 años antes y no hubiera ningún indicio posterior de recidiva.

### **2.3 Pérdidas durante el seguimiento**

La pérdida en el seguimiento se produjo en cuatro pacientes por traslado a diferentes centros sanitarios. Sin embargo, dado el carácter transversal de nuestro trabajo, este hecho no tuvo ninguna incidencia en los resultados aquí expuestos.

### **3. Consideraciones éticas**

Tanto el diseño del estudio, como el modelo de consentimiento informado entregados tanto a pacientes como controles, fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética e Investigación del Complejo Hospitalario de Jaén. Así mismo, se siguieron y respetaron los principios y recomendaciones para la investigación biomédica con sujetos humanos, establecidos en la declaración de Helsinki (Asamblea General de la Asociación Médica Mundial, Helsinki, Finlandia 1964).

Las sujetos participantes en el estudio fueron informadas previamente de las características del estudio y se les entregó una hoja informativa, explicándoles la voluntariedad del mismo, el uso confidencial de los datos y la posibilidad de revocar su consentimiento en cualquier momento. Antes de entrar a formar parte del estudio las pacientes firmaron un consentimiento informado (Anexo II)

### **4. Variables clínicas e histopatológicas**

La inclusión de cada sujeto incluida en el estudio llevó implícita, además de la recogida de muestras biológicas, la recopilación de toda aquella información clínico-histopatológica relevante para el estudio.

Todos estos datos fueron extraídos, bajo la supervisión de un oncólogo experto, de los informes médicos recogidos en las historias clínicas que a tal efecto el personal administrativo y auxiliar del Hospital Médico-Quirúrgico de Jaén archiva.

#### **4.1 Variables Clínicas**

Entre las variables clínicas recogidas, se consensuó recopilar parámetros relativos a la edad, índice de masa corporal (IMC), historia ginecológica, comorbilidad y tratamientos farmacológicos concomitantes.

Con respecto a la edad, en el caso de las pacientes se consideró la que tenían en el momento del diagnóstico; y con respecto a los controles, la correspondiente al momento de la extracción.

En lo referente al estado menstrual, se hicieron dos grupos, premenopáusicas y posmenopáusicas. Se consideraban posmenopáusicas a las pacientes que no hubieran tenido la menstruación en los 2 últimos años, o en el último año si tenían determinaciones hormonales en rango de menopáusica.

Otros parámetros clínicos recogidos, fue la existencia de comorbilidad asociada, centrándose en este caso en patologías como la diabetes y los niveles de colesterol, así como en la toma de tratamientos farmacológicos concomitantes de cualquier tipo (tabla 9).

PARÁMETROS CLÍNICOS
Edad
Índice de masa corporal
Estado menopáusico
Comorbilidad: diabetes mellitus y niveles de colesterol
Tratamiento farmacológico concomitante

Tabla.9 Variables clínicas

#### 4.2 Variables histopatológicas

Los datos derivados del análisis anatomopatológico, llevado a cabo de forma rutinaria por el Servicio de Anatomía Patológica, fueron recogidos en la base de datos elaborada para el bloque de análisis clínico e histopatológico.

Para el estadiaje de las pacientes, se utilizó el sistema TNM de la sexta edición del Cancer Staging Manual de la AJCC (American Joint Cancer Committee), pero para el estudio estadístico comparativo, en el caso de la T se consideraron solo 2 grupos, tumores con menos de 2 cm. (T1) y con más de 2 cm. (T2, T3 y T4). La clasificación de la N, se ha considerado teniendo en cuenta la clasificación de TNM de la sexta edición del Cancer Staging Manual de la AJCC (American Joint Cancer Committee) (Greene F et al. 2002) para el estudio descriptivo, pero para el estudio comparativo la afectación ganglionar se dividió en dos grupos, sin afectación ganglionar (N0) y con afectación ganglionar (N1, N2 y N3).

Los datos sobre los receptores de estrógenos y progesterona, se clasificaron en menor o igual al 10%, mayor del 10% o no evaluable, además se hizo un conteo en función de +, ++ y +++. Para este estudio, se consideraron como positivos (+, ++ y +++), siempre que fueran positivos los de receptores de estrógenos y/o progesterona y negativos si no lo era al menos uno de ellos (-).

La determinación de HER2, se realizó en el Servicio de Anatomía Patológica; de tal forma que la primera determinación se hacía por IHC, clasificándolos en -, +, ++ y +++. Se consideró HER2 amplificado cuando tenía +++. Cuando existían ++, se hacía la determinación por hibridación fluorescente *in situ*. Si el resultado era positivo, se consideraba que estaba amplificado. Para el estudio se dividió en dos grupos, negativos (los -, + y ++ que no tuvieran FISH positivo) y positivos, los de +++ por IHC o amplificado por FISH.

Los subtipos intrínsecos descritos por Perou, se adaptaron a los datos de IHC, para ello, se agrupó a las pacientes en los 4 subtipos intrínsecos siguiendo los criterios descritos por Carey, de grupo de Perou (Carey LA et al. 2006):

- Luminal A: Positividad para receptores de estrógeno y/o progesterona (RE y/o RP), niveles bajos de Ki-67 y ausencia de expresión de Her2-neu.

- Luminal B: Positividad para receptores de estrógeno y/o progesterona (RE y/o RP), niveles altos de Ki-67 y/o expresión de Her2-neu.
- HER2: Negatividad para receptores de estrógeno y/o progesterona (RE y/o RP) y expresión de Her2-neu, independientemente de los niveles de Ki-67.
- Triple Negativo: Negatividad para receptores de estrógeno y/o progesterona (RE y/o RP) y ausencia de expresión de Her2-neu, independientemente de los niveles de Ki-67.

Toda la información recogida, se resume en la siguiente tabla (tabla 10)

PARÁMETROS HISTOPATOLÓGICOS
TNM al diagnóstico
Estadio clínico
Receptores de estrógeno y progesterona
Her2
Fenotipo

Tabla 10. Variables histopatológicas

### 4.3 Datos del seguimiento

Se realizó un seguimiento de todos los sujetos del estudio, tomando como fecha inicial, en el caso de los controles, la de la extracción, y en el de las enfermas, la del inicio del tratamiento. Como fecha de fin de estudio, se hizo coincidir la de las controles, con el final la de la última revisión de las enfermas, que en todas las pacientes fue, cuando menos, una en los 6 últimos meses anteriores al cierre de la base de datos para el estudio. Se objetivó que ninguno de los sujetos sanos había desarrollado ninguna enfermedad neoplásica, y en el caso de las pacientes que sufrieron una recaída, se tomó la fecha de ésta.

## 5. Análisis metabólico

### 5.1 Extracción de plasma de sangre periférica

Las muestras de sangre de los sujetos fueron extraídas mediante venopunción por el personal de enfermería del hospital de día del Servicio de Oncología Médica del Hospital Médico-Quirúrgico de Jaén, a las 8:30 horas, coincidiendo con el horario de apertura del Hospital de Día. En cada extracción se obtuvieron 5 ml de sangre total que fueron depositados en un tubo con EDTA para evitar su coagulación. Dentro de las dos primeras horas tras su obtención, cada muestra fue centrifugada a 1000 xg durante 15 minutos. Tras la centrifugación era posible observar tres fases claramente separadas en el tubo. La fase superior, de color amarillento, la correspondiente al plasma, fue transferida con una pipeta a otro tubo y alicuotada en viales de 500 µl para su inmediata congelación a -80°C.

### 5.2 Envío de las muestras

Las muestras fueron enviadas por mensajería urgente, en una caja de poliespam y cubiertas de nieve carbónica para impedir que se descongelaran. En menos de 24 horas fueron recepcionadas por el personal de la Universidad de Lleida-Instituto de Investigación Biomédica de Lleida, y conservadas consecuentemente hasta su procesamiento y posterior análisis metabólico.

Previamente al envío y manipulación de las muestras, se asignaron códigos a cada una muestra para adecuarlos al análisis y facilitar el procesamiento de los datos resultantes (Tabla 11).

NOMBRE DE LA PACIENTE	CÓDIGO PARA EL ANÁLISIS METABOLÓMICO
Nombre de la paciente N°1	RNA1
Nombre de la paciente N°2	RNA2
...	...
Nombre de la paciente N°92	RNA92
NOMBRE DEL CONTROL	CÓDIGO PARA EL ANÁLISIS METABOLÓMICO
Nombre del control N°1	R1
Nombre del control N°2	R2
...	...
Nombre del control N°20	R20

Tabla 11. Códigos metabólicos

### 5.3 Preparación de las muestras

Para la extracción de metabolitos, a partir de las muestras de plasma, se siguió una dinámica ya validada (Jové M y cols., 2015). De tal forma, cada ejemplar se descongeló en hielo a 4°C. Posteriormente, se añadieron 300 µl de metanol frío (que contiene 1 µM de butilhidroxitolueno como antioxidante y 1 µg/ml de fenilalanina marcada con carbono 13 como estándar interno de extracción) a 100 µl de plasma para la desproteinización, seguido de incubación a - 20°C durante 1 hora. Tras este proceso, se procedió al centrifugado a 12000g durante 3 min. Los sobrenadantes se recuperaron y se evaporaron utilizando un Speed Vac (Thermo Fisher Scientific, Barcelona, España). Finalmente, se procedió a su resuspension con agua de 0,4% de ácido acético / metanol (50/50 v/v).

### 5.4 Separación y detección de los metabolitos

Para el estudio metabólico, con el fin de obtener una adecuada separación cromatográfica, antes del análisis por espectrometría de masas, se utilizó un sistema Agilent LC 1290 acoplado a un sistema ESI-Q-TOF MS / MS 6520 (Agilent Technologies). De esta forma, se evitó que los picos cromatográficos de los diferentes metabolitos pudieran solaparse y permitieron el análisis de un elevado número de metabolitos con una gran sensibilidad (Fig. 4).

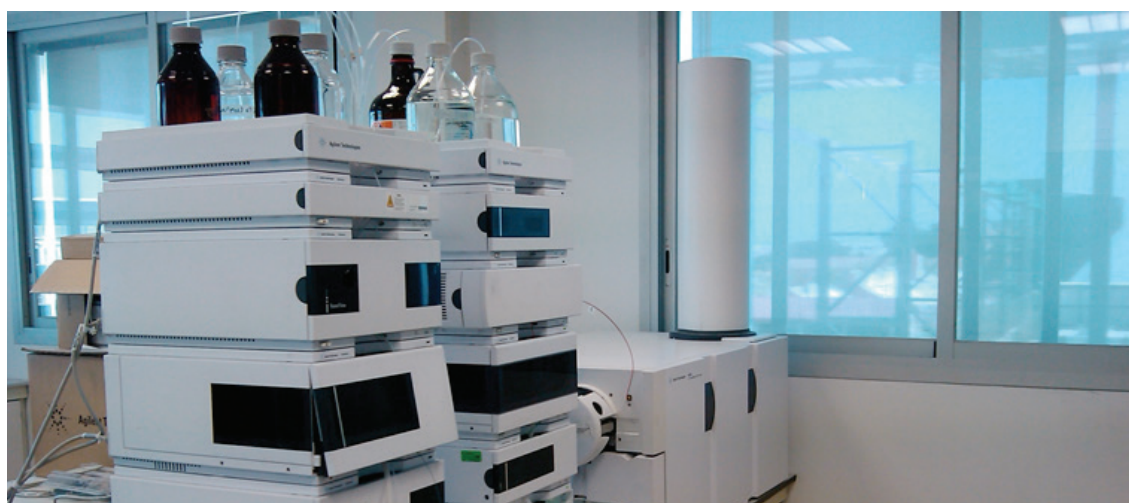


Figura 4. Sistema ESI-Q-TOF-MS/MS

Para llevar a cabo el análisis se inyectaron 2 µl de sobrenadante previamente extraído a una columna de fase inversa Zorbax SB-AQ 1,8 µm 2,1 x 50 mm; (Agilent Technologies, Barcelona, España) equipada con una precolumna Zorba-SB-C8 Rapid Resolution Cartridge 2,1 x 30 mm 3,5 µm; (Agilent Technologies, Barcelona, España) sometida a una temperatura de columna de 60 ° C. El flujo fue de 0,6 ml / min. Para la fase móvil el disolvente A estaba compuesto por agua que contenía ácido acético al 0,2%. El disolvente B se componía de metanol con ácido acético al 0,2%. El gradiente se inició a 2% de la fase B y aumentó a 98% en 13 min, manteniéndose en este estado durante 6 min. Se estableció un periodo de tiempo postanalítico de 5 minutos.

El sistema de espectrometría de masas en este estudio consistió en una combinación de espectrómetro de cuadrupolo, con espectrómetro de tiempo de vuelo asociado a una fuente de ionización ESI (fuente de ionización por electrospray), tanto en modo de ionización positiva como negativa. Se utilizó un modo de barrido completo (100-3000 m/z) en un rango dinámico extendido (2 GHz). Como gas nebulizador se utilizó el N<sub>2</sub> (5 L/min, 350 ° C). La tensión capilar fue de 3500 V, con una velocidad de barrido de exploración 1 scan/s. Para la fuente de electrospray se empleó un nebulizador independiente para la introducción continua a bajo nivel (10 L/min) de compuestos de referencia de masas: 121.050873, 922.009798 (modo de ionización positiva) y 119.036320, 966.000725 (modo de ionización negativa), que fueron utilizados para la calibración de masas en línea.

Mediante el MassHunter Data Analices Software A.02.00 (Agilent Technologies, Barcelona, España) se recopilaron los resultados; y, por medio del MassHunter Qualitative Analices Software (Agilent Technologies, Barcelona, España) se obtuvieron las características moleculares de las muestras según el algoritmo de extracción de características moleculares, lo que permitió identificar la especie iónica co-emigrante de una entidad molecular dada. (Agilent Technologies, Barcelona, España). (Jové M y cols., 2015; Sana TR y cols., 2008).

Por último, utilizando el MassHunter Mass Profiler Professional Software (Agilent Technologies, Barcelona, España) y la plataforma Metaboanalyst (Xia y cols., 2012) se llevó a cabo un análisis no dirigido de los resultados obtenidos. Para ello, se seleccionaron muestras con un mínimo de 2 iones. Los múltiples estados de carga no fueron considerados. Los compuestos de las diferentes muestras fueron alineados utilizando una ventana de tiempo de retención de 0,1% ± 0,25 minutos y una ventana de masa de 10,0 ppm ± 2,0 mDa. Se analizaron las características comunes (que se hubieran encontrado en, al menos, el 50% de las muestras de cualquier grupo), corrigiendo por sesgo individual.

El análisis de componentes principales, y el análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales, agrupación jerárquica, análisis de Random Forest y las curvas de rendimiento diagnóstico (ROC) se realizaron utilizando la plataforma MetaboAnalyst, que permitió el análisis estadístico y facilitó la interpretación funcional de los datos mediante el análisis de las vías metabólicas (Xia J y cols., 2012).

## 5.5 Análisis de datos e identificación de metabolitos

Se aplicó una estadística univariante (prueba de la *T de Student*,  $p < 0,05$ , Benjamini-Hochberg False Discovery Rate) para evaluar las diferencias significativas inducidas por el proceso carcinogénico. Para la identificación de los metabolitos resultantes, se utilizó la base de datos PCDL\_AMRT (Agilent Technologies, Barcelona, España), que utiliza los tiempos de retención en un sistema cromatográfico estandarizado como parámetro de búsqueda ortogonal, comparando con los datos de masa exacta (Accurate Mass Retention Time Approach) (Sana TR y cols., 2008). El proceso de forma esquemática queda resumido en la siguiente figura (Fig. 5)

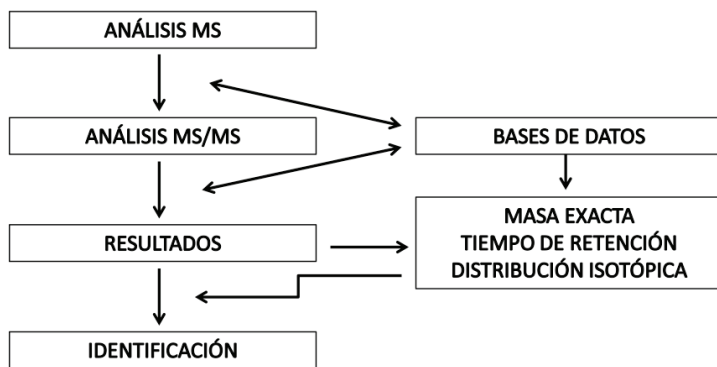


Fig. 5 Análisis metabolómico







## RESULTADOS

### 1. Análisis de variables clínicas e histopatológicas

En lo referente a las participantes del estudio, procedentes de sus historias clínicas, se extrajeron aquellos parámetros, como la edad, IMC, estado menopáusico, comorbilidad y tratamiento farmacológico concomitante, que resultaron útiles para la caracterización clínica de nuestra población. Finalmente, procedente de las enfermas, también se recogieron datos relativos a otros aspectos, como la toxicidad, efectos adversos asociados al tratamiento y parámetros hematológicos y bioquímicos, siendo guardados en una base de datos para su posible utilización en estudios futuros.

En cuanto a las variables histopatológicas, toda la información de este estudio fue escrutada de informes emitidos por un patólogo experto. De tal forma, se recogieron todas las variables relacionadas con los resultados del estudio inmunohistoquímico y los datos de expresión de los marcadores RE, RP, Ki67 y Her2.

De forma resumida, podemos encontrar todas las características mencionadas anteriormente, de forma más descriptiva y resumida, en la siguiente tabla (Tabla 12).

Los datos recogidos en la Tabla 1 muestran que el grupo de edad predominante en la muestra de la población con cáncer de mama osciló entre los 34 y los 91 años, con una mediana en torno a los 60 años. En el grupo de sujetos utilizados como control, la media de edad estuvo alrededor de los 50 años.

En referencia a la situación hormonal, tanto las enfermas como las controles se presentaron en estados muy similares, siendo más numerosos los casos de sujetos postmenopáusicas en el grupo de pacientes (50,5%) con respecto a las controles (45%).

Si nos fijamos en el IMC, en ambos grupos, la categoría predominante fue la que coincidía con parámetros dentro de la normalidad. Por otro lado, sí cabe destacar una mayor proporción de obesidad en el grupo de enfermas con respecto a las sanas.

Respecto a la comorbilidad, vimos como en las pacientes con cáncer de mama había más casos de diabetes y dislipemia que en los controles sanos, encontrándonos, a la vez, un paralelismo con el tratamiento farmacológico concomitante existente en cada grupo.

En lo que se refiere al análisis de la información histopatológica, se objetivó que, más del 70% de las pacientes, fueron estadio II al diagnóstico, siendo, dentro de éste, su fase más temprana (IIa), el grupo que más pacientes albergó. (43,4%).

Finalmente, al reparar en las características fenotípicas de las pacientes con cáncer de mama, de forma predominante, encontramos un fenotipo concordante con el tipo Luminal B (41,3%), seguido de un equilibrio entre el tipo Luminal A y HER2 (27.1%), y, como era esperable, una minoría de pacientes triple negativas (13%).

### 2. Separación y detección de metabolitos

Para obtener las diferencias metabólicas entre el plasma de las pacientes con cáncer respecto al plasma de las controles sanas, una vez preparada la muestra, se tenía que conseguir la separación y el análisis del conjunto de metabolitos que la componen. En nuestro caso se utilizó un tándem LC-ESI-Q-TOF-MS/MS, que permite, por un lado, una buena separación cromatográfica, reduciendo, así, la complejidad y mejorando la resolución de la muestra, y por otro, un posterior análisis por espectrometría de masas.

	PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA	CONTROLES SANOS
Tipo de muestra	Plasma	Plasma
Número de participantes	91	20
Edad (mediana, rango)	62 (34-91)	48 (22-64)
<b>ESTADO MENOPÁUSICO</b>		
Premenopáusica	46 (40,5%)	9 (45%)
Postmenopáusica	45 (49,4%)	11 (55%)
<b>IMC</b>		
Peso normal (18,5-24,9)	34 (37,3%)	12 (60%)
Sobrepeso (25-29,9)	30 (32,9)	8 (40%)
Obeso (>30)	27 (29,6%)	0 (0%)
<b>DIABETES MELLITUS</b>		
Sí	8 (8,7%)	0 (0%)
No	83 (91,2%)	20 (100%)
<b>COLESTEROL</b>		
Alto	10 (10,9%)	0 (0%)
Bajo	81 (89%)	20 (100%)
<b>TRATAMIENTO CONCOMITANTE</b>		
Sí	24 (26,3%)	1 (5%)
No	67 (73,6%)	19 (95%)
<b>ESTADIO</b>		
TNM estadio-I	2 (2, 1%)	No aplicable
TNM estadio-IIa TNM estadio-IIb	40 (43, 4%) 30 (32, 6%)	No aplicable
TNM estadio-IIIa TNM estadio-IIIb	13 (14, 1%) 7 (7, 6%)	No aplicable
TNM estadio-IV	0 (0%)	No aplicable
<b>FENOTIPO</b>		
Luminal A	25 (27, 1%)	No aplicable
Luminal B	38 (41, 3%)	No aplicable
HER2	25 (27, 1%)	No aplicable
Triple Negativo	12 (13%)	No aplicable

Tabla 12. Características clínico-patológicas de las pacientes.

Para esto se combinó una fuente de ionización por electrospray, junto con dos analizadores, uno en cuadrupolo y otro de tiempo de vuelo, separados entre sí, por una celda de colisión. Esto nos permitió centrarnos en los perfiles de bajo peso molecular, moléculas ionizables (relación masa/carga ó  $m/z < 1500$ ), que estaban presentes en, al menos, el 50% de las muestras de cada grupo (2356).

### 3. Análisis de datos

Para el análisis de datos, utilizamos los métodos de reconocimiento de patrones, los cuales nos permitieron extraer la información relevante procedente de la compleja matriz de datos metabólicos obtenidos.

Las aproximaciones más empleadas para estos supuestos son los análisis de multivarianza, y, en nuestro caso, utilizamos primero un método no supervisado y, posteriormente, uno supervisado. El no supervisado consistió en el análisis de componentes principales (PCA), y el supervisado en el Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA).

#### 3.1 Análisis de componentes principales (PCA)

Para determinar si existía una diferencia en la huella metabólica plasmática entre las pacientes con cáncer de mama y los controles sanos, se realizó un análisis multivariante no supervisado, en nuestro caso, un análisis de componentes principales (PCA). El PCA se utiliza para obtener una visión general del metaboloma de las muestras a analizar; pudiendo así, representar datos espectrales en un espacio de baja dimensionalidad. De esta forma, conseguimos reflejar la variabilidad intrínseca de la muestra y pudimos detectar *outliers* así como definir grupos y tendencias dentro de las muestras (Madsen y cols., 2010).

En nuestro caso (Figura 6), al analizar la figura, vemos cómo existe una clara diferenciación entre los dos grupos de plasma, sugiriéndonos, ya, la existencia de una firma metabólica específica para cada condición.

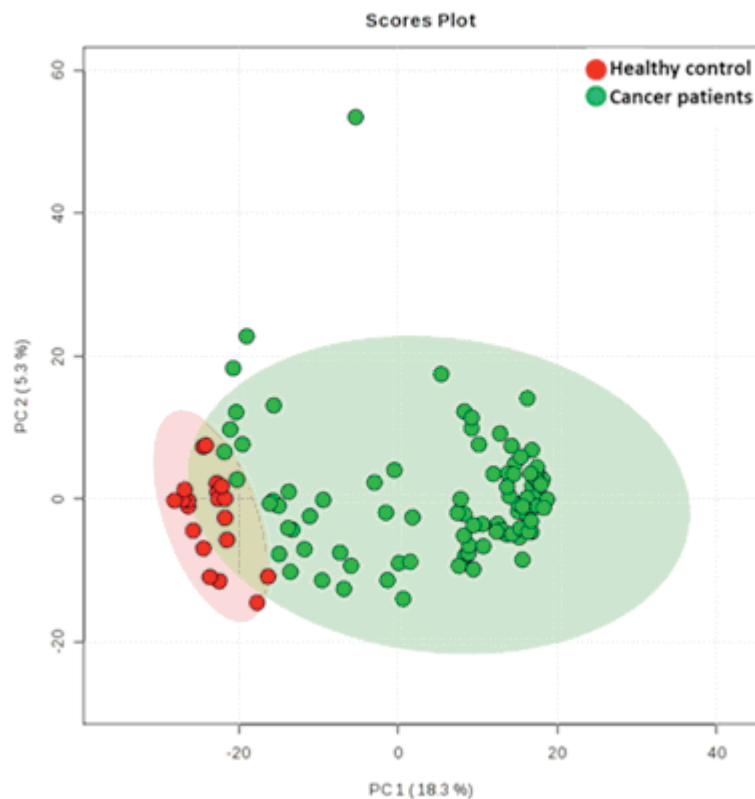


Figura 6. Análisis de los componentes principales. Los análisis de componentes principales revelaron una buena clusterización de las muestras del grupo con cáncer de mama.

### 3.2 Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA)

El PLS-DA es un análisis de multivarianza supervisado donde se utiliza la información de clase, para optimizar la separación entre los distintos grupos analizados. De tal forma, un análisis más detallado utilizando modelos PLS-DA consiguió demostrar una robusta separación de grupos entre los dos grupos (Figura 7)

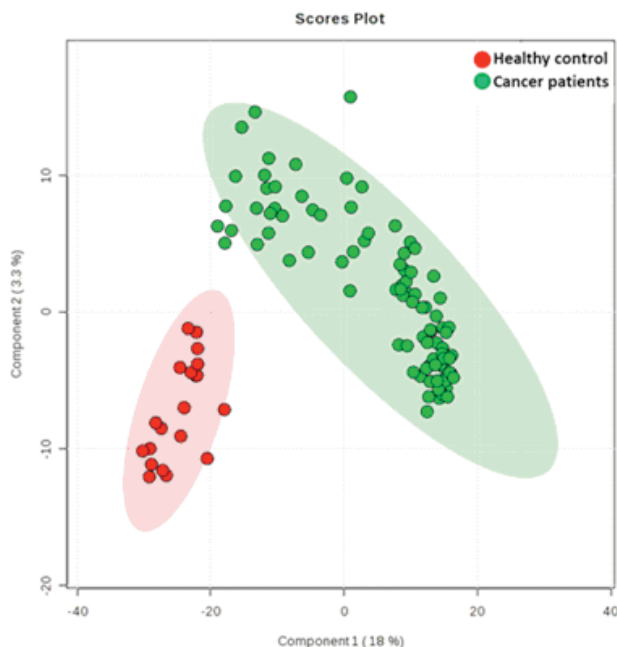


Figura 7. Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales. Mediante este análisis se define una firma metabólica perfecta para ambos grupos.

Además, los resultados de validación cruzada obtenida para la separación de ambos grupos son igualmente de óptimos (Tabla 13)

MEASURE	1 COMPS	2 COMPS	3 COMPS	4 COMPS	5 COMPS
ACCURACY	0.948	1.0	0.98	0.97	0.98
R2	0.57875	0.87072	0.94092	0.97992	0.99615
Q2	0.49665	0.74071	0.77456	0.7795	0.77166

Tabla 13. Datos de validación cruzada de PLS-DA (utilizando aquellas moléculas presentes al menos en el 50% de las muestras del mismo grupo)

### 3.3 Influencia de las variables en la firma metabólica

Obtenida la separación de ambos grupos, intentamos definir la posible influencia en la homogeneidad obtenida, en relación con las características clínicas de los sujetos. Para ello, utilizamos una T de Student para las variables continuas (edad, IMC y niveles de colesterol), y Test exacto de Fisher para las variables dicotómicas (estado menopáusico, diabetes y toma de fármacos concomitantes). De todas las variables analizadas, sólo el IMC presentó significación estadística entre ambos grupos.

De tal forma, un siguiente paso consistió en realizar un análisis multivariante que nos permitiera confirmar la influencia o no de esta variable sobre los metabolitos plasmáticos. Finalmente, se demostró como, contrariamente a lo que podía parecer en un principio, el IMC no presentó ningún peso sobre el perfil metabolómico obtenido, y por lo tanto no determina una firma metabólica específica (Figura 8).

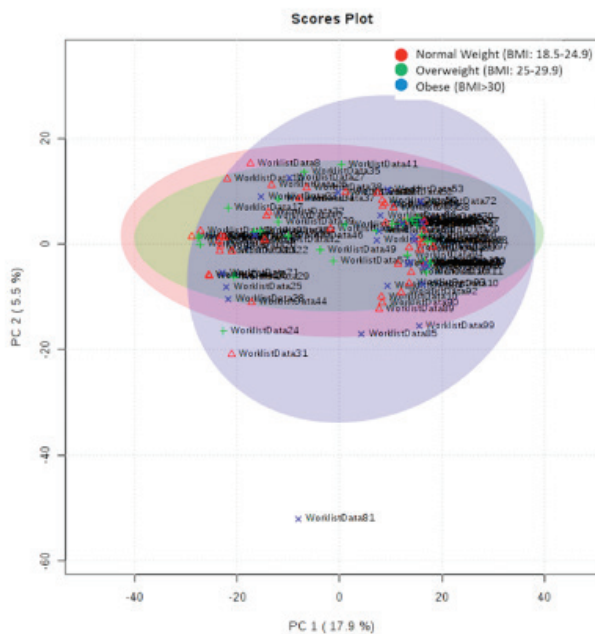


Figura 8. Análisis de componentes principales según IMC. El análisis de componentes principales indica que el IMC no es un factor que describa el metaboloma de forma adecuada.

Además, el ANOVA unidireccional realizado sobre las tres categorías de IMC no demostró metabolitos con significación estadística entre los distintos subgrupos (figura 9).

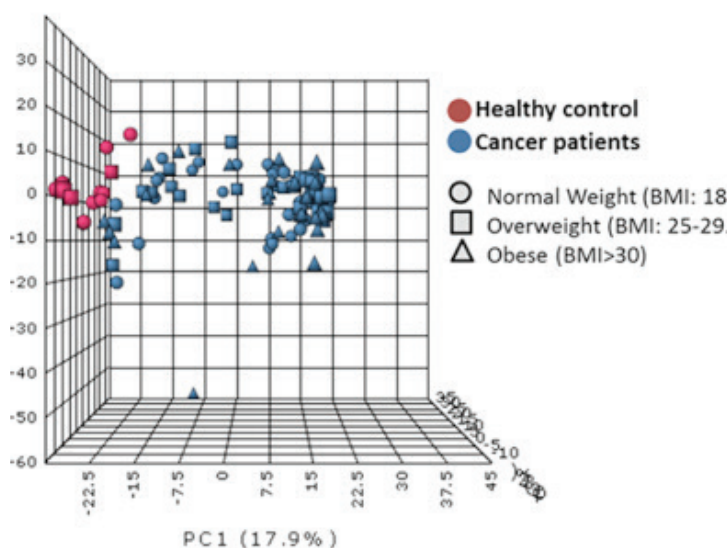


Figura 9. Análisis ANOVA por categorías de IMC. La condición de cáncer de mama condiciona una firma metabólica específica, en comparación con los controles sanos, independientemente del valor de IMC de los sujetos.

### 3.4 Análisis de “Random Forest”

Los análisis de clasificación multivariante anteriormente descritos, los complementamos con la aplicación del análisis de “Random Forest”, un modelo de clase de predicción supervisado. De tal forma, pretendíamos:

- a) Determinar la capacidad global del metaboloma para clasificar, con máxima precisión, a los pacientes dentro de sus respectivos grupos.
- b) Identificar los metabolitos más influyentes en la predicción de cada uno de los grupos, pudiendo reconocer, así, aquellos metabolitos que poseen la correlación más robusta.

De tal forma, con el análisis de “Random Forest”, se consiguió clasificar, con una precisión del 100%, las muestras pertenecientes a las pacientes con cáncer de mama, y las muestras procedentes de los controles sanos (Figura 10).

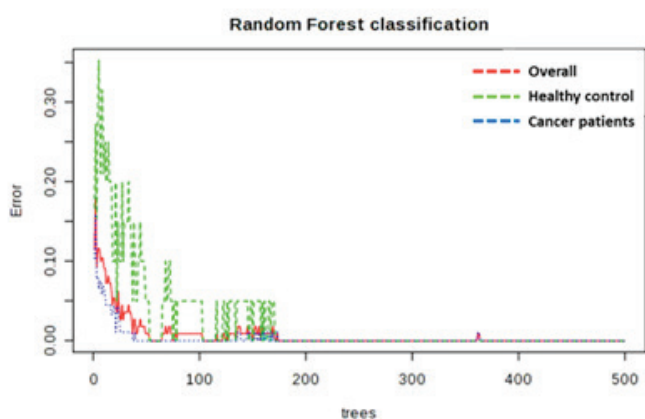


Figura 10. Clasificación según Análisis de “Random Forest”. La figura muestra un error global en la clasificación de 0, tanto para las pacientes enfermas, como para los sujetos sanos.

Por lo tanto, el error de clase, tanto para grupos, como para *outliers* fue de 0. Los metabolitos más importantes que contribuyeron a la clasificación de ambos grupos, se muestran en el siguiente esquema (Figura 11).

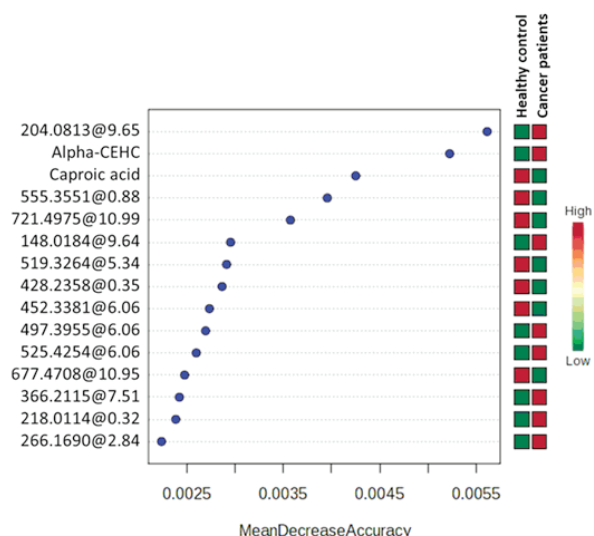


Figura 11. Metabolitos principales según el análisis de “Random Forest”. Aquellos metabolitos desconocidos se representan mediante su masa exacta y tiempo de retención.

#### 4. Identificación de los metabolitos alterados y vías metabólicas implicadas

Tras realizar el análisis multivariante, se procedió a desarrollar un análisis univariante mediante la aplicación de la *T de student* ( $p < 0.05$ , con corrección por Benjamini-Hochberg). Con este análisis pretendíamos describir potenciales biomarcadores específicos de cada condición experimental; es decir, queríamos definir qué metabolitos estaban alterados, de forma significativa, en las pacientes con cáncer de mama. De tal forma, encontramos 1269 metabolitos con diferentes concentraciones plasmáticas entre los controles sanos y las enfermas (Anexo III).

Tras la obtención de estos metabolitos, se procedió a una primera identificación basándonos en la masa exacta, el tiempo de retención y la distribución isotópica, utilizando la base de datos PCDL\_AMRT (Agilent Technologies, Barcelona, España).

Finalmente, mediante este método, conseguimos obtener 35 metabolitos con potencial identidad (Tabla 14)

COMPOUND	P (CORR)	REGULATION (cancer patients vs healthy control)	FC	MASS	RETENTION TIME
2-Hydroxy-3-methylbutyric acid	3.3E-04	Up	36.6	100.0522	1.5816069
2-Hydroxy-3-methylpentanoic acid	2.3E-02	Up	3.3	114.0682	3.2419913
2-Methylhippuric acid	1.8E-03	Down	-92.0	175.0639	3.6565607
2-Octenoic acid	5.3E-03	Down	-39.3	372.268	9.767441
3-Hydroxyanthranilic acid	8.8E-06	Down	-341.8	135.0336	1.5612222
3-Methylglutaric acid	5.5E-03	Up	37.6	128.0489	1.5807501
4-acetamidobutanoate	2.0E-03	Down	-53.3	127.064	0.70647365
5-b-Cholestane-3a,7a,12a-triol	3.6E-02	Down	-13.2	402.3519	12.439621
5 $\alpha$ -androstane-3,17-dione	1.2E-10	Down	-148.8	305.2386	10.385417
7-ketocholesterol	4.3E-04	Up	117.0	400.3335	12.138314
7 $\alpha$ -hydroxy-cholesterol	8.9E-03	Down	-31.4	384.329	12.368574
Caproic acid	8.4E-17	Down	-1.7	348.2573	5.769
Chenodeoxycholic Acid	6.1E-04	Up	161.8	392.2908	11.337122
Cortisol	3.1E-05	Down	-1.7	362.2124	7.031

Cortisone	3.0E-02	Down	-5.8	360.1945	6.9761095
Creatine	3.9E-04	Down	-339.6	113.0561	0.42863637
Cytidine	3.5E-02	Up	21.9	225.0778	0.7119473
DL-pipecolic acid	1.5E-06	Up	270.4	129.0792	0.33790255
Dopamine	7.8E-04	Up	1.5	135.0675	0.575
Glutamine	2.0E-06	Down	-1060.4	146.0684	0.5461304
Hippuric acid	3.8E-02	Down	-8.8	179.0599	2.1277783
Homocystine	2.9E-04	Up	62.3	306.0068	0.33542165
Inosine diphosphate (IDP)	1.8E-03	Up	52.7	410.0028	0.34574685
L-Arginine	1.5E-05	Down	-397.2	174.1067	0.4356315
Linoleic acid	4.1E-17	Up	42496.8	280.2411	11.370296
L-Lysine	1.7E-04	Down	-61.4	146.1059	0.34584
L-Valine	1.7E-02	Down	-64.5	117.0775	0.44549397
Myristic acid	2.7E-04	Up	78.9	250.1932	12.096725
N-Oleoyl-D-erythro-Sphingosine (C18:1 Ceramide)	7.2E-07	Down	-645.7	571.51	13.315624
Oleamide	3.8E-05	Up	2.0	281.2726	11.383955
Retinoic acid	1.3E-08	Down	-128.9	863.6179	11.356807
Stearic acid	2.0E-06	Up	673.6	284.2717	12.056651
Taurine	6.4E-09	Up	198.1	125.0153	0.32860422
Threonate	3.9E-02	Up	3.9	136.0378	0.88052344
Uric acid	2.8E-02	Up	2.3	168.0292	0.6809543

Tabla 14. Metabolitos con potencial identidad. Son metabolitos estadísticamente significativos, con potencial identidad ( $p < 0,05$  con corrección por Benjamini-Hochberg).

Al valorar de forma detenida estos metabolitos, observamos cómo a su vez, están implicados en el proceso de la biosíntesis de aminoacil-tRNA y de ácidos biliares primarios; además de en las vías metabólicas de la arginina y la prolina, entre otras, las cuales constituyen, en su conjunto, las vías metabólicas alteradas en el cáncer de mama (Tabla 15).



Pathway name	Total	Expected	Hits	P
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	75	0.87246	4	0.010095
Arginine and proline metabolism	77	0.89572	4	0.011061
Primary bile acid biosynthesis	47	0.54674	3	0.01624
Nitrogen metabolism	39	0.45368	2	0.074242
Purine metabolism	92	1.0702	3	0.088937
D-Arginine and D-ornithine metabolism	8	0.093062	1	0.089485
Lysine degradation	47	0.54674	2	0.10237
Fatty acid biosynthesis	49	0.57	2	0.10982
Biotin metabolism	11	0.12796	1	0.12101
D-Glutamine and D-glutamate metabolism	11	0.12796	1	0.12101
Pyrimidine metabolism	60	0.69796	2	0.15306
Linoleic acid metabolism	15	0.17449	1	0.16141
Taurine and hypotaurine metabolism	20	0.23265	1	0.20939
Retinol metabolism	22	0.25592	1	0.22783
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	24	0.27919	1	0.24586
Pantothenate and CoA biosynthesis	27	0.31408	1	0.27215
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	27	0.31408	1	0.27215
Lysine biosynthesis	32	0.37225	1	0.314
Steroid hormone biosynthesis	99	1.1516	2	0.32119
Propanoate metabolism	35	0.40715	1	0.33799
Valine, leucine and isoleucine degradation	40	0.46531	1	0.37618
Ascorbate and aldarate metabolism	45	0.52347	1	0.41224
Phenylalanine metabolism	45	0.52347	1	0.41224
Fructose and mannose metabolism	48	0.55837	1	0.43291
Glycine, serine and threonine metabolism	48	0.55837	1	0.43291
Cysteine and methionine metabolism	56	0.65143	1	0.48465
Tyrosine metabolism	76	0.88409	1	0.59485
Tryptophan metabolism	79	0.91899	1	0.60928

Tabla 15. Vías metabólicas moduladas en cáncer de mama

Con el fin de intentar definir un perfil metabólico de las pacientes con cáncer de mama, se realizó una nueva estadística multivariante, pero, en este caso, utilizando aquellas moléculas anteriormente mencionadas; es decir, aquellas que presentaron una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, y, de las que, además, se determinó una potencial identidad basada en su masa exacta, en su tiempo de retención y en la distribución isotópica. Para la mejor visualización de los resultados se realizó un análisis de segmentación o clusterización jerárquica, en el cual podemos objetivar la concentración relativa de cada metabolito (Figura 12).

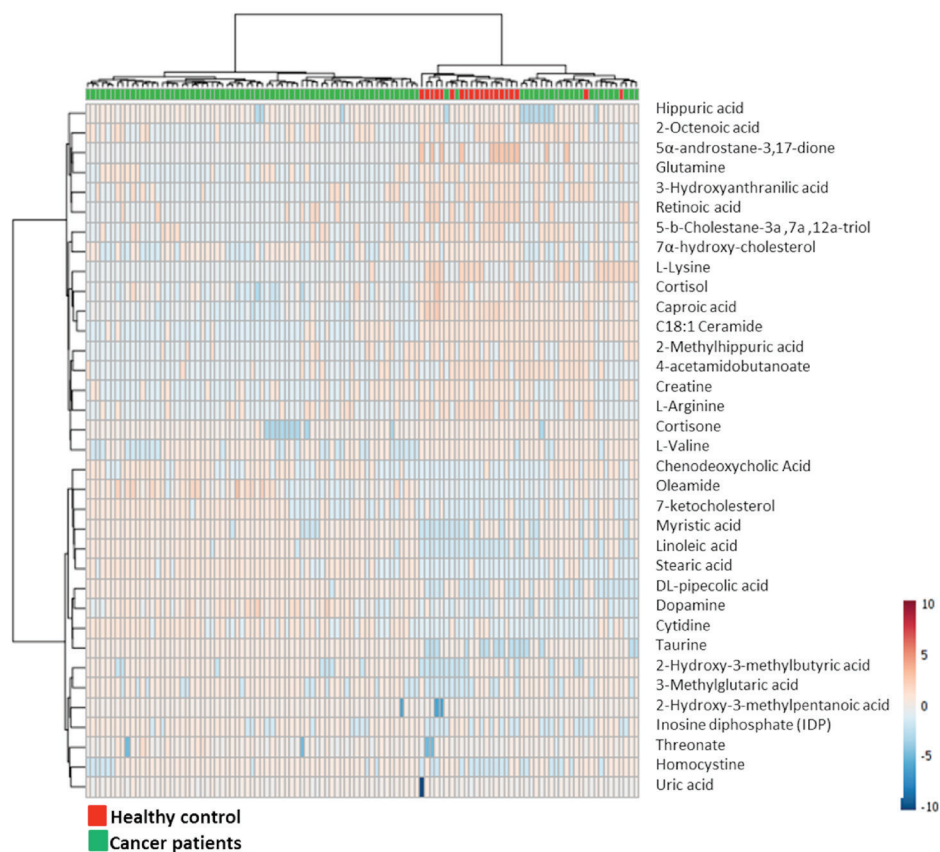


Figura 12. Análisis de clusterización jerárquico. Utiliza aquellos metabolitos estadísticamente significativos con potencial identidad (Basado en la masa exacta, tiempo de retención y distribución isotópica).

Siguiendo la misma línea argumental anteriormente utilizada, podemos demostrar que, tanto mediante el análisis de los componentes principales (Figura 13), como mediante el análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (Figura 14), se consigue evidenciar una firma metabolómica empleando sólo los 35 metabolitos con potencial identidad ya descritos, a pesar de que, por supuesto, la diferencia entre ambos grupos se realizaría mejor utilizando todas las moléculas detectadas.

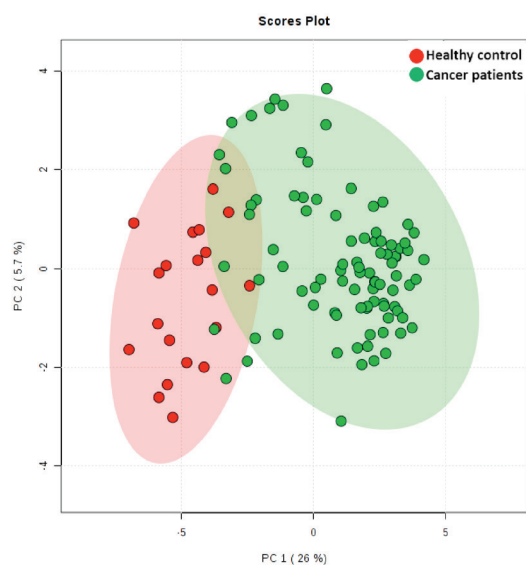


Figura 13. Análisis de componentes principales realizado con los metabolitos significativamente estadístico con potencial identidad (basado en la masa exacta, tiempo de retención y la distribución isotópica)

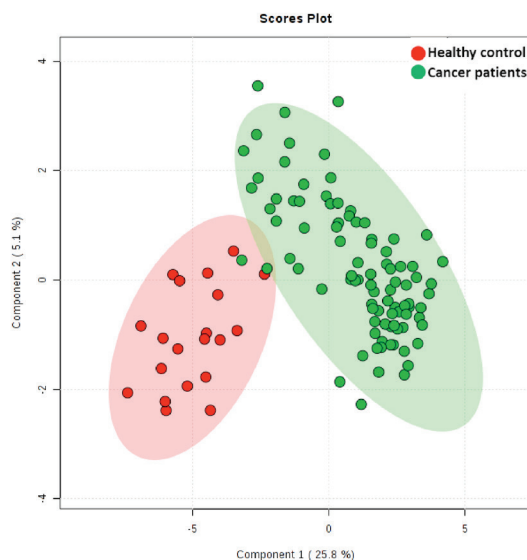


Figura 14. Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales con los metabolitos significativamente estadísticos con potencial identidad (basado en la masa exacta, tiempo de retención y la distribución isotópica).

Al igual que anteriormente, los resultados de validación cruzada corroboran la separación (tabla 16).

MEASURE	1 COMPS	2 COMPS	3 COMPS	4 COMPS	5 COMPS
ACCURACY	0.97067	0.974	0.966	0.948	0.948
R2	0.64092	0.79248	0.81766	0.82385	0.82633
Q2	0.58961	0.69667	0.64811	0.6131	0.5879

Tabla 16. Datos de validación cruzada en PLS-DA (utilizando las moléculas que presentan una diferencia significativamente estadística ( $p < 0,05$ ) y con potencial identidad).

Con el fin de controlar el sobreajuste, decidimos utilizar un test de permutación y un análisis de Random Forest. De tal forma, la posibilidad de obtener una firma metabolómica utilizando sólo los 35 metabolitos antes mencionados, fue apoyado por ambos análisis. Así, se obtuvo un test de permutación significativo ( $p = 0,005$ ) y un error *out of bag* de 0.027 (Figuras 15 y 16).

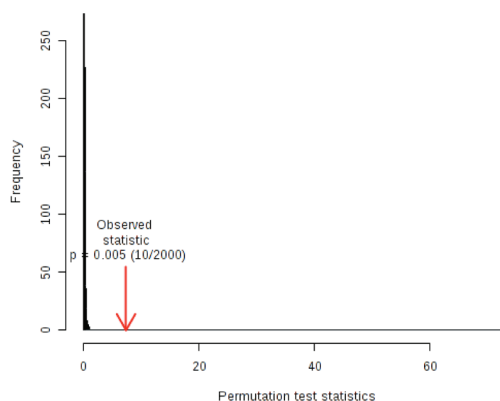


Figura 15. Test de permutación. Con la prueba de permutación, utilizando sólo los metabolitos con potencial identidad, validamos el PLS-DA, demostrando que ninguna de las distribuciones formadas por los datos permutados es mejor que la obtenida sobre los datos originales.

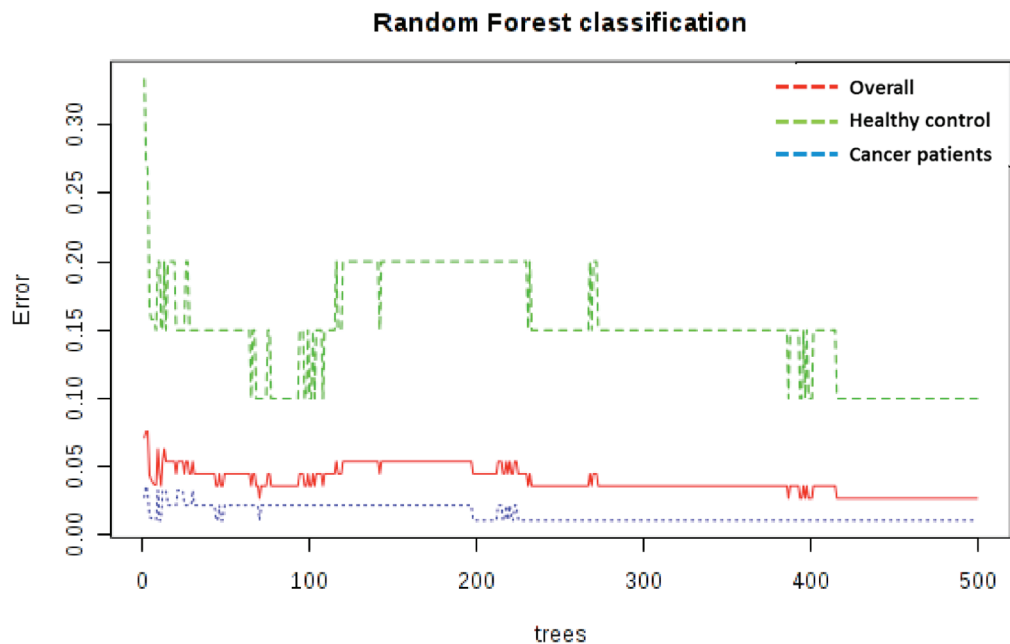


Figura 16. Clasificación de Random Forest. Con los metabolitos con potencial identidad, se obtiene un error global de clasificación de 0.027.

## 5. Análisis por curvas de rendimiento diagnóstico

Los resultados del análisis de Random Forest, los test de significación y los análisis de False Discovery Rate identificaron varios metabolitos fuertemente asociados al cáncer de mama. Un paso más, consistiría en caracterizar, de una forma más precisa, el valor predictivo de estos metabolitos. Para ello se realizó un análisis mediante curvas de rendimiento diagnóstico, utilizando, para ello, las áreas de picos obtenidas mediante la espectrometría de masas. De tal forma, esto lo podemos observar, mejor, a modo de resumen, en la siguiente tabla (Tabla 17)

METABOLITE	ACCURATE MASS@ RETENTION TIME	SENSITIVITY	SPECIFICITY	AUC	P	FOLD DIFFERENCE IN BREAST CANCER VS. HEALTHY CONTROLS
C26H43CIN4S3	542.2335@6.062	100	100	1.00	3.21e-18	0.98
C26H51N5O4	497.3955@6.065	100	100	1.00	2.62e-14	1.32
C9H16O3S	204.0813@9.653	100	100	1.00	5.74e-38	1.08
C23H30N2S	366.2115@7.516	100	100	0.999	4.76e-17	2.08
278.1552 @ 9.641	278.1552@9.641	100	100	0.999	6.15e-36	1.06
Caproic acid	348.2573@5.769	100	100	0.995	4.12e-23	0.99
Taurine	125.0153@0.328	100	90	0.952	3.048e-14	0.66
Stearamide	283.2877@11.795	90	90	0.959	2.3782e-12	0.85
Linoleic Acid	280.2411@11.37	100	90	0.935	8.7246e-8	6.29

Tabla 17. Análisis mediante Curvas ROC de los metabolitos estadísticamente significativos asociados al cáncer de mama. Los metabolitos investigados mediante el análisis de curvas ROC fueron seleccionados basándonos en función del aná-

lisis de Random Forest, el p-valor con corrección por Benjamini-Hochberg, y la diferencia en la que se encuentran entre las pacientes con cáncer de mama frente a las controles sanas. En el análisis ROC se utilizaron las áreas de los picos de espectrometría de masa correspondientes a los niveles de expresión en cada paciente

De esta manera, encontramos 3 metabolitos:

- Metabolito número 1: 542.2335@6.062038 ( $p = 3.2109E-18$ )
- Metabolito número 2: 497.3955@6.065792 ( $p = 2.6216E-14$ )
- Metabolito número 3: 204.0813@9.653965 ( $p = 5.7445E-38$ )

Lo más característicos de todos ellos es que presentaban un área bajo la curva (AUC) igual a 1, lo que lleva implícito una especificidad y una sensibilidad del 100%.

Por otro lado, de entre los metabolitos que presentan potencial identidad, también podemos encontrar otros cuatro metabolitos que predicen las diferencias, con una alta exactitud global:

- Ácido Caproico (AUC = 0,995; Especificidad = 1; Sensibilidad = 1)
- Taurina (AUC = 0,952; Especificidad = 0,9; Sensibilidad = 1)
- Estearamida (AUC = 0,959; Especificidad = 0,9; Sensibilidad = 0,9)
- Ácido Linoleico (AUC = 0,935, Especificidad = 0,9; Sensibilidad = 1)

A continuación, presentamos las curvas ROC de estos cuatro metabolitos. En ellas se representan la sensibilidad en ordenadas y el complementario de la especificidad en abscisas (1- especificidad, siendo este resultado la proporción de falsos positivo). De este modo, el metabolito ideal es el que se sitúa en el ángulo superior izquierdo de la gráfica (sensibilidad y especificidad del 100%). Esto significa que la exactitud global de cada metabolito para discriminar una condición de otra, puede describirse como el área bajo la curva de rendimiento diagnóstico es decir, a mayor área, mejor es el metabolito a la hora de diagnosticar (Figura 17, 18, 19, 20).

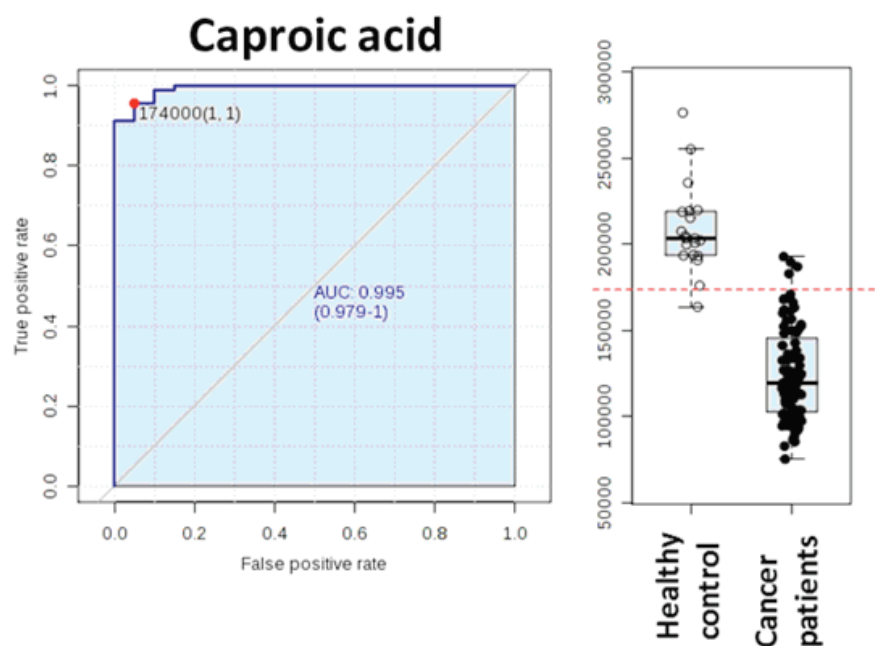


Figura 17. Curva ROC del Ácido Caproico. Muestra como el área bajo la curva es de 0.995.

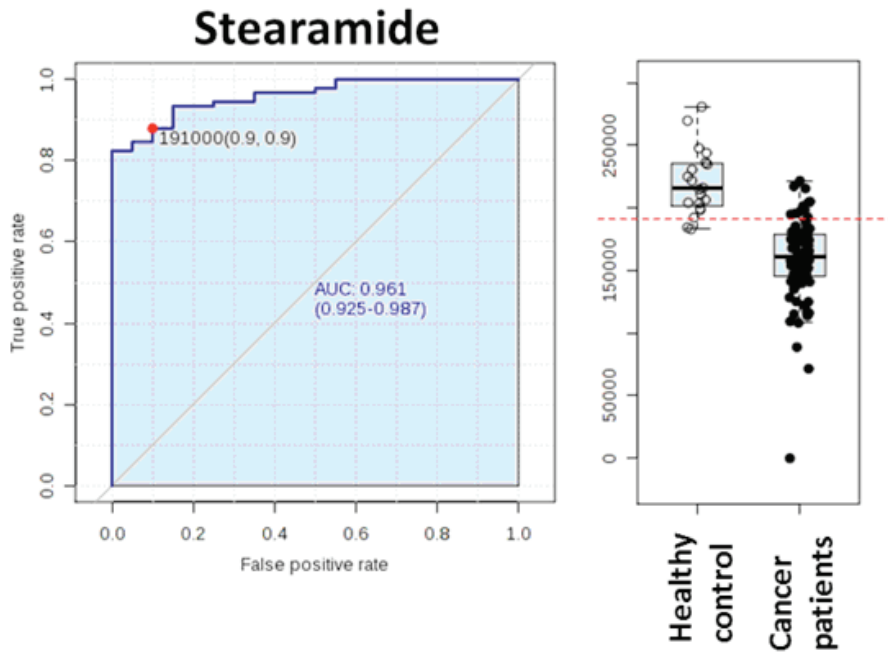


Figura 18. Curva ROC de la Estearamida. Muestra como el área bajo la curva es de 0.959.

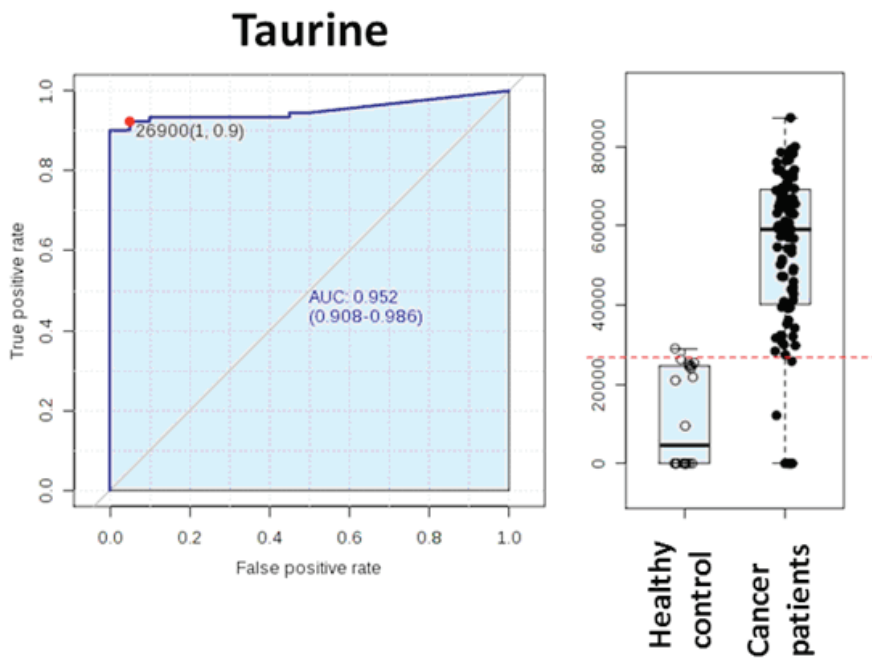


Figura 19. Curva ROC de la Taurina. Muestra como el área bajo la curva es de 0.952.

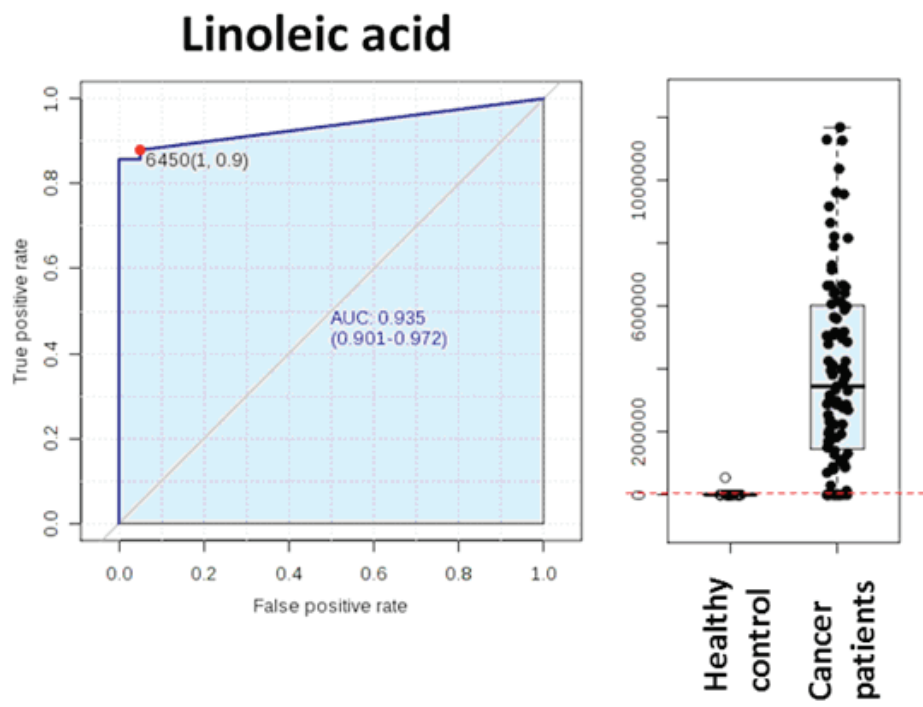


Figura 20. Curva ROC del Ácido Linoleico. Muestra como el área bajo la curva es de 0.935.









## DISCUSIÓN

El cáncer de mama es un fenómeno médico y social de grandes proporciones a nivel mundial. De tal forma, esta enfermedad, por sí sola, representa un problema de salud pública de primer orden, tanto por su incidencia, como por su mortalidad.

En España, el cáncer de mama es conocida por representar la primera causa de muerte por cáncer en el sexo femenino. Se trata, por tanto, de un problema de gran importancia y magnitud, que necesita un enfoque estricto, científico y profesional. No obstante, gracias a la implementación de las campañas de diagnóstico temprano y a la eficacia de los tratamientos complementarios ha sido posible observar, desde el año 2000, un descenso progresivo de las cifras de mortalidad por esta neoplasia, a pesar de existir un incremento en la incidencia de la misma.

En los últimos años, los avances tecnológicos han permitido profundizar en el conocimiento de la biología molecular de muchas enfermedades oncológicas; y, el cáncer de mama no ha sido una excepción. En este sentido, en los últimos años se ha registrado un incremento exponencial en la literatura publicada en áreas de la biología de la patología maligna mamaria, que ponen de manifiesto la asociación existente entre el cáncer de mama y la presencia de importantes cambios metabólicos en el huésped (Mishra y cols., 2015). Esta simbiosis se ha objetivado, tanto en estudios realizados a nivel celular (Aboagye y cols., 1999; Katz-Brull y cols., 2002; Kennedy y cols., 2013; Locasale y cols., 2011; Shaw y cols., 2013; Simpson y cols., 2012; Singer y cols., 1995; Weljie y cols., 2011) como a nivel tisular (Balluff y cols., 2015; Borgan y cols., 2010; Brockmoller y cols., 2012; Budczies y cols., 2012; Budczies y cols., 2013; Budczies y cols., 2015; Cao y cols., 2014; Giskeodegard y cols., 2012; Grinde y cols., 2014; Hines et al., 2014; Kanaan y cols., 2014; Li y cols., 2011; Mackinnon y cols., 1997; Mimmi y cols., 2013; Mountford y cols., 2001; Tang y cols., 2014).

De esta manera, se han producido avances notables en la identificación de patrones de diseminación concretos, en la mejora de la clasificación de tumores con evoluciones diferente y en el reconocimiento de diversas rutas metabólicas asociados a la resistencia de determinadas terapias. Existe, a la vez, una gran expectativa para poder identificar nuevas dianas moleculares, y simultáneamente, marcadores que sean predictivos de respuesta a determinados fármacos.

No obstante, a pesar de que se tiene un conocimiento más profundo de la biología de la neoplasia mamaria, el oncólogo clínico mantiene la sensación de que aún se mantiene una importante dependencia del acceso al tejido tumoral mamario, el cual sigue siendo inherente a la disponibilidad de técnicas de cruentas como la punción con aguja fina, la biopsia o bien, la extirpación completa del tumor; todas ellas, técnicas que pueden llevar aparejadas complicaciones propias como el sangrado, las infecciones o la diseminación tumoral.

Por tanto, uno de los intereses que ha subyacido siempre, en la práctica diaria, ha sido el de buscar la posibilidad de ofrecer una mejor opción diagnóstica a las pacientes a las cuales debemos asistir, con el fin de poder plantearles estrategias que les minimicen los riesgos y las molestias. Por esto, el análisis de biofluidos, en nuestro caso, muestras de suero, resulta mucho más atractivo para el clínico, ya que añade el incentivo de estar más acostumbrado a trabajar con este tipo de elemento, y, además, ofrece más facilidad para su obtención y utilización, todo ello unido a la ventaja de que requiere una mínima preparación.

Si seleccionamos los artículos más relevantes, y con mayor potencial de traducción en la práctica asistencial en lo referente a la utilización del plasma como recurso para estudiar los cambios metabólicos, comprobamos cómo éstos se han afianzado, sobre todo, en intentar discriminar subtipos de cáncer de mama (Fan y cols., 2016), estudiar los cambios asociados al desarrollo de la metastatización (Jobard y cols., 2014; Oakman y cols., 2011; Tenori y cols., 2012), reconocer las modificaciones que ocurren en el proceso de la recidiva (Asiago y cols., 2010; Tenori y cols., 2015) o, incluso, intentar predecir la respuesta terapéutica en el tumor primario tras haber recibido un tratamiento de forma

neoadyuvante (Wei y cols., 2013), encontrándonos de forma más anecdótica, la búsqueda de diferencias entre los perfiles de mujeres sanas y enfermas (Qiu Y y cols., 2013).

El propósito de nuestro estudio consiste en poner de manifiesto los cambios específicos existentes dentro del perfil metabólico procedente de una muestra de plasma; sabiendo, además, que las modificaciones que obtengamos, serán propias del cáncer de mama. De tal forma, hemos obtenido fenotipos metabólicos, con la mejor sensibilidad y especificidad publicados hasta la actualidad, que revelan diferencias significativas al comparar los patrones de metabolitos provenientes de pacientes afectas de cáncer de mama, con aquéllos de los controles sanos, facilitándonos, así mismo, la posibilidad de reflejar el dinamismo existente entre las distintas rutas de señalización metabólica. Es decir, nuestros resultados demuestran que existe una firma metabólica propia del cáncer, y que, además, puede ser detectada en el plasma del paciente, independientemente de las características clínicas de las pacientes. Se consigue, así, un método de diagnóstico precoz y poco invasivo.

Para nuestro estudio seleccionamos dos muestras de sujetos, una compuesta por pacientes afectas de cáncer de mama, las cuales habían sido diagnosticadas, tratadas y seguidas en el Complejo Hospitalario de Jaén; y, otra, compuesta por controles sanos. De tal forma, recogimos muestras de suero de un total de 91 pacientes afectas de cáncer de mama y, de 20 controles sanos, según los criterios establecidos, y que ya se expusieron en la sección de Material y Métodos (Ver apartados 2.1 y 2.2 de Material y Métodos). Aunque en un principio se pudiera pensar que el tamaño muestral sería mejorable, al revisar la bibliografía existente, ponemos de manifiesto que somos el estudio que recoge el mayor número de pacientes con cáncer. De tal forma, 55 enfermas y 25 controles sanos (Qiu y cols. 2013); 20 enfermas y 20 controles (Cui M y cols., 2015); 30 enfermas y 25 controles (Wang J y cols., 2009); 60 enfermas y 60 controles (Shen J y cols., 2013); 27 enfermas y 30 controles (Gu H y cols., 2011). Así, todos los autores están de acuerdo en que, debido a la complejidad de los datos obtenidos a partir de un análisis metabólico con reconocimiento de patrones, no existe hasta el momento ningún método estadístico estandarizado para el cálculo del tamaño muestral, y se remiten a estudios previos ya realizados (Wei S y cols., 2012).

En lo que respecta a las variables clínicas que caracterizan a nuestros sujetos, vemos como son similares a las descritas en referencias previas. Así, la edad media de los controles sanos fue alrededor de los 50 años, ligeramente inferior a la edad media de las pacientes, la cual fue de 62 años, pero que, en cambio, sí coincide con los datos epidemiológicos publicados en población caucásica (Altekruse SF y cols., 2010), en la cual, clásicamente, el aumento del riesgo del cáncer de mama es máximo entre los 50 y 65 años de edad, y en las cuales, se pone de manifiesto, incluso, que la curva de incidencia actual ya muestra un aumento significativo en la proporción de casos diagnosticados a partir de los 40 años.

Si nos fijamos en el estado menopáusico, los datos obtenidos están en consonancia con la edad de las pacientes, de tal forma, más de la mitad de las pacientes eran postmenopáusicas (50,5%).

A pesar de todo, en nuestro estudio hemos demostrado cómo los cambios descritos en el perfil metabólico de las pacientes con cáncer de mama no se ven afectadas por estas variables. De hecho, ya se sabía que la edad no era un factor de confusión. En el artículo de Qiu (Qiu y cols., 2013) se distribuyó a las pacientes por grupos de edad, de tal forma que había pacientes por encima de los 60 años y por debajo de los 41 años; y pacientes por encima de los 50 años y por debajo de los 50 años. De esta forma, finalmente, objetivaron que los metabolitos no varían e función de la longevidad poblacional.

De forma contraria, la influencia del estatus postmenopáusico era desconocida hasta ahora. Aunque en alguna publicación sí se recoge el estado hormonal de las pacientes (Wei S y cols., 2012), la motivación está más dirigida a la descripción de la población, que al análisis de su influencia en el perfil metabólico. Esto va en consonancia con diferentes estudio, en los cuales tampoco se tiene en cuenta el estado hormonal a la hora de hacer diferencias entre los distintos perfiles (Fan Y y cols., 2016; Oakman C y cols., 2011; Tenori L y cols., 2011; Asiago VM y cols., 2010).

La tendencia es similar en lo que respecta a las demás características clínicas recogidas. Así, aunque en un primer análisis, el IMC se presentó como un posible factor de confusión. Sin embargo, tras el análisis multivariante, finalmente se demostró cómo no influye en el perfil, bien sea considerándolo en global, o bien sea por categorías. Se pueden encontrar alusiones a este tema en alguna publicación (Shen J y cols., 2013), pero nunca sin llegar a analizarlo de forma estadística. Somos, por tanto, el primer trabajo que demuestra la no existencia de relación entre el IMC y el perfil metabólico de las pacientes con cáncer.

Otras variables como la ingesta de medicación concomitante, los niveles de colesterol o la diabetes, que resultaron ser más frecuentes en el grupo de las paciente que en de las controles, tampoco aportaron diferencias en el perfil metabólico obtenido, siendo también el primer trabajo que lo demuestra.

Por tanto, los cambios descritos en el perfil metabólico de las pacientes con cáncer de mama pueden afectar a la biología de la enfermedad de diferentes formas, sin embargo, hemos demostrado cómo esas modificaciones no se ven afectadas por las distintas características clínicas de las pacientes.

En lo que se refiere a las variables histopatológicas, en nuestro trabajo, éstas han sido analizadas desde un punto de vista meramente descriptivo, pues no era la finalidad de este estudio diferenciar perfiles en función de fenotipos tumorales. Así, si nos fijamos en el tamaño del tumor al diagnóstico, el 2.1% de las pacientes presentaron tumores menores de 2 cm. En lo que se refiere al análisis de la información histopatológica, se comprobó que, más del 70% de las pacientes, estaban dentro de un estadio II al diagnóstico, estando, a su vez, en su fase más temprana (IIa), el grupo que más pacientes albergó (43,4%).

En nuestra muestra los subtipos intrínsecos de Perou, siguiendo los criterios inmunohistoquímicos que hemos referido en material y método (Ver apartado 4.2 de Material y Métodos), tenían la siguiente distribución:

- Tumores subtipo triple negativo: 13%
- Tumores subtipo HER2: 27.1%
- Tumores subtipo Luminal A: 27.1%
- Tumores subtipo Luminal B: 41.3%.

Nuestros datos, con alguna pequeña variación, son muy similares a los obtenidos en la mayoría de los grandes estudios de pacientes sin seleccionar, (Blows FM y cols., 2010), en los cuales los tumores luminales representan más del 60% de la muestra, seguidos de los HER2 amplificado, y, los menos frecuentes, son los del subtipo Basal-Like.

Por lo tanto, independientemente de las variables clínicas, y sin haber tenido en cuenta las variables histopatológicas, mediante la utilización de la espectrometría de masas, obtuvimos 1269 metabolitos con diferente concentración entre el plasma de los controles sanos y el de las pacientes con cáncer. Posteriormente, basándonos en la masa exacta, tiempo de retención y la distribución isotópica identificamos 35 metabolitos, lo que representa un 2,75% de los metabolitos totales.

Esto se puede explicar porque a pesar de que el uso de ESI-Q-TOF-MS/MS en estudios metabólicos ha experimentado un gran desarrollo en los últimos años, las muestras biológicas acuosas más complejas, como el plasma, siguen requiriendo unos métodos de preparación más exhaustivos para prevenir la degradación de la columna del cromatógrafo. Si a esto se añade que las muestras retenidas tienen que pasar al espectrómetro ionizadas mediante un electrospray, y que algunos analitos ionizarán mejor en modo positivo y otros en modo negativo, un estudio metabólico completo requerirá el análisis por ambos métodos de ionización, lo que representa, también, una cuestión por resolver, ya que no todas las moléculas se ionizan de la misma manera, provocando diferencias de sensibilidad aún cuando los componentes estén presentes en la misma concentración molar.

En definitiva, todas estas circunstancias complican el análisis de muestras complejas, como es el plasma, donde cada análisis detectará miles de iones cuyos tiempos de retención y masas, no son conocidos, como ha sido nuestro caso.

No obstante, incluso con el limitado número de metabolitos identificados en nuestro caso, sí hemos conseguido confirmar que, a pesar de su aparente papel en el desarrollo de las funciones vitales habituales dentro de las células sanas pertenecientes a nuestro organismo, también contribuyen, en forma de soporte metabólico a la transformación neoplásica a través de su participación en varias rutas metabólicas. De tal forma, algunos metabolitos contribuyen al crecimiento celular mediante la proporción del material de construcción necesario para la síntesis de componentes celulares esenciales y sustratos para la bioenergética.

De este modo, las bajas concentraciones plasmáticas de los aminoácidos valina, arginina, triptófano y lisina en las pacientes con cáncer de mama podrían traducir un mayor consumo aminoácidos por parte del tumor, pero también podría expresar la especial predilección que sienten las células neoplásicas por ellos.

Igualmente, los elevados niveles alcanzados en nuestro estudio, en relación con las concentraciones de taurina y homocisteína, son, también, sugestivos de un mayor empleo de la metionina, un aminoácido esencial en la síntesis de compuestos donantes de grupo metilo, el aminoácido cisteína, y el antioxidante glutatión (Stipanuk MH y cols., 2011).

Siguiendo esta línea de argumentación, el mayor contenido de ácido linoleico y ácido esteárico, así como de citidina, la cual, además, también se utiliza para la biosíntesis de la fosfatidilcolina y de la fosfatidiletanolamina (Gibellini F y cols., 2010), sugiere un incremento en la tasa de biosíntesis para lípidos estructurales.

Hay que añadir que esta alta concentración plasmática obtenida para la citidina (nucleósido pirimidínico), para el difosfato de inosina (nucleósido purínico) y para el ácido úrico, nos sugiere un aumento en la demanda de sustratos para la biosíntesis de ácido nucleico necesarios para el desarrollo y crecimiento del tumor. En paralelo, la elevada concentración en ácidos grasos de cadena media y corta (ácido caproico y ácido mirístico), y el menor contenido en glutamina y creatina, junto con una mayor cuantía de taurina, sugieren un importante incremento en la transformación y cambios energéticos de las células tumorales.

En este contexto es, también, interesante destacar la detección de tres metabolitos pertenecientes al metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA), cuyos niveles se encontraban elevados en las pacientes con cáncer de mama. El cambio detectado en los niveles de estos tres metabolitos (ácido 2-hidroxi-3-methylbutírico, ácido 2-hidroxi-3-metilpentanoico, y ácido 3-metilglutárico) nos sugiere que los aminoácidos de cadena ramificada son utilizados, preferentemente, por las células de cáncer de mama, debido a su capacidad para proporcionar el carbono necesario para la gluconeogénesis. Si a este hecho, añadimos que los BCAA son esenciales para el mantenimiento de la masa corporal y para la regulación del metabolismo de las proteínas del músculo esquelético (Baracos VE y cols., 2006); los metabolitos descritos podrían utilizarse como biomarcadores tempranos de esta condición, ya que el cáncer de mama sería el responsable de la activación de las vías metabólicas inductoras de la caquexia, por su capacidad para incrementar la oxidación de los BCAA, al igual que de la puesta en marcha del catabolismo neto en músculo esquelético. Todo ello se obtendría a través de una reducción en la síntesis de proteínas y una activación de la proteólisis.

Por otro lado, otros metabolitos conocidos, tales como la taurina y el ácido úrico, han demostrado su capacidad para desempeñar un papel clave en la protección celular cancerígenas del daño excesivo producido por el estrés oxidativo, debido a sus propiedades antioxidantes. Este hecho se ha reforzado mediante la detección de una concentración más baja de 7 $\alpha$ -hidroxi-colesterol y ácido 3-hidroxiantranílico, en el grupo de mujeres con cáncer de mama. Estos 2 metabolitos, se caracterizan por

ser compuestos derivados del estrés oxidativo, siendo ambos, además, productos de oxidación del triptófano.

Por último, hay, además, otras clases de metabolitos que son utilizadas como moléculas de transducción de señales. De tal forma, lo más relevante es, que todos ellos, son lípidos endógenos de señalización. Así, detectamos un contenido disminuido de ácido retinoico; C18: 1 ceramida y de dos aminoácidos N-acilo (ácido 2-metilhipúrico y ácido hipúrico). En cambio, la oleamida endocannabinoide se encontró incrementada en el grupo de cáncer de mama. Esto nos lleva a pensar que, globalmente, todos estos cambios parecen estar enfocados y diseñados para una mejor y mayor proliferación y supervivencia de las células tumorales.

Por lo tanto, podemos ver cómo los cambios en el perfil metabolómico de las pacientes con cáncer de mama que hemos descrito en nuestro estudio, pueden llegar a afectar a la biología de la enfermedad de una manera muy compleja. De esta manera, los metabolitos pueden llegar a promover la tumorigénesis de diferentes formas, como puede ser mediante el cambio en el estado de diferenciación, la inducción y promoción de patrones de diseminación, o bien, alterando diversos mecanismos moleculares que asocien resistencia a determinadas terapias, y provocando que los tumores sean más viables en condiciones de estrés.

Aunque nuestro estudio se centra en una cohorte relativamente pequeña de pacientes, claramente indica que, la metabolómica enfocada al plasma humano es útil en la identificación de metabolitos diferenciales y en la predicción de cáncer de mama. Desde nuestro punto de vista, las firmas metabólicas para el diagnóstico, deben ser elaboradas a partir de un número pequeño de pacientes y deben de presentar una sensibilidad y especificidad adecuada. Posteriormente, creemos, deberían ser validadas en una cohorte de pacientes, independiente de la que se empleo para desarrollar la firma, y con mayor número de pacientes, para validar los resultados, y posiblemente, poder encontrar más marcadores que nos permitan aumentar la sensibilidad y la especificidad de la prueba.

Posiblemente esta aproximación pueda venir más dirigida en el contexto de una mayor focalización del estudio de los ácidos grasos; de tal forma, que, mediante su análisis y ponderación, podamos obtener una herramienta diagnóstica, y no invasiva, de cáncer de mama.

La fuerza de nuestro estudio, por tanto, se fundamenta en la obtención de metabolitos de muestras de suero, obtenidas mediante métodos poco invasivos, y en el desarrollo de un modelo diagnóstico de alta sensibilidad y especificidad, independientemente de las características clínicas e histopatológicas de las pacientes. A pesar de que el mecanismo de interconexión sigue siendo especulativo, los resultados que confirman la correlación paciente/tumor de las diferentes muestras, avalan la aplicación de este método para el estudio de los cambios metabólicos y la aplicación de métodos diagnósticos más efectivo en nuestro caso. Por tanto, la identificación de biomarcadores moleculares en este tipo de muestras abre un excitante camino para entender tanto la fisiopatología específica del cáncer de mama, como el comportamiento de los distintos metabolitos, según la procedencia de la muestra analizada.

Es evidente que la metabolómica abre un nuevo campo de investigación aplicada en el cáncer de mama, de potencial aún incalculable, y cuyos resultados prácticos estamos sólo comenzando a descubrir. En el futuro, los estudios clínicos en cáncer de mama deberían desarrollarse teniendo en cuenta la información metabolómica, hasta ahora disponible y recopilada, incluyendo, además, un elemento traslacional sistemático que nos permita adquirir nuevos conocimientos de forma prospectiva en el contexto más favorable; es decir, el estudio aleatorizado de forma prospectiva.









## CONCLUSIONES

- **Conclusión 1:** se han expuesto y se han optimizado, métodos analíticos apropiados, rentables, reproducibles y eficientes, basados en técnicas de espectrometría de masas, para el análisis metabolómico de muestras biológicas obtenidas mediante métodos poco invasivos, en concreto, suero obtenido de sangre venosa de pacientes. A esto hay que añadir el hecho de que, en función de los objetivos establecidos, se han seleccionado y planteado los criterios más adecuados para el procesamiento de los datos y su posterior análisis mediante herramientas bioinformáticas avanzadas.

- **Conclusión 2:** se ha demostrado cómo hasta en 1269 metabolitos, la concentración sérica fue diferente según la condición del sujeto; evidenciando así que, a pesar de su aparente papel en el desarrollo de las funciones vitales habituales dentro de las células sanas pertenecientes a nuestro organismo, también contribuyen, en forma de soporte metabólico, a la transformación neoplásica, a través de su participación en varias rutas metabólicas.

Se han identificado 35 metabolitos, que permiten diferenciar a pacientes con cáncer de mama de sujetos sanos de manera estadísticamente significativa, cabiendo destacar la alta especificidad y sensibilidad que presentan los elevados niveles de taurina y el ácido linoleico, y los bajos niveles de ácido caproico. Es decir, este estudio prueba la existencia de una firma metabólica del cáncer y que, además, ésta puede ser detectada en suero sanguíneo.

- **Conclusión 3:** a pesar del elevado número de trabajos publicados sobre metabolómica en cáncer de mama, hasta donde podemos saber, en esta tesis doctoral se presenta, por vez primera, los mejores resultados en cuanto a una ecuación diagnóstica, con una test de permutación significativo ( $p=0.05$ ) y un error “out of bag” de 0,027, independientemente de las características clínicas del sujeto.

- **Conclusión 4:** es conocido que los estudios de detección de biomarcadores en metabolómica son difíciles de reproducir, bien sea por la heterogeneidad y el tamaño de las poblaciones de los estudios, la variabilidad de los protocolos experimentales, el ruido en los datos de la metabolómica o, incluso, las variaciones biológicas de los propios metabolitos. Aún así, los resultados metabolómicos obtenidos en este trabajo de tesis doctoral en relación a la detección de metabolitos, que se posicionan como nuevos biomarcadores relacionados con el diagnóstico del cáncer de mama, pueden permitir profundizar en el estudio de otras líneas de actuación, ya vuelvan a ser diagnósticas, o incluso, terapéuticas.

- **Conclusión general:** queda un largo camino por recorrer en lo que se refiere a la metabolómica y su relación con el cáncer de mama. Si duda, un mejor conocimiento del metabolismo del cáncer de mama puede abrir el camino a un mejor control de la enfermedad. De tal forma, sería interesante explorar las posibilidades que nos brinda un perfil metabolómico obtenido de biofluidos, y por tanto de forma poco invasiva, en cualquier aspecto relacionado con el diagnóstico, seguimiento y tratamiento del cáncer de mama. De esta manera, se destacan tres situaciones concretas. Por un lado, continuar con el estudio que permita obtener métodos diagnósticos no invasivos, eficaces y fáciles de llevar a cabo. Por otro, conseguir una mejor determinación de la enfermedad micrometastásica residual que queda en una paciente tras la intervención quirúrgica, permitiendo, así, la posibilidad de evaluar la necesidad de someterla a un tratamiento adyuvante; y para finalizar, poder plantear estrategias de tratamiento individualizado a cada paciente, optimizando así, la eficacia terapéutica y minimizando, además, el riesgo de toxicidad.





## **BIBLIOGRAFÍA**



## **BIBLIOGRAFÍA**

### **A**

Aboagye EO, Bhujwala ZM. Malignant transformation alters membrane choline phospholipid metabolism of human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 59: 80-84 (1999).

Allred DC, Carlson RW, Berry DA, Burstein HJ, Edge SB, Goldstein LJ, et al. NCCN Task Force Report: Estrogen Receptor and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer by Immunohistochemistry. *J Natl Compr Canc Netw.* 6:1-21 (2009).

Altekruse S F, Kosary CL, Krapcho M. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007, National Cancer Institute. Bethesda, MD. <http://seer.cancer.gov/csr/1975-2007>. SEER web site (2010).

Andersson M, Lidbrink E, Bjerre K, Wist E, Enevoldsen K, Jensen Ab, et al. Phase III randomized study comparing docetaxel plus trastuzumab with vinorelbine plus trastuzumab as first-line therapy of metastatic or locally advanced human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: The HERNATA Study. *J Clin Oncol.* 29: 264-271 (2010).

Andreopoulou E, Cristofanilli M. Circulating tumor cells as prognostic marker in metastatic breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 10: 171-7 (2010).

Antoniou AC, Easton DF. Risk prediction models for familial breast cancer. *Future Oncol.* 2: 257-74 (2006).

Asiago, VM, Alvarado LZ, Shanaiah N, Gowda GAN, Owusu- Sarfo K, Ballas RA, et al. Early detection of recurrent breast cancer using metabolite profiling. *Cancer Res.* 70: 8309-8318 (2010).

Astley SM. Computer-based detection and prompting of mammographic abnormalities. *Br. J. Radiol.* 77: 194-200 (2004).

Aue WP, Bartholdi E, Ernst RR. 2-Dimensional Spectroscopy - Application to Nuclear Magnetic-Resonance. *Journal of Chemical Physics:* 64: 2229-2246 (1976).

Avril N, Sassen S, Schmalfeldt B, Naehrig J, Rutke S, Weber WA, et al. Prediction of response to neoadjuvant chemotherapy by sequential F-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in patients with advanced-stage ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 23:7445-53 (2005).

### **B**

Bales JR, Higham DP, Howe I, Nicholson JK, Sadler PJ. Use of highresolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy for rapid multicomponent analysis of urine. *Clin Chem.* 30: 426-432 (1984).

Balluff B, Frese CK, Maier SK, Schöne C, Kuster B, Schmitt M, et al. De novo discovery of phenotypic intratumour heterogeneity using imaging mass spectrometry. *J Pathol.* 235: 3-13 (2015).

Baracos VE, Mackenzie ML. Investigations of Branched-Chain Amino Acids and Their Metabolites in Animal Models of Cancer. *J Nutr.* 237-242 (2006).

Bartelink H, Maingon P, Poortmans P, Weltens C, Fourquet A, Jager J, et al. Whole-breast irradiation with or without a boost for patients treated with breast-conserving surgery for early breast cancer: 20-year follow-up of a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 16: 47-56 (2015).

Baselga J, I. Bradbury, and H. Eidtmann, Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *The Lancet.* 379: 633-640 (2012).

Bathen TF, Engan T, Krane J, Axelson D. Analysis and classification of proton NMR spectra of lipoprotein fractions from healthy volunteers and patients with cancer or CHD. *Anticancers Res.* 20: 2393-408 (2000).

Bathen TF, Geurts B, Sitter B, Fjosne HE, Lundgrens S, Buydens LM, et al. Feasibility of MR Metabolics for immediate analysis of resection margins during breast cancer surgery. *PLoS ONE* 8: 1-7 (2013).

Bear HD, Tang G, Rastogi P, Geyer CE, Rooidoux A, Atkins JN, et al. Bevacizumab added to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *The New England Journal of Medicine.* 366: 310-320 (2012).

Behjatnia B, Sim J, Bassett LW, Moatamed NA, Apple SK. Does size matter? Comparison study between MRI, gross, and microscopic tumor sizes in breast cancer in lumpectomy specimens. *Int J Clin Exp Pathol.* 3: 303-9 (2010).

Belouche-Babari M, Jackson LE, Al-Saffar NM, Workman P, Leach MD, Ronen SM. Magnetic resonance spectroscopy monitoring of mitogen-activated protein kinase signalling inhibition. *Cancer Res.* 65: 3356-63 (2005).

Berenton RG. *Applied chemometrics for scientist.* John Wiley and sons, Hoboken, NJ (2007).

Bertos NR, Park M. Breast cancer - one term, many entities? *J Clin Invest.* 121:3789-96 (2011).

Bertucci F, Borie N, Ginestier C, Groulet A, Charafe-Jauffret E, Adelaide J, et al. Identification and validation of an ERBB2 gene expression signature in breast cancers. *Oncogene.* 23:2564-75 (2004).

Bhargava R, Beriwal S, Dabbs DJ, Ozbek U, Soran A, Johnson RR, et al. Immunohistochemical surrogate markers of breast cancer molecular classes predicts response to neoadjuvant chemotherapy: a single institutional experience with 359 cases. *Cancer.* 116:1431-9 (2010).



Blancas I, García-Puche JL, Bermejo B, Hanrahan ED, Monteagudo C, Martínez-Agullo A, et al. Low number of examined lymph nodes in node-negative breast cancer patients is an adverse prognostic factor. *Ann Oncol.* 17 (11): 1644-9 (2006).

Bliss JM, Kilburn LS, Coleman RE, Forbes JF, Coates AS, Jones SE, et al. Disease-related outcomes with long-term follow-up: an updated analysis of the intergroup exemestane study. *J Clin Oncol.* 30: 709-717 (2012).

Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med.* 7: 1-12 (2010).

Blum JL, Barrios CH, Feldman N, Verma S, McKenna EF, Lee LF, et al. Pooled analysis of individual patient data from capecitabine monotherapy clinical trials in locally advanced or metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 136: 777-788 (2012).

Bokemeyer C, Kollmannsberger C, Oechsle K, Dohmen BM, Pfannenberger A, Claussen CD, et al. Early prediction of treatment response to high dose salvage chemotherapy in patients with relapsed germ cell cancer using 18 FDG PET. *Br J Cancer.* 86: 506-11 (2002).

Bolton E, Wang Y, Thiessen PA, Bryant SH. PubChem: Integrated Platform of Small Molecules and Biological Activities. Wheeler RA, Spellmeyer DC (eds). *Annual Reports in Computational Chemistry.* 4: 217-241 (2008).

Borgan E, Sitter B, Lingjarde OC, Johnsen H, Lundgren S, Bathen TF, et al. Merging transcriptomics and metabolomics advances in breast cancer profiling. *BMC Cancer.* 10: 1-14 (2010).

Boros LG, Brackett DJ, Harrigan GG. Metabolic biomarker and kinase drug target discovery in cancer using stable isotope-based dynamic metabolic profiling (SIDMAP). *Current Cancer Drug Targets.* 3: 445-453 (2003).

Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coobes RC, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med.* 353: 793-802 (2005).

Bro R, Kamstrup-Nielsen MH, Engelsen SB, Savorani F, Rasmussen MA, Hansen L, et al. Forecasting individual breast cancer risk using plasma metabolomics and biocontours. *Metabolomics* 11:1376-1380 (2015).

Brockmüller SF, Bucher E, Müller BM, Budczies J, Hilvo M, Griffin JL, et al. Integration of metabolomics and expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAM) in breast cancer-link to patient survival, hormone receptor status, and metabolic profiling. *J Proteome Res.* 11: 850-60 (2012).

Brown FF, Campbell ID, Kuchel PW, Rabenstein DC. Human erythrocyte metabolism studies by <sup>1</sup>H spin echo NMR. *FEBS Lett.* 82: 12-16 (1977).

Buckhaults P, Rago C, St Croix B, Romans KE, Saha S, Zhang L, et al. Secreted and cells surface genes expressed in benign and malignant colorectal tumors. 61: 6996-7001 (2001).

Budczies J, Brockmüller SF, Müller BM, Barupal DK, Richter-Ehrenstein C, Kleine-Tebbe A, et al. Comparative metabolomics of estrogen receptor positive and estrogen receptor negative breast cancer: alterations in glutamine and beta-alanine metabolism. *J Proteomics.* 94: 279-88 (2013).

Budczies J, Denkert C, Muller B, Brockmoller SF, Klauschen F, Györfy B, et al. Remodeling of central metabolism in invasive breast cancer compared to normal breast tissue – a GC-TOFMs based metabolomics study. *BMC Genomics.* 13: 334 (2012).

Budczies J, Pfitzner BM, Györfy B, Winzer KJ, Radke C, Dietel M, Fiehn O, Denkert C. Glutamate enrichment as new diagnostic opportunity in breast cancer. *Int J Cancer.* 136:1619-28 (2015).

Buyse M, Loi S, van't Veer L, Viale G, Delorenzi M, Glas AM, et al. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 98:1183-92 (2006).

Buzdar AY, Ibrahim NK, Francis D, Booser DJ, Thomas ES, Theriault RL, et al. Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. *J Clin Oncol.* 23: 3676-85 (2005).

## C

Cadoo KA, McArdle O, O'Shea AM, Power CP, Hennessy BT. Management of unusual histological types of breast cancer. *Oncologist.* 17:1135-1145 (2012).

Cameron SJ, Lewis KE, Beckmann M, Allison GG, Ghosal R, Lewis AD, et al. The metabolomic detection of lung cancer biomarkers in sputum. *Lung Cancer.* 94: 88-95 (2016).

Cardoso F, Costa A, Norton L, ESO-ESMO 2nd international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC2). 00: 1-14 (2014).

Cao B, Mengjie L, Weibin Z, Zhao Q, GU R, Liu L, et al. Metabolomic approach to evaluating adriamycin pharmacodynamics and resistance in breast cancer cells. *Metabolomics.* 9: 960-973 (2013).

Cao MD, Lamichhane S, Lundgren S, Bofin A, Fjøsne H, Giskeødegård GF, et al. Metabolic characterization of triple negative breast cancer. *BMC Cancer.* 14: 941 (2014).

Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 295:2492-502 (2006).

Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res*. 13:2329-34 (2007).

Casado -Vela J, Cebrián A, Del Pulgar MT, Sanchez-Lopez E, Vilaseca M, Menchen L, et al. Lights and shadows of proteomic Technologies for the study of protein species including isoforms, splicing variants and protein post-traslational modifications. *Proteomics*. 11: 590-603 (2011).

Chan AW, Mercier P, Schiller D, Bailey R, Robbins S, Eurich DT, et al. (1)H-NMR. Urinary metabolomic profiling for diagnosis of gastric cancer. *Br J Cancer*. 114: 59-62 (2016).

Chan DW, Beveridge RA, Muss H, Fritsche HA, Hortobagyi G, Theriault R, et al. Use of Truquant BR radioimmunoassay for early detection of breast cancer recurrence in patients with stage II and stage III disease. *J. Clin. Oncol*. 15: 2322-2328 (1997).

Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, Hilsenbeck SG, Gutierrez MC, Tham YL, et al. Patterns of resistance and incomplete response to docetaxel by gene expression profiling in breast cancer patients. *Journal of Clinical Oncology* 23:1169-1177 (2005).

Chari R, Thu KL, Wilson IM, Lockwood WW, Lonergan KM, Coe BP, et al. Integrating the multiple dimensions of genomic and epigenomic landscapes of cancer. *Cancer and metastases review*. 29: 73-93 (2010).

Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 101:736-50 (2009).

Cheng LL, Lean CL, Bogdanva A, Carter Wright S, Ackerman JL, Brady TS, et al. Enhanced resolution of proton NMR spectra of malignant lymph nodes using magic angle spinning. *Mag Reson Med*. 36: 653-8 (1996).

Chia SK, Speers CH, Bryce CJ, Hayes MM, Olivotto IA. Ten-year outcomes in a population-based cohort of node-negative, lymphatic, and vascular invasion-negative early breast cancers without adjuvant systemic therapies. *J Clin Oncol*. 22: 1630-7 (2004).

Chung YL, Troy H, Banerji U, Jackson LE, Walton MI, Stubbs M, et al. Magnetic resonante spectroscopy pharmacodynamic markers of the heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin (17AGG) in human colon cancer models. *J Natl Cancer Inst*. 95:1624-33 (2003).

Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart M, et al. Tailoring therapies—improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol* 26: 1533-1546 (2015).

Colditz GA, Baer HJ, Tamini RM. Breast Cancer. En: Schottenfeld D, Fraumeni JF, editors. Cancer epidemiology and prevention. 3ª edición. New Cork: Oxford University Press. 995-1013 (2006).

Corona G, Polesel J, Fratino L, Miolo G, Rizzolio F, Crivellari D, et al. Metabolomics Biomarkers of frailty in elderly Breast Cancer patients. *Journal of Cellular Physiology*. 229: 898-902 (2014).

Cristofanelli M. Circulating tumor cells, disease progresión and survival in metastatic breast cancer. *Semin Oncol*. 33: 9-14 (2006).

Cui M, Wang Q, Chen G. Serum metabolomics analysis reveals changes in signaling lipids in breast cancer patients. *Biomed Chromatogr*. 30: 42-47(2016).

## D

Davis VW, Bathe OF, Schiller DE, Slupsky CM, Sawyer MB. Metabolomics and Surgical Oncology: Potential Role for Small Molecule Biomarkers. *Journal of Surgical Oncology*. 103: 451-459 (2011).

Dawson SJ, Provenzano E, Caldas C. Triple negative breast cancers: clinical and prognostic implications. *Eur J Cancer*. 1: 27-40 (2009).

De Cremoux P, Grandin L, Dieras V, Savignoni A, Degeorges A, Salmon R, et al. Urokinase-type plasminogen activator and plasminogen-activator-inhibitor type 1 predict metastases in good prognosis breast cancer patients. *Anticancer Res*. 29: 1475-82 (2009).

De Geus-Oei LF, van der Heijden HF, Corstens FH, Oyen WJG. Predictive and prognostic value of FDG-PET in nonsmall-cell lung cancer: a systematic review. *Cancer*. 110: 1654-64 (2007).

De Soto JA, Deng CX. PARP-1 inhibitors: are they the long-sought genetically specific drugs for BRCA1/2 associated breast cancers? *Int J Med Sci*. 3: 117-123 (2006).

Dear RF, McGeechan K, Jenkins MC, Barratt A, Tattersall MHN, Wilcken N. Combination versus sequential single agent chemotherapy for metastatic breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. (2013).

Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD (2007). Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev*. 26: 51-78 (2007).

Del Casar JM, Martin A, Garcia C, Corte MD, Alvarez A, Junquera S, et al. Characterization of breast cancer subtypes by quantitative assessment of biological parameters: relationship with clinicopathological characteristics, biological features and prognosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 141: 147-52 (2008).

DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer. Principles & Practice of Oncology. 9th Edition. Lippincott Williams & Wilkins Publishers (2011).

Di Gangi IM, Mazza T, Fontana A, Copetti M, Pusilli C, Ippolito A, et al. Metabolomic profile in pancreatic cancer patients: a consensus-based approach to identify highly discriminating metabolites. *Oncotarget*. 7: 5815-29 (2016).

Di Saverio S, Catena F, Santini D, Ansaloni L, Fogacci T, Mignani S, et al. 259 Patients with DCIS of the breast applying USC/Van Nuys prognostic index: a retrospective review with long term follow up. *Breast Cancer Res Treat*. 109: 405-16. (2008).

Domitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk-Where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med*. 9: 208-21 (2004).

Dong JY, Qin LQ. Soy isoflavones consumption and risk of breast cancer incidence or recurrence: a meta-analysis of prospective studies. *Breast Cancer Res Treat*. 125: 315-23 (2011).

Dowling C, Bollen AW, Noworolski SM, McDermott MW, Barbaro NM, Day MR, et al. Pre-operative proton MR spectroscopic imaging of brain tumors: correlations with histopathologic analysis of resections specimens. *AJNR Am J Neuroradiol*. 22: 604-12 (2001).

Dubsky PC, Gnant MF, Taucher S, Roka S, Kandioler D, Pichler-Gebhard B, et al. Young age as an independent adverse prognostic factor in premenopausal patients with breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 3: 65-72 (2002).

Dunn WB, Bailey NJ, Jonshon HE (2005). Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst*. 130: 606-25 (2005).

## E

Earl HM, Vallier AL, Hiller L, Fenwick N, Young I, Iddawela m, et al. Effects of the addition of gemcitabine, and paclitaxel-first sequencing, in neoadjuvant sequential epirubicin, cyclophosphamide, and paclitaxel for women with high-risk early breast cancer (Neo-tAnGo): an open-label, 2x2 factorial randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 15: 201-212 (2014).

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomized trials. *Lancet*. 365: 1687-717 (2005).

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials. *Lancet* 383: 2127-2135 (2014).

Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 17:1471-4 (2010).

El-Deredy W, Ashmore SM, Branston NM, Darling JL, Williams SR, Thomas DG, et al. Pretreatment prediction of the chemotherapeutic response of human glioma cell cultures using nuclear magnetic resonance spectroscopy and artificial neural networks. *57: 4196-9* (1997).

Ellis MJ, Coup A, Sing B, Mauriac L, LLombert-Cussac A, Janicke F, et al. Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1 and ErbB-2 positive, estrogen and receptor positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial. *J Clin Oncol*. 19: 3808-3816 (2001).

Eriksson L, Johansson E, Byrne T, Trygg J, Vikstrom C. Multi- and Megavariate Data Analysis: Finding and Using Regularities in Metabonomics Data. In: Robertson DG, Lindon JC, eds. *Metabonomics in toxicity assessment*. Taylor & Francis, Boca Raton, FL. (2005).

## F

Fan Y, Zhou X, Xia T-S, Chen Z, Li J, Liu Q, et al. Human plasma metabolomics for identifying differential metabolites and predicting molecular subtypes of breast cancer. *Oncotarget*. 7: 9925-9938 (2016).

Fang G, Kim CN, Perkins CL, Ramadevi N, Winton E, Wittmann S, et al. CGP57148B (STI-571) induces differentiation and apoptosis and sensitizes Bcr-Abl-positive human leukemia cells to apoptosis due to antileukemic drug. *Blood*. 96: 2246-53 (2000).

Farmer P, Bonnefoi H, Anderle P, Cameron D, Wirapati P, Becette V, et al. A stroma related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nat Med*. 15:68-74 (2009).

Fehm T, Muller V, Alix-Panabieres C, Pantel K. Micrometastatic spread in breast cancer: detection, molecular characterization and clinical relevance. *Breast Cancer Res*. 1: 1-10 (2008).

Fiehn O. Combining Genomics, Metabolome Analysis, and Biochemical Modelling to Understand Metabolic Networks; *Comp Funct Genomics* 2: 155-168 (2001).

Fiehn O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* 48: 155-171 (2002).

Fini MA, Elias A, Johnson RJ, Wright R. Contribution of uric acid to cancer risk, recurrence and mortality. *Clinical and Translational Medicine*. 1:1-16 (2014).

Fix E, Hodges JL, Jr. Discriminatory Analysis. Nonparametric Discrimination: Consistency Properties. *International Statistical Review/Revue Internationale de Statistique*: 57: 238-247 (1989).

Flores YN, Bishai DM, Lorincz A, Shah KV, Lazcano-Ponce E, Hernandez M, et al. HPV testing for cervical cancer screening appears more cost-effective than Papanicolaou cytology in Mexico. *Cancer Causes Control*. 22: 261-72 (2011).

Francis PA, Regan MM, Fleming GF, Lang I, Ciruelos E, Bellet M, et al. Adjuvant ovarian suppression in premenopausal breast cancer. *N Engl J Med*. 372: 436-446 (2015).

Friedenreich CM, Woolcott CG, McTiernan A, Ballard-Barbash R, Brant RF, Stanczyk FZ, et al. Alberta physical activity and breast cancer prevention trial: sex hormone changes in a year-long exercise intervention among postmenopausal women. *J Clin Oncol*. 28:1458-66 (2010).

Fujiwaki R, Hata K, Nakayama K, Fukumoto M, Miyazaki K. Gene expression for dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase influences outcome in epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 18: 3964-51 (2000).

## **G**

Gago FE, Fanelli MA, Ciocca DR. Co-expression of steroid hormone receptors (estrogen receptor alpha and/or progesterone receptors) and Her2/neu (c-erbB-2) in breast cancer: clinical outcome following tamoxifen-based adjuvant therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 98:36-40 (2006).

Gamache PH, Meyer DF, Granger MC, Acworth IN. Metabolomic applications of electrochemistry/mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*: 15(12): 1717-1726 (2004).

Gampenrieder SP, Rinnerthaler G, Greil R. Neoadjuvant Chemotherapy and Targeted Therapy in Breast Cancer: Past, Present, and Future. *Journal of Oncology*. 2013: 1-12 (2013).

Gartland KP, Sanins SM, Nicholson JK, Sweatman BC, Beddell CR, Lindon JC. Pattern recognition analysis of high resolution <sup>1</sup>H NMR spectra of urine. A nonlinear mapping approach to the classification of toxicological data. *NMR Biomed*. 3: 166-17 (1990).

Gaul DA, Mezencev R, Long TQ, Jones CM, Benigno BB, Gray A, et al. Highly-accurate metabolomic detection of early-stage ovarian cancer. *Sci Rep*. 5: 1-7 (2015).

Gayther SA, Pharoah PDP, Ponder BAJ. The genetics of inherited breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 3: 365-375 (1998).

Gebruers N, Verbelen H, De Vrieze T, Coeck D, Tjalma W, et al. Incidence and time path of lymphedema in sentinel node negative breast cancer patients: a systematic review. *Arch Phys Med Rehabil*. 96: 1131-1139 (2015).

Gelmon KA, Boyle F, Kaufman B, Huntsman D, Manikhas A, Dileo A, et al. Open-label phase III randomized controlled trial comparing taxane-based chemotherapy (Tax) with lapatinib (L) or trastuzumab (T) as first-line therapy for women with HER-2 metastatic breast cancer: Interim analysis (IA) of NCIC CTG MA.31/GSK EGF 108919. *J Clin Oncol*: 30 (2012).

Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 355: 2733-43 (2006).

Gianni L, Baselga J, Eiermann W. First report of the European Cooperative Trial in Operable Breast Cancer (ECTO): effects of primary systemic therapy on local-regional disease. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 21 : 34 a (abstract 132) (2002).

Gianni L, Pienkowski T, Him YH, Roman L, Tseng LM, Liu MC, et al. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 13: 25-32 (2012).

Gianni L, Semiglazov V, Manikhas GM, Neoadjuvant trastuzumab in locally advanced breast cancer (NOHAH): antitumor and safety analysis. *J Clin Oncol*, 2007. ASCO Annual Meeting Proceeding Part I. 25: 532 (2007).

Gibellini F, Smith TK. The Kennedy pathway- De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine, *IUBMB Life*. 62: 414-428 (2010).

Giskeodegard, G.F., Grinde, M.T., Sitter, B., Axelson, D.E., Lundgren, S., Fjosne, H.E., Dahl, S., Gribbestad, I.S., Bathen, T.F. Multivariate modeling and prediction of breast cancer prognostic factors using MR metabolomics. *J. Proteome Res*. 9: 972-979 (2010).

Giskeodegard GF, Lundgren S, Sitter B, Fjøsne HE, Postma G, Buydens LM, Gribbestad IS, Bathen TF. Lactate and glycine-potential MR biomarkers of prognosis in estrogen receptor-positive breast cancers. *NMR Biomed*. 25(11): 1271-9 (2012).

Giuliano AE, Chung AP. Long-term follow-up confirms the oncologic safety of sentinel node biopsy without axillary dissection in node-negative breast cancer patients. *Ann Surg*. 251:601-3 (2010).

GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. ARCI: OMS; [último acceso el 16/01/16]. Accesible en: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.

Glunde K, Jie Ch, M Bhujwala Z. Molecular causes of the aberrant choline phospholipid metabolism in breast cancer. *Cancer Res*. 64: 4270-4276 (2004).

Glunde K, Serkova NJ. Therapeutic targets and biomarkers identified in cancer choline phospholipids metabolism. *Pharmacogenomics*. 7: 1109-23 (2006).



Green MC, Buzdar AU, Smith T, Ibrahim NK, Valero V, Rosales MF, et al. Weekly paclitaxel improves pathologic complete remission in operable breast cancer when compared with paclitaxel once every three weeks. *J Clin Oncol* 23: 5938-92 (2005).

Greene F. PD, Fleming I. *AJCC Cancer Staging Manual*. 6<sup>a</sup> ed. New York. Springer-Verlag. (2002).

Gribbestead IS, Sitter B, Lundgren S, Krane J, Axelson D. Metabolite composition in breast tumors examined by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anticancer Res*. 19: 1737-46 (1999).

Griffin JL, Pole JC, Nicholson JK, Carmichael PL. Cellular environment of metabolites and a metabolomic study of tamoxifen in endometrial cells using gradient high resolution magic angle spinning H NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*. 1619:151-8 (2003).

Grinde MT, Skrbo N, Moestue SA, Rødland EA, Borgan E, Kristian A, Sitter B, Bathen TF, Børresen-Dale AL, Mælandsmo GM, Engebraaten O, Sørli T, Marangoni E, Gribbestad IS. Interplay of choline metabolites and genes in patient-derived breast cancer xenografts. *Breast Cancer Res*. 21: 1-5 (2014).

Goldstein LJ, Gray R, Badve S, Childs BH, Yoshizawa C, Rowley S, et al. Prognostic utility of the 21-gene assay in hormone receptor-positive operable breast cancer compared with classical clinicopathologic features. *J Clin Oncol*. 26:4063-71 (2008).

Goss PE, Ingle JN, Martino S, Robert NJ, Muss HB, Piccart MJ, et al. A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *N Engl J Med*. 349: 1793-1802(2003).

Gottschalk S, Anderson N, Hainz C, Eckhardt SG, Serkova NJ. Imatinib (STI571)-mediated changes in glucose metabolism in human leukaemia BCR-ABL-positive cells. *Clin Cancer Res*. 10: 6661-6668 (2004).

Griffin JL, Shockcor JP. Metabolic profiles of cancer cells. *Nat Rev Cancer*. 4: 551-561 (2004).

Gu H, Pan Z, Xi B, Asiago V, Musselman B, Raftery D. Principal component directed partial least squares analysis for combining NMR and MS data in metabolomics: Application to the detection of breast cancer. *Anal Chim*. 686: 57-63 (2011).

Guarneri V, Frassoldati A, Bottini A, Cagossi K, Bisagni G, Sarti S, et al., Preoperative chemotherapy plus trastuzumab, lapatinib, or both in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer: results of the randomized phase II CHER-LOB study. *Journal of Clinical Oncology*. 30:1989-1995 (2012).

Guth U, Huang DJ, Huber M, Schotzau A, Wruk D, Holzgreve W, et al. Tumor size and detection in breast cancer: Self-examination and clinical breast examination are at their limit. *Cancer Detect Prev*.32: 224-8 (2008).

## H

Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol.* 28:2784-95 (2010).

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144: 646-74 (2011).

Harberck N, Kates RE, Schmitt M, Gauger K, Kiechle M, Janicke F, et al. Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type 1 predict disease outcome and therapy response in primary breast cancer. *Clin Breast Cancer.* 5: 348-52 (2004).

Harbeck N, Thomssen C. A new look at node-negative breast cancer. *Oncologist.* 1:51-60 (2011).

Henson DE, Ries L, Freedman LS, Carriaga M. Relationship among outcome, stage of disease and histologic grade for 22616 cases of breast cancer. The basis for a prognostic cancer index. *Cancer.* 15: 2142-9 (1991).

Hewer R, Vorster J, Steffens FE, Meyer D. Applying biofluid H-1 NMR-based metabonomic techniques to distinguish between HIV-1 positive/AIDS patients on antiretroviral treatment and HIV-1 negative individuals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis:* 41:1442-1446 (2006).

Hilakivi-Clarke L, Andrade JE, Helferich W. Is soy consumption good or bad for the breast? *J Nutr.* 140:2326-2334 (2010).

Hines KM, Ballard BR, Marshall DR, McLean JA. Structural mass spectrometry of tissue extracts to distinguish cancerous and non-cancerous breast diseases. *Mol Biosyst.* 10: 2827-2837(2014).

Hobert JA, Eng C. PTEN hamartoma tumor syndrome: an overview. *Genet Med.* 11: 687-94 (2009)

Holdsworth CH, Badawi RD, Manola JB, Kijewski MF, Israel D, Demetri GD, et al. CT and PET: early prognostic indicators of response to imatinib mesylate in patients with gastrointestinal stromal tumor. *AJR Am J Roentgenol.* 189: 324-330 (2007).

Horai H, Arita M, Kanaya S, Nihei Y, Ikeda T, Suwa K, et al. Massbank. *J Mass Spectrom* 45: 703-714 (2010).

Hou N, Hong S, Wang W, Olopade OI, Dignam JJ, Huo D. Hormone replacement therapy and breast cancer: heterogeneous risks by race, weight, and breast density. *J Natl Cancer Inst.* 105:1365-72 (2013).

<http://www.ine.es/prensa/np0215.htm>. Estadística de defunciones según la causa de muerte. Website del Instituto Nacional de Estadística. Publicado el 27 de febrero de 2015. Acceso el 13 de agosto de 2015.

Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*. 7: 96 (2006).

Huan T, Troyer DA, Li L. Metabolite Analysis and Histology on the Exact Same Tissue: Comprehensive Metabolomic Profiling and Metabolic Classification of Prostate Cancer. *Sci Rep*. 6: 1-13 (2016).

Huang S, Chong N, Lewis NE, Jia W, Xie G, Garmire LX. Novel personalized pathway-based metabolomics models reveal key metabolic pathways for breast cancer diagnosis. *Genome Medicine* 8: 1-14 (2016).

## I

Idirisinghe PK, Thike AA, Cheok PY, Tse GM, Lui PC, Fook-Chong S, et al. Hormone receptor and c-ERBB2 status in distant metastatic and locally recurrent breast cancer. Pathologic correlations and clinical significance. *Am J Clin Pathol*. 133: 416-29 (2010).

Ishikawa S, Sugimoto M, Kitabatake K, Sugano A, Nakamura M, Kaneko M, et al. Identification of salivary metabolomic biomarkers for oral cancer screening. *Sci Rep*. 6: 1-7 (2016).

Iwata H, Sato N, Masuda N, Nakamura S, Yamamoto N, Kuroi K, et al. Docetaxel followed by fluorouracil/epirubicin/cyclophosphamide as neoadjuvant chemotherapy for patients with primary breast cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 41: 867-875 (2011).

## J

Jacobs MA, Barker PB, Bottomley PA. Proton magnetic resonance spectroscopic imaging of human breast cancer: a preliminary study. *J Magn Reson Imaging*. 19: 68-75 (2004).

Jain, M., Nilsson, R., Sharma, S., Madhusudhan, N., Kitami, T., Souza, A.L., Kafri, R., Kirschner, M.W., Clish, C.B., Mootha, V.K. Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. *Science*. 336: 1040-1044 (2012).

Jobard E, Pontoizeau C, Blaise BJ, Bachelot T, Elena-Hermann B, Tredan O. A serum Nuclear Magnetic Resonance- based Metabolomic signature of advanced metastatic human breast cancer. *Cancer letters*. 343: 33-41 (2014).

Johnston SR, Kilburn LS, Ellis P, Dodwell D, Cameron D, Hayward L, et al. Fulvestrant plus anastrozole or placebo versus exemestane alone after progression on non-steroidal aromatase inhibitors in post-

menopausal patients with hormone-receptor-positive locally advanced or metastatic breast cancer (SoFEA): a composite, multicentre, phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol* 14: 989–998 (2013).

Jové M, Maté I, Naudí A, Mota-Martorell N, Portero-Otín M, De la Fuente M, Pamplona R. Human Aging Is a Metabolome-related Matter of Gender. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 71: 578-585 (2015).

Jové M, Mauri-Capdevila G, Suárez I, Cambray S, Sanahuja J, Quilez A, et al. Metabolomics predicts stroke recurrence after transient ischemic attack. *Neurology*. 84: 36-45 (2015).

Jung SY, Jeong J, Shin SH, Kwon Y, Kim EA, Ko KL, et al. The invasive lobular carcinoma as a prototype luminal A breast cancer: a retrospective cohort study. *BMC Cancer*. 10: 664 (2010).

Jung SY, Jeong J, Shin SH, Kwon Y, Kim EA, Ko KL, et al. Accumulation of p53 determined by immunohistochemistry as a prognostic marker in node negative breast cancer; analysis according to st gallen consensus and intrinsic subtypes. *J Surg Oncol*. 103:207-11 (2011).

## K

Kaderbhai NN, Broadhurst DI, Ellis DI, Goodacre R, Kell DB. Functional genomics via metabolic footprinting: monitoring metabolite secretion by *Escherichia coli* tryptophan metabolism mutants using FT-IR and direct injection electrospray mass spectrometry. *Compar Funct Genom*: 4: 376-391 (2003).

Kanehisa M. A database for post-genome analysis. *Trends Genet*.13: 375-6 (1997).

Kanaan YM, Sampey BP, Beyene D, ESNakula AK, Naab TJ, Ricks-Santi LJ, Dasi S, Day A, Blackman KW, Frederick W, Copeland RL Sr, Gabrielson E, Dewitty RL Jr. Metabolic profile of triple-negative breast cancer in African-American women reveals potential biomarkers of aggressive disease. *Cancer Genomics Proteomics*. 11: 279-94 (2014).

Katz-Brull R, Seger D, Rivenson-Segal D, Rushkin E, Degani H. Metabolic markers of breast cancer: enhanced choline metabolism and reduced choline-ether-phospholipid synthesis. *Cancer Res*. 62: 1966-70 (2002).

Kaufman B, Mackey JR, Clemens MR, Bapsy PP, Vaid A, Wardley A, et al. Trastuzumab plus anastrozole versus anastrozole alone for the treatment of postmenopausal women with human epidermal growth factor receptor 2-positive, hormone receptor-positive metastatic breast cancer: results from the randomized phase III TANDEM study. *J Clin Oncol*. 27: 5529-37 (2009).

Kaufman M, Von Minckwitz G, Rody A. Preoperative (neoadjuvant) systemic treatment of breast cancer. *Breast*. 14: 576-581 (2005).

Kaufman PA, Awada A, Twelves C, Yelle L, Perez EA, Wanders J, et al. A Phase III, open-label, randomized, multicenter study of eribulin mesylate versus capecitabine in patients with locally advanced or metastatic breast cancer previously treated with anthracyclines and taxanes. *Cancer Res*. 33: 594-601 (2012).

Kennedy KM, Scarbrough PM, Ribeiro A, Richardson R, Yuan H, Sonveaux P, Landon CD, Chi JT, Pizzo S, Schroeder T, Dewhirst MW. Catabolism of exogenous lactate reveals it as a legitimate metabolic substrate in breast cancer. *PLoS One*. 8: 1-20 (2013).

Kidd EA, Siegel BA, Dehdashti F, Griqsbay PW. The standardized uptake value for F-18 fluorodeoxyglucose is a sensitive predictive biomarker for cervical cancer treatment response and survival. *Cancer*. 110: 1738-44 (2007).

Kline EE, Treat EG, Aversa TA, Davis MS, Smith AY, Sillerud LO. Citrate concentrations in humans seminal fluids and expressed prostatic fluid determined via H nuclear magnetic resonance spectroscopy outperform prostate specific antigen in prostate cancer detection. *J Urol*. 176: 2274-9 (2006).

Krishnamurthy S, Cristofanilli M, Singh B, Reuben J, Gao H, Cohen EN, et al. Detection of minimal residual disease in blood and bone marrow in early stage breast cancer. *Cancer*. 116: 3330-7 (2010).

Kuroda H, Nakai M, Ohnisi K, Ishida T, Kuroda M, Itoyama S. Vascular invasion in triple-negative carcinoma of the breast identified by endothelial lymphatic and blood vessel markers. *Int J Surg Pathol*. 8: 324-329 (2010).

Kuukasjarvi T, Karhu R, Tanner M, Kahkonen M, Schaffer A, Nupponen N, et al. Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. *Cancer Res*. 57: 1597-604 (1997).

Kwon JH, Kim YJ, Lee KW, Oh DY, Park SY, Kim JH, et al. Triple negativity and young age as prognostic factors in lymph node-negative invasive ductal carcinoma of 1 cm or less. *BMC Cancer*. 10:557 (2010).

## L

Larsimont D, Durbecq V, Awada A, Di Leo A. [HER2 and topoisomerase II alpha: useful clinical markers in breast cancer]. *Bull Cancer*. 95: 344-51 (2008).

Lauria R, Perrone F, Carlomagno C, De Laurentiis M, Morabito A, Gallo C, et al. The prognostic value of lymphatic and blood vessel invasion in operable breast cancer. *Cancer*. 76: 1772-8 (1995).

Lee AH, Pinder SE, Macmillan RD, Mitchell M, Ellis IO, Elston CW, et al. Prognostic value of lympho-vascular invasion in women with lymph node negative invasive breast carcinoma. *Eur J Cancer*. 42: 357-62 (2006).

Li CI, Malone KE, Saltzman BS, Daling JR. Risk of invasive breast carcinoma among women diagnosed with ductal carcinoma in situ and lobular carcinoma in situ, 1988-2001. *Cancer*. 106: 2104-12 (2006).

Li CI, Uribe DJ, Daling JR. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer*. 93: 1046-52 (2005).

Li M, Song Y, Cho N, Chang JM, Koo HR, Yi A, et al. An HR-MAS MR metabolomics study on breast tissues obtained with core needle biopsy. *PLoS One*. 6: 1-8 (2011).

Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. So what's the deal with metabolomics? *Anal Chem*. 75: 384-391 (2003).

Lindon, J.C., Holmes, E., Nicholson, J.K. Metabonomics and its role in drug development and disease diagnosis. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 4: 189-199 (2004).

Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E. The handbook of metabonomics and metabolomics. 1st ed. Elsevier, Amsterdam ; Boston (2007).

Lipton A, Ali SM, Leitzel K, Demers L, Chinchilli V, Engle L, et al. Elevated serum Her-2/neu level predicts decreased response to hormone therapy in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 20:1467-72 (2002).

Locasale JW, Grassian AR, Melman T, Lyssiotis CA, Mattaini KR, Bass AJ, et al. Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat Genet.* 43: 869-74 (2011).

Longnecker MP. Alcoholic beverage consumption in relation to risk of breast cancer: meta-analysis and review. *Cancer Causes Control.* 5:73-82 (1994).

Lonning PE, Knappskog S, Staalesen V, Chrisanthar R, Lillehaug JR. Breast cancer prognostication and prediction in the postgenomic era. *Ann Oncol.* 18:1293-306 (2007).

## **M**

Ma H, Wang Y, Sullivan-Halley J, Weiss L, Marchbanks PA, Spirtas R, et al. Use of four biomarkers to evaluate the risk of breast cancer subtypes in the women's contraceptive and reproductive experiences study. *Cancer Res.* 70: 575-87 (2010).

Ma XJ, Wang Z, Ryan PD, Isakoff SJ, Barmettler A, Fuller A, et al. A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell.* 5:607-16 (2004).

Mackinnon WB, Barry PA, Malycha PL, Guillet DJ, Russell P, Lean CL, et al. Fine-needle biopsy specimens of benign breast lesions distinguished from invasive cancer ex vivo with proton MR spectroscopy. *Radiology.* 204: 661-6 (1997).

Madsen R, Lundstedt T & Trygg J. Chemometrics in metabolomics--a review in human disease diagnosis. *Anal. Chim. Acta* 659: 23-33 (2010).

Mangia A, Malfettone A, Simone G, Darvishian F. Old and new concepts in histopathological characterization of familial breast cancer. *Ann Oncol.* 1: 24-30 (2011).

Marginean F, Rakha EA, Ho BC, Ellis IO, Lee AH. Histological features of medullary carcinoma and prognosis in triple-negative basal-like carcinomas of the breast. *Mod Pathol.* 23:1357-63 (2010).

Masood S, Bui MM. Prognostic and predictive value of HER2/neu oncogene in breast cancer. *Microsc Res Tech.* 59: 102-8 (2002).

Mcgale P, Taylor C, Correa C, Cutter D, Duane F, Ewertz M, Gray R, Mannu G, Peto R, Whelan T, Wang Y, Wang Z, Darby S. Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials. *Lancet.* 383: 2127-2135 (2014)

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal AP, Futreal PA, Harshman K, Tautigian S, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science.* 266:66-71 (1994).

Miller AB, Wall C, Baines CJ, Sun P, To T, Narod SA. Twenty five year follow-up for breast cancer incidence and mortality of the Canadian National Breast Screening Study: randomised screening trial. *BMJ.* 348: 366 (2014).

Miller LD, Smeds J, George J, Vega VB, Vergara L, Ploner A, et al. An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 13550-5 (2005).

Millikan RC, Newman B, Tse CK, Moorman PG, Conway K, Dressler LG, et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 109: 123-39 (2008).

Mimmi MC, Finato N, Pizzolato G, Beltrami CA, Fogolari F, Corazza A. Absolute quantification of choline-related biomarkers in breast cancer biopsies by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Cell Pathol (Amst).* 36:71-83 (2013).

Mishra P, Ambs S. Metabolic Signatures of Human Breast Cancer. *Mol Cell Oncol.* 2: 1-10 (2015).

Morris M, Watkins SM. Focused metabolomic profiling in the drug development process: advances from lipid profiling. *Curr Opin Chem Biol.* 9: 407-412 (2005).

Morrow M, Schnitt SJ, Norton L. Current management of lesions associated with an increased risk of breast cancer. Current management of lesions associated with an increased risk of breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 12: 227-238 (2015).

Morvan D, Demiden A. Metabolomics by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of the response to chloroethylnitrosurea reveals drug efficacy and tumor adaptative metabolic pathways. *67: 2150-2159* (2007).

Moskowitz CS, Chou JF, Wolden SL, Bernstein JL, Malhotra J, Novetsky Friedman D, et al. Breast cancer after chest radiation therapy for childhood cancer. *J Clin Oncol.* 32: 2217-2223 (2014).

Moss SM, Cuckle H, Evans A, Johns L, Waller M, Bobrow L. Effect of mammographic screening from age 40 years on breast cancer mortality at 10 years' follow-up: a randomised controlled trial. *Lancet*. 368: 2053-60 (2006).

Mountford CE, Somorjai RL, Malycha P, Gluch L, Lean C, Russell P, et al. Diagnosis and prognosis of breast cancer by magnetic resonance spectroscopy of fine needle aspirates analysed using a statistical classification strategy. *Br J Surg* 88:1234-40 (2001).

Muruanandham M, Alfieri AA, Matei C, Chen Y, Sukenick G, Schemainda I, et al. Metabolic signatures associated with a NAD synthesis inhibitor-induced tumor apoptosis identified by H-decoupled-31P magnetic resonance spectroscopy. *Clin Cancer Res*. 11: 3503-13 (2005).

## **N**

Nagrath D, Caneba C, Karedath T, Bellance N. Metabolomics for mitochondrial and cancer studies. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1807: 650-653 (2011).

Neckers L. Heat Shock Protein 90: the cancer chaperone. *J Biosci*. 32: 517-30 (2007).

Nelson HD, Tyne K, Naik A, Bougatsos C, Chan BK, Humphrey L. Screening for breast cancer: an update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 151:727-37 (2009).

Ng AK, Travis LB. Radiation therapy and breast cancer risk. *J Natl Compr Canc Netw*.7:1121-8 (2009).

Nicholson JK, Lindon JC, Holmes. Metabonomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopy data. *Xenobiotica*. 29: 1181-1189 (1999).

Nicholson JK, Wilson ID. High-resolution proton magnetic resonance spectroscopy of biological fluids. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*: 21: 449-501 (1989).

Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*.10: 5367-74 (2004).

## **O**

Oakman C, Tenori L, Biganzoli L, Santarpia L, Cappadona S, Luchinat C, et al. Uncovering the metabolic fingerprint of breast cancer. *Int. J. Biochem. Cell. Biol*. 43: 1010-1020 (2011).



Oakman C, Tenori L, Claudino WM, Cappadona S, Nepi S, Battaglia A, et al. Identification of a serum-detectable metabolomic fingerprint potentially correlated with the presence of micrometastatic disease in early breast cancer patients at varying risks of disease relapse by traditional prognostic methods. *Annals of Oncology*. 22: 1295-130 (2011).

Olier-Gárate C, Jara-Sánchez C, Romero-La Orden N, Moreno C, Nogales M. Epidemiología y Factores Pronósticos del Cáncer de Mama. *Rev Cancer*. 23: 1-9 (2009).

Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol*. 16: 373-378 (1998).

Osborne CK, Shou J, Massarweh S, Schiff R. Crosstalk between estrogen receptor and growth factor receptor pathways as a cause for endocrine therapy resistance in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 11:865-870 (2005).

## **P**

Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 351:2817-26 (2004).

Paik S, Tang G, Fumagalli D. An ideal prognostic test for estrogen receptor-positive breast cancer? *J Clin Oncol*. 26: 4058-9 (2008).

Parise CA, Bauer KR, Brown MM, Caggiano V. Breast cancer subtypes as defined by the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) among women with invasive breast cancer in California, 1999-2004. *Breast J*. 15: 593-602 (2009).

Pasikanti KK, Esuvaranathan K, Ho PC, Mahendran R, Kamaraj R, et al. Noninvasive urinary metabolomic diagnosis of human bladder cancer. *J Proteome Res*. 9:2988-95 (2010).

Pauling L, Robinson AB, Teranishi R, Cary P. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68: 2374-237 (1971).

Pepels MJ, Vestjens JH, de Boer M, Smidt M, van Diest PJ, Borm GF, et al. Safety of avoiding routine use of axillary dissection in early stage breast cancer: a systematic review. *Breast Cancer Res Treat*. 125: 301-13 (2011).

Pérez E. Combining adjuvant chemotherapy with biologicals. *St. Gallen 2007*. *Breast* 16(Suppl 1) S: 10 Abstract S34 (2007).

Perez EA, Romond EH, Suman VJ, Jeong JH, Sledge G, Geyer CE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: planned joint analysis of overall survival from NSABP B-31 and NCCTG N9831. *J Clin Oncol*. 32: 3744-3752 (2014).

- Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist*. 1: 61-70 (2011).
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 406: 747-52 (2000).
- Pettersson A, Hankinson SE, Willett WC, Lagiou P, Trichopoulos D, Tamimi RM. Nondense mammographic area and risk of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 13: 2-10 (2011).
- Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt Ba, Levine RJ, Fusaro VA, Steinberg SM, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet*. 359: 572-7 (2002).
- Piccart M, Hortobagyi GN, Campone M, Pritchard KI, Lebrun F, Ito Y, et al. Everolimus plus exemestane for hormone receptor-positive (HR+), human epidermal growth factor receptor-2- negative (HER2-) advanced breast cancer (BC): overall survival results from BOLERO-2. *Eur J Cancer*. 25: 2357-2362 (2014).
- Piccart-Gebhart MJ, Burzykowski T, Buyse M, Sledge G, Carmichael J, Luck HJ, et al. Taxanes alone or in combination with anthracyclines as first-line therapy of patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 26: 1980-1986 (2008).
- Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 353: 1659-72 (2005).
- Pinero A, Gimenez J, Merck B, Vazquez C. Consensus meeting on sentinel lymph node biopsy in breast cancer. *Spanish society of mastology and breast disease. Cir Esp*. 82: 146-9 (2007).
- Pio BS, Park CK, Pietras R, Hsueh WA, Satyamurthy N, Pegram MD, et al. Usefulness of 3'-(F-18) fluoro-3'-deoxythymidine with positron emission tomography in predicting breast cancer response to therapy. *Mol Imaging Biol*. 8: 36-42 (2006).
- Pivot X, Romieu G, Debled M, Pierga JY, Kerbrat P, Bachelot T, et al. 6 months versus 12 months of adjuvant trastuzumab for patients with HER2-positive early breast cancer (PHARE): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 14: 741-748.(2013).
- Pollan M. Epidemiology of breast cancer in young women. *Breast Cancer Res Treat*. 1:3-6 (2010).
- Pucar D, Koutcher JA, Shah A, Dyke JP, Schwartz L, Thaler H, et al. Preliminary assessment of magnetic resonance spectroscopic imaging in predicting treatment outcome in patients with prostate cancer at high risk for relapse. *Clin Prostate Cancer*. 3 :174-81 (2004).

## Q

Qiu Y, Cai G, Su M, Chen T, Liu Y, Xu Y, et al. Urinary metabonomic study on colorectal cancer. *J Proteome Res.* 9:1627-34 (2010).

Qiu Y, Zhou B, Su M, Baxter S, Zheng X, Zhao X, et al. Mass spectrometry-based quantitative metabolomics revealed a distinct lipid profile in breast cancer patients. *Int J Mol Sci.* 14: 8047-8061 (2013).

## R

Rakha EA, Gill MS, El-Sayed ME, Khan MM, Hodi Z, Blamey RW, et al. The biological and clinical characteristics of breast carcinoma with mixed ductal and lobular morphology. *Breast Cancer Res Treat.* 114: 243-50 (2009).

Rastelli F, Crispino S. Factors predictive of response to hormone therapy in breast cancer. *Tumori.* 94: 370-83 (2008).

Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N, Berg CD, Chlebowski RT, Feuer EJ, et al. The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. *N Engl J Med.* 356: 1670-4 (2007).

Robidoux A, Tang G, Rastogi P, Geyer CE, Azar CA, Atkins JN, et al. Evaluation of lapatinib as a component of neoadjuvant therapy for HER2+ operable breast cancer: NSABP protocol B-41. *Journal of Clinical Oncology.* 30: abstract LBA506 (2012).

Rodrigues N, Carter D, Dillon D, Parisot N, Choi DH, Haffty BG. Correlation of clinical and pathologic features with outcome in patients with ductal carcinoma in situ of the breast treated with breast-conserving surgery and radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 54:1331-1335 (2002).

Rojo A, García JF, González Cortijo L, Hornedo J, González A, Ortega G, et al. Factores pronósticos y predictivos. En: Díaz-Rubio E, Martín Jiménez MM, editores. *Tratado de cáncer de mama.* 1ª edición. Madrid: YOU AND US.p. 13-24 (2008).

Rosai J, *Surgical Pathology.* In Rosai J. 9ª ed. Philadelphia: Mosby. (2004).

Rosenberg L, Boggs DA, Wise LA, Adams-Campbell LL, Palmer JR. Oral contraceptive use and estrogen/progesterone receptor-negative breast cancer among African American women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 19: 2073-9 (2010).

Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Puzstai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist.* 14:320-68 (2009).

Ryan D, Robards K. Metabolomics: The greatest omics of them all? *Anal Chem.* 78: 7954-8 (2006).

## S

Sana TR, Waddell K, Fischer SM. A sample extraction and chromatographic strategy for increasing LC/MS detection coverage of the erythrocyte metabolome. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008;871: 314-321 (2008).

Schnitt SJ, Moran MS, Houssami N, Morrow M. The Society of Surgical Oncology-American Society for Radiation Oncology Consensus Guideline on margins for breast-conserving surgery with whole-breast irradiation in stages I and II invasive breast cancer: perspectives for pathologists. *Arch Pathol Lab Med.* 139: 575-577.(2015).

Schmitt CA, Lowe SW. Apoptosis and therapy. *J Pathol.* 187: 127-37 (1999).

Schneeweiss A, Chia S, Hickish T, Harvey V, Eniv A, Hegg R, et al. Neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab concurrent or sequential with an anthracycline-containing or concurrent with an anthracycline- Free standard regimen: A Randomized Phase II Study (TRYPHAENA). *Cancer Research.* 71: abstract S5-6 (2011).

Schwartz GF, Veronesi U, Clough KB, Dixon JM, Fentiman IS, Heywang-Köbrunner SH, Holland R, Hughes KS, Margolese R, Olivotto IA, Palazzo JP, Solin LJ. Proceedings of the consensus conference on breast conservation. *Cancer.* 107:242-250 (2006).

Seidman JD, Schnaper LA, Aisner SC. Relationship of the size of the invasive component of the primary breast carcinoma to axillary lymph node metastasis. *Cancer.* 75: 65-71 (1995).

Serkova N, Boros LG. Detection of resistance to imatinib by metabolic profiling: clinical and drug development implications. *Am J Pharmacogenomics.* 5: 293-392 (2005).

Serkova NJ, Niemann CU. Pattern recognition and biomarker validation using quantitative H-NMR-based metabolomics. *Expert Rev Mol Diagn.* 6: 717-31 (2006).

Shah S, Chen B. Testing for HER2 in Breast Cancer: A Continuing Evolution. *Patholog Res Int.* 2011: 1-16 (2011).

Shaw PG, Chaerkady R, Wang T, Vasilatos S, Huang Y, Van Houten B, et al.. Integrated proteomic and metabolic analysis of breast cancer progression. *PLoS One.* 8: 1-12 (2013).

Shen J, Yan L, Liu S, Ambrosone CB, Zhao H. Plasma metabolomic profiles in breast cancer patients and healthy controls: By race and tumor receptor subtypes. *Translational Oncology.* 6: 757-765 (2013).

Simpson NE, Tryndyak VP, Beland FA, Pogribny IP. An in vitro investigation of metabolically sensitive biomarkers in breast cancer progression. *Breast Cancer Res Treat.* 133: 959-68 (2012).

Silverstein MJ, Lagios MD, Craig PH, Waisman JR, Lewinsky BS, Colburn WJ, et al. A prognostic index for ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer*. 77: 2267-74 (1996).

Singer S, Souza K, Thilly WG. Pyruvate utilization, phosphocholine and adenosine triphosphate (ATP) are markers of human breast tumor progression: a <sup>31</sup>P- and <sup>13</sup>C-nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy study. *Cancer Res*. 55: 5140-5145 (1995).

Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KL, et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol*. 20:3628-36 (2002).

Sinha PS, Bendall S, Bates T. Does routine grading of invasive lobular cancer of the breast have the same prognostic significance as for ductal cancers? *Eur J Surg Oncol*. 26: 733-7 (2000).

Sitter B, Bathen TF, Singstad HE, Fjosne HE, Lundgren S, Halgunset J, et al. Quantification of metabolites in breast cancer patients with different clinical prognosis using HR MAS MR spectroscopy. *NMR Biomed*. 23; 424-431 (2010).

Sitter, B., Lundgren, S., Bathen, T.F., Halgunset, J., Fjosne, H.E., Gribbestad, I.S. Comparison of HR MAS MR spectroscopic profiles of breast cancer tissue with clinical parameters. *NMR Biomed*. 19: 30-40 (2006).

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 235:177-82 (1987).

Slupsky CM, Steed H, Wells TH, Dabbs K, Schepansky A, Capstick V, et al. Urine metabolite analysis offers potential early diagnosis of ovarian and breast cancers. *Clin. Cancer Res*. 16: 5835-5841 (2010).

Smith IC, Heys SD, Hutcheon AW, Miller ID, Payne S, Gilbert FJ, et al. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: significantly enhanced response with docetaxel. *J Clin Oncol*; 20: 156-1460 (2002).

Smith IE, Dowsett M, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, Blohmer JU, et al. Neoadjuvant treatment of postmenopausal breast cancer with anastrozole, tamoxifen or both in combination: The Immediate Preoperative Anastrozole, Tamoxifen or combined with Tamoxifen (IMPACT) multicenter double-blind randomized trial. *J Clin Oncol*; 23: 5108-5116 (2005).

Smith CA, O'Maille G, Want EJ, Qin C, Trauger SA, Brandon TR, et al. METLIN: a metabolite mass spectral database. *Ther Drug Monit*. 27: 747-51 (2005).

Soga T, Ohashi Y, Ueno Y, Naraoka H, Tomita M, Nishioka T. Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *J Proteome Res*: 2: 488-494 (2003).

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98: 10869-74 (2000).

Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med.* 360:790-800 (2009).

Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J, et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst.* 98: 262-72 (2006).

Sterin M, Cohen JS, Mardor Y, Berman E, Ringel I. Levels of phospholipid metabolites in breast cancer cells treated with antimetabolic drugs A31P\_magnetic resonante spectroscopy study. *Cancer Res.* 61:7536-43 (2001).

Stipanuk MH, Ueki I. Dealing with methionine/homocysteine sulfur: cysteine metabolism to taurine and inorganic sulfur. *Inherit. Metab. Dis.* 34: 17-32 (2011).

Stotter, A.T.; McNeese, M.D.; Ames, F.C.; Oswald, M.J.; Ellerbroek, N.A. Predicting the rate and extent of locoregional failure after breast conservation therapy for early breast cancer. *Cancer.* 64: 2217-2225(1989).

Sud M, Fahy E, Cotter D, Brown A, Dennis EA, Glass CK, et al. LMSD: LIPID MAPS structure database. *Nucleic Acids Res.* 35: 527-53 (2007).

Sugimoto M, Wong DT, Hirayama A, Soga T, Tomita M. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast cancer and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics.* 6: 78-95 (2010)

Suzuki R, Iwasaki M, Inoue M, Sasazuki S, Sawada N, Yamaji T, et al. Alcohol consumption-associated breast cancer incidence and potential effect modifiers: the Japan Public Health Center-based Prospective Study. *Int J Cancer.* 127:685-95 (2010).

Swain SM, Kim SB, Cortes I, Ro I, Semiglazov V, Campone M, et al. Confirmatory overall survival (OS) analysis of CLEOPATRA: a randomized, double-blind, placebo controlled Phase III study with pertuzumab (P), trastuzumab (T), and docetaxel (D) in patients (pts) with HER2-positive firstline (1L) metastatic breast cancer (MBC). *Lancet Oncol.* 14: 461-471(2013).

Swanson MG, Zektzer AS, Tabatabai ZL, Simko J, Jarso S, Keshari KR, et al. Quantitative analysis of prostate metabolites using H HR-MAS spectroscopy. *Magn Reson Med.* 55: 1257-64 (2006).

## T

Tai P, Yu E, Shiels R, Pacella J, Jones K, Sadikov E, et al. Short and long term cause specific survival of patients with inflammatory breast cancer. *BMC Cancer.* 5: 137 (2005).

Tang X, Lin CC, Spasojevic I, Iversen ES, Chij T, Marks TR. A joint analysis of metabolomics and genetics of breast cancer. *Breast Cancer Research.* 16: 415 (2014).

Tenori L, Oakman C, Claudino WM, Bernini P, Cappadona S, Nepi S, et al. Exploration of serum metabolomic profiles and outcomes in women with metastatic breast cancer: a pilot study. *Molecular oncology*. 6: 1-8 (2012).

Tenori L, Oakman C, Morris PG, Gralka E, Turner N, Cappadona S, et al. Serum metabolomic profiles evaluated after surgery may identify patients with oestrogen receptor negative early breast cancer at increased risk of disease recurrence. Results from a retrospective study. *Mol Oncol*. 9:128-39 (2015).

Thiebaut AC, Kipnis V, Chang SC, Subar AF, Thompson FE, Rosenberg PS, et al. Dietary fat and post-menopausal invasive breast cancer in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study cohort. *J Natl Cancer Inst*. 99: 451-62 (2007).

Toi M, Nakamura S, Kuroi K, IwATA h, Ohno S, Masuda N, et al. Phase II study of preoperative sequential FEC and docetaxel predicts of pathological response and disease free survival. *Breast Cancer Res Treta*. 110: 531-539 (2008).

Trygg J, Lundstedt T. Chemometrics Techniques for Metabonomics. In: Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, eds. *The Handbook of Metabonomics and Metabolomics*. Elsevier (2007).

Turner LB. A meta-analysis of fat intake, reproduction, and breast cancer risk: An evolutionary perspective. *Am J Hum Biol*. 23: 601-8 (2011).

Tutt A, Robson M, Garber JE, Domchek SM, Audeh MW, Weitzel JN, et al. Oral poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet*. 376: 235-44 (2010).

## U

Untch M, Rezai M, Loibl S, Pasching PA, Huober J, Tesch H, et al. Neoadjuvant treatment with trastuzumab in HER2-positive breast cancer: results from the GeparQuattro Study. *Journal of Clinical Oncology*. 28: 2024–2031 (2010).

Untch M, Loibl S, Bischoff J, Eidtmann H, Kaufmann M, Blohmer JU, et al. “Lapatinib versus trastuzumab in combination with neoadjuvant anthracyclinetaxane- based chemotherapy (GeparQuinto, GBG 44): a randomised phase 3 trial,” *The Lancet Oncology*. 13: 135–144 (2012).

U.S. Preventive Services Task Force. Screening for breast cancer: Recommendations and rationale. *Ann. Intern. Med*. 137, 344–346(2002).

## V

Van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, et al. A gene expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 347:1999-2009 (2002).

Veneables W, Ripley B, Hornik K, Gebhdart A. *Bundle of MASS class, nnet, spatial*. 7. 2-42 ed (2008).

Vermeersch KA, Styczynski MP, et al. (2013). Applications of metabolomics in cancer research. *Journal of carcinogenesis*. 12: 9 (2013).

Veronesi U, Zurrída S, Viale G, Galimberti V, Arnone P, Nole F. Rethinking TNM: a breast cancer classification to guide to treatment and facilitate research. *Breast J*. 15: 291-5 (2009).

Veronesi U, Viale G, Paganelli G, Zurrída S, Luini A, Galimberti V, et al. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: ten-year results of a randomized controlled study. *Ann Surg*. 251: 595-600 (2010).

Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol*. 28: 1684-91 (2010).

Von Minckwitz G, Blohmer JU, Raab G, Lohr A, Gerber B, Heinrich G, et al. In vivo chemosensitivity adapted preoperative chemotherapy in patients with early stage breast cancer. The Gepartrio pilot study. *Annals of Oncology*: 16: 56-63 (2005).

Von Minckwitz G, Eidtmann H, Rezai M, Fasching PA, Tesch H, Eggemann H, et al. Neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab for HER2-negative breast cancer. *The New England Journal of Medicine*. 366: 299-309 (2012).

Von Minckwitz G, Kummel S, Vogel P, Hanusch C, Eidtmann H, Hilfrich J, et al. Neoadjuvant vinorelbine-capecitabine versus docetaxel-doxorubicin-cyclophosphamide in early nonresponsive breast cancer: a phase III randomized GeparTrio trial. *J Natl Cancer Inst*. 100: 542-521 (2008).

## W

Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, Sieuwerts AM, Look MP, Yang F, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet*. 365:671-9 (2005).

Warburg O, Posener K, Negelein E. On the metabolism of cancer cells. *Biochem Z*; 152: 309-44 (1924).

Warner, E. Breast-Cancer Screening. *N. Engl. J. Med*. 365: 1025-1032 (2011).

Watson JT, Sparkman OD. Introduction to mass spectrometry :instrumentation, applications and strategies for data interpretation. 4th ed. John Wiley & Sons, Chichester,England ; Hoboken, NJ, (2007)

Wei J, Xie G, Zhou Z, Shi P, Qiu Y, Zheng X, et al. Salivary metabolite signatures of oral cancer and leukoplakia. *Int J Cancer*. 129: 2207-17(2011).

Wei S, Liu L, Zhan J, Bowers J, Gowda GA, Seeger H, et al. Metabolomics approach for predicting response to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Molecular Oncology*. 7: 1-11 (2012).

Wen T, Gao L, Wen Z, Wu C, Tan CS, ToH WZ, et al. Exploratory investigation of plasma metabolomics in human lung adenocarcinoma. *Mol Biosyst*. 9: 2370-2378 (2013).

Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist H, et al. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *J Clin Oncol*. 21:3469-78 (2003).



Wildiers H, Kim SB, Gonzalez-Martin A et al. T-DM1 for HER2-positive metastatic breast cancer (MBC): primary results from TH3RESA, a phase 3 study of T-DM1 vs treatment of physician's choice. ESMO. abstr LBA15 (2013).

Wilson AR, Marotti L, Bianchi S, Biganzoli L, Claassen S, Decker T, et al. The requirements of a specialist Breast Centre. *Eur J Cancer*. 49: 3579–3587 (2013).

Wilson ID. Chromatographic and Electrophoretic Separations Combined with Mass Spectrometry for Metabonomics. In: Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, eds. *The handbook of metabonomics and metabolomics*. 1st ed. Elsevier, Amsterdam; Boston. 149-170 (2007).

Wilson ID, Nicholson JK, Castro-Perez J, Granger JH, Johnson KA, Smith BW. High resolution “Ultra performance” liquid chromatography coupled to oa-TOF mass spectrometry as a tool for differential metabolic pathway profiling in functional genomic studies. *J Proteome Res*. 4: 591-598 (2005).

Wishart DS. Proteomics and the human metabolome project. *Expert Rev Proteomics*. 4: 333-335 (2007).

Wishart DS. Applications of metabolomics in drug discovery and development. *Drugs RD*. 9: 307-322 (2007).

Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y, et al. HMDB 3.0-The Human metabolome database in 2013. *Nucleic Acids Res*. 41: 801-807 (2013).

Wo JY, Chen K, Neville BA, Lin NU, Punglia RS. Effect of very small tumor size on cancer-specific mortality in node-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 29: 2619-27 (2011).

Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 265:2088-2090 (1994).

[www.uniprot.org/uniprot/P35790](http://www.uniprot.org/uniprot/P35790)

## X

Xia J, Mandal R, Sinelnikov I V, Broadhurst D, Wishart DS. MetaboAnalyst 2.0--a comprehensive server for metabolomic data analysis. *Nucleic Acids Res*. 40: 127-133 (2012).

Xenidis N, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Stathopoulou A, Malamos N, et al. Peripheral blood circulating cytokeratin-19 mRNA-positive cells after the completion of adjuvant chemotherapy in patients with operable breast cancer. *Ann Oncol*; 14: 849-55 (2003).

## Y

Yaffe M, Hendrix S, Pike M, Santen R, Eden J, Genazzani AR. Is mammographic density, as currently measured, a robust surrogate for breast cancer?. *Gynecological Endocrinology*. 21:17-21 (2005).

Yang J, Xu GW, Zheng YF, Kong HW, Pang T, Lv S, et al. Diagnosis of liver cancer using HPLC-based metabonomics avoiding false-positive result from hepatitis and hepatocirrhosis diseases. *J Chromatogr B*: 813: 59-65 (2004).

Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol*. 11:174-83 (2010).

## Z

Zhang J, Bowers J, Liu L, Wei S, Gowda GA, Hammoud Z, et al. Esophageal cancer metabolite biomarkers detected by LC-MS and NMR methods. *PLoS One*. 7:1-10 (2012).





## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### INTRODUCCIÓN

#### TABLAS

Tabla 1. Principales factores de riesgo asociados al desarrollo de un carcinoma de mama

Tabla 2. Factores pronósticos y predictivos en cáncer de mama

Tabla 3. Conceptos aplicados en metabolómica

Tabla 4. Conceptos aplicados en análisis metabolómico

Tabla 5. Principales bases de datos para la identificación de metabolitos

Tabla 6. Ventajas e inconvenientes de la MS para su uso en metabolómica

Tabla 7. Distinción entre tejidos benignos y malignos mediante el estudio metabolómico

Tabla 8. Determinación de factores pronósticos y predictivos mediante el estudio metabolómico

#### FIGURAS

Figura 1. Ciencias “-ómicas”

Figura 2. Diagrama del análisis metabolómico

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### TABLAS

Tabla 9. Variables Clínicas

Tabla 10. Variables histopatológicas

Tabla 11. Códigos metabolómicos

#### FIGURAS

Figura 3. Esquema del diseño experimental del estudio

Figura 4. Sistema ESI-Q-TOF-MS/MS

Figura 5. Metabolómica no dirigida e identificación de metabolitos

## RESULTADOS

### TABLAS

Tabla 12. Características clínico-patológicas de las pacientes

Tabla 13. Datos de validación cruzada de PLS-DA (utilizando aquellas moléculas presentes en, al menos, el 50% de las muestras del mismo grupo.

Tabla 14. Metabolitos con potencial identidad

Tabla 15. Vías metabólicas moduladas en cáncer de mama

Tabla 16. Datos de validación cruzada en PLS-DA (utilizando las moléculas que presentan una diferencia significativamente estadística ( $p < 0,05$ ) y con potencial identidad).

Tabla 17. Análisis mediante Curvas ROC de los metabolitos estadísticamente significativos asociados al cáncer de mama

### FIGURAS

Figura 6. Análisis de los componentes principales

Figura 7. Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales

Figura 8. El análisis de componentes principales según IMC.

Figura 9. Análisis ANOVA por categorías de IMC

Figura 10. Clasificación según Análisis de "Random Forest"

Figura 11. Metabolitos principales según el análisis de Random Forest

Figura 12. Análisis de clusterización jerárquico

Figura 13. Análisis de componentes principales realizado con los metabolitos significativamente estadístico con potencial

Figura 14. Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales con los metabolitos significativamente estadísticos con potencial identidad

Figura 15. Test de permutación

Figura 16. Clasificación de "Random Forest"

Figura 17. Curva ROC del Ácido Caproico

Figura 18. Curva ROC de la Estearamida

Figura 19. Curva ROC de la Taurina

Figura 20. Curva ROC del Ácido Linoleico







## CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE POR ESCRITO

Yo, \_\_\_\_\_  
(Nombre del paciente)

He leído la información que se me ha entregado.  
He recibido la hoja de información que se me ha entregado.  
He podido hacer preguntas sobre el estudio.  
He recibido suficiente información sobre el estudio.  
He hablado del estudio con:

\_\_\_\_\_  
(Nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria  
Comprendo que puedo retirarme del estudio:  
1º Cuando quiera  
2º Sin tener que dar explicaciones  
3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Por la presente, otorgo mi consentimiento informado y libre para participar en esta investigación y doy mi consentimiento expreso y revocable al acceso de mis datos personales según consta en el apartado de confidencialidad de datos de la hoja de información al paciente.

(Firma del paciente)

(Fecha)

He comentado este estudio de investigación clínica con el paciente en un lenguaje comprensible e idóneo. Considero que he informado completamente al participante de la naturaleza del estudio y de los posibles beneficios y riesgos derivados del mismo, y creo que el participante ha comprendido esta explicación. He entregado una copia de este documento fechada y firmada al paciente.

(Firma del investigador)

(Fecha)

## **CONSENTIMIENTO INFORMADO ORAL ANTE TESTIGOS**

Yo, \_\_\_\_\_

(Nombre del testigo)

Declaro bajo mi responsabilidad que:

\_\_\_\_\_  
(Nombre de paciente)

Ha recibido la hoja de información del estudio.

Ha podido hacer preguntas sobre el estudio.

Ha recibido suficiente información sobre el estudio.

Ha hablado del estudio con:

\_\_\_\_\_  
(Nombre del investigador)

Comprende que su participación es voluntaria

Comprende que puede retirarse del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones

3º Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos

Y ha expresado libremente su conformidad expresa y revocable para participar en el estudio y para el acceso a sus datos personales según consta en el apartado de confidencialidad de datos de la hoja de información al paciente.

(Firma del testigo)

(Fecha)

He comentado este estudio de investigación clínica con el paciente y el testigo en un lenguaje comprensible e idóneo. Considero que he informado completamente al participante y el testigo de la naturaleza del estudio y de los posibles beneficios y riesgos derivados del mismo, y creo que el participante y el testigo han comprendido esta explicación. He entregado una copia de este documento fechada y firmada al paciente.

(Firma del investigador)

(Fecha)

**CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO DEL REPRESENTANTE**

*(Sólo en caso de pacientes incapaces)*

Yo, \_\_\_\_\_  
(Nombre del representante)

En calidad de \_\_\_\_\_  
(Relación con el paciente)

De \_\_\_\_\_  
(Nombre del paciente)

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

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado del estudio con

\_\_\_\_\_  
(Nombre del investigador)

Comprendo que la participación es voluntaria.

Comprendo que pueda retirarse del estudio.

- 1.º Cuando quiera.
- 2.º Sin tener que dar explicaciones.
- 3.º Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

En mi presencia se ha dado a \_\_\_\_\_ (nombre del paciente), toda la información pertinente adaptada a su nivel de entendimiento y está de acuerdo en participar. Y presto mi conformidad expresa y revocable con que \_\_\_\_\_ (nombre del paciente) participe en este estudio y al acceso de sus datos personales según consta en el apartado de confidencialidad de datos de la hoja de información al paciente.

(Firma del representante)

(Fecha)

He comentado este estudio de investigación clínica con el paciente y el representante en un lenguaje comprensible e idóneo. Considero que he informado completamente al participante y el representante de la naturaleza del estudio y de los posibles beneficios y riesgos derivados del mismo, y creo que el participante y el representante han comprendido esta explicación. He entregado una copia de este documento fechada y firmada al paciente y al representante.

(Firma del investigador)

(Fecha)

## **CONSENTIMIENTO INFORMADO, ESPECÍFICO PARA SUJETOS CONTROLES SIN CÁNCER DE MAMA, DIRIGIDO AL ESTUDIO DE METABOLITOS EN PLASMA**

Nombre del centro: COMPLEJO HOSPITALARIO DE JAÉN

Dirección Avda. del Ejército Español, 10. 23007 JAÉN

Nombre del paciente

Número de paciente:

Este formulario forma parte del proceso del consentimiento informado. Está diseñado para darle a usted una idea de lo que trata este estudio de investigación y de lo que le ocurrirá si usted elige participar en el estudio. Si usted quisiera conocer con profundidad algún aspecto mencionado en este impreso o tiene algunas preguntas relacionadas con este estudio de investigación, no dude en preguntarle al investigador principal. Lea detenidamente este impreso para estar seguro de que entiende toda la información contenida en el mismo. Usted se quedará con una copia. Este estudio se llevará a cabo en el Complejo Hospitalario de Jaén. El investigador principal le explicará el estudio. Su participación en el mismo es completamente voluntaria. Usted no tiene porqué tomar parte en este estudio si no lo desea y su atención médica no va a depender del hecho de que tome parte en él o no. Este estudio podría no ayudarle directamente a usted, pero esperamos que nos permita ampliar nuestros conocimientos para poder ayudar a otros sujetos en el futuro.

### **Objetivos**

El investigador principal le ha pedido su consentimiento para que participe en este estudio cuyo objetivo es identificar las diferencias metabólicas existentes entre mujeres que padecen un cáncer de mama y mujeres que no tienen dicha enfermedad. Para ello, le solicitamos que nos permita tomarle una muestra de sangre (10ml). No será necesario que se someta a pruebas adicionales por haber concedido su permiso para utilizar este material tumoral.

### **Beneficios potenciales, individuales o colectivos**

Es posible que usted no se beneficie directamente de la participación en este proyecto. Sin embargo, confiamos en que su generosa aportación sirva para mejorar el tratamiento de muchas personas que en un futuro puedan padecer cáncer de mama.

### **Posibles riesgos derivados de la participación**

En general, los riesgos son escasos, puesto que la extracción de sangre la realiza personal con mucha experiencia. En cualquier caso, estas molestias son las propias de un pinchazo, aunque en situaciones excepcionales podría llegar a aparecer un proceso infeccioso, una pequeña hemorragia o la molestia relacionada con la necesidad de realizar varios pinchazos para localizar las venas.

### **Información sobre el procedimiento**

Si usted decide participar en este proyecto, se le tomarán aproximadamente 10 ml de sangre en cada ocasión, que será almacenada en un congelador con todas las garantías de seguridad que exige la ley.

## Legislación

Igualmente, junto con la muestras de sangre, necesitaremos poder disponer de algunos datos de su historia clínica que guardaremos en una base de datos segura, que estará solamente al alcance del personal responsable de este proyecto.

Las muestras de sangre que usted nos proporcione serán codificadas, de manera que no aparecerá en los tubos ningún dato que comprometa su identidad. Este código nos permitirá relacionarle con la información que de usted hayamos guardado en nuestra base de datos.

De acuerdo con la Ley 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal, los datos personales que se le requieren (p.ej.edad, sexo, datos de salud) son los necesarios para cubrir los objetivos del estudio. En ninguno de los informes del estudio aparecerá su nombre, y su identidad no será revelada a persona alguna salvo para cumplir con los fines del estudio, y en el caso de urgencia médica o requerimiento legal. Cualquier información de carácter personal que pueda ser identificable será conservada y procesada por medios informáticos en condiciones de seguridad por Ricardo Collado Martín o la persona en quien él delegue, o por una institución designada a ella, con el propósito de determinar los resultados del estudio. El acceso a dicha información quedará restringido a Ricardo Collado Martín, o a otro personal autorizado que estará obligado a mantener la confidencialidad de la información. Los resultados del estudio podrán ser comunicados a las autoridades sanitarias y, eventualmente, a la comunidad científica a través de congresos y/o publicaciones.

Sus datos podrán ser utilizados con fines científicos. De acuerdo con la ley vigente, tiene usted derecho al acceso de sus datos personales; asimismo, y si está justificado, tiene derecho a su rectificación y cancelación. Si así lo desea, deberá solicitarlo al médico que le atiende en este estudio.

### Información adicional:

Si tiene alguna pregunta acerca de asuntos médicos relacionados con la investigación, o alguna cuestión relacionada con los procedimientos de este estudio, debe contactar con:

---

Dr. Ricardo Collado Martín  
Nombre del médico

---

953 220 306 / 953 008 516  
Número de teléfono

---

Dr. Ricardo Collado Martín  
Nombre del coordinador del estudio

---

953 220 306 / 953 008 516  
Número de teléfono

## CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL SUJETO CONTROL SIN CÁNCER DE MAMA POR ESCRITO

Yo, \_\_\_\_\_  
(Nombre del sujeto control)

He leído la información que se me ha entregado.  
He recibido la hoja de información que se me ha entregado.  
He podido hacer preguntas sobre el estudio.  
He recibido suficiente información sobre el estudio.  
He hablado del estudio con:

\_\_\_\_\_  
(Nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria  
Comprendo que puedo retirarme del estudio:  
1º Cuando quiera  
2º Sin tener que dar explicaciones  
3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Por la presente, otorgo mi consentimiento informado y libre para participar en esta investigación y doy mi consentimiento expreso y revocable al acceso de mis datos personales según consta en el apartado de confidencialidad de datos de la hoja de información al paciente.

(Firma del sujeto control)

(Fecha)

He comentado este estudio de investigación clínica con el sujeto control en un lenguaje comprensible e idóneo. Considero que he informado completamente al participante de la naturaleza del estudio y de los posibles beneficios y riesgos derivados del mismo, y creo que el participante ha comprendido esta explicación. He entregado una copia de este documento fechada y firmada al paciente.

(Firma del investigador)

(Fecha)

**CONSENTIMIENTO INFORMADO ORAL DEL SUJETO CONTROL SIN CÁNCER DE MAMA ANTE TESTIGOS**

Yo, \_\_\_\_\_

(Nombre del testigo)

Declaro bajo mi responsabilidad que:

\_\_\_\_\_  
(Nombre de sujeto control)

Ha recibido la hoja de información del estudio.

Ha podido hacer preguntas sobre el estudio.

Ha recibido suficiente información sobre el estudio.

Ha hablado del estudio con:

\_\_\_\_\_  
(Nombre del investigador)

Comprende que su participación es voluntaria

Comprende que puede retirarse del estudio:

1° Cuando quiera

2° Sin tener que dar explicaciones

3° Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos

Y ha expresado libremente su conformidad expresa y revocable para participar en el estudio y para el acceso a sus datos personales según consta en el apartado de confidencialidad de datos de la hoja de información al paciente.

(Firma del testigo)

(Fecha)

He comentado este estudio de investigación clínica con el sujeto control y el testigo en un lenguaje comprensible e idóneo. Considero que he informado completamente al participante y el testigo de la naturaleza del estudio y de los posibles beneficios y riesgos derivados del mismo, y creo que el participante y el testigo han comprendido esta explicación. He entregado una copia de este documento fechada y firmada al paciente.

(Firma del investigador)

(Fecha)

**CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO DEL REPRESENTANTE  
(Sólo en caso de sujetos controles sin cáncer de mama incapaces)**

Yo, \_\_\_\_\_  
(Nombre del representante)

En calidad de \_\_\_\_\_  
(Relación con el sujeto control)

De \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
(Nombre del sujeto control)

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

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado del estudio con

\_\_\_\_\_  
(Nombre del investigador)

Comprendo que la participación es voluntaria.

Comprendo que pueda retirarse del estudio.

- 1.º Cuando quiera.
- 2.º Sin tener que dar explicaciones.
- 3.º Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

En mi presencia se ha dado a \_\_\_\_\_ (nombre del sujeto control), toda la información pertinente adaptada a su nivel de entendimiento y está de acuerdo en participar. Y presto mi conformidad expresa y revocable con que \_\_\_\_\_ (nombre del sujeto control) participe en este estudio y al acceso de sus datos personales según consta en el apartado de confidencialidad de datos de la hoja de información al sujeto control.

(Firma del representante)

(Fecha)

He comentado este estudio de investigación clínica con el sujeto control y el representante en un lenguaje comprensible e idóneo. Considero que he informado completamente al participante y el representante de la naturaleza del estudio y de los posibles beneficios y riesgos derivados del mismo, y creo que el participante y el representante han comprendido esta explicación. He entregado una copia de este documento fechada y firmada al paciente y al representante.

(Firma del investigador)

(Fecha)





## Moléculas diferentes, de forma estadísticamente significativa, entre pacientes con cancer de mama y controles sanos

Compound	P (Corr)	Regulation (cancer patients Vs healthy control)	Mass	Retention Time
C4 H6	9,30E-05 up	244,57797	54,0471	3,2491462
C4 H6 (2)	0,041106164 up	16,961819	54,0475	3,4187877
C4 H8	0,01618517 up	2,0673041	56,064	9,588262
C3 H9 N	2,44E-07 up	693,7814	59,0759	9,6211815
60.022@0.32425803	7,42E-14 up	1195,1332	60,022	0,32425803
C4 H9 N	0,008731695 down	-47,7287	71,0707	0,45460492
C4 H11 N	6,49E-05 up	205,17033	73,0913	9,644464
C6 H4	0,002161457 up	37,358277	76,0311	0,8869689
82.0735@0.3259259	0,021615723 up	17,014717	82,0735	0,3259259
83.9889@0.32634723	3,51E-06 up	361,6225	83,9889	0,32634723
97.9686@0.32438752	9,57E-16 up	2,2230566	97,9686	0,32438752
100.0015@0.32618025	1,02E-14 up	2,317938	100,0015	0,32618025
2-Hydroxy-3-methylbutyric acid	3,27E-04 up	36,557568	100,0522	1,5816069
103.0465@0.48916453	1,34E-04 up	71,38483	103,0465	0,48916453
C5 H13 N O	0,013454561 down	-35,9272	103,0998	11,038706
C5 H13 N O (2)	5,24E-06 up	360,9948	103,0999	11,739626
104.1016@0.4106087	0,001263066 down	-54,501274	104,1016	0,4106087
108.094@6.8899035	0,03507224 down	-21,685585	108,0939	6,8899035
C8 H12	0,0161452 down	-33,2668	108,0939	3,1723282
Creatine	3,91E-04 down	-339,61105	113,0561	0,42863637
113.084@2.1546912	1,86E-07 up	24,761124	113,0843	2,1546912
C9 H6	0,018263014 up	32,208218	114,0479	1,2765871
2-Hydroxy-3-methylpentanoic acid	0,02301409 up	3,2980385	114,0682	3,2419913
L-Valine	0,017350342 down	-64,50541	117,0775	0,44549397
C9 H10	0,020669939 up	17,931105	118,0782	5,2420254
C5 H4 N4	0,002637335 up	47,947605	120,0437	2,446937
C5 H4 N4 (10)	3,79E-08 up	1061,8641	120,0437	4,4392815
C5 H4 N4 (11)	0,001784631 up	78,3935	120,0437	4,5617785
C5 H4 N4 (12)	2,39E-07 up	895,5553	120,0437	4,8050632
C5 H4 N4 (13)	7,68E-05 up	185,91911	120,0437	4,944795
C5 H4 N4 (14)	5,03E-06 up	205,3857	120,0437	5,224307
C5 H4 N4 (15)	5,29E-05 up	257,154	120,0437	5,4229364
C5 H4 N4 (16)	3,99E-06 up	515,9029	120,0437	5,624334
C5 H4 N4 (18)	7,44E-05 up	246,64723	120,0437	6,002085
C5 H4 N4 (2)	7,44E-06 up	398,7797	120,0437	2,5937352
C5 H4 N4 (3)	9,03E-04 up	69,3433	120,0437	2,7862983
C5 H4 N4 (4)	1,99E-05 up	294,7056	120,0437	2,9837127
C5 H4 N4 (5)	5,56E-05 up	50,412838	120,0437	3,1672523
C5 H4 N4 (6)	6,38E-07 up	137,71193	120,0437	3,5797405
C5 H4 N4 (7)	0,004372553 up	29,775135	120,0437	3,8787327
C5 H4 N4 (8)	2,67E-08 up	423,647	120,0437	4,0885234
C5 H4 N4 (9)	1,47E-04 up	85,68444	120,0437	4,285565
C5 H4 N4 (17)	0,001020161 up	114,77413	120,0438	5,816484
Taurine	6,38E-09 up	198,09927	125,0153	0,32860422
4-acetamidobutanoate	0,002003364 down	-53,316326	127,064	0,70647365
3-Methylglutaric acid	0,005526376 up	37,589462	128,0489	1,5807501
C5 H7 N O3	7,60E-05 down	-242,62566	129,0434	2,4426584
DL-pipecolic acid	1,49E-06 up	270,4421	129,0792	0,33790255
C9 H9 N	0,03404401 down	-21,517311	131,0737	1,2777019
3-Hydroxyanthranilic acid	8,83E-06 down	-341,82864	135,0336	1,5612222
Dopamine	0,0007809 up	1,45	135,0675	0,575
Threonate	0,039227072 up	3,8591702	136,0378	0,88052344
137.9003@0.3887037	7,52E-04 down	-81,42886	137,9003	0,3887037
C4 H7 Cl2 N	2,35E-04 up	497,24475	138,995	0,32783055
C4 H10 N4 S	0,00149002 up	55,248512	146,0655	1,5808775
Glutamine	2,04E-06 down	-1060,4479	146,0684	0,5461304
L-Lysine	1,72E-04 down	-61,43537	146,1059	0,34584
C8 H4 O3	0,04677189 up	28,87852	148,0161	12,005303
C8 H6 Cl N	0,02208716 down	-22,799873	151,0154	0,40925714
C5 H12 O3 S	3,66E-05 up	191,94904	152,051	3,4264996
155.0681@0.45361814	0,002344885 down	-63,465504	155,0681	0,45361814
C4 H9 Cl2 N O	0,002255535 down	-155,22307	157,0051	0,32345003
159.053@0.503519	6,76E-07 up	1001,11365	159,0529	0,503519
C3 H11 N7 O	3,30E-04 down	-682,2704	161,101	0,42622033
C5 H6 O2 S2	1,04E-04 up	7,859619	161,9836	0,32459825
C3 H10 N6 S	0,002515871 down	-75,76851	162,0683	5,5077543
C7 H14 O2 S	0,005336309 down	-46,92934	162,0712	6,459499
C10 H12 O2	0,001651759 up	77,57514	164,0832	12,870709
Uric acid	0,027582746 up	2,2613251	168,0292	0,6809543
C7 H12 N4 O	6,20E-07 up	944,12085	168,103	6,1662974
C7 H12 N4 O (2)	1,80E-06 up	765,96814	168,103	7,0663834
C3 H6 Cl N O S2	0,004162231 down	-17,204424	170,9606	0,21788003
C10 H23 N O	0,001254277 up	10,840619	173,178	4,2336698
C6 H11 Cl N4	3,05E-04 up	109,442535	174,0671	5,8075414
L-Arginine	1,49E-05 down	-397,21246	174,1067	0,4356315
2-Methylhippuric acid	0,001796061 down	-91,99216	175,0639	3,6565607
Hippuric acid	0,03816984 down	-8,761045	179,0599	2,1277783
C5 H13 N O2 S2	4,44E-12 up	189,83856	183,0389	0,32655767
C5 H12 N8	2,85E-08 up	5765,3203	184,1161	7,0670485
C5 H12 N8 (2)	6,20E-07 up	1850,7535	184,1162	6,167351

Compound	P (Corr)	Regulation (cancer patients Vs healthy control)	Mass	Retention Time
C7 H10 N2 O2 S	4,38E-07 down	-364,18213	186,045	0,43359998
C9 H14 O2 S	1,08E-06 up	577,696	186,0702	9,52657
C5 H10 N4 S2	0,020519007 down	-26,501621	190,0351	0,40950003
C10 H22 O S	1,32E-09 up	1357,1859	190,1388	9,523834
C6 H18 N6 O	0,002094353 up	69,45571	190,1553	6,6648965
C10 H16 N4	6,57E-04 up	104,11244	192,1364	0,43726927
C7 H20 N4 S	6,16E-06 down	-205,90007	192,1417	0,43614823
C7 H18 N2 O2 S	0,034102097 down	-14,753049	194,1093	2,5867305
C10 H15 N O S	0,002596293 down	-100,54963	197,088	0,4706812
C4 H7 Cl N2 O3 S	1,58E-04 down	-174,47708	197,9854	1,5480711
C12 H22 O2	0,006114819 up	9,228025	198,1618	8,400215
C12 H22 O2 (2)	0,002424649 up	64,54488	198,1619	12,330672
C5 H5 N5 O2 S	7,44E-04 up	22,414406	199,0164	0,3246337
C4 H12 Cl N3 O4	2,54E-07 down	-175,27245	201,0496	0,32475
C9 H2 N2 S2	8,18E-13 down	-639,7834	201,963	0,36220008
C4 H6 N6 O4 (2)	0,039525874 up	59,588013	202,0444	0,41955924
C4 H6 N6 O4	0,013961026 down	-118,17374	202,0446	0,41258183
C12 H19 N3	0,027582746 up	4,230462	205,1587	9,525785
C9 H20 O3 S	0,002167495 down	-67,57657	208,1129	8,674031
212.1702@6.0630007	7,42E-05 up	262,7113	212,1702	6,0630007
C12 H6 O2 S	0,034121733 up	6,481461	214,009	0,4868726
C7 H18 N8	0,022212505 up	10,851633	214,1674	4,5830216
C9 H13 Cl N2 O2	2,54E-04 up	138,06631	216,0713	0,44548148
C5 H6 N4 O4 S	5,04E-07 up	25,751541	218,0114	0,32379454
C6 H Cl O3 S2	0,021063665 down	-26,410437	219,9044	0,3838286
220.0852@1.1467648	6,12E-10 down	-1933,3247	220,0852	1,1467648
C9 H21 Cl N4	1,46E-05 up	291,19208	220,1471	9,519721
C12 H20 N4	2,33E-05 up	264,0788	220,168	0,43622747
C9 H24 N4 S	2,04E-07 down	-409,04156	220,1757	0,43489996
C5 H3 Cl N2 O6	0,006650459 down	-40,063362	221,9672	0,39590472
C7 H10 O4 S2	5,80E-07 up	240,03377	222,0043	0,32516283
C14 H24 O2 (2)	0,001349042 up	84,66894	224,1766	12,403346
C14 H24 O2	0,002266479 up	77,77773	224,1775	12,098139
Cytidine	0,03542802 up	21,857855	225,0778	0,7119473
C13 H19 Cl O	0,042538613 down	-13,069507	226,1139	0,423675
C12 H22 N2 O2	9,46E-15 up	9060,831	226,1691	6,0663905
C7 H16 N8 O	0,00408901 down	-52,987373	228,1478	0,656892
C17 H11 N	0,006652449 down	-31,232265	229,0885	0,4742676
229.238@8.320602	0,001036418 up	11,252597	229,238	8,320602
C10 H3 N O4 S	0,007322189 up	80,95541	232,9759	0,23461223
C8 H14 N2 O6 (2)	0,002392016 down	-107,47122	234,0839	1,0270344
C8 H14 N2 O6	7,42E-05 down	-278,89606	234,0851	0,7987038
C6 H18 N8 O2	3,35E-08 down	-977,7391	234,1566	0,44331032
C10 H24 N2 O4	8,62E-08 up	239,53566	236,1771	8,621721
C6 H11 Cl N4 O4	0,0179944 up	21,959383	238,0499	0,43465382
C13 H10 N4 O	3,26E-05 down	-2,1806004	238,0851	4,826217
C10 H14 N4 O S	0,001433869 up	104,37657	238,0869	7,3238783
C14 H24 O S	1,90E-04 down	-105,88095	240,1539	11,955486
C13 H24 N2 S	0,03057574 up	6,7400017	240,1685	8,086362
C17 H22 O	0,006760607 down	-29,535965	242,1657	3,1363041
C10 H22 N6 O	0,002238446 up	71,423225	242,1885	12,097238
C8 H19 N7 S	7,33E-06 up	714,8359	245,1417	6,0639625
C12 H19 Cl O S	0,0110487 up	29,853466	246,0857	0,4938382
C10 H29 N7	0,022874806 up	20,36538	247,247	11,353399
C8 H5 Cl O7	8,53E-07 down	-240,16621	247,9707	0,6890488
C9 H17 Cl N4 O2	0,002874123 down	-44,59035	248,1039	0,56569993
C10 H20 N2 O5	0,01177294 up	36,29039	248,1375	0,4395102
C12 H24 O3 S	8,69E-04 down	-115,822334	248,1425	0,43864277
C11 H25 Cl N4	0,023964867 down	-15,674421	248,1775	10,795187
C9 H14 N8 O	0,008437083 up	28,992922	250,1291	7,297187
Myristic acid	2,68E-04 up	78,94528	250,1932	12,096725
C12 H24 N6	0,003619365 up	55,826397	252,2093	12,259769
252.2099@10.09466	0,018714974 up	27,304443	252,2099	10,09466
C9 H15 N7 O2	7,87E-09 up	3313,2705	253,1279	6,0780144
C5 H10 N4 S4	4,66E-06 down	-65,257225	253,9771	0,36522225
C16 H33 N O	9,44E-05 up	232,75049	255,2562	11,222838
C8 H4 N2 O4 S2	0,003070294 up	2,6911294	255,9589	0,3231728
256.2403@11.563516	4,53E-05 up	411,7566	256,2403	11,563516
C13 H26 N2 O3	6,12E-10 up	114,27498	258,1947	2,6831613
C8 H20 N8 O2	0,04552958 down	-17,401026	260,1731	0,47214994
C14 H18 N2 O3	0,001225498 down	-48,264202	262,1327	2,4587708
C17 H10 Cl N	0,0435707 up	12,442346	263,0476	0,8850293
C14 H12 N6	0,006770235 down	-2,791787	264,112	2,4413185
C13 H20 N4 S	0,044516698 down	-11,255018	264,1397	9,446976
264.9748@2.9053724	1,46E-05 down	-221,58049	264,9748	2,9053724
C13 H30 N6	1,98E-11 up	5445,679	270,2556	11,564831
C11 H26 N6 O2	0,034998894 up	17,760437	274,2143	9,802611
C16 H34 O3	1,27E-06 up	95,177895	274,2507	10,807165
C9 H5 Cl S4	0,031093119 down	-18,385477	275,897	0,38263637
C11 H10 N4 O S2	4,23E-04 up	80,75821	278,0307	0,34289703
C11 H26 N4 O2 S	2,12E-04 down	-101,10442	278,1792	0,43633336
C18 H33 N O	2,45E-06 up	128,99632	279,2562	11,008722

Compound	p (Corr)	Regulation (cancer patients Vs healthy control)	Mass	Retention Time
Linoleic acid	4,14E-17 up	42496,75	280,2411	11,370296
Oleamide	3,83E-05 up	2,036343	281,2726	11,383955
282.2566@11.689865	3,72E-08 up	2722,2834	282,2566	11,689865
Stearic acid	1,96E-06 up	673,58923	284,2717	12,056651
C19 H29 N O	1,06E-06 down	-138,38942	287,227	8,918766
C17 H27 N O3	0,022663223 down	-19,869555	293,1999	9,075802
C7 H17 N7 O2 S2	0,004759546 down	-42,83323	295,086	0,7083913
C13 H17 Cl N4 S	0,006584088 up	41,107224	296,0772	10,2788515
C18 H32 O3 (2)	3,00E-06 up	602,7171	296,2346	12,739666
C18 H32 O3	3,56E-04 up	193,50835	296,2371	12,337602
C18 H35 N O2	6,99E-09 down	-1180,4725	297,267	11,3718405
C13 H30 N8	1,83E-04 up	229,14946	298,2552	12,023381
C13 H5 N3 O6	0,018482843 down	-21,792715	299,0172	0,32199994
C13 H25 N5 O3	0,003574477 down	-91,39754	299,1979	6,8043933
C17 H34 O4	4,23E-09 up	798,52057	302,2447	10,636541
C14 H16 N4 S2	0,00204773 down	-27,763386	304,0816	1,3894829
5 $\alpha$ -androstane-3,17-dione	1,24E-10 down	-148,80891	305,2386	10,385417
Homocystine	2,86E-04 up	62,278194	306,0068	0,33542165
C12 H31 N5 O4	0,029596679 down	-16,070463	309,232	9,528082
C12 H31 N5 O4 (2)	4,60E-08 down	-1314,2166	309,2365	9,601748
C9 H21 N5 O3 S2	0,026524732 down	-18,220287	311,1077	0,66540307
C18 H36 N2 S	0,013928644 down	-30,936214	312,2638	13,351328
C14 H27 N5 O3	2,82E-07 down	-4,8009	313,2135	8,088225
C15 H31 N5 S	0,025224615 down	-7,841307	313,2285	6,620386
C8 H10 N8 O6	7,52E-04 down	-289,1141	314,0728	1,0617354
C10 H19 Cl N2 O7	1,19E-05 up	285,8	314,0886	9,249628
C19 H30 N4	0,021728044 up	33,909637	314,2465	12,390803
C18 H29 N5	0,010034961 down	-2,4926612	315,2421	7,0906997
C14 H32 N6 O2	0,009727014 up	30,229912	316,2621	12,016785
C21 H35 N O	0,039227072 up	3,4233255	317,2726	7,795924
C15 H35 N3 S2	3,10E-06 up	293,36798	321,2318	9,073458
C13 H31 Cl N6 O	9,99E-05 down	-77,35424	322,2271	5,978286
C14 H5 N5 O S2	0,012197764 down	-16,954018	322,9937	0,5172258
C16 H34 Cl N O S	0,030274766 up	25,089638	323,2041	8,893321
C16 H29 N5 S	4,17E-07 up	36,186474	323,2126	9,645524
C17 H24 O4 S	1,54E-09 up	462,6676	324,1373	2,8426275
C15 H19 N O3 S2	4,61E-06 down	-80,51317	325,0811	1,1950476
C18 H35 N3 O2	0,027807528 down	-12,378784	325,2737	6,0643497
326.1949@3.6240907	5,06E-13 down	-256,3197	326,1949	3,6240907
C16 H33 N5 S	3,75E-05 down	-234,35324	327,2446	7,107363
330.2772@11.303863	0,045552958 down	-2,9917035	330,2772	11,303863
C17 H33 N O5	0,003974505 down	-28,911268	331,2358	5,8117714
C20 H12 O5	1,05E-06 down	-69,626465	332,0693	2,0373182
C22 H20 O3	0,02675541 up	17,732347	332,1399	6,204395
C19 H24 N6	3,32E-09 down	-862,3288	336,2063	7,066325
C17 H31 N5 S	2,20E-05 up	247,546	337,2302	9,635051
C16 H30 N6 O2	0,005234688 down	-47,08713	338,2438	6,925327
338.7591@5.8324213	7,78E-09 down	-81,137024	338,7591	5,8324213
C18 H33 N3 O3	6,27E-09 up	2,162161	339,2534	7,5161805
C16 H24 N2 S3	3,86E-07 up	501,00275	340,1095	2,8443964
C20 H31 N5	0,039227072 down	-6,436251	341,2578	7,807263
343.2219@3.6344838	2,31E-05 up	43,809135	343,2219	3,6344838
C20 H29 N3 O2	3,67E-05 down	-149,68988	343,2233	12,259387
C16 H34 N4 O4	0,013961026 down	-22,242704	346,2583	7,8615437
Caproic acid	8,37E-17 down	-1,7	348,2573	5,769
348.7591@5.7688694	0,03307431 down	-5,6360993	348,7591	5,7688694
C13 H26 N12 (2)	0,005775198 down	-56,558517	350,2399	7,621218
C13 H26 N12	0,01112874 down	-27,85264	350,2405	7,4446363
C20 H34 Cl N3	0,001489382 up	72,10296	351,2437	9,647244
C13 H22 O3 S4	3,90E-05 up	152,4803	354,0429	7,3250847
C14 H36 N4 O2 S2	0,02613476 down	-12,968886	356,2292	6,444634
C18 H35 N3 S2	0,00434871 down	-28,02096	357,2263	4,130281
C16 H35 N7 O2	0,010564902 down	-18,255949	357,2872	8,811291
C14 H3 Cl N4 O4 S	0,005645108 down	-31,745562	357,9539	0,32178846
C14 H14 O9 S	4,96E-04 up	133,31297	358,0357	0,6144038
C14 H30 N8 O S (2)	0,015122383 down	-36,69914	358,2251	7,6119676
C14 H30 N8 O S	0,013809574 down	-33,98761	358,2256	7,450401
C21 H42 O4	0,009240921 down	-2,4807324	358,3088	11,812093
C19 H5 N O S3	1,09E-04 down	-40,773643	358,9542	7,5241203
Cortisone	0,030274766 down	-5,8378644	360,1945	6,9761095
C21 H31 N O2 S	4,41E-06 down	-552,9217	361,2056	10,998146
Cortisol	3,07E-05 down	-1,7	362,2124	7,031
363.7104@7.5173335	9,23E-05 up	226,02435	363,7104	7,5173335
C14 H9 Cl2 N5 O S	7,53E-04 down	-38,22276	364,9914	0,7253055
C23 H30 N2 S	4,58E-18 up	1153,9005	366,2115	7,5163574
C15 H38 N6 O2 S	0,002755613 down	-29,77417	366,2782	10,973587
C20 H42 N6	1,72E-05 up	285,40543	366,348	12,015953
C20 H5 N3 O S2	0,020754429 down	-27,191454	366,9839	0,47260493
C12 H29 N7 O6	2,63E-14 down	-224,67549	367,2124	7,5056
C14 H37 N7 O2 S	0,001468954 down	-42,172497	367,2718	8,521545
367.7126@7.508818	2,24E-16 down	-244,92267	367,7126	7,508818



Compound	P (Corr)	Regulation (cancer patients Vs healthy control)	Mass	Retention Time
C20 H28 N6 O	3,35E-07 down	-1438,8893	368,2318	6,1712713
C20 H28 N6 O (2)	1,43E-08 down	-4464,0396	368,2318	7,0663476
C27 H44 (3)	0,013589146 up	38,345627	368,3437	16,01008
C27 H44	2,87E-05 up	208,12883	368,3439	12,304817
C27 H44 (2)	0,001211321 up	194,87166	368,3448	15,515002
C21 H19 Cl O4	0,045552958 down	-10,837215	370,0958	11,614912
C16 H34 N8 S	3,24E-05 up	530,83167	370,263	13,211927
370.7581@13.211934	1,09E-04 up	207,31512	370,7581	13,211934
370.7592@13.285526	1,69E-05 down	-59,820847	370,7592	13,285526
2-Octenoic acid	0,005321701 down	-39,295128	372,268	9,767441
C13 H31 N11 O2	0,005638891 up	38,714043	373,2657	13,2213
C10 H18 N2 O5 S4	9,41E-06 up	297,16418	374,0105	0,6641578
C23 H35 Cl O2	0,002874123 down	-24,444166	378,2356	5,183107
C16 H5 N5 O3 S2	3,70E-08 down	-164,84981	378,9843	0,9342962
C15 H37 N7 O2 S	9,42E-04 down	-34,395138	379,2702	9,448351
C24 H32 N2 S	2,27E-07 up	1219,3954	380,226	11,6901865
C9 H8 Cl N5 O8 S	0,0227786 down	-29,145813	380,9793	0,7378181
C17 H31 Cl N8	4,29E-04 up	51,191204	382,2422	0,3237659
C14 H25 N O7 S2	0,01345269 down	-11,349625	383,1071	1,9814566
7 $\alpha$ -hydroxy-cholesterol	0,008897226 down	-31,36587	384,329	12,368574
C20 H39 N3 S2	0,006432778 down	-18,535948	385,2571	5,083179
C23 H22 N4 O2	0,002344885 down	-80,74462	386,174	7,607665
C20 H34 N8	5,79E-16 down	-1474,8787	386,2925	10,16158
C18 H42 N8 O	0,001313387 down	-41,614845	386,3536	12,955179
C17 H33 N5 O5	1,63E-05 down	-3,3401842	387,2478	4,148335
C29 H5 Cl	0,001876563 up	58,52359	388,0095	0,3373857
C25 H32 N4	1,44E-07 down	-513,3634	388,2615	9,747404
C7 H Cl2 N3 O2 S5	0,022095356 down	-13,534151	388,8039	6,3629475
Chenodeoxycholic Acid	6,11E-04 up	161,82008	392,2908	11,337122
C18 H39 N3 S3	2,51E-05 up	155,1043	393,2283	4,6133265
C13 H38 N12 S	2,07E-05 up	277,30884	394,3052	11,443872
C24 H48 N2 O2	1,27E-13 down	-1874,2516	396,374	13,15828
C19 H39 N7 O2	0,011237998 down	-22,992817	397,3181	4,944937
398.3197@12.043287	0,022312777 down	-15,795482	398,3197	12,043287
C24 H46 O4	0,031169314 down	-12,320089	398,3404	12,503838
C20 H21 N3 O4 S	1,10E-09 up	729,513	399,1237	2,8441143
C20 H37 N3 O S2	0,040289506 down	-10,784155	399,2386	5,190102
7-ketocholesterol	4,27E-04 up	117,011635	400,3335	12,138314
5-b-Cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triol	0,035652112 down	-13,194351	402,3519	12,439621
C9 Cl3 N O3 S4	5,90E-06 down	-97,997475	402,7765	13,663565
C10 H14 Cl N3 O4 S4	1,94E-05 down	-59,74663	402,9584	0,46909094
C13 H11 Cl2 N5 S3	6,72E-05 down	-34,358856	402,9589	1,0352856
C22 H49 N3 O3	0,003567036 up	69,88998	403,3802	12,949729
C5 H3 Cl3 N2 O3 S5	0,009989689 down	-19,281418	403,7829	13,921572
C22 H49 Cl N4	7,56E-06 up	403,6912	404,3632	12,38348
C21 H43 Cl N2 O S	0,003971222 down	-40,694965	406,2741	10,64239
C24 H41 N S2	0,002488607 up	46,89287	407,2679	7,037986
C21 H45 N O4 S	9,96E-04 down	-66,71236	407,3055	11,1914625
C22 H41 N5 S	1,45E-15 up	5475,9873	407,3076	11,5957575
C22 H24 N4 O4	5,59E-14 down	-2,3582122	408,1802	1,275667
C20 H40 O6 S	5,59E-06 down	-367,614	408,2528	9,240001
408.3914@12.466255	0,006055078 up	44,487217	408,3914	12,466255
C19 H44 Cl N5 O2	0,001818142 down	-57,61286	409,3193	11,322534
409.7527@13.45093	0,006418299 up	29,493988	409,7527	13,45093
Inosine diphosphate (IDP)	0,001820976 up	52,74305	410,0028	0,34574685
C30 H22 N2	0,001392328 up	26,609764	410,1789	5,18475
C27 H51 Cl	0,025532298 up	21,200674	410,3736	12,445163
411.7708@13.869441	1,09E-06 down	-482,90897	411,7708	13,869441
C7 H2 Cl2 O6 S5	1,43E-04 down	-85,5774	411,7888	7,4182277
C16 H24 N6 O3 S2	3,92E-04 down	-64,44576	412,1355	2,9649444
C22 H32 N6 O2	5,97E-08 up	300,62994	412,2586	0,50768894
C18 H40 N2 O6 S	5,94E-14 down	-2,4116635	412,2604	0,33939654
C15 H40 N8 O S2	0,018929912 down	-9,650723	412,2802	7,7124634
C26 H49 Cl O	2,98E-04 down	-172,9228	412,3495	12,687789
412.7818@7.711023	0,00137189 down	-57,456207	412,7818	7,711023
C11 H28 Cl N11 O2 S	0,021299968 up	18,42393	413,1803	7,52868
C20 H40 Cl N7	0,005102523 down	-43,031223	413,2968	11,394551
C17 H2 O13	0,01020841 up	8,027762	413,9486	0,3233333
C20 H26 N6 O2 S	0,017900968 up	13,667072	414,1819	7,51386
C28 H43 Cl	0,042840563 down	-11,562727	414,303	10,930526
C23 H46 N2 S2	0,026965601 down	-12,219338	414,3124	10,330238
C7 H3 Cl3 O6 S4	2,31E-04 down	-39,392628	415,7845	13,780728
C18 H40 N8 O3	4,18E-05 down	-97,33083	416,3254	11,078436
C21 H5 Cl2 N3 O S	5,09E-04 down	-49,943295	416,9547	1,0826111
C21 H5 Cl2 N3 O S (2)	2,48E-06 down	-131,74602	416,9554	0,8224287
C25 H39 N O4	2,49E-05 up	249,66034	417,2854	5,184469
421.7815@11.700707	4,26E-05 up	236,46936	421,7815	11,700707
C19 H27 Cl N6 O S	1,52E-04 up	66,63466	422,1656	7,5203657
C26 H47 Cl N2	0,004986323 up	47,148335	422,3424	11,826258
C28 H51 Cl	0,045570906 up	16,569607	422,3759	12,639553
C14 H4 N2 O10 S2	0,021595784 down	-14,485857	423,9285	0,38084522
C23 H28 N4 O2 S	6,20E-07 up	8,373709	424,1928	6,165045

Compound	p (Corr)	Regulation (cancer patients Vs healthy control)	Mass	Retention Time
424.7623@13.422313	0,041780073 up	13,448823	424,7623	13,422313
C27 H23 Cl N2 O	1,87E-06 up	247,58005	426,1487	5,184927
C26 H50 O4	0,022874806 down	-15,807724	426,3704	12,792151
426.7433@13.608849	4,79E-06 down	-72,15815	426,7433	13,608849
C18 H37 N9 O S	4,07E-05 down	-43,237015	427,2828	10,235999
C22 H40 N2 S3	0,013812038 down	-3,242221	428,2358	0,35140744
C29 H48 O2	7,90E-04 up	3,2173147	428,3665	13,096932
C21 H42 N4 O S2	2,01E-07 up	323,96176	430,2794	5,1837344
C20 H33 N9 O2	0,012847452 down	-15,383188	431,2734	4,5983224
C22 H37 N7 O2	4,22E-08 up	11,067672	431,2997	6,178777
C21 H44 N4 O5	0,027708918 down	-11,106612	432,3301	12,458235
C26 H43 N O4	0,010143459 down	-29,088041	433,3189	10,556061
C17 H42 N10 O S	1,94E-11 down	-7027,469	434,3264	6,063714
C20 H45 N5 O5	7,95E-05 up	13,909355	435,3391	12,003172
C27 H48 Cl N O	5,88E-04 up	94,57996	437,3476	10,438001
C24 H47 N5 S	6,70E-09 up	966,8566	437,3581	9,107827
C23 H38 N2 S3	0,004193674 down	-19,562193	438,2188	7,0683107
C30 H46 S	4,27E-06 down	-137,43283	438,3301	11,037433
C25 H49 N3 O S	0,017021919 up	34,74584	439,3627	11,837138
C28 H25 Cl N2 O	3,68E-15 up	1195,0226	440,1637	6,160325
C29 H44 Cl N	5,38E-04 down	-43,058807	441,3204	7,3580523
C26 H53 N O4	0,002654094 up	59,500298	443,4019	12,136624
C33 H16 O2	0,013366127 down	-20,68022	444,1135	11,646452
C29 H48 O3	0,033780564 up	7,197215	444,3613	13,038582
444.3619@12.505855	0,005347919 up	14,478658	444,3619	12,505855
444.3621@12.829359	0,006509685 up	30,58743	444,3621	12,829359
C28 H39 N5	4,67E-05 up	546,3232	445,316	7,0668864
C21 H34 S5	0,001860401 up	28,47344	446,1285	1,2776085
C21 H46 N6 O2 S	2,42E-04 up	103,55511	446,3399	3,1693883
C21 H46 N6 O2 S (2)	2,88E-04 up	97,18987	446,3402	3,3017592
C21 H46 N6 O2 S (3)	0,002655841 up	47,439503	446,3402	3,5687292
C21 H46 N6 O2 S (4)	7,53E-04 up	70,76059	446,3403	4,0743175
C23 H47 Cl N4 O2	0,010585429 up	29,086811	446,3403	4,6448154
C29 H42 N4	1,51E-04 down	-428,9921	446,3408	12,607977
C21 H2 Cl N O7 S	2,05E-05 down	-176,35602	446,9236	0,45376804
C17 H2 Cl N O12	4,48E-06 down	-159,16557	446,9256	0,9282501
C21 H13 N13	1,42E-14 down	-907,3994	447,1419	0,5745937
C25 H24 N2 O4 S	0,012912125 down	-9,418887	448,1442	9,65135
C23 H47 N O5 S	0,017054403 down	-25,845516	449,3157	9,757902
C20 H48 Cl N7 O2	0,022453882 down	-23,347908	453,3498	12,126542
C13 H11 Cl N2 O10 S2	3,64E-04 down	-133,15149	453,9495	0,37527862
C30 H46 O S	3,16E-04 down	-109,86614	454,3274	10,644362
C25 H41 N7 O	0,010566685 down	-20,38257	455,34	7,9351645
C13 H12 N8 O5 S3	0,006738513 down	-23,579584	456,0101	0,47209996
C23 H45 Cl N6 O	9,14E-05 down	-208,77626	456,3279	12,138219
456.7097@13.621417	1,85E-10 down	-62,254673	456,7097	13,621417
C22 H39 N11	0,00833942 down	-26,615086	457,3404	9,50897
C29 H47 N O S	0,015173969 down	-14,705505	457,3405	10,699877
C21 H6 N4 O7 S	0,002282374 up	22,773046	457,9913	0,32855812
C26 H51 Cl N2 S	3,53E-08 down	-340,0509	458,3438	2,8402557
C27 H33 N5 O2	9,15E-14 up	5601,1914	459,2635	8,518579
C18 H4 O15	0,003761789 down	-38,998417	459,9572	0,37117073
C27 H27 N S3	0,013198934 down	-10,319621	461,1307	0,5816046
461.8425@6.6850724	0,001179125 down	-45,13863	461,8425	6,6850724
C29 H14 N6 O	1,35E-06 down	-101,72611	462,1269	11,039534
462.8334@12.540197	7,39E-05 up	89,0471	462,8334	12,540197
C26 H49 N5 S	1,22E-05 up	145,35164	463,3689	12,330385
C19 H49 N11 O2	7,16E-13 down	-317,95575	463,4157	12,446267
C28 H3 N O3 S2	1,32E-04 down	-73,21397	464,9514	0,4808298
C32 H51 N O	1,38E-04 down	-65,83437	465,4017	11,670047
C18 H46 N10 S2	3,70E-08 down	-131,9047	466,34	9,800947
C30 H58 O3	3,02E-07 down	-192,30908	466,4372	13,502144
C21 H49 N5 O2 S2	0,010311978 down	-22,657248	467,3345	8,156061
C27 H45 N7	0,003380332 down	-54,43472	467,3762	11,054037
C15 H17 Cl N2 O5 S4	1,88E-04 down	-33,17427	467,9676	0,34176192
C25 H52 N6 O2	2,71E-10 down	-361,60217	468,4156	13,314058
C28 H56 N2 O S	1,55E-07 down	-1410,1302	468,4175	13,151748
C24 H51 N7 O2	0,002113289 up	87,18936	469,4159	12,327031
C20 H34 N14	5,98E-15 down	-150,47867	470,3106	5,1762495
C23 H45 N5 O S2	7,49E-09 up	1016,0584	471,309	6,0625634
C29 H53 N5	1,86E-06 up	570,37555	471,4286	12,796091
C14 O9 S5	7,31E-05 down	-117,00201	471,8105	8,348339
C28 H41 Cl N2 S	0,00306314 up	23,137157	472,2678	0,3241343
C22 H45 Cl N8 O	1,09E-12 down	-743,41254	472,333	12,755268
C21 H41 N5 O7	0,009486293 down	-7,404945	475,2999	4,994215
C24 H50 Cl N5 S	5,79E-04 down	-105,35638	475,348	11,504297
C24 H50 Cl N5 O2	0,003892235 down	-70,09344	475,3611	12,126983
C24 H49 N3 O6	3,25E-09 up	1156,0024	475,3637	10,894877
C13 H4 N2 O8 S5	0,040192027 down	-8,1407385	475,8617	12,13547
C15 H20 N6 O10 S	0,007947979 down	-2,9186616	476,0968	0,5778991
C27 H41 Cl N2 O3	4,91E-06 down	-54,1603	476,2779	9,208952

Compound	P (Corr)	Regulation (cancer patients Vs healthy control)	Mass	Retention Time
C30 H43 N3 S	2,62E-04 up	132,0672	477,316	10,21575
C23 H48 Cl N5 O S	0,002407163 down	-56,182053	477,3243	11,059073
C27 H56 Cl N O S	1,28E-04 down	-89,56791	477,3775	12,586777
C24 H41 N5 O3 S	7,49E-06 up	329,61243	479,2932	6,0625196
C31 H37 N5	0,011594211 up	28,15052	479,3029	10,760722
C16 H41 N13 S2	0,004489211 up	2,6432998	479,303	10,901129
C13 H Cl O8 S5	3,79E-05 up	159,62027	479,7964	6,062708
480.454@13.596407	4,93E-08 down	-653,8758	480,454	13,596407
C20 Cl N O6 S3	0,031166537 down	-19,535805	480,8626	12,398112
C16 H2 O14 S2	0,005291526 down	-34,896225	481,8877	0,38795242
C16 H46 N14 O S	0,02762621 down	-20,670599	482,3687	12,549387
C29 H58 N2 O S	0,011457871 down	-34,540157	482,4338	13,268141
C26 H45 N O3 S2	0,002595435 down	-30,572409	483,284	8,539441
C26 H45 N O3 S2 (2)	9,72E-04 down	-43,408886	483,2853	8,806835
C28 H50 Cl N O S	0,019657934 down	-17,876686	483,3258	10,882055
C31 H46 Cl N O	1,51E-05 down	-76,60514	483,3295	7,1977882
483.3305@7.0687184	7,58E-04 down	-36,818943	483,3305	7,0687184
C24 H49 N7 O S	1,46E-05 up	282,5067	483,3749	6,0652814
C28 H53 Cl N2 O2	0,004224077 down	-28,874702	484,3755	11,803841
C15 H3 N O8 S5	9,23E-14 up	1704,6176	484,8458	12,548579
C23 H18 O2 S5	0,026499256 up	23,536743	485,9906	0,33977148
C30 H N O3 S2	2,58E-06 down	-43,783035	486,9394	0,80417657
C22 H N O13	1,45E-09 down	-456,92468	486,9461	0,45951435
C26 H45 N7 S	0,027582746 down	-10,624324	487,3504	10,411732
C32 H57 N S	3,00E-06 up	622,22595	487,4263	12,872648
C12 H9 Cl2 N3 O4 S5	0,009295842 up	12,706882	488,8607	12,138331
C27 H59 N3 S2	0,001814719 down	-73,38826	489,4175	13,191925
C14 H19 Cl N2 O5 S5	0,029184537 down	-8,45859	489,9574	0,3710625
C23 H49 N5 S3	0,001882997 down	-41,363968	491,3161	10,055056
C27 H53 N7 O	5,25E-13 up	3293,9353	491,4325	12,688494
C23 H47 N3 O6 S	0,001516774 up	126,41177	493,3182	10,336049
494.4735@13.675856	2,30E-08 down	-81,29812	494,4735	13,675856
C30 H60 N2 O S	2,64E-04 down	-54,984657	496,4444	13,310546
C27 H56 N6 O2	0,00184575 down	-40,992645	496,4447	13,352401
497.358@5.8625336	9,85E-08 down	-37,515205	497,358	5,8625336
C26 H51 N5 O4	3,02E-21 up	7,0568886	497,3955	6,065792
C18 H18 N4 O11 S	0,002136901 up	22,126244	498,0684	0,6478388
C26 H50 N4 O S2	8,77E-09 down	-647,5998	498,3425	6,313141
C25 H51 Cl N8	0,039227072 down	-13,263562	498,3927	11,971667
499.1758@6.162619	8,94E-05 up	58,541157	499,1758	6,162619
C22 H45 N O5 S3	0,024500322 down	-13,449592	499,244	7,6566644
C26 H57 N7 O2	7,79E-04 up	74,54932	499,4603	13,075432
C35 O5	0,027352227 down	-19,412146	499,9771	0,34967697
C21 H48 N12 S	2,04E-04 up	122,03957	500,3855	11,65222
C27 H52 Cl N3 O3	0,0163675 up	15,87871	501,3726	7,070078
C18 H14 O11 S3	0,003852087 up	17,140617	501,9664	0,34032625
C29 H49 N3 S2	1,22E-07 down	-164,0571	503,3341	0,4762592
C26 H53 N3 S3	0,005645108 down	-48,40218	503,3378	11,228324
C28 H60 N2 O S2	0,012100626 up	43,588413	504,4169	12,398924
C20 H8 Cl N O3 S5	1,49E-04 down	-105,35098	504,8831	0,4435833
C29 H48 Cl N3 O2	0,03404401 down	-15,346078	505,3399	0,48517743
C29 H48 Cl N3 O2 (2)	1,15E-05 down	-131,67319	505,3402	0,653574
C29 H48 Cl N3 O2 (3)	1,66E-09 down	-177,46916	505,3406	0,8076191
C33 H47 N O3	0,012477847 down	-23,88717	505,3548	11,568811
505.3713@11.802113	0,012452268 down	-27,818481	505,3713	11,802113
C18 H2 O12 S3	0,031287648 down	-11,128601	505,8727	11,873894
C26 H38 N10 O	3,75E-04 down	-66,20379	506,3194	11,055501
C13 H2 Cl N3 O7 S5	0,003213318 down	-25,252716	506,8191	11,044472
C25 H N O2 S5	4,91E-07 up	371,76425	506,8578	12,553144
C29 H57 N5 S	3,03E-08 up	1848,6871	507,4353	12,486968
C35 H57 N O	4,60E-08 down	-1176,2009	507,4468	12,466134
C24 H52 N12	0,001425864 down	-57,56878	508,45	13,105188
C30 H64 N6	1,05E-11 down	-1118,4552	508,5188	14,160905
C33 H44 Cl2	4,73E-10 down	-880,9038	510,2832	2,8401065
C31 H43 Cl N2 S	1,32E-23 down	-7150,093	510,2833	6,0111537
C31 H43 Cl N2 S (2)	3,64E-13 down	-2376,539	510,2838	6,2033024
C33 H63 Cl O	0,002770438 down	-43,078053	510,4645	13,279452
511.7504@7.5175343	1,47E-08 up	517,2812	511,7504	7,5175343
C20 H25 Cl N6 S4	8,45E-16 down	-1494,8549	512,0738	0,53770834
C22 H44 N10 O4	0,00169051 down	-30,910143	512,3555	6,511227
C26 H52 N6 O2 S	0,001673493 down	-53,50826	512,3866	12,235462
C34 H40 Cl N O	1,20E-06 down	-56,512497	513,2619	6,0423536
513.2943@8.868193	5,84E-04 down	-38,05414	513,2943	8,868193
C34 H59 N S	1,16E-07 up	2637,3928	513,4393	12,009333
C24 H38 N2 O4 S3	7,46E-06 up	162,8461	514,2	7,0684047
C18 H42 N8 O9	3,55E-04 up	226,92177	514,3053	11,035173
C12 Cl3 N3 O10 S2	0,001064634 up	25,701305	514,806	11,041117
C17 H41 N17 O2	0,002289602 down	-36,91146	515,364	11,003488
C16 H45 N11 O6 S	2,33E-13 down	-2,570939	519,3264	5,345785
C18 H41 N13 O5	4,34E-04 up	140,77339	519,3345	10,6333
C31 H53 N O S2	4,91E-07 down	-195,7798	519,3571	0,50525



Compound	p (Corr)	Regulation (cancer patients Vs healthy control)	Mass	Retention Time
C35 H9 Cl N4	0,001033485 down	-46,154457	520,0506	0,64895
C36 H56 S	1,46E-05 up	1246,0431	520,4132	12,012071
C30 H51 N O6	1,20E-17 down	-2,6475742	521,3715	0,5815677
521.585@12.469726	1,47E-04 down	-51,59483	521,585	12,469726
521.6167@10.810063	2,75E-07 down	-129,6251	521,6167	10,810063
C28 H26 S5	0,012919515 up	19,842968	522,0613	0,5092353
C29 H58 N6 O2	4,60E-06 down	-263,91318	522,4651	13,223821
C12 H4 Cl3 N O8 S4	1,10E-09 up	1756,6211	522,7906	11,037487
C25 H43 N5 O S3	0,006924044 down	-30,697975	525,2597	9,468909
C28 H31 N9 O2	0,040886164 down	-10,325797	525,2621	7,7500753
C25 H53 N S5	5,58E-05 down	-68,529884	527,2735	8,847684
C28 H49 N S4	8,77E-04 down	-65,426414	527,2736	8,464259
C28 H41 N5 O S2	0,001031077 down	-47,30385	527,2749	8,207951
C21 H50 Cl N9 S2	0,024618993 down	-17,13885	527,3342	11,007464
C27 H53 N5 O3 S	0,004585784 down	-30,634981	527,3859	11,876014
C32 H53 N3 O S	0,010764937 down	-13,271363	527,399	10,461888
527.7242@9.6561575	8,74E-09 down	-93,93182	527,7242	9,6561575
C18 H19 Cl3 N2 O6 S2	3,74E-09 down	-246,76546	527,9746	0,3475652
528.8747@12.559213	1,26E-05 up	201,3191	528,8747	12,559213
C20 H3 Cl2 N3 O S5	4,21E-06 down	-242,12425	530,8244	10,789706
C22 H50 Cl N5 O7	5,28E-04 down	-58,83715	531,3397	10,798833
C26 H57 N7 O2 S	3,11E-05 down	-70,553	531,427	13,214309
C29 H61 Cl N4 O2	0,003193921 up	68,79005	532,4488	12,648067
532.7074@12.616357	0,014707091 down	-19,165503	532,7074	12,616357
C31 H51 N O2 S2	0,03710964 down	-6,9691606	533,3397	6,0951376
C33 H59 N S2	0,014523287 down	-33,001034	533,4156	12,41417
534.5301@14.197723	1,17E-09 down	-285,0743	534,5301	14,197723
C34 H41 N5 O	1,73E-04 down	-104,70406	535,3285	10,754837
C35 H66 Cl N	1,96E-05 up	338,7725	535,4895	12,843905
C27 H57 Cl N4 O2 S	5,46E-05 down	-72,25411	536,3916	7,0925307
C34 H64 O4	1,16E-04 down	-158,6002	536,4826	13,30444
C32 H68 N6	8,35E-13 down	-5814,5396	536,5506	14,432805
C26 H35 N O7 S2	0,033547465 down	-14,03446	537,1858	5,5529084
C33 H48 Cl N3 O	0,004095299 down	-30,275988	537,3434	9,807352
C30 H63 N7 O	0,016860899 up	7,3020105	537,5116	13,000532
C20 H42 N8 O9	4,18E-05 up	298,90125	538,3049	10,781017
C36 H58 O S	0,004519994 up	74,26463	538,4239	11,955789
C18 H2 Cl N O7 S5	9,03E-04 up	68,377846	538,8076	10,782111
C28 H50 Cl N5 O3	1,43E-04 up	140,14064	539,3645	11,097266
C31 H53 N7 O	0,002282374 down	-49,746273	539,4343	11,657616
C35 H73 N O2	2,01E-11 down	-2319,564	539,5636	14,271487
C18 H11 Cl3 O5 S4	0,023125056 up	17,831678	539,85	0,38989472
540.6851@11.241606	1,90E-07 down	-338,40295	540,6851	11,241606
C28 H55 N5 O3 S	0,015072997 down	-22,07231	541,3992	12,151524
C39 H59 N	3,50E-08 up	2791,7256	541,4704	12,334291
C26 H22 O5 S4	0,004713555 up	27,593176	542,0329	0,675757
C26 H43 Cl N4 S3	5,04E-13 up	8,309881	542,2335	6,0620375
C32 H49 N S3	0,01245433 down	-14,599335	543,305	7,0916624
C19 H45 N9 O9	6,10E-05 up	733,626	543,3336	10,6169405
C27 H53 N5 S3	0,003231036 up	29,233414	543,347	8,521604
C29 H62 Cl N7	5,59E-08 down	-270,48502	543,4742	13,109696
C24 H4 N2 O4 S5	4,54E-06 up	190,71443	543,8753	12,154308
C21 H51 N7 O5 S2	0,03719411 down	-14,488809	545,3406	10,640878
C28 H47 N7 O2 S	1,54E-05 up	898,263	545,3503	10,914946
C26 H19 Cl N6 S3	4,66E-04 down	-69,18204	546,0569	0,8843784
C39 H50 N2	1,25E-06 down	-224,80176	546,3958	13,104036
C31 H55 Cl N6	2,45E-06 up	366,66727	546,4067	13,073783
C38 H58 S	0,00157813 up	64,1602	546,4284	12,263459
C16 Cl3 N3 O7 S3	7,12E-07 up	566,3832	546,7909	10,783787
C27 H50 Cl N3 O6	4,76E-08 down	-638,4653	547,3503	10,8463335
C24 H48 N14 O	6,18E-08 down	-1981,1884	548,4143	12,562359
C30 H64 N2 O6	0,04496675 down	-15,182956	548,4805	13,25589
C18 H3 N3 O14 S2	0,004649381 up	6,2486105	548,9079	12,564281
C16 H15 N5 O13 S2	1,51E-05 down	-67,54405	549,0135	0,68206894
C29 H64 Cl N5 O2	0,022797856 down	-32,246704	549,4747	12,801686
C38 H79 N	1,70E-08 down	-184,94365	549,6186	12,665384
C24 H46 N4 O8 S	2,03E-06 up	3,776795	550,3043	6,063827
C21 H42 N8 O9	4,44E-05 up	402,69174	550,3071	10,764647
C29 H63 Cl N4 O3	0,011039266 up	56,363358	550,4626	12,617564
C31 H62 N6 O2	0,015327011 down	-39,965443	550,4974	13,383418
C20 Cl3 N O8 S2	3,87E-05 up	163,99323	550,8083	10,76327
C26 H N O8 S3	7,03E-09 up	870,19037	550,8842	12,566718
C30 H61 N7 S	0,00224494 down	-78,0756	551,4756	12,489371
C34 H45 Cl2 N O	3,91E-08 down	-1467,2122	553,2817	11,019248
C16 H13 Cl3 N6 S5	0,007357941 down	-25,878963	553,893	0,38127273
C33 H49 N O6	3,49E-18 down	-3,1670475	555,3551	0,8858022
C34 H57 N3 O S	1,92E-04 down	-168,37599	555,4188	12,406269
C31 H61 N3 O S2	0,004531712 down	-42,242973	555,4333	11,1263895
C25 H16 O5 S5	0,001895097 up	27,914001	555,9585	0,3259318
C41 H29 Cl	4,11E-04 up	70,23295	556,1927	10,071378
C28 H60 O10	4,28E-06 down	-416,27942	556,429	12,258424
C27 H57 Cl N10	3,27E-04 up	204,15439	556,4425	12,278526



Compound	P (Corr)	Regulation (cancer patients Vs healthy control)	Mass	Retention Time
C36 H61 CI N2	0,040289506 up	20,386856	556,4504	12,533831
556.7685@11.049999	1,65E-07 down	-175,01814	556,7685	11,049999
C34 H47 N5 O2	1,94E-05 down	-83,84009	557,3747	11,604419
C32 H67 N3 O2 S	2,32E-04 down	-127,923996	557,5021	13,235069
C19 H4 CI3 N O3 S5	3,89E-05 up	149,43956	558,7907	10,762772
C31 H41 N7 O3	0,00682324 down	-25,328281	559,3266	10,788778
C28 H55 CI2 N7	2,37E-06 down	-136,55998	559,3943	11,057677
C21 H14 CI2 N8 O S3	0,001813959 up	66,94271	559,9892	0,34952307
C29 H64 N6 O2 S	0,031394914 up	4,5050387	560,4811	12,83102
C40 H35 N O2	5,74E-07 down	-57,3023	561,262	11,047576
C29 H22 O6 S3	3,99E-06 down	-168,33676	562,0501	0,56827503
C34 H58 O6	2,72E-05 up	835,28754	562,4214	12,016187
C28 H51 CI2 N3 O2 S	1,04E-08 down	-398,2702	563,3008	10,784765
C18 H49 N11 O7 S	0,004924876 down	-2,9764817	563,3521	5,6614413
C28 H57 N3 O8	6,66E-05 down	-318,80557	563,4135	12,153951
C30 H65 N3 S3	0,00250094 down	-50,90885	563,4436	12,778072
C22 H5 CI N6 O S5	0,045609742 down	-11,81056	563,883	0,3875342
C33 H64 N4 O3	0,03898175 up	20,106152	564,5044	12,654807
C37 H72 O S	2,62E-04 down	-94,151825	564,519	13,418399
C22 H40 CI N7 O4 S2	4,40E-05 down	-94,29502	565,2278	13,2122965
565.5721@14.310528	7,84E-18 down	-885,5448	565,5721	14,310528
C39 H50 O3	1,64E-05 down	-40,050003	566,3707	0,7771818
C28 H62 N4 O7	0,001199074 up	115,90788	566,4565	12,517962
C33 H33 N3 S3	1,28E-13 down	-2165,769	567,1851	12,1317215
C32 H61 N3 O S2	0,00158246 up	33,802547	567,4223	12,977454
C31 H58 CI N5 O2	6,26E-05 up	326,2902	567,4257	12,864411
C38 H62 CI N	3,72E-05 down	-118,68769	567,4605	12,5741205
C36 H61 N3 S	0,016119791 down	-18,044636	567,4628	11,894574
C23 H53 N17	0,005645108 down	-25,8241	567,4635	12,008999
567.5921@14.579638	6,36E-07 down	-622,28973	567,5921	14,579638
C22 H20 N2 O6 S5	0,00136804 up	81,72011	567,9931	0,34183642
C36 H72 S2	5,47E-05 down	-97,82382	568,5083	13,398129
C21 H13 CI2 N3 O2 S5	5,14E-04 down	-30,168865	568,8983	10,789521
C28 H51 N5 O3 S2	3,67E-04 down	-292,04565	569,3462	11,041068
C17 H13 CI3 N4 O2 S5	0,010879158 down	-26,888824	569,8687	0,38433328
C29 H26 N6 O S3	2,89E-05 up	119,63497	570,1308	0,5515217
C30 H35 CI N2 O7	2,24E-07 up	713,7428	570,21	10,653458
C30 H21 N9 O4	1,15E-05 up	119,146805	571,1697	2,8427453
C29 H45 N7 O5	0,002006156 down	-24,19346	571,3511	0,5732948
C31 H61 N3 O2 S2	0,003606096 down	-44,864414	571,4222	11,901688
C28 H61 N9 O3	3,02E-07 down	-110,23858	571,488	13,214556
N-Oleoyl-D-erythro-Sphingosine (C18:1 Ceramide)	7,18E-07 down	-645,66516	571,51	13,315624
C17 H8 N4 O11 S4	0,02462228 down	-15,911823	571,9103	11,907686
C22 H7 N O10 S4	1,67E-04 up	43,675877	572,8953	12,569908
C33 H62 N6 O2	0,01181059 up	7,6222315	574,965	13,301808
C25 H50 CI N O9 S	1,95E-06 up	496,25833	575,2817	11,068725
C33 H57 N3 O S2	0,015173969 down	-13,499943	575,4015	10,514012
C35 H70 CI2 O	7,35E-04 up	305,2237	576,4758	12,394938
576.7294@12.611401	2,72E-06 down	-111,545235	576,7294	12,611401
C25 H40 CI N3 O6 S2	1,80E-06 up	158,97104	577,2007	6,062236
C31 H31 N9 O3	2,67E-16 down	-436,07013	577,2512	11,0584545
C27 H41 CI2 N9 O	0,003185435 down	-58,80713	577,2851	10,936758
C26 H48 CI N5 O3 S2	0,003601352 down	-38,86498	577,2911	10,700572
C31 H46 O8 S	0,001784631 up	47,12841	578,2888	9,651395
C40 H38 N2 O2	1,25E-05 down	-62,00437	578,2906	11,792555
C37 H70 O4	5,13E-12 down	-4366,6694	578,5293	13,546625
C30 H29 N O S5	0,013318871 up	22,193275	579,0851	0,5919615
C28 H50 CI N O7 S	1,01E-05 down	-382,35117	579,2987	11,268438
C34 H44 S4	0,048478987 down	-8,029616	580,2336	6,7369385
C42 H48 N2	1,90E-09 down	-43,744343	580,3841	7,675231
C32 H52 CI N O2 S2	6,66E-10 down	-3245,7908	581,3121	11,764894
C38 H79 N O2	1,57E-04 down	-98,438385	581,6094	14,791666
582.2276@11.054822	1,13E-04 down	-201,33615	582,2276	11,054822
C35 H38 N2 O2 S2	7,28E-08 down	-461,04947	582,2345	10,391216
C23 H19 CI2 N3 O9 S	0,001642276 down	-34,94768	583,0226	0,45938334
C33 H65 N3 O S2	0,042197257 down	-14,01554	583,4598	11,682802
C38 H65 N O S	2,08E-06 up	858,79333	583,4786	11,9580555
C17 H16 N2 O15 S3	0,03835274 up	16,738438	583,9707	0,34195593
C31 H33 CI N8 S	0,003052856 up	201,21194	584,2221	11,129921
C32 H35 N5 O6	4,39E-07 down	-97,552475	585,2556	10,774158
C38 H51 N S2	0,032861333 down	-6,8590283	585,349	9,450762
C25 H55 N13 O S	0,001479722 down	-91,07828	585,4285	12,166842
C33 H67 N3 O3 S	3,75E-05 up	502,1184	585,4951	12,030834
C39 H71 N S	1,09E-04 down	-222,68573	585,5329	13,391559
C35 H30 N4 O5	2,33E-04 down	-447,75162	586,2199	11,034417
C18 H26 CI N21 O	0,004051973 up	82,074295	587,2283	11,041674
C29 H4 N2 O5 S4	7,39E-06 up	144,85971	587,8991	12,164846
C34 H52 S4	3,60E-08 down	-75,27654	588,296	6,064118
C29 H47 N7 O2 S2	2,28E-04 up	101,15005	589,3225	10,744665
589.5891@12.35661	6,85E-10 down	-115,76783	589,5891	12,35661
C21 H18 O14 S3	9,58E-09 up	572,9755	589,9873	0,34725305

Compound	p (Corr)	Regulation (cancer patients Vs healthy control)	Mass	Retention Time
591.7434@12.615925	0,003574477 down	-17,591772	591,7434	12,615925
C31 H48 N2 O3 S3	0,010990877 down	-8,319603	592,2849	0,70947915
C25 H49 Cl N8 O4 S	0,001755746 down	-32,263485	592,3255	0,40147725
C26 H59 N9 O2 S2	9,41E-04 down	-62,140392	593,4243	11,917719
C36 H59 N5 O2	1,90E-04 down	-300,67545	593,4643	12,550392
C35 H50 N2 O6	3,28E-20 down	-2,2645583	594,3662	1,2758383
C42 H62 N2	0,020519007 up	38,313828	594,4876	12,729659
C31 H46 Cl N O6 S	2,05E-04 up	151,67502	595,2746	11,215817
C39 H81 N S	6,05E-05 down	-84,684	595,6172	14,961259
C21 H46 Cl2 N6 O5 S2	6,29E-07 down	-431,35114	596,2396	10,960201
C27 H48 N16	9,21E-05 down	-57,491333	596,424	6,003208
597.5261@13.328806	1,56E-05 down	-163,1602	597,5261	13,328806
C14 H5 Cl3 O18 S	1,13E-04 down	-47,487537	597,829	0,38858327
C26 H48 Cl3 N5 O4	3,51E-04 up	97,010826	599,2769	10,769397
C27 H61 N5 O3 S3	1,57E-04 down	-94,03613	599,3911	11,31161
C31 H61 N5 O4 S	1,72E-04 down	-167,79843	599,445	12,411621
C34 H65 N9	9,31E-08 down	-112,35738	599,5397	13,4388685
C32 H41 Cl N2 O3 S2	0,038900048 up	14,146953	600,2252	10,355329
C30 H36 Cl N11 O	1,45E-05 down	-73,16218	601,2727	10,755417
C24 H47 N11 O S3	0,015188395 down	-12,773542	601,3109	8,92938
C32 H70 N6 O2 S	0,008920266 down	-29,580875	602,5305	13,437366
C37 H50 Cl N3 O2	4,02E-04 down	-26,803057	603,3598	10,149614
C35 H58 Cl N3 O S	3,68E-04 down	-103,45292	603,3956	11,682944
C33 H70 Cl N5 O2	4,04E-15 up	15411,873	603,5196	12,870975
C34 H44 N4 S3	1,18E-07 up	1309,4497	604,2731	11,038749
C31 H40 N8 O S2	0,030911632 down	-11,889905	604,2762	6,062867
C34 H72 Cl N3 O3	1,16E-07 up	1449,2072	605,5351	13,026102
C24 H18 N2 O7 S5	0,003819962 up	36,04226	605,9635	0,34854177
C37 H35 Cl N2 O2 S	1,49E-04 up	28,3972	606,2072	10,42401
C28 H26 N14 O3	0,004093915 down	-32,226055	606,2262	10,713355
C39 H74 O4	4,49E-11 down	-1786,5663	606,5593	13,701083
C28 H57 N5 O5 S2	5,27E-07 down	-2,1120017	607,3781	5,94608
C28 H61 N7 O5 S	0,021615723 down	-12,935926	607,4403	12,16777
C38 H73 N S2	0,002372499 down	-66,59375	607,5179	13,173299
C23 H20 N12 O9	0,003793572 down	-26,49331	608,1437	0,5794999
C40 H33 Cl N2 O2	0,003504372 up	171,22105	608,2219	10,832072
C33 H38 Cl2 N4 O3	0,011950604 down	-63,078102	608,2328	11,247982
C34 H59 N S4	0,001786154 down	-47,751232	609,3515	10,059462
610.19@5.323917	1,32E-18 down	-211,01083	610,19	5,323917
C37 H30 N4 O5	0,001498581 down	-186,47588	610,2205	10,788895
C19 H42 N6 O14 S	0,007812453 up	64,56242	610,2532	11,727605
C34 H66 Cl N5 O2	1,54E-09 down	-286,80115	611,4918	11,907375
C33 H66 Cl N7 O	5,90E-06 down	-352,6682	611,5051	12,117031
C37 H73 N O5	0,002109535 down	-50,438038	611,5478	13,39269
C32 H32 N6 O S3	2,19E-05 up	27,705095	612,1783	13,053968
C36 H75 N3 O2 S	3,30E-05 down	-219,37018	613,5632	13,494207
C23 H14 N14 O2 S3	1,77E-04 down	-81,23738	614,0621	11,331998
C39 H38 N2 O S2	0,010034961 down	-21,74397	614,2389	8,120786
C40 H70 S2	8,65E-08 up	422,62384	614,4941	13,298326
C39 H57 N3 O3	2,82E-08 down	-214,86465	615,4366	11,928076
C33 H65 N3 O3 S2	7,04E-05 down	-94,133286	615,4494	10,577686
C22 H4 N2 O20	0,006226783 down	-15,126858	615,9352	11,915143
C24 H8 Cl N9 S5	5,91E-07 up	166,02849	616,9234	12,5804205
C34 H35 N9 O3	1,60E-08 up	1125,0792	617,2822	10,765189
C36 H7 Cl O7 S	0,046184856 down	-12,741911	617,9585	0,35852265
C28 H62 N10 O3 S	0,025760233 up	6,9480352	618,4726	9,477833
C36 H58 N8 O	0,003651924 up	36,771954	618,4735	9,60231
C40 H66 N4 O	0,031182863 up	14,078056	618,524	13,344842
C32 H61 N O2 S4	0,03226957 down	-8,162961	619,3569	10,042213
C27 H34 Cl2 N8 O5	9,50E-08 up	272,48926	620,1993	10,908861
C36 H45 Cl N2 O5	1,94E-04 down	-46,273872	620,298	11,78381
C35 H40 N8 O S	7,21E-04 down	-125,46187	620,3033	12,382946
C32 H56 N6 S3	0,002323465 down	-62,372932	620,3734	6,8043017
C36 H36 Cl N5 O S	0,004804696 down	-25,2522	621,2346	10,768724
C32 H63 N O4 S3	0,007348474 down	-10,154299	621,3916	6,6266665
C35 H69 Cl2 N O S	6,53E-04 down	-91,79422	621,4541	12,381369
C35 H67 N5 O2 S	4,73E-06 up	643,9449	621,5069	12,508657
C33 H71 N3 O7	3,12E-06 up	1219,8226	621,5297	12,689019
C41 H80 Cl N	0,005017708 down	-31,943645	621,6008	13,532154
C39 H26 O4 S2	7,46E-06 up	13,674153	622,1277	0,58650005
C20 H18 N18 O3 S2	8,83E-05 up	63,971367	622,1305	0,49874163
C26 H38 N8 O2 S4	4,81E-05 down	-194,35861	622,1971	10,977901
C35 H58 O S4	5,24E-07 down	-70,277	622,3357	10,461124
C29 H50 N16	3,31E-06 down	-123,66562	622,4405	7,7307
C40 H34 Cl N3 O2	0,002324992 down	-23,665953	623,2271	13,275828
C30 H45 N3 O3 S4	1,46E-05 down	-55,78834	623,2333	11,287226
C41 H57 N3 O2	0,002750332 up	73,92723	623,4396	12,402206
C35 H69 N5 O4	0,005638891 down	-26,078857	623,5343	13,336939
C37 H73 N3 O2 S	6,42E-08 up	2340,8174	623,547	12,811384
C33 H56 N2 O5 S2	0,04154492 down	-10,665428	624,3615	9,340884
C27 H3 N3 O6 S5	0,010564902 up	22,854725	624,8647	12,50875
C35 H27 N7 O5	0,003005676 down	-35,491314	625,209	12,724854

Compound	P (Corr)	Regulation (cancer patients Vs healthy control)	Mass	Retention Time
C39 H47 N S3	6,08E-08 up	494,52338	625,2891	6,0629826
C34 H51 N5 O2 S2	0,029442005 down	-5,892829	625,347	9,577844
C35 H71 N5 O2 S	2,91E-06 down	-83,98766	625,5364	13,471899
C27 H17 C3 N6 O4 S	5,80E-07 down	-467,23355	626,0113	9,64592
C33 H54 N8 O4	1,47E-05 up	1571,5468	626,4273	8,08713
C38 H30 Cl N3 O4	7,21E-04 down	-44,477013	627,1895	12,054024
C34 H66 Cl N5 O3	0,001195596 down	-44,686207	627,4901	11,700776
C37 H74 Cl N3 O2	1,52E-05 down	-90,17968	627,5497	13,524363
C39 H78 Cl N O2	0,001009624 down	-45,916653	627,5875	13,427648
C31 H52 N2 O S5	3,83E-06 up	362,9075	628,2704	10,780796
C35 H53 Cl N4 O4	0,009415892 down	-17,829315	628,3735	9,665432
C33 H62 Cl N3 O6	1,43E-04 down	-106,95782	631,4294	11,945015
631.437@12.14616	6,52E-05 down	-64,3939	631,437	12,14616
C35 H33 Cl N8 S	0,016557785 up	10,503404	632,2218	10,736397
C36 H56 N8 O2	1,03E-04 down	-63,763416	632,4517	7,5351515
C35 H71 N S4	0,011329108 down	-27,4123	633,4465	12,155938
C38 H36 Cl2 N4 O	0,010106682 up	33,95077	634,2296	10,890735
C42 H82 Cl N	0,00459873 down	-30,478056	635,6145	13,605956
C41 H64 O3 S	2,86E-09 down	-1082,0881	636,4537	12,585846
C34 H73 Cl2 N5 O	1,94E-04 up	138,66638	637,5266	12,607059
C40 H79 N S2	0,001369077 down	-14,786745	637,5651	13,441854
C38 H58 N2 S3	7,63E-04 down	-52,44276	638,3721	10,3440485
C35 H70 Cl N7 O	8,55E-04 down	-91,25431	639,5307	12,571397
639.5464@12.42119	3,89E-05 up	485,6348	639,5464	12,42119
C24 H52 N10 S5	0,004237046 down	-42,93954	640,2987	12,854255
C31 H65 Cl N12	5,33E-04 up	113,40502	640,5119	13,338726
C40 H28 Cl N7	2,97E-12 down	-2231,7644	641,2099	12,503632
C33 H67 N7 O3 S	0,004893698 down	-30,589582	641,5071	11,754506
C42 H75 N O S	3,74E-09 up	7307,8525	641,5584	12,486784
C46 H75 N	2,09E-09 down	-467,57898	641,5919	13,716542
C35 H65 N O S4	0,034824494 down	-6,1227007	643,3947	10,067878
C38 H61 N O S3	0,007365137 down	-21,256153	643,3953	10,253971
C33 H57 N9 S2	0,046334747 down	-6,9711714	643,4189	11,363159
C40 H61 N5 S	7,12E-04 down	-92,76739	643,4685	12,401736
C40 H69 N O S2	0,013516577 down	-12,281837	643,4831	11,207769
C29 H8 N8 O3 S4	0,028272005 up	17,446112	643,967	12,4216795
C38 H63 N O S3	0,007181017 down	-23,641726	645,4094	9,925885
C37 H69 Cl2 N O S	6,27E-05 down	-117,7525	645,4453	12,113373
C39 H75 N5 O2	2,07E-04 down	-108,92076	645,5973	13,428996
C40 H67 Cl2 N O	0,012804248 down	-19,907484	647,4579	12,400079
C41 H81 N3 S	0,01148661 down	-13,890549	647,6182	13,550943
C35 H67 N7 O4	0,01981366 up	18,96982	649,5263	13,120286
C38 H79 N7 O	0,033540424 down	-5,501067	649,6353	13,682648
C38 H66 Cl N O5	0,02820358 down	-8,911814	651,464	12,186098
C30 H65 N15 O	5,44E-05 down	-55,09002	651,5588	13,454376
C42 H72 Cl N3	1,28E-05 down	-233,2536	653,545	12,404436
C39 H76 Cl N3 O2	1,51E-05 down	-53,6806	653,5591	13,578369
653.6121@13.4305	0,004879911 down	-21,806694	653,6121	13,4305
C40 H75 Cl2 N O	8,07E-04 up	61,29919	655,518	13,099672
C38 H77 N3 O3 S	6,51E-08 down	-191,5364	655,5711	13,702001
C28 H39 Cl3 N8 S2	2,39E-11 down	-1202,2654	656,1787	11,081454
C34 H47 Cl3 S3	2,04E-04 down	-98,9659	656,1793	11,113315
658.091@11.37917	3,41E-04 down	-71,13606	658,091	11,37917
C38 H53 N5 O S2	0,005662719 down	-28,41441	659,3673	10,3921385
C35 H65 N O2 S4	0,0299071 down	-13,9686165	659,3917	9,754903
C37 H62 Cl N5 O3	0,013589146 down	-15,775484	659,4581	12,127939
C35 H67 Cl2 N5 O2	0,004214661 down	-38,42505	659,4701	12,385002
C42 H3 N3 O S3	0,001838486 up	38,142498	660,9492	12,590508
C26 H45 Cl3 N4 O3 S3	0,020475501 down	-31,309307	662,166	10,826518
C37 H62 N2 O8	2,77E-08 down	-3571,3403	662,4469	13,319941
C35 H73 N11 O	8,87E-15 down	-505,93695	663,602	13,320562
C37 H39 Cl3 N2 O S	3,32E-05 down	-250,54036	664,1809	11,261148
C43 H51 N7	1,37E-05 down	-86,61608	665,4189	6,8516536
C35 H67 N7 O S2	8,87E-04 down	-70,837364	665,4871	12,453501
C45 H79 N S	0,017848669 down	-22,665276	665,6016	13,440188
C23 H18 N6 O8 S5	0,022453882 up	21,146627	665,9757	0,34336004
C43 H62 N4 S	1,39E-04 down	-93,99254	666,4691	12,2796955
C39 H81 N5 O3	3,31E-07 down	-90,770515	667,6394	13,567889
C42 H34 Cl2 N2 O2	8,02E-04 down	-95,1935	668,1991	10,759766
C44 H47 N O S2	5,35E-04 down	-38,033604	669,3149	11,946291
C29 H54 Cl N11 O5	0,018228507 down	-11,932163	671,401	7,8295717
C31 H65 N11 O S2	6,29E-11 up	1022,0733	671,4843	8,0888405
C45 H69 N O S	0,035378642 down	-7,6543636	671,5093	11,724469
C42 H73 N O3 S	9,57E-04 down	-96,50697	671,5339	13,133574
C23 H16 N10 O5 S5	8,37E-08 up	623,24896	671,9911	0,34763077
C43 H15 N O8	0,04617064 down	-12,698758	673,0775	0,562339
C38 H38 Cl3 N3 O2	6,33E-04 down	-50,848248	673,2018	11,054515
C25 H14 N4 O13 S3	0,03532403 down	-12,90706	673,9761	12,182606
C36 H63 Cl N8 O2	1,09E-04 down	-27,879322	674,4751	7,274
C30 H17 N3 O14 S	0,007895921 up	37,762367	675,0423	0,63900006
C41 H70 Cl N O2 S	0,033972044 down	-13,343103	675,4854	12,506325



Compound	p (Corr)	Regulation (cancer patients Vs healthy control)	Mass	Retention Time
C30 H66 C1 N13 S	1,69E-04 down	-128,78366	675,5026	12,705037
C35 H31 C13 N4 O4	1,24E-05 up	370,38007	676,1421	10,511217
C36 H72 N2 O5 S2	0,003076892 up	39,643723	676,4875	6,9223547
C41 H75 N S3	0,048052203 up	19,725958	677,5046	13,296999
C31 H41 C13 O8 S	3,46E-07 up	1594,3429	678,1573	11,116558
C37 H62 N10 O2	2,24E-16 down	-20019,07	678,5049	7,507727
C36 H78 C1 N5 O4	1,15E-08 down	-230,08295	679,5713	13,646182
C30 H23 N3 O10 S3	1,23E-04 down	-169,52632	681,0564	0,6214888
C32 H51 N5 O11	5,92E-17 up	4,525119	681,3573	11,580488
C35 H76 C1 N5 O3 S	0,021595784 down	-21,126095	681,5338	13,192855
C39 H75 N3 O4 S	9,02E-04 down	-43,13017	681,5501	12,763842
C29 H48 C12 N4 S5	4,13E-07 down	-751,44916	682,1876	11,2472925
C42 H82 O2 S2	9,43E-05 down	-151,05896	682,5831	14,412758
C49 H21 N3 O2	7,53E-05 up	85,672295	683,1652	10,99863
C38 H78 C1 N7 O	3,54E-08 down	-172,62546	683,5988	13,854749
C40 H77 N9	1,73E-10 down	-569,6924	683,6334	13,464919
C49 H29 C1 O2	0,013287799 down	-22,563995	684,1807	11,1400795
C35 H37 C13 N2 O6	0,001788468 down	-50,014046	686,1705	10,741595
C36 H74 N6 O2 S2	0,011216312 up	29,91165	686,5352	12,932882
C38 H69 N7 S2	0,01675173 down	-10,202232	687,5089	11,24463
C44 H68 C1 N3 O	0,018714974 down	-21,292316	689,5018	12,609326
C37 H79 N5 O2 S2	1,60E-08 down	-586,2831	689,5688	13,991588
C37 H80 C1 N7 O2	0,003619899 up	58,31878	689,6087	15,2527275
689.8247@0.387069	2,58E-04 down	-56,604973	689,8247	0,387069
C30 H6 N6 O15	0,038375277 down	-11,783002	689,9886	9,379436
C31 H10 N6 O12 S	0,004986323 down	-26,130089	690,0062	0,6908624
C39 H66 N2 S4	5,95E-11 up	960,9157	690,4103	9,65258
C29 H57 N17 O3	1,29E-06 down	-62,814007	691,482	11,169888
C43 H81 N O3 S	1,24E-04 down	-38,066566	691,5936	12,438209
C46 H81 N3 O	3,34E-06 down	-88,312355	691,6399	13,463651
C47 H65 C1 N2	0,009672042 up	17,246891	692,485	7,51448
C37 H80 C1 N5 O4	0,015173969 down	-14,146378	693,5945	13,267311
C45 H79 N3 S	0,01669763 down	-12,894936	693,5996	14,373763
C43 H83 N O3 S	8,17E-05 down	-86,516884	693,6178	12,569845
C40 H83 N7 S	2,93E-11 up	11006,7705	693,6423	15,519569
C40 H74 N2 O S3 (2)	0,028442852 down	-5,4528537	694,4997	7,147697
C40 H74 N2 O S3	3,57E-05 down	-80,05507	694,5002	6,710645
C38 H65 N S5	0,044293914 up	10,786575	695,3651	11,580898
C26 H20 N2 O13 S4	6,99E-04 down	-39,50976	695,983	12,186722
C30 H19 N9 O2 S5	0,029514255 down	-15,127573	697,0271	0,51453847
C46 H36 C1 N3 O2	1,75E-04 down	-61,714573	697,2494	13,448752
C43 H71 N S3	1,47E-09 up	429,7164	697,4751	7,514124
C46 H67 N S2	7,67E-05 up	73,75034	697,4751	6,06087
C49 H8 C12 S	0,046334747 up	13,070271	697,9663	0,33926314
C25 H14 N8 O9 S4	5,13E-04 up	55,559856	697,9751	7,5143294
C38 H78 N6 O3 S	1,86E-10 down	-2,781088	698,5887	13,9549465
C40 H73 N7 O S	1,40E-05 up	221,68085	699,5637	12,767711
C44 H32 C1 N3 O4	0,02675541 down	-6,33012	701,207	12,399501
C43 H75 N O2 S2	3,61E-06 down	-159,75026	701,5273	11,486917
C32 H18 N10 O10	4,83E-08 down	-89,84932	702,1158	11,422151
C39 H74 O8 S	7,54E-04 down	-57,847652	702,5114	12,594592
C38 H38 C12 N2 O3 S2	0,020430533 down	-22,690762	704,1726	10,6359415
C45 H28 N4 O5	4,49E-09 down	-62,81355	704,2071	12,399751
C44 H67 N O2 S2	7,18E-05 up	186,73598	705,4608	7,5124297
C38 H6 N6 O4 S3	3,17E-05 up	217,40858	705,9617	7,513259
C37 H45 C13 O3 S2	5,32E-05 up	471,51343	706,1883	11,752769
C48 H66 O4	1,75E-11 down	-192,9598	706,4992	7,9545
C37 H78 N4 S4	2,68E-05 up	226,49818	706,5181	13,014692
C41 H73 N O6 S	6,46E-05 up	157,30945	707,5117	13,304866
C44 H82 C1 N O3	1,94E-05 down	-46,970943	707,6026	13,660842
C42 H35 N3 S4	1,33E-04 up	103,358284	709,1702	11,260399
C42 H63 N S4	0,004156141 up	30,035425	709,3857	11,5905
C44 H71 N O2 S2	0,03141639 down	-14,500074	709,4963	12,4193945
C44 H71 N O4 S	0,013809574 up	29,489222	709,5174	7,5180993
C43 H10 N4 O8	0,044907432 up	11,217435	710,0539	0,62607414
C35 H74 N4 O4 S3	0,019257449 down	-14,029755	710,4853	12,306973
C32 H71 C1 N10 O S2	0,00451799 down	-35,902794	710,502	7,536377
C44 H86 C1 N O3	1,01E-05 down	-234,04153	711,6364	14,0185585
C45 H79 N O3 S	1,47E-04 down	-371,65787	713,5808	13,375862
C40 H73 N7 S2	8,09E-06 down	-171,89883	715,5381	11,747164
C44 H74 C1 N O4	7,33E-05 down	-92,05107	715,5414	12,648708
C37 H74 C1 N7 O4	4,79E-06 up	424,9108	715,5578	12,659026
C31 H43 N9 O7 S2	3,62E-05 up	94,923645	717,2695	9,107959
C28 H27 N23 O2	0,001355327 up	33,369457	717,2711	8,691065
C34 H71 N9 O S3	5,31E-06 down	-141,19847	717,5008	12,19269
C48 H67 N3 O2	0,010330845 down	-55,632584	717,5163	12,770947
C43 H75 N O5 S	0,002208537 up	77,01499	717,5324	13,1717005
C43 H79 N3 O S2	0,011113839 down	-48,448467	717,5672	13,787904
C43 H58 N8 S	6,16E-04 down	-47,341137	718,4558	10,970842
C39 H81 N3 O2 S3	1,47E-07 down	-272,9053	719,5526	13,641828
C33 H69 N17 O	5,40E-04 down	-250,69402	719,5825	14,02916
C28 H24 N4 O9 S5	3,65E-05 up	184,45442	720,0213	13,04937

Compound	P (Corr)	Regulation (cancer patients Vs healthy control)	Mass	Retention Time
C36 H36 Cl N3 O9 S	6,17E-07 down	-152,97404	721,196	10,766036
C47 H67 N3 O3	4,62E-05 down	-231,2235	721,5162	12,993958
C49 H71 N O S	0,001225498 up	12,834985	721,5219	13,316124
C22 H18 N12 O11 S3	5,12E-04 up	122,503075	722,0382	13,216388
C41 H51 Cl2 N O4 S	2,28E-07 up	476,22897	723,2952	11,024611
C46 H77 N O3 S	2,42E-19 up	5,358408	723,5626	7,516135
C33 H31 Cl3 O2 S5	0,026024032 up	15,124793	723,9931	0,35032505
C42 H16 Cl N3 O4 S2	0,001580317 up	81,11866	725,0334	13,1850815
C33 H54 Cl3 N3 S4	7,81E-04 up	120,374146	725,2311	10,723362
C46 H83 N3 O3	4,16E-07 down	-565,97485	725,6502	14,082599
C29 H48 Cl3 N7 O6 S	4,00E-08 up	2029,8278	727,2465	11,248687
C46 H33 Cl N2 O S2	4,12E-08 down	-87,02822	728,1654	10,754428
C31 H47 N5 O7 S4	1,46E-05 down	-237,97885	729,2244	13,209142
C36 H50 Cl3 N O8	1,73E-08 up	3386,8538	729,2631	11,741461
C36 H42 O8 S4	0,037730694 down	-13,371353	730,1801	10,72871
C39 H77 N3 O3 S3	8,76E-04 down	-27,239588	731,5125	12,432208
C44 H64 N2 O3 S2	6,66E-07 up	384,7654	732,4369	7,5153503
C41 H80 O2 S4	4,69E-04 down	-43,0366	732,5105	12,319143
733.5544@12.522415	0,001975813 up	52,335976	733,5544	12,522415
C36 H71 N13 O S	0,03358529 down	-13,162591	733,5628	13,742669
C33 H21 N9 O2 S5	0,014840765 up	28,987364	735,0436	13,295294
735.5391@13.320068	0,005590912 up	32,48822	735,5391	13,320068
C37 H73 Cl N4 O2 S3 (2)	3,67E-05 down	-245,337	736,4553	7,4673996
C37 H73 Cl N4 O2 S3	3,05E-07 down	-1198,8021	736,4559	7,5708127
736.474@7.5017805	2,43E-04 up	110,547295	736,474	7,5017805
C48 H68 N2 S2	0,009079359 down	-20,61119	736,4852	11,193322
C49 H74 Cl N3	0,00405547 down	-60,120308	739,5512	13,433518
C42 H81 N11	0,047213975 down	-4,505074	739,6691	14,21435
C32 H64 N14 S3	0,001686213 down	-36,77295	740,4664	10,998869
C41 H79 N3 O6 S	0,004617891 down	-3,877218	741,5677	13,63599
C43 H87 N3 S3	3,00E-06 down	-192,73344	741,609	13,498601
C42 H78 S5	1,85E-18 down	-3203,081	742,4732	7,514411
C45 H81 N3 O S2	1,09E-04 down	-688,33984	743,5833	13,785623
745.5142@13.101241	0,008481226 up	76,07415	745,5142	13,101241
C37 H79 N9 O4 S	0,03151284 down	-44,78153	745,5986	14,029785
C41 H78 O7 S2	0,042094726 down	-4,2314186	746,5228	12,606274
747.2961@10.781781	7,53E-05 up	111,539	747,2961	10,781781
C31 H68 Cl N15 O2 S	5,80E-07 down	-187,50548	749,5034	12,520941
C41 H67 N9 O4	0,010879158 down	-14,778642	749,5355	12,778379
752.4279@7.4792967	6,40E-04 down	-87,757355	752,4279	7,4792967
C55 H2 N2 O4	0,0012318 up	62,321003	754,0066	0,35527286
754.5199@12.330217	8,82E-05 down	-54,65793	754,5199	12,330217
755.5493@13.398682	7,57E-05 up	523,20233	755,5493	13,398682
755.9545@0.45658067	3,28E-04 down	-39,065487	755,9545	0,45658067
C30 H46 Cl3 N5 O9 S	1,12E-07 down	-2820,13	757,2141	13,430876
C30 H62 N16 O S3	0,044895966 up	12,558496	758,4403	7,5162997
758.4887@11.204125	0,01726004 down	-12,669077	758,4887	11,204125
759.5679@11.76604	0,009761187 down	-22,06161	759,5679	11,76604
760.159@13.802705	0,021955162 down	-26,049412	760,159	13,802705
760.2133@13.457648	2,15E-04 down	-174,1819	760,2133	13,457648
760.5192@13.145681	2,49E-07 down	-471,3984	760,5192	13,145681
761.5032@13.026462	4,18E-05 up	349,7488	761,5032	13,026462
761.9698@11.030121	1,81E-09 up	1634,8569	761,9698	11,030121
762.0128@13.28682	4,48E-06 down	-306,8997	762,0128	13,28682
763.4682@7.5321054	3,73E-09 down	-110,92354	763,4682	7,5321054
763.5148@13.060026	0,04445581 down	-16,246597	763,5148	13,060026
767.5836@13.649892	0,031166537 down	-3,893405	767,5836	13,649892
768.1852@0.57861453	0,008452523 down	-7,7642264	768,1852	0,57861453
768.4011@7.5148005	8,66E-09 up	2500,2607	768,4011	7,5148005
769.0381@12.607526	0,022821462 down	-8,215394	769,0381	12,607526
769.5998@13.846641	2,74E-05 down	-901,99316	769,5998	13,846641
769.9545@11.033002	1,90E-09 up	1908,657	769,9545	11,033002
770.4552@11.031941	3,46E-10 up	1862,5247	770,4552	11,031941
771.2655@13.603835	4,53E-04 down	-109,404594	771,2655	13,603835
771.4401@11.0061655	0,001084084 down	-24,193563	771,4401	11,0061655
771.5261@13.132096	0,035478517 up	23,642233	771,5261	13,132096
773.6044@13.940491	4,12E-04 down	-376,40323	773,6044	13,940491
775.2279@12.677608	0,01335007 down	-9,276516	775,2279	12,677608
775.56@13.287462	0,017618926 down	-52,801376	775,56	13,287462
778.2226@12.6779995	5,20E-21 down	-1118,8582	778,2226	12,6779995
779.0486@13.7327175	0,002281569 up	59,802856	779,0486	13,7327175
779.6929@14.367177	4,00E-08 down	-117,200325	779,6929	14,367177
781.7044@14.610909	2,67E-11 down	-3127,9795	781,7044	14,610909
782.9609@11.0415	7,77E-06 up	232,48593	782,9609	11,0415
783.4801@6.8562317	0,003118961 down	-25,586468	783,4801	6,8562317
783.58@13.623179	0,033540424 down	-13,041475	783,58	13,623179
784.4906@11.041081	1,15E-06 down	-150,85922	784,4906	11,041081
785.5968@13.864352	0,027565883 down	-137,09407	785,5968	13,864352
787.5187@13.091159	6,95E-04 up	152,52899	787,5187	13,091159
789.2394@13.023227	2,68E-17 down	-5197,0503	789,2394	13,023227
789.5672@13.529342	0,009294834 down	-29,8848	789,5672	13,529342
789.5777@11.531382	1,09E-06 down	-212,9002	789,5777	11,531382

Compound	p (Corr)	Regulation (cancer patients Vs healthy control)	Mass	Retention Time
790.5476@12.6124115	0,007154996 down	-28,256304	790,5476	12,6124115
791.052@12.609223	0,031169314 down	-12,131144	791,052	12,609223
791.5883@9.656213	0,010311978 down	-6,8993864	791,5883	9,656213
792.088@9.653887	1,46E-05 down	-138,65808	792,088	9,653887
792.447@7.5136924	3,31E-09 up	729,0796	792,447	7,5136924
793.0447@13.58591	0,024788206 down	-14,835696	793,0447	13,58591
795.5344@10.767446	0,002415862 down	-28,538073	795,5344	10,767446
795.6127@13.962562	0,015244965 down	-82,50667	795,6127	13,962562
797.3374@6.0620003	3,11E-09 up	489,34613	797,3374	6,0620003
797.3899@12.741193	0,002424649 up	66,04098	797,3899	12,741193
797.535@13.25282	1,47E-09 up	3232,1672	797,535	13,25282
797.6586@13.413524	6,20E-07 down	-118,380615	797,6586	13,413524
798.6597@13.874434	0,001855136 down	-236,31139	798,6597	13,874434
799.3804@7.5225997	0,016722236 down	-15,000124	799,3804	7,5225997
799.4402@11.03752	3,83E-05 up	138,5764	799,4402	11,03752
801.542@13.370749	0,03607508 up	34,173534	801,542	13,370749
802.517@11.245967	7,32E-04 down	-48,58612	802,517	11,245967
803.0143@11.240042	4,69E-07 down	-92,47778	803,0143	11,240042
803.369@7.487755	0,015072997 down	-35,29314	803,369	7,487755
805.7126@14.451845	9,95E-10 down	-116,95275	805,7126	14,451845
806.453@10.79092	1,83E-05 up	184,1386	806,453	10,79092
809.6701@13.35722	0,001211321 down	-113,232025	809,6701	13,35722
809.7379@14.965076	2,09E-09 down	-233,08891	809,7379	14,965076
812.5387@13.421567	7,35E-05 up	263,41452	812,5387	13,421567
813.0291@13.446649	0,010384114 up	27,545794	813,0291	13,446649
813.065@12.612882	1,20E-05 down	-107,60337	813,065	12,612882
813.6046@12.659847	0,037987355 down	-13,505432	813,6046	12,659847
814.6867@14.27342	0,0394561 up	53,3716	814,6867	14,27342
817.5978@13.640619	0,009240921 down	-48,202366	817,5978	13,640619
818.4543@10.767022	7,70E-05 up	105,53412	818,4543	10,767022
819.5825@13.568094	5,90E-06 down	-584,4899	819,5825	13,568094
819.59@11.334151	0,049874995 down	-4,4898634	819,59	11,334151
819.6114@13.884416	8,41E-09 down	-2500,2441	819,6114	13,884416
821.0986@0.576975	6,64E-14 down	-1268,727	821,0986	0,576975
821.6276@14.030076	0,004547618 down	-123,732346	821,6276	14,030076
823.4396@13.051874	0,027693825 up	31,716457	823,4396	13,051874
824.5381@11.261698	0,003070294 down	-26,15028	824,5381	11,261698
825.0247@11.26	0,001562341 down	-32,9744	825,0247	11,26
826.368@7.5206194	1,69E-05 up	146,43916	826,368	7,5206194
828.5739@12.593338	5,32E-05 up	138,79211	828,5739	12,593338
829.4319@13.2047	0,031093119 down	-36,98521	829,4319	13,2047
829.5619@13.348354	2,13E-04 up	341,19067	829,5619	13,348354
829.6414@12.395817	0,010023993 down	-18,713276	829,6414	12,395817
830.4433@7.5608563	6,59E-08 up	854,4727	830,4433	7,5608563
831.2342@13.599335	2,82E-05 down	-252,36804	831,2342	13,599335
833.5985@11.5667	0,002282374 down	-21,892168	833,5985	11,5667
834.2291@13.631414	1,68E-07 down	-744,2523	834,2291	13,631414
834.5724@12.610849	5,32E-05 down	-87,57777	834,5724	12,610849
835.7439@15.035132	1,18E-09 down	-160,14755	835,7439	15,035132
837.5115@13.466757	3,61E-07 down	-562,8576	837,5115	13,466757
837.6242@14.029717	0,012976695 down	-71,876564	837,6242	14,029717
837.7753@15.412952	7,53E-04 down	-113,55498	837,7753	15,412952
839.5511@10.801081	4,26E-11 down	-251,20537	839,5511	10,801081
839.6025@13.437275	1,76E-06 up	459,84964	839,6025	13,437275
841.459@13.3447485	2,56E-04 down	-124,14596	841,459	13,3447485
841.5846@12.495526	0,001738959 up	38,13822	841,5846	12,495526
845.2865@13.749249	7,95E-12 down	-271,29205	845,2865	13,749249
846.5366@11.2794	3,38E-05 down	-95,702545	846,5366	11,2794
847.0424@11.27936	4,23E-04 down	-43,154766	847,0424	11,27936
847.458@7.5149207	8,57E-14 up	1608,5356	847,458	7,5149207
847.6181@11.800777	5,31E-04 down	-25,32094	847,6181	11,800777
849.2435@12.90223	0,011950604 down	-23,183355	849,2435	12,90223
851.4356@13.092303	0,023686584 up	25,762335	851,4356	13,092303
852.2438@12.904944	3,10E-12 down	-165,29955	852,2438	12,904944
852.3546@7.513222	9,91E-32 down	-9691,441	852,3546	7,513222
853.4676@13.283632	7,93E-04 down	-101,71353	853,4676	13,283632
853.5517@13.354429	0,0424418 up	23,152964	853,5517	13,354429
855.0778@0.88517994	0,012813608 down	-9,700933	855,0778	0,88517994
855.4667@13.439183	8,11E-07 down	-909,8392	855,4667	13,439183
855.5687@13.650001	0,001033485 up	112,51819	855,5687	13,650001
857.371@12.957262	3,03E-08 up	1619,6707	857,371	12,957262
857.6432@12.662271	2,77E-12 down	-607,91486	857,6432	12,662271
859.6132@12.461782	4,30E-05 up	265,14963	859,6132	12,461782
859.6366@12.520674	0,018797692 up	16,729656	859,6366	12,520674
861.6186@12.659359	4,90E-04 up	2,2612283	861,6186	12,659359
861.6378@11.833786	0,030447567 down	-2,2789488	861,6378	11,833786
863.2601@13.21419	5,33E-04 down	-66,93251	863,2601	13,21419
863.5084@13.557276	1,58E-09 down	-1080,7877	863,5084	13,557276
863.6012@13.392656	2,44E-06 up	420,35144	863,6012	13,392656
Retinoic acid	1,26E-08 down	-128,88216	863,6179	11,356807
863.7201@7.514913	1,72E-06 down	-176,07808	863,7201	7,514913
865.5348@13.856864	2,61E-04 down	-61,02251	865,5348	13,856864



Compound	P (Corr)	Regulation (cancer patients Vs healthy control)	Mass	Retention Time
868.5633@11.298947	5.38E-04 down	-33,751038	868,5633	11,298947
869.0556@11.295554	3.45E-06 down	-39,29901	869,0556	11,295554
871.1744@0.58202946	7.16E-09 up	52,82077	871,1744	0,58202946
871.5267@13.217606	3.03E-08 up	2281,6787	871,5267	13,217606
878.3014@7.5183926	3,91E-15 up	1977,4176	878,3014	7,5183926
879.4906@13.40523	5,46E-05 up	204,43515	879,4906	13,40523
879.8215@16.543568	3,03E-04 down	-44,866093	879,8215	16,543568
880.4298@13.00687	7,66E-05 up	194,64655	880,4298	13,00687
882.4281@13.620292	2,86E-10 down	-4138,7446	882,4281	13,620292
883.387@13.046856	1,92E-05 up	464,6273	883,387	13,046856
885.396@13.208855	0,004518997 down	-67,54644	885,396	13,208855
885.5006@13.393572	2,61E-04 up	110,140495	885,5006	13,393572
889.6696@12.125711	3,79E-04 down	-110,51562	889,6696	12,125711
890.5667@11.31334	4,17E-13 down	-1083,0507	890,5667	11,31334
891.0714@11.310158	7,84E-18 down	-416,29675	891,0714	11,310158
892.4549@13.653439	9,37E-09 down	-166,17415	892,4549	13,653439
893.1543@0.5277954	0,005140195 down	-23,671577	893,1543	0,5277954
895.4701@13.404159	1,97E-04 up	158,6691	895,4701	13,404159
895.7615@14.5754385	2,05E-05 down	-110,37205	895,7615	14,5754385
897.6029@11.126553	0,038973726 down	-2,0940692	897,6029	11,126553
897.7692@14.793055	0,022874806 down	-19,684534	897,7692	14,793055
901.6856@12.661502	0,004475378 down	-25,005741	901,6856	12,661502
902.0002@0.6819999	3,24E-05 down	-55,48366	902,0002	0,6819999
903.8157@15.345958	5,46E-05 up	236,859	903,8157	15,345958
904.4121@13.39856	0,003411694 down	-64,63348	904,4121	13,39856
905.665@11.847286	0,028435495 down	-4,128103	905,665	11,847286
906.4269@13.450363	6,54E-06 down	-603,64655	906,4269	13,450363
906.4466@13.05579	3,10E-08 up	1990,1008	906,4466	13,05579
906.5971@13.288105	1,54E-05 down	-38,347656	906,5971	13,288105
908.4277@13.619285	2,87E-13 down	-7781,12	908,4277	13,619285
908.4475@13.9228945	7,43E-07 down	-269,08807	908,4475	13,9228945
908.4585@13.197655	0,001167367 up	101,213356	908,4585	13,197655
910.4579@13.9755335	2,56E-16 down	-6935,0576	910,4579	13,9755335
911.2707@7.4379635	9,32E-04 up	51,615658	911,2707	7,4379635
911.2734@7.6164064	1,64E-05 up	193,22578	911,2734	7,6164064
912.5799@11.329174	1,76E-11 down	-669,2556	912,5799	11,329174
914.2134@0.4998164	2,08E-04 up	72,2014	914,2134	0,4998164
914.2152@0.58300006	0,010879158 up	13,546159	914,2152	0,58300006
915.2666@7.5287223	0,030697184 up	31,325808	915,2666	7,5287223
923.2656@13.091137	3,35E-11 down	-1539,8462	923,2656	13,091137
923.5022@14.027311	6,59E-08 down	-149,81174	923,5022	14,027311
925.5355@14.214599	1,03E-04 down	-166,66484	925,5355	14,214599
926.5216@13.562159	2,36E-06 up	795,6942	926,5216	13,562159
928.5366@13.716444	8,99E-05 up	253,09242	928,5366	13,716444
933.6931@12.137452	0,009672528 down	-26,6012	933,6931	12,137452
934.4559@13.790538	1,45E-09 down	-275,53677	934,4559	13,790538
934.5961@11.345815	1,22E-28 down	-2969,9314	934,5961	11,345815
935.0968@11.34323	3,02E-21 down	-241,97682	935,0968	11,34323
935.5375@12.664245	3,06E-06 up	261,12155	935,5375	12,664245
936.2018@0.53666663	0,032012504 down	-11,564227	936,2018	0,53666663
937.2785@13.370154	6,95E-04 down	-57,17935	937,2785	13,370154
937.5166@14.082913	9,18E-20 down	-25103,877	937,5166	14,082913
939.5396@14.324152	0,008772024 down	-41,820984	939,5396	14,324152
939.6108@13.241499	1,30E-06 down	-70,49046	939,6108	13,241499
940.538@14.188198	0,001346514 down	-45,07813	940,538	14,188198
941.6244@11.154674	0,006025184 down	-11,838455	941,6244	11,154674
942.9821@0.3474808	0,001205248 down	-48,468777	942,9821	0,3474808
944.4396@14.059941	4,65E-06 down	-66,15635	944,4396	14,059941
945.7002@13.254459	0,001855136 down	-20,281273	945,7002	13,254459
945.7143@12.659179	0,003429044 down	-28,679264	945,7143	12,659179
948.4371@14.003073	1,42E-14 down	-468,29474	948,4371	14,003073
948.5061@13.370229	3,75E-05 up	186,95372	948,5061	13,370229
949.6855@11.861221	0,003819962 down	-12,9179535	949,6855	11,861221
950.5205@13.4424715	2,96E-09 up	1445,3555	950,5205	13,4424715
952.5366@13.6045065	2,86E-12 up	2378,5618	952,5366	13,6045065
952.832@5.0526	0,018677715 up	19,02403	952,832	5,0526
954.5526@13.842069	6,03E-06 up	701,4892	954,5526	13,842069
956.612@11.3608	4,37E-35 down	-1802,8324	956,612	11,3608
957.6641@13.239103	4,04E-08 down	-939,7921	957,6641	13,239103
958.1823@0.51103663	1,72E-04 up	55,824257	958,1823	0,51103663
959.4309@13.501859	3,77E-12 down	-761,42865	959,4309	13,501859
963.7064@12.224317	0,027735334 down	-2,4977336	963,7064	12,224317
968.4294@13.926919	1,87E-13 down	-1960,1282	968,4294	13,926919
969.7074@13.142581	0,03831682 down	-14,067194	969,7074	13,142581
971.7243@13.265501	0,003793572 down	-31,292795	971,7243	13,265501
972.438@14.16984	0,003740619 down	-25,071434	972,438	14,16984
972.6172@10.747542	8,18E-06 up	194,75363	972,6172	10,747542
974.5198@13.415947	2,23E-12 up	3239,99	974,5198	13,415947
977.7207@12.135	6,02E-05 down	-147,89723	977,7207	12,135
978.5523@13.695164	1,06E-06 up	519,42206	978,5523	13,695164
978.5944@6.061178	2,30E-08 up	43,03337	978,5944	6,061178

Compound	p (Corr)	Regulation (cancer patients Vs healthy control)	Mass	Retention Time
978.6185@11.373285	9,22E-19 down	-217,88177	978,6185	11,373285
979.2692@13.908343	8,20E-07 down	-272,9596	979,2692	13,908343
983.4259@13.4807205	4,72E-21 down	-4476,125	983,4259	13,4807205
985.6545@11.179654	2,86E-13 down	-351,35257	985,6545	11,179654
987.6915@13.311717	5,25E-05 down	-96,675186	987,6915	13,311717
988.4091@13.429215	0,002778188 down	-40,41347	988,4091	13,429215
989.1189@0.4972706	0,016312316 up	12,923763	989,1189	0,4972706
989.1193@0.58338195	0,021615723 down	-12,1961355	989,1193	0,58338195
989.742@12.659558	2,07E-04 down	-46,224117	989,7415	12,659558
990.6661@11.037739	2,96E-07 up	10,223944	990,6661	11,037739
991.7366@12.5542345	0,005883258 down	-19,185974	991,7366	12,5542345
993.711@11.8735	2,80E-05 down	-97,80943	993,711	11,8735
995.4724@14.06909	0,011030995 down	-23,497747	995,4724	14,06909
997.2788@13.2471075	0,004146744 down	-32,012844	997,2788	13,2471075
1000.299@13.248322	6,00E-08 down	-190,91707	1000,299	13,248322
1002.1444@11.028437	2,03E-06 up	349,8834	1002,1444	11,028437
1005.7461@12.403526	0,040097736 down	-12,011836	1005,7461	12,403526
1007.7256@12.233803	0,003291057 down	-13,677627	1007,7256	12,233803
1009.6331@11.027981	1,32E-05 up	230,01459	1009,6331	11,027981
1010.1302@11.02634	5,38E-06 up	246,69296	1010,1302	11,02634
1011.3167@13.495	1,05E-06 down	-96,340706	1011,3167	13,495
1016.6789@11.191609	1,98E-09 up	1579,1968	1016,6789	11,191609
1017.1078@0.50021785	0,01726004 down	-16,1513	1017,1078	0,50021785
1017.6745@11.041875	0,002317611 up	45,58329	1017,6745	11,041875
1018.1117@11.0294	2,20E-06 up	439,3504	1018,1117	11,0294
1021.6545@12.401512	0,002317611 up	27,414349	1021,6545	12,401512
1023.6695@12.574772	0,024818286 up	2,7955382	1023,6695	12,574772
1026.0656@0.54725	1,23E-04 down	-82,61864	1026,0656	0,54725
1033.0853@0.5073867	0,014967507 down	-15,420346	1033,0853	0,5073867
1035.7635@12.557419	0,012847452 down	-8,456791	1035,7635	12,557419
1037.7324@11.885501	1,85E-12 down	-811,0793	1037,7324	11,885501
1040.679@11.047158	0,003793572 up	64,98821	1040,679	11,047158
1042.0359@0.525875	1,27E-06 down	-37,782307	1042,0359	0,525875
1042.696@11.212072	7,63E-05 up	285,82965	1042,696	11,212072
1048.052@0.4848889	2,33E-06 down	-77,77858	1048,052	0,4848889
1048.607@11.057657	1,98E-16 down	-3038,1018	1048,607	11,057657
1049.7751@12.404897	1,41E-04 down	-65,0807	1049,7751	12,404897
1051.6976@12.803095	0,002654094 up	35,4586	1051,6976	12,803095
1051.7584@12.242937	6,70E-09 down	-436,5417	1051,7584	12,242937
1053.2885@14.100973	4,95E-07 down	-356,37045	1053,2885	14,100973
1054.6295@11.044743	0,040936615 down	-9,725946	1054,6295	11,044743
1065.3289@13.198051	3,99E-06 up	230,27853	1065,3289	13,198051
1065.7725@12.152202	3,42E-04 down	-40,276005	1065,7725	12,152202
1069.7769@13.729189	1,20E-04 down	-84,20065	1069,7769	13,729189
1072.303@13.365393	2,79E-05 down	-62,65091	1072,303	13,365393
1072.8173@13.199337	6,27E-09 up	1670,4779	1072,8173	13,199337
1073.3184@13.20329	3,33E-09 up	1586,7686	1073,3184	13,20329
1075.8206@13.203124	1,41E-09 up	1469,0872	1075,8206	13,203124
1076.326@13.203345	5,70E-10 up	1511,6713	1076,326	13,203345
1077.5726@11.032963	0,001595611 up	97,66798	1077,5726	11,032963
1079.7894@12.563518	0,006495447 down	-5,4387603	1079,7894	12,563518
1080.5586@11.031135	0,006509685 up	68,70304	1080,5586	11,031135
1081.3026@13.195404	7,60E-06 up	368,92883	1081,3026	13,195404
1081.7463@11.840126	3,00E-06 down	-41,741745	1081,7463	11,840126
1081.8044@13.195612	7,47E-05 up	202,46893	1081,8044	13,195612
1085.309@13.616908	1,12E-05 down	-127,40061	1085,309	13,616908
1086.3195@13.259196	7,46E-05 up	130,87968	1086,3195	13,259196
1093.8029@12.404958	5,15E-09 down	-596,1372	1093,8029	12,404958
1093.8066@13.229508	6,88E-07 up	464,07477	1093,8066	13,229508
1094.305@13.233687	3,75E-05 up	171,79103	1094,305	13,233687
1095.7808@12.249399	1,60E-26 down	-1286,0521	1095,7808	12,249399
1096.61@10.900001	3,90E-06 down	-68,82835	1096,61	10,900001
1099.3285@13.964686	1,92E-06 down	-189,95178	1099,3285	13,964686
1102.3011@13.203725	4,03E-07 up	539,5647	1102,3011	13,203725
1102.3297@13.946667	1,10E-07 down	-52,584965	1102,3297	13,946667
1103.5511@10.893275	3,59E-04 up	89,040474	1103,5511	10,893275
1105.3018@13.217949	3,74E-07 up	577,1147	1105,3018	13,217949
1105.5634@11.116726	0,002424649 up	55,216255	1105,5634	11,116726
1105.7996@13.219732	7,46E-06 up	278,00757	1105,7996	13,219732
1109.7981@12.157841	9,97E-10 down	-756,74304	1109,7981	12,157841
1113.5435@11.017415	3,91E-04 up	110,10836	1113,5435	11,017415
1117.5295@11.02553	0,04489921 up	19,956009	1117,5295	11,02553
1123.815@12.568544	7,31E-05 down	-68,55979	1123,815	12,568544
1127.3037@14.325577	3,19E-04 down	-64,05841	1127,3037	14,325577
1133.7762@13.197474	0,040210545 down	-14,0438795	1133,7762	13,197474
1137.8313@12.406589	4,14E-17 down	-433,53998	1137,8313	12,406589
1141.528@11.045519	3,41E-08 up	1282,6578	1141,528	11,045519
1145.2968@13.483973	2,46E-05 down	-106,079	1145,2968	13,483973
1147.3258@13.584333	0,0036096 down	-28,219597	1147,3258	13,584333
1153.8247@12.1623335	5,40E-19 down	-851,07635	1153,8247	12,1623335
1155.3094@13.536382	1,49E-08 up	531,62006	1155,3094	13,536382
1155.8112@13.547217	3,72E-08 up	457,44238	1155,8112	13,547217



Compound	p (Corr)	Regulation (cancer patients Vs healthy control)	Mass	Retention Time
1158.3157@13.573446	6.82E-04up	70.60077	1158.3157	13.573446
1158.8195@13.547678	0.048461184up	13.159887	1158.8195	13.547678
1161.846@13.696797	0.003092258down	-28.78949	1161.846	13.696797
1162.3348@13.727821	0.003129503down	-22.20679	1162.3348	13.727821
1163.7969@13.497939	9.91E-04up	64.442825	1163.7969	13.497939
1164.3@13.532376	7.83E-09up	732.3555	1164.3	13.532376
1164.8007@13.526795	0.008468236up	28.861591	1164.8007	13.526795
1165.5352@11.004964	0.009747072up	29.538279	1165.5352	11.004964
1167.3062@13.528796	0.001804382up	52.71283	1167.3062	13.528796
1167.5562@11.206708	4.27E-05up	240.72545	1167.5562	11.206708
1167.8436@12.571806	5.60E-08down	-264.2106	1167.8436	12.571806
1168.8192@13.569018	2.29E-04up	109.72055	1168.8192	13.569018
1171.336@13.748125	6.76E-09up	955.4899	1171.336	13.748125
1171.8383@13.723412	5.96E-06up	242.4655	1171.8383	13.723412
1176.8088@13.543354	0.01666915up	15.979334	1176.8088	13.543354
1179.8297@13.705526	0.024061965up	19.32175	1179.8297	13.705526
1184.3235@13.537867	0.011216312up	23.571955	1184.3235	13.537867
1184.851@13.777039	0.003260683up	50.019516	1184.851	13.777039
1187.5262@10.773902	0.002359895up	38.170822	1187.5262	10.773902
1193.7913@13.141798	0.008511232up	22.188515	1193.7913	13.141798
1194.8175@13.484771	4.34E-04up	77.184784	1194.8175	13.484771
1197.8503@12.1632	2.78E-14down	-77.721146	1197.8503	12.1632
1201.3217@14.59832	3.69E-14down	-1307.6833	1201.3217	14.59832
1203.3011@13.4599495	6.72E-05up	163.17493	1203.3011	13.4599495
1203.804@13.444907	1.36E-09up	1164.254	1203.804	13.444907
1206.8116@13.465752	5.79E-06up	212.03154	1206.8116	13.465752
1211.5262@10.763587	2.42E-04up	110.63406	1211.5262	10.763587
1211.8677@12.576212	3.73E-40down	-2390.8257	1211.8677	12.576212
1215.7997@13.448502	2.23E-06up	226.72453	1215.7997	13.448502
1218.8044@13.431806	1.83E-04up	93.67762	1218.8044	13.431806
1224.2911@13.445264	0.002856151up	45.10546	1224.2911	13.445264
1227.7985@13.42321	0.002969159up	38.954334	1227.7985	13.42321
1272.2476@0.5804895	0.02536636up	6.227335	1272.2476	0.5804895
1274.1971@0.581352	0.026326757up	17.039856	1274.1971	0.581352
1275.3445@14.930764	3.93E-07down	-84.35288	1275.3445	14.930764
1294.2213@0.5575778	0.040210545down	-10.346465	1294.2213	0.5575778
1312.162@0.57889473	0.002637335down	-25.519947	1312.162	0.57889473
1340.1324@0.536372	0.045670222down	-10.002495	1340.1324	0.536372
1358.832@13.119722	5.38E-05up	100.46179	1358.832	13.119722
1405.1313@13.195722	1.10E-05up	368.03223	1405.1313	13.195722
1416.6108@13.191057	1.02E-04up	102.49702	1416.6108	13.191057
1424.5999@13.191283	1.77E-05up	199.15906	1424.5999	13.191283
1485.9908@11.023999	8.82E-05up	185.79822	1485.9908	11.023999
1534.0967@13.534526	1.86E-06up	262.2359	1534.0967	13.534526
1534.5825@13.533201	2.11E-06up	225.21645	1534.5825	13.533201
1539.1147@13.558585	3.23E-04down	-105.69648	1539.1147	13.558585
1546.5872@13.515499	0.003336156up	38.949326	1546.5872	13.515499









Fundación Progreso y Salud  
**CONSEJERÍA DE SALUD**

**D. JAVIER MONTERO PLATA, EN CALIDAD DE DIRECTOR DE LA OFICINA DE TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA DEL SISTEMA SANITARIO PÚBLICO DE ANDALUCÍA (OTT-SSPA).**

**CERTIFICA**

Que D. Ricardo Collado Martín con DNI 28.954.663-D, consta como inventor de la invención con título "KIT DIAGNÓSTICO PLASMÁTICO EN CÁNCER DE MAMA", actualmente en proceso de redacción de informe de búsqueda y redacción de la patente con referencia FIBAO-16015.

A petición del interesado y para que conste a los efectos oportunos, firma la presente en Sevilla a 20 de Enero de 2017.



**Javier Montero Plata**

Director de la Oficina de Transferencia de Tecnología  
del Sistema Público de Andalucía

Avda. Américo Vespucio 5, bloque 2, 2ª. Pta.  
Parque Científico y Tecnológico Cartuja 93, 41092 Sevilla  
Tel.: +34 955 04 04 50 Fax: +34 955 040 457  
[www.juntadeandalucia.es/fundacionprogresoysalud](http://www.juntadeandalucia.es/fundacionprogresoysalud)









## **CURRICULUM VITAE**

### Datos personales:

Nombre y apellidos: Ricardo Collado Martín.  
DNI: 28954663-D  
Fecha de nacimiento: 5 de octubre de 1980.  
Lugar de nacimiento: Cáceres.  
Domicilio: C/ Sta Joaquina de Vedruna nº 17- 3ºB.  
Tfno: 626-174-708/ 927-24-19-49.  
E-mail: [porcupaintril@yahoo.es](mailto:porcupaintril@yahoo.es)

### Datos académicos:

Título: licenciado en Medicina.  
Fecha de inicio carrera: Septiembre de 1998  
Fecha de fin de carrera: Junio de 2004  
Centro de estudios: Facultad de Medicina de Salamanca

### Estudios postgrado:

-Posgrado oficial en Biomedicina: Máster interuniversitario en “Biomedicina Regenerativa”  
Impartido por:  
Departamento de Ciencias de la Salud (Universidad de Jaén)  
Departamento de Anatomía y Embriología Humana (Universidad de Granada)  
Departamento de Biología Celular (Universidad de Granada)  
Departamento de Química Farmacéutica (Universidad de Granada)

Tesis de Máster: “Pacientes con adenocarcinoma de páncreas avanzado irresecable o metastático en tratamiento con inhibidores de la tirosina quinasa más antimetabolitos: relación entre los efectos adversos más frecuentes y la evolución de la enfermedad”

### Datos profesionales y formación:

Médico Residente (MIR). Especialidad de Medicina Familiar y Comunitaria.  
Centro de trabajo: Área de salud de Cáceres.

Médico Residente (MIR). Especialidad de Oncología Médica desde Mayo del 2006. (Finalización 22 de Mayo de 2010).  
Centro de trabajo: Hospital Universitario Complejo Ciudad de Jaén.  
Estancia externa en el Memorial Sloan-Kettering Cancer Center de New York, desde el 1 de febrero hasta el 31 marzo del 2010.

FEA Oncología Médica. Hospital San Pedro de Alcántara (Cáceres), desde Mayo del 2010 (Área de especialización: Genitourinaria)

Colaborador honorario universitario en la Facultad de Medicina de Badajoz:

- Curso 2012-2013 con 180 horas.
- Curso 2013-2014 con 180 horas.
- Curso 2014-2015 con 180 horas.

## **Publicaciones:**

Revistas:

Como primer autor:

-Collado R, Ortega A, Alonso R, et al. Estrategias terapéuticas del carcinoma de mama localmente avanzado. Rev. Cáncer 2009. 23: 40-48.

-Collado R, García A, De la cruz L, et al. Clinical Guidelines SEOM: cancer of unknown primary site. Clinical and translational Oncology 2014. 16: 1091-1097.

Como segundo o posterior autor:

-De Castro J, González-Larriba JL, Vázquez S, Massutí B, Sanchez-Torres JM, Dómine M, Garrido P, Calles A, Artal A, Collado R. Long-term survival in advanced non-squamous NSCLC patients treated with first-line bevacizumab-based therapy. Clin Transl Oncol. 2016 Jul 1.

-Salguero R, Muñoz J, Collado R, et al. Uso de marcadores tumorales en la práctica clínica. Extremadura Médica 2012. 15: 5-10.

## **Capítulos de Libros:**

Como primer autor:

-Collado R. Mantenimiento del beneficio y tolerabilidad de sorafenib a dosis subóptimas. Sorafenib en cáncer renal; 2013.p.20-23

-Collado R, García M, Alonso R.. Signos de sospecha de progresión tumoral. En: Alonso R, Muñoz J, editores. VI curso de actualización en Oncología para atención primaria. 1ª ed. Cáceres: Ediciones Égloga; 2012.p.77-83.

- Collado R, González I, Plata MY. Manejo de las complicaciones agudas propias de pacientes oncológicos. En: Jódar F, Manjón MD, Báñez F, Carrillo D, editores.39 TEMAS ESENCIALES PARA EL MÉDICO CLÍNICO. 1ª ed. Granada: Ediciones Martín Urquiza ; 2011.p.125-130. ISBN: 978-84-615-5009-8.

-Collado R, Franco Y. Signos de sospecha de progresión tumoral. En: González S, Alonso R, editores. V curso de actualización en Oncología para atención primaria. 1ª ed. Cáceres: Ediciones Égloga; 2011.p.73-86.

-Collado R, Jaén A, Sánchez P. Tratamiento quimioterápico neoadyuvante del cáncer de mama localmente avanzado. En: Salvador J, editores. Cuadernos multidisciplinares del cáncer de mama. 1ªed. Madrid: Saned; 2009.p.30-35.

-Collado R, Martínez E, Sánchez C. Urgencias urológicas. En: Jaén A, Quesadas N, editores. Protocolo de actuación en urgencias oncológicas. 1ª ed. Jaén: 2010.p.35-50.

Como segundo o posterior autor:

- Ríos Mª P, Collado R, González S, et al. Psiquiatría en pacientes oncológicos. En: Muñoz J, Collado R, editores. VII curso de actualización en Oncología para atención primaria. 1ª ed. Cáceres: Ediciones Síndéresis; 2014.p.24-30.

- Durán M, Collado R, López D, et al. Derivaciones urinarias. En: Muñoz J, Collado R, editores. VII curso de actualización en Oncología para atención primaria. 1ª ed. Cáceres: Ediciones Síndéresis; 2014.p.53-72.

- Aires J, Collado R, Borrega P, et al. Enfermedad tromboembólica. En: Muñoz J, Collado R, editores. VII curso de actualización en Oncología para atención primaria. 1ª ed. Cáceres: Ediciones Síndéresis; 2014.p.135-141.

- Alonso R, Collado R. Melanoma Cutáneo. Novedades terapéuticas. En: Alonso R, Muñoz J, editores. VI curso de actualización en Oncología para atención primaria. 1ª ed. Cáceres: Ediciones Égloga; 2012.p.103-110.

- González I, Plata MY, Collado R. Neutropenia febril en el paciente oncológico. En: Jódar F,

- Manjón MD, Báñez F, Carrillo D, editores. 39 TEMAS ESENCIALES PARA EL MÉDICO CLÍNICO. 1ª ed. Granada: Ediciones Martín Urquiza ; 2011.p.255-264. ISBN: 978-84-615-5009-8.
- González I, Collado R, Plata MY. Sedación terminal. En: Jódar F, Manjón MD, Báñez F, Carrillo D, editores. 39 TEMAS ESENCIALES PARA EL MÉDICO CLÍNICO. 1ª ed. Granada: Ediciones Martín Urquiza ; 2011.p.93-108. ISBN: 978-84-615-5009-8.
- Alonso R, Collado R. Concepto de ascensor analgésico. En: González S, Alonso R, editores. V curso de actualización en Oncología para atención primaria. 1ª ed. Cáceres: Ediciones Égloga; 2011.p.19-23.
- Ortega A, Alonso R, Sánchez A, Collado R, et al. Capítulo 20: tratamiento adyuvante en cáncer de mama HER2 positivo. En: Díaz-Rubio E, Martín M, editores. Tratado de Cáncer de mama. 1ª ed. Madrid: YOU and US; 2008.p.31-53.
- Caballero MJ, Collado R, Ortega A. Dolor Oncológico. En: Jaén A, Quesadas N, editores. Protocolo de actuación en urgencias oncológicas. 1ª ed. Jaén: 2010.p.35-50.
- González I, Caballero MJ, Collado R. Urgencias neurológicas. En: Jaén A, Quesadas N, editores. Protocolo de actuación en urgencias oncológicas. 1ª ed. Jaén: 2010.p.35-50.

### **Casos clínicos:**

Como supervisor:

- Quintana A, Salguero C, Aires J, Collado R. Enfermedad de Paget extramamaria. En: SEOM editores. VI concurso + MIR de casos clínicos para residentes de Oncología Médica 2013.
- Quintana L. Tumor Germinal no seminomatoso (TGNS) de mal pronóstico con respuesta óptima al tratamiento sistémico. VII concurso + MIR de casos clínicos para residentes de Oncología Médica 2014.

Como primer autor:

- Collado R. Beneficio clínico, y sin deterioro en la calidad de vida, en una paciente con cáncer de mama metastásico en tratamiento con Lapatinib. En Archivos clínicos de cáncer de mama. 1ª ed. Madrid: YOU and US; 2011.P. 29-32.
- Collado R, Lomas M, Jaén A, et al. Abstract title: Lapatinib in combination with capecitabine for the treatment of a patient with metastatic breast cancer. Oncologist. 2010.
- Collado R, González I, Plata MY, Díaz T, Jaén A. Metástasis esplénica por carcinoma de ovario. A propósito de un caso. En: SEOM editores. III concurso + MIR de casos clínicos para residentes de Oncología Médica 09-10. 1ª ed. Madrid: Luzán; 2010.p.262-264.
- Collado R, Alonso A, Jaén A, Sánchez P. Tratamiento combinado con fotemustina en melanoma avanzado. En: Berrocal A, editores. Fotemustina en melanoma metastático. 2010. Barcelona: editorial Glosa; 2010.p.14-17.
- Collado R, Alonso R, González I. Cáncer de mama metastático. Tratamiento hormonal de mantenimiento. En: SEOM editores. II concurso + MIR de casos clínicos para residentes de Oncología Médica 08-09. 1ª ed. Madrid: Luzán; 2009.p.208-210.
- Collado R, Alonso R, Ortega A, et al Respuesta a docetaxel en un paciente con cáncer gástrico diseminado, tras recuperación de su estado general con tratamiento de soporte. En: de Castro J, editores. Casos clínicos de cáncer gástrico. 1ª ed. Barcelona: Sanofi Aventis; 2008.p.19-22.
- Collado R, García A, Alonso R. Síndrome diarreico en un paciente inmunocomprometido. En: Díaz-Rubio M, Malagelada JR, Vázquez JL editores. Casos clínicos de residentes en Patología Digestiva 2006. 1ª ed. Madrid: Luzán; 2006.
- Collado R, Jaén A, Alonso A, et al. Exemestano en neoadyuvancia en paciente posmenopáusica. En: Ángel Seguí editores. Avances en el tratamiento con hormonoterapia para el cáncer de mama. 1ª ed. Barcelona: Ars XXI: 2008.p.1-7.
- Collado R, Jaén A, Ortega A, et al. Tratamiento con letrozol en una paciente con cáncer de mama metastático. Magazine cáncer de mama en la red. 2010 marzo. Disponible en : URL: <http://www.webesteve@info.esteve.es>

Como segundo o posterior autor:

- Quintana L, Salguero C. Aires J, Collado R. Nuevo paradigma en el tratamiento neoadyu-

vante del carcinoma renal tras tratamiento con inhibidor múltiple de tirosinquinasa. En: Archivos Clínicos Cáncer de riñón. 1ª Ed. Tres Cantos (Madrid): YOU AND US. 2014.p. 7-13

-González I, Plata MY, Díaz T, Collado R Jaén A. Disnea en un paciente con adenocarcinoma de colon tratado con oxaliplatino. En: SEOM editores. III concurso + MIR de casos clínicos para residentes de Oncología Médica 09-10. 1ª ed.Madrid: Luzán; 2010.p.262-264.

-Irene M. González Cebrián, Ana M. Jaén Morago, Jessica Plata Fernández, Ricardo Collado Martín, Tamara Diaz Redondo, Pedro López Leiva. Cáncer de mama metastásico ErbB2 positivo em tratamiento com lapatinib-capecitabina. En: Archivos Clínicos Cáncer de mama. 1ª Ed. Tres Cantos (Madrid): YOU AND US. 2010.p. 9-13

-Alonso R, Sánchez A, Dueñas R, Ortega A, García A, Collado R. Metástasis endoluminal colónica como recaída única de una tumoración sólida. En: SEOM editores. I concurso + MIR de casos clínicos para residentes de Oncología Médica 2007. 1ªed. Madrid: Luzán; 2007.p.174-175.

-Ortega A, García A, Alonso R, Collado R. Mononeuropatía múltiple asociada a anticuerpos anti-Hu como forma de presentación del carcinoma pulmonar de células pequeñas. En: SEOM editores. I concurso + MIR de casos clínicos para residentes de Oncología Médica 2007. 1ªed. Madrid: Luzán; 2007.p.257-259.

-Alonso R, Collado R, González I, et al. Metástasis en páncreas de melanoma cutáneo. Nueva Oncología 2009;5: 10-11.

-Collado R, Garcia A, Alonso R, et al. Ictericia obstructiva. En: Díaz-Rubio M, Malagelada J, Vázquez J editores. Casos clínicos de residentes en patología digestiva 2006. 1ª ed. Madrid: Luzán; 2007.

### **Comunicaciones y trabajos realizados:**

-Aires J, Quintana L, Collado R. Aplicación del Modelo Pronóstico de Susan Halabi en el cáncer de próstata metastático resistente a la castración. Comunicación para Libro, en el XV Congreso SEOM 2015.

-Collado R, Alonso R, Aires J. Índices pronósticos: pasado y futuro. Comunicación para Libro, en el XV Congreso SEOM 2015.

-Collado R, Alonso R, García M. Abordaje y tratamiento de los pacientes ingresados con el diagnóstico de neutropenia febril: nuestra experiencia durante los dos últimos dos años. Comunicación tipo póster en el III Simposio de la SEOM 2014

-Quintana L, Aires J, González S, López MH, Illán A, Collado R et al. Resultados en práctica clínica habitual tras quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama. Experiencia unicéntrica. Comunicación tipo póster en el III Simposio de la SEOM 2014.

-Collado R, Alonso R, García M. TAC, PET\_TAC e histología: Relación en nuestro centro en el CPNCP. Comunicación tipo póster en el XIV nacional de la SEOM 2013.

-Salguero C, Quintana L, Aires J, Muñoz J, Collado et al. Dos años de experiencia con pazopanib en primera línea de cáncer renal metastático (CCRM): un nuevo estándar de tratamiento. Comunicación tipo póster en el XIV nacional de la SEOM 2013.

-García M, Collado R, Argenta S, Mateos L, Del Barco E. Comorbilidad cardiovascular en pacientes con cáncer de cabeza y cuello. XXXIV Congreso Nacional de Medicina Interna 2013.

-Dávila MA, Benaín J, López AB, Collado R. Aspergilosis pulmonar. Comunicación tipo póster en la 5ª reunión Nacional SEMEG 2012.

-Collado R, Alonso R, Muñoz J. Enfermedad tromboembólica: ¿sabemos lo suficiente? Comunicación tipo póster en el 2º Simposio de la SEOM 2012.

-Collado R, Alonso R, Muñoz J. Tromboembolismo venoso y profilaxis en el paciente oncológico. Comunicación tipo póster en el 2º Simposio de la SEOM 2012.

-Alonso R, Collado R, Muñoz J. Calidad de vida en el CPNM. A propósito de un caso. Comunicación a libro en el 2º Simposio de la SEOM 2012.

-Salguero C, Ibáñez F, Quintana L, Franco Y, Alonso R, Collado R. Linfoma plasmablastico en

- paciente VIH. Comunicación a libro en el 2º Simposio de la SEOM 2012.
- Salguero C, Quintana L, Franco Y, Alonso R, Collado R. Encefalopatía multifocal progresiva inducida por capecitabina en paciente con carcinoma colorrectal. Comunicación a libro en el 2º Simposio de la SEOM 2012.
  - González S, Corcho M, Salguero C, López de Ceballos MH, Romero S, Muñoz J, Collado R. Análisis del proceso de estudio del estado de portador en individuos de familias con mutación conocida en BRCA 1-2. Comunicación tipo póster en 2º Simposio de la SEOM 2012.
  - Collado R, Alonso R, Muñoz J. Realidad epidemiológica del cáncer de pulmón no microcítico en un área de salud. Comunicación tipo póster en el congreso de la SEOM 2011.
  - Collado R, Alonso R, Muñoz J. Estudio retrospectivo del valor de los marcadores otumorales de secreción en CPNCP. Comunicación tipo póster en el congreso de la SEOM 2011.
  - Muñoz J, Alonso R, Collado R. Cáncer de mama triple negativo. Revisión unicéntrica de 10 años. Comunicación tipo póster en el congreso de la SEOM 2011.
  - Alonso R, Collado R, Muñoz J. Evaluación de pemetrexed-bevacizumab como terapia de mantenimiento tras tratamiento con platino-pemetrexed-bevacizumab en CPNM avanzado. Comunicación tipo póster en el congreso de la SEOM 2011.
  - Ortega A, Plata Y, Cárdenas N, Collado R. Histología infrecuente de carcinoma de pulmón no microcítico: carcinoma sarcomatoide. Comunicación a libro en el congreso de la SEOM 2011.
  - Collado R. Cirugía Oncológica Inusual. Ponente en mesa redonda de la XII Reunión de la sociedad Extremeña de Cirugía. 2011.
  - Collado R. Signos de sospecha de Progresión Tumoral. Comunicación oral en el V curso de actualización en Oncología para atención primaria. 2010. Actividad acreditada con 1,4 créditos.
  - González S, Collado R, García JA, et al. Análisis de 12 familias con mutación en BRCA diagnosticadas en la unidad de cáncer hereditario de Extremadura (UCAHEX). Póster en el I Simposio Nacional SEOM. 2010.
  - Moreno MA, González I, Collado R, et al. Prognostic Impact of comorbidity in elderly patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). ECCO 15-34 th ESMO (abstr 8532); 2009.
  - González I, Collado R, Lomas M. Extravasación por antraciclas. Comunicación a libro en el congreso SEOM 2009.
  - Collado R, Alonso R, González I, et al. Respuesta completa con fotemustina y sorafenib en paciente con melanoma metastático. Comunicación en forma de póster en el congreso SEOM 2009.
  - Ortega A, González I, Collado R. Complicaciones infrecuentes en pacientes con adenocarcinoma de pulmón metastático. Comunicación tipo póster en el congreso de la SEOM 2009.
  - Collado R, Ortega A, Alonso, et al. Toxicidad por metotrexate en paciente cn enfermedad trofoblástica. Póster en el XVI congreso de la sociedad andaluza de cancerología.2008
  - Alonso R, Collado R, González I, et al. Pólipo colónico en paciente intervenida de carcinoma renal de células claras. XVI congreso de la Sociedad Andaluza de Cancerología; 2008.
  - González IM, Alonso R, Collado R, et al. Nódulo mamario con forma de recaída de melanoma de primario desconocido. Póster en el XVI congreso de la sociedad andaluza de cancerología.2008.
  - Alonso R, Collado R, Ortega R, et al. Fenotipo triple negativo en cáncer de mama: valoración de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante e identificación de factores pronósticos. Comunicación oral en XVI Congreso de la Sociead Andaluza de Cancerología. 2008
  - Collado R, Martín C. Predicción de las taquiarritmias supraventriculares post-resección pulmonar. Comunicación Oral en el VIII Congreso de Cardiología para estudiantes. Organizados por la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca. 2002.
  - Ortega AL, Cárdenas N, Martínez E, Alonso R, Collado R, González I, Medina B, Sánchez P. Supervivencia a 8 años de pacientes com cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) estadio III irresecable tratados con gemcitabina, ifosfamida y cisplatino. Comunicación oral en XVI Congreso de la Sociead Andaluza de Cancerología. 2008

### **Asistencia a jornadas, seminarios y cursos. Formación continuada y complementaria:**

- Toma de decisiones en la práctica clínica. Actividad acreditada con 7,2 créditos.
- Infección nosocomial INNOVA+. Módulos 1,2,3,4,5,7,8,9. Actividad acreditada con 2.9, 1.5, 2.1, 1.9, 1.7, 1.9, 1.8, 1 (14.8) créditos.
- Uveítis asociada a patología autoinmune. Curso online de la F.M.C. en Reumatología. Actividad acreditada con 3.1 créditos.
- Reumatología: Remisión en Artritis Reumatoide. Curso on-line de la F.M.C. en Reumatología. Actividad acreditada con 4.5 créditos.
- Artritis Psoriásica 2013: Curso on-line de la F.M.C. en Reumatología. Actividad acreditada con 3.1 créditos.
- Manifestaciones extraarticulares en Espondiloartropatías. Actividad acreditada con 4.6 créditos.
- Medidas de evaluación en Espondilitis Anquilosante, Artritis psoriásica. Actividad acreditada con 6.7 créditos.
- Detección Precoz. Artritis reumatoide rápidamente progresiva. Actividad acreditada con 4 créditos.
- Utilidad Clínica de Anticuerpos en las Enfermedades Autoinmunes. Módulo I Curso de formación médicos continuado en reumatología. Actividad acreditada con 5.6 créditos.
- Formación médico continuada en Reumatología: Inmunología para clínicos: Autoinmunidad y Factor de Necrosis Tumoral. Módulo 2. Actividad acreditada con 5.6 créditos.
- Valoración del riesgo cardiovascular en patología autoinmune: Artritis reumatoide y espondiloartropatías. Módulo 3. Curso de formación médica continuada en Reumatología. Actividad acreditada con 4.6 créditos.
- Imagen en reumatología: utilidad de la resonancia magnética: módulo 4. Actividad acreditada con 6 créditos.
- Imagen en reumatología: ecografía en AR, signos precoces de inflamación articular. Curso de formación médico continua en Reumatología. Módulo 5. Actividad acreditada con 8.7 créditos.
- AUA Update Series. Módulos I y II. Actividad acreditada con 1,7 créditos y 1,9 créditos.
- Onco-Diagnóstico. Cáncer de pulmón. Actividad acreditada con 3.7 créditos.
- Intervención nutricional en las situaciones clínicas más comunes en el anciano. Actividad acreditada con 4,2 créditos.
- ASCO Translational Oncology. Actividad acreditada con 7 créditos.



- ASCO Malignant Melanoma. Current Clinical Issues and Future Trends. Actividad acreditada con 7 créditos.
- ASCO Prostate Cancer. Current Clinical Issues and Future Trends. Actividad acreditada con 7 créditos.
- Curso on-line de formación médica continuada: Electrocardiografía clínica. Actividad acreditada con 6.3 créditos
- Cuestiones abiertas en psiquiatría. Actividad acreditada con 1 crédito.
- Diabetes e hiperlipidemia como enfermedad cardiovascular. Actividad acreditada con 3 créditos.
- III curso de osteoporosis: niveles muy bajos en vitamina D. Actividad acreditada con 3,7 créditos.
- Curso on-line de formación médica continuada: Manejo del paciente anciano con infección. Actividad acreditada con 7,7 créditos.
- Nutrición en el paciente anciano y pluripatológico. Actividad acreditada con 3,5 créditos.
- Relación médico-paciente: el médico ante situaciones difíciles. Actividad acreditada con 3,6 créditos.
- Gestión del paciente con Diabetes Mellitus tipo 2. Actividad acreditada con 3,1 créditos.
- Soporte nutricional en las personas ancianas. Actividad acreditada con 3,1 créditos.
- II curso multimedia. Tratamiento del dolor crónico. Módulos I, II, III, IV. Actividad acreditada con 14,9 créditos.
- Principles and practice of lung cancer. Módulos II, III. Actividad acreditada con 9 créditos.
- ESMO Clinical Collection. Focus on lung Cancer. Actividad acreditada con 6,7 créditos.
- ASCO Breast cancer. Current Clinical Issues and Future Trends. Actividad acreditada con 13 créditos.
- ASCO Renal cancer. Current Clinical Issues and Future Trends. Actividad acreditada con 8,2 créditos.
- Adelantando el futuro en el cáncer de mama metastático. 2011. Actividad acreditada con 0,5 créditos.
- Tratando juntos el Cáncer de Próstata avanzado.2011. Actividad acreditada con 3,4 créditos.
- Principles and practice of lung cancer. Vol 2,3.2011. Actividad acreditada con 5,5 y 2,2 créditos respectivamente.
- 2º simposio Nacional de la Sociedad Española de Oncología Médica. 2012. Actividad acreditada con 2,7 créditos.
- VII OncoUrology Forum 2016. Programa presencial con 8 horas lectivas.

- 2016 ASCO Annual Meeting. 2016.
- VI Simposio Científico SOGUG. 18 horas lectivas. 2015.
- VII curso de actualización en Oncología para Atención Primaria. Actividad acreditada con 0,9 créditos. (Director del Curso)
- 2015 Annual Meeting of the American Urological Association. 2015
- Ninth European Internacional Kidney Cancer Symposium. 2014
- 5th World Congreso of IFHNOS and Annual Meeting of AHNS. 2014
- VI curso de actualización en Oncología para Atención Primaria. Actividad acreditada con 0,9 créditos.
- V curso de actualización en Oncología para Atención Primaria. Actividad acreditada con 1.4 créditos.
- XIII CONGRESO NACIONAL DE ONCOLOGÍA MÉDICA. 2011. actividad Acreditada con 2,7 créditos.
- XIII SIMPOSIO DE REVISIONES EN CÁNCER: “tratamiento médico del cáncer en el año 2011”. 2011. Actividad acreditada con 2,5 créditos de formación continuada.
- SIMPOSIO EDUCACIONAL DEL GRUPO ESPAÑOL DE CÁNCER DE PULMÓN. 2010. Actividad acreditada con 2,2 créditos, equivalentes a 15 horas y 45 minutos de duración.
- BIOLOGÍA MOLECULAR Y GENÓMICA: NUEVOS ALIADOS DEL CLÍNICO. Curso de formación on line. 2009. Actividad acreditada con 9,6 créditos, equivalentes a 76 horas lectivas.
- 2ª REVISIÓN ANUAL GEICAM DE AVANCES EN CÁNCER DE MAMA (RAGMA VIRTUAL 09). Actividad acreditada con 12,3 créditos, equivalentes a 90 horas lectivas.
- XI CONGRESO NACIONAL DE ONCOLOGÍA MÉDICA. 2009. actividad Acreditada con 21 créditos equivalentes a 105 horas lectivas.
- XII CONGRESO NACIONAL DE ONCOLOGÍA MÉDICA. 2009. actividad Acreditada con 0,5 créditos equivalentes a 2,5 horas lectivas.
- XIII CURSO R4: EN EL UMBRAL DE LA PRÁCTICA ONCOLÓGICA .2009. Actividad acreditada con 10 créditos, equivalentes a 50 horas lectivas.
- XVI SIMPOSIO INTERNACIONAL EN AVANCES EN EL TRATAMIENTO DE TUMORES DIGESTIVOS. 2008. Actividad acreditada con 10 créditos, equivalentes a 50 horas lectivas.
- TRATAMIENTO EMPÍRICO DE LOS SÍNDROMES INFECCIOSOS. 2007. Actividad acreditada con 5,68 créditos, equivalentes a 28,4 horas lectivas.
- SEMINARIO DE POSGRADO EN DOLOR ONCOLÓGICO. 2008. Actividad acreditada con 2,6 créditos, equivalentes a 13 horas lectivas.
- EL ELECTROCARDIOGRAMA EN AL CONSULTA DE ATENCIÓN PRIMARIA. 2006. Actividad acreditada con 3,2 créditos, equivalentes a 15 horas lectivas.
- 8º CONGRESO DE CÁNCER DE PULMÓN. 2009. Actividad acreditada con 5,1 créditos, equivalente a 14 horas lectivas.
- SESIONES CLÍNICAS DE ACTUALIZACIÓN EN NEUMOLOGÍA. 2007. Actividad acreditada con 3,1 créditos, equivalentes a 17 horas lectivas.
- CURSO DE ACTUALIZACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS. 2007. Actividad acreditada con 1,4 créditos, equivalentes a 7 horas lectivas.
- TRATANDO JUNTOS EL CANCER DE PRÓSTAT A AVANZADO. 2009.
- CIENCIA Y COMUNICACIÓN FORMACIÓN PARA RESIDENTES DE ONCOLOGÍA MÉDICA. 2009.
- 45TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY. 2009
- II REUNIÓN DE ACTUALIZACIÓN EN CÁNCER DE MAMA PARA RESIDENTES. 2008.
- 1ªS JORNADAS SOBRE PREVENCIÓN DE CÁNCER. 2008.
- V CURSO DE FORMACIÓN SEOM EM CUIDADOS CONTINUOS. 2007
- VI REUNIÓN POST-ASCO 2007. TUMORES GINCOLÓGICOS. 2007
- IV LUNG CANCER EXPERT FORUM. 2007.
- XII CURSO SOBRE HORMONOTERAPIA EN ONCOLOGÍA. 2009
- TALLER DE INICIACIÓN A LA PRÁCTICA CLÍNICA DE URGENCIAS. 2006
- CURSO BÁSICO DE PREVENCIÓN DE RIESGOS LABORALES. 2006.



**Participación en grupos cooperativos, de trabajo y ensayos clínicos:**

-Miembro activo del Comité Ético de Investigación Clínica del Complejo Hospitalario de Cáceres DESDE Noviembre 2010.

-Miembro activo del Grupo Español de Cáncer de pulmón desde Septiembre 2010.

-Miembro activo del Grupo Español de Tratamiento de Tumores de Cabeza y Cuello desde con participación en los estudios.

-Miembro activo del Grupo Español de Tratamiento de Tumores Genitourinarios.







## A plasma metabolomic signature discloses human breast cancer

Mariona Jové<sup>1,\*</sup>, Ricardo Collado<sup>2,\*</sup>, José Luís Quiles<sup>3</sup>, Mari-Carmen Ramírez-Tortosa<sup>4</sup>, Joaquim Sol<sup>1</sup>, Maria Ruiz-Sanjuan<sup>5</sup>, Mónica Fernandez<sup>5</sup>, Capilla de la Torre Cabrera<sup>5</sup>, Cesar Ramírez-Tortosa<sup>6,7</sup>, Sergio Granados-Principal<sup>5</sup>, Pedro Sánchez-Rovira<sup>5</sup>, Reinald Pamplona<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Experimental Medicine, University of Lleida-Institute for Research in Biomedicine of Lleida (UdL-IRBLleida), Lleida, Spain

<sup>2</sup>Department of Oncology, Medical Oncology Unit, Hospital San Pedro de Alcántara, Cáceres, Official Postgraduate Programme in Nutrition and Food Technology, University of Granada, Spain

<sup>3</sup>Institute of Nutrition and Food Technology "José Mataix", Biomedical Research Center, Department of Physiology, University of Granada, Granada, Spain

<sup>4</sup>Institute of Nutrition and Food Technology "José Mataix", Biomedical Research Center, Department of Biochemistry and Molecular Biology II, University of Granada, Granada, Spain

<sup>5</sup>Department of Medical Oncology, Hospital of Jaén, Jaén, Spain

<sup>6</sup>Department of Pathological Anatomy, Hospital of Jaén, Jaén, Spain

<sup>7</sup>GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research (Pfizer / University of Granada / Andalusian Regional Government), PTS Granada, Granada, Spain

\*These authors have contributed equally to this work

**Correspondence to:** Reinald Pamplona, **email:** reinald.pamplona@mex.udl.cat  
Pedro Sánchez-Rovira, **email:** oncoprs@yahoo.es

**Keywords:** breast cancer, biomarker, mass spectrometry, metabolites, metabolomics

**Abbreviations:** AUC, area under the curve; BCAA, branched chain amino acids; MS, mass spectrometry; RF, random forest; ROC, receiver operating curves; PCA, principal component analyses; PLS-DA, partial least square discriminant analysis

**Received:** August 12, 2016

**Accepted:** December 26, 2016

**Published:** January 05, 2017

### ABSTRACT

**Purpose:** Metabolomics is the comprehensive global study of metabolites in biological samples. In this retrospective pilot study we explored whether serum metabolomic profile can discriminate the presence of human breast cancer irrespective of the cancer subtype.

**Methods:** Plasma samples were analyzed from healthy women (n = 20) and patients with breast cancer after diagnosis (n = 91) using a liquid chromatography-mass spectrometry platform. Multivariate statistics and a Random Forest (RF) classifier were used to create a metabolomics panel for the diagnosis of human breast cancer.

**Results:** Metabolomics correctly distinguished between breast cancer patients and healthy control subjects. In the RF supervised class prediction analysis comparing breast cancer and healthy control groups, RF accurately classified 100% both samples of the breast cancer patients and healthy controls. So, the class error for both group in and the out-of-bag error were 0. We also found 1269 metabolites with different concentration in plasma from healthy controls and cancer patients; and basing on exact mass, retention time and isotopic distribution we identified 35 metabolites. These metabolites mostly support cell growth by providing energy and building stones for the synthesis of essential biomolecules, and function as signal transduction molecules. The collective results of RF, significance testing, and false discovery rate analysis identified several metabolites that were strongly associated with breast cancer.

**Conclusions:** In breast cancer a metabolomics signature of cancer exists and can be detected in patient plasma irrespectively of the breast cancer type.

## INTRODUCTION

There is a close relationship between metabolism and cancer. Cancer cell metabolism undergoes a profound rearrangement featured by changes in metabolic networks mostly involved in bioenergetic and biosynthetic processes [1]. This metabolic switch represents an adaption to support cell survival, tumor growth, tissue remodeling, and cancer metastasis. But whereas available evidence suggest that this metabolic adaption is regulated by a genomic program and influenced by the tumor microenvironment, in some circumstances altered metabolism can play a primary role in oncogenesis [1, 2]. Furthermore, metabolism can also determine the course of the cancerous process or even lead to an adverse drug response.

Breast cancer is the most common malignancy and cause of cancer death in women [3, 4]. Common methods for diagnosis and surveillance include mammography, histopathology and blood tests (such as antigens and protein patterns). Since the success for curative intervention and significantly increase long-term survival rates in breast cancer is in early stage disease, more sensitive biomarkers for early detection and molecular targets for better treating breast cancer are needed.

In this setting new profiling tools provide a global picture of tumor biology including development and progression. The comprehensive analysis of metabolites ('metabolomics'), by high-resolution <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and mass spectrometry (MS), are being currently used to identify and define the metabolic phenotype of subcellular organelles, cell types, or tissues. These metabolomics approaches are providing key information about oncogenesis, uncovering potential new therapeutic targets and will be a key tool in cancer diagnosis [1, 5, 6].

The human plasma metabolome is composed of around 4,229 confirmed compounds that can be grouped into more than 50 chemical classes [7]. Plasma metabolome profile is the result of a homeostatic system that expresses, in a bidirectional interaction, cellular needs and specific physiological cell-tissue states. Consequently, cell-tissue cancer could modify the chemical composition of blood plasma/serum, analogously to the association of specific metabolomics signatures with complex biological processes such as aging and diseases such as Alzheimer's disease, cardiovascular disease and metabolic disorders [8–11]. So, a potential strength of plasma metabolomic analysis is that this approach can provides a composite metabolomic snapshot of both the tumor and the host.

Since breast cancer displays a high heterogeneity from histology to prognosis, metastatic evolution and treatment responses, and in view of the need for more refined diagnosis estimation in breast cancer, we designed this study to explore whether metabolomics can add diagnosis information in individuals with breast cancer. We assessed plasma metabolomic profiles in newly diagnosed

breast cancer patients using a liquid chromatography-mass spectrometry (LC-ESI-QTOF MS/MS) platform-based metabolomics approach, with the hypothesis that in breast cancer a metabolomics signature of cancer exists and can be detected in patient plasma irrespectively of the breast cancer type.

## RESULTS

### Metabolomics profiling in plasma by LC-ESI-QTOF MS/MS in breast cancer and healthy groups

The first aim of this work was to analyze global metabolomic differences between breast cancer and healthy samples. To do this, we applied a non-targeted metabolomics approach focusing on the profiles of low molecular weight ( $m/z < 1500$ ) ionizable molecules which were present in at least 50% of the samples of each group (2356). To determine whether the metabolite fingerprints in fasting plasma differed between breast cancer and healthy control subjects in our metabolomics approach, we first evaluated separation between experimental groups using unsupervised principal component analyses (PCA) (Figure 1A). Strong group separation was achieved in plasma between all two groups, suggesting the existence of a specific metabolomic signature for each condition. Further analysis using partial least square discriminant analysis (PLS-DA) models demonstrated robust group separation between both groups (Figure 1B) obtaining good cross validation results (Max components= 5; C-V method= 10-fold CV; Performance measure= Q<sup>2</sup>) (Supplementary Table S1).

Multivariate classification analyses were complemented applying Random Forest (RF) analyses, a supervised class prediction model, in order to a) determine the capacity for global metabolomes to accurately classify patients into their respective groups and b) to identify metabolites most important to the class prediction and hence which possessed the strongest correlation to the respective disease. In the RF supervised class prediction analysis comparing breast cancer and healthy control groups, RF accurately classified 100% both samples of the breast cancer patients and healthy controls (Figure 1C). So, the class error for both group in and the out-of-bag error were 0. The metabolites which major contribute to classification were shown in Figure 1D.

### Altered metabolites and canonical pathways in plasma of breast cancer patients and healthy control subjects

After multivariate statistics analyses we applied a Student's T Test ( $p < 0.05$ , Benjamini-Hochberg False Discovery Rate) to define which metabolites were statistically altered in breast cancer patients. We found 1269 metabolites with different concentration in plasma

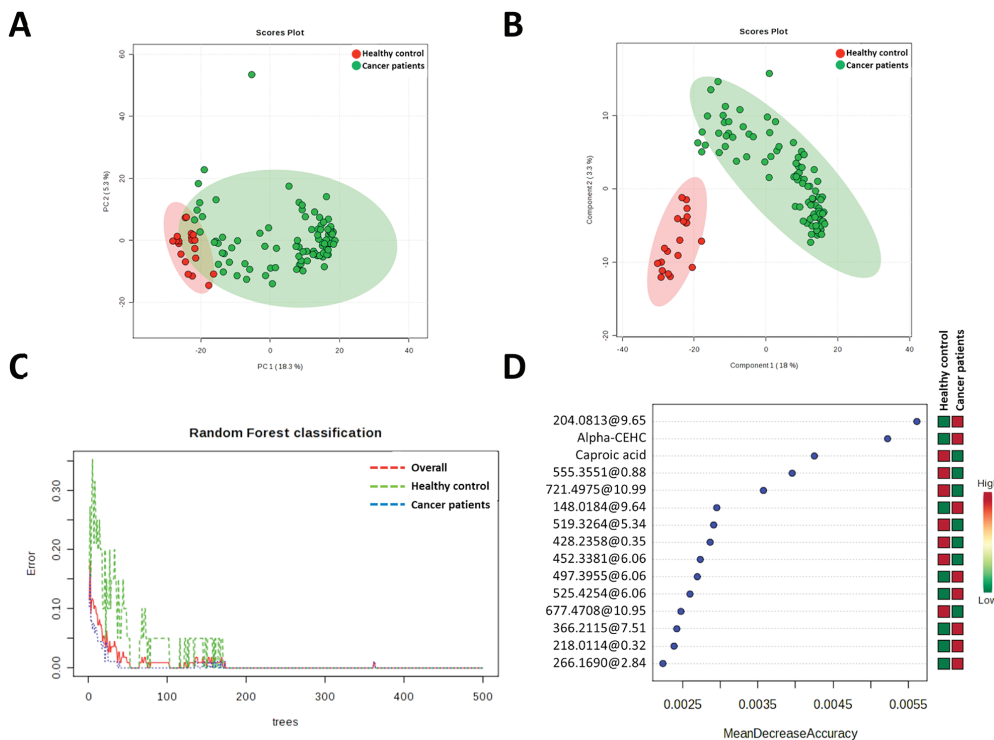
from healthy controls and cancer patients (Supplementary DataSet). Basing on exact mass, retention time and isotopic distribution we could identify 35 metabolites (Table 1) belonging to aminoacyl-tRNA biosynthesis, arginine and proline metabolism and primary bile acid biosynthesis pathways (Table 2), among others.

To further analyze whether these molecules could define the metabolic status of cancer patients we performed a multivariate statistics using only these molecules which present a statistically significant difference between groups and have a potential identity (based on exact mass, retention time and isotopic distribution) (Figure 2). First of all, we applied hierarchical analyses where we could see relative concentration of each metabolite (Figure 2A). This analysis also shows a good clusterization of samples from cancer patients. In the same line, both PCA and PLS-DA analyses showed that, although the separation is better using all molecules detected, we could define a signature using only 35 metabolites (Figure 2B and 2C). Both

permutation test (Supplementary Figure S2) and cross-validation results (Max components= 5; C-V method= 10-fold CV; Performance measure= Q2) (Supplementary Table S2) validate PLS-DA model. Finally, in order to control overfitting we used an alternative technique for multivariate analyses, the RF analyses obtaining an out-of-bag error of 0.027 (Supplementary Figure S2). Overall, these results supports an specific metabolomic signature using only 35 molecules.

### Receiver operator characteristic (ROC) curve analysis

The collective results of RF, significance testing, and false discovery rate analysis identified several metabolites that were strongly associated with breast cancer. To further characterize the predictive value of these metabolites to discriminate breast cancer, we performed ROC analysis using MS peak areas



**Figure 1: Multivariate analyses reveals specific metabolomic signature of cancer patients plasma samples.** A. Principal Component Analyses revealed a good clusterization of samples from cancer group. B. Partial Least Discriminating analysis define a perfect metabolic signature for both groups. C. Random Forest classification shows and overall classification error of 0 (0 for healthy and cancer patient groups). D. Metabolites which much contribute to Random Forest classification. Unknown identities are represented as exact mass@retention time.

**Table 1: Metabolites statistically significant ( $p < 0.05$ , Benjamini-Hochberg False Discovery Rate) with a potential identity**

Compound	p (Corr)	Regulation (cancer patients vs healthy control)	FC	Mass	Retention Time
2-Hydroxy-3-methylbutyric acid	3.3E-04	up	36.6	100.0522	1.5816069
2-Hydroxy-3-methylpentanoic acid	2.3E-02	up	3.3	114.0682	3.2419913
2-Methylhippuric acid	1.8E-03	down	-92.0	175.0639	3.6565607
2-Octenoic acid	5.3E-03	down	-39.3	372.268	9.767441
3-Hydroxyanthranilic acid	8.8E-06	down	-341.8	135.0336	1.5612222
3-Methylglutaric acid	5.5E-03	up	37.6	128.0489	1.5807501
4-acetamidobutanoate	2.0E-03	down	-53.3	127.064	0.70647365
5-b-Cholestane-3a, 7a, 12a-triol	3.6E-02	down	-13.2	402.3519	12.439621
5 $\alpha$ -androstane-3,17-dione	1.2E-10	down	-148.8	305.2386	10.385417
7-ketocholesterol	4.3E-04	up	117.0	400.3335	12.138314
7 $\alpha$ -hydroxy-cholesterol	8.9E-03	down	-31.4	384.329	12.368574
Caproic acid	8.4E-17	down	-1.7	348.2573	5.769
Chenodeoxycholic Acid	6.1E-04	up	161.8	392.2908	11.337122
Cortisol	3.1E-05	down	-1.7	362.2124	7.031
Cortisone	3.0E-02	down	-5.8	360.1945	6.9761095
Creatine	3.9E-04	down	-339.6	113.0561	0.42863637
Cytidine	3.5E-02	up	21.9	225.0778	0.7119473
DL-pipecolic acid	1.5E-06	up	270.4	129.0792	0.33790255
Dopamine	7.8E-04	up	1.5	135.0675	0.575
Glutamine	2.0E-06	down	-1060.4	146.0684	0.5461304
Hippuric acid	3.8E-02	down	-8.8	179.0599	2.1277783
Homocystine	2.9E-04	up	62.3	306.0068	0.33542165
Inosine diphosphate (IDP)	1.8E-03	up	52.7	410.0028	0.34574685
L-Arginine	1.5E-05	down	-397.2	174.1067	0.4356315
Linoleic acid	4.1E-17	up	42496.8	280.2411	11.370296
L-Lysine	1.7E-04	down	-61.4	146.1059	0.34584
L-Valine	1.7E-02	down	-64.5	117.0775	0.44549397
Myristic acid	2.7E-04	up	78.9	250.1932	12.096725
N-Oleoyl-D-erythro-Sphingosine (C18:1 Ceramide)	7.2E-07	down	-645.7	571.51	13.315624
Oleamide	3.8E-05	up	2.0	281.2726	11.383955
Retinoic acid	1.3E-08	down	-128.9	863.6179	11.356807
Stearic acid	2.0E-06	up	673.6	284.2717	12.056651
Taurine	6.4E-09	up	198.1	125.0153	0.32860422
Threonate	3.9E-02	up	3.9	136.0378	0.88052344
Uric acid	2.8E-02	up	2.3	168.0292	0.6809543



**Table 2: Pathways modulated by breast cancer condition**

Pathway name	Total	Expected	Hits	p
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	75	0.87246	4	0.010095
Arginine and proline metabolism	77	0.89572	4	0.011061
Primary bile acid biosynthesis	47	0.54674	3	0.01624
Nitrogen metabolism	39	0.45368	2	0.074242
Purine metabolism	92	1.0702	3	0.088937
D-Arginine and D-ornithine metabolism	8	0.093062	1	0.089485
Lysine degradation	47	0.54674	2	0.10237
Fatty acid biosynthesis	49	0.57	2	0.10982
Biotin metabolism	11	0.12796	1	0.12101
D-Glutamine and D-glutamate metabolism	11	0.12796	1	0.12101
Pyrimidine metabolism	60	0.69796	2	0.15306
Linoleic acid metabolism	15	0.17449	1	0.16141
Taurine and hypotaurine metabolism	20	0.23265	1	0.20939
Retinol metabolism	22	0.25592	1	0.22783
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	24	0.27919	1	0.24586
Pantothenate and CoA biosynthesis	27	0.31408	1	0.27215
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	27	0.31408	1	0.27215
Lysine biosynthesis	32	0.37225	1	0.314
Steroid hormone biosynthesis	99	1.1516	2	0.32119
Propanoate metabolism	35	0.40715	1	0.33799
Valine, leucine and isoleucine degradation	40	0.46531	1	0.37618
Ascorbate and aldarate metabolism	45	0.52347	1	0.41224
Phenylalanine metabolism	45	0.52347	1	0.41224
Fructose and mannose metabolism	48	0.55837	1	0.43291
Glycine, serine and threonine metabolism	48	0.55837	1	0.43291
Cysteine and methionine metabolism	56	0.65143	1	0.48465
Tyrosine metabolism	76	0.88409	1	0.59485
Tryptophan metabolism	79	0.91899	1	0.60928

(Table 3). We found 3 metabolites (metabolite 1: 542.2335@6.062038 (p=3.2109E-18), metabolite 2: 497.3955@6.065792 (p=2.6216E-14), metabolite 3: 204.0813@9.653965 (p=5.7445E-38)) with an area under the curve (AUC) = 1, a specificity= 1 and a sensibility = 1. Among the metabolites with a putative identity we found with highest significant the caproic acid (AUC = 0.995, specificity= 1 and a sensibility = 1), the taurine (AUC = 0.952, specificity= 0.9 and a sensibility = 1), staramide (AUC = 0.959, specificity= 0.9 and a sensibility = 0.9) and the linoleic acid (AUC = 0.935, specificity= 0.9 and a sensibility = 1) (Figure 3).

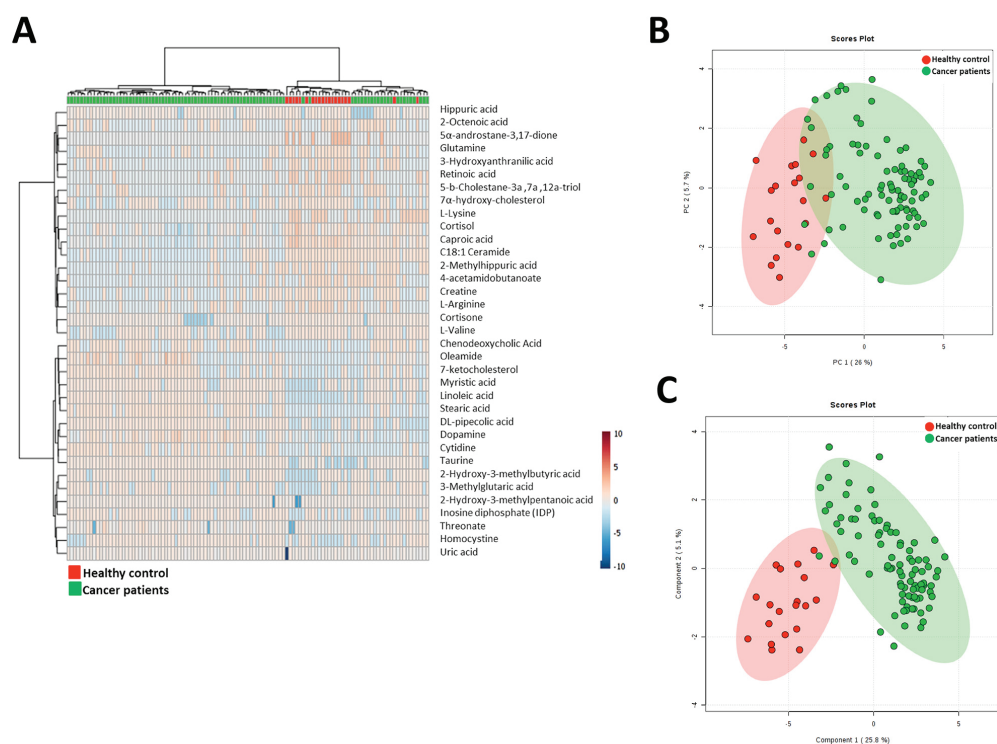
## DISCUSSION

Breast cancer has been associated with marked metabolic shifts [2] [12–19] [20–34]. Since now, metabolomics has been mainly used to refine molecular subtyping of breast cancer, cancer progression, cancer metastasis, and prediction of treatment sensitivity. Only a few metabolomics breast cancer studies have been conducted in plasma/serum mostly focused to discriminate breast cancer subtypes [35], metastatic breast cancer [36–41], recurrence [42, 43] and response to neoadjuvant chemotherapy [44].

The present study demonstrate for the first time that a metabolic signature of breast cancer exists and can be detected in patient plasma. Thus, we found 1269 metabolites with different concentration in plasma from healthy controls and cancer patients. Among them, 354 could be identified (based on exact mass, retention time and isotopic distribution) and different functions could be attributed. Specifically, some of the metabolites could be involved in cell growth by providing building stones for the synthesis of essential cellular components, and substrates for bioenergetics. So, the lower plasma concentrations of the amino acids valine, arginine, tryptophan and lysine in breast cancer patients could express the higher uptake of these amino acids by the tumor, but also a preferential utilization of them. In addition, the elevated content in taurine and homocysteine is also suggestive of increased utilization of the amino acid methionine, essential for the synthesis of methyl group donor compounds, the amino acid cysteine, and the antioxidant glutathione [45]. In this line, the higher content of linoleic acid and stearic acid,

as well as cytidine (also used for phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine biosynthesis) [46], suggest a higher rate of structural lipids biosynthesis. Furthermore, the higher plasma concentration of cytidine (pyrimidine nucleoside), inosine diphosphate (purine nucleoside) and uric acid suggest increased need of substrates for nucleic acid biosynthesis by the tumor. In parallel, the elevated content in short- and medium-chain fatty acids (caproic acid, and myristic acid), the lower content in glutamine and creatine, and higher content of taurine, suggest increased bioenergetics of tumor cells.

In this context it is also particularly interesting the detection of increased levels in breast cancer patients of three metabolites belonging to the branched chain amino acid (BCAA) metabolism (2-hydroxy-3-methylbutiric acid, 2-hydroxy-3-methylpentanoic acid, and 3-methylglutaric acid) suggesting that BCAA are preferentially used by breast cancer cells likely to provide carbon for gluconeogenesis. Because i) BCAAs have a central role in the maintenance of lean body mass and

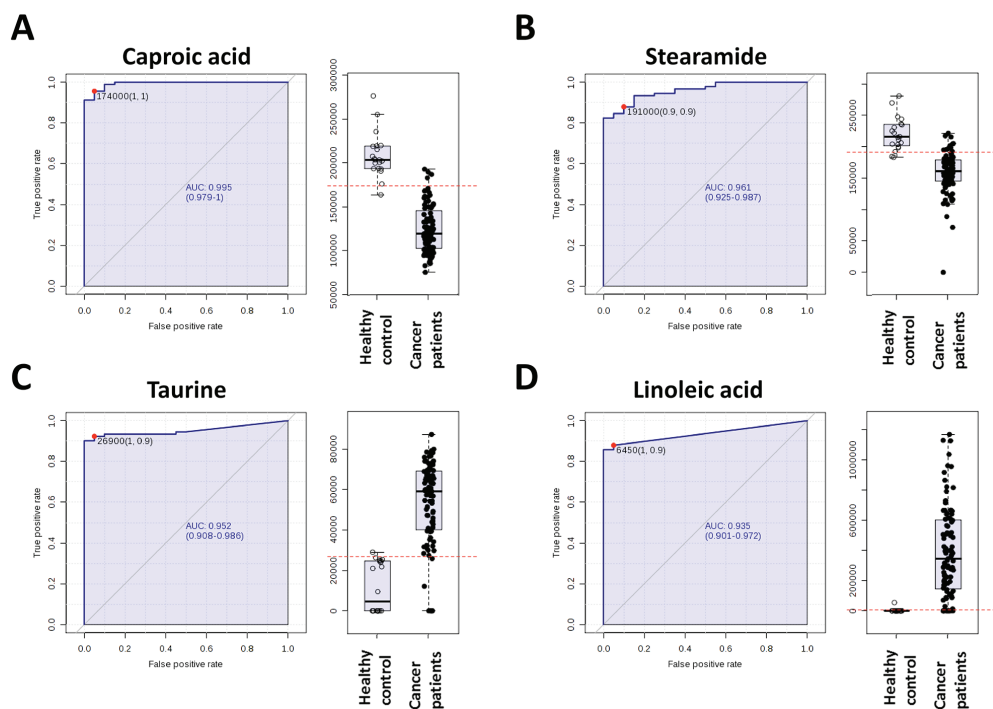


**Figure 2:** A. Hierarchical clustering analyses using the statistical significant metabolites which has a potential identity (based on exact mass, retention time and isotopic distribution). B. Principal Component Analyses performed with the statistical significant metabolites which has a potential identity (based on exact mass, retention time and isotopic distribution). C. Partial Least Square Discriminant Analysis performed with the statistical significant metabolites which has a potential identity (based on exact mass, retention time and isotopic distribution).

**Table 3: Receiver operator characteristic (ROC) analysis of metabolites significantly associated with the presence of breast cancer**

Metabolite	Accurate mass@ retention time	Sensitivity	Specificity	AUC	p	Fold difference in breast cancer vs. healthy controls
C26H43CIN4S3	542.2335@6.062	100	100	1.00	3.21e-18	0.98
C26H51N5O4	497.3955@6.065	100	100	1.00	2.62e-14	1.32
C9H16O3S	204.0813@9.653	100	100	1.00	5.74e-38	1.08
C23H30N2S	366.2115@7.516	100	100	0.999	4.76e-17	2.08
278.1552@9.641	278.1552@9.641	100	100	0.999	6.15e-36	1.06
Caproic acid	348.2573@5.769	100	100	0.995	4.12e-23	0.99
Taurine	125.0153@0.328	100	90	0.952	3.048e-14	0.66
Stearamide	283.2877@11.795	90	90	0.959	2.3782e-12	0.85
Linoleic Acid	280.2411@11.37	100	90	0.935	8.7246e-8	6.29

Metabolites investigated through ROC analysis were selected on the basis of their value to Random Forest, p-value and false discovery rate, and fold difference in breast cancer vs. healthy controls. Mass spectrometry peak areas corresponding to expression level in each patient were used in the ROC analysis.



**Figure 3: Receiver operating characteristic curve of caproic acid, stearamide, taurine and linoleic acid.**

**Table 4: Demographic and clinical pathological characteristics of study population**

	Breast cancer patients	Healthy control subjects
Biospecimen	Plasma	Plasma
Number of participants	91	20
Age (median, range)	62 (34-91)	48 (22-64)
TNM stage-I	2 (2.1%)	n.a.
TNM stage-IIa	40 (43.4%)	n.a.
TNM stage-IIb	30 (32.6%)	
TNM stage-IIIa	13 (14.1%)	n.a.
TNM stage-IIIb	7 (7.6%)	
TNM stage-IV	0	n.a.
Luminal A	25 (27.1%)	n.a.
Luminal B	38 (41.3%)	n.a.
HER-2	25 (27.1)	n.a.
Triple Negative	12 (13.0%)	n.a.

Abbreviations: n.a., not applicable.

regulation of skeletal muscle protein metabolism [47] and ii) cancer cachexia is characterized by increased oxidation of BCAAs, and net catabolism of skeletal muscle through a reduction in protein synthesis and activation of proteolysis, it is postulated that breast cancer activates metabolic pathways which induce cachexia.

Other metabolites which show antioxidant activity (taurine and uric acid) were increased in plasma from cancer subjects could be involved in protecting cancer cells from excessive damage by oxidative stress. Reinforcing this fact, a lower concentration of the oxidative stress-derived compounds 7 $\alpha$ -hydroxy-cholesterol and 3-hydroxyanthranilic acid (oxidation product of tryptophan) were detected in the breast cancer group.

Finally, among differential metabolites endogenous signaling lipids were found. Thus, we detected a decreased content of retinoic acid, C18:1 ceramide and two N-acyl amino acids (2-methylhippuric acid and hippuric acid), while the endocannabinoid oleamide is increased in breast cancer group. Globally, all these changes seem to be designed to enhance cell proliferation and tumor cell survival.

In summary, the changes described in the metabolomic profile in breast cancer patients may affect disease biology in different ways. Specifically, these metabolites may promote tumorigenesis by changing the differentiation status of tumors, induce metastatic phenotype, or make tumors more viable in oxidative stress conditions. But in any case, metabolomics studies in human plasma from breast cancer patients could be useful to describe diagnostic and/or prognosis biomarkers, as well as for monitoring treatment.

## MATERIALS AND METHODS

### Participants and ethics

A total of 91 breast cancer patients and 20 healthy control subjects were recruited at the Breast Cancer Medicine Service at Hospital of Jaén (Jaén, Spain). The study was approved by the institutional review board of the Clinical Research Ethics Committee of the Hospital of Jaén, and every patient provided written informed consent for participation. The criteria for selection included: at least 18 years old with histological confirmation of breast cancer; no detectable macrometastatic disease, and no prior anticancer treatment. Demographic characteristics and clinical diagnosis of studied subjects are summarized in Table 4. In order to avoid the effect of potential cofounders (such as age, BMI, menopause, diabetes, cholesterol and drug treatment) in metabolomics analyses the homogeneity of both groups was checked. We applied Student T-test for continuous variables (age, BM and cholesterol) and Fisher's exact Test for two way categorical data (menopause, diabetes and drug treatment). Among cofounders analyzed only BMI presents statistically significance ( $p=0.0057$ ) between groups. To further analyze the effect of BMI in plasma metabolomics profile we performed multivariate statistics which showed that BMI, contrary to pathology, did not have any effect in determining plasma metabolomic profile (Supplementary Figure S1). Further, one-way ANOVA on BMI (Normal Weight (BMI: 18.5-24.9); Overweight (BMI: 25-29.9); Obese (BMI>30)) showed no statistically significant metabolites between groups.

Samples were collected in EDTA tubes at 08:00 hours in the morning after at least 8h of fasting using standard venipuncture procedures. Blood was processed by centrifugation within 2 h of collection using a gradient of histopaque in order to separate plasma, erythrocytes and PBMC. Plasma samples were isolated, aliquoted and stored at -80°C until further use.

### Sample processing

Metabolites from plasma were extracted as previously described [9]. Samples were thawed on ice at 4°C, and 300 µl of cold methanol (containing 1 µM of butylhydroxytoluene as antioxidant and 1 µg/ml of <sup>13</sup>C-phenylalanine as internal standard) were added to 100 µl of plasma for deproteinization, followed by incubation at -20°C for 1h and then, centrifuged at 12000g for 3 min. The supernatants were recovered, evaporated using a Speed Vac (Thermo Fisher Scientific, Barcelona, Spain) and re-suspended in water 0.4% acetic acid/methanol (50/50).

### Metabolomic analyses

For the metabolomic study, an Agilent 1290 LC system coupled to an ESI-Q-TOF MS/MS 6520 instrument (Agilent Technologies) was used. In all cases, 2 µL of extracted sample was applied onto a reversed-phase column (Zorbax SB-Aq 1.8 µm 2.1 x 50 mm; Agilent Technologies) equipped with a precolumn (Zorba-SB-C8 Rapid Resolution Cartridge 2.1 x 30 mm 3.5 µm; Agilent Technologies) with a column temperature of 60°C. The flow rate was 0.6 mL/min. Solvent A was composed of water containing 0.2% acetic acid and solvent B was composed of methanol 0.2% acetic acid. The gradient started at 2% B and increased to 98% B in 13 min and held at 98% B for 6 min. Post-time was established in 5 min.

Data were collected in positive electrospray mode time of flight operated in full-scan mode at 100–3000 m/z in an extended dynamic range (2 GHz), using N<sub>2</sub> as the nebulizer gas (5 L/min, 350°C). The capillary voltage was 3500 V with a scan rate of 1 scan/s. The ESI source used a separate nebulizer for the continuous, low-level (10 L/min) introduction of reference mass compounds: 121.050873, 922.009798 (positive ion mode) and 119.036320, 966.000725 (negative ion mode), which were used for continuous, online mass calibration. MassHunter Data Analysis Software (Agilent Technologies, Barcelona, Spain) was used to collect the results, and MassHunter Qualitative Analysis Software (Agilent Technologies, Barcelona, Spain) to obtain the molecular features of the samples, representing different, co-migrating ionic species of a given molecular entity using the Molecular Feature Extractor algorithm (Agilent Technologies, Barcelona, Spain), as described [9, 48]. Finally, MassHunter Mass Profiler Professional

Software (Agilent Technologies, Barcelona, Spain) and Metaboanalyst platform [49] were used to perform a non-targeted metabolomic analysis of the extracted features. We selected samples with a minimum of 2 ions. Multiple charge states were not considered. Compounds from different samples were aligned using a retention time window of 0.1% ± 0.25 minutes and a mass window of 10.0 ppm ± 2.0 mDa. Only common features (found in at least 50% of the samples of any group) were analyzed, correcting for individual bias. PCA, PLS-DA, RF analyses, Hierarchical analyses and ROC curves were done using Metaboanalyst platform [49]. Then, we applied univariate statistics (Student's T test, p<0.05, Benjamini-Hochberg false discovery rate) evaluate significant differences induced by carcinogenic process. The resulting differential metabolites were searched against PCDL database from Agilent (Agilent Technologies, Barcelona, Spain), which uses retention times in a standardized chromatographic system as an orthogonal searchable parameter to complement accurate mass data (accurate mass retention time approach) according to previously published works [48]. Pathway analysis was performed using Metaboanalyst platform [49].

### CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no competing interests.

### FUNDING

This research was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, Institute Carlos III (FIS grant PI14/00328), and the Autonomous Government of Catalonia (2014SGR168) to R.P. This study has been co-financed by FEDER funds from the European Union ('Una manera de hacer Europa').

### Author contributions

P.S.R. and R.P. designed the experiments. M.J., and R.P. analyzed the data. M.J., R.C., J.L.Q., M.C.R., J.S., A.J., M.F., C.T., and C.R. performed the experiments. R.P. supervised the design and data interpretation. The manuscript was written by M.J., R.C., P.S.R. and R.P. and edited by R.P. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

### REFERENCES

1. Hirschey MD, DeBerardinis RJ, Diehl AME, Drew JE, Frezza C, Green MF, Jones LW, Ko YH, Le A, Lea MA, Locasale JW, Longo VD, Lyssiotis CA, et al. Dysregulated metabolism contributes to oncogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2015; 35: S129–50. doi: 10.1016/j.semcancer.2015.10.002.



2. Mishra P, Ambs S. Metabolic Signatures of Human Breast Cancer. *Mol Cell Oncol* [Internet]. Taylor & Francis; 2015 [cited 2016 Aug 1]; 2. doi: 10.4161/23723556.2014.992217.
3. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2015 [cited 2015 Feb 10]; 65: 87–108. doi: 10.3322/caac.21262.
4. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* [Internet]. [cited 2016 Aug 1]; 62: 10–29. doi: 10.3322/caac.20138.
5. Griffin JL, Shockcor JP. Metabolic profiles of cancer cells. *Nat Rev Cancer* [Internet]. Nature Publishing Group; 2004 [cited 2016 Aug 1]; 4: 551–61. doi: 10.1038/nrc1390.
6. Nicholson JK. Global systems biology, personalized medicine and molecular epidemiology. *Mol Syst Biol* [Internet]. European Molecular Biology Organization; 2006 [cited 2016 Aug 1]; 2: 52. doi: 10.1038/msb4100095.
7. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Eisner R, Young N, Gautam B, Hau DD, Psychogios N, Dong E, Bouatra S, Mandal R, Sinelnikov I, Xia J, et al. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2009 [cited 2014 Mar 27]; 37: D603–10. doi: 10.1093/nar/gkn810.
8. Ansoleaga B, Jové M, Schlüter A, Garcia-Esparcia P, Moreno J, Pujol A, Pamplona R, Portero-Otín M, Ferrer I. Deregulation of purine metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2015; 36: 68–80. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.08.004.
9. Jové M, Mauri-Capdevila G, Suárez I, Cambray S, Sanahuja J, Quílez A, Farré J, Benabdelhak I, Pamplona R, Portero-Otín M, Purroy F. Metabolomics predicts stroke recurrence after transient ischemic attack. *Neurology* [Internet]. 2015 [cited 2016 Aug 1]; 84: 36–45. doi: 10.1212/WNL.0000000000001093.
10. Jové M, Naudí A, Portero-Otín M, Cabré R, Rovira-Llopis S, Bañuls C, Rocha M, Hernández-Mijares A, Víctor VM, Pamplona R. Plasma lipidomics discloses metabolic syndrome with a specific HDL phenotype. *FASEB J* [Internet]. 2014 [cited 2015 Jun 17]; 28: 5163–71. doi: 10.1096/fj.14-253187.
11. Jové M, Portero-Otín M, Naudí A, Ferrer I, Pamplona R. Metabolomics of human brain aging and age-related neurodegenerative diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 2014 [cited 2015 Aug 7]; 73: 640–57. doi: 10.1097/NEN.0000000000000091.
12. Aboagye EO, Bhujwalla ZM. Malignant transformation alters membrane choline phospholipid metabolism of human mammary epithelial cells. *Cancer Res* [Internet]. 1999 [cited 2016 Aug 1]; 59: 80–4. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9892190>.
13. Katz-Brull R, Seger D, Rivenson-Segal D, Rushkin E, Degani H. Metabolic markers of breast cancer: enhanced choline metabolism and reduced choline-ether-phospholipid synthesis. *Cancer Res* [Internet]. 2002 [cited 2016 Aug 1]; 62: 1966–70. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11929812>.
14. Kennedy KM, Scarbrough PM, Ribeiro A, Richardson R, Yuan H, Sonveaux P, Landon CD, Chi J-T, Pizzo S, Schroeder T, Dewhirst MW. Catabolism of exogenous lactate reveals it as a legitimate metabolic substrate in breast cancer. *PLoS One* [Internet]. 2013 [cited 2016 Aug 1]; 8: e75154. doi: 10.1371/journal.pone.0075154.
15. Locasale JW, Grassian AR, Melman T, Lyssiotis CA, Mattaini KR, Bass AJ, Heffron G, Metallo CM, Muranen T, Sharfi H, Sasaki AT, Anastasiou D, Mullarky E, et al. Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat Genet* [Internet]. 2011 [cited 2016 Aug 1]; 43: 869–74. doi: 10.1038/ng.890.
16. Shaw PG, Chaekady R, Wang T, Vasilatos S, Huang Y, Van Houten B, Pandey A, Davidson NE, Soule H, Maloney T, Wolman S, Jr. WP, Brenz R, et al. Integrated Proteomic and Metabolic Analysis of Breast Cancer Progression. Singh KK, editor. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; 2013 [cited 2016 Aug 1]; 8: e76220. doi: 10.1371/journal.pone.0076220.
17. Simpson NE, Tryndyak VP, Beland FA, Pogribny IP. An in vitro investigation of metabolically sensitive biomarkers in breast cancer progression. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2012 [cited 2016 Aug 1]; 133: 959–68. doi: 10.1007/s10549-011-1871-x.
18. Singer S, Souza K, Thilly WG. Pyruvate utilization, phosphocholine and adenosine triphosphate (ATP) are markers of human breast tumor progression: a 31P- and 13C-nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy study. *Cancer Res* [Internet]. 1995 [cited 2016 Aug 1]; 55: 5140–5. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7585561>.
19. Weljie AM, Bondareva A, Zang P, Jirik FR. (1)H NMR metabolomics identification of markers of hypoxia-induced metabolic shifts in a breast cancer model system. *J Biomol NMR* [Internet]. 2011 [cited 2016 Aug 1]; 49: 185–93. doi: 10.1007/s10858-011-9486-4.
20. Balluff B, Frese CK, Maier SK, Schöne C, Kuster B, Schmitt M, Aubele M, Höfler H, Deelder AM, Heck A, Hogendoorn PCW, Morreau J, Maarten Altelaar AF, et al. De novo discovery of phenotypic intratumour heterogeneity using imaging mass spectrometry. *J Pathol* [Internet]. 2015 [cited 2016 Aug 1]; 235: 3–13. doi: 10.1002/path.4436.
21. Borgan E, Sitter B, Lingjærde OC, Johnsen H, Lundgren S, Bathen TF, Sørli T, Børresen-Dale A-L, Gribbestad IS. Merging transcriptomics and metabolomics--advances in breast cancer profiling. *BMC Cancer* [Internet]. 2010 [cited 2016 Aug 1]; 10: 628. doi: 10.1186/1471-2407-10-628.
22. Brockmüller SF, Bucher E, Müller BM, Budczies J, Hilvo M, Griffin JL, Orešič M, Kallioniemi O, Iljin K, Loibl S, Darb-Esfahani S, Sinn B V, Klauschen F, et al. Integration of metabolomics and expression of glycerol-3-phosphate

- acyltransferase (GPAM) in breast cancer-link to patient survival, hormone receptor status, and metabolic profiling. *J Proteome Res* [Internet]. 2012 [cited 2016 Aug 1]; 11: 850–60. doi: 10.1021/pr200685r.
23. Budczies J, Denkert C, Müller BM, Brockmüller SF, Klauschen F, Györfy B, Dietel M, Richter-Ehrenstein C, Marten U, Salek RM, Griffin JL, Hilvo M, Orešič M, et al. Remodeling of central metabolism in invasive breast cancer compared to normal breast tissue – a GC-TOFMS based metabolomics study. *BMC Genomics* [Internet]. BioMed Central; 2012 [cited 2016 Aug 1]; 13: 334. doi: 10.1186/1471-2164-13-334.
  24. Budczies J, Brockmüller SF, Müller BM, Barupal DK, Richter-Ehrenstein C, Kleine-Tebbe A, Griffin JL, Orešič M, Dietel M, Denkert C, Fiehn O. Comparative metabolomics of estrogen receptor positive and estrogen receptor negative breast cancer: alterations in glutamine and beta-alanine metabolism. *J Proteomics*. 2013; 94: 279–88. doi: 10.1016/j.jprot.2013.10.002.
  25. Budczies J, Pflitzner BM, Györfy B, Winzer K-J, Radke C, Dietel M, Fiehn O, Denkert C. Glutamate enrichment as new diagnostic opportunity in breast cancer. *Int J cancer* [Internet]. 2015 [cited 2016 Aug 1]; 136: 1619–28. doi: 10.1002/ijc.29152.
  26. Cao MD, Lamichhane S, Lundgren S, Bofin A, Fjøsne H, Giskeødegård GF, Bathen TF, Kaplan H, Malmgren J, Hirshfield K, Ganesan S, Xu H, Eirew P, et al. Metabolic characterization of triple negative breast cancer. *BMC Cancer* [Internet]. BioMed Central; 2014 [cited 2016 Aug 1]; 14: 941. doi: 10.1186/1471-2407-14-941.
  27. Grinde MT, Skrbo N, Moestue SA, Rødland EA, Borgan E, Kristian A, Sitter B, Bathen TF, Børresen-Dale A-L, Mælandsmo GM, Engebraaten O, Sørli T, Marangoni E, et al. Interplay of choline metabolites and genes in patient-derived breast cancer xenografts. *Breast Cancer Res* [Internet]. BioMed Central; 2014 [cited 2016 Aug 1]; 16: R5. doi: 10.1186/bcr3597.
  28. Hines KM, Ballard BR, Marshall DR, McLean JA. Structural mass spectrometry of tissue extracts to distinguish cancerous and non-cancerous breast diseases. *Mol Biosyst* [Internet]. NIH Public Access; 2014 [cited 2016 Aug 1]; 10: 2827–37. doi: 10.1039/c4mb00250d.
  29. Kanaan YM, Sampey BP, Beyene D, Esnakula AK, Naab TJ, Ricks-Santi LJ, Dasi S, Day A, Blackman KW, Frederick W, Copeland RL, Gabrielson E, Dewitty RL. Metabolic profile of triple-negative breast cancer in African-American women reveals potential biomarkers of aggressive disease. *Cancer Genomics Proteomics* [Internet]. [cited 2016 Aug 1]; 11: 279–94. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25422359>.
  30. Li M, Song Y, Cho N, Chang JM, Koo HR, Yi A, Kim H, Park S, Moon WK. An HR-MAS MR Metabolomics Study on Breast Tissues Obtained with Core Needle Biopsy. Monleon D, editor. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; 2011 [cited 2016 Aug 1]; 6: e25563. doi: 10.1371/journal.pone.0025563.
  31. Mackinnon WB, Barry PA, Malycha PL, Gillett DJ, Russell P, Lean CL, Doran ST, Barraclough BH, Bilous M, Mountford CE. Fine-needle biopsy specimens of benign breast lesions distinguished from invasive cancer ex vivo with proton MR spectroscopy. *Radiology* [Internet]. 1997 [cited 2016 Aug 1]; 204: 661–6. doi: 10.1148/radiology.204.3.9280241.
  32. Mimmi MC, Finato N, Pizzolato G, Beltrami CA, Fogolari F, Corazza A, Esposito G. Absolute quantification of choline-related biomarkers in breast cancer biopsies by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Cell Pathol (Amst)* [Internet]. 2013 [cited 2016 Aug 1]; 36: 71–83. doi: 10.3233/ACP-130082.
  33. Mountford CE, Somorjai RL, Malycha P, Gluch L, Lean C, Russell P, Barraclough B, Gillett D, Himmelreich U, Dolenko B, Nikulin AE, Smith IC. Diagnosis and prognosis of breast cancer by magnetic resonance spectroscopy of fine-needle aspirates analysed using a statistical classification strategy. *Br J Surg* [Internet]. 2001 [cited 2016 Aug 1]; 88: 1234–40. doi: 10.1046/j.0007-1323.2001.01864.x.
  34. Tang X, Lin C-C, Spasojevic I, Iversen ES, Chi J-T, Marks JR. A joint analysis of metabolomics and genetics of breast cancer. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2014 [cited 2016 Aug 1]; 16: 415. doi: 10.1186/s13058-014-0415-9.
  35. Fan Y, Zhou X, Xia T-S, Chen Z, Li J, Liu Q, Alolga RN, Chen Y, Lai M De, Li P, Zhu W, Qi L-W. Human plasma metabolomics for identifying differential metabolites and predicting molecular subtypes of breast cancer. *Oncotarget* [Internet]. 2016 [cited 2016 Aug 1]; 7: 9925–38. doi: 10.18632/oncotarget.7155.
  36. Cui M, Wang Q, Chen G. Serum metabolomics analysis reveals changes in signaling lipids in breast cancer patients. *Biomed Chromatogr* [Internet]. 2016 [cited 2016 Aug 1]; 30: 42–7. doi: 10.1002/bmc.3556.
  37. Gu H, Pan Z, Xi B, Asiago V, Musselman B, Raftery D. Principal component directed partial least squares analysis for combining nuclear magnetic resonance and mass spectrometry data in metabolomics: Application to the detection of breast cancer. *Anal Chim Acta*. 2011; 686: 57–63. doi: 10.1016/j.aca.2010.11.040.
  38. Jobard E, Pontoizeau C, Blaise BJ, Bachelot T, Elena-Herrmann B, Trédan O. A serum nuclear magnetic resonance-based metabolomic signature of advanced metastatic human breast cancer. *Cancer Lett*. 2014; 343: 33–41. doi: 10.1016/j.canlet.2013.09.011.
  39. Oakman C, Tenori L, Claudino WM, Cappadona S, Nepi S, Battaglia A, Bernini P, Zafarana E, Saccenti E, Fornier M, Morris PG, Biganzoli L, Luchinat C, et al. Identification of a serum-detectable metabolomic fingerprint potentially correlated with the presence of micrometastatic disease in early breast cancer patients at varying risks of disease relapse by traditional prognostic methods. *Ann Oncol*

- [Internet]. 2011 [cited 2016 Aug 1]; 22: 1295–301. doi: 10.1093/amnc/mdq606.
40. Shen J, Yan L, Liu S, Ambrosone CB, Zhao H. Plasma metabolomic profiles in breast cancer patients and healthy controls: by race and tumor receptor subtypes. *Transl Oncol* [Internet]. 2013 [cited 2016 Aug 1]; 6: 757–65. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24466379>.
  41. Tenori L, Oakman C, Claudino WM, Bemini P, Cappadona S, Nepi S, Biganzoli L, Arbushites MC, Luchinat C, Bertini I, Di Leo A. Exploration of serum metabolomic profiles and outcomes in women with metastatic breast cancer: A pilot study. *Mol Oncol*. 2012; 6: 437–44. doi: 10.1016/j.molonc.2012.05.003.
  42. Asiago VM, Alvarado LZ, Shanaiah N, Gowda GAN, Owusu-Sarfo K, Ballas RA, Raftery D. Early detection of recurrent breast cancer using metabolite profiling. *Cancer Res* [Internet]. 2010 [cited 2016 Aug 1]; 70: 8309–18. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1319.
  43. Tenori L, Oakman C, Morris PG, Gralka E, Turner N, Cappadona S, Fornier M, Hudis C, Norton L, Luchinat C, Di Leo A. Serum metabolomic profiles evaluated after surgery may identify patients with oestrogen receptor negative early breast cancer at increased risk of disease recurrence. Results from a retrospective study. *Mol Oncol*. 2015; 9: 128–39. doi: 10.1016/j.molonc.2014.07.012.
  44. Wei S, Liu L, Zhang J, Bowers J, Gowda GAN, Seeger H, Fehm T, Neubauer HJ, Vogel U, Clare SE, Raftery D. Metabolomics approach for predicting response to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Mol Oncol*. 2013; 7: 297–307. doi: 10.1016/j.molonc.2012.10.003.
  45. Stipanuk MH, Ueki I. Dealing with methionine/homocysteine sulfur: cysteine metabolism to taurine and inorganic sulfur. *J Inher Metab Dis* [Internet]. NIH Public Access; 2011 [cited 2016 Aug 1]; 34: 17–32. doi: 10.1007/s10545-009-9006-9.
  46. Gibellini F, Smith TK. The Kennedy pathway—De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life*. Wiley Subscription Services, Inc., a Wiley company; 2010; 62: 414–28. doi: 10.1002/IUB.337.
  47. Baracos VE, Mackenzie ML. Investigations of branched-chain amino acids and their metabolites in animal models of cancer. *J Nutr* [Internet]. 2006 [cited 2016 Aug 1]; 136: 237S–42S. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16365090>.
  48. Sana TR, Roark JC, Li X, Waddell K, Fischer SM. Molecular formula and METLIN Personal Metabolite Database matching applied to the identification of compounds generated by LC/TOF-MS. *J Biomol Tech* [Internet]. 2008 [cited 2014 Feb 7]; 19: 258–66. Available from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2567134&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
  49. Xia J, Mandal R, Sinelnikov I V, Broadhurst D, Wishart DS. MetaboAnalyst 2.0—a comprehensive server for metabolomic data analysis. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2012 [cited 2015 May 13]; 40: W127-33. doi: 10.1093/nar/gks374.







**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
PROGRAMA DE DOCTORADO NUTRICIÓN HUMANA Y  
CIENCIA DE LOS ALIMENTOS