

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 967**

51 Int. Cl.:

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/493 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.05.2011 PCT/CA2011/050315**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.11.2011 WO11143779**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2011 E 11782836 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2572193**

54 Título: **Métodos para la evaluación de cáncer colorrectal y pólipos colorrectales mediante medición de metabolitos en orina**

30 Prioridad:

21.05.2010 US 347043 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

01.03.2018

73 Titular/es:

THE GOVERNORS OF THE UNIVERSITY OF ALBERTA (100.0%)

4th Floor Enterprise Square 10230 - Jasper Avenue

Edmonton, Alberta T5J 4P6, CA

72 Inventor/es:

FEDORAK, RICHARD, NEIL y

WANG, HAILI

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 656 967 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para la evaluación de cáncer colorrectal y pólipos colorrectales mediante medición de metabolitos en orina

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a la evaluación de cáncer colorrectal y pólipos colorrectales mediante medición de metabolitos en orina.

Antecedentes

10 El cáncer colorrectal (CRC) se encuentra entre las causas principales de morbilidad. La probabilidad de sobrevivir a CRC están estrechamente relacionadas con el estadio de la enfermedad en el diagnóstico; cuanto más temprano sea el diagnóstico, mayor es la probabilidad de supervivencia. En muchos casos CRC va precedido por pólipos colorrectales, particularmente pólipos colorrectales adenomatosos. Si se identifica de manera temprana en el estadio de pólipos colorrectales o lesión precancerosa, es más probable que pueda curarse el CRC. Por tanto, los sujetos con CRC y/o pólipos colorrectales se beneficiarían enormemente de un diagnóstico temprano.

15 Los métodos de exploración actuales de CRC consisten en uno o una combinación de los siguientes: pruebas de sangre oculta en heces (FOBT), sigmoidoscopia flexible, enema de bario por contraste de aire, colonografía por tomografía computarizada (CTC) y/o colonoscopia. Todos estos métodos de exploración actuales tienen limitaciones o posibles riesgos que limitan su aplicación.

20 La colonoscopia es actualmente la prueba convencional para determinar la presencia o ausencia de CRC o pólipos colorrectales. Sin embargo, la colonoscopia es invasiva y puede imponer peligros y riesgos innecesarios provocados por sedación o por la propia intervención. Un método de diagnóstico de CRC no invasivo conocido es FOBT. Sin embargo, FOBT tiene una sensibilidad muy baja en la detección de CRC y no resulta atractivo ya que se requiere la manipulación de materia fecal. CTC es una técnica no invasiva reciente para obtener imágenes del colon. Sin embargo, su rendimiento varía debido principalmente a diferencias tecnológicas en la preparación del sujeto y el hardware y software usados para el análisis. Ahora están disponibles varios nuevos métodos de exploración basados en ADN. Estos son normalmente ensayos basados en PCR usados para identificar mutaciones que se sabe que se producen en la secuencia de adenoma a carcinoma, o en CRC familiar. Sin embargo, queda por comprobar si las pruebas basadas en genómica darán como resultado una alta precisión de diagnóstico para CRC esporádico.

25 Ejemplos adicionales de la técnica anterior son los siguientes: Hsu *et al.* (Clinica Chimica Acta, 402, (1-2), abril de 2009, págs. 31-37) describen que los nucleósidos en orina determinados mediante CL/EM/EM pueden ser útiles como marcadores biológicos para cáncer colorrectal. Qui *et al.* (J. Proteome Res., 2010, 9 (3), págs. 1627-1634) usan cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) acoplado con análisis de múltiples variables para obtener perfiles de metabolitos de orina de pacientes con cáncer colorrectal (CRC) y un modelo de lesión colorrectal precancerosa inducida por 1,2-dimetilhidrazina (DMH), y sus equivalentes sanos y encontraron una clara distinción entre grupos. Denkert *et al.* (Molecular Cancer, 2008, 7:72) analizan biopsias de tejido de colon y encuentran que la obtención de perfiles metabólicos facilita el fenotipado bioquímico de tejido de colon normal y neoplásico a altos niveles de significación e indica una metabolómica basada en GC-TOF como nuevo método para investigaciones de patología molecular. Slupsky *et al.* (Journal of Proteome Research 2009, 8, págs. 5550-5558) dan a conocer métodos para obtener perfiles de metabolitos en orina de pacientes con neumonía, en los que uno de los metabolitos es adipato. El documento WO2007/088537 da a conocer que CD24 se sobreexpresa en lesiones premalignas del tracto GI lo que se correlaciona con estadios tempranos de carcinogénesis, y sugiere que puede usarse la detección de CD24 circulante en muestras biológicas como marcador de detección temprana de cáncer.

40 Por consiguiente, existe una necesidad de desarrollar métodos mejorados de evaluación de CRC y pólipos colorrectales en un sujeto.

Sumario

45 Se describen métodos para la evaluación de pólipos adenomatosos mediante medición de metabolitos en orina. En algunas realizaciones, se identifica que determinados metabolitos están elevados o reducidos en cuanto a la concentración o cantidad en sujetos con pólipos adenomatosos en comparación con sujetos sin pólipos adenomatosos. La medición de estos metabolitos en orina puede indicar la presencia de pólipos adenomatosos en particular en un sujeto.

50 En un aspecto, la invención proporciona un método para evaluar si un sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar pólipos adenomatosos, comprendiendo dicho método:

(a) proporcionar una muestra de orina de dicho sujeto;

(b) obtener un perfil de metabolitos a partir de dicha muestra de orina, en el que dicho perfil metabólico se obtiene midiendo la concentración de dos o más metabolitos en dicha muestra de orina para producir dicho perfil de metabolitos para dicho sujeto;

(c) comparar dicho perfil de metabolitos con un perfil de metabolitos de referencia, en el que dicho perfil de metabolitos de referencia se determina a partir de la concentración de metabolitos correspondientes en orina de individuos en una población de referencia; y

5 (d) evaluar, basándose en dicha comparación en la etapa (c), si dicho sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar pólipos adenomatosos

y en el que la etapa (b) comprende medir la concentración en dicha muestra de orina de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ó 17 metabolitos cualesquiera seleccionados del grupo que consiste en: butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina; 3-hidroxi butirato; asparagina; trigonelina; 3-hidroxifenilacetato; histidina; acetona; 2-oxoglutarato; etanol; adipato; 3-hidroximandelato; tirosina y benzoato.

10 También se da a conocer un método para identificar metabolitos de orina indicativos de la presencia o ausencia de CRC y/o pólipos colorrectales, comprendiendo dicho método:

(a) proporcionar una muestra de orina de un sujeto;

(b) obtener un perfil de metabolitos a partir de dicha muestra de orina;

(c) comparar dicho perfil de metabolitos con un perfil de metabolitos de referencia; y

15 (d) identificar, basándose en dicha comparación en la etapa (c), uno o más metabolitos en dicho perfil de metabolitos que son indicativos de la presencia de o predisposición a CRC y/o pólipos colorrectales en dicho sujeto.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un uso de un perfil de metabolitos de orina que comprende uno o más de metabolitos seleccionados del grupo que consiste en:

20 1,6-anhidro- β -D-glucosa, 1-metilnicotinamida, 2-hidroxiisobutirato, 2-oxoglutarato, 3-aminoisobutirato, 3-hidroxi butirato, 3-hidroxiisovalerato, 3-hidroximandelato, 3-hidroxifenilacetato, 3-indoxilsulfato, 4-hidroxifenilacetato, acetato, acetona, adipato, alanina, ascorbato, asparagina, benzoato, betaína, butirato, carnitina, citrato, creatina, creatinina, dimetilamina, etanol, formiato, galactosa, glucosa, glutamina, glicerol, glicina, glicolato, guanidoacetato, hipurato, histidina, hipoxantina, isoleucina, lactato, leucina, lisina, manitol, metanol, metilguanidina, N,N-dimetilglicina, O-acetilcarnitina, pantotenato, propilenglicol, piroglutamato, piruvato, serina, succinato, sacarosa, tartrato, taurina, treonina, trigonelina, trimetilamina, N-óxido de trimetilamina, tirosina, uracilo, urea, valina, xilosa, cisaconitato, β -alanina, 1-metil-L-histidina, 3-metil-L-histidina y trans-aconitato,

25 para evaluar si un sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar pólipos adenomatosos.

También se da a conocer un kit para evaluar si un sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar CRC y/o pólipos colorrectales, comprendiendo dicho kit uno o más reactivos para detectar la presencia y/o concentración y/o cantidad de uno o más metabolitos en una muestra de orina de un sujeto, e instrucciones para el uso de dicho kit para evaluar si un sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar CRC y/o pólipos colorrectales.

30 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un sistema que comprende:

(a) un aparato de evaluación de pólipos adenomatosos que incluye una unidad de control y una unidad de memoria para evaluar un estado de pólipos adenomatosos en un sujeto; y

35 (b) un aparato terminal de comunicación de información que proporciona datos sobre la presencia y/o concentración y/o cantidad de metabolitos en una muestra de orina del sujeto conectados entre sí en comunicación,

en el que el aparato terminal de comunicación de información incluye:

(a) una unidad de envío de datos que transmite los datos sobre la presencia y/o concentración y/o cantidad de metabolitos en la muestra al aparato de evaluación de pólipos adenomatosos; y

40 (b) una unidad de recepción de resultado de evaluación que recibe el resultado de evaluación del estado de pólipos adenomatosos del sujeto transmitido desde el aparato de evaluación de pólipos adenomatosos,

en el que la unidad de control del aparato de evaluación de pólipos adenomatosos incluye:

(a) una unidad de recepción de datos que recibe los datos sobre la concentración y/o cantidad de metabolitos de la muestra transmitidos desde el aparato terminal de comunicación de información;

45 (b) una unidad de cálculo de valor de discriminante que calcula un valor de discriminante que es un valor de discriminante de múltiples variables, basándose en la concentración y/o valor de cantidad de los metabolitos en la muestra recibidas por la unidad de recepción de datos y un discriminante de múltiples variables con la concentración y/o cantidad del metabolito como variable explicativa almacenada en la unidad de memoria;

(c) una unidad de evaluación de criterio de valor de discriminante que evalúa el estado de pólipos adenomatosos en

el sujeto, basándose en el valor de discriminante calculado por la unidad de cálculo de valor de discriminante; y

(d) una unidad de envío de resultado de evaluación que transmite el resultado de evaluación del sujeto obtenido por la unidad de evaluación de criterio de valor de discriminante al aparato terminal de comunicación de información.

5 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para identificar y evaluar la eficacia de agentes farmacéuticos y/o tratamientos quirúrgicos y/o tratamientos físicos contra pólipos adenomatosos, comprendiendo dicho método:

(a) proporcionar una primera muestra de orina de un sujeto que tiene pólipos adenomatosos;

10 (b) obtener un perfil de metabolitos a partir de dicha primera muestra de orina, en el que dicho perfil metabólico se obtiene midiendo la concentración de dos o más metabolitos en dicha primera muestra de orina para producir dicho perfil de metabolitos para dicho sujeto;

(c) proporcionar una segunda muestra de orina de dicho sujeto al o en el que, tras la etapa b), se han administrado uno o más candidatos farmacéuticos y/o se han realizado uno o más tratamientos físicos o quirúrgicos;

15 (d) obtener un perfil de metabolitos a partir de dicha segunda muestra de orina, en el que dicho perfil metabólico se obtiene midiendo la concentración de dos o más metabolitos en dicha segunda muestra de orina para producir dicho perfil de metabolitos para dicho sujeto;

(e) comparar dicho perfil de metabolitos obtenido en las etapas (b) y (d) con un perfil de metabolitos de referencia, en el que dicho perfil de metabolitos de referencia se determina a partir de la concentración de metabolitos correspondientes en orina de individuos en una población de referencia; y

20 (f) evaluar, basándose en dicha comparación en la etapa (e), si el uno o más candidatos farmacéuticos y/o tratamientos son eficaces contra pólipos adenomatosos

y en el que la etapa (b) comprende medir la concentración en dicha primera muestra de orina de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ó 17 metabolitos cualesquiera seleccionados del grupo que consiste en: butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina; 3-hidroxi-butilato; asparagina; trigonelina; 3-hidroxi-fenilacetato; histidina; acetona; 2-oxoglutarato; etanol; adipato; 3-hidroxi-mandelato; tirosina y benzoato;

25 y en el que la etapa (d) comprende medir la concentración en dicha segunda muestra de orina de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ó 17 metabolitos cualesquiera seleccionados del grupo que consiste en: butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina; 3-hidroxi-butilato; asparagina; trigonelina; 3-hidroxi-fenilacetato; histidina; acetona; 2-oxoglutarato; etanol; adipato; 3-hidroxi-mandelato; tirosina y benzoato.

Breve descripción de los dibujos

30 En los dibujos, que ilustran realizaciones de la invención únicamente a modo de ejemplo:

la figura 1 es un gráfico de importancia de la variable en la proyección (VIP) de metabolitos analizados en orden de su contribución a la separación entre datos de muestras de orina obtenidas de sujetos que tienen CRC y los de sujetos sin CRC y/o pólipos colorrectales para 69 metabolitos;

35 la figura 2 es un gráfico de VIP de metabolitos analizados en orden de su contribución a la separación entre datos de muestras de orina obtenidas de sujetos que tienen CRC y los de sujetos sin CRC y/o pólipos colorrectales para 20 metabolitos con un valor de VIP mayor de 1;

la figura 3 es un gráfico de dispersión de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS) bidimensional de los datos de muestras de orina obtenidas de sujetos sin CRC y/o pólipos colorrectales (cuadrados grises) en comparación con la de sujetos que tienen CRC (puntos negros) construido a partir de 69 metabolitos;

40 la figura 4 es un gráfico de dispersión de OPLS bidimensional de los datos de muestras de orina obtenidas de sujetos sin CRC y/o pólipos colorrectales (cuadrados grises) en comparación con la de sujetos que tienen CRC (puntos negros) construido a partir de 20 metabolitos con un valor de VIP mayor de 1;

45 la figura 5 es un gráfico de dispersión de análisis de discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) bidimensional de los datos de muestras de orina obtenidas de sujetos sin CRC y/o pólipos colorrectales (cuadrados grises) en comparación con la de sujetos que tienen CRC (puntos negros) construido a partir de 69 metabolitos;

la figura 6 es un gráfico de dispersión de PLS-DA bidimensional de los datos de muestras de orina obtenidas de sujetos sin CRC y/o pólipos colorrectales (cuadrados grises) en comparación con la de sujetos que tienen CRC (puntos negros) construido a partir de 20 metabolitos con un valor de VIP mayor de 1;

50 la figura 7 es un gráfico de observado frente a predicho del modelo de OPLS de la figura 3. Los datos de muestra de orina obtenida de sujetos sin CRC y/o pólipos colorrectales se presentan como cuadrados grises y los de sujetos

que tienen CRC se presentan como puntos negros;

la figura 8 es un gráfico de observado frente a predicho del modelo de OPLS de la figura 4. Los datos de muestra de orina obtenida de sujetos sin CRC y/o pólipos colorrectales se presentan como cuadrados grises y los de sujetos que tienen CRC se presentan como puntos negros;

5 la figura 9 es una curva de características operativas del receptor (ROC) del modelo de OPLS de la figura 3;

la figura 10 es una curva de ROC del modelo de OPLS de la figura 4;

la figura 11 es un gráfico de VIP de metabolitos analizados en orden de su contribución a la separación entre los datos de muestras de orina obtenidas de sujetos sin CRC y/o pólipos colorrectales y los de sujetos que tienen pólipos colorrectales para 69 metabolitos;

10 la figura 12 es un gráfico de VIP de metabolitos analizados en orden de su contribución a la separación entre los datos de muestras de orina obtenidas de sujetos sin CRC y/o pólipos colorrectales y los de sujetos que tienen pólipos colorrectales para 26 metabolitos con un valor de VIP mayor de 1;

la figura 13 es un gráfico de OPLS bidimensional de los datos de muestras de orina obtenidas de sujetos sin CRC y/o pólipos colorrectales (cuadrados grises) en comparación con los de sujetos que tienen pólipos colorrectales (rombos negros) construido a partir de 69 metabolitos;

15 la figura 14 es un gráfico de OPLS bidimensional de los datos de muestras de orina obtenidas de sujetos sin CRC y/o pólipos colorrectales (cuadrados grises) en comparación con los de sujetos que tienen pólipos colorrectales (rombos negros) construido a partir de 26 metabolitos con un valor de VIP mayor de 1;

20 la figura 15 es un gráfico de dispersión de PLS-DA bidimensional de los datos de muestras de orina obtenidas de sujetos sin CRC y/o pólipos colorrectales (cuadrados grises) en comparación con los de sujetos que tienen pólipos colorrectales (rombos negros) construido a partir de 69 metabolitos;

la figura 16 es un gráfico de dispersión de PLS-DA bidimensional de los datos de muestras de orina obtenidas de sujetos sin CRC y/o pólipos colorrectales (cuadrados grises) en comparación con los de sujetos que tienen pólipos colorrectales (rombos negros) construido a partir de 26 metabolitos con un valor de VIP mayor de 1;

25 la figura 17 es un gráfico de observado frente a predicho del modelo de OPLS de la figura 13. Los datos de muestras de orina obtenidas de sujetos sin CRC y/o pólipos colorrectales se presentan como cuadrados grises y los de sujetos que tienen pólipos colorrectales se presentan como rombos negros;

la figura 18 es un gráfico de observado frente a predicho del modelo de OPLS de la figura 14. Los datos de muestras de orina obtenidas de sujetos sin CRC y/o pólipos colorrectales se presentan como cuadrados grises y los de sujetos que tienen pólipos colorrectales se presentan como rombos negros;

30 la figura 19 es una curva de ROC del modelo de OPLS de la figura 13;

la figura 20 es una curva de ROC del modelo de OPLS de la figura 14;

35 la figura 21 es un gráfico de VIP de metabolitos analizados en orden de su contribución a la separación entre los datos de muestras de orina obtenidas de sujetos sin CRC y/o pólipos colorrectales y los del grupo de sujetos que tienen pólipos adenomatosos para 69 metabolitos;

la figura 22 es un gráfico de VIP de metabolitos analizados en orden de su contribución a la separación entre los datos de muestras de orina obtenidas de sujetos sin CRC y/o pólipos colorrectales y los de sujetos que tienen pólipos adenomatosos para 17 metabolitos con un valor de VIP mayor de 1;

40 la figura 23 es un gráfico de OPLS bidimensional de los datos de muestras de orina obtenidas de sujetos sin CRC y/o pólipos colorrectales (cuadrados grises) en comparación con los de sujetos que tienen pólipos adenomatosos (rombos negros) construido a partir de 69 metabolitos;

la figura 24 es un gráfico de observado frente a predicho del modelo de OPLS de la figura 23. Los datos de muestras de orina obtenidas de sujetos sin CRC y/o pólipos colorrectales se presentan como cuadrados grises y los de sujetos que tienen pólipos adenomatosos se presentan como rombos negros;

45 la figura 25 es un gráfico de observado frente a predicho del modelo de OPLS del gráfico de OPLS bidimensional con 17 metabolitos con un valor de VIP mayor de 1. El gráfico de OPLS bidimensional se preparó basándose en los datos de muestras de orina obtenidas de sujetos sin CRC y/o pólipos colorrectales en comparación con los de sujetos que tienen pólipos adenomatosos. Los datos de muestras de orina obtenidas de sujetos sin CRC y/o pólipos colorrectales se presentan como cuadrados grises y los de sujetos que tienen pólipos adenomatosos se presentan como rombos negros;

50

la figura 26 es una curva de ROC del modelo de OPLS de la figura 23;

la figura 27 es una curva de ROC del modelo de OPLS del gráfico de OPLS bidimensional con 17 metabolitos con un valor de VIP mayor de 1. El gráfico de OPLS bidimensional se preparó basándose en los datos de muestras de orina obtenidas de sujetos sin CRC y/o pólipos colorrectales en comparación con los de sujetos que tienen pólipos adenomatosos;

5

la figura 28 es un gráfico de OPLS bidimensional basándose en los datos de muestras de orina obtenidas de sujetos sin CRC y/o pólipos colorrectales (triángulos) en comparación con los de sujetos que tienen pólipos adenomatosos (rombos), superpuestos con los de sujetos que tienen pólipos hiperplásicos (cuadrados), construido a partir de 69 metabolitos;

10 la figura 29 es un diagrama de la invención que proporciona un sistema para evaluar si un sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar CRC y/o pólipos colorrectales; y

la figura 30 es un resumen del modelo O2PLS que relaciona dos tablas de datos entre sí.

Descripción detallada

CRC y pólipos colorrectales

15 CRC se encuentra entre las causas principales de morbilidad. CRC es el tercer tumor maligno más común en el mundo, y representa aproximadamente el diez por ciento de la incidencia de cáncer total en el mundo. CRC aparece no sólo en seres humanos sino también en especies de animales, y en ambos sexos. Entre los seres humanos, más de 9 de cada 10 personas con diagnóstico de CRC tienen más de 50 años de edad. Sin embargo, individuos más jóvenes pueden desarrollar CRC.

20 La probabilidad de sobrevivir a CRC está estrechamente relacionada con el estadio de la enfermedad en el diagnóstico. La probabilidad de supervivencia es mayor si el diagnóstico se realiza más temprano, permitiendo un tratamiento más temprano. Los pólipos adenomatosos y otros tipos de pólipos colorrectales pueden progresar para dar carcinomas malignos y por tanto pueden ser indicativos de que un sujeto corre el riesgo de desarrollar CRC. Por tanto, no sólo resulta beneficioso poder detectar CRC en sí mismo, sino que es útil poder detectar también la presencia de lesiones precancerosas tales como pólipos colorrectales.

25

Hay varios tipos de pólipos colorrectales. Se sabe que los pólipos adenomatosos son un precursor de CRC en estado avanzado. Otros tipos de pólipos pueden no tener en sí mismos potencial maligno. No obstante, pueden ser indicadores útiles de que un sujeto corre el riesgo de desarrollar CRC. Por ejemplo, a diferencia de pólipos adenomatosos, se ha reconocido históricamente que los pólipos hiperplásicos son crecimientos benignos del colon que no tienen potencial maligno, es decir, se pensaba que eran espectadores inofensivos. Sin embargo, se ha observado que los pólipos hiperplásicos son más prevalentes en poblaciones con una mayor incidencia de cáncer. Además, los pólipos hiperplásicos pueden representar un grupo heterogéneo de pólipos, algunos de los cuales presentan un riesgo significativo de potencial maligno. Estas lesiones posiblemente malignas se conocen como adenoma serrado sésil y se han relacionado con la ruta de cáncer de inestabilidad de microsatélites y por tanto son posibles precursores de CRC inestable de microsatélites esporádico.

30

35

Actualmente, los factores de riesgo para CRC no se entienden bien y se han establecido pocos factores de riesgo específicos, aparte de la dieta, para la enfermedad. Como tal, CRC se diagnostica normalmente a partir de una historia completa del sujeto y exploración física, seguido por obtención de imágenes endoscópicas y/o radiológicas. El diagnóstico se confirma con exploración histopatológica de biopsias o muestras extraídas quirúrgicamente.

40 Los métodos de exploración actuales de CRC consisten en uno o una combinación de los siguientes: FOBT, sigmoidoscopia flexible, enema de bario por contraste de aire, CTC y colonoscopia. Todos estos métodos de exploración actuales tienen limitaciones o posibles riesgos que limitan su aplicación.

La colonoscopia es actualmente la prueba convencional para evaluar la presencia o ausencia de CRC y/o pólipos colorrectales. Sin embargo, la colonoscopia es invasiva y puede imponer peligros y riesgos innecesarios a un individuo provocados por sedación o por la propia intervención, y las complicaciones con colonoscopia pueden incluir perforación, hemorragia, depresión respiratoria, arritmias e infección. Además, requiere personal especializado y recursos físicos considerables.

45

Un método de diagnóstico de CRC no invasivo conocido es FOBT. Sin embargo, FOBT tiene una sensibilidad muy baja en la detección de CRC. FOBT se basa en la suposición de que los cánceres sangrarán, por tanto, pueden detectarse en las heces usando ensayos químicos o inmunológicos, e implica una prueba basta para determinar la actividad de tipo peroxidasa de derivado hémico en hemoglobina. Sin embargo, la sensibilidad de la prueba sólo es de aproximadamente el 50%, con una sensibilidad del 20% para adenomas, debido al hecho de que no todos los adenomas y CRC sangran. Además, no es una prueba atractiva para los sujetos ya que se requiere la manipulación de materia fecal.

50

CTC, o colonoscopia virtual, es una técnica no invasiva reciente para obtener imágenes del colon. Sin embargo, su rendimiento varía debido principalmente a diferencias tecnológicas en la preparación del sujeto y el hardware y software usados para el análisis. Otras limitaciones de CTC incluyen altas lecturas de falsos positivos (FP), incapacidad de detectar adenomas planos, ausencia de capacidad para eliminar pólipos, dosis de radiación repetitivas y acumulativas, y coste.

Con los avances en la patología molecular relacionada con CRC, se ponen a disposición varios nuevos métodos de exploración basados en análisis de ADN de muestras de heces. Estos son normalmente ensayos basados en PCR usados para identificar mutaciones que se sabe que se producen en la secuencia de adenoma a carcinoma, o en CRC familiar. Las mutaciones génicas comúnmente exploradas incluyen KRAS, TP53, APC, así como ensayos para determinar inestabilidad de microsátélites y ADN hipermetilado. Sin embargo, queda por comprobar si las pruebas basadas en genómica darán como resultado una alta precisión de diagnóstico para CRC esporádico

Metabólica y diagnóstico de CRC o pólipos colorrectales

La metabólica es un campo emergente de investigación aguas debajo de la genómica, proteómica y transcriptómica. Un metaboloma es una colección cuantitativa de compuestos de bajo peso molecular, tales como sustratos metabólicos y productos, lípidos, péptidos pequeños, vitaminas y otros cofactores de proteínas, generados mediante metabolismo. Un metaboloma se encuentra aguas debajo de un transcriptoma y un proteoma, y por tanto cualquier cambio con respecto a un estado normal se ve amplificado y es numéricamente más rastreable. La metabólica puede ser una herramienta precisa, sistemática y cuantitativa para examinar y describir el crecimiento, mantenimiento y función celular.

La metabólica puede realizarse con orina, suero, tejido e incluso con saliva y líquido amniótico. Generalmente, la metabólica en orina representa un método de pruebas mucho menos invasivo en comparación con la metabólica en tejido o suero.

La presente invención usa metabólica en orina para identificar sujetos que tienen o corren el riesgo de desarrollar pólipos adenomatosos. Resulta beneficioso en la gestión del riesgo de pólipos adenomatosos, tanto en la prevención como en el tratamiento. El uso de metabólica en orina en la presente invención tiene varios posibles beneficios. Obtener una muestra de orina y su análisis es relativamente sencillo, no invasivo y económico en comparación con los métodos existentes para evaluar la presencia o ausencia de CRC o pólipos colorrectales. La invención también permite monitorizar la propensión individual a CRC antes de recurrir a, o en combinación con, métodos de exploración convencionales, y proporciona la monitorización basada en población de pólipos adenomatosos.

Están disponibles una amplia gama de técnicas analíticas para someter a ensayo y cuantificar componentes de un metaboloma y extraer perfiles de metabolitos útiles a partir de los datos, incluyendo, por ejemplo, cromatografía de líquidos y de gases acoplada con espectrometría de masas (CL-EM o CG-EM), espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de capa fina (CCF), análisis electroquímico, espectroscopía por índice de refracción, espectroscopía de ultravioleta, análisis de fluorescencia, análisis radioquímico, espectroscopía de infrarrojo cercano y análisis por dispersión de la luz. Las salidas de tales técnicas analíticas pueden analizarse adicionalmente usando análisis de múltiples variables tal como análisis de componentes principales (PCA), análisis de discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS).

Uno o más perfiles de metabolitos obtenidos a partir de los análisis anteriormente descritos basándose en una población de referencia de estado de pólipo adenomatoso conocido pueden usarse como referencia para evaluar la presencia o ausencia de CRC o pólipos colorrectales en un sujeto. Por ejemplo, una población de referencia puede estar compuesta por sujetos sanos (es decir, sujetos que se sabe o se evalúa mediante otros medios que están libres de pólipos adenomatosos) o alternativamente puede estar compuesta por sujetos que ya se ha identificado que tienen o tienen predisposición a desarrollar CRC o pólipos colorrectales. Esta evaluación puede realizarse: (a) proporcionando una muestra de orina de un sujeto que se sospecha que tiene o tiene predisposición a desarrollar pólipos adenomatosos; (b) obteniendo un perfil de metabolitos a partir de dicha muestra de orina; (c) comparando dicho perfil de metabolitos con un perfil de metabolitos de referencia; y (d) evaluando, basándose en dicha comparación en la etapa (c), si dicho sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar pólipos adenomatosos.

Proporcionar y procesar muestras de orina

Pueden recogerse muestras de orina de sujetos que se sabe o se sospecha que tienen CRC o pólipos colorrectales, y de sujetos sin CRC o pólipos colorrectales, mediante protocolos conocidos. Los sujetos de esta invención incluyen ambos sexos de especies de animal que son propensos a CRC y/o pólipos colorrectales, incluyendo seres humanos.

Además de proporcionar una muestra de orina, se pueden realizar en los sujetos FOBT, pruebas inmunitarias fecales (FIT) y/o una colonoscopia, cuyos resultados pueden usarse para determinar la clasificación de sujetos en uno de los grupos de: sujetos sin CRC y/o pólipos colorrectales (grupo normal); sujetos que tienen pólipos colorrectales en general (grupo de pólipos); o sujetos que tienen específicamente pólipos adenomatosos (grupo adenomatoso). La patología de muestras quirúrgicas reseca puede usarse para clasificar sujetos en un grupo en el que los sujetos tienen CRC (grupo de CRC). Puede obtenerse información clínica relevante tal como edad, sexo,

historia familiar, comorbidades, medicamentos, etc. a partir de cuestionarios de estudio y el historial clínico de sujetos, que también puede usarse para determinar la clasificación de sujetos. Tales pruebas pueden usarse en el desarrollo de perfiles de metabolitos de orina de referencia y también pueden usarse como anexo a examinar sujetos de prueba mediante los métodos de la invención para confirmar o refinar adicionalmente un diagnóstico de pólipos adenomatosos.

Pueden recogerse muestras de orina de sujetos en cualquier momento, por ejemplo durante el examen de rutina o en relación con una revisión o visita regular a un médico, o antes de o junto con la administración de tratamiento, tal como la administración de un medicamento o la realización de una cirugía. Pueden recogerse muestras de orina una o más veces para un análisis separado o combinado, por ejemplo 15-700 ml cada vez. Los recipientes de recogida de muestras de orina pueden variar en cuanto al tamaño y la forma, pero de manera ideal pueden contener por ejemplo 20-1.000 ml de muestra de orina. Normalmente, el recipiente es estéril. Si se desea, los recipientes de muestra pueden cargarse previamente o tratarse con agentes para prevenir la contaminación de la muestra por microorganismos tales como bacterias y hongos mientras se espera a almacenar una muestra, o tales agentes pueden añadirse tras recogerse la muestra. El análisis metabólico de las muestras de orina recogidas puede producirse inmediatamente o las muestras pueden procesarse para su almacenamiento y posterior análisis. Por ejemplo, la totalidad o parte de la muestra puede almacenarse en un congelador a $-5\sim 10^{\circ}\text{C}$ en el plazo de 0-48 horas desde la recogida, o pueden congelarse a $-120\sim 10^{\circ}\text{C}$ en el plazo de 0-48 horas desde la recogida, o pueden procesarse con productos químicos para su futuro análisis o usarse antes de almacenarse. Si las muestras se han almacenado congeladas, pueden descongelarse (por ejemplo a temperatura ambiente durante 12-48 horas) antes del análisis.

Obtención de un perfil de metabolitos a partir de la muestra

Las técnicas analíticas que hacen posible obtener perfiles de metabolitos a partir de las muestras de orina pueden incluir una o una combinación de, pero sin limitarse a, espectrometría de masas (EM) acoplada con cromatografía de gases (CG-EM) o cromatografía de líquidos (CL-EM), HPLC, espectroscopía de RMN, CCF, análisis electroquímico, espectroscopía por índice de refracción, espectroscopía de ultravioleta, análisis de fluorescencia, análisis radioquímico, espectroscopía de infrarrojo cercano y análisis por dispersión de la luz. Las salidas obtenidas a partir de tales análisis pueden analizarse adicionalmente usando análisis estadístico de múltiples variables para ayudar en la caracterización de diferencias de perfil de metabolitos entre muestras relacionadas con pólipos adenomatosos. Tales herramientas analíticas incluyen, pero no se limitan a, análisis de componentes principales (PCA), análisis de discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS). Aunque pueden usarse HPLC o tecnologías que implican EM para medir concentraciones de metabolitos en el intervalo submolar, con frecuencia son laboriosas y requieren mucho tiempo ya que requieren que en primer lugar se realice cromatografía (de líquidos o gases) para separar los metabolitos, y también requieren múltiples patrones internos.

La espectroscopía de RMN es una herramienta ideal para el estudio metabólico porque puede cuantificar un gran número de metabolitos simultáneamente, sólo requiere un patrón y generalmente es más rápida en proporcionar resultados de análisis estadístico tales como gráficos de PCA y/o OPLS.

En algunas realizaciones, las muestras de orina pueden procesarse antes del análisis. Por ejemplo, para adquisición de RMN no automatizada (manual), pueden extraerse aproximadamente 100-1.000 μl de muestra de orina de la muestra recogida y/o almacenada, después diluirse con un patrón interno a una razón de, por ejemplo, 1:1-1:20 (v/v). El patrón interno puede incluir, por ejemplo, 1-20 mM de 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sodio (DSS) o forma de sal, trifluoroacetato de 4,4-dimetil-4-silapentano-1-amonio (DSA) o propionato de trimetilsililo (TSP). También pueden añadirse agentes para prevenir la contaminación microbiana. Tales adiciones pueden incluir, por ejemplo, imidazol 10-200 mM, o azida de sodio al 0,1-0,5 % o 0,5-5 μM . El volumen total puede ser, por ejemplo, de 100-1.300 μl . La muestra para el análisis por RMN puede almacenarse en un congelador a, por ejemplo, -6°C . El mismo procedimiento se aplica a la adquisición de RMN automatizada (robótica). En el día de la adquisición de RMN, se mide el pH de cada muestra. Pueden añadirse diversas concentraciones de ácidos y bases, por ejemplo, pero sin limitarse a, HCl y NaOH, a las muestras para lograr un pH de entre, por ejemplo, 6,7 y 6,8 para minimizar el intercambio químico ya que el desplazamiento químico puede cambiar con el pH. Puede colocarse una alícuota de, por ejemplo, 100-1.000 μl de las muestras en tubos de RMN y taparse para las muestras para RMN tanto no automatizada como automatizada.

Pueden adquirirse espectros de RMN de una dimensión. Tras obtenerse los espectros, puede volver a comprobarse el pH de cada muestra para garantizar que el pH no se ha desplazado una cantidad significativa. Estos datos pueden registrarse para hacer referencia a los mismos si una muestra particular produjera un espectro inesperado. Las muestras pueden congelarse y almacenarse de nuevo a una temperatura por debajo de cero.

Identificación de metabolitos para un perfil de metabolitos de referencia

La presente invención implica el descubrimiento de que perfiles de metabolitos en la orina de sujetos que tienen o tienen predisposición a desarrollar pólipos adenomatosos pueden distinguirse de manera fiable de perfiles de metabolitos en la orina de sujetos sanos (es decir, aquellos sin pólipos adenomatosos) de manera que esta

distinción puede usarse para evaluar si un sujeto particular tiene o tiene predisposición a desarrollar CRC y/o pólipos colorrectales. Se desarrolla uno o más perfiles de referencia referentes a metabolitos presentes en la orina de una población de referencia que se sabe o bien que están libres de CRC y/o pólipos colorrectales o bien que tienen o tienen predisposición a desarrollar CRC o pólipos colorrectales, que entonces pueden usarse para su comparación con un perfil de metabolitos correspondiente generado a partir de la orina de un sujeto de prueba. Analizando el contenido en metabolitos de orina de sujetos de estado de CRC o pólipo colorrectal conocido, es posible entonces comparar esto con el contenido de los mismos metabolitos en sujetos con un estado de CRC o pólipo colorrectal diferente, identificando por tanto metabolitos que se correlacionan significativamente con el estado adenomatoso de un individuo. En los ejemplos ilustrativos en el presente documento, se consideraron 240 metabolitos y se encontró que 69 tenían una significación particular. Sin embargo, la orina contiene miles de metabolitos, y las técnicas descritas pueden emplearse para evaluar si otros metabolitos de orina son de manera similar diagnóstico de CRC y/o pólipos colorrectales.

Por tanto, en un aspecto, la invención proporciona un método para identificar metabolitos de orina indicativos de la presencia o ausencia de pólipos adenomatosos, comprendiendo el método: (a) proporcionar una muestra de orina de un sujeto; (b) obtener un perfil de metabolitos a partir de la muestra de orina; (c) comparar el perfil de metabolitos con un perfil de metabolitos de referencia; y (d) identificar, basándose en la comparación en la etapa (c), uno o más metabolitos en el perfil de metabolitos que son indicativos de la presencia de o predisposición a cáncer colorrectal y/o pólipos colorrectales en dicho sujeto.

La cuantificación de metabolitos, por ejemplo mediante concentración o en cantidad absoluta, puede realizarse una vez que están disponibles los datos de análisis de, por ejemplo, pero sin limitarse, CG-EM, CL-EM, HPLC, espectroscopía de RMN, CCF, análisis electroquímico, espectroscopía por índice de refracción, espectroscopía de ultravioleta, análisis de fluorescencia, análisis radioquímico, espectroscopía de infrarrojo cercano y análisis por dispersión de la luz. Los datos de cuantificación pueden usarse para identificar y establecer un patrón para determinar un perfil de metabolitos de referencia basándose en muestras de orina obtenidas de sujetos que se sabe que están libres de pólipos adenomatosos.

Por ejemplo, una vez adquiridos los espectros a partir de espectroscopía de RMN, puede realizarse la cuantificación de metabolitos usando herramientas que comparan la integral de una señal de referencia conocida, tal como DSS, DSA o TSP, con señales derivadas de una biblioteca de compuestos para determinar la concentración con respecto a la señal de referencia. Las herramientas pueden incluir software tales como el software Chenomx RMNSuite v4.6. El procedimiento de cuantificación puede realizarse por más de un individuo para la lectura y verificación para optimizar la precisión.

Los niveles de los metabolitos específicos por encima o por debajo de un valor crítico determinado, o bien en cuanto a la concentración o bien en cuanto a la cantidad, pueden indicar la presencia de pólipos adenomatosos. Las concentraciones o la cantidad de los metabolitos pueden interpretarse independientemente usando un punto de corte individual para cada metabolito o pueden interpretarse de manera colectiva. Las concentraciones o cantidades de metabolitos obtenidas pueden usarse tal cual (es decir, como datos sin procesar) o normalizarse. Por ejemplo, la concentración o cantidad de un metabolito puede someterse a transformación logarítmica para normalizar las concentraciones o cantidades a la concentración o la cantidad de otros metabolitos. Los metabolitos también pueden normalizarse a la concentración de todos los metabolitos menos la concentración de compuestos seleccionados tales como, por ejemplo, urea para obtener resultados similares.

Los metabolitos que no son productos del metabolismo normal de un sujeto (por ejemplo, xenobióticos tales como ibuprofeno y salicilurato) o patrones internos (por ejemplo DSS) pueden excluirse del análisis.

Puede aplicarse análisis estadístico de múltiples variables a los datos recogidos o datos espectrales complejos para identificar diferencias que surgen entre los grupos de conjuntos de datos obtenidos a partir de la muestra de orina. Las medidas de metabolitos en muestras de sujetos que tienen CRC o pólipos colorrectales en general o específicamente pólipos adenomatosos pueden compararse con medidas de metabolitos en muestras de sujetos sin CRC o pólipos colorrectales para identificar metabolitos que contribuyen significativamente a la separación de diferentes grupos. La comparación de datos puede realizarse usando cualquier herramienta apropiada que cumple con ese fin. Las herramientas incluyen PCA, PLS-DA, OPLS y máquinas de vectores de soporte (SVM), y pueden usarse software que pueden realizar uno o más de tales análisis, por ejemplo, Simca-P+. Estos son métodos estadísticos de compresión de datos multidimensionales para dar dos o tres componentes principales. PLS-DA y OPLS están supervisados, es decir, tienen en cuenta las asignaciones de clases, mientras que PCA no está supervisado y puede verse influida por muchos factores tales como sexo, comorbidades, etc.

Puede usarse un punto de corte de múltiples variables optimizado para la combinación subyacente de metabolitos para distinguir un estado canceroso o precanceroso de un estado sano. Tras la determinación de qué metabolitos específicos son los factores contribuyentes significativos a la separación de datos entre las muestras del grupo de adenoma y las del grupo normal, pueden establecerse uno o más perfiles de esos metabolitos específicos. Pueden usarse uno o más perfiles de metabolitos o su combinación como perfil de metabolitos de referencia para evaluar CRC o pólipos colorrectales en general o pólipos adenomatosos en particular en un sujeto.

En algunas realizaciones, los metabolitos que eran significativos en la separación del grupo normal del grupo de adenoma se identificaron como: 1,6-anhidro- β -D-glucosa; 1-metilnicotinamida; 2-hidroxiisobutirato; 2-oxoglutarato; 3-aminoisobutirato; 3-hidroxiisobutirato; 3-hidroxiisovalerato; 3-hidroxiimandelato; 3-hidroxiifenilacetato; 3-indoxilsulfato; 4-hidroxiifenilacetato; acetato; acetona; adipato; alanina; ascorbato; asparagina; benzoato; betaína; butirato; carnitina; citrato; creatina; creatinina; dimetilamina; etanol; formiato; galactosa; glucosa; glutamina; glicerol; glicina; glicolato; guanidoacetato; hipurato; histidina; hipoxantina; isoleucina; lactato; leucina; lisina; manitol; metanol; metilguanidina; N,N-dimetilglicina; O-acetilcarnitina; pantotenato; propilenglicol; piroglutamato; piruvato; serina; succinato; sacarosa; tartrato; taurina; treonina; trigonelina; trimetilamina; N-óxido de trimetilamina; tirosina; uracilo; urea; valina; xilosa; cis-aconitato; β -alanina; 1-metil-L-histidina, 3-metil-L-histidina y trans-aconitato.

Sin embargo, no siempre se requieren todas las características de los resultados de análisis de metabolitos para un diagnóstico apropiado de pólipos adenomatosos. Dado que habrá un coste incremental para obtener más información sobre el perfil de metabolitos de orina de un sujeto, puede resultar beneficioso usar el menor número posible de metabolitos. Con el fin de determinar qué metabolitos específicos son los factores contribuyentes más fuertes a la separación de datos entre las muestras del grupo de adenoma y del grupo normal, puede realizarse un análisis de datos adicional. Este análisis de datos adicional puede realizarse mediante un método analítico apropiado tal como, pero sin limitarse a, un gráfico de VIP.

El gráfico de VIP permite la identificación de metabolitos que tienen un mayor impacto sobre el impulso de la separación entre grupos en modelos. A cada metabolito usado para construir modelos se le puede asignar una puntuación de VIP. Esta puntuación se asigna mediante una fórmula estadística que se usa para calcular la influencia de cada metabolito. Cuanto mayor es la puntuación de VIP, mayor es la influencia del metabolito con la puntuación sobre la separación de grupos diferentes. El gráfico de VIP también permite la comparación de la influencia de un metabolito sobre otro. En el análisis de gráfico de VIP, se dice que los factores con una VIP grande, habitualmente mayor de 1, son los más relevantes. Los metabolitos con un valor de VIP mayor de 1 pueden ser los factores contribuyentes más fuertes, y la totalidad o parte de ellos pueden constituir un perfil de metabolitos de referencia una vez demostrada satisfactoriamente su capacidad para evaluar CRC o pólipos colorrectales mediante una comparación con el perfil de metabolitos de referencia que consiste en todos los metabolitos que se encuentra que son significativos en la separación de grupos diferentes.

Hay muchas maneras para evaluar un perfil de metabolitos seleccionado para evaluar si un sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar pólipos adenomatosos. Los valores medidos para metabolitos pueden combinarse automáticamente y el valor combinado puede correlacionarse con la cuestión de diagnóstico subyacente. Los valores de metabolitos pueden combinarse mediante cualquier método matemático apropiado. Los métodos matemáticos para correlacionar una combinación de metabolitos con una enfermedad pueden emplear métodos tales como, pero sin limitarse a, análisis de discriminante (DA) (es decir, DA regularizado cuadrático lineal), métodos de núcleos (es decir, SVM), métodos no paramétricos (es decir, clasificadores de k vecinos más próximos), PLS (mínimos cuadrados parciales), métodos basados en árbol (es decir, regresión lógica, CART, métodos de bosques aleatorios, métodos de refuerzo/empaquetado), modelos lineales generalizados (es decir, regresión logística), métodos basados en componentes principales (es decir, SIMCA), modelos aditivos generalizados, métodos basados en lógica difusa, métodos basados en redes neuronales y algoritmos genéticos. Para el modelo SVM, los coeficientes lineales de cada característica en un clasificador de SVM pueden usarse para seleccionar las características más importantes. Pueden seleccionarse las características que tenían el valor absoluto más grande y puede volver a calcularse el modelo SVM usando sólo las características seleccionadas y el conjunto de entrenamiento si es necesario.

Cuando se comparan resultados de prueba a partir de dos poblaciones diferentes, por ejemplo, una con una enfermedad y la otra sin la enfermedad, pocas veces se observa una separación perfecta entre los dos grupos. De hecho, la distribución de los resultados de prueba se solapará. Por tanto, cuando se selecciona y se aplica un punto de corte o valor de criterio para distinguir entre las dos poblaciones, habrá algunos casos con la enfermedad correctamente clasificada como positiva (fracción de verdaderos positivos), pero algunos casos con la enfermedad se clasificarán como negativos (fracción de falsos negativos). Por otro lado, algunos casos sin la enfermedad se clasificarán correctamente como negativos (fracción de verdaderos negativos), pero algunos casos sin la enfermedad se clasificarán como positivos (fracción de falsos positivos).

El rendimiento de diagnóstico de una prueba de este tipo, o la precisión de una prueba para distinguir grupos con enfermedad de grupos sanos, puede evaluarse usando herramientas tales como análisis de curva de ROC. La curva de ROC es una representación gráfica del espectro de sensibilidades y especificidades generadas usando los diversos puntos de corte, usando la sensibilidad como eje de las y y 1-especificidad como eje de las x. En una curva de ROC, se representa gráficamente la tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) en función de la tasa de FP (100-especificidad) para diferentes puntos de corte. Cada punto en la curva de ROC representa un par de sensibilidad/especificidad correspondiente a un umbral de decisión particular. Una prueba con una distinción perfecta (sin solapamiento en las dos distribuciones) tiene una curva de ROC que pasa a través de la esquina superior izquierda (sensibilidad del 100%, especificidad del 100%). Por tanto, cualitativamente, cuanto más cerca está el gráfico de la esquina superior izquierda, mayor es la precisión global de la prueba. El área bajo la curva de ROC (AUC) refleja la precisión de la prueba y se presenta en la esquina superior izquierda del gráfico. Un AUC de 0,9 a 1 representa una prueba de diagnóstico excelente mientras que un AUC de 0,8-0,9 representa una buena

prueba y un AUC de 0,7 a 0,8 representa una prueba aceptable.

Desarrollo de perfiles de metabolitos de referencia

5 Generalmente, cuantos más metabolitos se evalúen, más precisa será la evaluación de pólipos adenomatosos. En realizaciones a modo de ejemplo, se consideraron más de 240 metabolitos, y se usaron 69 metabolitos para evaluar si un sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar CRC o pólipos colorrectales. De hecho, en el perfil de metabolitos pueden incluirse otros metabolitos de orina, o metabolitos de orina adicionales, además de estos metabolitos identificados. Sin embargo, tal como se indicó anteriormente, esto implica un mayor esfuerzo y coste. En muchos casos, una evaluación menos precisa, específica o detallada puede ser suficiente, particularmente si la evaluación sólo es de naturaleza preliminar o debe realizarse junto con o seguido por otra prueba de diagnóstico, tal como colonoscopia. Además, una prueba que implica la evaluación de menos metabolitos puede reducirse más fácilmente para dar una prueba o kit simplificado que puede usar un sujeto en su domicilio, o un profesional médico en el punto de atención, sin necesidad de enviar una muestra de orina a un laboratorio para su análisis.

15 Tal como se explicó anteriormente, se considera que los valores de VIP mayores de 1 reflejan metabolitos con el mayor potencial para distinguir entre sujetos sanos y enfermos. Para la evaluación de CRC en sí mismo, a diferencia de pólipos colorrectales de cualquier clase, tal como se detalla en la tabla 1, se ha mostrado que los siguientes metabolitos muestran valores de VIP mayores de 1,0, presentados de mayor a menor valor de VIP: adipato; 3-hidroxiacetato; creatina; guanidoacetato; dimetilamina; hipoxantina; benzoato; O-acetilcarnitina; piruvato; metanol; lactato; creatinina; xilosa; 3-indoxilsulfato; trigonelina; taurina; treonina; p-metilhistidina; glucosa y 4-hidroxiacetato.

20 En un ejemplo ilustrativo que no forma parte de la invención, el perfil metabólico de referencia se refiere a evaluar si un sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar CRC, e incluye medidas de concentraciones en una muestra de orina de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 metabolitos cualesquiera seleccionados del grupo que consiste en: adipato; 3-hidroxiacetato; creatina; guanidoacetato; dimetilamina; hipoxantina; benzoato; O-acetilcarnitina; piruvato; metanol; lactato; creatinina; xilosa; 3-indoxilsulfato; trigonelina; taurina; treonina; p-metilhistidina; glucosa y 4-hidroxiacetato.

25 Generalmente, si van a usarse menos de la totalidad de 20 de estos metabolitos en el perfil de metabolitos de referencia, se dará preferencia a aquellos con los mayores valores de VIP. Tal como se describe en la tabla 2, se demostró que un perfil que sólo contenía los cinco metabolitos principales tenía una sensibilidad y especificidad aceptables, y pueden usarse menos para desarrollar un perfil aceptable. Por tanto, en diversas realizaciones, el perfil de referencia para detectar CRC incluye uno o más metabolitos en un conjunto de metabolitos seleccionados del grupo que consiste en:

30 (i) adipato; 3-hidroxiacetato; creatina; guanidoacetato; dimetilamina; hipoxantina; benzoato; O-acetilcarnitina; piruvato; metanol; lactato; creatinina; xilosa; 3-indoxilsulfato; trigonelina; taurina; treonina; p-metilhistidina; glucosa y 4-hidroxiacetato;

35 (ii) adipato; 3-hidroxiacetato; creatina; guanidoacetato; dimetilamina; hipoxantina; benzoato; O-acetilcarnitina; piruvato; metanol; lactato; creatinina; xilosa; 3-indoxilsulfato; trigonelina; taurina; treonina; p-metilhistidina y glucosa;

(iii) adipato; 3-hidroxiacetato; creatina; guanidoacetato; dimetilamina; hipoxantina; benzoato; O-acetilcarnitina; piruvato; metanol; lactato; creatinina; xilosa; 3-indoxilsulfato; trigonelina; taurina; treonina y p-metilhistidina;

40 (iv) adipato; 3-hidroxiacetato; creatina; guanidoacetato; dimetilamina; hipoxantina; benzoato; O-acetilcarnitina; piruvato; metanol; lactato; creatinina; xilosa; 3-indoxilsulfato; trigonelina; taurina y treonina

(v) adipato; 3-hidroxiacetato; creatina; guanidoacetato; dimetilamina; hipoxantina; benzoato; O-acetilcarnitina; piruvato; metanol; lactato; creatinina; xilosa; 3-indoxilsulfato; trigonelina y taurina;

(vi) adipato; 3-hidroxiacetato; creatina; guanidoacetato; dimetilamina; hipoxantina; benzoato; O-acetilcarnitina; piruvato; metanol; lactato; creatinina; xilosa; 3-indoxilsulfato y trigonelina;

45 (vii) adipato; 3-hidroxiacetato; creatina; guanidoacetato; dimetilamina; hipoxantina; benzoato; O-acetilcarnitina; piruvato; metanol; lactato; creatinina; xilosa y 3-indoxilsulfato;

(viii) adipato; 3-hidroxiacetato; creatina; guanidoacetato; dimetilamina; hipoxantina; benzoato; O-acetilcarnitina; piruvato; metanol; lactato; creatinina y xilosa;

50 (ix) adipato; 3-hidroxiacetato; creatina; guanidoacetato; dimetilamina; hipoxantina; benzoato; O-acetilcarnitina; piruvato; metanol; lactato y creatinina;

(x) adipato; 3-hidroxiacetato; creatina; guanidoacetato; dimetilamina; hipoxantina; benzoato; O-acetilcarnitina; piruvato; metanol y lactato;

(xi) adipato; 3-hidroxiacetato; creatina; guanidoacetato; dimetilamina; hipoxantina; benzoato; O-acetilcarnitina;

piruvato y metanol;

(xii) adipato; 3-hidroxi butirato; creatina; guanidoacetato; dimetilamina; hipoxantina; benzoato; O-acetilcarnitina y piruvato;

(xiii) adipato; 3-hidroxi butirato; creatina; guanidoacetato; dimetilamina; hipoxantina; benzoato y O-acetilcarnitina;

5 (xiv) adipato; 3-hidroxi butirato; creatina; guanidoacetato; dimetilamina; hipoxantina y benzoato;

(xv) adipato; 3-hidroxi butirato; creatina; guanidoacetato; dimetilamina e hipoxantina;

(xvi) adipato; 3-hidroxi butirato; creatina; guanidoacetato y dimetilamina;

(xvii) adipato; 3-hidroxi butirato; creatina y guanidoacetato;

(xviii) adipato; 3-hidroxi butirato y creatina;

10 (xix) adipato y 3-hidroxi butirato; y

(xx) adipato.

En algunas realizaciones de este ejemplo, lo que se mide es la concentración (por ejemplo, medida en μM) de los metabolitos de orina, y una concentración mayor o menor del metabolito en la orina de un sujeto de prueba con respecto a aquella en el perfil de metabolitos de referencia (basándose en concentraciones o bien sin procesar o bien normalizadas) es indicativa de CRC.

En algunas realizaciones de este ejemplo, una concentración elevada de uno o más metabolitos cualesquiera seleccionados del grupo que consiste en adipato; 3-hidroxi butirato; creatina; guanidoacetato; dimetilamina; benzoato; O-acetilcarnitina; lactato; xilosa; 3-indoxilsulfato; trigonelina; taurina; treonina; p-metilhistidina y 4-hidroxi fenilacetato es indicativa de que el sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar CRC.

20 Se entenderá que por “elevado” quiere decirse que la concentración de un metabolito en la orina de un sujeto que tiene o tiene predisposición a desarrollar CRC es mayor que en la orina de sujetos que no tienen o que no tienen predisposición a CRC. Por ejemplo, haciendo referencia a la tabla 1, se observará que la concentración media de adipato en la orina de individuos con CRC era de 218,1 μM , mucho mayor que la concentración media de adipato en la orina de sujetos “normales” sin CRC, que se encontró que era de 1,3 μM . Por tanto, de manera comparativa con respecto a sujetos sanos, los sujetos con CRC tenían concentraciones de adipato elevadas en su orina.

En algunas realizaciones de este ejemplo, una concentración reducida de uno o más metabolitos cualesquiera seleccionados del grupo que consiste en hipoxantina; piruvato; metanol; creatinina y glucosa es indicativa de que el sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar CRC.

30 Se entenderá que por “reducido” quiere decirse que la concentración de un metabolito en la orina de un sujeto que tiene o tiene predisposición a desarrollar CRC es menor que en la orina de sujetos que no tienen o que no tienen predisposición a CRC. Por ejemplo, haciendo referencia a la tabla 1, se observará que la concentración media de hipoxantina en la orina de sujetos con CRC era de 188,4 μM , menor que la concentración media de hipoxantina en la orina de sujetos “normales” sin CRC, que se encontró que era de 208,4 μM . Por tanto, de manera comparativa con respecto a sujetos sanos, los sujetos con CRC tenían concentraciones de hipoxantina reducidas en su orina.

35 Un perfil de metabolitos de referencia que es diagnóstico de pólipos adenomatosos puede ser diferente de un perfil de metabolitos de referencia para CRC en sí mismo. Es decir, el perfil de diagnóstico de referencia puede estar compuesto por un conjunto diferente de metabolitos relevantes, y concentraciones relativas diferentes de estos metabolitos pueden ser relevantes.

40 En determinadas realizaciones, el perfil de metabolitos de referencia es para pólipos adenomatosos e incluye concentraciones de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ó 17 metabolitos cualesquiera seleccionados del grupo que consiste en: butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina; 3-hidroxi butirato; asparagina; trigonelina; 3-hidroxi fenilacetato; histidina; acetona; 2-oxoglutarato; etanol; adipato; 3-hidroxi mandelato; tirosina y benzoato.

45 Como anteriormente, estos son metabolitos que se encontró que tenían puntuaciones de VIP de 1,0 o más y se indican en orden descendiente en la tabla 5. Como anteriormente, se demostraron especificidad y sensibilidad aceptables con un perfil basado únicamente en los cinco metabolitos principales (tabla 6) y pueden usarse menos. Por tanto, si se incluyen menos que la totalidad de los metabolitos en el perfil de metabolitos de referencia, el perfil puede incluir uno o más metabolitos en un conjunto de metabolitos seleccionados del grupo que consiste en:

50 (i) butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina; 3-hidroxi butirato; asparagina; trigonelina; 3-hidroxi fenilacetato; histidina; acetona; 2-oxoglutarato; etanol; adipato; 3-hidroxi mandelato; tirosina y benzoato;

- (ii) butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina; 3-hidroxi-butilato; asparagina; trigonelina; 3-hidroxifenilacetato; histidina; acetona; 2-oxoglutarato; etanol; adipato; 3-hidroxi-mandelato y tirosina;
- (iii) butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina; 3-hidroxi-butilato; asparagina; trigonelina; 3-hidroxifenilacetato; histidina; acetona; 2-oxoglutarato; etanol; adipato y 3-hidroxi-mandelato;
- 5 (iv) butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina; 3-hidroxi-butilato; asparagina; trigonelina; 3-hidroxifenilacetato; histidina; acetona; 2-oxoglutarato; etanol y adipato;
- (v) butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina; 3-hidroxi-butilato; asparagina; trigonelina; 3-hidroxifenilacetato; histidina; acetona; 2-oxoglutarato y etanol;
- 10 (vi) butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina; 3-hidroxi-butilato; asparagina; trigonelina; 3-hidroxifenilacetato; histidina; acetona y 2-oxoglutarato;
- (vii) butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina; 3-hidroxi-butilato; asparagina; trigonelina; 3-hidroxifenilacetato; histidina y acetona;
- (viii) butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina; 3-hidroxi-butilato; asparagina; trigonelina; 3-hidroxifenilacetato e histidina;
- 15 (ix) butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina; 3-hidroxi-butilato; asparagina; trigonelina y 3-hidroxifenilacetato;
- (x) butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina; 3-hidroxi-butilato; asparagina y trigonelina;
- (xi) butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina; 3-hidroxi-butilato y asparagina;
- (xii) butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina y 3-hidroxi-butilato;
- 20 (xiii) butirato; serina; metanol; β -alanina y p-metilhistidina;
- (xiv) butirato; serina; metanol y β -alanina;
- (xv) butirato; serina y metanol;
- (xvi) butirato y serina; y
- (xvii) butirato.
- 25 En algunas realizaciones, una concentración elevada de uno o más metabolitos cualesquiera seleccionados del grupo que consiste en p-metilhistidina; 3-hidroxi-butilato; asparagina; trigonelina; 3-hidroxifenilacetato; histidina; acetona; adipato; 3-hidroxi-mandelato; tirosina y benzoato es indicativa de que el sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar pólipos adenomatosos. Como anteriormente, "elevado" es con respecto a una concentración de metabolito de orina correspondiente de sujetos sanos.
- 30 En algunas realizaciones, una concentración reducida de uno o más metabolitos cualesquiera seleccionados del grupo que consiste en butirato; serina; metanol; β -alanina; 2-oxoglutarato y etanol es indicativa de que el sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar pólipos adenomatosos. Como anteriormente, "reducido" es con respecto a una concentración de metabolito de orina correspondiente de sujetos sanos.
- 35 En la tabla 5 se muestran concentraciones de metabolitos de orina elevadas y reducidas para sujetos que tienen pólipos adenomatosos.
- En un ejemplo, que no forma parte de la invención, el perfil de metabolitos de referencia se diseña para identificar a sujetos que tienen o tienen predisposición a pólipos colorrectales, pero no necesariamente para distinguir un tipo de pólipo de otro. Por ejemplo, el pólipo puede ser adenomatoso o hiperplásico, pero el perfil de diagnóstico de referencia no distingue necesariamente entre los dos.
- 40 En determinadas realizaciones, el perfil de metabolitos de referencia es para pólipos colorrectales que son o bien pólipos adenomatosos o bien pólipos hiperplásicos e incluye concentraciones en orina de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 ó 26 metabolitos cualesquiera seleccionados del grupo que consiste en: butirato; serina; asparagina; p-metilhistidina; 3-hidroxi-butilato; metanol; 3-hidroxi-mandelato; tirosina; trigonelina; β -alanina; histidina; dimetilamina; urea; 1,6-anhidro- β -D-glucosa; glucosa; etanol; benzoato; acetona; treonina; 2-hidroxiisobutilato; creatinina; 3-hidroxifenilacetato; 3-indoxilsulfato; hipurato; ascorbato y 4-
- 45 hidroxifenilacetato.

Como anteriormente, estos son metabolitos que se encontró que tenían puntuaciones de VIP de 1,0 o más y se indican en orden descendiente (tabla 3). Como anteriormente, se demostraron especificidad y sensibilidad

aceptables con un perfil basado únicamente en los cinco metabolitos principales (tabla 4) y pueden usarse menos. Por tanto, si se incluyen menos que la totalidad de los metabolitos en el perfil de metabolitos de referencia, el perfil puede incluir uno o más metabolitos en un conjunto de metabolitos seleccionados del grupo que consiste en:

- 5 (i) butirato; serina; asparagina; p-metilhistidina; 3-hidroxiisobutirato; metanol; 3-hidroximandelato; tirosina; trigonelina; β -alanina; histidina; dimetilamina; urea; 1,6-anhidro- β -D-glucosa; glucosa; etanol; benzoato; acetona; treonina; 2-hidroxiisobutirato; creatinina; 3-hidroxifenilacetato; 3-indoxilsulfato; hipurato; ascorbato y 4-hidroxifenilacetato;
- (ii) butirato; serina; asparagina; p-metilhistidina; 3-hidroxiisobutirato; metanol; 3-hidroximandelato; tirosina; trigonelina; β -alanina; histidina; dimetilamina; urea; 1,6-anhidro- β -D-glucosa; glucosa; etanol; benzoato; acetona; treonina; 2-hidroxiisobutirato; creatinina; 3-hidroxifenilacetato; 3-indoxilsulfato; hipurato y ascorbato;
- 10 (iii) butirato; serina; asparagina; p-metilhistidina; 3-hidroxiisobutirato; metanol; 3-hidroximandelato; tirosina; trigonelina; β -alanina; histidina; dimetilamina; urea; 1,6-anhidro- β -D-glucosa; glucosa; etanol; benzoato; acetona; treonina; 2-hidroxiisobutirato; creatinina; 3-hidroxifenilacetato; 3-indoxilsulfato y hipurato;
- (iv) butirato; serina; asparagina; p-metilhistidina; 3-hidroxiisobutirato; metanol; 3-hidroximandelato; tirosina; trigonelina; β -alanina; histidina; dimetilamina; urea; 1,6-anhidro- β -D-glucosa; glucosa; etanol; benzoato; acetona; treonina; 2-hidroxiisobutirato; creatinina; 3-hidroxifenilacetato y 3-indoxilsulfato;
- 15 (v) butirato; serina; asparagina; p-metilhistidina; 3-hidroxiisobutirato; metanol; 3-hidroximandelato; tirosina; trigonelina; β -alanina; histidina; dimetilamina; urea; 1,6-anhidro- β -D-glucosa; glucosa; etanol; benzoato; acetona; treonina; 2-hidroxiisobutirato; creatinina y 3-hidroxifenilacetato;
- (vi) butirato; serina; asparagina; p-metilhistidina; 3-hidroxiisobutirato; metanol; 3-hidroximandelato; tirosina; trigonelina; β -alanina; histidina; dimetilamina; urea; 1,6-anhidro- β -D-glucosa; glucosa; etanol; benzoato; acetona; treonina; 2-hidroxiisobutirato y creatinina;
- 20 (vii) butirato; serina; asparagina; p-metilhistidina; 3-hidroxiisobutirato; metanol; 3-hidroximandelato; tirosina; trigonelina; β -alanina; histidina; dimetilamina; urea; 1,6-anhidro- β -D-glucosa; glucosa; etanol; benzoato; acetona; treonina y 2-hidroxiisobutirato;
- 25 (viii) butirato; serina; asparagina; p-metilhistidina; 3-hidroxiisobutirato; metanol; 3-hidroximandelato; tirosina; trigonelina; β -alanina; histidina; dimetilamina; urea; 1,6-anhidro- β -D-glucosa; glucosa; etanol; benzoato; acetona y treonina;
- (ix) butirato; serina; asparagina; p-metilhistidina; 3-hidroxiisobutirato; metanol; 3-hidroximandelato; tirosina; trigonelina; β -alanina; histidina; dimetilamina; urea; 1,6-anhidro- β -D-glucosa; glucosa; etanol; benzoato y acetona;
- 30 (x) butirato; serina; asparagina; p-metilhistidina; 3-hidroxiisobutirato; metanol; 3-hidroximandelato; tirosina; trigonelina; β -alanina; histidina; dimetilamina; urea; 1,6-anhidro- β -D-glucosa; glucosa; etanol y benzoato;
- (xi) butirato; serina; asparagina; p-metilhistidina; 3-hidroxiisobutirato; metanol; 3-hidroximandelato; tirosina; trigonelina; β -alanina; histidina; dimetilamina; urea; 1,6-anhidro- β -D-glucosa; glucosa y etanol;
- (xii) butirato; serina; asparagina; p-metilhistidina; 3-hidroxiisobutirato; metanol; 3-hidroximandelato; tirosina; trigonelina; β -alanina; histidina; dimetilamina; urea; 1,6-anhidro- β -D-glucosa y glucosa;
- 35 (xiii) butirato; serina; asparagina; p-metilhistidina; 3-hidroxiisobutirato; metanol; 3-hidroximandelato; tirosina; trigonelina; β -alanina; histidina; dimetilamina; urea y 1,6-anhidro- β -D-glucosa;
- (xiv) butirato; serina; asparagina; p-metilhistidina; 3-hidroxiisobutirato; metanol; 3-hidroximandelato; tirosina; trigonelina; β -alanina; histidina; dimetilamina y urea;
- 40 (xv) butirato; serina; asparagina; p-metilhistidina; 3-hidroxiisobutirato; metanol; 3-hidroximandelato; tirosina; trigonelina; β -alanina; histidina y dimetilamina;
- (xvi) butirato; serina; asparagina; p-metilhistidina; 3-hidroxiisobutirato; metanol; 3-hidroximandelato; tirosina; trigonelina; β -alanina e histidina;
- (xvii) butirato; serina; asparagina; p-metilhistidina; 3-hidroxiisobutirato; metanol; 3-hidroximandelato; tirosina; trigonelina y β -alanina;
- 45 (xviii) butirato; serina; asparagina; p-metilhistidina; 3-hidroxiisobutirato; metanol; 3-hidroximandelato; tirosina y trigonelina;
- (xix) butirato; serina; asparagina; p-metilhistidina; 3-hidroxiisobutirato; metanol; 3-hidroximandelato y tirosina;
- (xx) butirato; serina; asparagina; p-metilhistidina; 3-hidroxiisobutirato; metanol y 3-hidroximandelato;

(xxi) butirato; serina; asparagina; p-metilhistidina; 3-hidroxi-butirato y metanol;

(xxii) butirato; serina; asparagina; p-metilhistidina y 3-hidroxi-butirato;

(xxiii) butirato; serina; asparagina y p-metilhistidina;

(xxiv) butirato; serina y asparagina;

5 (xxv) butirato y serina; y

(xxvi) butirato.

10 En algunas realizaciones de este ejemplo, una concentración elevada de uno o más metabolitos cualesquiera seleccionados del grupo que consiste en asparagina; p-metilhistidina; 3-hidroxi-butirato; 3-hidroxi-mandelato; tirosina; trigonelina; histidina; dimetilamina; urea; 1,6-anhidro-β-D glucosa; glucosa; benzoato; acetona; treonina; 2-hidroxiisobutirato; creatinina; 3-hidroxi-fenilacetato; 3-indoxil-sulfato; hipurato y 4-hidroxi-fenilacetato es indicativa de que el sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar pólipos colorrectales que son o bien pólipos adenomatosos o bien pólipos hiperplásicos. Como anteriormente, "elevado" es con respecto a una concentración de metabolito de orina correspondiente de individuos sanos.

15 En algunas realizaciones de este ejemplo, una concentración reducida de uno o más metabolitos cualesquiera seleccionados del grupo que consiste en butirato; serina; metanol; β-alanina; etanol y ascorbato es indicativa de que el sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar pólipos colorrectales que son o bien pólipos adenomatosos o bien pólipos hiperplásicos. Como anteriormente, "reducido" es con respecto a una concentración de metabolito de orina correspondiente de sujetos sanos.

20 En la tabla 3 se muestran concentraciones de metabolitos de orina elevadas y reducidas para sujetos que tienen pólipos que son o bien adenomatosos o bien hiperplásicos.

Evaluación de si un sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar pólipos adenomatosos

25 La invención proporciona métodos para evaluar si un sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar pólipos adenomatosos, comprendiendo el método: (a) proporcionar una muestra de orina de dicho sujeto; (b) obtener un perfil de metabolitos a partir de dicha muestra de orina; (c) comparar dicho perfil de metabolitos con un perfil de metabolitos de referencia; y (d) evaluar, basándose en dicha comparación en la etapa (c), si dicho sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar pólipos adenomatosos.

30 Pueden obtenerse muestras de orina tal como se describió anteriormente. El perfil de metabolitos del sujeto contiene la información correspondiente referente a la muestra de orina del sujeto según está contenida en el perfil de metabolitos de referencia seleccionado, tal como se describió anteriormente. La comparación del perfil de metabolitos del sujeto con el perfil de metabolitos de referencia permite la evaluación de si el sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar pólipos adenomatosos.

35 Simplemente a modo de ejemplo ilustrativo, el método puede ser un método para evaluar si un sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar CRC. Puede tomarse una muestra de orina y medirse concentraciones de los siguientes metabolitos: adipato; 3-hidroxi-butirato; creatina; guanidoacetato; dimetilamina; hipoxantina; benzoato; O-acetilcarnitina; piruvato; metanol; lactato; creatinina; xilosa; 3-indoxil-sulfato; trigonelina; taurina; treonina; p-metilhistidina; glucosa y 4-hidroxi-fenilacetato. Entonces se compara la concentración de cada uno de estos metabolitos en la orina del sujeto con las concentraciones de los metabolitos correspondientes en el perfil de metabolitos de referencia. La detección de una concentración de uno o más cualesquiera de adipato, 3-hidroxi-butirato, creatina, guanidoacetato, dimetilamina, benzoato, O-acetilcarnitina, lactato, xilosa, 3-indoxil-sulfato, trigonelina, taurina, treonina, p-metilhistidina y 4-hidroxi-fenilacetato en el perfil de metabolitos del sujeto mayor que en el perfil de metabolitos de referencia puede indicar que el sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar CRC. De manera similar, una concentración de uno o más cualesquiera de hipoxantina, piruvato, metanol, creatinina y glucosa en el perfil de metabolitos del sujeto menor que en el perfil de metabolitos de referencia puede indicar que el sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar CRC.

45 Kits de diagnóstico

La presente divulgación también proporciona kits para evaluar si un sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar CRC y/o pólipos colorrectales. Tales kits pueden comprender uno o más reactivos para detectar la presencia y/o concentración de uno o más metabolitos en una muestra de orina de un sujeto, y pueden incluir instrucciones para usar el kit para evaluar si un sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar CRC y/o pólipos colorrectales.

50 Es probable que los resultados más fiables se obtengan cuando se procesan muestras de orina, por ejemplo mediante espectroscopía de RMN, en un entorno de laboratorio. Por ejemplo, puede obtenerse una muestra de orina de un sujeto en la consulta de un profesional médico y después enviarse a un hospital o laboratorio médico comercial para pruebas adicionales. Sin embargo, en muchos casos, puede ser deseable proporcionar resultados

inmediatos en la consulta del médico o permitir que un sujeto realice las pruebas en su domicilio. La necesidad de una prueba que sea portátil, esté preconditionada, sea desechable, pueda usarla un sujeto sin ayuda o instrucciones, etc. puede en algunos casos ser más importante que un alto grado de precisión. En muchos casos, particularmente cuando habrá un seguimiento con un profesional médico, una prueba preliminar, incluso una con sensibilidad y/o especificidad reducidas, puede ser suficiente. Por tanto, un ensayo presentado en forma de kit puede implicar la detección y medición de un número relativamente pequeño de metabolitos, para reducir la complejidad y el coste del ensayo.

Puede usarse cualquier forma de ensayo en orina que pueda detectar metabolitos de orina tal como se describe en el presente documento. Normalmente, el ensayo cuantificará los metabolitos de orina en cierta medida, por ejemplo, si tienen una concentración o cantidad mayor o menor que un valor umbral predeterminado. Tales kits pueden adoptar la forma de una tira de ensayo, tira reactiva, casete, cartucho, matriz basada en chips o basada en perlas, placa de múltiples pocillos o serie de recipientes, o similares. Se proporcionan uno o más reactivos para detectar la presencia y/o concentración y/o cantidad de metabolitos de orina seleccionados. La orina del sujeto puede dispensarse directamente sobre el ensayo o indirectamente a partir de una muestra almacenada. La presencia o ausencia de un metabolito por encima o por debajo de un umbral predeterminado puede presentarse, por ejemplo, mediante una salida cromogénica, fluorogénica, electroquimioluminiscente u otra salida, por ejemplo como en un inmunoensayo enzimático (EIA) tal como un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA).

En una realización, un kit puede comprender un sustrato sólido, tal como por ejemplo un chip, portaobjetos, matriz, etc., con reactivos que pueden detectar y/o cuantificar uno o más metabolitos de orina inmovilizados en ubicaciones predeterminadas sobre el sustrato. A modo de ejemplo ilustrativo, puede proporcionarse un chip con reactivos inmovilizados en ubicaciones predeterminadas, diferenciadas, para la detección y cuantificación en una muestra de orina de la concentración de adipato; 3-hidroxiacetato; creatina; guanidoacetato y dimetilamina. Tal como se comentó anteriormente, se encontraron niveles elevados de estos metabolitos en la orina de sujetos con CRC. El chip puede estar configurado de tal manera que sólo se proporciona una salida detectable (por ejemplo, cambio de color) si la concentración de uno o más de estos metabolitos está por encima de un valor umbral, seleccionándose el valor umbral para distinguir entre una concentración de metabolito indicativa de sujetos sanos y aquellos que tienen o tienen predisposición a desarrollar CRC. Por tanto, la presencia de una salida detectable tal como un cambio de color proporciona una indicación inmediata de que la muestra de orina contiene niveles significativamente elevados de uno o más metabolitos de orina relevantes, indicando que el sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar CRC.

Sistemas para realizar la evaluación de CRC o pólipos colorrectales

En una realización, la invención proporciona un sistema para evaluar si un sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar pólipos adenomatosos. Tal como se muestra en la figura 29, un sistema de este tipo puede comprender:

(a) un aparato de evaluación de pólipos adenomatosos que incluye una unidad de control y una unidad de memoria para evaluar un estado de pólipos adenomatosos en un sujeto; y

(b) un aparato terminal de comunicación de información que proporciona datos sobre la presencia y/o concentración y/o cantidad de metabolitos en una muestra de orina del sujeto conectados entre sí en comunicación,

en el que el aparato terminal de comunicación de información incluye:

(a) una unidad de envío de datos que transmite los datos sobre la presencia y/o concentración y/o cantidad de metabolitos en la muestra al aparato de evaluación de pólipos adenomatosos; y

(b) una unidad de recepción de resultado de evaluación que recibe el resultado de evaluación del estado de pólipos adenomatosos del sujeto transmitido desde el aparato de evaluación de pólipos adenomatosos,

en el que la unidad de control del aparato de evaluación de pólipos adenomatosos incluye:

(a) una unidad de recepción de datos que recibe los datos sobre la concentración y/o cantidad de metabolitos de la muestra transmitidos desde el aparato terminal de comunicación de información;

(b) una unidad de cálculo de valor de discriminante que calcula un valor de discriminante que es un valor de discriminante de múltiples variables, basándose en la concentración y/o valor de cantidad de los metabolitos en la muestra recibidas por la unidad de recepción de datos y un discriminante de múltiples variables con la concentración y/o cantidad del metabolito como variable explicativa almacenada en la unidad de memoria;

(c) una unidad de evaluación de criterio de valor de discriminante que evalúa el estado de pólipos adenomatosos en el sujeto, basándose en el valor de discriminante calculado por la unidad de cálculo de valor de discriminante; y

(d) una unidad de envío de resultado de evaluación que transmite el resultado de evaluación del sujeto obtenido por la unidad de evaluación de criterio de valor de discriminante al aparato terminal de comunicación de información.

Evaluación de la eficacia de agentes farmacéuticos y/o tratamientos físicos y/o tratamiento quirúrgico

El análisis metabólico es ideal para la identificación y evaluación de los efectos de posibles agentes farmacéuticos y/o nuevos tratamientos físicos y/o quirúrgicos contra CRC, pólipos colorrectales y/o pólipos adenomatosos. Pueden tomarse muestras de orina una o más veces, mediante métodos descritos anteriormente en el presente documento, de un sujeto antes y después del tratamiento. El tratamiento puede incluir la administración de uno o más agentes farmacéuticos a una o más dosis, y/o llevar a cabo uno o más tratamientos físicos y/o quirúrgicos, a o en un sujeto. La administración de agentes farmacéuticos puede realizarse de muchas maneras diferentes incluyendo, pero sin limitarse a, inyección, administración oral, aplicación de parche o pomada.

Los perfiles de metabolitos obtenidos a partir de las muestras pueden compararse entre sí y/o con el perfil de metabolitos de sujetos sin CRC y/o pólipos colorrectales. La comparación puede indicar la eficacia de los agentes farmacéuticos y/o del tratamiento físico y/o tratamiento quirúrgico mediante cambios del perfil de metabolitos en muestras de orina del sujeto. Además, pueden estudiarse comorbidades y medicamentos de un sujeto en análisis posteriores para determinar sus efectos sobre los resultados de prueba metabólica y específicamente si contribuyen a resultados discordes. Además, los perfiles de metabolitos de las muestras con CRC pueden correlacionarse con hallazgos quirúrgicos e histológicos para determinar si la ubicación o el estadio de CRC pueden cambiar un perfil de metabolitos.

Esta invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplo 1. Evaluación de grupo de CRC frente al grupo normal (incluido con fines ilustrativos)

Se reclutaron sujetos para el grupo normal de un estudio basado en población de 1.200 sujetos asintomáticos que se suponía que estaban expuestos a un riesgo promedio o alto de CRC, basándose en historia familiar de cáncer colorrectal o historia personal de pólipos colorrectales. A todos los sujetos para el grupo de CRC se les había diagnosticado recientemente CRC.

Se seleccionaron cuatrocientos cuarenta y cuatro sujetos sin CRC y/o pólipos colorrectales y se clasificaron como grupo normal. Se clasificaron setenta y siete sujetos con CRC como grupo de CRC. Se obtuvo información clínica a partir de cuestionarios del estudio y los sujetos cumplieron un cuestionario médico, se les realizó una FOBT, FIT y una colonoscopia para la determinación de la clasificación.

Se recogieron muestras de orina de sujetos de los dos grupos. Se congelaron las muestras de orina a -80°C en el plazo de 24 horas tras la recogida. Los recipientes de recogida de muestras de orina se cargaron previamente con azida de sodio en polvo para detener cualquier crecimiento bacteriano en la orina mientras esperaba a congelarse a -80°C .

Se descongelaron muestras de orina a temperatura ambiente en la campana biológica 24 horas antes de la adquisición de RMN. Para la adquisición de RMN no automatizada (manual), se diluyeron $585\ \mu\text{l}$ de cada muestra con $65\ \mu\text{l}$ de patrón interno que consistía en 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sodio (DSS) 5 mM, imidazol 100 mM y azida de sodio al 0,2% en D_2O al 99% (Chenomx Inc., Edmonton, AB) para lograr un volumen total de $650\ \mu\text{l}$ y se almacenaron a 4°C . Para la adquisición de RMN automatizada (robótica), se diluyeron $675\ \mu\text{l}$ de cada muestra con $75\ \mu\text{l}$ del mismo patrón interno de Chenomx para lograr un volumen total de $750\ \mu\text{l}$ y se almacenaron a 4°C . En el día de la adquisición de RMN, se midió el pH de cada muestra. Se añadieron diversas concentraciones de HCl y NaOH a las muestras para lograr un pH de entre 6,7 y 6,8 para minimizar el intercambio químico ya que el desplazamiento químico cambiará con el pH. Para las muestras para la RMN no automatizada, se colocó una alícuota de $600\ \mu\text{l}$ de las muestras en tubos de RMN de 5 mm y se taparon; para las muestras para la RMN automatizada, se usaron $700\ \mu\text{l}$.

Modo manual/no automatizado: Se adquirieron espectros de RMN de una dimensión usando un espectrómetro de RMN Oxford 600 Hz con una consola de dos canales Varian VNMR5 y que funcionaba con software VNMRJ versión 2.2C en un ordenador central RHEL 4 en el Canadian National High Field NMR Centre (NANUC). Se establecieron muestras ($600\ \mu\text{l}$) a una profundidad de 66 mm en el calibre de profundidad y después se insertaron en el espectrómetro. Se ejecutaron todas las muestras a una anchura de barrido (sw) de 7225,43 Hz. Se calibraron individualmente la frecuencia de saturación (sfrq), desviación de transmisor (tof) y anchura de pulso (pw) al comienzo de cada conjunto de ejecuciones de muestras. La tof osciló entre (-213 y -215 Hz) y la pw osciló entre 6 y 8 microsegundos. Se optimizaron las correcciones hasta que se obtuvo un valor de anchura de línea aceptable a alturas de pico relativas del 50% ($< 1,0\ \text{Hz}$), el 0,55% ($< 12,0\ \text{Hz}$) y el 0,11% ($< 20,0\ \text{Hz}$). Durante el procesamiento posterior de la muestra, se usó un rellenado con ceros para aumentar los puntos de datos adquiridos reales al siguiente factor de 2 más grande. No se aplicaron funciones de ponderación. Se usó el primer incremento de una secuencia de pulsos 2D-1H, 1H-NOESY para la adquisición de datos de 1H-RMN (resonancia magnética nuclear de hidrógeno 1) y para la supresión de la señal de disolvente. Los experimentos contenían un tiempo de mezclado de 100 ms junto con un tiempo previo a la saturación de 990 ms ($\sim 80\ \text{Hz}$ gammaB1). Se recogieron espectros a 25°C a lo largo de un total de 32 exploraciones a lo largo de un periodo de 3,5 minutos; también se usó un retardo de recirculación total de 5 segundos.

Modo automatizado: Las ejecuciones automatizadas siguieron exactamente los mismos parámetros experimentales usados en el modo manual con la excepción de i) uso de muestra de $700\ \mu\text{l}$ y ii) 30 s adicionales de tiempo de

aquellos a la derecha eran los verdaderos positivos (TP). Los datos de sensibilidad y especificidad se resumen en la tabla 2.

En la tabla 2, la columna de modelo indica qué metabolitos se usaron para construir el modelo. El término “modelo principal” se refiere al modelo que contenía los 69 metabolitos. La columna de punto de corte corresponde a determinados puntos de corte en la curva de ROC. La sensibilidad y la especificidad son medidas de lo exacta y precisa que es la prueba. La curva de ROC es una medida de lo robustos que son los modelos. R^2Y y Q^2 son medidas de la calidad de los modelos construidos; lo que significa que cuanto mayores son los números mejor es el modelo. Un número negativo significa que no puede usarse el modelo.

A partir de la tabla 2 puede observarse que con un punto de corte que oscila entre 0,114184 - 0,302331 se alcanzarán resultados en un intervalo de sensibilidad del 87,18-25,64% y un intervalo de especificidad del 54,03-98,10% al usar los metabolitos con una puntuación de VIP mayor de 1. De manera similar, pueden usarse diferentes puntos de corte para numerosos conjuntos de los metabolitos, lo que también puede observarse en la tabla 2 con los diferentes subconjuntos de metabolitos. Por ejemplo, cuando se usan los 15 metabolitos principales y un intervalo de punto de corte de 0,120717-0,326168 pueden alcanzarse un intervalo de sensibilidad del 79,49-20,51% y un intervalo de especificidad del 34,12-99,53%.

Con los datos de la tabla 2, se representaron gráficamente las curvas de ROC de sensibilidad frente a 1-especificidad (figuras 9 y 10) usando STATA10.0 (College Station, Texas). Las curvas de ROC en las figuras tenían puntuaciones de AUC de 0,9178 y 0,8465, respectivamente. Este resultado mostró que el perfil de metabolitos que consistía en 20 metabolitos de los 69, con un valor de VIP mayor de 1, también podía usarse para evaluar si un sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar CRC, aunque el perfil de metabolitos que consiste en 69 metabolitos puede proporcionar una evaluación más precisa. La tabla 2 también demuestra que pueden usarse incluso cinco metabolitos con los valores de VIP más altos para evaluar si un sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar CRC.

Ejemplo 2. Evaluación del grupo de pólipos frente al grupo normal (incluido con fines ilustrativos)

Se reclutaron sujetos para el grupo normal y el grupo de pólipos a partir de un estudio basado en población de 1.200 sujetos asintomáticos que se suponía que estaban expuestos a un riesgo promedio o alto de CRC, basándose en historia familiar de CRC o historia personal de pólipos colorrectales. Todos los sujetos cumplieron un cuestionario médico, se les realizaron una FOBT, FIT y una colonoscopia para determinar la clasificación de los sujetos. Se encontró que un sujeto en el grupo de pólipos tenía CRC y se excluyó de la prueba.

Se seleccionaron cuatrocientos cuarenta y cuatro sujetos sin CRC y/o pólipos colorrectales y se clasificaron como grupo normal. El grupo de pólipos consistía en doscientos treinta y seis con pólipos hiperplásicos y adenomas tubulares, tubulovillosos, villosos.

Se siguió el procedimiento tal como se describió anteriormente en “evaluación del grupo de cáncer frente al grupo normal” para la recogida de muestras de orina, tratamiento de la muestra, adquisición de RMN y análisis de los datos obtenidos.

Se consideraron más de 240 metabolitos y se encontró que 72 eran significativos, es decir, se identificaron los picos espectrales de 72 metabolitos en la biblioteca de compuestos en los espectros de las muestras del estudio: 1,6-anhidro- β -D-glucosa, 1-metilnicotinamida, 2-hidroxiisobutirato, 2-oxoglutarato, 3-aminoisobutirato, 3-hidroxiisobutirato, 3-hidroxiisovalerato, 3-hidroxiacetato, 3-hidroxiacetato, 3-indoxilsulfato, 4-hidroxiacetato, acetato, acetona, adipato, alanina, ascorbato, asparagina, benzoato, betaína, butirato, carnitina, citrato, creatina, creatinina, DSS (indicador de forma químico), dimetilamina, etanol, formiato, galactosa, glucosa, glutamina, glicerol, glicina, glicolato, guanidoacetato, hipurato, histidina, hipoxantina, ibuprofeno, isoleucina, lactato, leucina, lisina, manitol, metanol, metilguanidina, N,N-dimetilglicina, O-acetilcarnitina, pantotenato, propilenglicol, piroglutamato, piruvato-salicilurato, serina, succinato, sacarosa, tartrato, taurina, treonina, trigonelina, trimetilamina, N-óxido de trimetilamina, tirosina, uracilo, urea, valina, xilosa, cis-aconitato, trans-aconitato, β -alanina, II-metilhistidina, T-metilhistidina.

Se sometieron las concentraciones de metabolitos a transformación logarítmica para normalizar las concentraciones. Se excluyeron aquellos metabolitos que no eran productos del metabolismo humano normal, es decir xenobióticos, tales como ibuprofeno y salicilurato. También se excluyó el patrón interno DSS en el análisis, y se obtuvieron 69 metabolitos como perfil de metabolitos de referencia.

Los metabolitos identificados con una puntuación de VIP de más de 1 son butirato; serina; asparagina; p-metilhistidina; 3-hidroxiisobutirato; metanol; 3-hidroxiacetato; tirosina; trigonelina; β -alanina; histidina; dimetilamina; urea; 1,6-anhidro- β -D-glucosa; glucosa; etanol; benzoato; acetona; treonina; 2-hidroxiisobutirato; creatinina; 3-hidroxiacetato; 3-indoxilsulfato; hipurato; ascorbato y 4-hidroxiacetato. El resultado se resume en la tabla 3 junto con la lista de 69 metabolitos.

Se realizó el siguiente análisis con dos perfiles de metabolitos diferentes, uno con los 69 metabolitos que se encontró que eran significativos para la separación del grupo de pólipos y el grupo normal, y el otro con 26 metabolitos con un valor de VIP mayor de 1.

Se generaron los gráficos de VIP para ilustrar qué metabolitos contribuyen más a la separación entre los grupos normal y de pólipos (figuras 11 y 12). Se produjeron los gráficos de dispersión bidimensionales de OPLS (figuras 13 y 14), PLS-DA (figuras 15 y 16), gráficos de observado frente a predicho (figuras 17 y 18), curvas de ROC (figuras 19 y 20) y datos de sensibilidad y especificidad (tabla 4) resultantes.

5 En el gráfico de dispersión de OPLS, el grupo normal estaba en cuadrados grises y el grupo de pólipos estaba en rombos negros. Las figuras 13 y 14 mostraron, aunque hubo un solapamiento entre los dos grupos, que el grupo de pólipos se agrupó junto y el grupo normal también se agrupó junto, y aparecieron en lados diferentes (derecho e izquierdo) de cada gráfico.

10 En el gráfico de dispersión de PLS-DA, el grupo normal estaba en cuadrados grises y el grupo de pólipos estaba en rombos negros. Las figuras 15 y 16 mostraron, aunque hubo un solapamiento entre los dos grupos, de manera similar al gráfico de dispersión de OPLS, que el grupo de pólipos se agrupó junto en la parte superior del gráfico y el grupo normal se agrupó junto en la parte inferior.

15 A partir de la tabla 4, se alcanzaría un intervalo de sensibilidad del 94-57% y un intervalo de especificidad del 40-78% con un intervalo de punto de corte de 0,25-0,45. En el entorno de una prueba de exploración, una tasa de FN baja es más importante que una tasa de FP baja, por tanto puede lograrse una sensibilidad mayor a costa de una especificidad menor. En este caso, puede usarse un punto de corte de 0,3 para lograr una sensibilidad del 88% y una especificidad del 51%. En cambio, análisis preliminares de cincuenta y dos sujetos de muestras del grupo normal y de pólipos que mostraron FOBT tenían una sensibilidad del 9% y una especificidad del 100%.

20 Las curvas de ROC en las figuras 19 y 20 tenían puntuaciones de AUC de 0,7673 y 0,7015, respectivamente. Este resultado mostró que también puede usarse el perfil de metabolitos que consistía en 26 metabolitos de los 69, con valor de VIP mayor de 1, para evaluar si un sujeto tiene pólipos colorrectales, aunque el perfil de metabolitos que consiste en 69 metabolitos puede proporcionar una evaluación más precisa. La tabla 4 también demuestra que pueden usarse incluso cinco metabolitos con los valores de VIP más altos para evaluar si un sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar pólipos colorrectales.

25 Ejemplo 3. Evaluación del grupo de pólipos de adenoma frente al grupo normal

Se reclutaron sujetos para el grupo normal y el grupo de adenoma a partir de un estudio basado en población de 1.200 sujetos asintomáticos que se suponía que estaban expuestos a un riesgo promedio o alto de CRC, basándose en historia familiar de CRC o historia personal de pólipos colorrectales.

30 Se seleccionaron cuatrocientos cuarenta y cuatro sujetos sanos sin CRC y/o pólipos colorrectales y se clasificaron como grupo normal. El grupo de adenoma consistió en ciento sesenta y dos sujetos con pólipo adenomatoso. Se obtuvo información clínica a partir de cuestionarios del estudio y los sujetos cumplimentaron un cuestionario médico, se les realizaron una FOBT, FIT y una colonoscopia para la determinación de la clasificación.

Se siguió el procedimiento descrito anteriormente en "evaluación del grupo de cáncer frente al grupo normal" para la recogida de muestras de orina, tratamiento de la muestra, adquisición de RMN y análisis de los datos obtenidos.

35 Se consideraron más de 240 metabolitos y se encontró que 72 eran significativos, es decir, se identificaron los picos espectrales de 72 metabolitos en la biblioteca de compuestos en los espectros de las muestras del estudio: 1,6-anhidro- β -D-glucosa, 1-metilnicotinamida, 2-hidroxiisobutirato, 2-oxoglutarato, 3-aminoisobutirato, 3-hidroxiisobutirato, 3-hidroxiisovalerato, 3-hidroxiacetato, 3-hidroxiacetato, 3-indoxilsulfato, 4-hidroxiacetato, acetato, acetona, adipato, alanina, ascorbato, asparagina, benzoato, betaína, butirato, citrato, creatina, creatinina, creatinina, DSS (indicador de forma químico), dimetilamina, etanol, formiato, galactosa, glucosa, glutamina, glicerol, glicina, glicolato, guanidoacetato, hipurato, histidina, hipoxantina, ibuprofeno, isoleucina, lactato, leucina, lisina, manitol, metanol, metilguanidina, N,N-dimetilglicina, O-acetilcarnitina, pantotenato, propilenglicol, piroglutamato, piruvato-salicilurato, serina, succinato, sacarosa, tartrato, taurina, treonina, trigonelina, trimetilamina, N-óxido de trimetilamina, tirosina, uracilo, urea, valina, xilosa, cis-aconitato, trans-aconitato, β -alanina, Π -metilhistidina, T-metilhistidina.

45 Se sometieron las concentraciones de metabolitos a transformación logarítmica para normalizar las concentraciones. Se excluyeron los metabolitos que no eran productos del metabolismo humano normal, es decir xenobióticos, tales como ibuprofeno y salicilurato. También se excluyó el patrón interno DSS en el análisis y se obtuvieron 69 metabolitos como perfil de metabolitos de referencia.

50 Los metabolitos identificados con una puntuación de VIP de más de uno son butirato, serina, asparagina, Π -metilhistidina, 3-hidroxiacetato, metanol, 3-hidroxiacetato, tirosina, trigonelina, β -alanina, histidina, dimetilamina, urea, 1,6-anhidro- β -D-glucosa, glucosa, etanol, benzoato, acetona, treonina, 2-hidroxiisobutirato, creatinina, 3-hidroxiacetato, 3-indoxilsulfato, hipurato, ascorbato, 4-hidroxiacetato. El resultado se resume en la tabla 5 junto con la lista de 69 metabolitos.

55 Se realizó el siguiente análisis con dos perfiles de metabolitos diferentes, uno con los 69 metabolitos importantes y el otro con 17 metabolitos con un valor de VIP mayor de 1.

Los gráficos de VIP se generaron para ilustrar qué metabolitos contribuyen más a la separación entre los grupos normal y de adenoma (figuras 21 y 22). Se produjeron los gráficos de dispersión de OPLS (figura 23), PLS (no mostrado), gráficos de observado frente a predicho (figuras 24 y 25), curva de ROC (figuras 26 y 27) y datos de sensibilidad y especificidad (tabla 6) resultantes.

5 En el gráfico de dispersión de OPLS, el grupo normal está en cuadrados grises y el grupo de pólipos está en rombos negros. La figura 23 muestra, aunque hay un solapamiento entre los dos grupos, que el grupo de pólipos se agrupa junto y el grupo normal también se agrupa junto, y aparecen en lados diferentes (derecho e izquierdo) del gráfico. No se muestra el gráfico de dispersión de OPLS para 17 metabolitos con un valor de VIP mayor de 1.

10 En el gráfico de dispersión de PLS-DA, el grupo normal está en cuadrados grises y el grupo de pólipos está en rombos negros. Aunque hay un solapamiento entre los dos grupos, de manera similar al gráfico de dispersión de OPLS, el grupo de pólipos se agrupa junto en la parte superior del gráfico y el grupo normal se agrupa junto en la parte inferior.

15 A partir de la tabla 6, se alcanzaría un intervalo de sensibilidad del 65,55-5,88% y un intervalo de especificidad del 50,71-98,58% con un intervalo de punto de corte de 0,329791-0,577397 para los metabolitos con una puntuación de VIP mayor de 1. En el entorno de una prueba de exploración, una tasa de FN baja es más importante que una tasa de FP baja, por tanto puede lograrse una sensibilidad mayor a costa de una especificidad menor. En este caso, puede usarse un punto de corte de 0,329791 para lograr una sensibilidad del 65,55% y una especificidad del 50,71%. En cambio, análisis preliminares de cincuenta y dos muestras normales y de pólipos colorrectales que mostraron FOBT tenían una sensibilidad del 9% y una especificidad del 100%.

20 Las curvas de ROC en las figuras 26 y 27 tenían puntuaciones de AUC de 0,7524 y 0,6937, respectivamente. Este resultado mostró que también puede usarse el perfil de metabolitos que consistía en 17 metabolitos de los 69, con valor de VIP mayor de 1, para evaluar si un sujeto tiene pólipos adenomatosos, aunque el perfil de metabolitos que consiste en 69 metabolitos puede proporcionar una evaluación más precisa. La tabla 6 también demuestra que pueden usarse incluso cinco metabolitos con los valores de VIP más altos para evaluar si un sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar pólipos adenomatosos.

Ejemplo 4. Evaluación del grupo de pólipos de adenoma frente al grupo de pólipos hiperplásicos

30 Se introdujo un total de 110 muestras de orina de sujetos con pólipos hiperplásicos de manera ciega en el modelo de normal frente a adenoma comentado en el ejemplo 3. El resultado del análisis mostró que el perfil de metabolitos de pólipos hiperplásicos era más similar al del grupo adenomatoso que al del grupo normal (figura 29). Esto se confirmó adicionalmente mediante un intento por establecer un modelo de OPLS entre pólipos hiperplásicos y pólipos adenomatosos. No pudo construirse un modelo significativo para separar los dos grupos ($R^2Y = 0,126$, $Q^2 = -0,0771$).

Este resultado sugiere que algunos de los pólipos hiperplásicos pueden ser precancerosos como los pólipos adenomatosos y por tanto presentan una huella metabólica precancerosa.

35 Ejemplo 5. Métodos analíticos y su aplicación

Métodos analíticos

PLS (convencional): PLS convencional se aplica al problema de regresión de dos bloques (X/Y). Usa X para construir un modelo de Y, en el que el objetivo es predecir este último a partir del primero para nuevas muestras en el conjunto de predicción. En este sentido, PLS es unidireccional, es decir, $X \rightarrow Y$, pero no viceversa.

40 Cuando X está compuesto, por ejemplo, por datos espectroscópicos, lecturas de procesamiento o medidas a partir de plataformas bioanalíticas, existe un riesgo de que pueda residir variación sistemática en X que no está linealmente correlacionada con Y. Tal variabilidad en X se denomina habitualmente variación ortogonal a Y. Aunque la variación ortogonal a Y en X no afecta al poder predictivo de un modelo de PLS, puede afectar negativamente a la interpretación del modelo. La correspondencia puntuación-carga se ve perturbada por la presencia de variación ortogonal a Y en X.

45 *OPLS:* El método de OPLS es una modificación reciente del método de PLS, que se diseña para gestionar la variación en X que es ortogonal a Y. Es una extensión del método de regresión de PLS supervisado con un filtro de corrección de señal ortogonal (OSC) integrado, que elimina las señales no correlacionadas dando como resultado información de la variación dentro de la clase. OPLS separa la variación simétrica en X en dos partes, una que está linealmente relacionada (y por tanto es predictiva) con Y y una que es ortogonal a Y. La variación predictiva de Y en X se modela mediante las componentes predictivas. La variación en X que es ortogonal a Y se modela mediante las componentes ortogonales. Este reparto de los datos de X proporciona una capacidad de interpretación y transparencia de modelo mejoradas, pero no cambia el poder predictivo. De manera similar a PLS, OPLS es un método unidireccional, en el que el alcance es la relación $X \rightarrow Y$.

55 *Gráfico de dispersión de OPLS:* El gráfico de dispersión es del modelo de OPLS.

O2PLS: O2PLS es una generalización de OPLS. A diferencia de PLS y OPLS, O2PLS es bidireccional, es decir $X \longleftrightarrow Y$, y por tanto puede usarse X para predecir Y, y puede usarse Y para predecir X. Adicionalmente, con O2PLS es posible repartir la variabilidad sistémica en X e Y en tres partes, (i) la variación predictiva conjunta de X/Y, (ii) la variación ortogonal a Y en X, y (iii) la variación no relacionada con X en Y.

- 5 La figura 30 es un resumen del modelo de O2PLS que relaciona dos tablas de datos entre sí. La variación ortogonal a Y en X (lado izquierdo de la figura) representa la variación de las observaciones en X que está variando de manera ortogonal a la estructura correspondiente en Y. Esta variación es única para X. La variación predictiva conjunta de X/Y (parte central de la figura) describe la variación predictiva entre X e Y, el solapamiento de información. La variación no relacionada con X en Y (lado derecho de la figura) corresponde a la variación de las observaciones en Y que está variando de manera ortogonal a la estructura correspondiente en X. Esta variación es única para Y.

La capacidad de interpretar la variación predictiva conjunta de X/Y por separado de la variación no correlacionada implica que se refina y simplifica la interpretación del modelo. Además, debe observarse que para el caso de una única y, los métodos de OPLS y O2PLS son idénticos. Para un modelo de este tipo sólo puede haber una componente predictiva que expresa la variación predictiva de X/Y conjunta.

- 15 **Gráfico de dispersión de PLS-DA:** Este gráfico de dispersión es del modelo de análisis de discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). Se usa PLS convencional cuando existe una relación cuantitativa entre dos tablas de datos X e Y; usa X para construir un modelo de Y, en el que el objetivo es predecir Y a partir de X para nuevas muestras en el conjunto de predicción. Es otro método estadístico usado para comprimir conjuntos de datos multidimensionales y complejos para dar un conjunto de datos más fácil de gestionar.

- 20 **Gráfico de observado frente a predicho:** El gráfico de observado frente a predicho presenta los valores observados frente a valores ajustados o predichos para la respuesta seleccionada. El gráfico de observado frente a predicho es un gráfico de dispersión de las variables Y (que son normal frente a cáncer, adenoma o pólipos) frente a los valores predichos. El gráfico de observado frente a predicho proporciona valores predichos de Y, según se asignan por el modelo, para cada muestra junto con su valor observado (normal o cáncer/adenoma/pólipo). Después, se toman estos valores para generar una curva de ROC. El gráfico de observado frente a predicho permite determinar los verdaderos positivos, falsos positivos, verdaderos negativos y falsos negativos, calcular la sensibilidad y especificidad con un intervalo de puntos de corte, y ver el solapamiento presente entre dos grupos.

- 25 **Curva de ROC:** La curva de característica operativa del receptor (ROC) es una representación gráfica del espectro de sensibilidades y especificidades generado usando los diversos puntos de corte, usando la sensibilidad como eje y y 1-especificidad como eje x. El área bajo la curva de ROC (AUC) refleja la precisión de la prueba y se presenta en la esquina inferior izquierda del gráfico. Un AUC de 0,9 a 1 representa una prueba de diagnóstico excelente mientras que un AUC de 0,8-0,9 representa una prueba buena y un AUC de 0,7 a 0,8 representa una prueba aceptable.

- 30 **Gráfico de VIP:** El gráfico de la importancia de la variable en la proyección (VIP) permite identificar qué metabolitos tienen un mayor impacto sobre el impulso de la separación entre grupos en modelos. A cada metabolito usado para construir modelos se le asigna una puntuación de VIP; esta puntuación se asigna mediante una fórmula estadística que se usa para calcular la influencia de cada modelo. Cuanto mayor es la puntuación de VIP, mayor es la influencia del metabolito con la puntuación sobre la conformación del modelo. VIP también permite la comparación de un metabolito con otro. Se dice que los términos con un VIP más grande (mayor de 1) son los más relevantes para explicar "Y".

40 **Métodos analíticos usados**

Gráfico de dispersión de OPLS y PLS-DA: El PLS ortogonal denominado O2PLS se ha implementado en SIMCA-P+ 12. O2PLS es bidireccional, es decir $X \longleftrightarrow Y$, y por tanto puede usarse X para predecir Y, y puede usarse Y para predecir X. Para el caso de una única y, los métodos de OPLS y O2PLS son idénticos.

El modelo de O2PLS puede escribirse como:

- 45
$$(1) X = T_P P'_P + T_O P'_O + E \text{ (para el modelo de X)}$$

$$(2) Y = U_P Q'_P + U_O Q'_O + F \text{ (para el modelo de Y)}$$

donde existe una relación lineal entre T_P y U_P . En este caso, los vectores de puntuación en T_P y T_O son mutuamente ortogonales. El número de componentes en el conjunto respectivo de componentes se determina usando una validación cruzada.

- 50 Para cualquier parte del modelo de OPLS/O2PLS, los porcentajes explicados y las varianzas predichas pueden obtenerse a partir de gráficos y listas en el software. Los vectores indicados en la tabla 7 son únicos para OPLS/O2PLS. Estos vectores, además de los indicados para PLS, se calculan para cada componente.

Curva de ROC (característica operativa del receptor): Se generaron curvas de ROC usando STATA 10.0 (College Station, Texas), junto con las curvas de ROC también se generó un informe completo de sensibilidad y especificidad.

La curva de ROC es una herramienta fundamental para la evaluación de pruebas de diagnóstico. En una curva de ROC se representa gráficamente la tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) en función de la tasa de falsos positivos (100-especificidad) para diferentes puntos de corte de un parámetro. Cada punto en la curva de ROC representa un par de sensibilidad/especificidad correspondiente a un umbral de decisión particular. El área bajo la curva de ROC es una medida de lo bien que puede distinguir un parámetro entre dos grupos de diagnóstico (enfermo/normal).

El rendimiento de diagnóstico de una prueba, o la precisión de una prueba para distinguir casos enfermos de casos normales, se evalúa usando el análisis de curva de característica operativa del receptor (ROC). También pueden usarse curvas de ROC para comparar el rendimiento de diagnóstico de dos o más pruebas de laboratorio o de diagnóstico.

Un resultado de prueba que compara dos poblaciones, por ejemplo, una con una enfermedad y la otra sin la enfermedad, pocas veces se observa una separación perfecta entre los dos grupos. De hecho, la distribución de los resultados de prueba se solapará, tal como se muestra en la siguiente figura. Por tanto, cuando se selecciona y se aplica un punto de corte o valor de criterio para distinguir entre las dos poblaciones, habrá algunos casos con la enfermedad correctamente clasificados como positivos (TP = fracción de verdaderos positivos), pero algunos casos con la enfermedad se clasificarán como negativos (FN = fracción de falsos negativos). Por otro lado, algunos casos sin la enfermedad se clasificarán correctamente como negativos (TN = fracción de verdaderos negativos), pero algunos casos sin la enfermedad se clasificarán como positivos (FP = fracción de falsos positivos). En una curva de característica operativa del receptor (ROC), se representa gráficamente la tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) en función de la tasa de falsos positivos (100-especificidad) para diferentes puntos de corte. Cada punto en la curva de ROC representa un par de sensibilidad/especificidad correspondiente a un umbral de decisión particular. Una prueba con una distinción perfecta (sin solapamiento en las dos distribuciones) tiene una curva de ROC que pasa a través de la esquina superior izquierda (sensibilidad del 100%, especificidad del 100%). Por tanto, cuanto más cerca está la curva de ROC de la esquina superior izquierda, mayor es la precisión global de la prueba.

Gráfico de VIP: SIMCA-P+ calcula la influencia sobre Y de cada término (x_k) en el modelo, denominada VIP (importancia de la variable en la proyección). VIP es la suma a lo largo de todas las dimensiones de modelo de las contribuciones VIN (influencia de la variable). Para una dimensión de PLS dada, a , $(VIN)_{ak}^2$ es igual al peso de PLS al cuadrado (w_{ak}^2) de ese término, multiplicado por la SS explicada de esa dimensión de PLS. El valor acumulado (a lo largo de todas las dimensiones de PLS) es:

$$VIP_{ak}^2 = \sum (VIN)_k^2$$

donde la suma se realiza a lo largo de $a = 1$ a A . Después se divide este valor entre la SS explicada total por el modelo de PLS y se multiplica por el número de términos en el modelo. La VIP final es la raíz cuadrada de ese número. La fórmula también puede expresarse como:

$$VIP_{Ak} = \sqrt{\sum_{a=1}^A (w_{ak}^2 * (SSY_{a-1} - SSY_a)) * \frac{K}{(SSY_a - SSY_A)}}$$

La suma de cuadrados de todas las VIP es igual al número de términos en el modelo, por tanto la VIP promedio es igual a 1. Puede compararse la VIP de un término con los otros. Los términos con VIP grandes, mayores de 1, son los más relevantes para explicar Y. El gráfico de VIP muestra cuáles son las variables más importantes a lo largo del modelo en su conjunto.

El gráfico de VIP porta información similar al gráfico de coeficientes y en términos prácticos con frecuencia los dos gráficos parecen muy similares. La principal diferencia es que el gráfico de VIP describe qué variables X caracterizan bien al bloque de X y qué variables se correlacionan con Y. PLS es una técnica dual que intenta encontrar direcciones en X que tanto caracterizan bien las X como están relacionadas con Y. En casos extremos, es posible que una variable X tenga una alta VIP, pero no esté relacionada con Y en absoluto.

Los valores de VIP resumen la contribución global de cada variable X al modelo de PLS, sumada a lo largo de todas las componentes y ponderada según la variación en Y representada por cada componente, por tanto sólo se obtiene un único gráfico de VIP por modelo.

Máquinas de vectores de soporte (SVM): Se construyeron clasificadores usando máquinas de vectores de soporte (SVM). Las SVM separan los puntos de datos de pólipos frente a normales en un espacio de n dimensiones (en el que n es el número de características) de manera que se maximiza el margen de separación. Se construyó una SVM lineal, lo que significa que se crea una ecuación lineal:

$$\text{predicción (x)} = w_1 \cdot x_1 + w_2 \cdot x_2 + \dots + w_n \cdot x_n - b$$

Los valores x_i son los valores individuales del vector característico para un sujeto (tal como se describió en la

sección de “clasificación”). Los valores w_i son los valores de ponderación que se encuentran mediante el algoritmo de SVM, junto con el parámetro b que ayuda a ajustar la ecuación al conjunto de datos.

Tabla 1. Puntuaciones de VIP (grupo normal frente a grupo de CRC) con análisis de concentración (concentraciones en μM)

ID de var. (primaria)	Puntuación de VIP	Normales				Cáncer				Mayor en normal	Mayor en cáncer
		mín.	máx.	media	mediana	mín.	máx.	media	mediana		
Adipato	3,93	0,0	103,9	1,3	0,0	0,0	8645,5	218,1	0,0		x
3-Hidroxi-butirato	2,25	0,0	498,4	11,7	0,0	0,0	3075,7	157,0	0,0		x
Creatina	1,96	0,0	15102,4	2099,7	1563,5	0,0	13477,6	2280,7	1339,0		x
Guanido-acetato	1,95	0,0	1781,0	204,0	143,0	0,0	2857,9	232,0	148,9		x
Dimetilamina	1,82	193,0	24617,4	5643,3	4234,9	716,0	35527,5	8175,9	6212,0		x
Hipoxantina	1,66	0,0	2108,5	208,4	106,5	0,0	1240,1	188,4	144,1	x	
Benzoato	1,64	0,0	567,3	3,5	0,0	0,0	1130,9	35,0	0,0		x
O-acetil-carnitina	1,60	0,0	131,3	24,7	17,5	0,0	168,2	30,0	21,3		x
Piruvato	1,56	0,0	539,8	35,4	10,0	0,0	341,2	28,4	8,0	x	
Metanol	1,52	0,0	4738,5	224,5	0,0	0,0	2783,6	215,9	0,0	x	
Lactato	1,28	0,0	31,5	4,1	0,0	0,0	90,0	8,2	0,0		x
Creatinina	1,26	0,0	10201,1	331,0	58,1	0,0	1245,5	109,8	0,0	x	
Xilosa	1,22	7,1	8301,4	308,6	163,1	9,9	1554,7	364,0	237,0		x
3-Indoxilsulfato	1,19	0,0	1317,6	120,5	82,5	0,0	1207,0	209,1	135,5		x
Trigonelina	1,13	0,0	474,7	78,5	48,7	0,0	450,6	99,6	60,2		x
Taurina	1,06	0,0	536,6	39,0	22,5	0,0	416,3	43,3	18,7		x
Treonina	1,04	0,0	888,3	45,5	13,4	0,0	715,5	79,1	35,0		x
p-Metilhistidina	1,04	0,0	113,8	20,3	14,2	0,0	164,9	25,7	18,0		x
Glucosa	1,03	0,0	614,8	12,8	0,0	0,0	460,6	7,4	0,0	x	
4-Hidroxifenil-acetato	1,01	0,0	1401,1	72,6	48,8	0,0	856,0	102,7	57,9		x
1,6-Anhidro- β -D-glucosa	0,98	0,0	2763,6	35,7	13,8	0,0	140,4	27,8	18,1	x	
Sacarosa	0,91	0,0	982,2	87,7	0,0	0,0	1419,5	96,3	0,0		x
β -Alanina	0,87	6976,6	441697,0	127007,5	111896,6	8573,4	324813,3	115212,8	99859,9	x	
Formiato	0,86	0,0	27789,2	250,7	0,0	0,0	261,1	9,7	0,0	x	
3-Hidroxi-mandelato	0,81	0,0	2539,3	60,0	0,0	0,0	750,9	37,4	0,0	x	
N-óxido de trimetilamina	0,78	0,0	5028,3	283,2	132,2	0,0	2465,1	450,2	283,1		x
Carnitina	0,76	0,0	907,1	47,8	22,7	0,0	972,1	85,5	36,4		x
Isoleucina	0,76	0,0	1022,5	21,4	9,3	0,0	401,7	55,4	17,8		x
Valina	0,72	0,0	66,4	9,5	6,5	0,0	217,1	12,8	5,4		x
Pantotenato	0,69	0,0	321,3	20,3	11,6	0,0	752,2	57,6	19,5		x
Galactosa	0,66	5,1	772,6	121,1	96,0	13,8	3227,7	207,6	105,8		x
3-Hidroxifenil-acetato	0,66	0,0	188,6	11,9	0,0	0,0	249,2	10,7	0,0	x	
Succinato	0,62	0,0	282,0	17,9	10,7	0,0	481,1	34,8	19,4		x
Citrato	0,58	0,0	864,8	140,3	79,4	0,0	1071,5	200,4	108,6		x
Leucina	0,57	0,0	2897,0	97,8	52,0	3,8	2710,6	208,9	60,8		x
Trimetil-amina	0,54	0,0	4024,6	104,7	12,2	0,0	1883,9	119,2	5,7		x
2-Oxoglutarato	0,53	0,0	1256,7	56,2	27,0	0,0	409,9	53,9	12,8	x	
N,N-dimetil-glicina	0,52	0,0	415,5	29,4	17,3	0,0	188,3	27,7	18,0	x	
Glicerol	0,51	0,0	2004,7	149,7	81,6	0,0	1181,5	172,0	98,4		x
Lisina	0,47	0,0	112,4	12,6	9,7	0,0	136,9	17,4	12,2		x
1-Metil-	0,44	0,0	603,3	64,5	26,9	0,0	410,6	36,8	0,0	x	

ES 2 656 967 T3

nicotinamida												
Etanol	0,42	8,2	1494,3	194,3	135,0	21,7	1317,2	329,7	247,2			x
Acetato	0,41	0,0	12892,6	85,6	33,1	0,0	8769,3	268,5	45,9			x
Ascorbato	0,39	0,0	12949,8	276,2	29,8	0,0	4539,5	237,3	0,0	x		
Tirosina	0,39	0,0	976,3	71,2	48,9	0,0	298,4	64,4	36,4	x		
t-	0,38	0,0	3078,9	77,0	0,0	0,0	2022,0	162,4	61,0			x
Metilhistidina												
Urea	0,37	0,0	4771,9	246,5	128,6	0,0	1125,0	173,9	90,5	x		
Glicolato	0,35	27,8	4976,9	699,3	506,0	0,0	2767,5	736,0	602,0			x
cis-Aconitato	0,34	0,0	551,8	62,9	42,6	0,0	236,2	68,8	53,0			x
Propilenglicol	0,30	0,0	3745,6	227,6	60,4	0,0	5091,3	190,0	0,0	x		
Tartrato	0,28	0,0	442,9	9,3	0,0	0,0	63,4	1,6	0,0	x		
Piroglutamato	0,26	0,0	536,1	21,7	13,2	0,0	195,9	19,9	8,5	x		
Alanina	0,25	0,0	1431,3	169,3	110,5	0,0	786,7	179,6	138,8			x
Acetona	0,25	0,0	115,1	10,0	6,8	0,0	1788,4	57,2	7,7			x
Hipurato	0,23	0,0	1057,1	147,3	98,3	0,0	813,4	95,6	53,8	x		
2-Hidroxi-	0,22	0,0	643,1	30,9	21,6	0,0	148,5	33,4	24,8			x
isobutirato												
Serina	0,21	0,0	917,4	126,6	92,8	0,0	965,2	148,8	99,5			x
Histidina	0,20	19,0	45262,7	1675,2	862,7	51,2	7274,5	1461,1	849,1	x		
3-Amino-	0,20	0,0	1605,2	83,4	36,2	0,0	3350,0	160,5	57,5			x
isobutirato												
Betaína	0,18	0,0	2675,7	90,9	51,9	0,0	457,9	81,5	51,5	x		
Glicina	0,18	0,0	1337,0	7,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	x		
Butirato	0,14	0,0	96,4	3,0	0,0	0,0	57,4	3,9	0,0			x
trans-	0,07	0,0	530,1	12,3	0,0	0,0	351,2	17,1	0,0			x
Aconitato												
3-Hidroxi-	0,07	0,0	243,3	31,3	21,9	0,0	140,1	33,3	20,6			x
isovalerato												
Metil-	0,07	0,0	1054,6	57,3	21,7	0,0	490,8	33,5	17,0	x		
guanidina												
Uracilo	0,06	0,0	456,2	29,1	18,4	0,0	238,1	28,3	19,3	x		
Manitol	0,06	0,0	1877,4	43,5	0,0	0,0	1533,8	65,1	0,0			x
Asparagina	0,02	0,0	670,6	40,2	0,0	0,0	292,0	41,1	0,0			x
Glutamina	0,00	0,0	13433,0	293,2	114,4	0,0	1747,8	293,3	162,8			x

Tabla 2. Datos de sensibilidad y especificidad (grupo normal frente a grupo de CRC)

Modelo	Conjunto de entrenamiento						Conjunto de prueba	
	Punto de corte	Sensibilidad	Especificidad	Curva de ROC	R2Y	Q2	Sensibilidad	Especificidad
Modelo principal	0,0885604	97,40%	50,00%	0,9178	0,408	0,333	94,87%	56,40%
	0,170391	90,91%	73,22%				76,92%	74,41%
	0,226651	83,12%	82,94%				64,10%	85,78%
	0,412168	50,65%	97,16%				20,51%	98,10%
15 mejores	0,120717	88,31%	57,35%	0,8281	0,231	0,195	79,49%	34,12%
	0,136656	79,22%	66,59%				74,36%	82,94%
	0,148472	71,43%	71,33%				66,67%	91,47%
	0,326168	37,66%	97,16%				20,51%	99,53%
14 mejores	0,126112	88,31%	59,48%	0,8218	0,226	0,186	84,62%	63,51%
	0,133453	81,82%	64,22%				82,05%	68,72%
	0,153027	74,03%	72,75%				69,23%	79,15%
	0,306811	44,16%	97,16%				20,15%	98,58%
13 mejores	0,129639	85,71%	59,48%	0,8117	0,213	0,174	84,62%	63,98%
	0,14178	79,22%	66,82%				71,79%	71,56%
	0,150067	71,43%	71,33%				69,23%	75,36%
	0,305146	38,96%	97,16%				17,95%	99,05%
12 mejores	0,129682	85,71%	58,77%	0,8069	0,209	0,17	84,62%	64,93%
	0,142588	79,22%	66,82%				71,79%	72,99%
	0,153333	72,73%	72,04%				69,23%	78,20%
	0,304388	37,66%	97,16%				17,95%	99,53%
11 mejores	0,132533	85,71%	60,19%	0,8129	0,212	0,173	82,05%	65,88%
	0,144688	79,22%	68,01%				71,79%	75,36%
	0,153709	72,73%	72,51%				69,23%	78,20%

	0,302045	37,66%	97,16%					17,95%	99,53%
10 mejores	0,133508	85,71%	60,43%	0,8143	0,212	0,181		84,62%	67,30%
	0,147835	79,22%	69,91%					71,79%	74,88%
	0,155504	72,73%	72,51%					69,23%	77,73%
	0,298765	36,36%	97,16%					20,51%	98,58%
9 mejores	0,131493	85,71%	60,19%	0,805	0,199	0,166		79,49%	65,40%
	0,138175	77,92%	64,93%					76,92%	70,14%
	0,148832	72,73%	72,27%					64,10%	76,30%
	0,282037	36,36%	97,16%					17,95%	97,63%
8 mejores	0,131493	85,71%	60,43%	0,805	0,196	0,162		84,62%	63,03%
	0,144356	77,92%	69,43%					71,79%	73,93%
	0,149313	71,43%	72,27%					64,10%	75,83%
	0,282037	36,36%	97,16%					17,95%	98,10%
7 mejores	0,127899	85,71%	54,74%	0,8033	0,196	0,169		82,05%	61,14%
	0,141203	77,92%	68,01%					76,92%	74,41%
	0,147994	71,43%	71,33%					69,23%	76,78%
	0,282972	36,36%	97,16%					17,95%	98,58%
6 mejores	0,108354	84,42%	50,00%	0,7653	0,167	0,152		84,62%	56,40%
	0,118968	75,32%	57,11%					82,05%	63,98%
	0,138547	67,53%	67,30%					71,79%	72,99%
	0,312037	32,47%	97,16%					23,08%	98,10%
5 mejores	0,117829	84,42%	51,18%	0,7794	0,17	0,164		89,74%	56,87%
	0,134735	76,62%	63,74%					74,36%	70,14%
	0,145389	68,83%	68,72%					69,23%	73,93%
	0,302779	28,57%	97,16%					20,51%	98,58%
VIP > 1	0,114184	92,21%	50,47%	0,8465	0,25	0,211		87,18%	54,03%
	0,132386	83,12%	64,22%					76,92%	70,14%
	0,152742	75,32%	75,12%					69,23%	78,20%
	0,302331	48,05%	97,16%					25,64%	98,10%

** El modelo denominado VIP > 1 contiene 20 metabolitos

Tabla 3. Puntuaciones de VIP (grupo normal frente a grupo de pólipos) con análisis de concentración (concentraciones en µM)

ID de var. (primaria)	Puntuación de VIP	Normales				Pólipos				Mayor en normal	Mayor en pólipos
		mín.	máx.	media	mediana	mín.	máx.	media	mediana		
Butirato	2,85	0,0	96,4	3,0	0,0	0,0	15,3	0,1	0,0	x	
Serina	2,70	0,0	982,2	87,7	0,0	0,0	851,5	45,7	0,0	x	
Asparagina	1,73	0,0	670,6	40,2	0,0	0,0	402,0	47,5	34,5		x
p-Metil-histidina	1,65	0,0	3745,6	227,6	60,4	0,0	2919,3	275,5	118,9		x
3-Hidroxi-butirato	1,65	0,0	498,4	11,7	0,0	0,0	3392,5	19,1	0,0		x
Metanol	1,59	0,0	1054,6	57,3	21,7	0,0	1019,6	39,7	17,4	x	
3-Hidroxi-mandelato	1,57	0,0	2539,3	60,0	0,0	0,0	947,6	82,2	0,7		x
Tirosina	1,52	0,0	551,8	62,9	42,6	0,0	1196,3	80,6	61,2		x
Trigonelina	1,51	0,0	4771,9	246,5	128,6	0,0	1789,8	287,8	204,6		x
β-Alanina	1,45	0,0	442,9	9,3	0,0	0,0	189,5	3,1	0,0	x	
Histidina	1,38	0,0	2108,5	208,4	106,5	0,0	3400,1	267,0	153,6		x
Dimetil-amina	1,36	8,2	1494,3	194,3	135,0	17,3	1146,5	225,3	177,2		x
Urea	1,28	6976,6	441697,0	127007,5	111896,6	16667,4	376686,7	141754,5	129086,3		x
1,6-Anhidro-β-D-glucosa	1,25	0,0	603,3	64,5	26,9	0,0	1012,1	80,3	40,1		x
Glucosa	1,22	0,0	13433,0	293,2	114,4	0,0	63614,4	863,9	130,8		x
Etanol	1,14	0,0	27789,2	250,7	0,0	0,0	6405,3	88,9	0,0	x	
Benzoato	1,13	0,0	567,3	3,5	0,0	0,0	6282,2	33,9	0,0		x
Acetona	1,09	0,0	115,1	10,0	6,8	0,0	778,8	11,7	6,6		x
Treonina	1,06	0,0	976,3	71,2	48,9	0,0	441,7	79,3	60,2		x
2-Hidroxi-	1,05	0,0	643,1	30,9	21,6	0,0	162,4	33,9	27,3		x

ES 2 656 967 T3

isobutirato												
Creatinina	1,04	193,0	24617,4	5643,3	4234,9	0,0	31595,9	6528,6	5403,3			x
3-Hidroxi- fenilacetato	1,04	0,0	188,6	11,9	0,0	0,0	152,3	15,1	0,0			x
3-Indoxil- sulfato	1,02	0,0	1317,6	120,5	82,5	0,0	585,8	130,3	100,2			x
Hipurato	1,02	19,0	45262,7	1675,2	862,7	0,0	21449,0	1947,0	1078,2			x
Ascorbato	1,01	0,0	12949,8	276,2	29,8	0,0	10663,2	236,8	0,0	x		
4-Hidroxi- fenilacetato	1,01	0,0	1401,1	72,6	48,8	0,0	1354,3	84,8	57,8			x
N,N- Dimetil- glicina	0,95	0,0	131,3	24,7	17,5	0,0	387,6	29,2	19,8			x
Adipato	0,95	0,0	103,9	1,3	0,0	0,0	837,7	6,8	0,0			x
Alanina	0,95	0,0	1431,3	169,3	110,5	0,0	1621,6	185,5	137,9			x
Hipoxantina	0,95	0,0	1022,5	21,4	9,3	0,0	555,6	23,7	14,3			x
3-Amino- isobutirato	0,85	0,0	1605,2	83,4	36,2	0,0	2222,4	89,8	34,5			x
cis- Aconitato	0,83	0,0	864,8	140,3	79,4	0,0	1289,9	169,7	105,1			x
N-óxido de trimetil- amina	0,80	7,1	8301,4	308,6	163,1	0,0	5752,9	324,8	215,7			x
3-Hidroxi- isovalerato	0,79	0,0	243,3	31,3	21,9	0,0	141,5	32,8	26,9			x
Manitol	0,79	0,0	4738,5	224,5	0,0	0,0	6932,3	321,5	0,0			x
trans- Aconitato	0,75	0,0	456,2	29,1	18,4	0,0	515,1	33,1	20,8			x
Valina	0,72	0,0	113,8	20,3	14,2	0,0	151,2	22,8	18,4			x
Trimetil- amina	0,62	0,0	66,4	9,5	6,5	0,0	270,7	11,3	7,5			x
t-Metil- histidina	0,61	0,0	474,7	78,5	48,7	0,0	706,5	92,6	75,8			x
Glicina	0,61	27,8	4976,9	699,3	506,0	0,0	8600,5	815,7	504,6			x
Lactato	0,58	0,0	2897,0	97,8	52,0	0,0	3269,3	109,3	52,7			x
Tartrato	0,55	0,0	4024,6	104,7	12,2	0,0	2263,2	104,9	16,3			x
O-Acetil- carnitina	0,55	0,0	321,3	20,3	11,6	0,0	349,9	19,1	12,2	x		
Propilen- glicol	0,53	0,0	539,8	35,4	10,0	0,0	594,3	38,5	4,9			x
Citrato	0,52	0,0	15102,4	2099,7	1563,5	0,0	8519,8	2126,3	1566,6			x
Piruvato	0,51	0,0	282,0	17,9	10,7	0,0	109,7	19,7	13,0			x
Betaína	0,47	0,0	2675,7	90,9	51,9	0,0	740,3	84,9	59,7	x		
Taurina	0,47	0,0	5028,3	283,2	132,2	0,0	2142,7	302,2	182,8			x
Piro- glutamato	0,43	0,0	917,4	126,6	92,8	0,0	587,5	134,4	111,9			x
Creatina	0,38	0,0	10201,1	331,0	58,1	0,0	4663,5	273,1	61,7	x		
Carnitina	0,34	0,0	907,1	47,8	22,7	0,0	359,8	48,1	30,6			x
Metil- guanidina	0,34	0,0	415,5	29,4	17,3	0,0	250,0	28,7	20,8	x		
Isoleucina	0,32	0,0	31,5	4,1	0,0	0,0	69,6	4,6	0,0			x
Galactosa	0,29	0,0	614,8	12,8	0,0	0,0	248,0	6,6	0,0	x		
Formiato	0,29	5,1	772,6	121,1	96,0	0,0	1424,0	128,3	101,4			x
Uracilo	0,28	0,0	530,1	12,3	0,0	0,0	107,0	10,5	0,0	x		
Glicerol	0,28	0,0	1337,0	7,3	0,0	0,0	2004,9	11,3	0,0			x
Lisina	0,26	0,0	1877,4	43,5	0,0	0,0	604,4	42,6	0,0	x		
Leucina	0,24	0,0	112,4	12,6	9,7	0,0	81,7	13,9	11,5			x
Sacarosa	0,22	0,0	888,3	45,5	13,4	0,0	5926,7	68,3	14,6			x
Xilosa	0,22	0,0	3078,9	77,0	0,0	0,0	1870,0	84,2	0,0			x
Acetato	0,21	0,0	12892,6	85,6	33,1	0,0	6645,0	84,8	36,8	x		
Guanido- acetato	0,20	0,0	1057,1	147,3	98,3	0,0	1145,0	162,8	118,6			x
Glicolato	0,20	0,0	1781,0	204,0	143,0	0,0	2980,5	228,6	162,6			x
Pantotenato	0,19	0,0	536,1	21,7	13,2	0,0	177,5	17,9	11,6	x		
Succinato	0,16	0,0	536,6	39,0	22,5	0,0	269,3	33,7	24,2	x		
Glutamina	0,13	0,0	2004,7	149,7	81,6	0,0	1121,2	176,9	125,8			x

ES 2 656 967 T3

1-Metil-nicotin-amida	0,08	0,0	2763,6	35,7	13,8	0,0	381,5	21,7	14,3	x
2-Oxo-glutarato	0,00	0,0	1256,7	56,2	27,0	0,0	488,8	56,2	30,0	x

Tabla 4. Datos de sensibilidad y especificidad (grupo normal frente a grupo de pólipos)

Modelo	Conjunto de entrenamiento						Conjunto de prueba	
	Punto de corte	Sensibilidad	Especificidad	Curva de ROC	R2Y	Q2	Sensibilidad	Especificidad
Modelo principal	0,297766	88,56%	50,24%	0,7673	0,194	0,115	74,79%	51,66%
	0,358217	78,39%	62,32%				67,23%	59,24%
	0,398023	68,22%	68,01%				57,98%	68,25%
	0,639182	15,68%	97,16%				6,72%	96,21%
15 mejores	0,301863	74,58%	50,00%	0,6763	0,0749	0,0564	64,71%	42,18%
	0,319843	68,64%	55,45%				57,98%	52,61%
	0,339898	63,14%	62,80%				51,26%	62,09%
	0,621478	8,47%	97,16%				3,36%	98,10%
14 mejores	0,304827	74,58%	50,47%	0,675	0,0716	0,0541	63,87%	43,13%
	0,320823	68,22%	55,45%				58,82%	52,61%
	0,340114	62,71%	62,56%				51,26%	62,09%
	0,621743	7,63%	97,16%				3,36%	98,58%
13 mejores	0,305219	75,85%	50,47%	0,6802	0,0735	0,0564	67,23%	44,55%
	0,323129	68,22%	56,64%				58,82%	54,50%
	0,342031	61,86%	61,85%				51,26%	63,51%
	0,59798	8,90%	97,16%				5,04%	98,10%
12 mejores	0,316487	75,85%	51,66%	0,6894	0,0783	0,0595	68,91%	48,82%
	0,32912	69,92%	59,48%				62,18%	56,40%
	0,34476	63,14%	62,80%				52,94%	66,35%
	0,589455	9,32%	97,16%				4,20%	98,58%
11 mejores	0,326944	77,97%	50,71%	0,6995	0,0813	0,0589	78,15%	48,82%
	0,34317	70,34%	60,66%				63,87%	59,24%
	0,352496	64,83%	64,45%				55,46%	65,88%
	0,564702	8,90%	97,16%				5,88%	97,16%
10 mejores	0,341829	79,66%	50,24%	0,7036	0,0798	0,0537	82,35%	47,39%
	0,351485	73,31%	59,24%				69,75%	58,29%
	0,36358	66,10%	65,88%				55,46%	65,40%
	0,521618	10,17%	97,16%				4,20%	95,73%
9 mejores	0,333275	80,08%	50,00%	0,7037	0,0803	0,0538	78,99%	45,02%
	0,348153	72,03%	59,72%				62,18%	58,29%
	0,358523	64,83%	64,45%				55,46%	64,93%
	0,544911	9,75%	97,16%				4,20%	97,63%
8 mejores	0,347543	78,81%	52,84%	0,7071	0,0799	0,0552	71,43%	50,24%
	0,358489	72,03%	62,56%				59,66%	59,72%
	0,364861	66,53%	66,35%				55,46%	64,45%
	0,537677	7,20%	97,16%				5,04%	97,63%
7 mejores	0,378897	78,81%	51,66%	0,6997	0,0641	0,0442	73,95%	50,71%
	0,382814	71,19%	59,95%				66,39%	58,29%
	0,384873	65,68%	65,40%				59,66%	63,51%
	0,471671	11,02%	97,16%				3,36%	97,63%
6 mejores	0,385209	77,97%	50,95%	0,6958	0,0574	0,0413	74,79%	50,71%
	0,391155	71,19%	61,14%				60,50%	58,77%
	0,392868	66,95%	66,35%				55,46%	64,45%
	0,460474	6,36%	97,16%				4,20%	98,10%
5 mejores	0,379823	71,61%	62,80%	0,6895	0,0552	0,039	53,78%	59,24%
	0,381874	69,07%	65,17%				51,26%	62,09%
	0,383028	66,95%	66,82%				50,42%	63,98%
	0,472361	5,93%	97,16%				1,68%	96,68%
VIP > 1	0,329791	76,69%	51,90%	0,7015	0,0976	0,0507	65,55%	50,71%
	0,339597	70,36%	57,82%				58,82%	56,40%
	0,352619	64,83%	64,69%				56,30%	64,45%
	0,577397	11,44%	97,16%				5,88%	98,58%

** El modelo denominado VIP > 1 contiene 26 metabolitos

Tabla 5. Puntuaciones de VIP (grupo normal frente a grupo de adenoma) con análisis de concentración (concentraciones en μM)

ID de var. (primaria)	Puntuación de VIP	Normales				Adenoma				Mayor en normal	Mayor en adenoma
		mín.	máx.	media	mediana	mín.	máx.	media	mediana		
Butirato	3,41	0,0	96,4	3,0	0,0	0,0	10,1	0,1	0,0	x	
Serina	2,65	0,0	982,2	87,7	0,0	0,0	664,1	50,5	0,0	x	
Metanol	2,29	0,0	1054,6	57,3	21,7	0,0	1019,6	39,8	17,7	x	
β -Alanina	2,03	0,0	442,9	9,3	0,0	0,0	142,7	2,0	0,0	x	
p-Metil-histidina	1,91	0,0	3745,6	227,6	60,4	0,0	3262,4	271,9	124,6		x
3-Hidroxi-butirato	1,56	0,0	498,4	11,7	0,0	0,0	3392,5	29,4	0,0		x
Asparagina	1,56	0,0	670,6	40,2	0,0	0,0	402,0	45,9	26,9		x
Trigonelina	1,52	0,0	4771,9	246,5	128,6	0,0	2427,3	295,1	169,6		x
3-Hidroxi-fenilacetato	1,39	0,0	188,6	11,9	0,0	0,0	152,3	14,1	0,0		x
Histidina	1,37	0,0	2108,5	208,4	106,5	0,0	3400,1	261,0	155,5		x
Acetona	1,34	0,0	115,1	10,0	6,8	0,0	778,8	14,1	6,0		x
2-Oxo-glutarato	1,25	0,0	1256,7	56,2	27,0	0,0	553,6	48,1	12,0	x	
Etanol	1,24	0,0	27789,2	250,7	0,0	0,0	4594,5	53,7	0,0	x	
Adipato	1,23	0,0	103,9	1,3	0,0	0,0	837,7	9,0	0,0		x
3-Hidroxi-mandelato	1,22	0,0	2539,3	60,0	0,0	0,0	1065,4	75,7	0,0		x
Tirosina	1,20	0,0	551,8	62,9	42,6	0,0	606,8	73,4	53,4		x
Benzoato	1,16	0,0	567,3	3,5	0,0	0,0	6282,2	46,0	0,0		x
Propilenglicol	0,98	0,0	539,8	35,4	10,0	0,0	451,1	33,5	0,0	x	
t-Metil-histidina	0,98	0,0	474,7	78,5	48,7	0,0	706,5	95,2	65,5		x
O-Acetil-carnitina	0,97	0,0	321,3	20,3	11,6	0,0	349,9	18,2	10,5	x	
Creatina	0,96	0,0	10201,1	331,0	58,1	0,0	5572,1	319,9	72,5	x	
1,6-Anhidro- β -D-glucosa	0,94	0,0	603,3	64,5	26,9	0,0	1764,1	87,5	35,9		x
Creatinina	0,90	193,0	24617,4	5643,3	4234,9	465,5	31595,9	6397,5	4691,9		x
Alanina	0,89	0,0	1431,3	169,3	110,5	6,2	1995,2	182,5	125,7		x
3-Amino-isobutirato	0,82	0,0	1605,2	83,4	36,2	0,0	2222,4	93,3	33,5		x
Hipoxantina	0,82	0,0	1022,5	21,4	9,3	0,0	199,9	21,4	12,7	x	
Dimetil-amina	0,76	8,2	1494,3	194,3	135,0	17,9	1146,5	211,5	156,1		x
Uracilo	0,74	0,0	530,1	12,3	0,0	0,0	107,0	9,1	0,0	x	
Glicerol	0,72	0,0	1337,0	7,3	0,0	0,0	635,5	3,9	0,0	x	
4-Hidroxi-fenil-acetato	0,71	0,0	1401,1	72,6	48,8	0,0	1354,3	83,4	55,4		x
2-Hidroxi-isobutirato	0,71	0,0	643,1	30,9	21,6	2,2	154,8	31,2	24,0		x
Treonina	0,66	0,0	976,3	71,2	48,9	0,0	430,8	70,3	53,6	x	
Ascorbato	0,65	0,0	12949,8	276,2	29,8	0,0	10663,2	284,3	0,0		x
3-Indoxil-sulfato	0,62	0,0	1317,6	120,5	82,5	0,0	845,6	121,0	89,9		x
Urea	0,62	6976,6	441697,0	127007,5	111896,6	19467,8	410148,3	130697,5	123744,3		x
Isoleucina	0,58	0,0	31,5	4,1	0,0	0,0	69,6	4,0	0,0	x	
Pantotenato	0,55	0,0	536,1	21,7	13,2	0,0	468,1	21,6	10,8	x	
cis-Aconitato	0,52	0,0	864,8	140,3	79,4	0,0	1275,6	170,8	103,9		x
Sacarosa	0,51	0,0	888,3	45,5	13,4	0,0	1091,4	48,3	0,0		x
Citrato	0,50	0,0	15102,4	2099,7	1563,5	0,0	8519,8	1928,5	1180,5	x	

ES 2 656 967 T3

Hipurato	0,46	19,0	45262,7	1675,2	862,7	0,0	10889,5	1802,3	935,4		x
Trimetil- amina	0,45	0,0	66,4	9,5	6,5	0,0	270,7	10,9	6,9		x
1-Metil- nicotinamida	0,45	0,0	2763,6	35,7	13,8	0,0	942,8	26,5	13,7	x	
Glucosa	0,43	0,0	13433,0	293,2	114,4	0,0	39542,0	711,4	119,3		x
3-Hidroxi- isovalerato	0,40	0,0	243,3	31,3	21,9	0,0	141,5	30,9	24,7	x	
Leucina	0,39	0,0	112,4	12,6	9,7	0,0	81,7	13,3	9,8		x
N,N-Dimetil- glicina	0,39	0,0	131,3	24,7	17,5	0,0	387,6	28,2	17,0		x
Succinato	0,38	0,0	536,6	39,0	22,5	0,0	291,3	34,3	20,5	x	
Formiato	0,38	5,1	772,6	121,1	96,0	0,0	1424,0	131,4	101,0		x
trans- Aconitato	0,35	0,0	456,2	29,1	18,4	0,0	449,7	33,6	18,3		x
Tartrato	0,33	0,0	4024,6	104,7	12,2	0,0	2263,2	116,3	11,2		x
Carnitina	0,33	0,0	907,1	47,8	22,7	0,0	347,3	46,1	29,7	x	
Guanido- acetato	0,23	0,0	1057,1	147,3	98,3	0,0	1145,0	142,3	95,8	x	
Glicolato	0,22	0,0	1781,0	204,0	143,0	0,0	1017,4	208,6	153,6		x
Taurina	0,21	0,0	5028,3	283,2	132,2	0,0	1715,0	285,6	159,2		x
Piruvato	0,20	0,0	282,0	17,9	10,7	0,0	390,5	20,8	11,4		x
Acetato	0,20	0,0	12892,6	85,6	33,1	0,0	6645,0	103,4	36,3		x
Xilosa	0,18	0,0	3078,9	77,0	0,0	0,0	1914,4	82,5	0,0		x
Manitol	0,15	0,0	4738,5	224,5	0,0	0,0	4200,6	221,9	0,0	x	
Metil- guanidina	0,15	0,0	415,5	29,4	17,3	0,0	250,0	28,5	20,6	x	
Lisina	0,14	0,0	1877,4	43,5	0,0	0,0	604,4	40,7	0,0	x	
Betaína	0,13	0,0	2675,7	90,9	51,9	0,0	969,5	82,8	52,2	x	
Valina	0,13	0,0	113,8	20,3	14,2	0,0	151,2	22,0	16,4		x
Lactato	0,12	0,0	2897,0	97,8	52,0	0,0	5581,3	144,2	50,9		x
Glicina	0,07	27,8	4976,9	699,3	506,0	42,9	8600,5	768,0	480,4		x
N-óxido-de- trimetilamina	0,06	7,1	8301,4	308,6	163,1	0,0	1478,1	265,2	194,8	x	
Piro- glutamato	0,04	0,0	917,4	126,6	92,8	0,0	587,5	133,2	100,8		x
Galactosa	0,03	0,0	614,8	12,8	0,0	0,0	487,3	9,7	0,0	x	
Glutamina	0,00	0,0	2004,7	149,7	81,6	0,0	1121,2	169,8	116,0		x

Tabla 6. Datos de sensibilidad y especificidad (grupo normal frente a grupo de adenoma)

Modelo	Conjunto de entrenamiento						Conjunto de validación	
	Punto de corte	Sensibilidad	Especificidad	Curva de ROC	R2Y	Q2	Sensibilidad	Especificidad
Modelo principal	0,25947	88,89%	50,24%	0,7524	0,142	0,0463	82,72%	51,18%
	0,294233	77,78%	60,19%				75,31%	59,24%
	0,322602	66,67%	66,59%				67,90%	67,77%
	0,527314	11,11%	97,16%				2,47%	97,16%
15 mejores	0,274543	77,78%	50,95%	0,6966	0,0737	0,0398	76,54%	49,76%
	0,28085	70,37%	57,82%				69,14%	59,72%
	0,285875	62,35%	62,32%				59,26%	64,45%
14 mejores	0,405516	12,35%	97,16%	0,6977	0,0738	0,0426	2,47%	96,68%
	0,278997	77,78%	52,37%				75,31%	49,29%
	0,284213	70,37%	57,82%				69,14%	56,87%
	0,288594	62,35%	61,85%				59,26%	63,03%
13 mejores	0,411351	9,88%	96,92%	0,6966	0,0676	0,039	1,23%	97,63%
	0,281655	77,78%	50,95%				74,07%	48,82%
	0,287454	70,37%	57,82%				67,90%	56,87%
	0,29164	62,35%	62,32%				59,26%	62,56%
12 mejores	0,419266	7,41%	97,16%	0,6978	0,0679	0,0366	1,23%	97,63%
	0,279368	78,40%	50,71%				77,78%	48,82%
	0,285647	70,37%	58,53%				71,60%	56,87%
	0,29013	62,35%	62,32%				61,73%	63,03%
11	0,422674	7,41%	97,16%	0,6909	0,0657	0,0377	1,23%	97,63%
	0,273899	79,01%	50,24%				81,48%	51,18%

mejores	0,27869	71,60%	56,64%				76,54%	54,98%
	0,286068	63,58%	63,03%				59,26%	63,51%
	0,419749	7,41%	97,16%				1,23%	97,63%
10 mejores	0,277371	78,40%	50,47%	0,6929	0,0655	0,0386	79,01%	51,66%
	0,28425	70,99%	60,43%				71,60%	57,82%
	0,289461	63,58%	63,27%				61,73%	62,56%
	0,431667	7,41%	97,16%				1,23%	98,10%
9 mejores	0,292693	75,31%	50,95%	0,681	0,056	0,0311	74,07%	49,29%
	0,295476	68,52%	56,64%				66,67%	53,55%
	0,298941	63,58%	62,80%				61,73%	61,61%
	0,387558	7,41%	97,16%				1,23%	97,63%
8 mejores	0,296909	73,46%	50,24%	0,6757	0,0534	0,0317	74,07%	53,55%
	0,300521	66,05%	58,06%				67,90%	58,77%
	0,302474	62,96%	62,80%				59,26%	61,14%
	0,37303	9,26%	97,16%				0,00%	97,63%
7 mejores	0,304543	74,69%	50,24%	0,6747	0,0465	0,0313	71,60%	51,66%
	0,308861	68,52%	58,77%				65,43%	57,35%
	0,310255	63,58%	63,51%				60,49%	60,19%
	0,353752	6,79%	97,16%				1,23%	97,63%
6 mejores	0,30621	73,46%	50,47%	0,6614	0,0404	0,027	71,60%	52,13%
	0,310248	67,28%	54,27%				67,90%	55,45%
	0,312955	60,49%	60,43%				60,49%	61,14%
	0,342299	4,94%	97,16%				2,47%	96,21%
5 mejores	0,304164	73,46%	50,00%	0,6581	0,0362	0,029	72,84%	51,66%
	0,309997	66,67%	54,50%				69,14%	55,45%
	0,312623	61,11%	60,90%				60,49%	60,19%
	0,33285	7,41%	97,16%				2,47%	96,68%
VIP > 1	0,258307	77,78%	50,47%	0,6937	0,0801	0,0408	82,72%	49,76%
	0,26743	69,14%	56,87%				72,84%	59,24%
	0,274993	61,73%	61,61%				61,73%	64,93%
	0,444394	11,73%	97,16%				3,70%	97,16%

** El modelo denominado VIP > 1 contiene 17 metabolitos

Tabla 7. Vectores únicos para OPLS/O2PLS

Vector	Descripción
To	Matriz de puntuaciones que resume la variación de X ortogonal a Y.
Tocv	Matriz de puntuaciones ortogonales sometidas a validación cruzada de To
ToPS	Matriz de puntuaciones que resume la variación de X ortogonal a Y para el conjunto de predicción.
ToPScv	Matriz de puntuaciones predichas sometidas a validación cruzada de ToPS para el conjunto de predicción.
Uo	Matriz de puntuaciones que resume la variación de Y ortogonal a X.
Po	Cargas ortogonales de la parte de X del modelo. Po expresa la importancia de las variables para aproximarse a la variación de X ortogonal a Y, en la componente seleccionada.
Po(corr)	Cargas ortogonales Po, ajustadas a escala como coeficiente de correlación entre X y To, en la componente seleccionada.
Pocv	Cargas ortogonales Po de la parte de X del modelo, para una dimensión de modelo seleccionada, calculadas a partir de la ronda de validación cruzada seleccionada.
Wo	Pesos que combinan las variables X (primera dimensión) o los residuos de X (dimensiones posteriores) para formar las puntuaciones To. Estos pesos se seleccionan para minimizar la correlación entre To y U, por tanto indirectamente entre To e Y.
Wocv	Pesos ortogonales Wo a partir de la parte de X del modelo, para una dimensión de modelo seleccionada, calculados a partir de la ronda de validación cruzada seleccionada.
Qo	Cargas ortogonales de la parte de Y del modelo. Qo expresa la importancia de las variables para aproximarse a la variación de Y ortogonal a X, en la componente seleccionada.
Qocv	Cargas ortogonales Qo a partir de la parte de Y del modelo, para una dimensión de modelo seleccionada, calculadas a partir de la ronda de validación cruzada seleccionada.
Co	Pesos que combinan las variables Y (primera dimensión) o los residuos de Y

	(dimensiones posteriores) para formar las puntuaciones U_0 . Estos pesos se seleccionan para minimizar la correlación entre U_0 y T , por tanto indirectamente entre U_0 y X .
Cocv	Pesos ortogonales C_0 a partir de la parte de Y del modelo, para una dimensión de modelo seleccionada, calculados a partir de la ronda de validación cruzada seleccionada.
Q	Cargas de la parte de Y del modelo. Q expresa la importancia de las variables para aproximarse a la variación de Y correlacionada con X , en la componente seleccionada. Las variables Y con Q grande (positivo o negativo) están altamente correlacionadas con T (y X).
Qcv	Cargas Q a partir de la parte de Y del modelo, para una dimensión de modelo seleccionada, calculadas a partir de la ronda de validación cruzada seleccionada.
R	R es la proyección de U_0 sobre X . R contiene entradas distintas de cero cuando la matriz de puntuación U_0 no es completamente ortogonal a X . La norma de esta matriz es habitualmente muy pequeña, pero se usa para potenciar las predicciones de X .
S	S es la proyección de T_0 sobre Y . S contiene entradas distintas de cero cuando la matriz de puntuación T_0 no es completamente ortogonal a Y . La norma de esta matriz es habitualmente muy pequeña, pero se usa para potenciar las predicciones de Y .
Perfiles relacionados con Y	Presentan los perfiles puros estimados de los constituyentes subyacentes en X con la suposición de variables Y aditivas. Las estimación incluyen una transformación lineal de la matriz de coeficiente, $B_p(B_p^T B_p)^{-1}$, donde B_p es la matriz de coeficiente usando sólo las componentes predictivas para calcular la matriz de coeficiente (es decir, las componentes ortogonales a Y no se incluyen en el cálculo de B_p).

La mención de cualquier publicación en el presente documento es por su divulgación previa a la fecha de presentación y no debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a preceder a tal publicación debido a invención previa.

5 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Tal como se usan en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un”, “una” y “el/la” incluyen la referencia en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

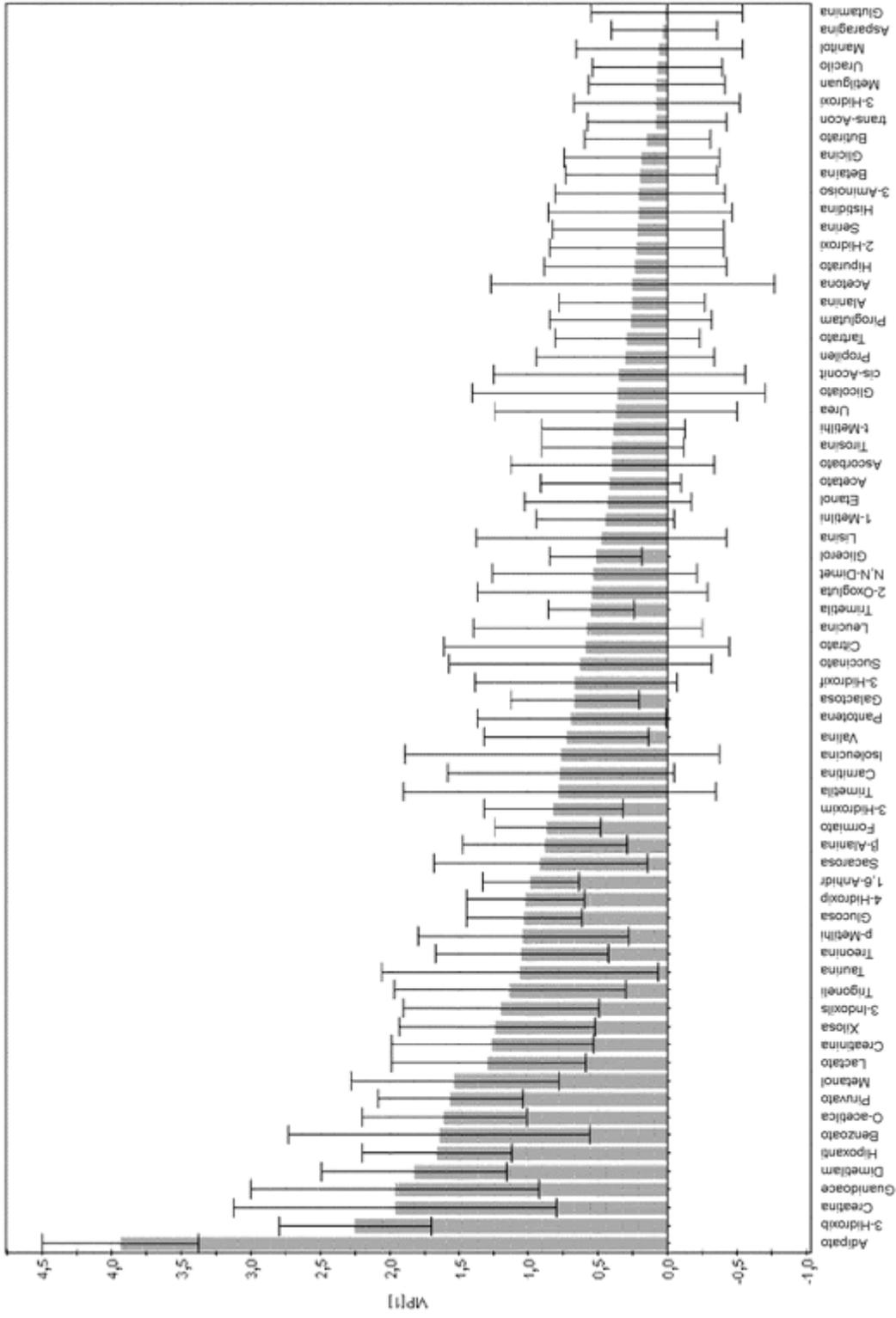
REIVINDICACIONES

1. Método para evaluar si un sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar pólipos adenomatosos, comprendiendo dicho método:
 - (a) proporcionar una muestra de orina de dicho sujeto;
 - 5 (b) obtener un perfil de metabolitos a partir de dicha muestra de orina, en el que dicho perfil metabólico se obtiene midiendo la concentración de dos o más metabolitos en dicha muestra de orina para producir dicho perfil de metabolitos para dicho sujeto;
 - (c) comparar dicho perfil de metabolitos con un perfil de metabolitos de referencia, en el que dicho perfil de metabolitos de referencia se determina a partir de la concentración de metabolitos correspondientes en
 - 10 orina de individuos en una población de referencia; y
 - (d) evaluar, basándose en dicha comparación en la etapa (c), si dicho sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar pólipos adenomatosos
 y en el que la etapa (b) comprende medir la concentración en dicha muestra de orina de al menos 2, 3, 4, 5,
 - 15 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ó 17 metabolitos cualesquiera seleccionados del grupo que consiste en: butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina; 3-hidroxi-*n*-butirato; asparagina; trigonelina; 3-hidroxi-*n*-acetato; histidina; acetona; 2-oxoglutarato; etanol; adipato; 3-hidroxi-*n*-mandelato; tirosina y benzoato.
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha etapa (b) comprende medir la concentración en dicha
 - 20 muestra de orina de al menos dos o más metabolitos cualesquiera en un conjunto de metabolitos seleccionados del grupo que consiste en:
 - (i) butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina; 3-hidroxi-*n*-butirato; asparagina; trigonelina; 3-hidroxi-*n*-acetato; histidina; acetona; 2-oxoglutarato; etanol; adipato; 3-hidroxi-*n*-mandelato; tirosina y benzoato;
 - 25 (ii) butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina; 3-hidroxi-*n*-butirato; asparagina; trigonelina; 3-hidroxi-*n*-acetato; histidina; acetona; 2-oxoglutarato; etanol; adipato; 3-hidroxi-*n*-mandelato y tirosina;
 - (iii) butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina; 3-hidroxi-*n*-butirato; asparagina; trigonelina; 3-hidroxi-*n*-acetato; histidina; acetona; 2-oxoglutarato; etanol; adipato y 3-hidroxi-*n*-mandelato;
 - (iv) butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina; 3-hidroxi-*n*-butirato; asparagina; trigonelina; 3-hidroxi-*n*-acetato; histidina; acetona; 2-oxoglutarato; etanol y adipato;
 - 30 (v) butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina; 3-hidroxi-*n*-butirato; asparagina; trigonelina; 3-hidroxi-*n*-acetato; histidina; acetona; 2-oxoglutarato y etanol;
 - (vi) butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina; 3-hidroxi-*n*-butirato; asparagina; trigonelina; 3-hidroxi-*n*-acetato; histidina; acetona y 2-oxoglutarato;
 - 35 (vii) butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina; 3-hidroxi-*n*-butirato; asparagina; trigonelina; 3-hidroxi-*n*-acetato; histidina y acetona;
 - (viii) butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina; 3-hidroxi-*n*-butirato; asparagina; trigonelina; 3-hidroxi-*n*-acetato e histidina;
 - (ix) butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina; 3-hidroxi-*n*-butirato; asparagina; trigonelina y 3-hidroxi-*n*-acetato;
 - 40 (x) butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina; 3-hidroxi-*n*-butirato; asparagina y trigonelina;
 - (xi) butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina; 3-hidroxi-*n*-butirato y asparagina;
 - (xii) butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina y 3-hidroxi-*n*-butirato;
 - (xiii) butirato; serina; metanol; β -alanina y p-metilhistidina;
 - (xiv) butirato; serina; metanol y β -alanina;
 - 45 (xv) butirato; serina y metanol; y
 - (xvi) butirato y serina.

3. Método según la reivindicación 1, en el que una concentración en orina elevada de dos o más metabolitos cualesquiera seleccionados del grupo que consiste en butirato, serina, metanol, β -alanina, p-metilhistidina; 2-oxoglutarato y etanol es indicativa de que el sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar pólipos adenomatosos; o
- 5 en el que una concentración en orina reducida de dos o más metabolitos cualesquiera seleccionados del grupo que consiste en 3-hidroxibutirato; asparagina; trigonelina; 3-hidroxifenilacetato; histidina; acetona; adipato; 3-hidroximandelato; tirosina y benzoato es indicativa de que el sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar pólipos adenomatosos.
- 10 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que cualquiera o ambos de dicho perfil de metabolitos y dicho perfil de metabolitos de referencia se obtiene usando uno o más métodos seleccionados del grupo que consiste en: espectroscopía por resonancia magnética nuclear; cromatografía de líquidos de alto rendimiento; cromatografía de capa fina; cromatografía de gases; análisis electroquímico; espectroscopía de masas; espectroscopía por índice de refracción; espectroscopía de ultravioleta; análisis de fluorescencia; análisis radioquímico; espectroscopía de infrarrojo cercano; cromatografía de gases y análisis por dispersión de la luz.
- 15 5. Uso de un perfil de metabolitos que comprende dos o más de los siguientes metabolitos de orina:
- 1,6-anhidro- β -D-glucosa, 1-metilnicotinamida, 2-hidroxiisobutirato, 2-oxoglutarato, 3-aminoisobutirato, 3-hidroxibutirato, 3-hidroxiisovalerato, 3-hidroximandelato, 3-hidroxifenilacetato, 3-indoxilsulfato, 4-hidroxifenilacetato, acetato, acetona, adipato, alanina, ascorbato, asparagina, benzoato, betaína, butirato, carnitina, citrato, creatina, creatinina, dimetilamina, etanol, formiato, galactosa, glucosa, glutamina, glicerol, glicina, glicolato, guanidoacetato, hipurato, histidina, hipoxantina, isoleucina, lactato, leucina, lisina, manitol, metanol, metilguanidina, N,N-dimetilglicina, O-acetilcarnitina, pantotenato, propilenglicol, piroglutamato, piruvato, serina, succinato, sacarosa, tartrato, taurina, treonina, trigonelina, trimetilamina, N-óxido de trimetilamina, tirosina, uracilo, urea, valina, xilosa, cis-aconitato, β -alanina, 1-metil-L-histidina, 3-metil-L-histidina, y trans-aconitato,
- 20 para evaluar si un sujeto tiene o tiene predisposición a desarrollar pólipos adenomatosos.
- 25 6. Sistema adaptado para llevar a cabo el método según la reivindicación 1, comprendiendo el sistema:
- (a) un aparato de evaluación de pólipos adenomatosos que incluye una unidad de control y una unidad de memoria para evaluar un estado de pólipos adenomatosos en un sujeto; y
- 30 (b) un aparato terminal de comunicación de información que proporciona datos sobre la presencia y/o concentración y/o cantidad de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ó 17 metabolitos cualesquiera seleccionados del grupo que consiste en: butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina; 3-hidroxibutirato; asparagina; trigonelina; 3-hidroxifenilacetato; histidina; acetona; 2-oxoglutarato; etanol; adipato; 3-hidroximandelato; tirosina y benzoato, en una muestra de orina del sujeto conectados entre sí en comunicación,
- 35 en el que el aparato terminal de comunicación de información incluye:
- (a) una unidad de envío de datos que transmite los datos sobre la presencia y/o concentración y/o cantidad de los metabolitos en la muestra al aparato de evaluación de pólipos adenomatosos; y
- 40 (b) una unidad de recepción de resultado de evaluación que recibe el resultado de evaluación del estado de pólipos adenomatosos del sujeto transmitido desde el aparato de evaluación de pólipos adenomatosos,
- en el que la unidad de control del aparato de evaluación de pólipos adenomatosos incluye:
- (a) una unidad de recepción de datos que recibe los datos sobre la concentración y/o cantidad de metabolitos de la muestra transmitidos desde el aparato terminal de comunicación de información;
- 45 (b) una unidad de cálculo de valor de discriminante que calcula un valor de discriminante que es un valor de discriminante de múltiples variables, basándose en la concentración y/o valor de cantidad de los metabolitos en la muestra recibidas por la unidad de recepción de datos y un discriminante de múltiples variables con la concentración y/o cantidad del metabolito como variable explicativa almacenada en la unidad de memoria;
- (c) una unidad de evaluación de criterio de valor de discriminante que evalúa el estado de pólipos adenomatosos en el sujeto, basándose en el valor de discriminante calculado por la unidad de cálculo de valor de discriminante; y
- 50 (d) una unidad de envío de resultado de evaluación que transmite el resultado de evaluación del sujeto obtenido por la unidad de evaluación de criterio de valor de discriminante al aparato terminal de comunicación de información.

7. Método para identificar y evaluar la eficacia de agentes farmacéuticos y/o tratamientos quirúrgicos y/o tratamientos físicos contra pólipos adenomatosos, comprendiendo dicho método:
- (a) proporcionar una primera muestra de orina de un sujeto que tiene pólipos adenomatosos;
- 5 (b) obtener un perfil de metabolitos a partir de dicha primera muestra de orina, en el que dicho perfil metabólico se obtiene midiendo la concentración de dos o más metabolitos en dicha primera muestra de orina para producir dicho perfil de metabolitos para dicho sujeto;
- (c) proporcionar una segunda muestra de orina de dicho sujeto al o en el que, tras la etapa b), se han administrado uno o más candidatos farmacéuticos y/o se han realizado uno o más tratamientos físicos o quirúrgicos;
- 10 (d) obtener un perfil de metabolitos a partir de dicha segunda muestra de orina, en el que dicho perfil metabólico se obtiene midiendo la concentración de dos o más metabolitos en dicha segunda muestra de orina para producir dicho perfil de metabolitos para dicho sujeto;
- (e) comparar dicho perfil de metabolitos obtenido en las etapas (b) y (d) con un perfil de metabolitos de referencia, en el que dicho perfil de metabolitos de referencia se determina a partir de la concentración de metabolitos correspondientes en orina de individuos en una población de referencia; y
- 15 (f) evaluar, basándose en dicha comparación en la etapa (e), si el uno o más candidatos farmacéuticos y/o tratamientos son eficaces contra pólipos adenomatosos
- y en el que la etapa (b) comprende medir la concentración en dicha primera muestra de orina de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ó 17 metabolitos cualesquiera seleccionados del grupo que
- 20 consiste en: butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina; 3-hidroxi-butirato; asparagina; trigonelina; 3-hidroxifenilacetato; histidina; acetona; 2-oxoglutarato; etanol; adipato; 3-hidroxi-mandelato; tirosina y benzoato;
- y en el que la etapa (d) comprende medir la concentración en dicha segunda muestra de orina de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ó 17 metabolitos cualesquiera seleccionados del grupo que
- 25 consiste en: butirato; serina; metanol; β -alanina; p-metilhistidina; 3-hidroxi-butirato; asparagina; trigonelina; 3-hidroxifenilacetato; histidina; acetona; 2-oxoglutarato; etanol; adipato; 3-hidroxi-mandelato; tirosina y benzoato.

Gráfico de VIP - Normal frente a cáncer - 69 metabolitos



ID de var. (primaria)

FIG. 1

SIMCAP v. 12.0.1 - 2011.04.27 15:36:59 (UTC-7)

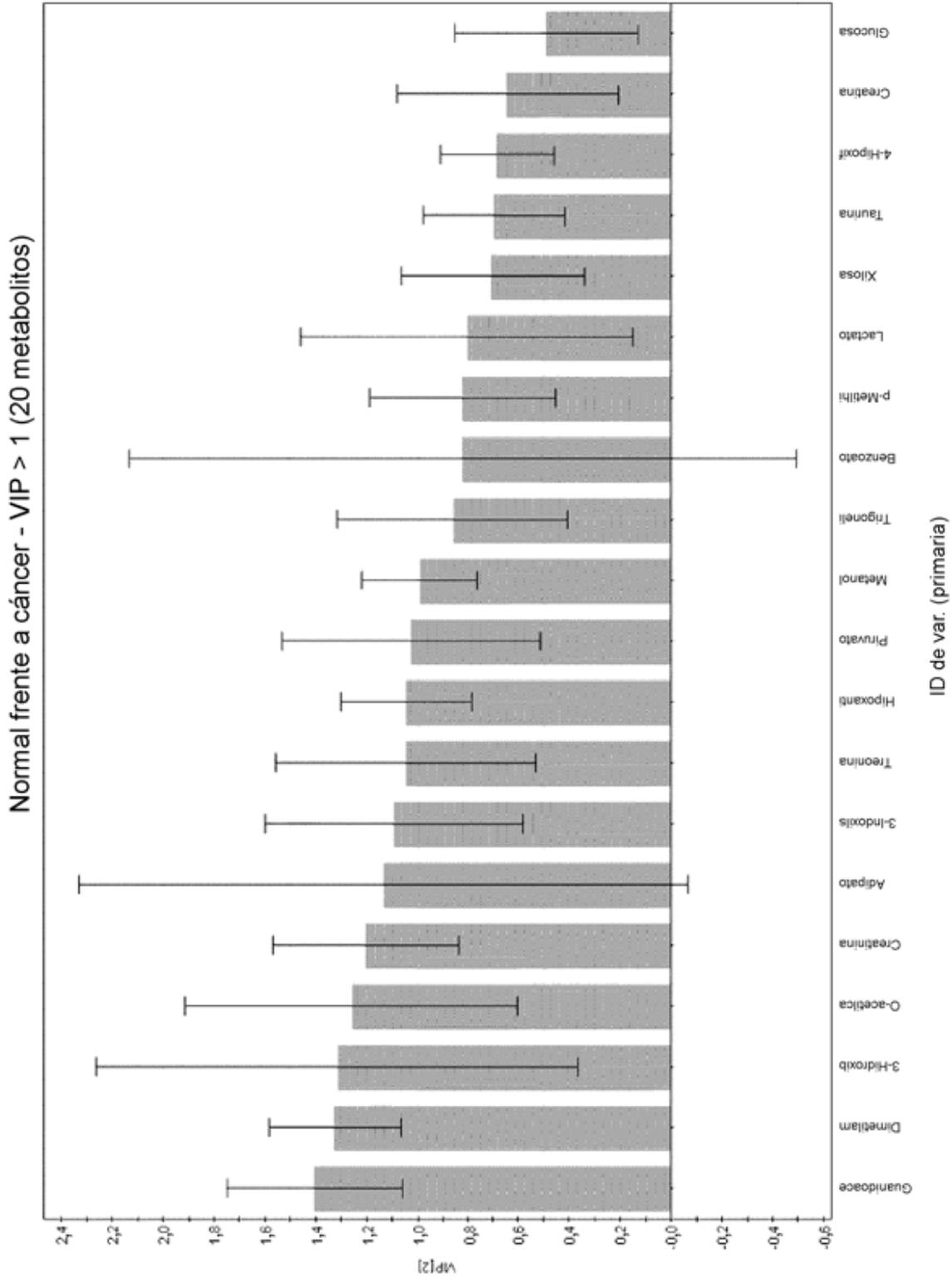


FIG. 2

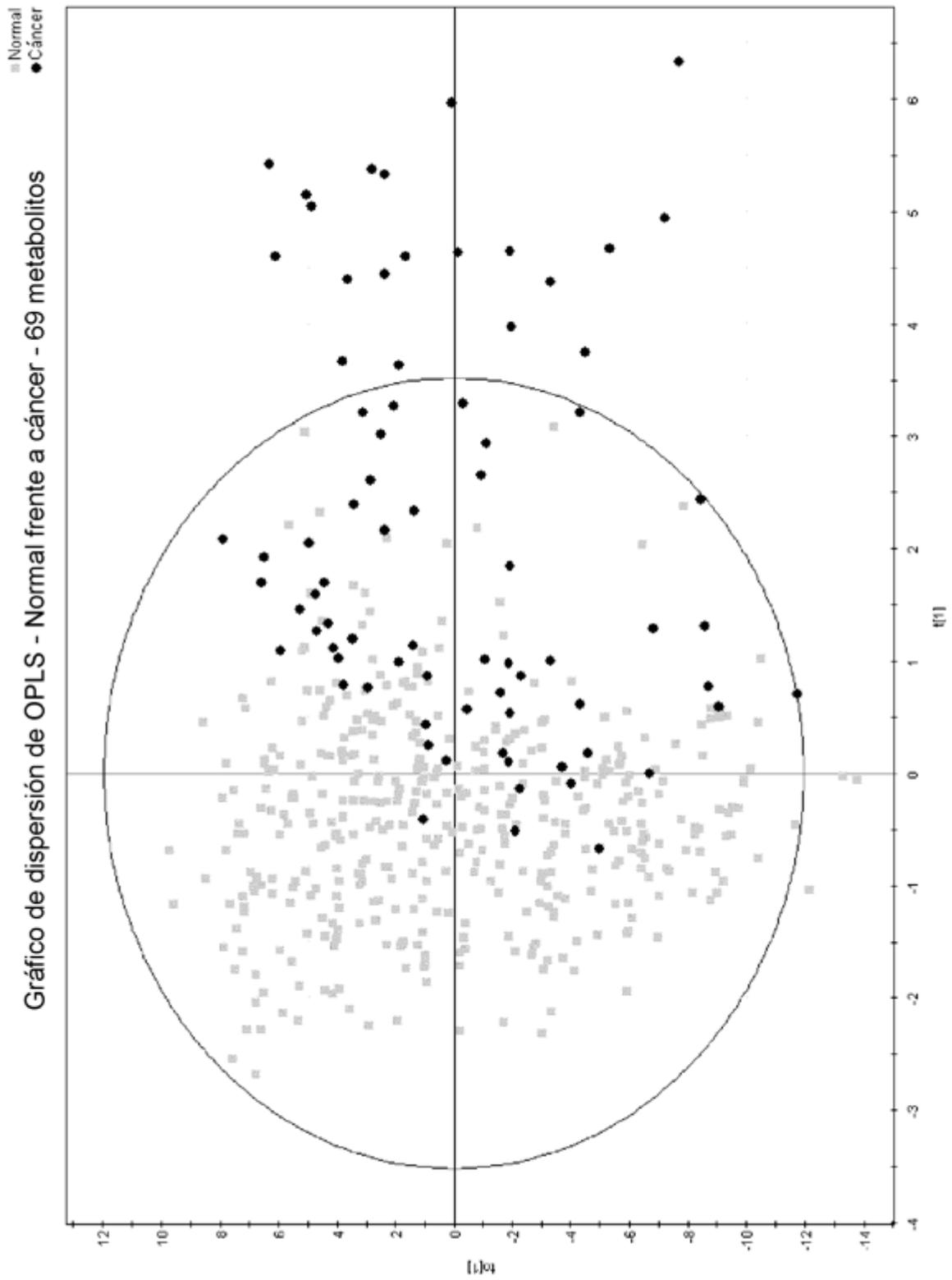


FIG. 3

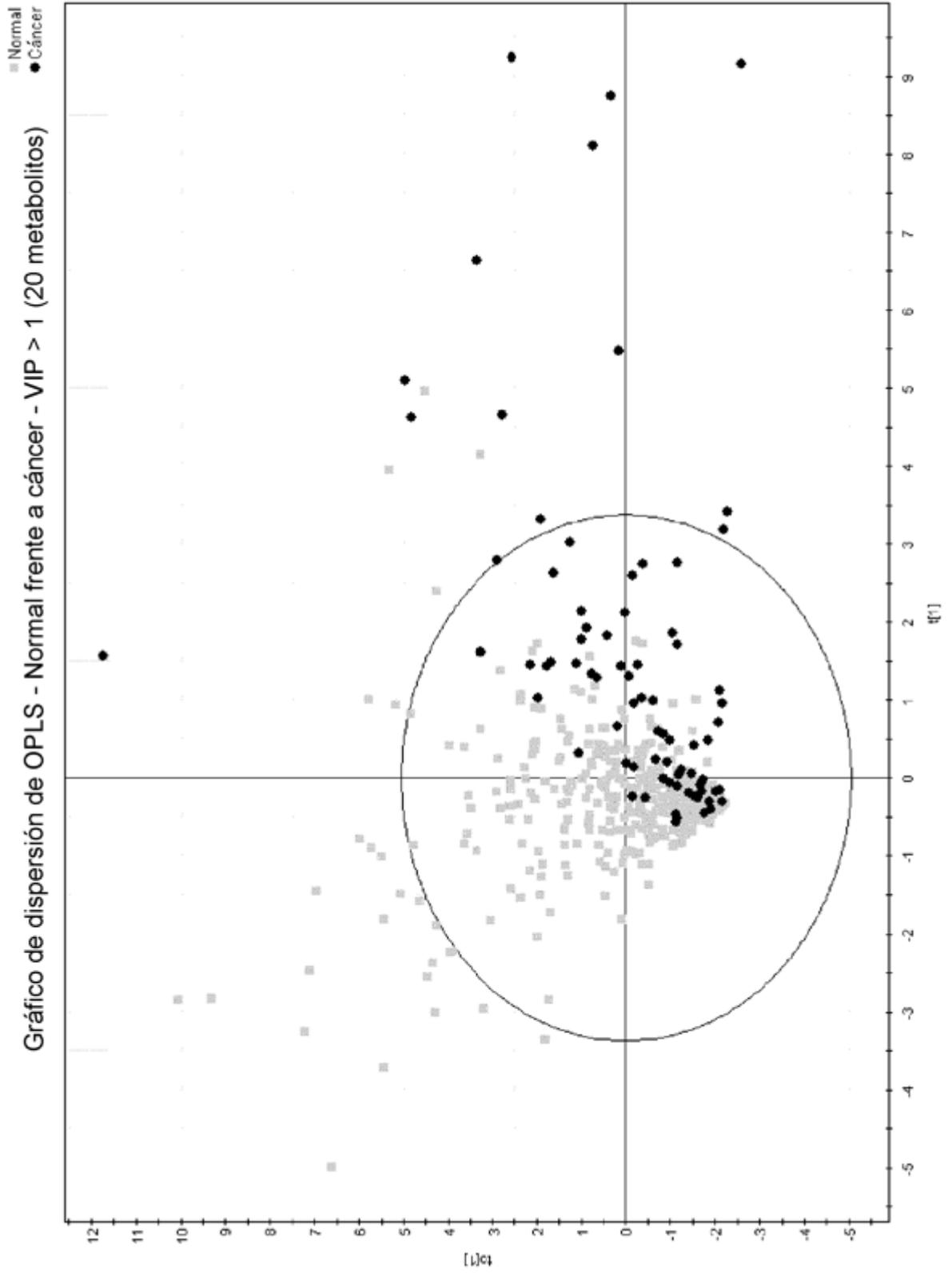


FIG. 4

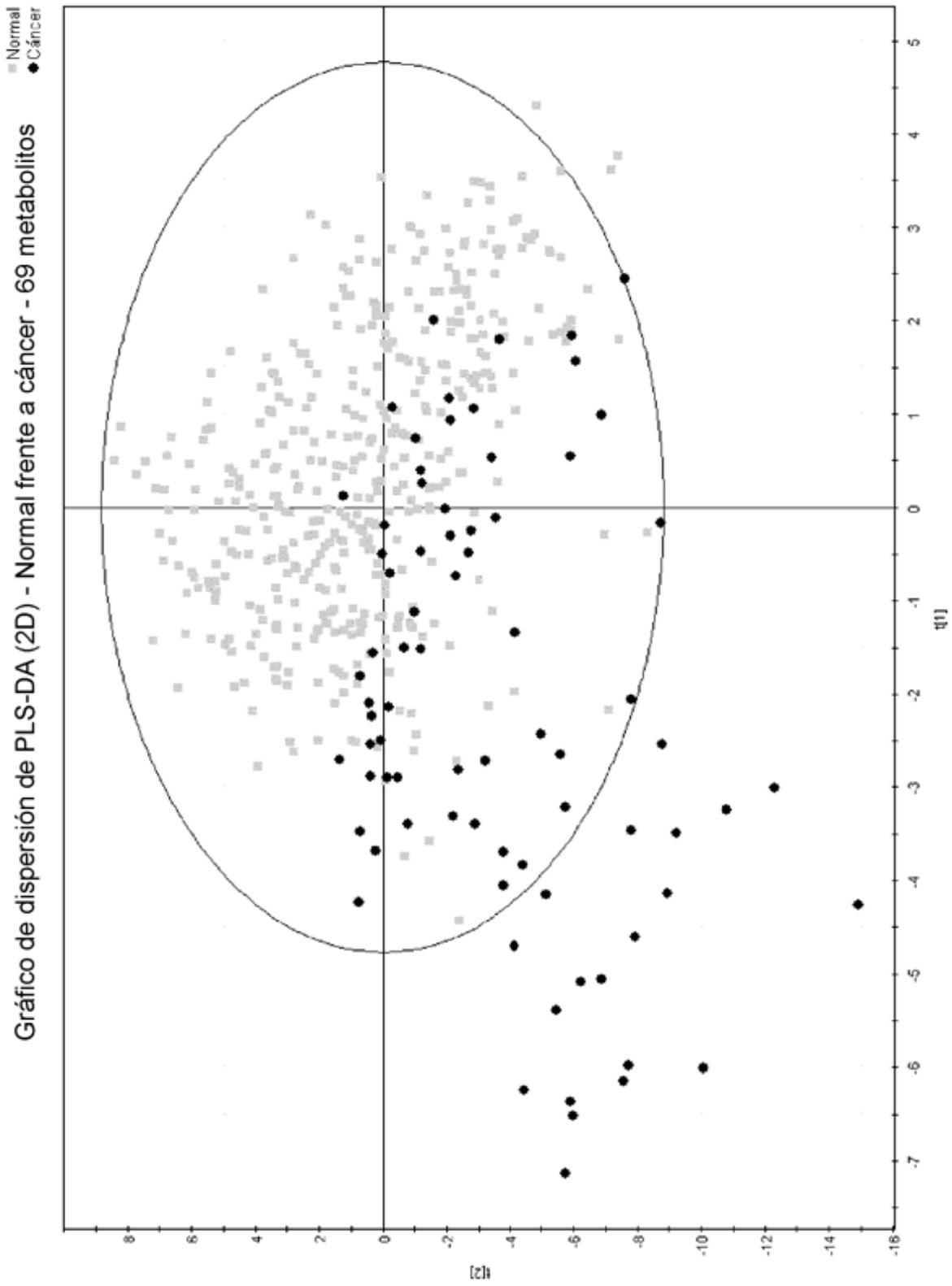


FIG. 5

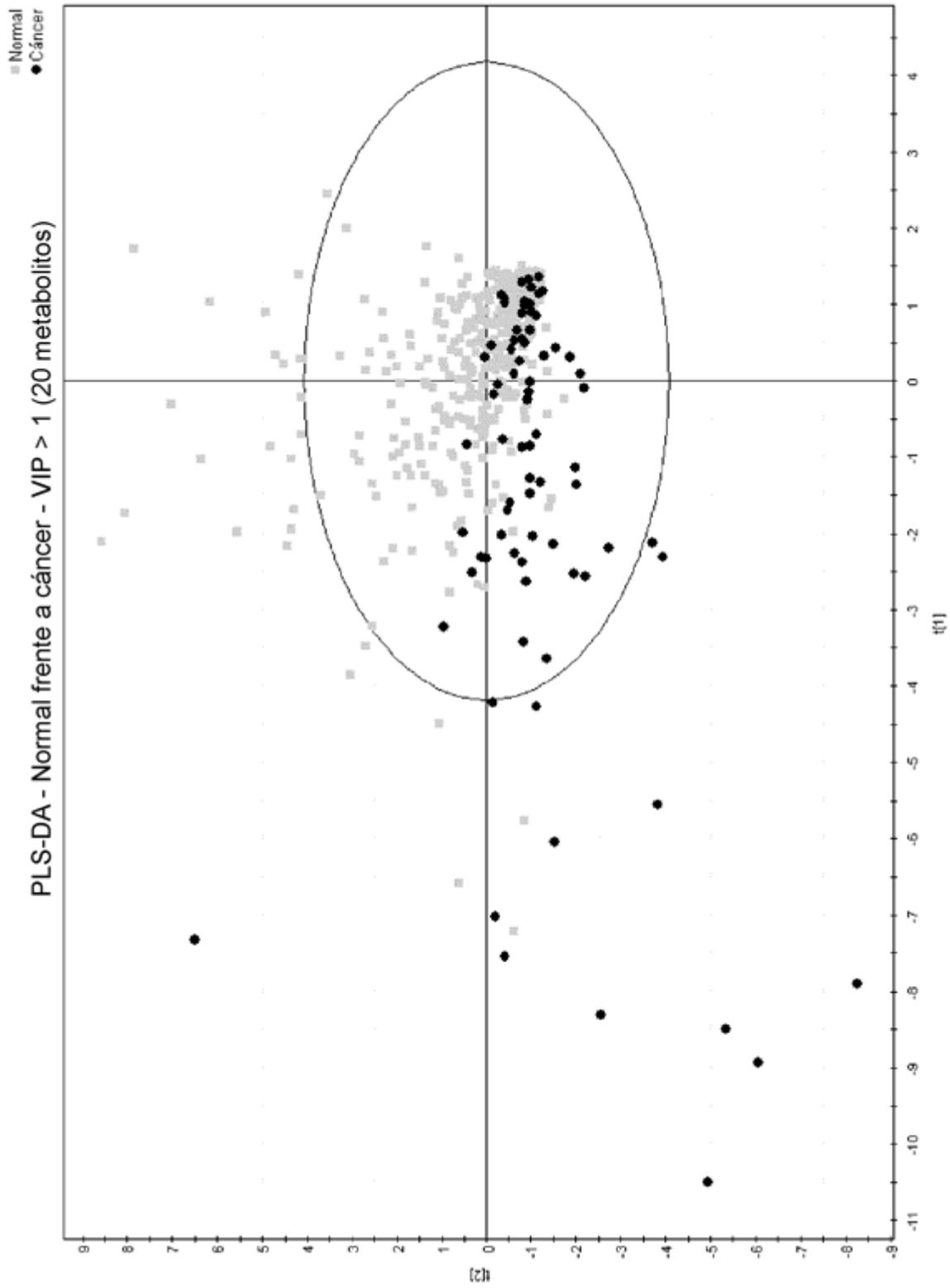


FIG. 6

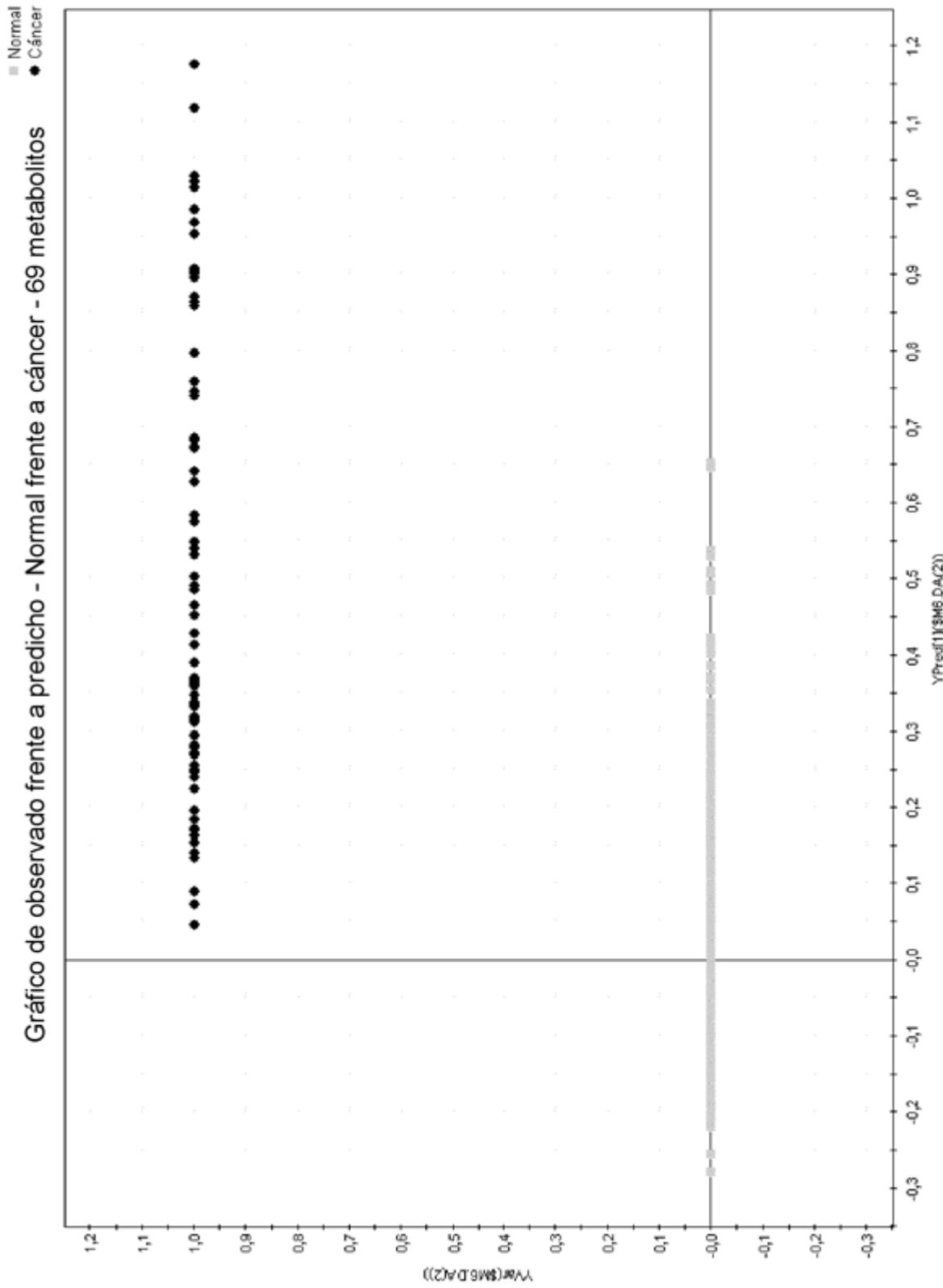


FIG. 7

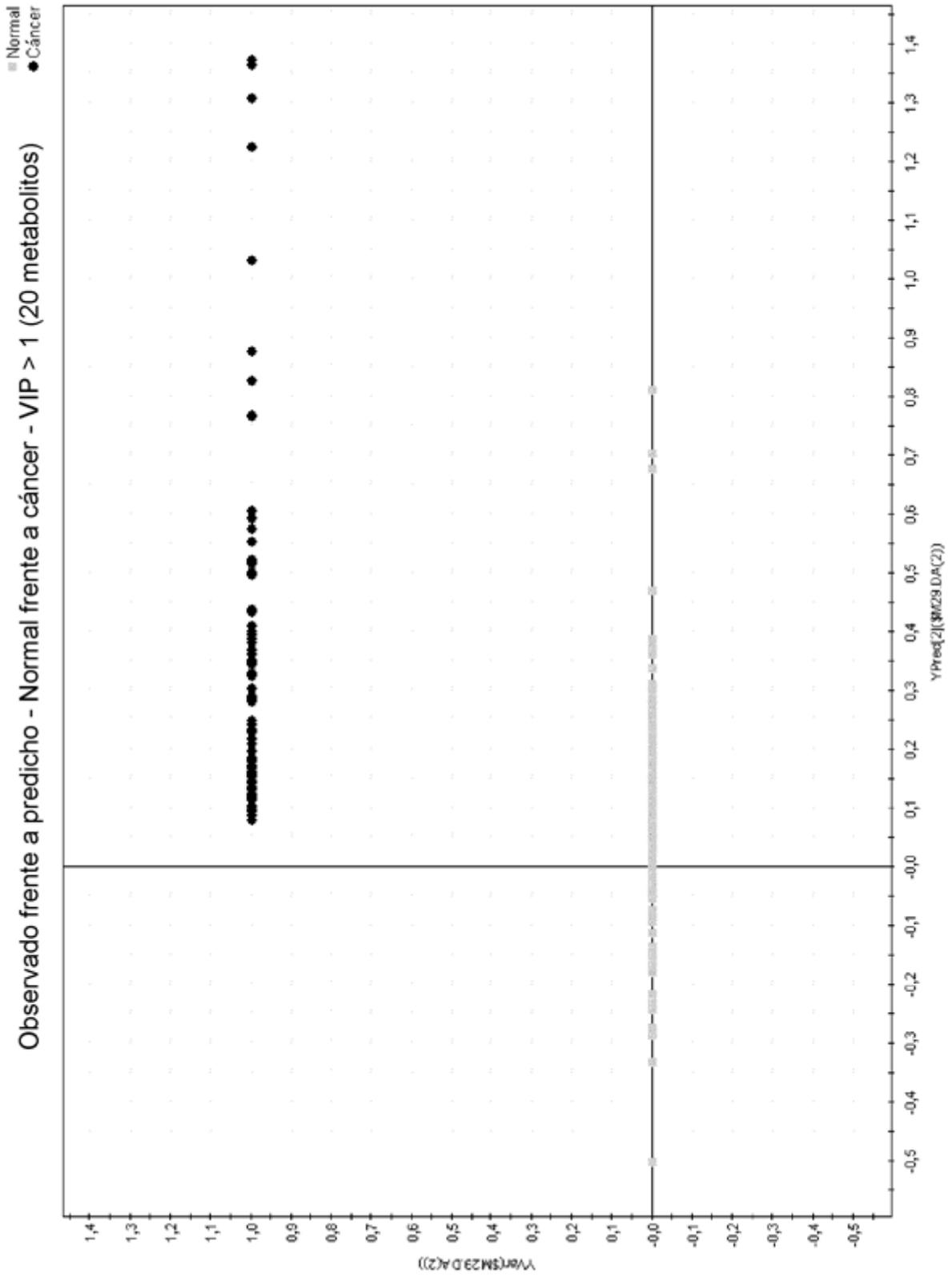


FIG. 8

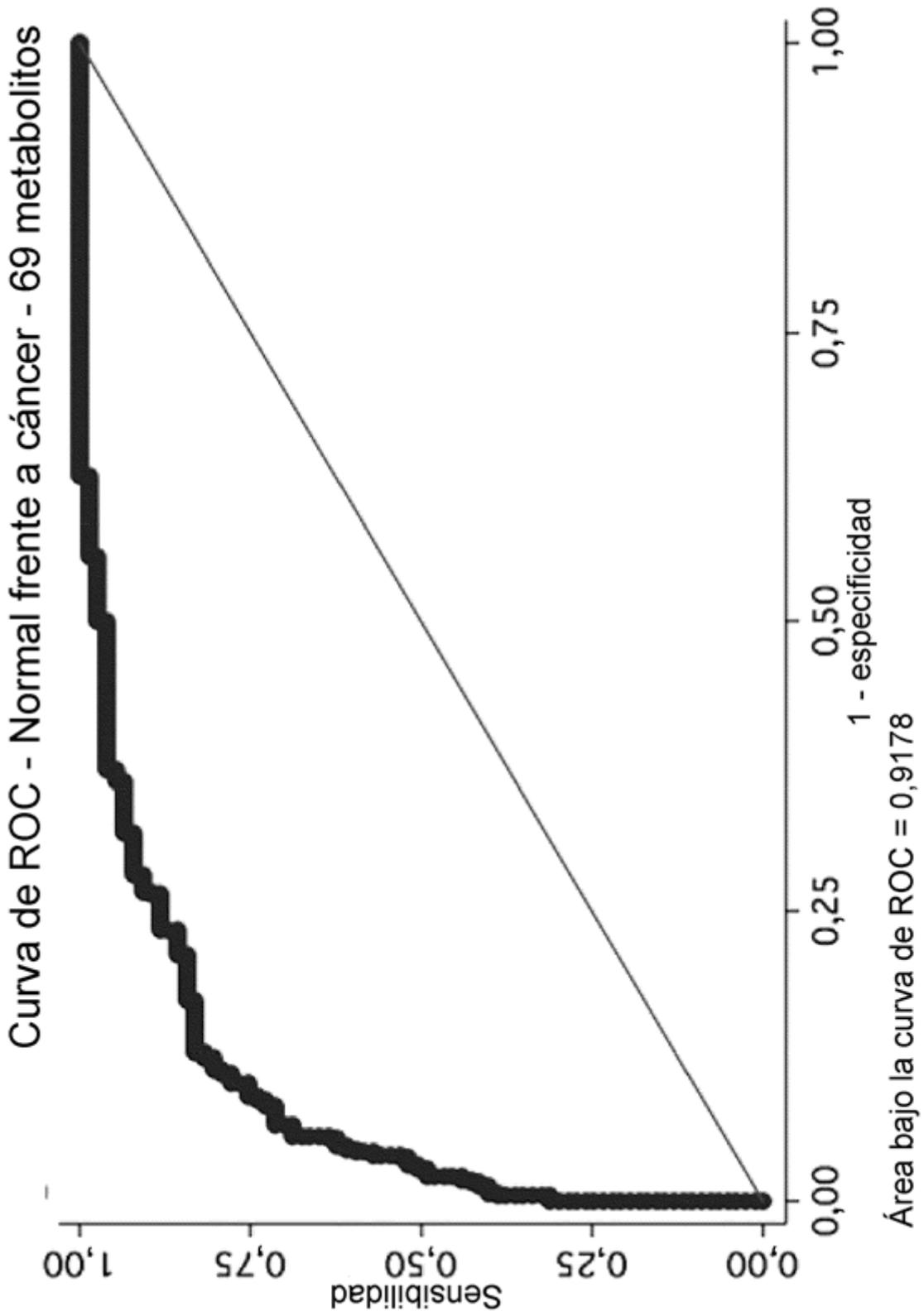


FIG. 9

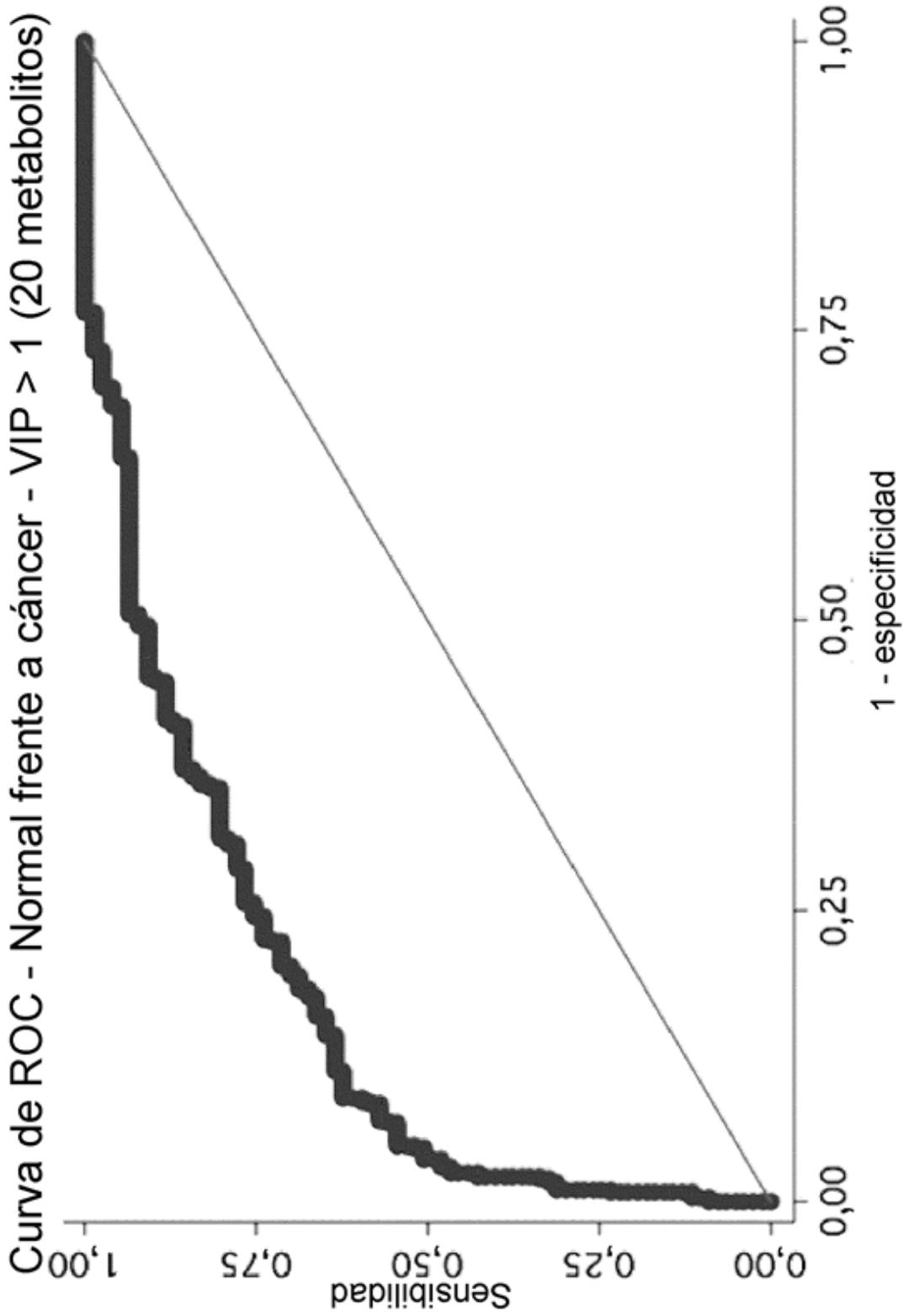
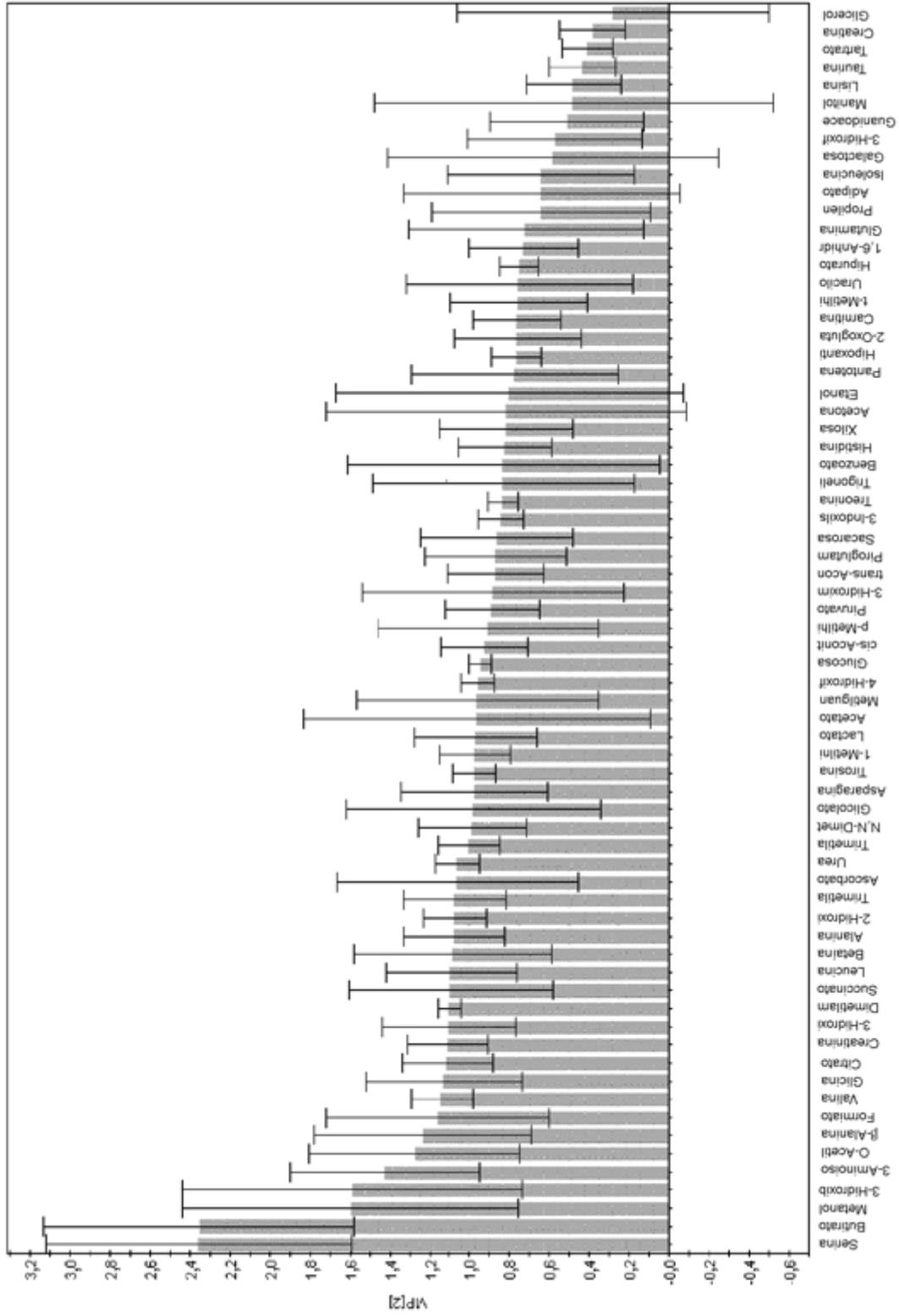


FIG. 10

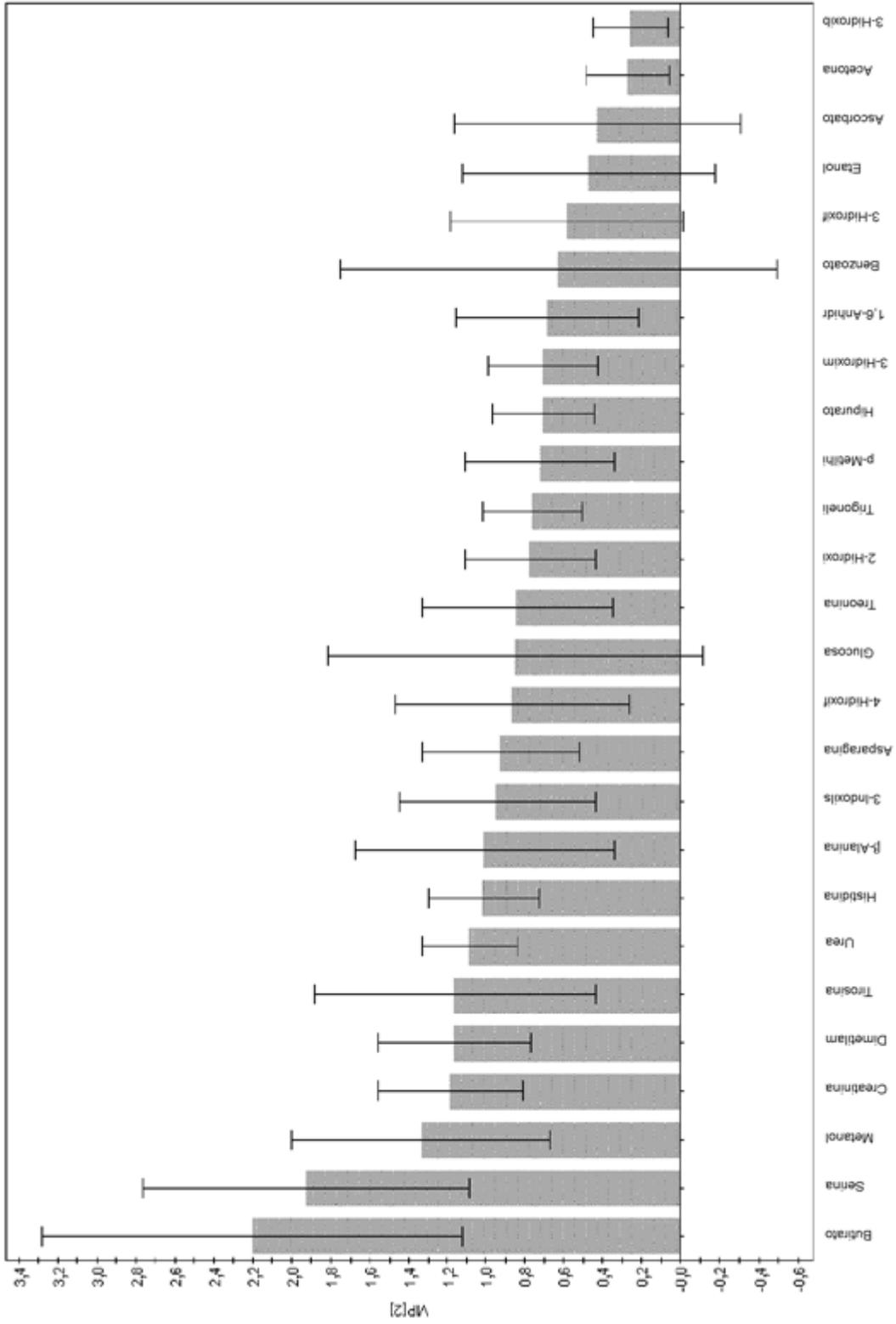
Gráfico de VIP - Normal frente a pólipos - 69 metabolitos



ID de var. (primaria)

FIG. 11

Gráfico de VIP - Normal frente a pólipos - VIP > 1 (26 metabolitos)



ID de var. (primaria)

FIG. 12

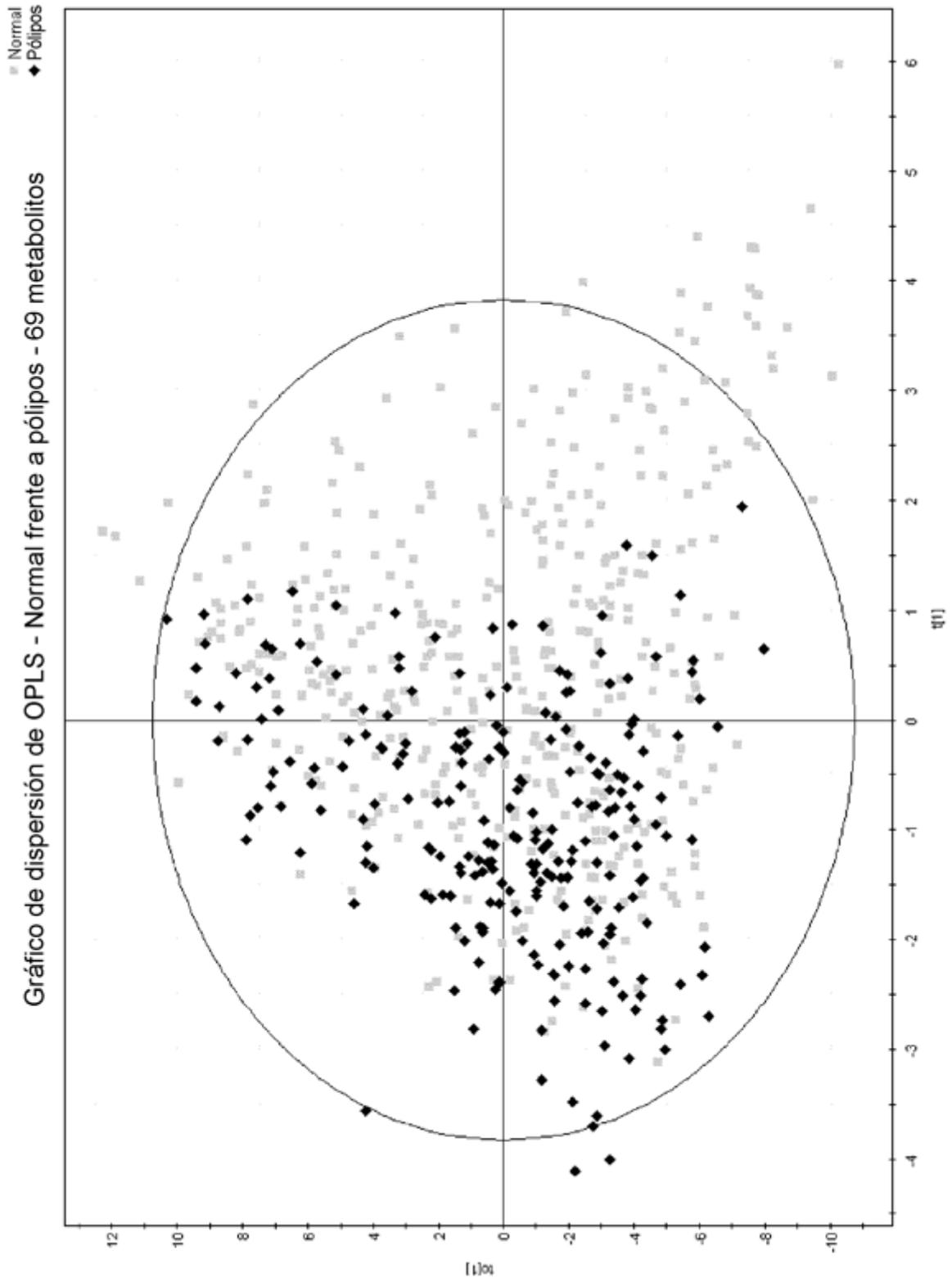


FIG. 13

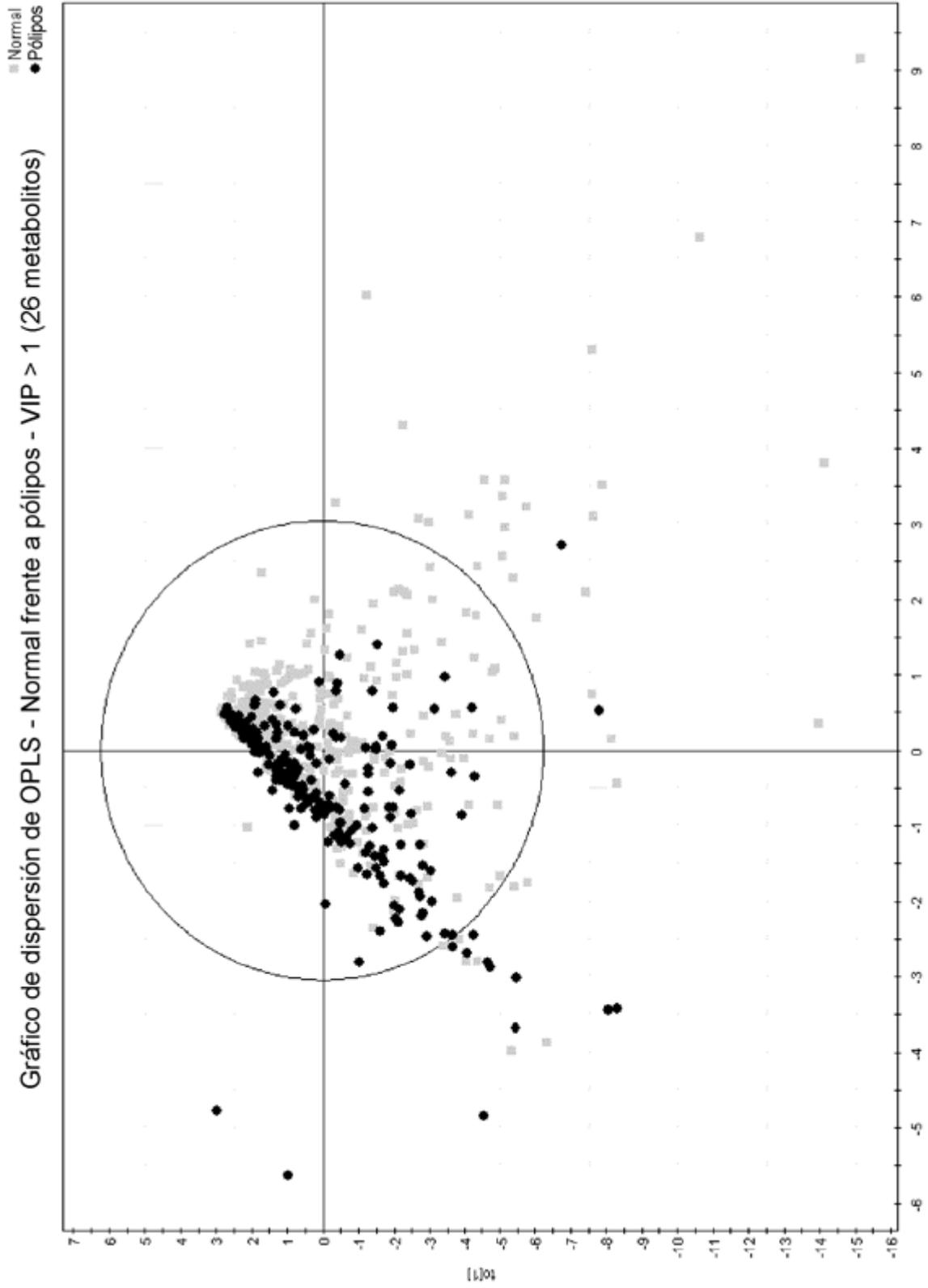


FIG. 14

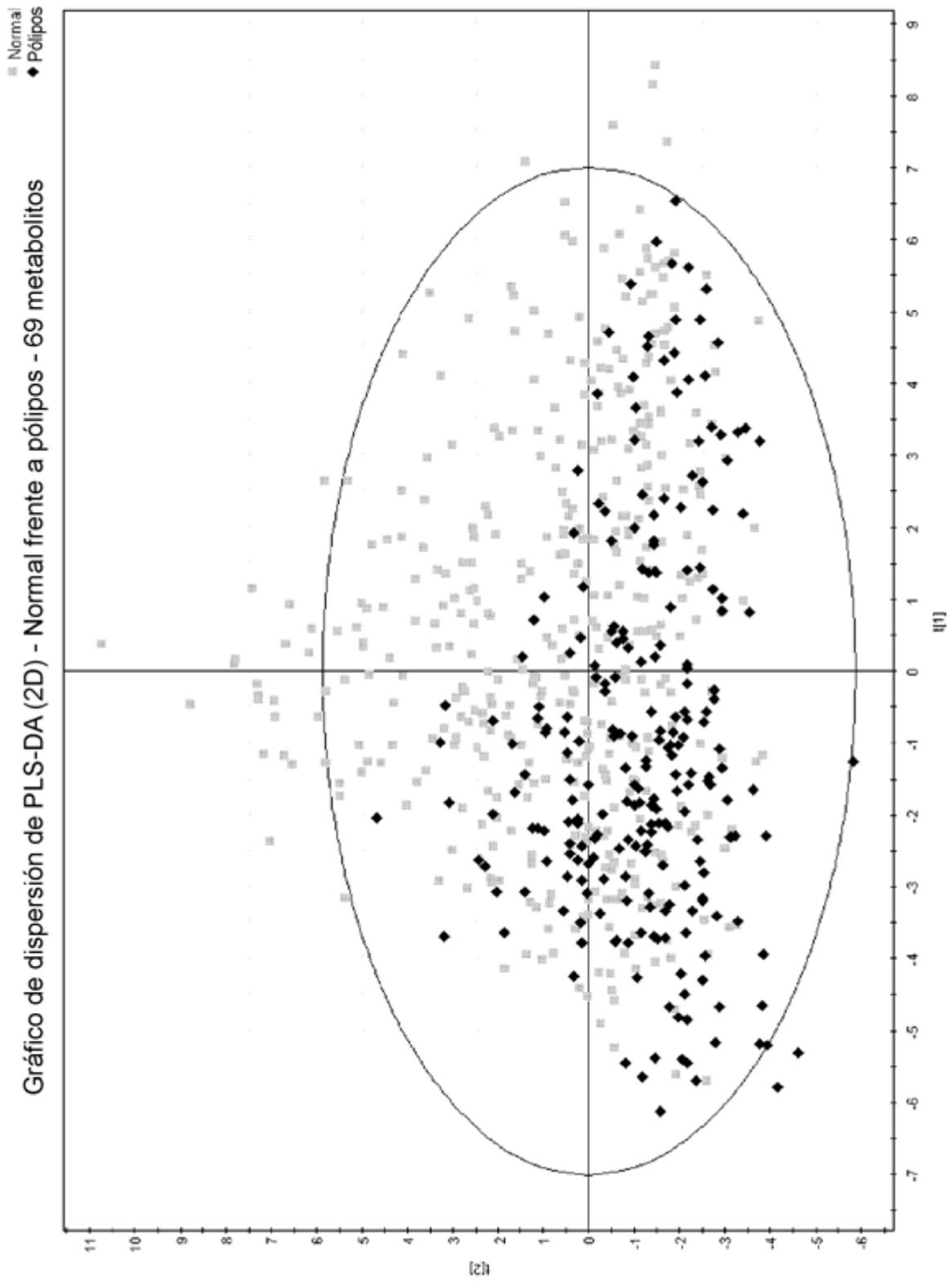


FIG. 15

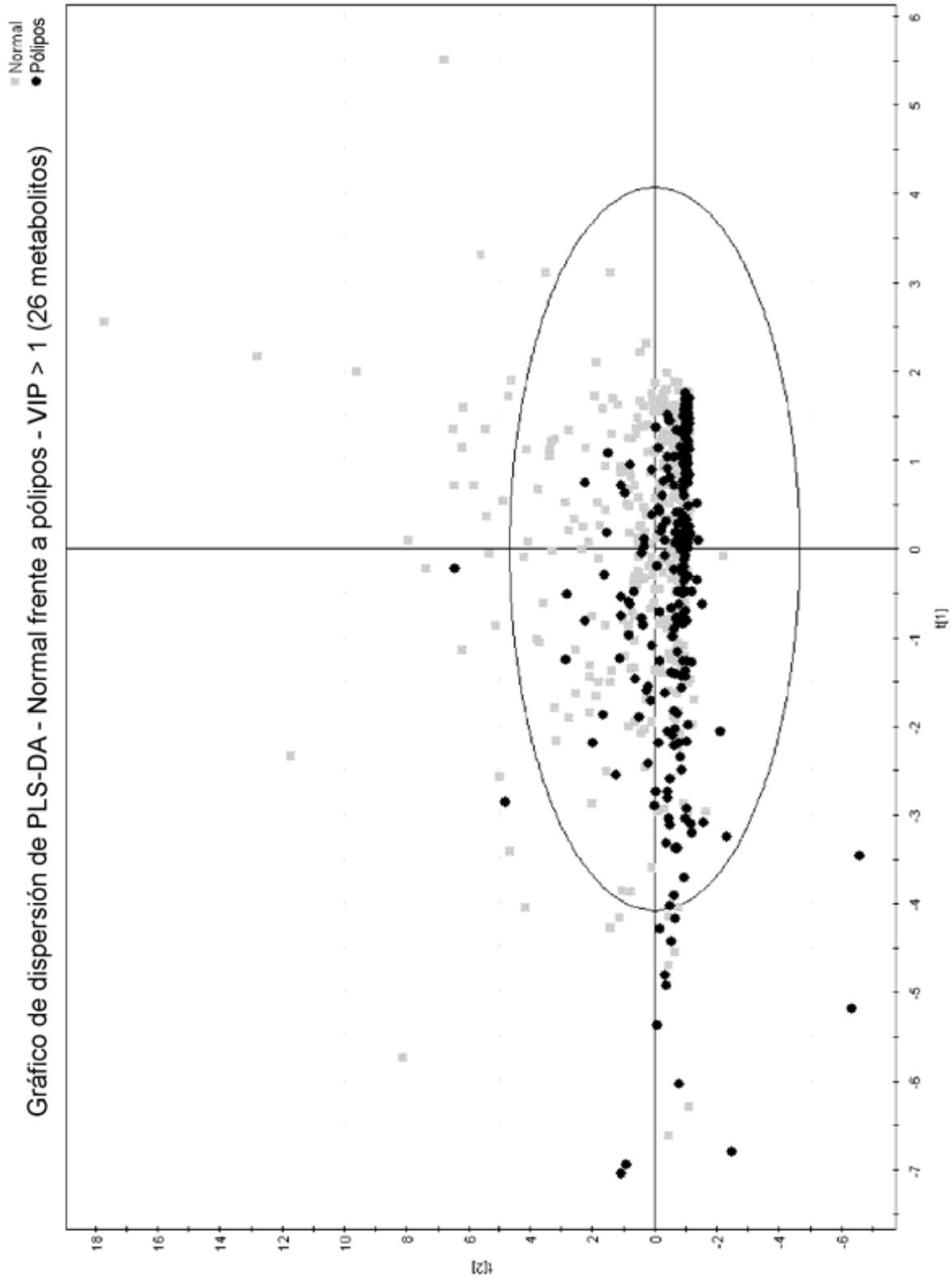


FIG. 16

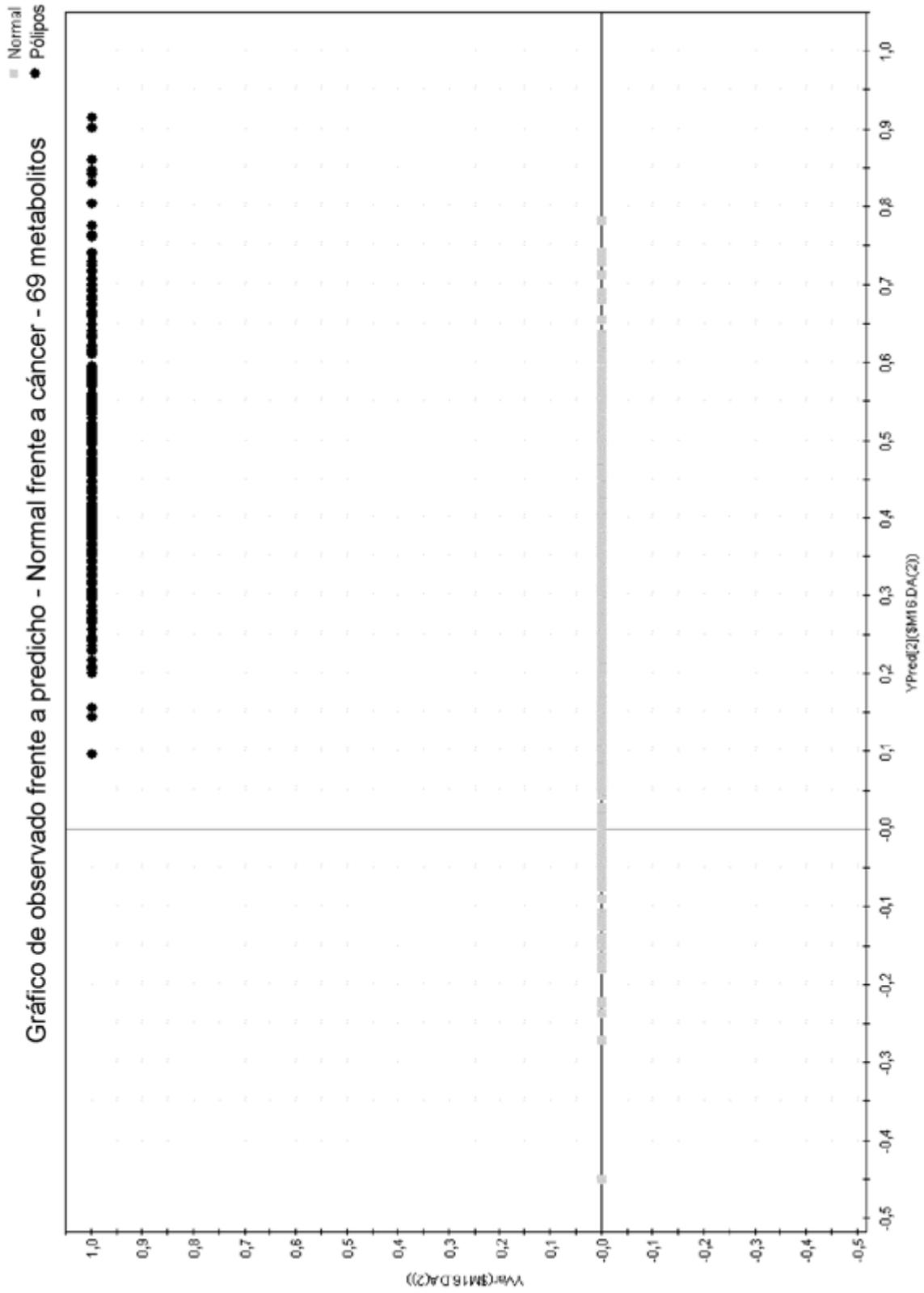


FIG. 17

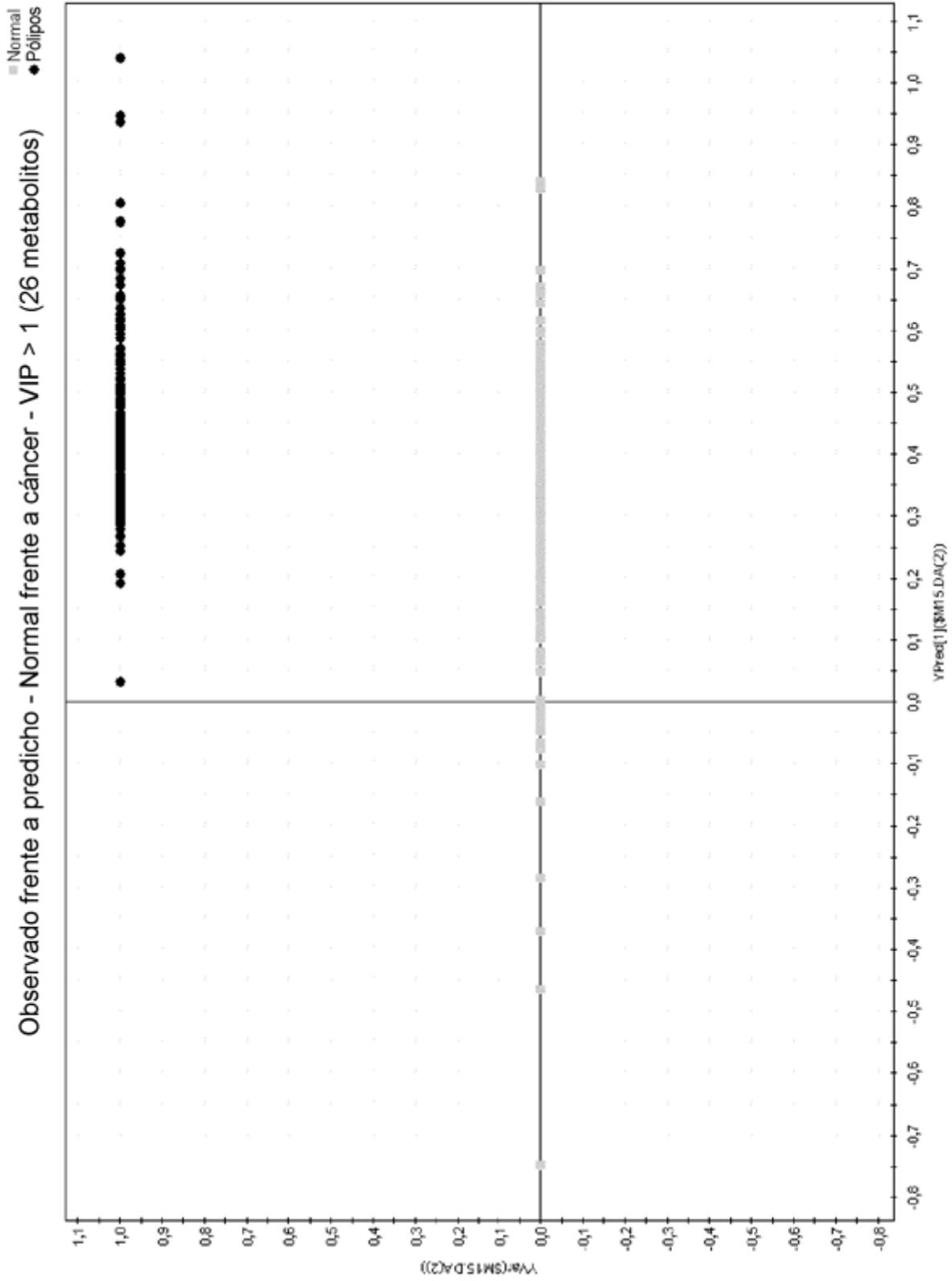


FIG. 18

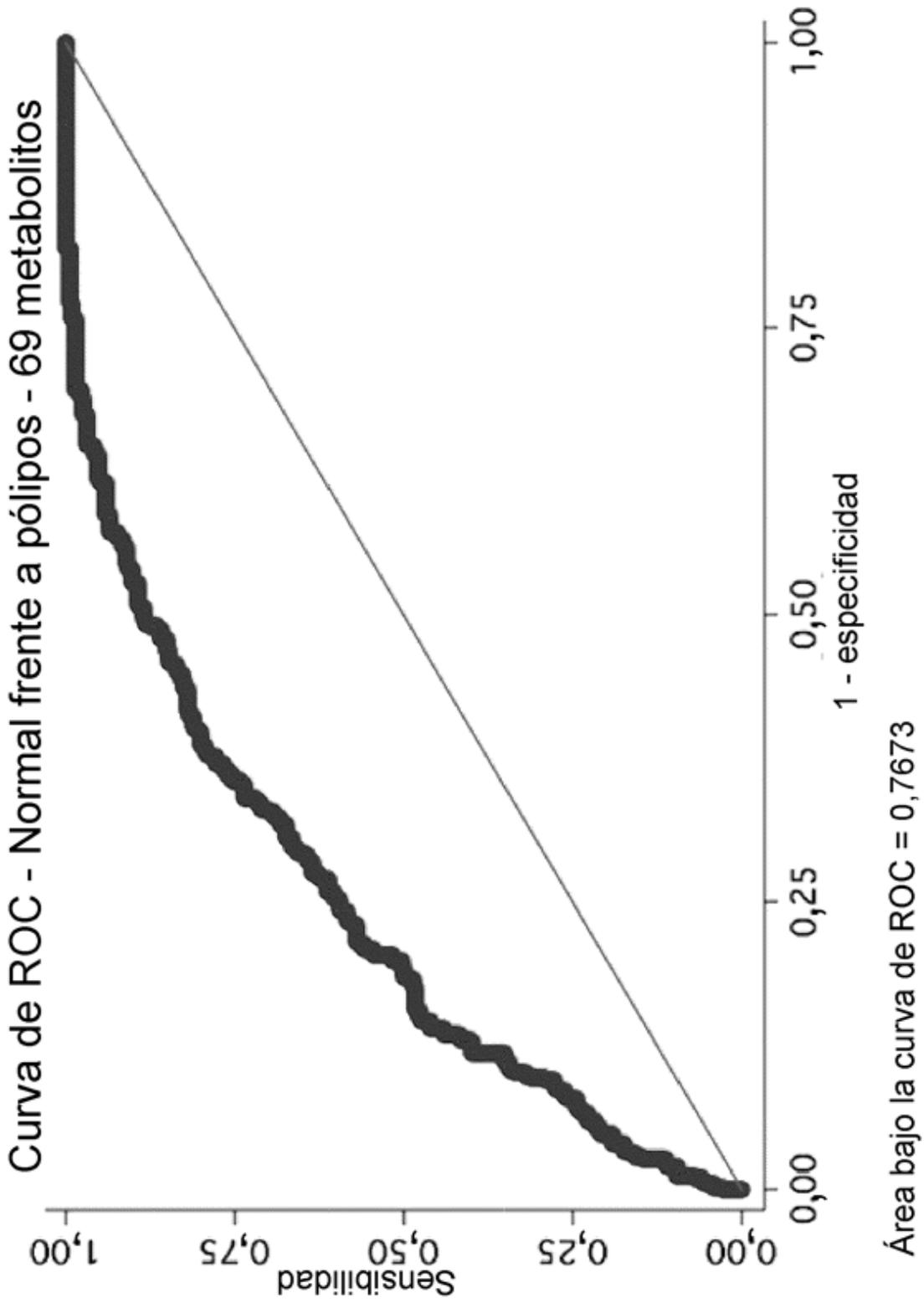
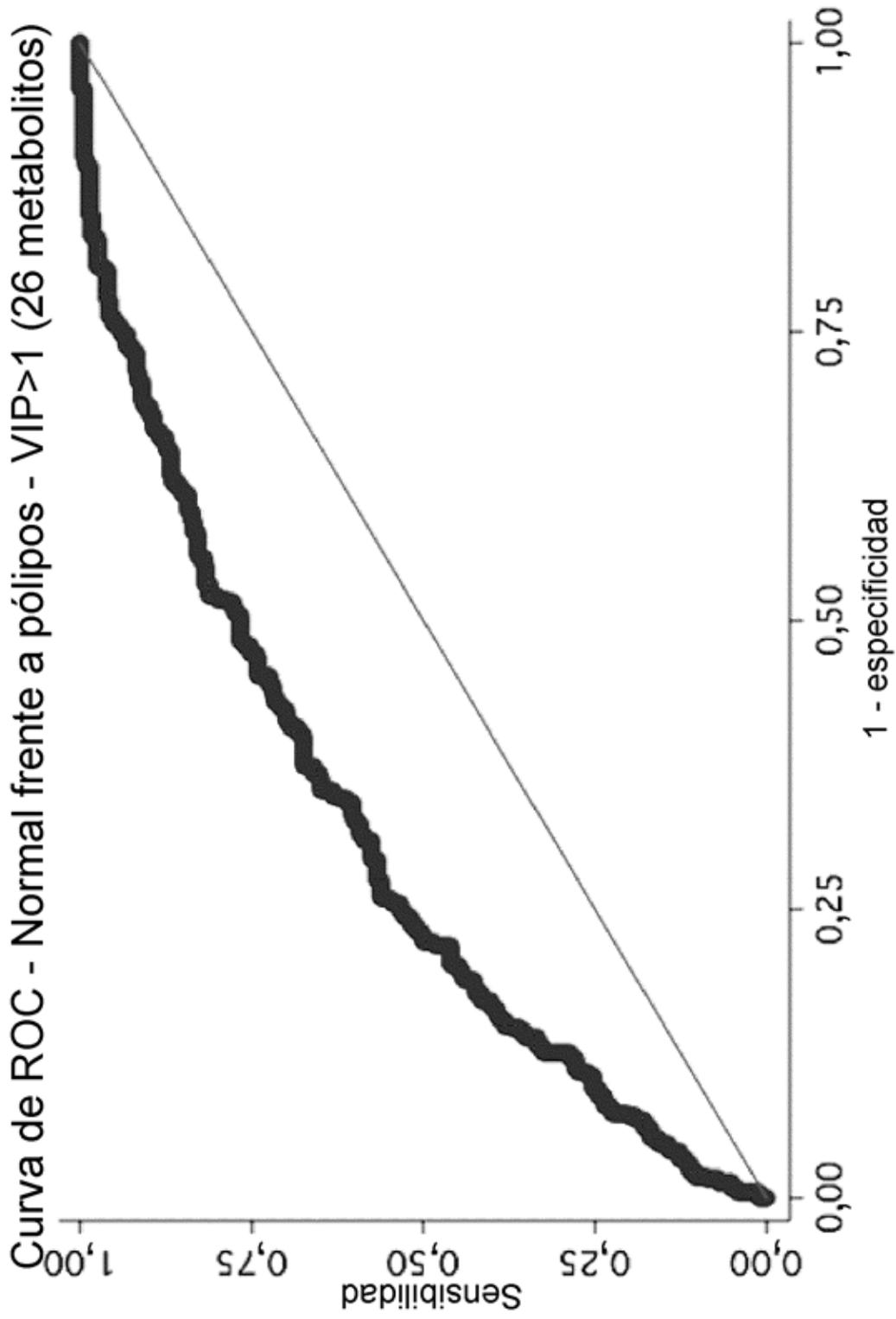


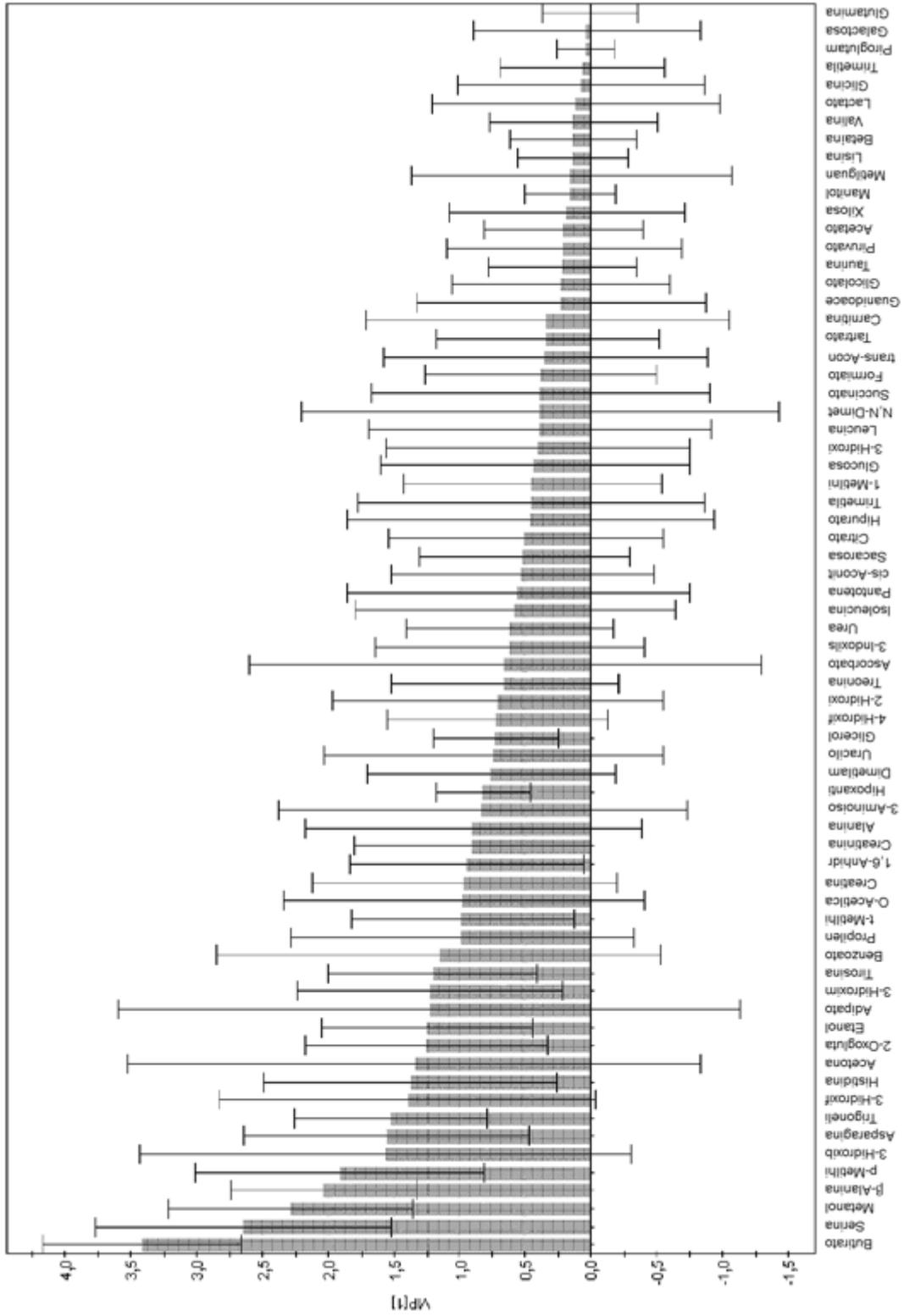
FIG. 19



Área bajo la curva de ROC = 0,7015

FIG. 20

Gráfico de VIP - Normal frente a adenoma - 69 metabolitos



ID de var. (primaria)

FIG. 21

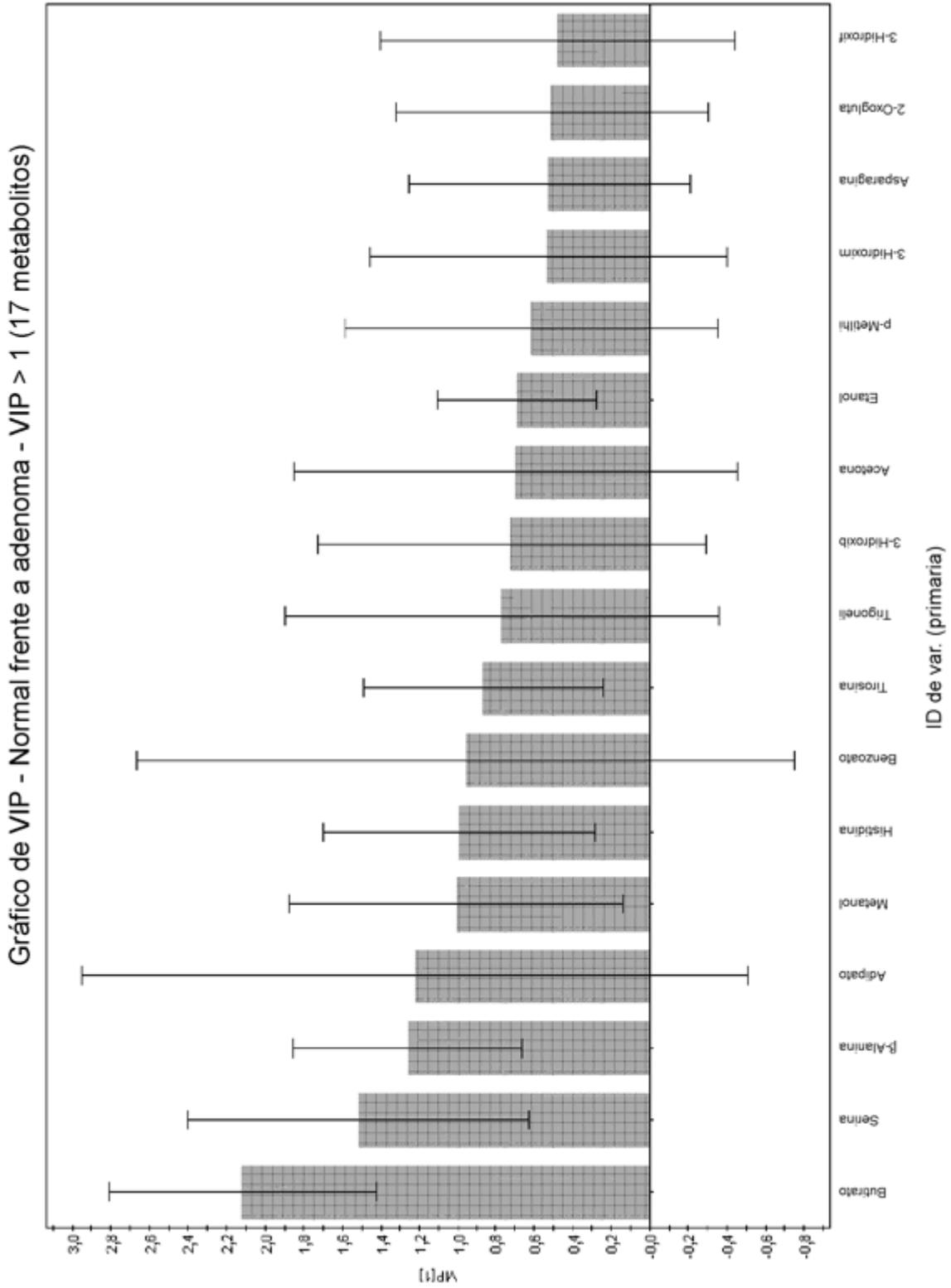


FIG. 22

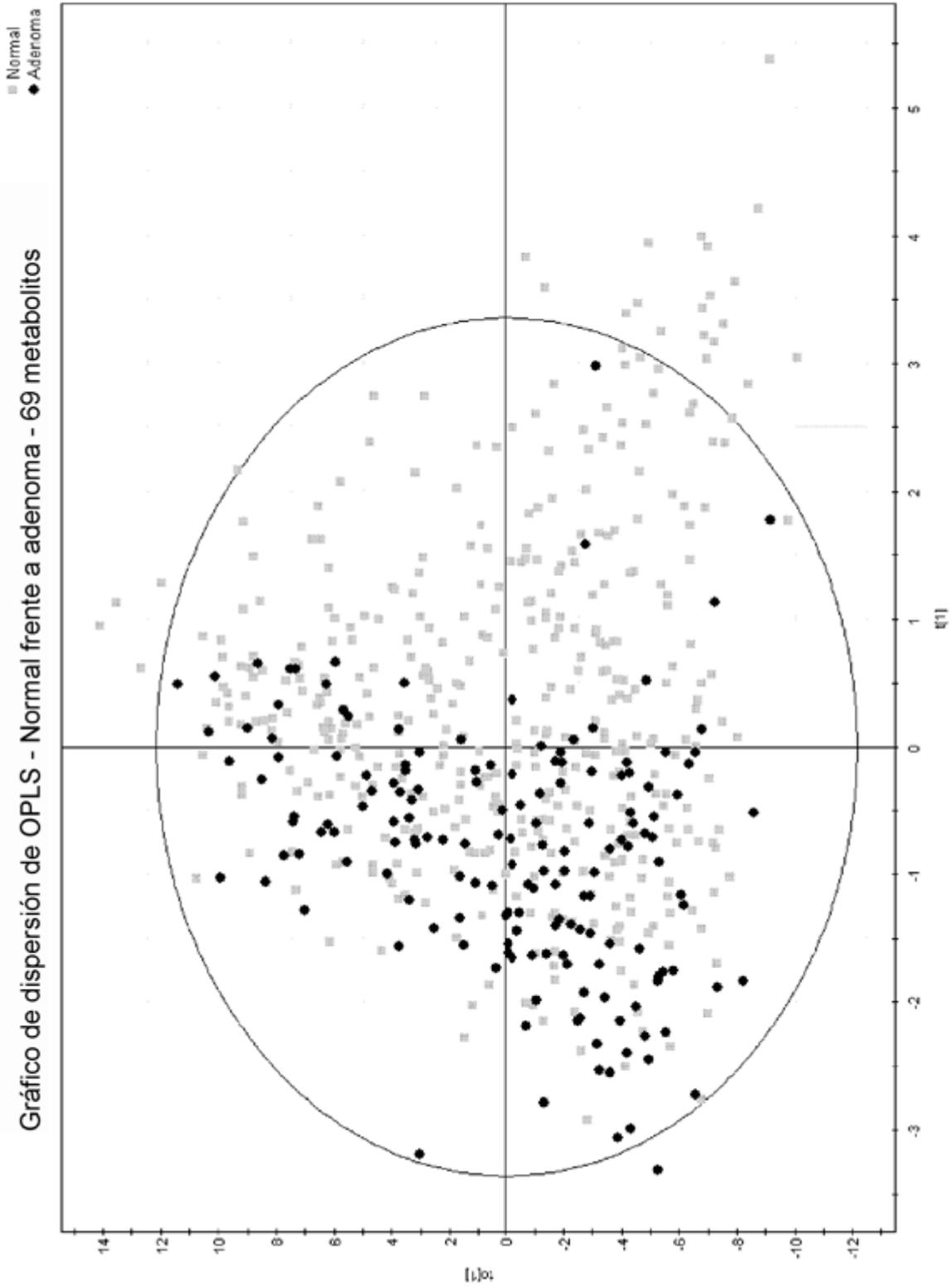


FIG. 23

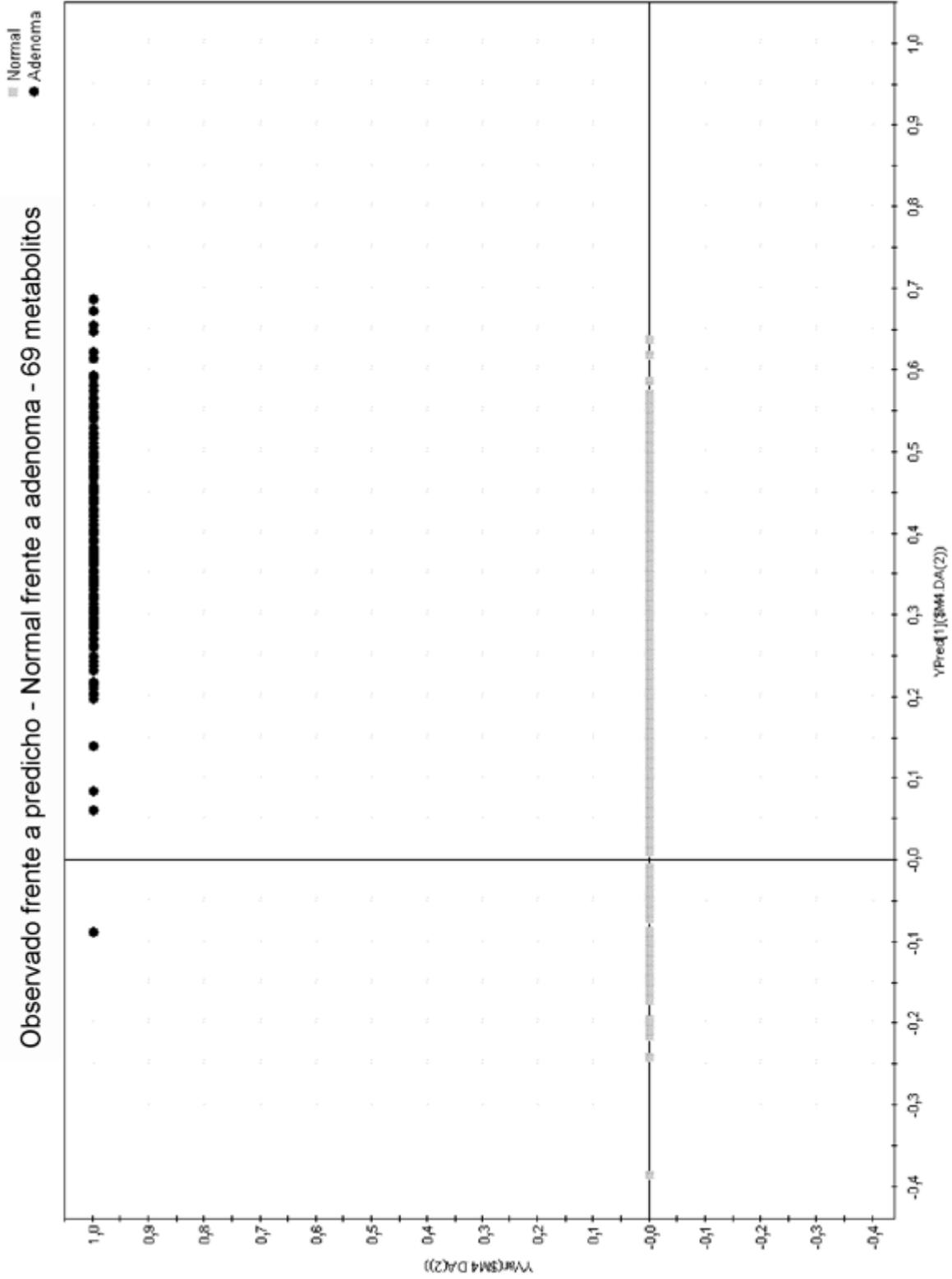


FIG. 24

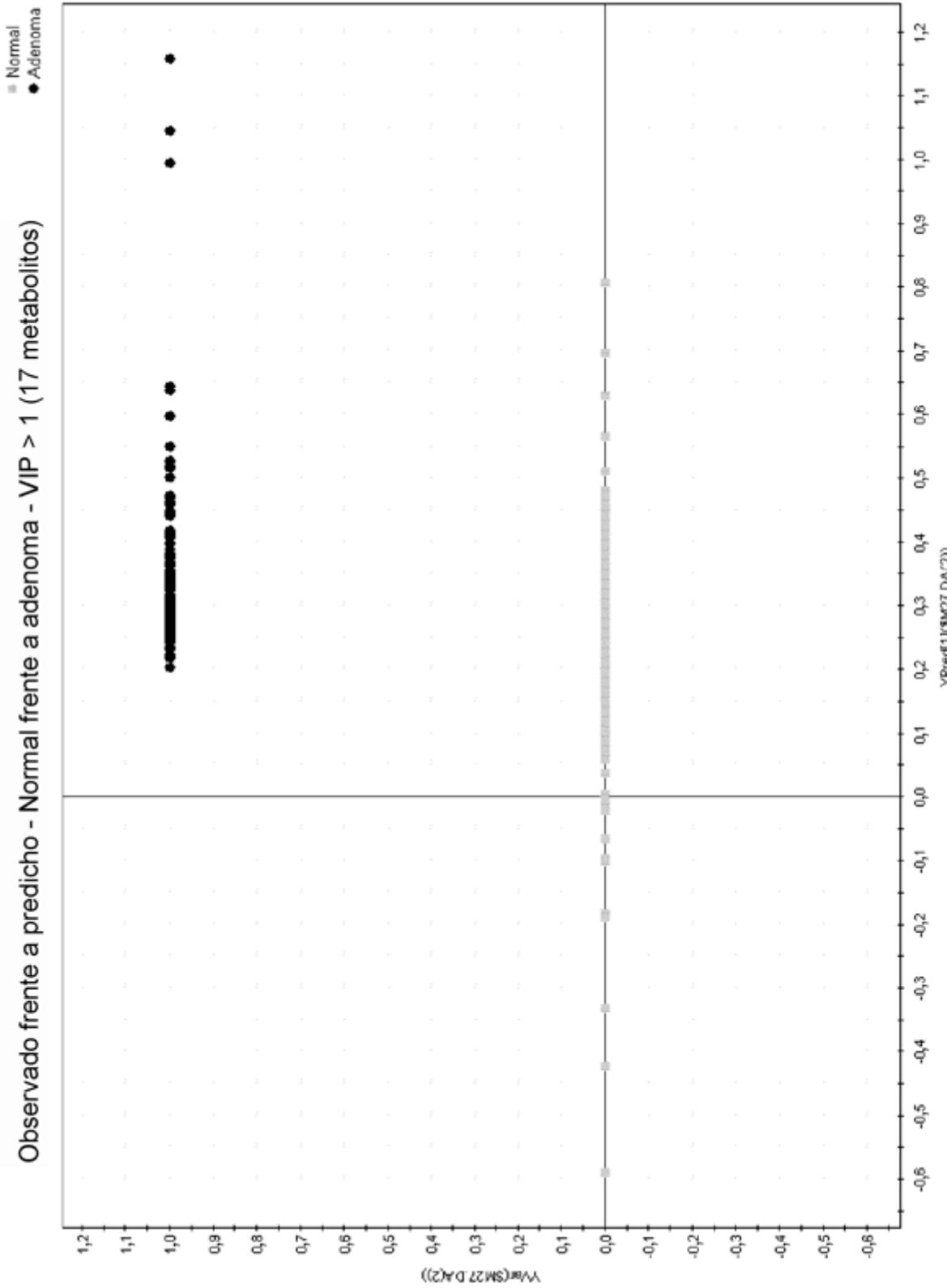


FIG. 25

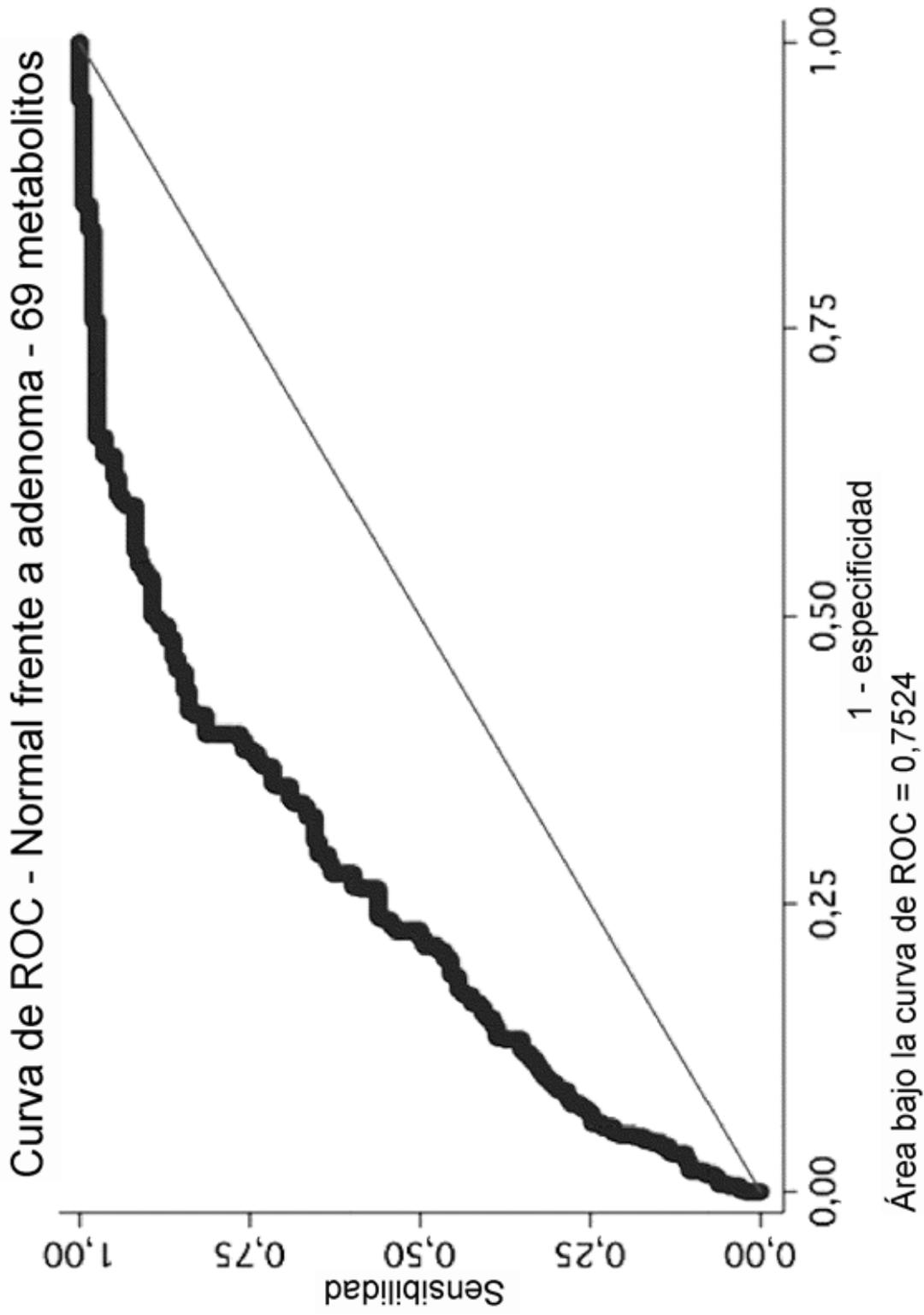


FIG. 26

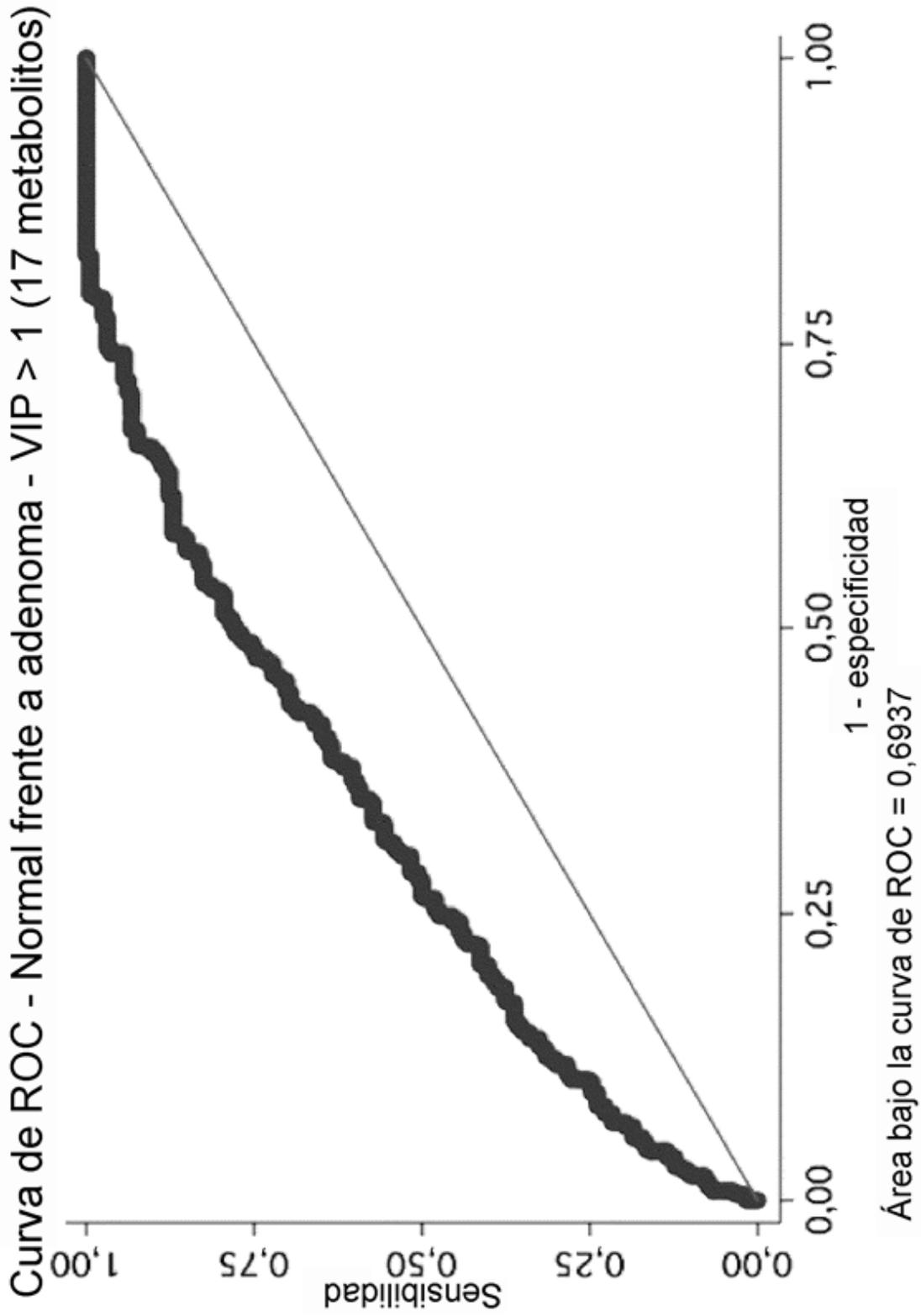


FIG. 27

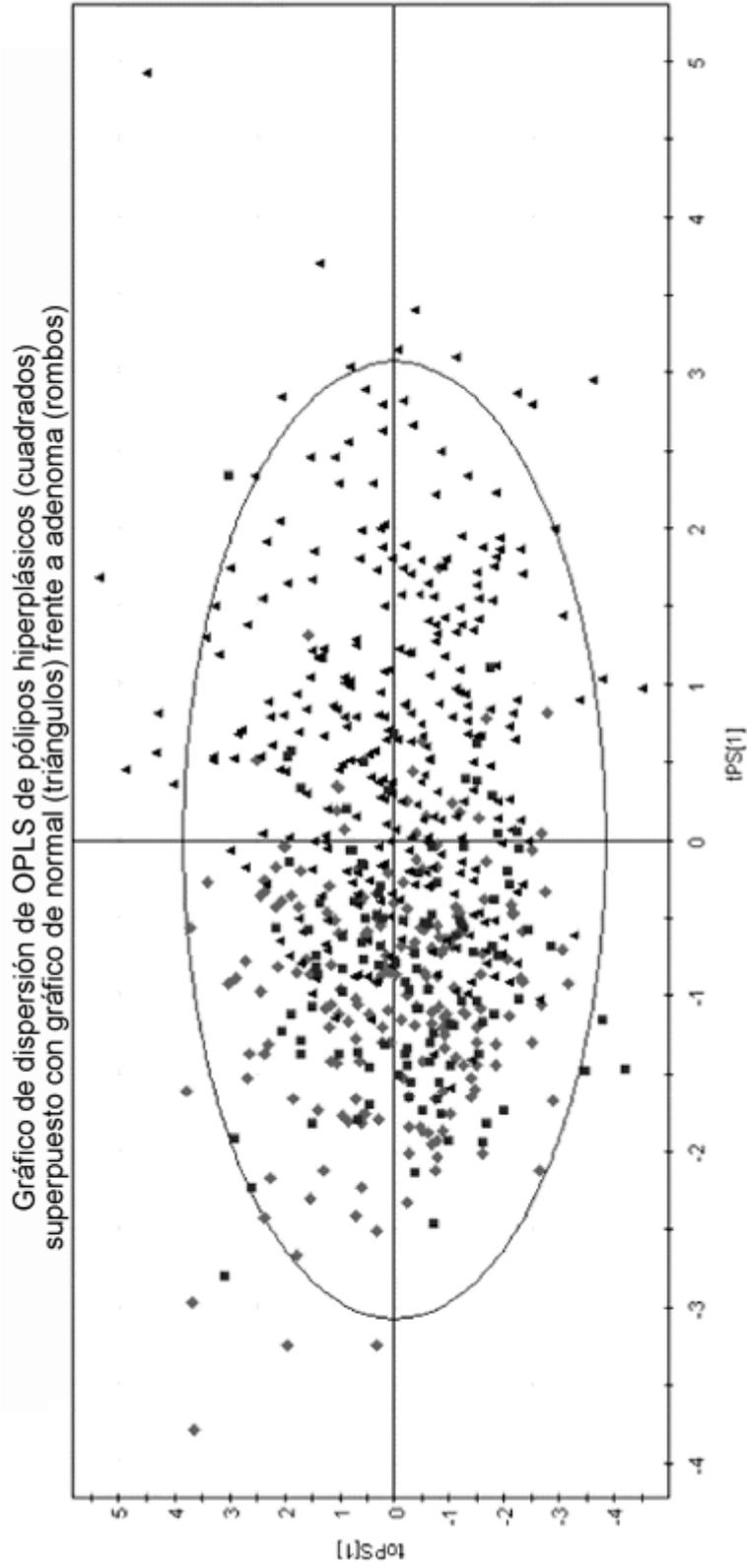


FIG. 28

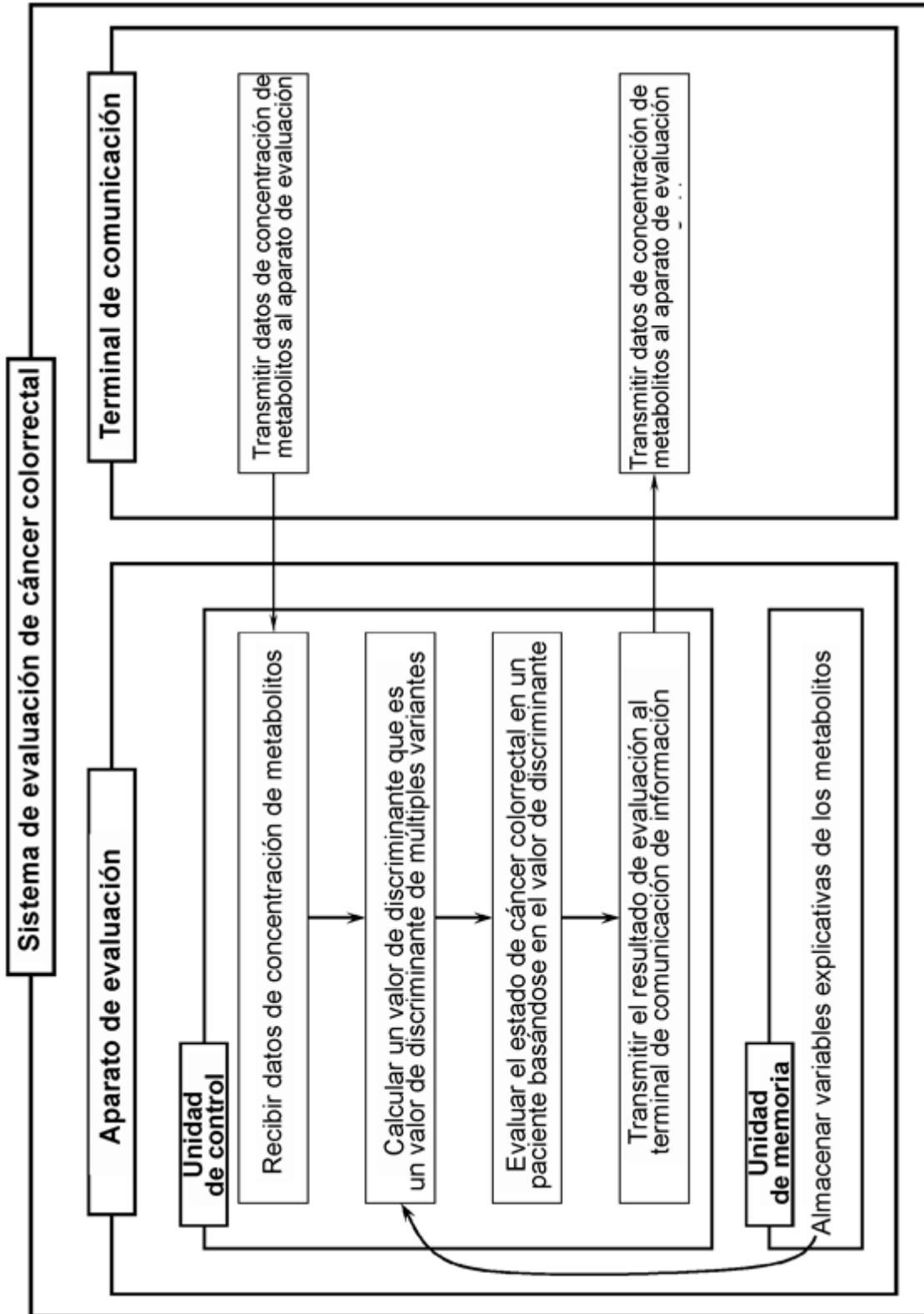


FIG. 29

Resumen del modelo de O2PLS que relaciona dos tablas de datos entre sí

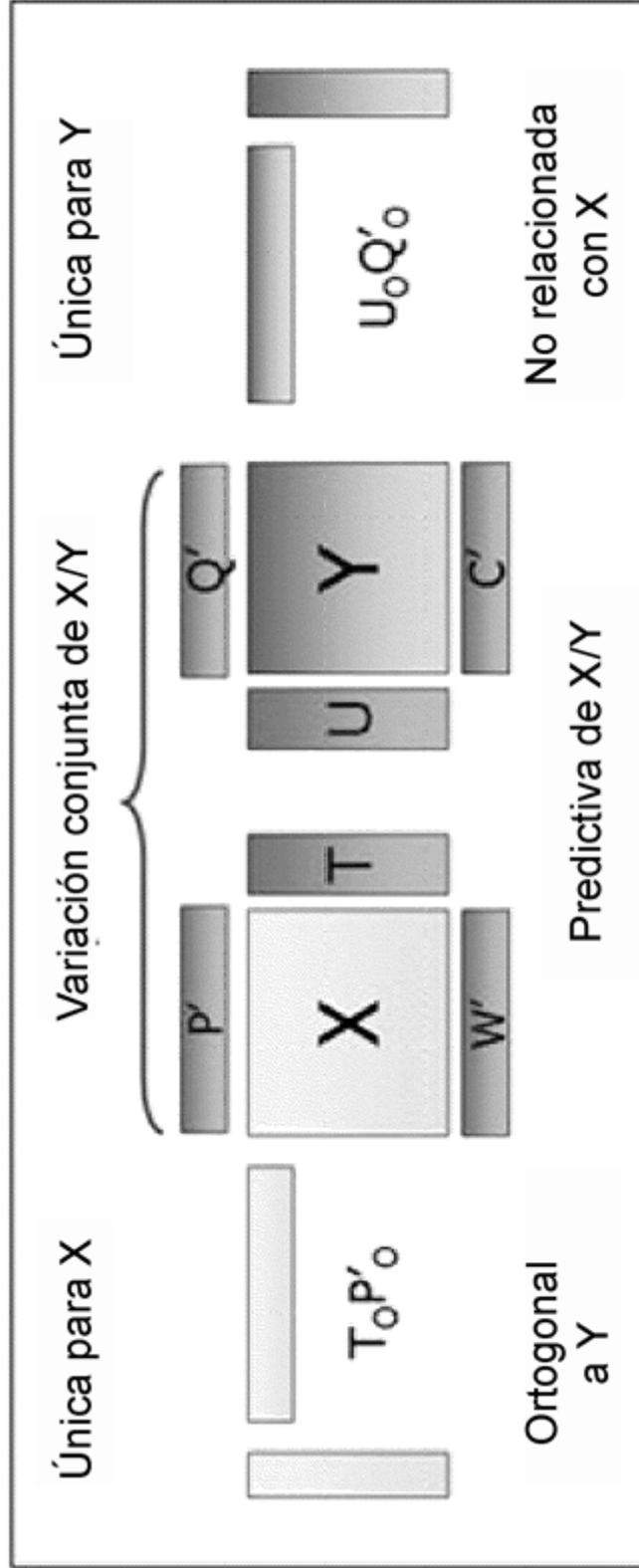


FIG. 30