



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**  
FACULTAD DE MEDICINA

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO CIRUJANO**

**TÍTULO:**

**ESTUDIO PILOTO SOBRE LAS DIFERENCIAS DE  
COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES FECALES ENTRE  
PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL Y SUJETOS  
CONTROL**

**VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS DIFFERENCES  
BETWEEN COLORECTAL CANCER AND CONTROL  
PATIENTS: A PILOT STUDY**

**ALUMNA**

**SHIRLEY MARIANNE LUYO AVALO**

**ASESORA**

**DRA. CLAUDIA MACHICADO RIVERO**

**LIMA-PERÚ  
2020**



## **Jurado**

ZELAYA ARTEAGA ELENA CRISTINA- Coordinador del Jurado

PINTO VALDIVIA JOSÉ LUIS- Profesor Calificador

ESPINOZA RÍOS JORGE LUIS- Profesor Calificador

**Asesora del trabajo de investigación**

Dra. Claudia Machicado Rivero

## Dedicatoria

A mis padres, Shirley y Steward

Por el amor y el apoyo

## Agradecimientos

Agradezco a mi asesora, la Dra. Claudia

Por la dura tarea de guiar a los que recién comenzamos

A la familia del Dr. Tejada Reátegui

Por su contribución a la familia herediana

A los doctores Eric y Alfredo que colaboraron en el desarrollo  
del proyecto

y a las personas que cooperaron en el transcurso del trabajo

## Declaración de la autora

La fuente de financiamiento del estudio fue la Beca de Medicina Francisco Tejada y Semiramis Reátegui del año 2016.

## Tabla de contenidos

|                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| <b>1. Introducción</b>               | <b>1</b>  |
| <b>2. Material y Métodos</b>         | <b>9</b>  |
| <b>3. Resultados</b>                 | <b>15</b> |
| <b>4. Discusión</b>                  | <b>19</b> |
| <b>5. Conclusiones</b>               | <b>23</b> |
| <b>6. Referencias Bibliográficas</b> | <b>24</b> |
| <b>7. Tablas, gráficos y figuras</b> | <b>32</b> |

Resumen. **Antecedentes.** La microbiota ha emergido como una herramienta complementaria a la medicina personalizada. Las técnicas de metabolómica podrían representar una nueva herramienta de tamizaje para el cáncer colorrectal. **Objetivo.** Comparar la abundancia de un grupo de compuestos volátiles orgánicos como los ácidos grasos de cadena corta (butirato, propionato y acetato) en pacientes con cáncer colorrectal y sujetos sin neoplasia. **Material y Métodos.** Las muestras de heces de adultos sin patología neoplásica (n=10) y adultos con cáncer colorrectal (n=12) fueron recolectadas en hospitales locales y analizadas. La cromatografía de gases y espectrometría de masas con microextracción en fase sólida fue utilizada para la identificación de VOCs. El análisis multivariado se realizó con PCA y se evaluó la significancia (ANOVA) de las masas más representativas que explicaban la mayor variabilidad de la diferencia entre pacientes con enfermedad neoplásica y no neoplásica. **Resultados.** El ácido butírico y el ácido propiónico fueron identificados ( $p < 0.05$ ). La abundancia relativa del ácido propiónico fue mayor en los controles que en los casos ( $p$ -valor  $< 0.05$ ). En el PCA, se mostró una tendencia a la separación entre casos y controles. **Conclusiones.** Los ácidos grasos de cadena corta, ácido butírico y ácido propiónico, se asocian al estado canceroso por lo que representan potenciales candidatos a marcadores diagnósticos.

Palabras clave: cáncer colorrectal, metabolómica, compuestos orgánicos volátiles, microbiota, cromatografía de gases, espectrometría de masas.

**Abstract. Background.** Microbiota has emerged as a complementary tool to personalized medicine. Metabolomics techniques could represent new screening tools and non-invasive diagnostic tests for colorectal cancer. **Objective.** To compare the abundance of a group of volatile organic compounds such as short chain fatty acids (butyrate, propionate, acetate) in colorectal cancer patients and non neoplasics patients in a local cohort. **Methods.** Feces samples from 22 patients were collected (cancer-free, n = 10; colorectal cancer, n = 12) at local hospitals and analyzed. Headspace solid-phase microextraction(SPME) in combination with GS-MS was performed to identify VOCs. Multivariate analysis was performed using PCA and we evaluated the significance (ANOVA) of the components which represented the most variability between the samples of colorectal cancer patients and non neoplasics patients. **Results.** Propionic acid and butyric acid were identified (p-value <0.05). The relative abundance of the propionic acid was greater in controls than in cases (p-value<0.05). PCA shows there is a tendency towards the separation between cases and controls. **Conclusions.** Short chain fatty acids, butyric acid and acetic acid, are associated to a cancer state which makes them potential candidates for diagnostic markers.

MeSH: Metabolomics, colorectal neoplasms, volatile organic compounds, mass spectrometry, chromatography gas.

## 1. Introducción

El cuerpo humano tiene aproximadamente  $3.0 \cdot 10^{13}$  de células humanas que coexisten con aproximadamente  $3.8 \cdot 10^{13}$  de células bacterianas cada una de ellas bajo una finamente organizada homeostasis entre el medio intracelular y el medio extracelular. Sin embargo, cuando los procesos biológicos encargados del buen funcionamiento celular se fragmentan, sobreviene la desregulación del organismo hacia el proceso de la enfermedad(1). La comunidad microbiana compuesta por bacterias, hongos, protistas y arquea que colonizan la barrera epitelial de todos los organismos multicelulares se denomina microbiota. El conjunto de genes de esta comunidad se denomina microbioma. La fuerza de la evolución que mantiene esta relación simbiótica se debe a que la microbiota influye en varios procesos vitales como la respuesta inmune, la acumulación del tejido graso, la descomposición de alimentos, la expresión de genes, la generación del tejido linfático adaptativo y mantenimiento de la homeostasis intestinal, entre otros(2). Como menciona Castello et al(3), *“El cuerpo humano puede ser visto como un ecosistema”*.

Particularmente, la microbiota más estudiada es la del sistema gastrointestinal. Existen entre 800-1000 especies diferentes de bacterias colónicas en condiciones fisiológicas; sin embargo cuatro phylum dominan el ecosistema: Firmicutes (Gram positivos) y Bacteroidetes (Gram negativos anaerobios) seguidos de Actinobacteria y Proteobacteria entre otras bacterias aún no cultivables(4). La homeostasis de la microbiota intestinal se asocia con el bienestar y la protección

contra enfermedades como por ejemplo, la biosíntesis de vitaminas K, B2, B12; el metabolismo de carbohidratos no digeridos, la regulación de la neurotransmisión y estados de estrés y ansiedad (5). La alteración de la estabilidad de la microbiota intestinal, también conocido como disbiosis, se asocia a diversas enfermedades como la encefalopatía hepática en pacientes cirróticos; la enfermedad inflamatoria intestinal; la obesidad, la resistencia a la insulina; y enfermedades neoplásicas como el cáncer colorrectal (6–8).

Alrededor del 15% de neoplasias en el mundo son atribuidas a agentes infecciosos(9). Los rasgos distintivos del cáncer o *hallmarks* , según Hanahan, explican la génesis tumoral basado en procesos biológicos subdivididos en iniciación, promoción y progresión durante su desarrollo(10). La microbiota del huésped podría influenciar en la carcinogénesis mediante mecanismos que incluyen (I) la alteración del balance entre proliferación y muerte celular; (II) la inducción de efectos proinflamatorios e inmunosupresores y (III) la influencia en el metabolismo del huésped (7). Por ejemplo, en estudios clínicos y preclínicos se ha encontrado que *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides fragilis* y *Escherichia coli pks+* productora de colibactina presentan una alta prevalencia en tejido tumoral de pacientes con cáncer colorrectal(11). Sin embargo, es difícil determinar la composición exacta de la microbiota asociada a los diversos tipos de neoplasias debido a que dependen de múltiples factores como la raza, la dieta, la edad, la genética, la población, el tratamiento antibiótico, la exposición a patógenos y el ciclo circadiano, entre otros(12,13)

El cáncer colorrectal (CRC) es el tercer cáncer más diagnosticado en el mundo, según el reporte de Globocan del 2018 de la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer–IARC(14). La incidencia y las tasas de mortalidad del CRC varían notablemente en el mundo. De acuerdo al sexo, el CRC es el tercer cáncer más diagnosticado en varones; y es el segundo, en las mujeres. Asimismo, es el segundo cáncer con mayor letalidad en ambos sexos. Las tasas de incidencia estandarizada por edades más altas se encuentran en Europa, Australia/Nueva Zelanda y América del Norte; y las tasas más bajas en África Occidental y el sur de Asia Central. Estas diferencias geográficas parecen ser atribuidas a las diferencias en las exposiciones alimentarias y ambientales que se imponen sobre un fondo de susceptibilidad genéticamente determinada. Además de programas de detección temprana establecidos en los países desarrollados(14).

En el Perú, según el Registro de Cáncer de Lima Metropolitana 2010 – 2012, elaborado por el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas(INEN) tanto en hombres como en mujeres, el CRC es el quinto cáncer más frecuente. El cáncer de colon representó el 5% de todas las neoplasias malignas y el 53.5 % de los casos se presentaron en mujeres (15).

La red de comunicación bacteriana gastrointestinal manifestada en los productos metabólicos es una aproximación al estudio de la función del microbioma. La metabolómica es el estudio de moléculas pequeñas o metabolitos presentes en muestras biológicas. Hay 114177 metabolitos identificados en el *Human Metabolome Database* provenientes de diversos tipos de bioespecímenes como

orina, sangre, leche materna, entre otros(16).

Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) son un sub grupo de metabolitos de bajo peso molecular producidos dentro de los procesos metabólicos normales y anormales en el cuerpo humano (VOCs endógenos) y sustancias absorbidas de la dieta en el sistema gastrointestinal o moléculas inhaladas (VOCs exógenos). Los VOCs poseen diferentes propiedades fisicoquímicas que varían de acuerdo a los factores internos y externos del huésped. Son liberados en la orina, heces, piel, saliva, aliento, sangre y sudor e incluyen aldehídos, alcoholes, alcanos, esterés, ácidos grasos y cetonas(17).

Los ácidos grasos de cadena corta, los compuestos de amonio y los ácidos grasos de cadena ramificada; los cofactores/vitaminas, aminoácidos y los ácidos biliares han sido estudiadas en su relación con el CRC(18). El análisis de los VOCs es posible mediante técnicas analíticas y permite la caracterización según tipo de cáncer, lo cual ayuda a elucidar las rutas bioquímicas alteradas(18,19). Bond et al. identificaron VOCs en pacientes con CRC a través de cromatografía de gases y espectrometría de masas como potenciales biomarcadores fecales(20).

Los ácidos grasos de cadena corta (SCFA, short chain fatty acids) son metabolitos que constan de cadenas de 1-6 átomos de carbono y que son producidos en la fermentación sacarolítica de las fibras dietéticas, a cargo de bacterias anaeróbicas, en el colon proximal. Los SCFA como el acetato (C2), propionato (C3) y butirato (C4) son la principal fuente de energía para el epitelio colónico y son producidos

de 50 a 100 mmol/L en un ratio molar de aproximadamente 60:20:20, respectivamente(21). Los SCFA son sustratos en la  $\beta$ -oxidación mitocondrial y el ciclo del ácido cítrico, generan ATP a través de su oxidación mitocondrial, modulan el metabolismo de carbohidratos y lípidos (gluconeogénesis y lipogénesis), mantienen la función de la barrera intestinal, presentan efectos antiinflamatorios y cruzan la barrera hematoencefálica para modular la neurotransmisión(22). Además, ejercen un efecto protector en el huésped contra patógenos y enfermedades infecciosas; por ejemplo, el butirato disminuye la expresión de 17 genes localizados en la Isla de patogenicidad 1 (SPI1) de *Salmonella enterica* y el acetato inhibe la translocación de EHEC 0157:H7 del lumen intestinal a la circulación sistémica(23,24). Con respecto a su metabolismo, el acetato es generado de manera ubicua por la mayoría de bacterias anaeróbicas del intestino. El propionato es formado a partir de la vía succinato por Bacteroidetes, la clase Negativicutes del phylum Firmicutes y *Akkermansia muciniphila*; y por la vía propanediol por Lachnospiraceae del phylum Firmicutes.(25). El butirato es generado por los clusters Clostridium IV y XIVa en el phylum Firmicutes que incluyen especies como *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale* y *Roseburia*, que a su vez constituyen el 5-10% del total de bacterias en heces de adultos sanos(26).

Los SCFA son VOCs ampliamente estudiados mediante metabolómica en muestras de heces, con fines preventivos, diagnósticos y terapéuticos en CRC(27). El butirato presenta actividad supresora tumoral en líneas de células neoplásicas. Las concentraciones de 5mmol/L de butirato modifican epigenéticamente la

expresión de genes reguladores de la proliferación celular o apoptosis(28). El propionato presenta un efecto anti proliferativo como ligando de GPR41 y GPR43 en células de CRC; asimismo, produce autofagia de células neoplásicas(29). Por el contrario, el acetato que se origina a partir de la oxidación de glucosa, glutamina o ácidos grasos y favorece la biosíntesis de macromoléculas como ácidos grasos, esteroides, amino ácidos y nucleótidos, regula la acetilación de histonas en células sanas y en distintos tipos de neoplasias como astrocitoma, oligodendroglioma , mama, ovario y pulmón. El acetato representa una fuente de energía para las células cancerosas como lo son la glucosa o la glutamina en el efecto Warburg, por lo que se argumenta que actúa como un oncometabolito(30).

Las bacterias productoras de SCFA como *Clostridium*, *Roseburia*, *Faecalibacterium* y *Bifidobacterium* se encuentran disminuidas en el CRC. Estudios previos han demostrado diferencias en la abundancia de ciertos SCFA entre sujetos sanos y pacientes con CRC(31,32). El butirato y propionato se encuentran en mayor cantidad en sujetos sanos mientras que el acetato es más abundante en CRC(20,31,33).

La espectrometría de masas y cromatografía de gases (GC-MS) a través de la microextracción en fase sólida (SPME) es una de las técnicas de extracción simples y de bajo costo que permiten investigar los VOCs en bioespecímenes. Ello permite obtener una huella característica de volátiles específicos en mezclas complejas como son las muestras humanas. Entre sus desventajas están la falta de un protocolo estandarizado para su uso, la variabilidad y la contaminación de los

VOCs. Algunos estudios de volatolómica han utilizado la técnica de GC-MS con SPME para el análisis de VOCs en muestras fecales, en busca de un biomarcador para el CRC(20,31).

La microbiota ha emergido como una herramienta complementaria a la medicina personalizada, contribuyendo con nuevos enfoques en la prevención, el diagnóstico y el tratamiento del cáncer(34). Por ejemplo, en prevención y diagnóstico temprano, sets de biomarcadores metabólicos y/o metagenómicos; en tratamiento, el trasplante fecal, la terapia “phage”, los probióticos y prebióticos(34). Actualmente el gold standard del diagnóstico del CRC es la colonoscopia, un procedimiento que por su naturaleza invasiva asociada a la falta de información e infraestructura adecuada, limita el diagnóstico oportuno en medios con bajos recursos. Las pruebas actuales de tamizaje no invasivo son el test de sangre oculta en heces (gFOBT) o la prueba inmunoquímica fecal (FIT)(35). Otras pruebas que detectan mutaciones de ADN (KRAS) en muestras de heces asociado a FIT presentan menor especificidad comparado con FIT según la evidencia(36). Considerando el potencial rol de la microbiota en la carcinogénesis, marcadores de diagnóstico temprano determinados por técnicas de metagenómica y/o metabólica microbiana podrían representar una nueva herramienta de tamizaje para el CRC.

### **1.1. Pregunta de investigación**

¿Existen diferencias detectables por GS-MS en la abundancia de butirato, propionato y acetato en muestras de heces de individuos sin neoplasia y pacientes

con CRC en una cohorte local?

## **1.2. Importancia del estudio**

La importancia de este estudio radica en el reconocimiento de potenciales marcadores diagnósticos en muestras de fácil colecta y conservación (heces), con una logística sencilla y aplicando una técnica precisa como la GC-MS.

## **1.3. Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo general.**

Comparar la abundancia de un grupo de ácidos grasos de cadena corta (butirato, propionato y acetato) en heces de pacientes con cáncer colorrectal y sujetos sin neoplasia, a través de GC-MS usando SPME, en una cohorte local.

### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Determinar la abundancia relativa de butirato, propionato y acetato mediante GS-MS.
- Asociar la existencia de butirato, propionato y acetato con el fenotipo de los participantes incluyendo la presencia de cáncer, la edad, el sexo, el índice de masa corporal y la localización del tumor.

## 2. Material y Métodos

### **2.1 Población de estudio**

La población del estudio estuvo compuesta por sujetos que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión y que no tuvieron ningún criterio de exclusión según se menciona a continuación:

#### **2.1.1 Criterios de inclusión**

Los criterios de inclusión para los casos eran los siguientes: individuos mayores de edad con cáncer colorrectal primario diagnosticado histopatológicamente; informe de colonoscopia especificando la localización anatómica del tumor: ascendente, descendente o transversal. Los criterios de inclusión para los controles fueron los siguientes: individuos mayores de edad, sanos o con enfermedad no neoplásica colónica o rectal.

#### **2.1.2 Criterios de exclusión**

Los criterios de exclusión para los casos fueron los siguientes: prueba no confirmatoria de cáncer y tratamiento con radioterapia o quimioterapia previo a la cirugía. Ambos grupos tenían como criterio de exclusión consumo de antibióticos dentro de los 2 meses previos a la participación en el estudio; desórdenes intestinales crónicos como enfermedad intestinal inflamatoria, intestino irritable, colitis ulcerativa, enfermedad celíaca; restricciones alimentarias como anorexia nervosa o bulimia y comorbilidades como hipertensión arterial o diabetes mellitus tipo 1 o 2.

La duración de la participación del paciente contempló únicamente el momento de recolección de muestra de heces el día del ingreso del paciente a los Servicios de

Cirugía. Luego de la firma del consentimiento, el investigador solicitó al paciente la colección de heces en un frasco estéril.

## **2.2 Lugar de Investigación**

El enrolamiento se realizó en el Servicio de Cirugía del Hospital Nacional Arzobispo Loayza (Lima) y en el Servicio de Cirugía del Hospital Cayetano Heredia (Lima). Se preservaron las muestras a  $-20^{\circ}\text{C}$  en el Laboratorio de Investigación Traslacional y Biología Computacional de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Las muestras se analizaron en el Laboratorio de Química Analítica de la Pontificia Universidad Católica del Perú. El análisis subsecuente de los datos se realizó con la ayuda del personal del Laboratorio del Instituto de Ciencias Ómicas y Biotecnología Aplicada (ICOBA) de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

## **2.3 Tamaño muestral**

La muestra del estudio es no probabilística o por conveniencia dado que no hay estudios en cohortes locales con CRC. La muestra es no representativa de los Servicio hospitalarios participantes por lo que los resultados no podrían ser extrapolados.

## **2.4 Bioespecímenes**

Las muestras fueron recolectadas en frascos estériles en el Servicio de Cirugía de los hospitales especificados y congeladas inmediatamente a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Luego los especímenes fueron transportados al Laboratorio de Investigación Traslacional y Biología Computacional de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia dentro de las 2 horas siguientes de

su colecta. Se registró en los frascos y posteriormente en el sistema, el día, la hora de la colección de la muestra y el código del paciente. La cantidad aproximada de heces recolectadas fue de 6 g. El procesamiento consistió en el trasvase de alícuotas con un peso de 4g a dos viales de espacio de cabeza (headspace) de 10ml (Supelco) cada uno y su posterior congelación a -20°C. No se realizó otra manipulación o preparación de la muestra.

Para el análisis de las muestras, se extrajeron los viales del congelador y se transportaron en cajas refrigeradas al Laboratorio de Química Analítica en la Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP).

### **2.5 Microextracción en Fase Sólida**

Se utilizaron fibras para la microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) para extraer los VOCs de las muestras biológicas. La fibra (Supelco) para SPME que fue utilizada en el procedimiento fue la siguiente: Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS). La fibra fue inyectada manualmente en el vial que contenía la muestra de heces, con la técnica de espacio de cabeza o headspace (en inglés) y expuesta por 20 minutos a una temperatura constante de 38°C, en condiciones estáticas, para absorber los volátiles. Las condiciones fueron controladas para asegurar su reproducibilidad.

### **2.6 Instrumentos para la GC-MS**

Las muestras fueron analizadas utilizando un espectrómetro de masas acoplado con un cromatógrafo de gases (GC-MS) modelo Agilent 7890B GC y 5977A MSD, de cuadropolo simple e ionización electrónica (EI) (Imagen 1). El equipo de GC-MS estuvo equipado con una columna capilar VF23ms (Agilent

Technologies) de 30m de largo, con un diámetro interno de 0.25mm y con un tamaño de partícula de 0.25  $\mu\text{m}$ . Este procedimiento se realizó en el Laboratorio de Química Analítica en la PUCP.

### **2.7 Condiciones de análisis: Medidas de GC MS/SPME**

El flujo del gas portador helio fue establecido en 1mL/min. El programa de temperatura fue 40°C isotérmico por 5 min, con gradiente de 10°C/min hasta 230°C isotérmico por 5 minutos. El tiempo total de cada lectura por GC-MS fue de 29 minutos. Se determinó ese tiempo después de realizar pruebas con el equipo y observar que no se encontraban señales después de 29 minutos. El espectrómetro de masas fue operado en modo de scan entre 35 – 450, con un voltaje electromultiplicador de 70 eV. La temperatura del inyector fue de 250°C, con la válvula de Split cerrada (modo splitless).

### **2.8 Obtención de los cromatogramas**

En primer lugar, la fibra SPME fue pre acondicionada antes de su uso, introduciéndola en el puerto del cromatógrafo de gases sin previa exposición a las muestras, con las mismas condiciones de análisis descritas en la sección 2.7, por 40 minutos de duración de pre acondicionamiento. Una vez finalizado el pre acondicionamiento, se inició la lectura de los especímenes introduciendo la fibra previamente expuesta a la muestra con la técnica de *headspace* descrita en la sección 2.5. Cabe remarcar que ni bien finalizó la impregnación de volátiles en la fibra por la técnica de *headspace*, la misma fue inmediatamente transferida al puerto de inyección del cromatógrafo de gases, para su desorción térmica. El tiempo transcurrido fue menor de 2 min. El análisis de muestras se realizó en

duplicado. No se obtuvo promedio de ambos cromatogramas ya que no se utilizaron standards químicos. Por lo tanto, cada muestra tuvo dos lecturas que fueron tratadas y analizadas independientemente.

## **2.9 Identificación de compuestos**

Los compuestos fueron identificados en base a los tiempos de retención (TRs) consultando la biblioteca de espectros de masas NIST (National Institute of Standards and Technology) Versión 2.0, 2011 y AMDIS Versión 2.71, 2012 (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System) seguido de una inspección manual-visual. Se consideró una probabilidad del 90% o más en NIST para la identificación tentativa de los compuestos.

## **2.10 Procesamiento de Datos y Análisis estadístico**

Se tabularon las principales características demográficas y clínicas de los participantes y se analizó las diferencias estadísticas por grupos etarios y por el IMC aplicando la prueba de Mann-Whitney. El análisis de datos volatolómicos se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la PUCP. Se utilizaron el software MS-DIAL v3.8 y MATLAB (R2019b). Los cromatogramas obtenidos del GC-MS con el formato “CDF” se extrajeron de ChemStation y se convirtieron al formato “Analysis Base File (ABF)”. Este proceso se ejecutó para el alineamiento de los cromatogramas y la normalización de los datos según el TIC (Total Ion Current) que son las áreas de cada pico o señal en los cromatogramas con MS-DIAL. Finalmente, se filtraron los datos con el análisis de componentes principales (PCA) y se evaluó la significancia (ANOVA) de las masas más representativas que explicaban la mayor varianza de aquellas

diferencias entre sujetos con y sin CRC, usando el software MATLAB. Se obtuvo la significancia estadística de la diferencia de los promedios de los tres SCFAs identificados en el grupo de casos y controles a través de la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

## **2.11 Aspectos Éticos**

El proyecto fue aprobado el 10 de diciembre del 2016 por el Comité de Ética de la UPOCH de acuerdo a la constancia 478-25-16. La aprobación del Comité de Ética de Investigación del Hospital Nacional Arzobispo Loayza fue obtenida el 16 de enero del 2017. La aprobación del Comité de Ética del Hospital Cayetano Heredia fue obtenida el 11 de Enero del 2018. El consentimiento informado, tanto para los casos como para los controles, precisó el propósito del estudio, las medidas de confidencialidad, los procedimientos a realizar según sea el caso; los riesgos y beneficios; el uso de la información obtenida a mediano plazo y los derechos del paciente. El formato de consentimiento informado aprobado se adjunta en el Anexo 1. No se contemplaron riesgos para la salud de los participantes ya que la toma de muestra de heces no amenaza el estado de salud de los individuos.

Toda la información obtenida en este estudio fue archivada físicamente en la historia clínica del paciente, la cual fue almacenada en el hospital y solo el médico y personal del estudio tuvieron acceso a los resultados de las pruebas. Se colectaron datos relevantes de los procedimientos especificados que fueron registrados electrónicamente utilizando un código alfa numérico en lugar del nombre del paciente. Estos registros electrónicos fueron almacenados en un ordenador encriptado protegido con una contraseña. La clave de la vinculación del nombre del participante y su respectivo código de estudio se almacenaron por

separado. Los participantes no serán identificados en ningún informe o publicación de este estudio.

### **3. Resultados**

#### **3.1 Población de estudio**

Se enrolaron 12 pacientes con diagnóstico histopatológico reciente de cáncer colorrectal primario y 10 individuos que no presentaban enfermedad neoplásica colónica o rectal (Tabla 1). El enrolamiento ocurrió abril del 2017 y agosto del 2018. El 45.4% de individuos fueron varones y 54.5% fueron mujeres. La edad media de los casos fue mayor (65 años) en comparación con la de los controles (47 años), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p$ -valor $<0.05$ ). La mayoría de participantes (77.2%) se enrolaron en el Servicio de Cirugía del Hospital Nacional Arzobispo Loayza (Lima) y el resto (22.7%) en el Servicio de Cirugía del Hospital Cayetano Heredia (Lima).

Los casos presentaron un IMC menor (21.4) que el de los controles (25.1), siendo esta diferencia significativa ( $p$ -valor $< 0.05$ ). Así, los pacientes con CRC tuvieron un IMC promedio normal a diferencia de los controles cuyo IMC fue considerado como sobrepeso (Tabla 1). La localización tumoral en colon proximal fue la predominante (66.6%), seguida del distal (16.6%) y rectal (16.6%).

#### **3.2 Volatiloma fecal**

Un total de 13775 compuestos fueron detectados en las muestras biológicas de pacientes con CRC y controles. En promedio, se identificaron 299 compuestos

(SD±52.98) en el grupo con CRC y 328 compuestos (SD±19.1) en el grupo control. En el Figura 1, se muestran dos cromatogramas obtenidos de un caso y de un control, respectivamente, donde se aprecian las señales emitidas durante los 29 minutos de análisis. De los 13775 compuestos, el 0.1% (26 compuestos) resultaron significativos (p-valor<0.05) en ambos grupos. Es decir, éstos 26 compuestos con nivel de confianza del 95% explicaron la mayor variabilidad de datos de toda la población, de los cuales dos fueron identificados con la biblioteca NIST (probabilidad > 90%), mientras que el resto carecían de identificación estructural y/o presentaban una concordancia con una probabilidad <90% (Tabla 2). Los compuestos identificados fueron ácido propiónico y ácido butírico. La media de la abundancia relativa del ácido propiónico fue  $0.0611 \pm 0.007$  en los controles y  $1.21E-02 \pm 0.002$  en los casos, es decir, un 80% menos abundante en los casos que en los controles. Así mismo, la media de la abundancia relativa del ácido butírico fue  $0.0028 \pm 0.0003$  en los controles y  $1.04E-03 \pm 0.0001$  en los casos, es decir, un 63% menos abundante en los casos que en los controles. Por otro lado, el ácido acético presentó una abundancia relativa de  $0.0002 \pm 0.00002$  en los controles y  $0.0011 \pm 0.0001$  en los casos, lo cual muestra que fue más abundante en un 81% en los casos que en los controles. También resultó ser un compuesto significativo (p-valor<0.05); sin embargo, no cumplió el criterio de concordancia en la identificación de compuestos resultando una probabilidad <90% en la biblioteca NIST.

### **3.3 Análisis de Componentes Principales (PCA) en función del diagnóstico de CRC**

Con la finalidad de observar la distribución de los VOCs en función del diagnóstico de CRC, se realizó un PCA agrupando a los sujetos en controles o casos. El PCA (Figura 3) mostró una tendencia a la separación entre casos y controles según el segundo componente principal (PC 2). Se observa que la mayoría de casos están entre los cuadrante II y III, a excepción de dos casos que tienden a agruparse con los controles (Figura 3). De la misma manera, existen tres controles que se encuentran en los cuadrantes mencionados donde predominan casos.

### **3.4 VOCs estadísticamente significativos**

Para identificar los compuestos que contribuyeron a la separación de los casos y los controles en el PCA, se trazó un Loading Plot (Figura 4). De los 26 compuestos enlistados en la Tabla 2, la presencia de 10 VOCs fue significativa ( $p$ -valor $<0.05$ ) para los casos (I cuadrante); mientras que, la presencia de 16 VOCs lo fue para los controles. Se utilizó la base de datos AMDIS para identificar estos VOCs a partir de sus tiempos de retención y espectros de masas. Solamente dos VOCs obtuvieron una concordancia mayor al 90% en la biblioteca NIST y fueron ácido butírico y ácido propiónico. Estos dos compuestos se hallan en el I cuadrante del Loading Plot en relación con los pacientes con CRC, es decir, podrían considerarse potenciales biomarcadores diagnósticos.

El tiempo de retención (TR) de 12.707 min correspondería al ácido butírico corroborado en la base de NIST  $> 90\%$ . La presencia de este SCFA es significativa en los casos y está graficada en el I cuadrante del Loading Plot (Figura 4). Asimismo, se graficó el promedio de las áreas normalizadas del ácido

butírico en las 22 muestras (44 lecturas) donde se observó una mayor abundancia del ácido butírico en los controles; sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa entre los casos y controles ( $p$ -valor  $< 0.05$ ) (Figura 5).

El TR de 11.55 min correspondería al ácido propiónico (NIST  $> 90$  %) y de igual manera se halla en el I cuadrante del Loading Plot (Figura 2). Se graficó el promedio de las áreas normalizadas del ácido propiónico en las 22 muestras (44 lecturas) donde se observó una mayor abundancia del ácido propiónico en los controles en comparación con los casos ( $p$ -valor $<0.01$ ) (Figura 6).

Por otro lado, el TR de 10.556 min corresponde tentativamente a ácido acético y se encuentra graficada en el II cuadrante, es decir, en asociación a los controles (Figura 4). De la misma manera, se realizó una gráfica del promedio de las áreas normalizadas en las 22 muestras donde se observa una mayor abundancia de ácido acético en los casos en comparación con los controles ( $p$ -valor $<0.05$ ) (Figura 7). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, presentó una concordancia de 80%-90% en NIST, por debajo del nivel exigido en este estudio ( $>90\%$ ), por lo que no se confirmó con suficiente confianza su presencia en las muestras analizadas.

### **3.5 Análisis de Componentes Principales según las características generales de la población**

No se encontró agrupación en el PCA por IMC, género o edad (Figuras 8-10). Según la localización neoplásica, se identificó una agrupación entre los puntos correspondientes a colon transversal y sigmoideos en el III cuadrante mientras que

colon descendente y rectal en el II cuadrante. La distribución de colon ascendente está dispersa entre el I y III cuadrante (Figura 11).

#### 4. Discusión

Estudios previos han demostrado la capacidad de obtener un perfil metabólico único característico del CRC basado en diversas moléculas de bajo peso molecular (19) . En el presente estudio, el perfil de VOCs de muestras fecales humanas fue determinado mediante GC-MS con el objetivo de identificar marcadores candidatos del CRC con miras a emplearse como una potencial prueba diagnóstica no invasiva de CRC.

El análisis del volatilo fecal reveló que, comparados con los controles, los casos tuvieron una menor abundancia de ácido butírico y ácido propiónico, lo cual coincide con hallazgos previos (13,31). Estos SCFAs son productos de la fermentación sacarolítica de las fibras dietéticas, a cargo de las bacterias anaeróbicas y son utilizados por el epitelio colónico como fuente de energía. Una abundancia relativa alta de butirato y propionato, como las que se observan en sujetos sanos, tienen un efecto anti-tumorigénico en el epitelio colónico, que inducen la apoptosis y la autofagia de células neoplásicas (27).

Estos resultados son consistentes con estudios previos y se relacionan con los factores dietéticos de riesgo para CRC incluyendo una dieta baja en fibra que conllevaría a niveles reducidos de los SCFAs “protectores” (buritato, propionato)

y al aumento de los metabolitos potencialmente asociados a carcinogénesis como los ácidos biliares secundarios(13,32).

De hecho, se sostiene que el butirato reduce el riesgo de CRC(37). Sus rutas metabólicas alteradas se asocian con la vulnerabilidad de las células colónicas a transformarse en células tumorales, a través del efecto Warburg que modifica el metabolismo aerobio (13).

La presencia de un compuesto con TR 10.556 min que tentativamente correspondería al ácido acético fue estadísticamente significativa en las muestras; sin embargo, no pudo identificarse con suficiente confianza por NIST <90%. El ácido acético es una de las fuentes de energía de las células colónicas y modula el metabolismo de carbohidratos y lípidos. Una mayor abundancia relativa de este SCFA en los casos explica que también actúa como un oncometabolito, es decir, como fuente de energía para las células tumorales y cuyos niveles incrementan en el CRC (18).

El análisis de componentes principales sugiere que los perfiles metabólicos entre los pacientes con CRC y controles son diferentes. Esta diferencia está basada en un grupo de 26 VOCs, que incluyen ácidos propiónico y butírico. Sin embargo se observó un solapamiento de metabolitos entre casos y controles, lo cual puede explicarse por el hecho de que algunos controles del estudio son sujetos no sanos, por lo que es posible la existencia de metabolitos comunes con CRC. Por ejemplo, en el PC1 (Figura 3) dos puntos pertenecientes a los casos se presentan en el I

cuadrante donde predominan los controles. Ambos puntos pertenecen a la misma muestra de un paciente de 54 años con cáncer de colon derecho. Por otro lado, 2 puntos que pertenecen a la misma muestra control se encuentran en el cuadrante II con los casos. Dicho control correspondía a una paciente de 70 años con diagnóstico de colecistitis aguda. Asimismo, 1 punto control se encuentra en el IV cuadrante agrupada con algunos casos. Dicha lectura correspondía a un paciente de 38 años con colecistitis aguda. Dado que virtualmente cualquier enfermedad puede alterar el microbioma y en consecuencia, el perfil metabólico fecal, en futuros estudios deberían reclutarse personas sanas como controles.

Así como existen diferencias moleculares, genéticas y epidemiológicas, según la localización de CRC (lado derecho o izquierdo), se postula que las rutas metabólicas también son distintas. Estudios previos encontraron que la trimetiletina, el indoxil sulfato y la anserina permiten la discriminación entre ambos tipos(38)Por otro lado, Ohigashi et al concluyó que no había diferencia en la concentración de los ácidos orgánicos según las localización del CRC(33). En nuestro estudio, valores pertenecientes a colon descendente y rectal (lado izquierdo) se agruparon en un mismo cuadrante; sin embargo, la distribución para el colon derecho no se discrimina claramente.

El PCA según el grupo etario, el IMC y el género sugiere que la distribución de los VOCs no varía en función del fenotipo mencionado. (Figuras 9, 10 y11). Este hallazgo se contrasta con trabajos previos como el de Zierer et al, quienes encontraron una asociación entre el IMC y el volatiloма fecal en una cohorte de

paciente sanos(39). Nuevamente, nuestros individuos controles no eran sujetos sanos por lo que ello influiría en los hallazgos del presente trabajo.

En nuestro estudio, utilizamos la técnica de GC-MS-SPME debido a su reconocida utilidad en metabolómica y a su facilidad de uso y calidad no invasiva. Se priorizó la simplicidad tanto de la recolección como del análisis de muestras. Cabe resaltar que se utilizó una columna distinta a las empleadas en estudios previos y, a pesar de ello, obtuvimos resultados similares a otros como el de la mayor abundancia de propionato y butirato en controles. Nuestro principal interés es hacer uso de técnicas sencillas y no invasivas que en un futuro puedan ser empleadas para el diagnóstico y pronóstico del CRC, que complementen a la colonoscopia.

Diversos factores como la edad, la dieta, el género, los antibióticos moldean la microbiota y su metabolismo lo que se traduce en la emisión de un perfil metabólico particular de los diferentes fluidos humanos. Debido a esto, surge la importancia de ejercer un análisis crítico individual y poblacional en nuestra región. En Latinoamérica, los estudios dedicados a metabolómica y microbioma son escasos(40). El presente trabajo contribuye a este conocimiento en nuestra región y en un país donde el CRC ocupa el quinto puesto en incidencia (15). En un futuro, cada región tendría que evaluar el microbioma de sus comunidades para aplicar una medicina personalizada más exitosa.

Las limitaciones del estudio son las siguientes: el tamaño muestral fue no representativo y pequeño, asimismo no estuvo pareado por edades; los datos de 2

pacientes reclutados (2 casos) no estuvieron completos en las categorías de IMC y estadiaje; los sujetos control del estudio no eran personas sanas y por último el procedimiento GC-MS-SPME aún no está estandarizado para la detección de VOCs asociados a CRC.

A continuación se exponen algunas recomendaciones a tener en cuenta para futuros estudios:

- Incrementar el tamaño muestral para mejorar la representatividad de los casos y controles.
- Considerar el uso de estándares de los VOCs de interés con el fin de estimar cuantitativamente su abundancia en las muestras.
- Estudiar condiciones precancerosas como pólipos y diferentes estadios del CRC.

## **5. Conclusiones**

Los resultados de este estudio piloto determinaron que la baja abundancia relativa de ácido propiónico se asocia al estado canceroso (CRC) por lo que representa un potencial candidato a marcadores de diagnóstico. La distribución de VOCs no parece explicarse según la edad, género o IMC. Demostramos que GC-MS-SPME es una técnica analítica sencilla y no invasiva para la determinación de VOCs, que podría emplearse en la detección del CRC.

## 6. Referencias Bibliográficas

1. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biol* [Internet]. 2016 Aug 19 [cited 2020 Mar 13];14(8):e1002533. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.1002533>
2. Bouskra D, Brézillon C, Bérard M, Werts C, Varona R, Boneca IG, et al. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature* [Internet]. 2008 Nov 5 [cited 2019 Jul 20];456(7221):507–10. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature07450>
3. Costello EK, Stagaman K, Dethlefsen L, Bohannan BJM, Relman DA. The application of ecological theory toward an understanding of the human microbiome. *Science* [Internet]. 2012 Jun 8 [cited 2018 Nov 22];336(6086):1255–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22674335>
4. Consortium THMP, Huttenhower C, Gevers D, Knight R, Abubucker S, Badger JH, et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* [Internet]. 2012 Jun 13 [cited 2019 Jul 24];486(7402):207–14. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature11234>
5. Clarke G, Grenham S, Scully P, Fitzgerald P, Moloney RD, Shanahan F, et al. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol*

- Psychiatry [Internet]. 2013 Jun 12 [cited 2019 Jul 20];18(6):666–73.  
Available from: <http://www.nature.com/articles/mp201277>
6. Bajaj JS, Heuman DM, Hylemon PB, Sanyal AJ, White MB, Monteith P, et al. Altered profile of human gut microbiome is associated with cirrhosis and its complications. *J Hepatol* [Internet]. 2014 May [cited 2019 Jul 22];60(5):940–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24374295>
  7. Garrett WS. Cancer and the microbiota. *Science* [Internet]. 2015 Apr 3 [cited 2019 Jul 22];348(6230):80–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25838377>
  8. Machiels K, Joossens M, Sabino J, De Preter V, Arijs I, Eeckhaut V, et al. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* [Internet]. 2014 Aug [cited 2019 Jul 22];63(8):1275–83. Available from: <http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2013-304833>
  9. Plummer M, de Martel C, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Franceschi S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Heal* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2019 Aug 13];4(9):e609-16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27470177>
  10. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* [Internet]. 2011 Mar 4 [cited 2018 Oct 28];144(5):646–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>
  11. Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, Dreolini L, Krzywinski M, Strauss

- J, et al. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res* [Internet]. 2012 Feb 1 [cited 2019 Oct 10];22(2):299–306. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22009989>
12. Mehta RS, Abu-Ali GS, Drew DA, Lloyd-Price J, Subramanian A, Lochhead P, et al. Stability of the human faecal microbiome in a cohort of adult men. *Nat Microbiol* [Internet]. 2018 Mar 15 [cited 2019 Oct 14];3(3):347–55. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41564-017-0096-0>
  13. Ocvirk S, Wilson AS, Posma JM, Li J V, Koller KR, Day GM, et al. A prospective cohort analysis of gut microbial co-metabolism in Alaska Native and rural African people at high and low risk of colorectal cancer. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2019 Dec 18 [cited 2020 Jan 16]; Available from: <https://academic.oup.com/ajcn/advance-article/doi/10.1093/ajcn/nqz301/5680465>
  14. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2019 Oct 4];68(6):394–424. Available from: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21492>
  15. Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. Registro de Cáncer de Lima Metropolitana.2010-2012 [Internet]. [cited 2019 Oct 5]. Available from: [http://www.inen.sld.pe/portal/documentos/pdf/banners\\_2014/2016/Registro](http://www.inen.sld.pe/portal/documentos/pdf/banners_2014/2016/Registro)

de Cáncer Lima Metropolitana 2010 - 2012\_02092016.pdf

16. Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, Guo AC, Liang K, Vázquez-Fresno R, et al. HMDB 4.0: The human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 2018 Jan 1;46(D1):D608–17.
17. Mansurova M, Ebert BE, Blank LM, Ibáñez AJ. A breath of information: the volatilome. *Curr Genet.* 2018 Aug 1;64(4):959–64.
18. Zhang F, Zhang Y, Zhao W, Deng K, Wang Z, Yang C, et al. Metabolomics for biomarker discovery in the diagnosis, prognosis, survival and recurrence of colorectal cancer: A systematic review. Vol. 8, *Oncotarget.* Impact Journals LLC; 2017. p. 35460–72.
19. Martín-Blázquez A, Díaz C, González-flores E, franco-Rivas D, Jiménez-Luna C, Melguizo C, et al. Untargeted Lc-HRMS-based metabolomics to identify novel biomarkers of metastatic colorectal cancer. [cited 2020 Jan 13]; Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55952-8>
20. Bond A, Greenwood R, Lewis S, Corfe B, Sarkar S, O’Toole P, et al. Volatile organic compounds emitted from faeces as a biomarker for colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2019 Apr [cited 2020 Jan 18];49(8):1005–12. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/apt.15140>
21. Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* [Internet]. 1987 Oct [cited 2019 Jul 14];28(10):1221–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3678950>
22. Dalile B, Van Oudenhove L, Vervliet B, Verbeke K. The role of short-

- chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2019 May 23 [cited 2019 Jul 13];1. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41575-019-0157-3>
23. Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Hautefort I, Thompson A, et al. Butyrate Specifically Down-Regulates Salmonella Pathogenicity Island 1 Gene Expression. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2019 Jul 14];72(1):946–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16391141>
  24. Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* [Internet]. 2011 Jan 26 [cited 2019 Jul 14];469(7331):543–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature09646>
  25. Reichardt N, Duncan SH, Young P, Belenguer A, McWilliam Leitch C, Scott KP, et al. Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *ISME J* [Internet]. 2014 Jun 20 [cited 2019 Jul 14];8(6):1323–35. Available from: <http://www.nature.com/articles/ismej201414>
  26. McNabney S, Henagan T. Short Chain Fatty Acids in the Colon and Peripheral Tissues: A Focus on Butyrate, Colon Cancer, Obesity and Insulin Resistance. *Nutrients* [Internet]. 2017 Dec 12 [cited 2019 Jun 14];9(12):1348. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29231905>
  27. O’Keefe SJD. Diet, microorganisms and their metabolites, and colon

- cancer. Vol. 13, Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology. Nature Publishing Group; 2016. p. 691–706.
28. Donohoe DR, Collins LB, Wali A, Bigler R, Sun W, Bultman SJ. The Warburg Effect Dictates the Mechanism of Butyrate-Mediated Histone Acetylation and Cell Proliferation. *Mol Cell*. 2012 Nov 30;48(4):612–26.
  29. Tang Y, Chen Y, Jiang H, Robbins GT, Nie D. G-protein-coupled receptor for short-chain fatty acids suppresses colon cancer. *Int J Cancer* [Internet]. 2011 Feb 15 [cited 2019 Jul 19];128(4):847–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20979106>
  30. Lyssiotis CA, Cantley LC. Acetate fuels the cancer engine. *Cell* [Internet]. 2014 Dec 18 [cited 2019 Jul 12];159(7):1492–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25525870>
  31. Weir TL, Manter DK, Sheflin AM, Barnett BA, Heuberger AL, Ryan EP. Stool Microbiome and Metabolome Differences between Colorectal Cancer Patients and Healthy Adults. White BA, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Aug 6 [cited 2020 Jan 16];8(8):e70803. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0070803>
  32. Ou J, Carbonero F, Zoetendal EG, Delany JP, Wang M, Newton K, et al. Diet, microbiota, and microbial metabolites in colon cancer risk in rural Africans and African Americans 1-4. [cited 2020 Jan 18]; Available from: <https://academic.oup.com/ajcn/article-abstract/98/1/111/4578311>
  33. Ohigashi S, Sudo K, Kobayashi D, Takahashi O, Takahashi T, Asahara T, et al. Changes of the intestinal microbiota, short chain fatty acids, and fecal pH in patients with colorectal cancer. *Dig Dis Sci*. 2013 Jun

- 11;58(6):1717–26.
34. Saus E, Iraola-Guzmán S, Willis JR, Brunet-Vega A, Gabaldón T. Microbiome and colorectal cancer: Roles in carcinogenesis and clinical potential. *Mol Aspects Med* [Internet]. 2019 May [cited 2019 Jul 17]; Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098299719300329>
  35. Robertson DJ, Lee JK, Boland CR, Dominitz JA, Giardiello FM, Johnson DA, et al. Recommendations on fecal immunochemical testing to screen for colorectal neoplasia: a consensus statement by the US Multi-Society Task Force on colorectal cancer. *Gastrointest Endosc* [Internet]. 2017 [cited 2020 Apr 30];85(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gie.2016.09.025> [www.giejournal.org](http://www.giejournal.org)
  36. Lopes G, Stern MC, Temin S, Sharara AI, Cervantes A, Costas-Chavarri A, et al. Early Detection for Colorectal Cancer: ASCO Resource-Stratified Guideline. *J Glob Oncol*. 2019 Nov 25;(5):1–22.
  37. Bird AR, Brown IL, Topping DL. Resistant Starches 25 *Curr Opin Clin Nutr Metab* [Internet]. Vol. 1, Issues Intest. Microbiol. 2000 [cited 2020 Mar 9]. Available from: [www.caister.com/bacteria-plant](http://www.caister.com/bacteria-plant)
  38. Deng K, Han P, Song W, Wang Z, Zhang F, Xie H, et al. Plasma metabolomic profiling distinguishes right-sided from left-sided colon cancer. *Clin Chim Acta*. 2018 Dec 1;487:357–62.
  39. Zierer J, Jackson MA, Kastenmüller G, Mangino M, Long T, Telenti A, et al. The fecal metabolome as a functional readout of the gut microbiome. *Nat Genet*. 2018 Jun 1;50(6):790–5.

40. Cala M, Aldana J, Sánchez J, Guio J, Meesters RJW. Urinary metabolite and lipid alterations in Colombian Hispanic women with breast cancer: A pilot study. *J Pharm Biomed Anal.* 2018 Apr 15;152:234–41.

**Imagen 1. Se muestra el equipo de Cromatografía de Gases acoplada a masas (GC-MS) empleado en el estudio.**



**Tabla 1. Características demográficas y clínicas de la población de estudio. Espacios en blanco no aplican para el grupo de controles.**

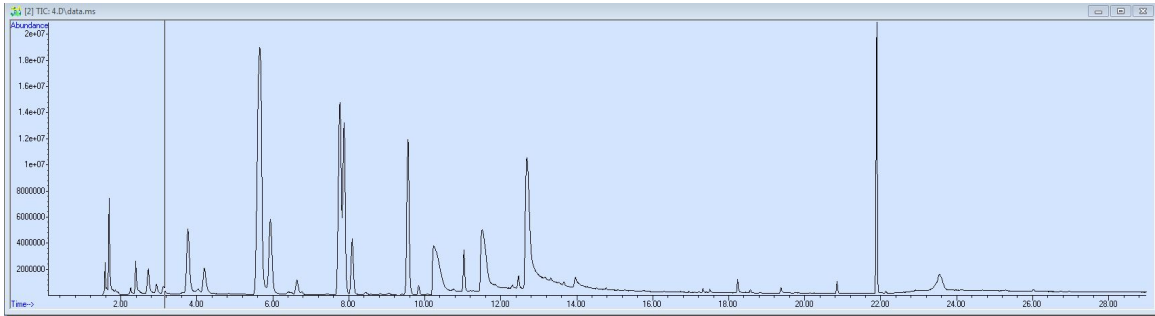
| ID    | Status   | Sexo      | Edad | IMC   | Estadíaaje | Localización del Tumor |
|-------|--|-----------|------|-------|------------|------------------------|
| CRC1  | Cancer Colorrectal                                       | Masculino | 54   | 21.5  | II         | Ascendente             |
| CRC2  | Cancer Colorrectal                                       | Femenino  | 59   | 22    | II         | Ascendente             |
| CRC3  | Cancer Colorrectal                                       | Femenino  | 62   | 15.8  | I          | Transverso             |
| CRC4  | Cancer Colorrectal                                       | Masculino | 61   | 22.3  | II         | Descendente            |
| CRC5  | Cancer Colorrectal                                       | Masculino | 65   | 21.5  | IV         | Transverso             |
| CRC6  | Cancer Colorrectal                                       | Masculino | 83   | 22    | III        | Rectal                 |
| CRC7  | Cancer Colorrectal                                       | Femenino  | 85   | 20,01 | IV         | Sigmoides              |
| CRC8  | Cancer Colorrectal                                       | Femenino  | 79   | 19.2  | IV         | Ascendente             |
| CRC9  | Cancer Colorrectal                                       | Masculino | 54   | 25    | III        | Rectal                 |
| CRC10 | Cancer Colorrectal                                       | Masculino | 74   | 23.2  | II         | Ascendente             |
| CRC11 | Cancer Colorrectal                                       | Femenino  | 46   | N.D   | N.D        | Ascendente             |
| CRC12 | Cancer Colorrectal                                       | Femenino  | 60   | N.D.  | N.D        | Ascendente             |
| H1    | Colecistitis Aguda                                       | Masculino | 49   | 24.3  |            |                        |
| H2    | Fistula Perineal/Hemorroides internas grado III          | Masculino | 36   | 25.5  |            |                        |
| H3    | Diverticulitis Aguda Hinchey II                          | Masculino | 37   | 23.9  |            |                        |
| H4    | Fistula recto vaginal/Hemorroides Grado I/Diverticulosis | Femenino  | 69   | 24.5  |            |                        |
| H5    | Hernia Inguinal Derecha Indirecta                        | Masculino | 64   | 24.8  |            |                        |
| H6    | Hernia inguinal izquierda                                | Femenino  | 46   | 28.6  |            |                        |
| H7    | Colecistitis Aguda                                       | Femenino  | 70   | 25.8  |            |                        |
| H8    | Apendicitis Aguda  | Femenino  | 24   | 24    |            |                        |
| H9    | Apendicitis Aguda  | Femenino  | 36   | 23.2  |            |                        |
| H10   | Colecistitis Aguda                                       | Femenino  | 38   | 26.7  |            |                        |

**Tabla 2. Características demográficas y clínicas de la población de estudio.**

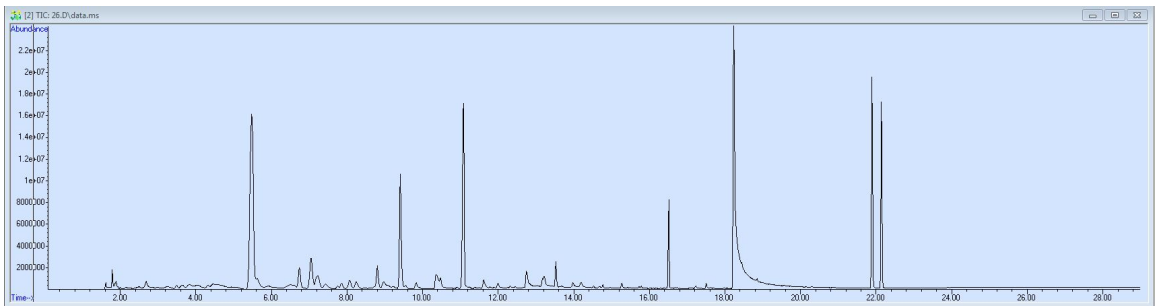
|                             | Casos       | Controles   | p-valor* |
|-----------------------------|-------------|-------------|----------|
| Sexo, n (%)                 |             |             |          |
| Masculino                   | 6 (50)      | 4 (40)      |          |
| Femenino                    | 6 (50)      | 6 (60)      |          |
| Edad, años                  |             |             |          |
| Media (SD)                  | 63.1(±13.9) | 47.2(±15.6) | p<0.05   |
| Rango                       | 46-83       | 24-70       |          |
| IMC (SD)                    |             |             |          |
| Media (SD)                  | 21.4(±1.5)  | 25.1(±2.6)  | p<0.001  |
| Rango                       | 15.8-25.04  | 23.2-26.7   |          |
| Localización Tumoral, n (%) |             |             |          |
| Colon proximal              | 8 (66.6)    |             |          |
| Colon distal                | 2(16.6)     |             |          |
| Recto                       | 2(16.6)     |             |          |
| Estadíaje,n (%)             |             |             |          |
| Temprana (1-2)              | 5(41.6)     |             |          |
| Tardía (3-4)                | 5(41.6)     |             |          |
| No conocida                 | 2(16.6)     |             |          |

\*Prueba de Mann-Whitney

**Figura 1 Cromatogramas obtenidos por GC-MS del control H2 y del caso CRC4.** En el eje X se grafica el tiempo de retención (min) y en el eje Y, la abundancia relativa



**Cromatograma del Control H2**

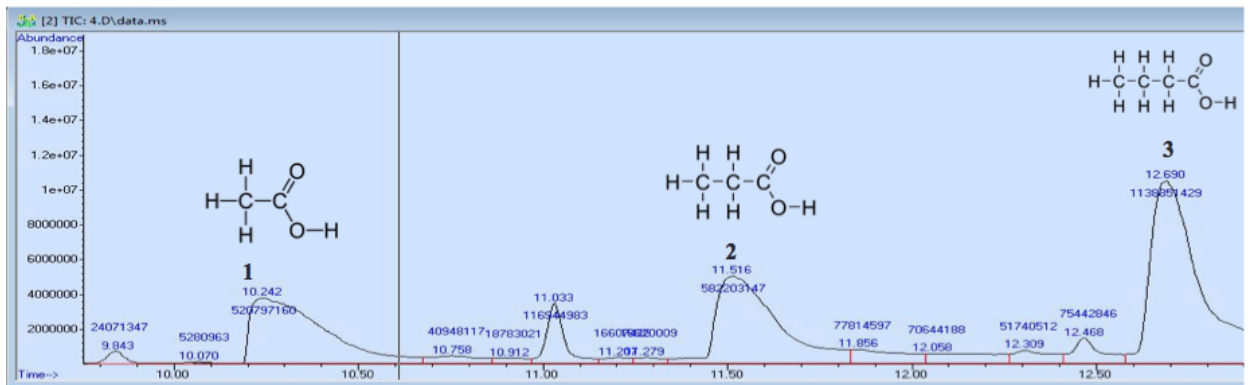


**Cromatograma del Caso CRC4**

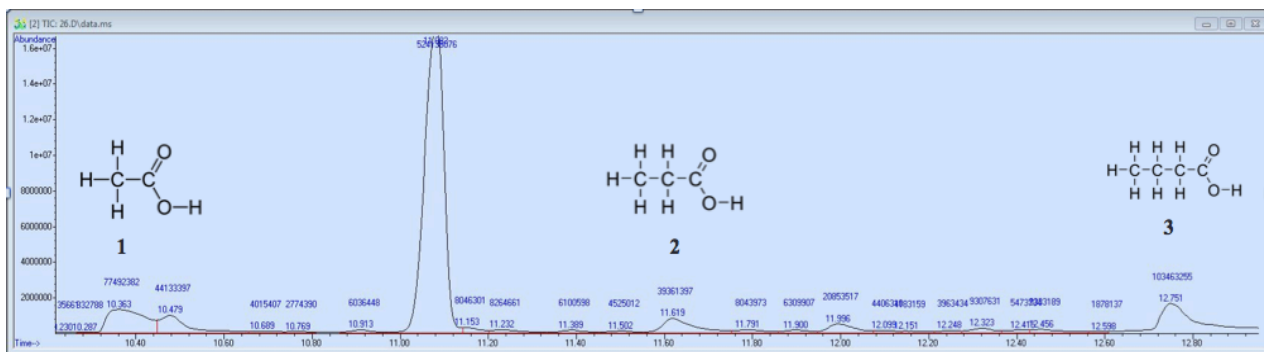
**Tabla 2 Compuestos identificados por GC-MS en las muestras de estudio ( $p < 0.05$ ). Se presentan en orden por el TR, de menor a mayor. El metabolito número 9 corresponde al ácido propiónico y el número 14 corresponde al ácido butírico. PC1 es la componente principal 1 PC2 es la componente principal 2.**

|           | TR<br>promedio(min) | p-Anova            | log(p)              | PC1                | PC2                |
|-----------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| 1         | 1.714               | 0.003878069        | -2.411384436        | 0.22938447         | -0.228984495       |
| 2         | 1.73                | 0.002265088        | -2.644914853        | 0.24567889         | -0.173493          |
| 3         | 1.739               | 0.005656539        | -2.247449199        | 0.216231866        | -0.252627719       |
| 4         | 3.129               | 0.001105884        | -2.956290281        | 0.210836733        | -0.195100876       |
| 5         | 3.142               | 0.003569933        | -2.447339938        | 0.242837171        | -0.21399901        |
| 6         | 3.449               | 0.004018112        | -2.395977998        | -0.114056343       | 0.063489578        |
| 7         | 9.939               | 0.000552135        | -3.257954891        | -0.194852619       | -0.018647282       |
| 8         | 10.556              | 9.85375E-05        | -4.006398497        | -0.189161397       | 0.074892405        |
| <b>9</b>  | <b>11.55</b>        | <b>0.001526468</b> | <b>-2.816312234</b> | <b>0.231716074</b> | <b>0.142720382</b> |
| 10        | 11.559              | 0.003780974        | -2.422396347        | 0.222843965        | 0.189670678        |
| 11        | 12.527              | 0.00657463         | -2.182128687        | 0.14965484         | 0.246513457        |
| 12        | 12.638              | 0.00844414         | -2.073444567        | 0.225460506        | 0.139471771        |
| 13        | 12.695              | 0.003228507        | -2.490998313        | 0.168626934        | 0.246674868        |
| <b>14</b> | <b>12.707</b>       | <b>0.008088099</b> | <b>-2.092153522</b> | <b>0.216479578</b> | <b>0.246146468</b> |
| 15        | 13.974              | 0.009419262        | -2.025983131        | 0.198716038        | 0.269070633        |
| 16        | 14.648              | 0.000565249        | -3.247760567        | -0.181638024       | 0.199594239        |
| 17        | 15.099              | 0.002220082        | -2.653630889        | 0.171748984        | 0.271304564        |
| 18        | 15.734              | 0.003551003        | -2.449648955        | -0.156400661       | 0.237083418        |
| 19        | 16.514              | 0.002280949        | -2.641884439        | -0.192395104       | 0.160511709        |
| 20        | 16.592              | 0.006982814        | -2.155969516        | -0.166259176       | 0.258710955        |
| 21        | 16.61               | 0.006656389        | -2.176761318        | -0.076975235       | 0.270252832        |
| 22        | 16.929              | 0.00021048         | -3.676789536        | 0.210509182        | 0.226396291        |
| 23        | 16.951              | 0.00569247         | -2.244699272        | 0.239697037        | 0.160456283        |
| 24        | 17.856              | 0.000159666        | -3.796787937        | -0.143519948       | 0.088822895        |
| 25        | 18.202              | 0.003942699        | -2.404206385        | 0.180776349        | -0.018913598       |
| 26        | 19.572              | 0.000425597        | -3.371001566        | -0.214800853       | -0.093615654       |

**Figura 2 Cromatogramas de los ácidos grasos de cadena corta obtenidos del control H2 y el caso CRC 4.** En el eje de X se grafica el tiempo de retención (min) y en el eje Y la abundancia relativa. Se resaltan 3 ácidos grasos de cadena corta que fueron objetivo del estudio Pico 1: ácido acético. Pico 2: ácido propiónico. Pico 3: ácido butírico.

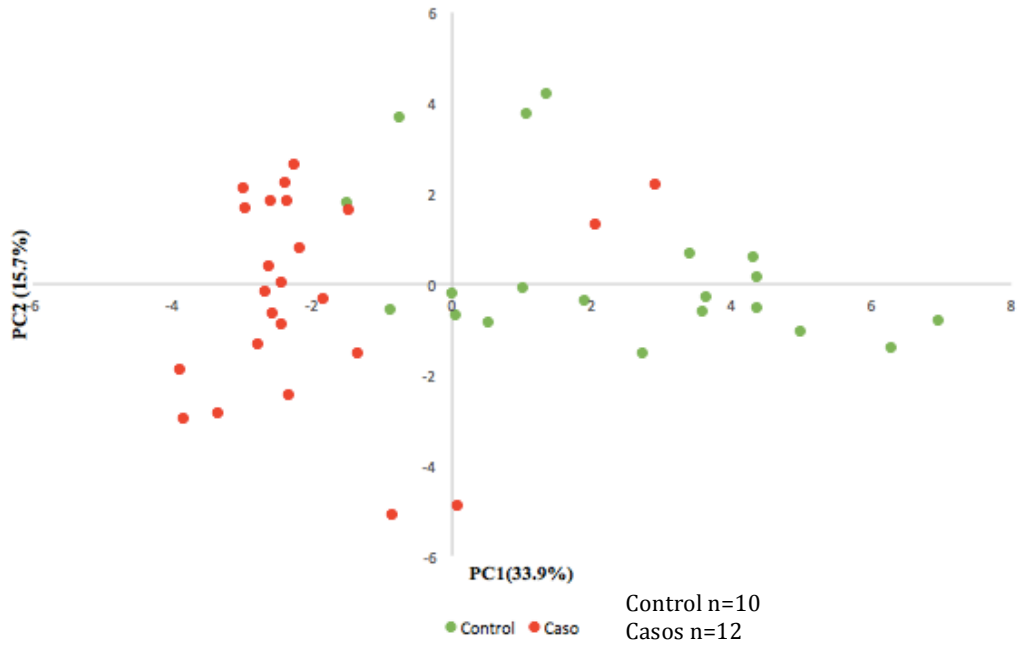


Cromatograma del Control H2

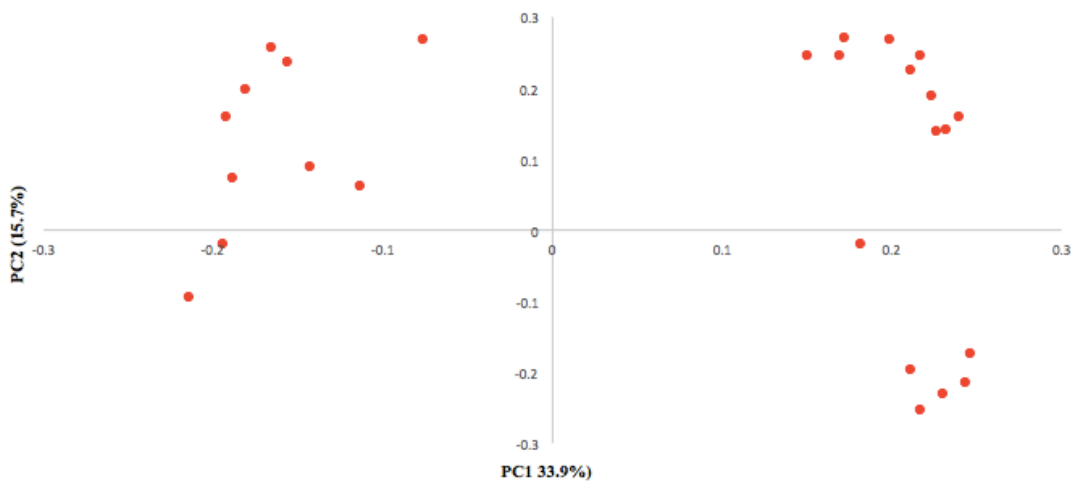


Cromatograma del Caso CRC4

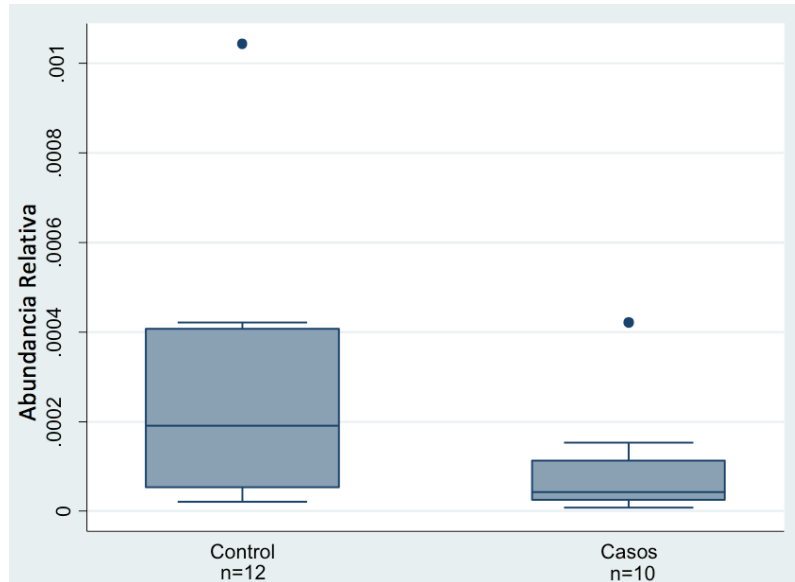
**Figura 3 Análisis de Componentes Principales (PCA).** En el eje X se grafica el PC2 (15.7%) y en el eje Y se grafica el PC1 (33.9%). Cada punto graficado corresponde a una lectura por GS-MS. En total se hicieron 44 lecturas correspondientes a 22 muestras.



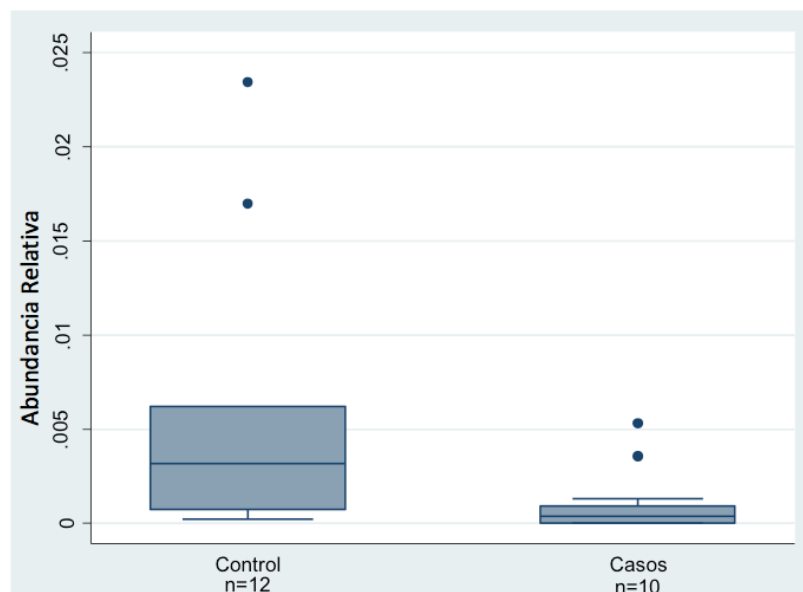
**Figura 4 Loading Plot de compuestos PC1 vs PC2.** En el eje X se grafica el PC2 (15.7%) y en el eje Y se grafica el PC1 (33.9%). Cada punto graficado es uno de los 26 compuestos que resultaron estadísticamente significativos entre casos y controles.



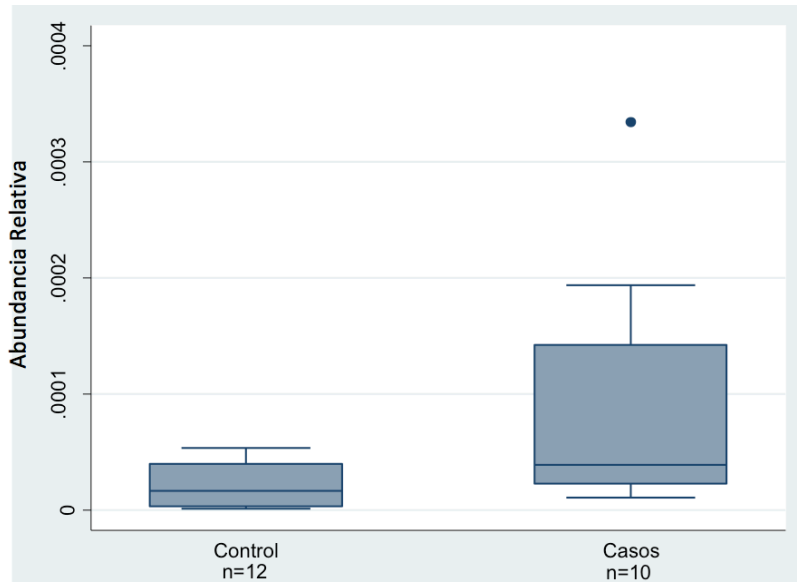
**Figura 5 Comparación del promedio de abundancia relativa del ácido butírico determinada por GC-MS en la población de estudio.** No existe diferencia estadísticamente significativa en el promedio de ácido butírico entre el grupo de casos y control. (p-valor >0.05). Se incluye la media en casos y controles. Los puntos son los valores más alejados de la cohorte.



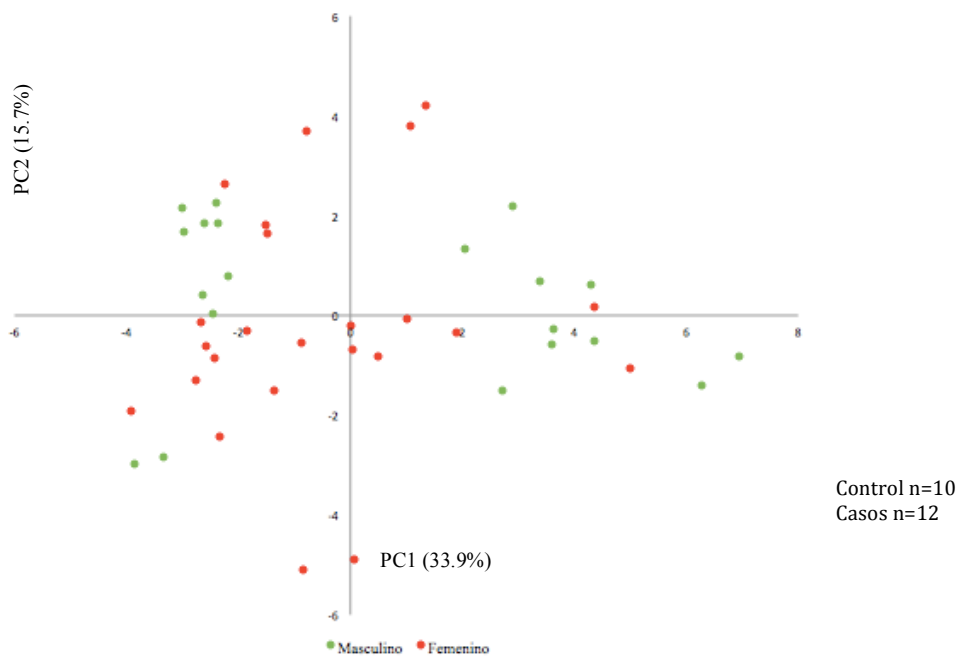
**Figura 6 Comparación del promedio de abundancia relativa del ácido propiónico determinada por GC-MS en la población de estudio.** Existe diferencia estadísticamente significativa en el promedio de ácido propiónico entre el grupo de casos y control. (p-valor < 0.05). Se incluye la media en casos y controles. Los puntos son los valores más alejados de la cohorte.



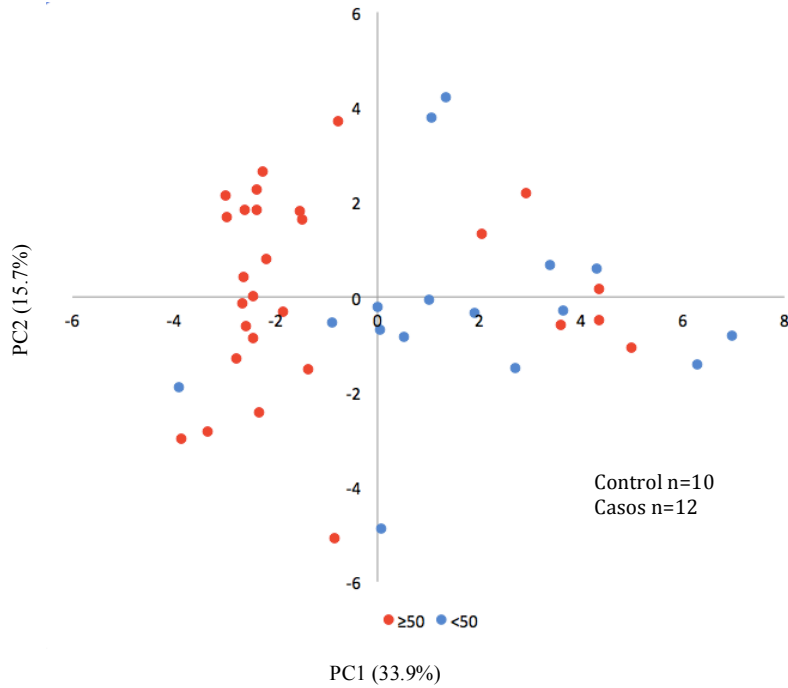
**Figura 7 Comparación del promedio de abundancia relativa del ácido acético determinada por GC-MS en la población de estudio.** Existe diferencia estadísticamente significativa en el promedio de ácido acético entre el grupo de casos y control ( $p$ -valor  $< 0.05$ ). Se incluye la media en casos y controles. Los puntos son los valores más alejados de la cohorte.



**Figura 8 PCA según el género.** En el eje X se grafica el PC2 (15.7%) y en el eje Y se grafica el PC1 (33.9%).



**Figura 9 PCA por grupos etarios.** En el eje X se grafica el PC2 (15.7%) y en el eje Y se grafica el PC1 (33.9%). Se grafican las componentes principales según dos grupos etarios: sujetos mayores o igual de 50 años y sujetos menores de 50 años.



**Figura 10 PCA según el índice de masa corporal (IMC).** En el eje X se grafica el PC2 (15.7%) y en el eje Y se grafica el PC1 (33.9%). Se grafican las componentes principales según el IMC (normal, sobrepeso y desnutrición).

