CAMBIO EN EL PERFIL METABOLÓMICO GLOBAL TRAS LA CIRUGÍA CON INTENCIÓN CURATIVA EN EL CÁNCER DE PULMÓN. ESTUDIO PROMOTER*.

(Predictive value Of Metabolomics after Treatment to Evaluate Response in lung cancer).

A. Pereira Vega[1], E. Vélez Menis[2], C. Gotera Rivera[3], B. Callejón Leblic[4], J. Romero López[5], L. Seijo Maceiras[6], L.A. Padrón Fraysse[5], J. Lancha Domínguez[5], A. González Hernández[5], T. García Barrera[4].

[1]*Servicio de Neumología. Hospital Universitario Juan Ramón Jiménez de Huelva. Fundación FABIS de investigación en Salud.*

[2]*Técnico de investigación de la Fundación Andaluza Beturia de Investigación en Salud (FABIS)*

[3]*Servicio de Neumología de la Fundación Jiménez Díaz. Madrid.*

[4]*Departamento de Química Analítica de la Universidad de Huelva (UHU)*

[5]*Servicio de Neumología. Hospital Universitario Juan Ramón Jiménez de Huelva.*

[6]*Servicio de Neumología de la Clínica Universidad de Navarra, sede en Madrid.*

Proyecto Financiado con la Beca Neumosur nº 8.2018

RESUMEN

La cirugía es el mejor tratamiento en los estadios precoces del cáncer de pulmón (CP) con lo que se pretende su curación. El estudio de las alteraciones metabólicas tras una intervención quirúrgica con intención curativa podría utilizarse para evaluar la respuesta al tratamiento o la detección de la recurrencia del cáncer. En este estudio hemos evaluado el perfil metabolómico global (PMG) de muestras de suero de 115 sujetos: Pacientes con CP recogidas en el preoperatorio (PRE) (48 muestras) y tras la intervención (POST), al mes (POST-A) (15 muestras) y a los 3 - 6 meses de la cirugía (POST-B) (17 muestras), y se han comparado con el PMG de personas sanas (grupo control: GC) (35 muestras). Se utilizó una plataforma metabolómica no dirigida basada en cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) de interacción hidrofílica (HILIC) y espectrometría de masas (MS). Se encontraron diferencias en el PMG en las diferentes situaciones estudiadas. Se encontraron 22 metabolitos alterados comparando todos los diferentes grupos estudiados. La normalización de la estearamida tras la cirugía, habitualmente elevada en el CP, podría ser un indicador de que la cirugía ha sido exitosa (Área Bajo la Curva (AUC) = 0,81). El mantenimiento de la elevación de la 3-galactosil-lactosa en el CP (respecto al GC) tras la cirugía podría indicar el fracaso de la cirugía radical (AUC >0,75). Este estudio proporciona información única sobre los PMG de los pacientes con CP después de la cirugía en dos puntos temporales diferentes mediante la combinación de métodos analíticos complementarios.

Palabras clave: Metabolómica, espectrometría de masas, cáncer de pulmón, suero, cirugía, cromatografía líquida de ultra alta definición

CHANGE IN THE GLOBAL METABOLOMIC PROFILE AFTER CURATIVE SURGERY FOR LUNG CANCER. PROMOTER* STUDY. (PREDICTIVE VALUE OF METABOLOMICS AFTER TREATMENT TO EVALUATE RESPONSE IN LUNG CANCER)

ABSTRACT

Surgery is the best treatment in the early stages of lung cancer (LC), with the aim of achieving a cure. The study of metabolic alterations following curative surgery could be used to evaluate response to treatment or detect cancer recurrence. In this study, we evaluated the global metabolomic profile (GMP) of serum samples from 115 subjects: LC patients collected preoperatively (PRE) (48 samples) and after surgery (POST), one month after surgery (POST-A) (15 samples) and 3-6 months after surgery (POST-B) (17 samples), and compared them with the GMP of healthy individuals (control group: CG) (35 samples). An untargeted metabolomic platform based on ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) with hydrophilic interaction chromatography (HILIC) and mass spectrometry (MS) was used. Differences in GMP were found in the different situations studied. Twenty-two altered metabolites were identified when comparing all the groups studied. The normalisation of stearamide after surgery, which is usually elevated in LC patients, could be an indicator that the surgery has been successful (Area Under the Curve (AUC) = 0.81). The persistence of elevated 3-galactosyl-lactose levels in LC patients (compared to CG) after surgery could indicate the failure of radical surgery (AUC >0.75). This study provides unique information on the metabolomic profiles of LC patients after surgery at two different time points by combining complementary analytical methods.

Keywords: Metabolomics, mass spectrometry, lung cancer, serum, surgery, ultra-high-perfomance liquid chromatography.

Recibido: 05.02.2025 Aceptado: 27.04.2025

Dr. Antonio Pereira Vega.
apv01h@gmail.com

INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón (CP) es el segundo más frecuente y el provoca mayor mortalidad, especialmente cuando se detecta en las fases avanzadas de le enfermedad, con menores posibilidades de curación[1]. Cuando se detecta en las fases precoces (estadios I y II del CP no de células pequeñas -CPNCP-) el tratamiento más adecuado, y con el que se pretende su curación, es la cirugía. Al respecto, las tasas de supervivencia a los 5 años difieren del 5%, en el caso de detección tardía, al 65% cuando la cirugía es efectiva[1].

Además de la intervención quirúrgica, muchos pacientes con CPNCP necesitan quimioterapia, radioterapia, terapia dirigida, inmunoterapia o alguna combinación de estos tratamientos para prevenir una recurrencia[2]. A pesar de que la cirugía mejora claramente la supervivencia del CP, la expectativa de vida puede verse mermada por una posible recidiva tras la intervención.

En este sentido, la identificación de biomarcadores (BM) que aporten información sobre posibles cambios metabólicos antes o después de la cirugía podría mejorar la prevención, la detección temprana de recidivas y orientar la terapia adyuvante o neoadyuvante con el fin de evitar la posible recurrencia de la enfermedad.

La metabolómica se considera un método eficaz para investigar el comportamiento de una gran cantidad de metabolitos en una gran variedad de muestras biológicas, incluido el suero. La mayoría de los estudios metabolómicos del CP han analizado muestras biológicas de pacientes con CP y de personas sanas para establecer diferencias metabólicas entre ellas e identificar posibles BM para el diagnóstico temprano[3 – 9]. Sin embargo, pocos estudios han investigado las alteraciones metabólicas en pacientes con CP antes y después de la cirugía. Ahmed *et al.*[10] analizaron muestras de suero y orina de pacientes con CP preoperatorios y postoperatorios 4 meses después de la cirugía y observaron un aumento en los niveles de lípidos y ácidos carboxílicos. Yang *et al.*[11] también describieron alteraciones en lípidos, ácidos grasos y aminoácidos en pacientes con CP preoperatorios y postoperatorios 7 días después de la resección en comparación con un grupo control. De manera similar, Chen *et al.*[12] han descrito cambios en muchos metabolitos implicados en el metabolismo lipídico en pacientes con CP antes y después de la intervención quirúrgica. Finalmente, Derveaux *et al.*[13] analizan mediante RNM los PMG preoperatorios y a los 3 meses de la cirugía en 71 pacientes. No conocemos estudios en España que valoren los cambios metabolómicos tras la cirugía.

La hipótesis de nuestro estudio fue determinar si el PMG de los pacientes con CP varía tras la realización de la cirugía con intención curativa. El objetivo principal de este trabajo fue valorar si cambia el PMG de los pacientes con CP intervenidos con intención curativa (Pre-Post intervención). Los objetivos específicos fueron determinar e identificar metabolitos que potencialmente puedan indicar un buen pronóstico, fracaso de la intervención o posible recurrencia del CP después de una cirugía con intención curativa utilizando la metabolómica; así como comparar nuestros resultados con metabolitos relacionados con el CP y sus vías metabólicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio: se trata de un estudio longitudinal prospectivo que realiza la recogida de muestras de sangre antes y después de la cirugía (entre 1 y 6 meses tras la cirugía). Las muestras de sangre de control se recogieron de voluntarios sanos. Los estudios de metabolómica se realizaron en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Huelva (UHU).

Criterios de inclusión y exclusión:
GRUPO CP:
Criterios de inclusión: 1.- Diagnóstico final de CP con cualquiera de las técnicas habituales para su diagnóstico, en los diferentes hospitales participantes durante el periodo de inclusión de pacientes (18 meses). 2.- Se incluirán todos los tipos de CP y todos sus posibles estadios precoces (I y II) subsidiarios de tratamiento con cirugía. 3.-Firma del consentimiento informado.
Criterios de exclusión: 1.- La presencia de otro cáncer diferente al CP. 2.- Estadios tardíos que aconsejen otros tratamientos diferentes a la cirugía (QT, RT, RT/QT o IT). 3.- Haber iniciado el tratamiento con Quimioterapia o Radioterapia por cualquier motivo. 4.- No firmar el consentimiento informado.

GRUPO SANOS:
Criterio de inclusión: 1-Pacientes mayores de 18 años sin patología conocida neoplásica o inflamatoria. 2- Firma del consentimiento informado.
Recolección de muestras: Las muestras de CP y del grupo control se recogieron en tres hospitales españoles (Hospital Universitario Juan Ramón Jiménez de Huelva, Fundación Jiménez Díaz de Madrid y Clínica Universidad de Navarra, sede en Madrid). Las muestras de sangre se obtuvieron después de 8 horas de ayuno. Después de la centrifugación (durante 10 min), las muestras de suero se alicuotaron y se congelaron a -80 °C hasta el análisis[14].

Las muestras se dividieron en 4 grupos: un grupo control de personas sanas (CONTROL, 35 muestras), un grupo de pacientes con CPNCP preoperatorio (PRE, 48 muestras) y dos grupos de pacientes con CPNCP postoperatorio 1 mes (POST-A, 15 muestras) y 3 - 6 meses des-

pués de la cirugía (POST-B, 17 muestras). Los datos clínicos de los sujetos se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Datos clínicos de los sujetos incluidos en el estudio.

Características clínicas		CONTROL (n= 35)	PRE (n=48)	POSTA (n=15)	POSTB (n=17)
Género	Masculino	21	29	8	12
	Femenino	14	19	7	6
Edad (años ± DS)		56.3 ± 13.1	65.7 ± 10.7	62.3 ± 9.1	67.33 ± 8.1
Hábito de fumador	No fumador	16	11	0	0
	Fumador	0	13	8	9
	Exfumador	19	24	7	8
Tipo CPNCP	Adenocarcinoma	-	32	15	17
	Adenocarcinoma lepídico	-	1	-	-
	Adenoescamoso	-	1	-	-
	Carcinoide	-	2	-	-
	Carcinoma	-	6	-	-
	Carcinoma de células escamosas	-	1	-	-
	Epidermoide	-	4	-	-
	Tumor carcinoide típico	-	1	-	-
Comorbilidades	DM	8	5	0	1
	HAS	0	20	5	8
	DLP	0	17	2	4
	EPOC	0	15	8	5
Cirugía	Lobectomía	-	32	14	15
	Segmentectomía	-	15	0	1
	Resección parcial	-	2	1	1

Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio. PRE: muestras de pacientes con cáncer de pulmón preoperatorio; POSTA: muestras de pacientes postoperatorios con cáncer de pulmón recogidas a 1 mes de la cirugía; POSTB: muestras de pacientes postoperatorios con cáncer de pulmón recogidas a los 3-6 meses de la cirugía.

Reactivos: todos los disolventes utilizados fueron de grado HPLC[14].

Tratamiento de muestra: para el análisis de RP, la extracción de metabolitos de las muestras de suero se realizó añadiendo 400 micrasL de una mezcla de metanol/etanol (1 : 1 v/v) a 100 micrasL de suero en Tubos Eppendorf. Las muestras se agitaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, seguido de una centrifugación a 2.057g durante 10 min a las 4°C para eliminar el sedimento que contiene la fracción proteica. El sobrenadante se transfirió a otro tubo Eppendorf y se secó en un sistema de vacío rápido (Concentrador T*hermo Scientific Savant SPD111 V SpeedVac*) a 30°C durante 20 min. El residuo resultante se reconstituyó con 100 micrasL de una mezcla de metanol/ agua (8 : 2 v/v) para el análisis. Posteriormente, el pellet restante se extrajo dos veces con una mezcla de acetonitrilo/metanol (4:1 v/v) para la extracción de metabolitos no polares, se agitó en vórtex y se centrifugó con las mismas condiciones anteriores y se secó utilizando una corriente de nitrógeno. Estos extractos se reconstituyeron en 100 micrasL de acetonitrilo/metanol (6 : 4 v/v) con 10 mM de formiato de amonio. Finalmente, para el análisis HILIC, las muestras se extrajeron mediante la adición de 400 micrasL de metanol/agua (4 : 1 v/v). Luego, las muestras fueron agitadas y centrifugadas utilizando las mismas condiciones anteriores y secadas en el sistema de vacío rápido (Concentrador *SpeedVac Thermo Scientific Savant SPD111 V*) a 30°C durante 60 min. Los extractos se reconstituyeron en 100 micrasL de metanol/agua (4 : 1 v/v). A las muestras se les añadió el estándar interno ácido palmítico-d31 para control de calidad[14].

Instrumentación: UHPLC-QTOF-MS.

Para lograr una amplia cobertura metabólica, se combinaron un RP y un HILIC acoplados a UHPLC.

Para el análisis por RP-UHPLC-QTOF-MS, agua (fase A) y acetonitrilo (fase B) con 0,1% de ácido fórmico se utilizaron como fases móviles siguiendo condiciones de gradiente desde 5 a 100% de fase B con un tiempo total de cromatograma de 30 min.

La separación cromatográfica se llevó a cabo en un Zorbax C18, 1,5 micrasmetros×Columna de 2,1 mm de diámetro interior (Agilent Technologies) en ambas ionizaciones, modo positivo y negativo.

Para el análisis HILIC-UHPLC-QTOF-MS, las fases móviles estaban compuestas por 20 mM de formiato de amonio y 0,1 % de ácido fórmico en agua (fase A) y acetonitrilo (fase B) con 0,1 % de ácido fórmico. La elución en gradiente se estableció en 95 % hasta 45 % de B con un tiempo total de 15 min. El caudal se estableció en 0,4 mL min-1. La separación cromatográfica se realizó en Acquity BEH Amide, 1,7micrasmetros ×Columna de 2,1 mm de diámetro interior (Waters, Massachusetts, EE. UU.).

Las masas de referencia utilizadas para la corrección de masa fueron metro/el 121,0509 y metro/el 922,0098 amu, que se introdujeron constantemente en el sistema para ambos modos de ionización (positivo y negativo). El rango de masas se controló de 50 a 1.100 amu. Los parámetros QTOF se establecieron en 3 kV para el voltaje capilar, 11 L min 1 a 350°C para el caudal de gas de secado y 35 psi para el nebulizador de gas. El voltaje del fragmentador se estableció en 175 V para ambos modos de ionización. Las muestras se adquirieron en modo de escaneo completo (MS) para el análisis primario no dirigido. Luego, se importó una lista que contenía las características más significativas y se analizó en modo MS/MS dirigido con una velocidad de escaneo MS/MS de 1 espectro s-1 Utilizando las condiciones cromatográficas iniciales. Se utilizó nitrógeno como gas de colisión y se fijaron varios voltajes de colisión de 10 a 40 V para la fragmentación de compuestos. Los datos se adquirieron en modo centroide utilizando una velocidad de barrido de 1,0 espectros por segundo.

Proceso de datos: para UHPLC-QTOF-MS, el procesamiento de datos sin procesar se llevó a cabo con el software *Agilent MassHunter Profinder B.10.0* (Agilent Technologies). Para extraer los datos, se aplicó el asistente de extracción recursiva de características (RFE) por lotes para moléculas pequeñas del software. La RFE realiza dos algoritmos. Primero, se utilizó el algoritmo de extracción de características moleculares (MFE), que incluye extracción, selección de especies de iones y estado de carga, para encontrar las características en el conjunto de datos. En segundo lugar, las características iniciales se alinearon por el tiempo de retención (RT) y la masa, creando una lista de características únicas a través del binning. Luego, los pares de datos RT y masa de las características alineadas y binning se utilizaron como criterios de entrada para encontrar las características con mayor precisión utilizando el algoritmo Find by Ion (FbI). También se aplicaron filtros adicionales, como filtros de puntuación, integración y pico, al conjunto de datos. (Tabla S2 de la información complementaria del artículo de Sánchez-Espirilla *et al*.[14]).

Tamaño muestral: para el cálculo del tamaño muestral se ha utilizado información de estudios previos[10]. Para conseguir una potencia del 80%, teniendo en cuenta que el nivel de significación es del 5%, y asumiendo que la proporción en el grupo de metabolitos alterados es del 84%, la proporción en el grupo control es del 16%, asumiendo un porcentaje esperado de pérdidas del 10% será necesario reclutar al menos 18 unidades experimentales en el estudio.

Análisis estadístico: para el procesamiento de datos de UHPLC-QTOF-MS, se utilizó *Mass Profiler Professional B.10.0* (Agilent Technologies) para la determinación de los metabolitos más relevantes entre los grupos. Para ambas características determinadas por las metodologías de cromatografía líquida (RP) y HILIC UHPLC-QTOF-MS, se llevaron a cabo análisis de componentes principales (PCA) y análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) con el fin de comparar los perfiles metabolómicos séricos obtenidos.

Una vez realizado el estudio, los datos fueron sometidos a la escala de Pareto y trasformación logarítmica.

Para evaluar la especificidad y sensibilidad de los metabolitos alterados, se determinaron los valores de las áreas bajo la curva (AUC) del análisis de características del operador recibido (ROC) utilizando Metaboanalyst 5.0. https:// www.metaboanalyst.ca/) Los valores de AUC superiores a 0,75 se consideraron clínicamente útiles en la clínica médica[15].

Se aplicaron el programa ANOVA de una vía y la prueba de Tukey para comparaciones múltiples utilizando STATISTICA 8.0 de StatSoft. Además, también se aplicó una corrección FDR de Benjamini- Hochberg para ajustar los valores p. El nivel de significación estadística para todas las pruebas se estableció en <0,05.

Anotación de metabolitos séricos: de acuerdo con las recomendaciones de la *Metabolomics Standards Initiative* (MSI), los metabolitos se identificaron hasta el nivel 2 de MSI16. Flujo de trabajo de análisis cualitativo de Agilent MassHunter.

Se utilizó el software B.08.00 para anotar los compuestos. Para ello, se aplicaron al conjunto de datos el flujo de trabajo "*Compound Discovery*" y la minería de compuestos "*Find by Molecular Features*" del software. METLIN (http:// metlin.scripps.edu) y HMDB (http://hmdb.ca) se consultaron bases de datos para la anotación de compuestos alterados, considerándose un puntaje superior al 97%, que refleja que tan bien coincide el compuesto con la masa, patrón isotópico y tiempo de retención del compuesto objetivo.

Además, se aplicaron experimentos MS-MS a las muestras para confirmar la anotación de algunos compuestos utilizando un QTOF (sistema 6550, *Agilent Technologies*) con las mismas condiciones cromatográficas que las aplicadas para el análisis primario. Los iones fueron seleccionados mediante fragmentación por disociación inducida por colisión sobre la marcha en función de los valores previamente determinados de la masa exacta y tiempo de retención.

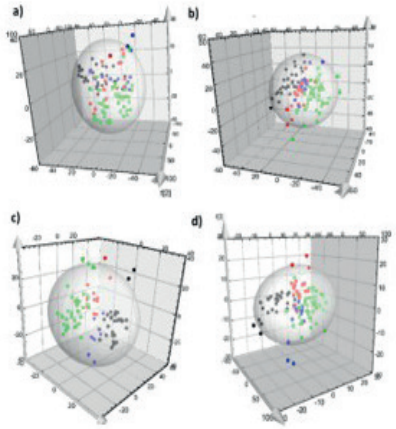
RESULTADOS

Los perfiles metabolómicos globales de las muestras de suero de los grupos CONTROL, PRE, POSTA y POSTB se determinaron utilizando ambas metodologías ESI (±) -RP-UHPLC-QTOF-MS y ESI (+) - HILIC-UHPLC-QTOF-MS.

Las gráficas PLS-DA mostraron buenas clasificaciones entre grupos en los diferentes extractos orgánicos y acuosos analizados por ESI. (±) -RP-UHPLC-QTOF-MS y ESI (+) -HILIC-UHPLC-QTOF-MS **(Figura 1a–d)**, mostrando una buena discriminación entre los PMG de los diferentes grupos.

Se encontraron veintidós metabolitos alterados **(Tabla 2)** combinando HILIC-UHPLC-QTOF-MS (10 metabolitos) y RP-UHPLC-ESI-(±)-QTOF-MS (12 metabolitos). Los metabolitos se identificaron utilizando la base de datos METLIN utilizando una puntuación superior al 90%, y con análisis MS/MS para confirmar la identidad de los metabolitos con los fragmentos característicos.

Figura 1. Diagrama de dispersión 3D-PLS-DA de (a) extractos MeOH: H2O (8:1 v/v) determinados por ESI (+)-RP-UHPLC-QTOF-MS y (b) ESI (–)-RPUHPLC-QTOF-MS; (c) Extractos de ACN: MeOH (6:4 v/v) determinados por ESI (+)-RP-UHPLC-QTOF-MS; d) Extractos de MeOH:H2O (4:1 v/v) determinado por ESI (+)-HILIC-UHPLC-QTOF-MS;



CONTROL: puntos negros; PRE: puntos verdes; POSTA: puntos azules; y POSTB: puntos rojos.

La **Tabla 2** incluye los valores de Área Bajo la Curva (AUC) de los metabolitos significativamente alterados. En este sentido, la estearamida (AUC = 0,81) y la 3-galactosil-lactosa (AUC = 0,81) mostraron valores de AUC superiores a 0,75 (utilidad clínica) al comparar los valores preoperatorios versus postoperatorios. Además, la galactosil-lactosa mostró un valor de AUC superior (AUC = 0,99) al comparar los valores inmediatamente postoperatorios con los controles y también a los 6 meses (AUC = 0,93).

Al comparar POST-A y el control, butil etil malonato (AUC = 0,90), 1-metilhistidina (AUC = 0,89), ácido arginínico (AUC = 0,77), cistina (AUC = 0,99) y norte La- (1-desoxi-1- fructosil) leucina (AUC = 0,75) también presentaron valores de AUC superiores a 0,75. De manera similar, en la comparación entre POST-B y control, el butiletilmalonato (AUC = 0,76), la 1- metilhistidina (AUC = 0,82) y la cistina (AUC = 0,94) presentaron abundancias con valores de AUC superiores a 0,75.

Finalmente, butil etil malonato (AUC = 0,75), galactosilactosa (AUC = 0,83), 3-b-galactopiranosil glucosa (AUC = 0,80), y norte La -(1-desoxi-1-fructosil) leucina (AUC = 0,76) presentaron valores superiores a 0,75 en comparación con los grupos PRE y POST-A.

Por lo tanto, podemos identificar un grupo de metabolitos con valor clínico potencial (AUC > 0.75) en el seguimiento de pacientes con CP que son candidatos quirúrgicos.

La **tabla 3** muestra los metabolitos alterados significativamente (p <0,05) entre los diferentes grupos analizados, respecto al grupo control (GC): GC vs CP (9 metabolitos), GC vs POST-A (10 metabolitos) y GC vs POST-B (9 metabolitos).

Curiosamente, la glucosil-galactosil-hidroxilisina, y o-carnitina y prolina se alteraron significativamente antes e inmediatamente después de la cirugía, pero volvieron a niveles similares a los valores iniciales del grupo control después de 6 meses de la cirugía, mientras que 3-b-galactopiranosil glucosa se alteró antes de la cirugía y después de 6 meses de la cirugía, pero no inmediatamente después de la cirugía. No tenemos clara la explicación de estos resultados, aunque, en el primer caso podría indicar una posible curación (aunque los metabolitos tardan en normalizarse) y en el segundo, "una posible recidiva precoz".

Finalmente, encontramos que 6,10,14-trimetil-5,9,13-pentadecatrien-2-ona, DG (16:0/ 24:1), E, e-caroteno-3,3-diona y estearamida se alteraron significativamente antes pero no después de la cirugía, lo que podría sugerir una posible curación. También encontramos diferencias significativas en la abundancia de 6-(2-carboxietil)-7- hidroxi-2,2-dimetil-4-cromanona glucósido, butil etil malonato, linalil propianato, Lyso-PC (17 : 0), 3-galactosilactosa y 3-b-galactopiranosil glucosa después de la cirugía, pero no antes de la intervención, lo que sugiere cambios metabólicos relacionados con la propia intervención, independiente de su relación con el CP.

En la **Figura 2** se muestran las clases de metabolitos más alteradas encontradas en los grupos del estudio. Estos metabolitos fueron los siguientes: ácidos carboxílicos (33,3%), compuestos organooxigenados (23,8%), lípidos prenólicos (14,3%), glicerolípidos (9,5%), glicerofosfolípidos (9,5%), ácidos grasos (4,8%) y esfingolípidos (4,8%). Los aminoácidos, péptidos y análogos fueron los metabolitos más alterados en los grupos PRE, POST-A y POST-B (26,7, 31,3 y 26,3 % del total de metabolitos alterados, respectivamente). Alteraciones en diacilglicéridos (DG), terpenoides y glicósidos de acilo graso antes y después de la cirugía sugirieron perturbaciones en el metabolismo de los lípidos, mientras que las alteraciones en los carbohidratos y los conjugados de carbohidratos sugieren cambios postoperatorios en el metabolismo de los carbohidratos. De manera similar, las alteraciones postoperatorias en los ácidos dicarboxílicos y sus derivados también sugieren que el metabolismo de los carbohidratos se vio afectado por el procedimiento quirúrgico.

TABLA 2.- Metabolitos alterados ordenados por clase

Metabolites	PRE vs CONTROL			POSTA vs CONTROL			POSTB vs CONTROL			PRE vs POSTA			PRE vs POSTB			EM	TM	MD	IM	Class
	FC	P	AUC	FC	P	AUC	FC	P	AUC	FC	P	AUC	FC	P	AUC					
1-[(5-Amino-5-carboxypentyl)amino]-1-deoxyfructose	1,05	NS	-	0,94	NS	-	0,98	NS	-	1,12	0,00	0,75	1,07	NS	-	308.1589	308.1584	HILIC	ESI +	Organooxygen compounds
1-Methylhistidine	0,88	NS	-	0,86	0,00	0,79	0,81	0,00	0,82	1,03	NS	-	1,08	0,02	0.70	169.0854	169.0851	HILIC	ESI +	Carboxylic acids and derivatives
Cystine	1,06	NS	-	1,21	0,00	1,00	1,29	0,00	0,94	0,96	NS	-	0,97	NS	-	240.024	240.0238	HILIC	ESI +	Carboxylic acids and derivatives
N-(1-Deoxy-1-fructosyl)leucine	1,13	NS	-	0,91	0,01	0,75	1,10	NS	-	1,23	0,00	0,76	1,03	NS	-	293.1479	293.1475	HILIC	ESI +	Carboxylic acids and derivatives
Butyl ethyl malonate	1,35	NS	-	4,34	0,02	0,90	1,66	0,02	0,76	0,31	0,04	0,75	0,81	0,02	0.55	188.105	188.1049	RP	ESI-	Carboxylic acids and derivatives
Argininic acid	1,01	NS	-	1,15	0,01	0,77	1,14	0,03	0,69	0,96	NS	-	0,97	NS	-	175.0959	175.0957	HILIC	ESI +	Carboxylic acids and derivatives
Proline	0,63	0,00	0,70	0,63	0,02	0,72	0,80	NS	-	1,00	NS	-	0,79	NS	-	115.0639	115.0633	HILIC	ESI +	Carboxylic acids and derivatives
Stearamide	0,38	0,02	0,81	0,72	NS	-	0,99	NS	-	1,01	NS	-	1,14	NS	-	283.2908	283.2875	RP	ESI+	Carboximidic acids and derivatives
3-b-Galactopyranosyl glucose	1,16	0,02	0,66	1,26	NS	-	1,22	0,00	0,89	0,85	0,00	0,80	0,87	0,01	0.72	342.1189	342.1162	HILIC	ESI +	Epoxides
Glucosylgalactosyl hydroxylysine	1,19	0,00	0,72	1,24	0,00	0,87	1,12	NS	-	0,95	0,04	0,69	1,07	NS	-	486.206	486.2061	HILIC	ESI +	Fatty Acyls
DG(14:0/22:1)	2,06	0,02	0,67	6,13	0,00	0,60	1,29	0,04	0,55	0,34	0,03	0,74	1,60	NS	-	622.5529	622.5536	RP	ESI+	Glycerolipids
DG(16:0/24:1)	1,68	0,03	0,65	0,85	NS	-	0,43	NS	-	1,98	NS	-	3,91	NS	-	678.6113	678.6162	RP	ESI+	Glycerolipids
LysoPC(17:0)	0,62	NS	-	0,90	NS	-	1,00	NS	-	0,69	0,01	0,56	0,62	0,04	0.5	509.35	509.3481	RP	ESI+	Glycerophospholipids
LysoPE(20:1)	1,70	NS	-	1,50	NS	-	0,21	NS	-	1,13	NS	-	7,98	0,02	0.71	507.3325	507.3325	RP	ESI+	Glycerophospholipids
L-Carnitine	1,16	0,00	0,70	1,18	0,00	0,79	1,02	NS	-	0,99	NS	-	1,04	NS	-	161.1056	161.1052	HILIC	ESI +	Organonitrogen compounds
Choline	0,87	NS	-	1,15	NS	-	1,97	0,02	0,68	0,76	NS	-	0,44	0,01	0.61	103.1003	103.1	RP	ESI+	Organonitrogen compounds
3-Galactosyllactose	1,45	0,00	0,89	1,59	0,00	0,99	1,48	0,00	0,93	0,91	0,00	0,83	0,98	NS	-	504.1683	504.1690	HILIC	ESI +	Organooxygen compounds
6-(2-Carboxyethyl)-7-hydroxy-2,2-dimethyl-4-chromanone glucoside	1,06	NS	-	5,36	0,00	0,65	2,29	0,00	0,69	0,20	0,01	0,53	0,46	0,01	0.54	426.1522	426.1526	RP	ESI-	Organooxygen compounds
6,10,14-Trimethyl-5,9,13-pentadecatrien-2-one	0,63	0,00	0,55	0,12	NS	-	0,29	NS	-	1,03	NS	-	0,43	NS	-	262.2275	262.2297	RP	ESI+	Prenol lipids
E,e-Carotene-3,3'-dione	1,79	0,03	0,62	0,45	NS	-	0,78	NS	-	3,97	NS	-	2,29	NS	-	564.398	564.3967	RP	ESI+	Prenol lipids
Linalyl propionate	2,10	NS	-	1,03	NS	-	1,14	0,00	0,60	1,01	NS	-	1,11	0,05	0.54	210.1618	210.162	RP	ESI-	Prenol lipids
SM(d17:1/24:0)	1,76	NS	-	1,14	NS	-	0,73	0,01	0,63	1,55	NS	-	2,41	0,00	0.62	800.6704	800.6771	RP	ESI+	Sphingolipids

RT: tiempo de retención, FC: Cambio de pliegue, N.S.: No significativo, lisofosfatidilcolina (LPC), lisofosfatidiletanolamina (LPE), Esfingomielina (SM); diacilglicéridos (DG); Masa Experimental (EM); Misa Teórica (MT); Metodología (MD); Modo de ionización (IM); Valor p obtenido a partir de ANOVA de una vía seguido por Test de Tuckey y corregido por postcorrección múltiple de Benjamini-Hochberg.

TABLA 3.- Metabolitos alterados significativamente ($p < 0.05$) entre los diferentes grupos analizados, respecto al grupo control (GC).

	CS – CP (9)	CS – POST-A (10)	CS – POST-B (9)
Metabolitos alterados	estearamida (0,38 veces), DG (14:0/22:1) (2,06 veces), DG (16:0/24:1) (1,68 veces), 6,10,14-trimetil-5,9,13-pentadecatrien-2-ona (0,63 veces), E, e-caroteno-3,3-diona (1,79 veces), 3-galacto-silactosa (1,45 veces), prolina (0,63 veces), glucosilgalactosil hidroxilisina (1,19 veces), 3-b-galactopiranosil glucosa (1,16 veces) y L-carnitina (1,16 veces).	6-(2-carboxietil)-7-hidroxi-2,2-dimetil-4-cromanona glucósido (5,36 veces), butiletil malonato (4,34 veces), DG (14:0/22:1) (6,13 veces), 1-metilhistidina (0,86 veces), 3- galactosil-lactosa (1,59 veces), ácido arginínico (1,15 veces), cistina (1,21 veces), glucosilgalactosil hidroxilisina (1,24 veces),y o-carnitina (1,18 veces),norte-(1-desoxi-1-fructosil)leucina (0,91 veces) y prolina (0,63 veces).	6- (2-carboxietil)-7-hidroxi-2,2-dimetil-4-cromanona glucósido (2,29 veces), butil etil malonato (1,66 veces), colina (1,97 veces), DG (14:0/22:1) (1,29 veces), 1-metilhistidina (0,81 veces), 3-b-galactopiranosil glucosa (1,22 veces), 3-galactosilactosa (1,48 veces), ácido arginínico (1,14 veces) y cistina (1,29 veces).

La **Figura 3** muestra los gráficos de barras de abundancia de metabolitos diferenciales en los grupos de estudio. La esteramida, la DG (16 : 0 / 24 : 1), la E,e-caroteno-3-3-diona y la prolina se alteraron, respecto al GC, en el grupo PRE y no se alteraron después de la cirugía **(Figura 3a)** lo que podría sugerir curación; glucosilgalactosil hidroxilisina y L-carnitina **(Figura 3b)** se encontraron alterados, respecto al GC, en los grupos PRE y POST-A pero no alterados en POST-B; lo que podría sugerir una "curación tardía" y 3-galactosilactosa **(La figura 3c)** estaba alterada, respecto al GC, en los grupos PRE, POST-A y POST-B con tendencias similares, lo que podría sugerir una posible intervención no curativa (tejido cancerígeno residual).

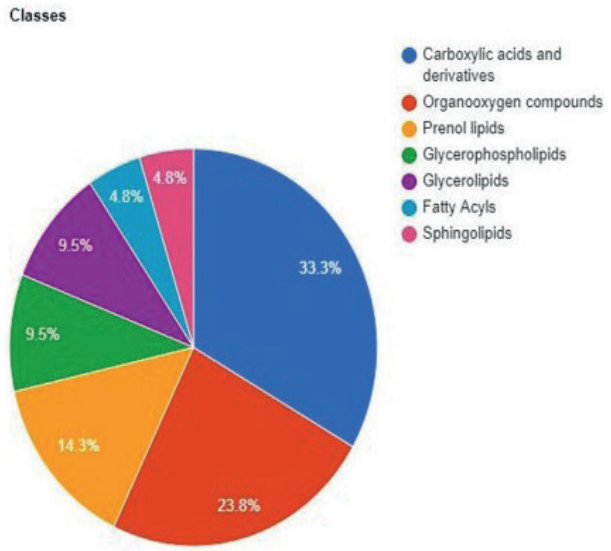


FIGURA 2.- Principales clases alteradas de metabolitos en los grupos PRE, POSTA y POST B en comparación con CONTROL.

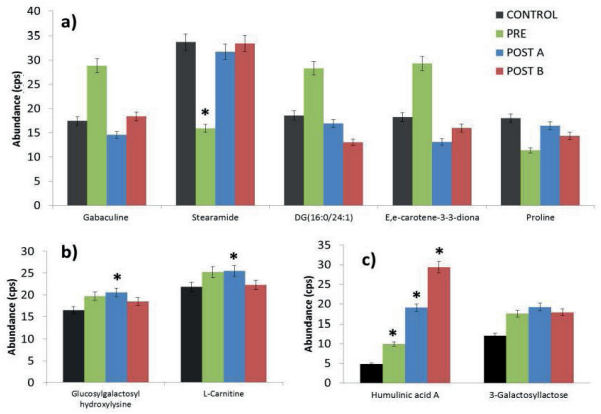


FIGURA 3.– Abundancia de metabolitos alterados después de la comparación con el grupo control: (a) metabolitos alterados en el grupo PRE y no alterados después cirugía; b) metabolitos alterados en los grupos PRE y POSTA y no alterados en POSTB; (c) metabolitos alterados en PRE, POSTA y POSTB grupos con tendencias similares. *Diferencias significativas (prueba ANOVA-Tukey) respecto a los valores de control. Barras de error: desviación estándar de la media (SEM).

DISCUSIÓN

En este estudio, hemos evaluado mediante metabolómica no dirigida (MBND) alteraciones metabólicas y metabolitos anotados que podrían tener valor potencial como biomarcadores para pacientes con CP sometidos a resección quirúrgica.

Los estudios metabolómicos de muestras de suero humano de pacientes con CP preoperatorios y postoperatorios son limitados en la literatura (10 - 13). Hasta donde sabemos, este es el primer estudio metabolómico no dirigido de muestras de suero de pacientes con CP pre y postoperatorio en dos momentos distintos después de la cirugía (1 mes, POST-A y 3 - 6 meses, POST-B). Además, la combinación de HILIC y cromatografía RP proporciona un nuevo enfoque, ya que la mayoría de los trabajos publicados informaron el uso de cromatografía líquida de ultraalta resolución en fase reversa (RP-UHPLC-MS) o cromatografía de gases (GC-MS)[10-12].

En nuestro estudio hemos encontrado alteraciones de metabolitos en PRE, POST-A y POST-B en comparación con el grupo CONTROL.

Descubrimos que la mayoría de los metabolitos alterados en comparación con el grupo control aumentaron en los grupos pre y postoperatorios al mes (POST-A) y a los 3 - 6 meses después de la cirugía (POST-B), incluidos aminoácidos, acilos grasos, carbohidratos y lípidos. Yang *et al.*[11] informaron resultados similares para aminoácidos, ácidos grasos y otros lípidos específicos en muestras de pacientes con CP preoperatorias y postoperatorias.

Los niveles de prolina disminuyeron antes e inmediatamente después de la cirugía, pero volvieron a los valores iniciales durante el seguimiento. Varios autores han encontrado niveles disminuidos de aminoácidos en muestras de pacientes con CP preoperatorias[10], aunque otros autores han descrito niveles aumentados de estos metabolitos, las alteraciones de los aminoácidos están relacionadas con la proliferación y supervivencia de las células cancerosas bajo estrés genotóxico, oxidativo y nutricional[17].

Encontramos niveles elevados del carbohidrato 3-galactosilactosa en consonancia con los datos informados por Ahmed et al. Dichos autores encontraron niveles elevados de varios carbohidratos en el suero de pacientes con CP preoperatorios[10]. Es bien sabido que las células tumorales tienen un impacto en el metabolismo de los carbohidratos, que a su vez está relacionado con una regulación celular no regulada, proliferación, proliferación rápida y metástasis[18]. También se han descrito alteraciones en varios lípidos, como ácidos grasos, lisofosfatidil-

colinas, lisofosfatidiletanolaminas, fosfatidilcolinas, esfingomielinas y glicéridos, en muestras preoperatorias de pacientes con CP[10-12]. Derveaux *et al*.[13] encuentran un cambio evidente en los PMG pre y postoperatorios y el análisis de metabolitos revela un aumento significativo de los niveles de lactato, cisteína y asparagina y una disminución de los niveles de acetato en el perfil de metabolitos plasmáticos. En nuestro estudio, los DG, los ácidos grasos, las esfingomielinas y los lípidos prenol se alteraron en las muestras preoperatorias. Específicamente, las abundancias de DG-(14:0/22:1) y DG (16:0/24:1) fueron mayores en este grupo. Los DG contribuyen al almacenamiento de energía, el metabolismo energético y la transducción de señales y son componentes de las membranas celulares, que actúan como bloques de construcción para los glicerofosfolípidos y como segundos mensajeros lipídicos. Algunos autores han observado niveles disminuidos de triacilglicéridos (TG) en pacientes con CP preoperatorios[11]. Aunque no encontramos niveles alterados de TG en nuestro estudio, la degradación de estos metabolitos podría explicar el aumento de DG en muestras de suero de CP preoperatorias. Por otro lado, los niveles de lípidos prenol como el propionato de linalilo y el E, e-caroteno-3,3" diona fueron más altos en pacientes en el preoperatorio. Los lípidos prenólicos son importantes para la salud debido a su efecto antioxidante. En este sentido, Yang *et al*.[11], también encontraron alteraciones en los lípidos prenólicos en pacientes con CP preoperatorios. Los lípidos son los componentes principales de las membranas biológicas y las moléculas de señalización necesarias para la proliferación, la supervivencia, la invasión, la metástasis y la interacción con el microambiente tumoral[19]. Las concentraciones de otros lípidos, como la glucosil-galactosil-hidroxilisina, también aumentaron antes de la operación.

También encontramos niveles elevados de L-carnitina en el mismo grupo. La L-carnitina interviene en numerosas vías metabólicas, incluida la β-oxidación de ácidos grasos, donde los AG se descomponen en acetil-CoA, que luego ingresa al TCA para ayudar a la generación de ATP. La evidencia acumulada sugiere que muchas células cancerosas reprogramaran la FAO y dependen de este proceso para la proliferación, la supervivencia, la resistencia a los medicamentos o la metástasis (20). En varios trabajos, los autores han encontrado niveles aumentados de L- carnitina en suero de pacientes con CP preoperatoria[10, 12].

Para intentar explicar los resultados y su implicación clínica, hemos diferenciado varias situaciones:

A) Hemos encontrado diversos metabolitos que difieren entre los controles y el CP preoperatorio (Posibles BM de CP). Sería una situación similar a los estudios transversales que comparan sujetos sanos y sujetos con cáncer de pulmón, en este caso, sujetos con CP en estadios iniciales. En estudios previos[21] nuestro grupo ha encontrado 11 metabolitos que diferencian claramente sujetos sanos de pacientes con CP ((treonina, creatina, fosfoetanolamina, glutamato, carnitina, Tirosina, fosfocolina, LPC (16:0), PC (16:0/16:1), 2 PC (16:0/20:5), TAG (16:0/16:0/18:1) y TAG (18:2/18:2/18:2) y podrían considerarse como posibles BM de CP. En el estudio actual, hemos encontrado 9 metabolitos que explican la diferencia en el PMG de sanos y pacientes con CP (estearamida (0,38 veces), DG (14:0/22:1) (2,06 veces), DG (16:0/24:1) (1,68 veces), 6,10,14-trimetil-5,9,13-pentadecatrien-2-ona (0,63 veces), E, e-caroteno-3,3-diona (1,79 veces), 3-galacto-silactosa (1,45 veces), prolina (0,63 veces), glucosilgalactosil hidroxilisina (1,19 veces), 3-b-galactopiranosil glucosa (1,16 veces) y L-carnitina (1,16 veces). Ambos estudios se han realizado con metabolómica no dirigida, lo que sugiere posibles metabolitos de una forma tentativa, y que tendrían que confirmarse con estudios de metabolómica dirigida (MBD). Otros autores[8] en un estudio de 623 casos (CP) y controles, encuentran que la esfingomielina (d18:0/22:0), un esfingolípido, y el ácido taurodesoxicólico 3-sulfato, una sal biliar, pueden ser factores de riesgo y posibles BM de detección del cáncer de pulmón. El metabolismo de los lípidos y los aminoácidos puede contribuir significativamente a la etiología del cáncer de pulmón, que varía según el estado de tabaquismo. Liu et al.[22], al estudiar el papel de los BM metabolómicos para diferenciar en nódulos pulmonares, adenocarcinoma pulmonar de lesiones benignas, encuentran que solo el nivel de LysoPC (18:3) fue significativamente menor en el adenocarcinoma de pulmón nodular en vidrio esmerilado que en la población sana. Al respecto, hay que destacar que la metabolómica, a diferencia de otras ómicas, como la genómica o la transcriptómica, refleja la interacción entre el genotipo y el fenotipo[23], lo que es especialmente relevante en el cáncer de pulmón, patología en el que el factor ambiental, fundamentalmente el tabaco, es importante.

B) Biomarcadores que estaban alterados en el preoperatorio y que se normalizaron después de la cirugía. Este hallazgo podría indicar una posible resección curativa. Entre ellos la estearamida mostró la mayor área bajo la curva (AUC = 0,81).

Los metabolitos estearamida, DG (16:0/24:1), E, e-caroteno-3- 3-diona y prolina se encontraron alterados antes de la cirugía en pacientes con PRE, pero volvieron a los valores basales en ambos grupos postoperatorios. Este hallazgo podría indicar que una posible resección curativa podría influir en los niveles de estos metabolitos en pacientes con CP. Además, el análisis de las curvas

ROC mostró un buen valor de AUC para la estearamida (AUC = 0,81). Varios estudios previos consideraron la estearamida como un metabolito relacionado con el CP (http://cosbi4.ee.ncku.edu.tw/LCMD/). Este metabolito podría seguir estudiándose en futuros estudios con metabolómica dirigida para verificar su papel como posible biomarcador de resección exitosa.

C) Metabolitos que se alteraron en los grupos PRE y POST-A pero que se normalizaron con el grupo control en la situación POST-B. Esta situación podría interpretarse como que el valor del biomarcador tarda en normalizarse tras una posible curación. En este caso la glucosigalactosihidroxilicina mostró el mejor valor del área bajo la curva (0,89).

D) Cuando comparamos con el grupo control, encontramos varios metabolitos alterados antes e inmediatamente después de la cirugía, pero volvieron a los valores iniciales después de 3 a 6 meses de la cirugía. Este hecho podría indicar que después de 1 mes de la cirugía estos metabolitos continúan alterados. Sin embargo, estas alteraciones no fueron significativas a los 3 - 6 meses de la cirugía sugiriendo una potencial buena evolución. La abundancia de glucosilgalactosidasa hidroxilisina, L-carnitina y prolina fueron significativamente diferentes en PRE y POST-A en comparación con el grupo de control, pero estos cambios no fueron significativos en el grupo POST-B. Además, los metabolitos glucosilgalactosil hidroxilisina y L-carnitina mostró una buena especificidad y sensibilidad con valores de AUC de 0,89 y 0,79, respectivamente, en los grupos POST-A **(Tabla 2)**.

E) Metabolitos que estaban alterados respecto al grupo control en los grupos PRE y POSTB, siendo similares a los controles en el POST-A. Entendemos que, aunque tendremos que comprobarlo en la evolución podrían sugerir una recidiva precoz. Aunque en este caso el área bajo la curva fue menos de 0,75 (el valor de la significación clínica) la colina y algunos glicerofosfolípidos mostraron este comportamiento.

Encontramos que la colina y la SM (d17:1/24:0) se alteraron en el grupo POST-B en comparación con el grupo control, pero fueron similares al control en POST-A. Sin embargo, no se encontraron buenos valores de AUC en el análisis ROC. A pesar de eso, la desregulación de los glicerofosfolípidos y la SM en el CP ha sido ampliamente reportada[24].

F) Metabolitos alterados en los grupos PRE, POST-A y POST-B con tendencias similares en comparación con el grupo control. Esto podría ser explicado por un posible fracaso de la cirugía radical. Esto ocurrió al mantenerse la elevación de las 3-galactosil-lactosa, que estaba elevada en el preoperatorio respecto a controles y se mantuvo de igual forma después de la cirugía.

La DG (14:0/22:1) y la 3-galactosil-lactosa aumentaron significativamente en el grupo PRE y se mantuvieron aumentadas en los grupos POST-A y POST-B. Las alteraciones en estos metabolitos persistieron después de la cirugía. Además, la 3-galactosil-lactosa presentó un valor de AUC superior a 0,75 en los grupos PRE, POST-A y POST-B (Cuadro S6). Hipotéticamente, estos metabolitos podrían indicar el fracaso de la cirugía. En cuanto a la 3-galactosilactosa, la rápida proliferación de las células cancerosas aumenta sus requerimientos nutricionales, lo que resulta en la alta expresión de receptores similares a lectinas en la superficie de las células cancerosas que tienen una fuerte afinidad por los grupos manosilo y galactosilo[25].

Limitaciones del estudio: es importante considerar algunas limitaciones de este trabajo. En primer lugar, el número de muestras, especialmente el número de pacientes postoperatorios es relativamente pequeño. Además, se incluyeron muestras de los mismos pacientes que se recogieron 3 y 6 meses después de la intervención para considerar un mayor número de muestras en el grupo POST-B. El hecho de que la recogida postoperatoria coincidió con la epidemia del COVID-19 influyó en ello. Los pacientes con CPNCP tenían diferentes subtipos de CPNCP, y esta variabilidad podría afectar a los resultados.

En este sentido, para asegurar las conclusiones, sería necesario un estudio de validación en una población más grande para verificar estos nuevos conocimientos. Por otro lado, hay una falta de estudios que analicen el impacto de la cirugía y la inflamación en el metaboloma de personas sanas. Este hecho podría actuar como un factor de confusión que puede ser difícil de controlar en análisis posteriores basados en la cirugía.

CONCLUSIONES

En este trabajo, hemos aplicado una plataforma metabolómica no dirigida combinada basada en cromatografía RP e HILIC acoplada a QTOF para determinar metabolitos alterados en muestras de suero de pacientes con CP preoperatorios y postoperatorios, un mes y 3 - 6 meses después de la cirugía. Hemos analizado en este artículo la variación en el PMG tras la cirugía (estadios precoces) para ver si efectivamente cambia y si nos puede aportar datos sobre la posible curación o recidiva precoz tras la cirugía, siempre en comparación con el PMG de personas sanas. Este planteamiento nos ha aportado una información sobre posibles metabolitos, que nos puede orientar sobre la curación o recidiva precoz tras la cirugía. Hecho que consideramos muy relevante.

A priori no podemos estudiar el pronóstico del paciente al nivel individual ni ver la variación cuantitativa de los diferentes metabolitos tras la cirugía, datos que podremos obtener mediante seguimiento temporal a largo plazo o en los estudios que estamos iniciando con metabolómica dirigida.

Encontramos alteraciones en los niveles de esteramida, DG (16:0/24:1), E, e-caroteno-3-3-diona, prolina glucosilgalactosil hidroxilisina y L-carnitina en muestras de suero de pacientes con CP, que volvieron a los de un grupo de control basal entre 3 y 6 meses después de la cirugía. Además, los niveles de 3-galactosil-lactosa permanecieron alterados después de la intervención en algunos pacientes. Un estudio más profundo de estos metabolitos como biomarcadores mediante metabolómica dirigida podría proporcionar nuevos conocimientos sobre la posible recuperación o progresión del CP después de una cirugía con intención curativa. Hasta donde sabemos, este trabajo es el primero en abordar los cambios metabólicos en muestras de suero de pacientes preoperatorios y postoperatorios recolectadas en dos puntos temporales diferentes utilizando la combinación de cromatografía RP y HILIC para proporcionar una amplia red metabólica, que incluye metabolitos de diferentes polaridades.

CONTENIDO ASOCIADO

Declaración de disponibilidad de datos: los conjuntos de datos analizados durante el estudio actual están disponibles en ftp://massive.ucsd.edu/MSV000092213/(ID masiva MSV000092213).
*Información complementaria[14]. La información complementaria está disponible de forma gratuita en https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jproteome.3c00356.

Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio; parámetros de extracción de características recursivas por lotes; coeficiente de variación (CV) de metabolitos calculado en muestras de control de calidad (QC); valores PLS-DA Q2 y R2 de la comparación por pares de los grupos CONTROL, PRE, POST-A y POST-B; metabolitos alterados ordenados por clase; fragmentos MS/MS de metabolitos alterados para una identificación precisa; coeficiente de variación de la abundancia de metabolitos alterados por grupo; resultados del diagrama de Venn; sensibilidad y especificidad más lejanas a la línea diagonal (índice de Youden) para curvas ROC; gráficos de PCA que muestran la agrupación de las muestras de QC; perfiles metabolómicos de muestras de extracto; gráfico 2D-PLSDA de comparación por pares PRE-CONTROL; gráfico 2D-PLSDA de comparación por pares POST-A-CONTROL; gráfico 2D-PLSDA de comparación por pares; y principales clases alteradas de metabolitos en los grupos PRE, POST-A y POST-B en comparación con CONTROL (PDF).

ABREVIATURAS

DG: diacilglicéridos.
ESI: ionización por electrospray.
GC: cromatografía de gases.
HPLC: cromatografía líquida de alto rendimiento.
RP: cromatografía liquida reversa.
CP: cáncer de pulmón.
LysoPC: lisofosfocolina metro/el:
masa/carga MS: espectrometría de masas.
CPNCP cáncer de pulmón de células no pequeñas.
PC: fosfocolina.
PCA: análisis de componentes principales.
PLS-DA: análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales.
Q: cuadrupolo.
QQQ: triple cuadrupolo.
ROC: característica del operador del receptor.
CPCP: cáncer de pulmón de células pequeñas.
SM: esfingomielina.
ETIQUETAS:
triacilglicéridos
TOF: tiempo de vuelo

BIBLIOGRAFÍA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin 2021; 71: 209–49.
2. Yuan M, Huang LL, Chen JH et al. The emerging treatment landscape of targeted therapy in non-small cell lung cancer. Signal Transduct Target Ther 2019; 4: 61.
3. Hori S, Nishiumi S, Kobayashi K et al. Metabolomic approach to lung cancer. Lung Cancer 2011; 74: 284–92.
4. Rocha CM, Barros AS, Goodfellow BJ et al. NMR metabolomics of human lung tumours reveals distinct metabolic signatures for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. Carcinogenesis 2015; 36: 68–75.
5. Puchades-Carrasco L, Jantus-Lewintre E, Pérez-Rambla C et al.Serum metabolomic profiling facilitates the non-invasive identification of metabolic biomarkers associated with the onset and progression of non-small cell lung cancer. Oncotarget 2016; 7: 12904–16.
6. Callejón-Leblic B, García-Barrera T, Pereira-Vega A, et al. Metabolomic study of serum, urine and bronchoalveolar lavage fluid based on gas chromatography mass spectrometry to delve into the pathology of lung cancer. J Pharm Biomed Anal 2019; 163: 122–9.
7. Madama D, Martins R, Pires AS et al. Metabolomic profiling in lung cancer: a systematic review. Metabolites 2021; 11: 630.
8. Tang Z, Liang D, Deubler EL et al. Lung cancer metabolomics: a pooled analysis in the Cancer Prevention Studies. BMC Med 2024; 22: 262.
9. Liu Z, Wang L, Gao S et al. Prediction and analysis of the tumor invasiveness of pulmonary ground-glass nodules based on metabolomics. Clin Exp Med 2024; 25: 22.
10. Ahmed N, Kidane B, Wang L et al. Metabolic changes in early-

stage non-small cell lung cancer patients after surgical resection. Cancers 2021; 13: 280.
11. Yang D, Yang X, Li Y et al.Clinical significance of circulating tumor cells and metabolic signatures in lung cancer after surgical removal. J Transl Med 2020; 18: 243.
12. Chen Y, Ma Z, Li A et al.Metabolomic profiling of human serum in lung cancer patients using liquid chromatography/hybrid quadrupole time-of flight mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry. J Cancer Res Clin Oncol 2015; 141: 705–18.
13. Derveaux E, Geubbelmans M, Criel M et al. NMR-metabolomics reveals a metabolic shift after surgical resection of non-small cell lung cancer. Cancers 2023; 15: 2127.
14. Sánchez-Espirilla S, Pereira-Vega A, Callejón-Leblic B et al. Untargeted metabolomic study of lung cancer patients after surgery with curative intent. J Proteome Res 2023; 22: 3499–507.
15. Fan J, Upadhye S, Worster A. Understanding receiver operating characteristic (ROC) curves. CJEM 2006; 8: 19–20.
16. Sumner LW, Amberg A, Barrett D et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis: Chemical Analysis Working Group (CAWG). Metabolomics Standards Initiative (MSI). Metabolomics 2007; 3: 211–21.
17. Wei Z, Liu X, Cheng C, et al. Metabolism of amino acids in cancer. Front Cell Dev Biol 2021; 8: 603837.
18. Fadaka A, Ajiboye B, Ojo O et al.Biology of glucose metabolization in cancer cells. J Oncol Sci 2017; 3: 45–51.
19. Bian X, Liu R, Meng Y et al. Lipid metabolism and cancer. J Exp Med 2021; 218: e20201606.
20. Eltayeb K, La Monica S, Tiseo M et al. Reprogramming of lipid metabolism in lung cancer: an overview with focus on EGFR-mutated non-small cell lung cancer. Cells 2022; 11: 413.
21. Callejón-Leblic B, Pereira-Vega A, Vázquez Gandullo E et al. Study of the metabolomic relationship between lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease based on direct infusion mass spectrometry. Biochemie 2019; 157: 111–22.
22. Liu Z, Wang L, Gao S et al. Prediction and analysis of the tumor invasiveness of pulmonary ground-glass nodules based on metabolomics. Clin Exp Med 2024; 25: 22.
23. Lin C, Tian Q, Guo S et al. Metabolomics for clinical biomarker discovery and therapeutic target identification. Molecules 2024; 29: 2198.
24. Meng Q, Hu X, Zhao X et al. Circular network of coregulated sphingolipids dictates lung cancer growth and progression. EBioMedicine 2021; 66: 103301.
25. Chen F, Huang G. Application of glycosylation in targeted drug delivery. Eur J Med Chem 2019; 182: 111612.

Agradecimentos:

Agradecemos a todos los pacientes que se han ofrecido voluntariamente y donado sus biomateriales para el estudio.

Los autores agradecen las subvenciones 08/2018 de la Asociación de Neumología y Cirugía Torácica (Neumosur) y Ref. 651/2018 y 1155/2020 de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía (SEPAR), que apoyaron el reclutamiento de muestras en los hospitales y el registro en el biobanco. También agradecen la financiación del proyecto "Proteómica y metabolómica con heteroátomos marcados para el estudio de cáncer de pulmón. Influencia del microbiota intestinal" (Ref.: PY20_00366). Proyecto de Excelencia. Consejería de Economía, Conocimiento, Empresa y Universidad, Andalucía, España. Los autores también agradecen al Instituto de Salud Carlos III (AES16/01783) y la financiación sin restricciones del Grupo Menarini. Financiación para acceso abierto: Universidad de Huelva/CBUA. Agradecemos a la Fundación Andaluza Beturia para la Investigación en Salud (FABIS) su apoyo metodológico y asesoramiento.

Los autores declaran no tener ningún interés financiero en competencia. sus biomateriales para el estudio.

El estudio se realizó de acuerdo con los principios recogidos en la Declaración de Helsinki y aprobado por el Comité Ético de la Junta de Andalucía (Código Ético nº 1898-N-21). Los datos de los pacientes se anonimizan en una base de datos con control de acceso jerárquico para garantizar el acceso seguro a la información.