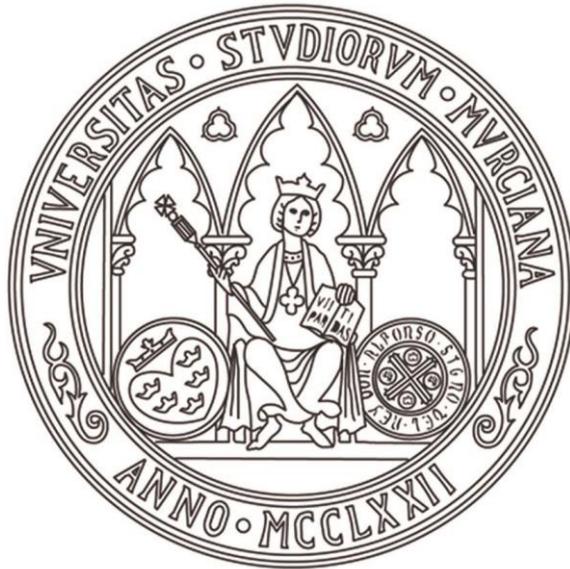




UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Análisis del microbioma-metiloma y estudio de asociación entre
Fusobacterium nucleatum y marcadores moleculares en el cáncer
colorrectal.

D. Ángel Escudero Jiménez
2023



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Análisis del microbioma-metiloma y estudio de asociación entre
Fusobacterium nucleatum y marcadores moleculares en el cáncer
colorrectal.

Autor: D. Ángel Escudero Jiménez

Director/es: D. Jorge Galán Ros, y
D. Pablo Conesa Zamora



**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD
DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D./Dña. ANGEL ESCUDERO JIMÉNEZ

doctorando del Programa de Doctorado en

CIENCIAS DE LA SALUD

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Análisis del microbioma-metiloma y estudio de asociación entre Fusobacterium nucleatum y marcadores moleculares en el cáncer colorrectal

y dirigida por,

D./Dña. JORGE GALÁN ROS

D./Dña. PABLO CONESA ZAMORA

D./Dña.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:

- La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 08 de Septiembre de 2023

Fdo.: Angel Escudero Jiménez

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis padres, Ángel e Isabel. Si he llegado hasta aquí ellos son los principales responsables. Mi fuerza, mi apoyo, mi suerte.

Gracias a mis Directores de tesis, Jorge Galán y Pablo Conesa. A Pablo, por abrirme las puertas y brindarme la oportunidad de subir otro peldaño más a nivel académico, y a Jorge por estar siempre, siendo apoyo e impulso en todo momento.

Y gracias a todas y cada una de las personas que se han cruzado en el camino que ya llevo recorrido, independientemente de la forma en la que haya sido, algo me han enseñado.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Anatomía y fisiología del intestino grueso	3
1.1. Anatomía del intestino grueso	3
1.2. Fisiología del intestino grueso	6
2. Cáncer colorrectal	9
2.1. Concepto	9
2.2. Estadios tumorales	10
2.3. Epidemiología	11
2.4. Etiología	17
2.5. Factores de riesgo	18
2.5.1 No modificables	18
2.5.2 Modificables	22
2.6. Manifestaciones clínicas	25
2.7. Pólipos colorrectales	26
2.8. Tipos CCR	29
2.8.1 CCR hereditario	29
2.8.2 CCR esporádico	31
2.9. Genética del CCR	37
2.9.1 Oncogenes	37
2.9.2 Genes supresores	39
2.9.3 Genes de reparación de emparejamiento erróneo	43
2.10. Diagnóstico	44
2.11. Tratamiento actual	48
3. Microbiota intestinal	49
3.1. Composición de la MI	50
3.2. Implicación fisiológica y metabólica de la MI	51
3.3. Microbiota y sistema inmune	52
3.4. Dinamismo de la microbiota	55
3.5. Disbiosis, respuesta inmune e inflamación en la inducción de la carcinogénesis	56
3.6. Disbiosis: Modelo “ <i>driver-passenger</i> ”	68

3.7.	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	73
4.	Biología molecular en la caracterización de la microbiota: Secuenciación genómica	74
4.1.	Introducción	74
4.2.	Generalidades NGS	76
4.3.	Secuenciación genómica de segunda generación	77
4.4.	Secuenciación genómica de tercera y cuarta generación	86
4.5.	Aplicaciones de secuenciación genómica	88
5.	Epigenética	92
II.	JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	97
III.	OBJETIVOS	101
IV.	MATERIAL Y MÉTODOS	105
1.	Diseño, población y criterios de estudio	107
2.	Variables del estudio	107
3.	Toma de muestras y almacenamiento	108
4.	Extracción de ADN a partir de tejido	108
5.	Estudio del microbioma bacteriano mediante NGS	108
6.	Estudio perfiles de metilación ADN mediante <i>microarray</i>	112
7.	Tratamiento con bisulfito para estudios de validación	116
8.	Pirosecuenciación	118
9.	Estudio de cuantificación mediante qPCR	119
10.	Inestabilidad de microsatélites (MSI)	121
11.	Fenotipo metilador de islas CpG (CIMP)	124
12.	Estudio de mutaciones (KRAS, BRAF, PIK3CA)	128
13.	Análisis estadístico	134
14.	Consideraciones éticas	135
V.	RESULTADOS	137
1.	Descripción de casos	139

2. CAPÍTULO 1: Estudio de microbioma	141
2.1 Análisis de la diversidad microbiana	141
2.2 Análisis de componentes principales	144
2.3 Análisis diferencial del microbioma	145
3. CAPÍTULO 2: Estudio género <i>Fusobacterium</i>-metiloma	147
3.1 Estudio de correlación <i>Fusobacterium spp.</i> - nivel metilación	147
3.2 Combinación de resultados de correlación y metilación diferencial	147
3.3 Estudio de validación por pirosecuenciación de metilación diferencial	149
3.4 Estudio de correlación entre <i>Fusobacterium nucleatum</i> y el porcentaje de metilación	149
4. CAPÍTULO 3: Análisis diferencial de la cuantificación relativa de <i>Fusobacterium nucleatum</i> en los distintos marcadores de interés en el CCR.	152
5. CAPÍTULO 4: Cuantificación relativa de <i>Fusobacterium nucleatum</i> en el diagnóstico del CCR.	162
VI. DISCUSIÓN	165
VII. CONCLUSIONES	181
VIII. BIBLIOGRAFÍA	185
IX. ANEXO	215
X. TABLAS Y FIGURAS	225
XI. ABREVIATURAS	235
XII. RESUMEN . SUMMARY	241

I. INTRODUCCIÓN

1. Anatomía y fisiología del intestino grueso

1.1 Anatomía del intestino grueso

El intestino grueso es la parte final del aparato digestivo que comprende desde el íleon terminal hasta el canal anal. Su longitud oscila entre 1,35 y 1,50 m, y su diámetro es de 7,5 cm en su parte inicial, disminuyendo en su progresión hacia la parte final hasta los 2,5 cm. Presenta distintas regiones características: ciego y apéndice vermiforme, colon ascendente, colon transverso, colon descendente, colon sigmoide, recto y canal anal (Figura 1) (1,2).

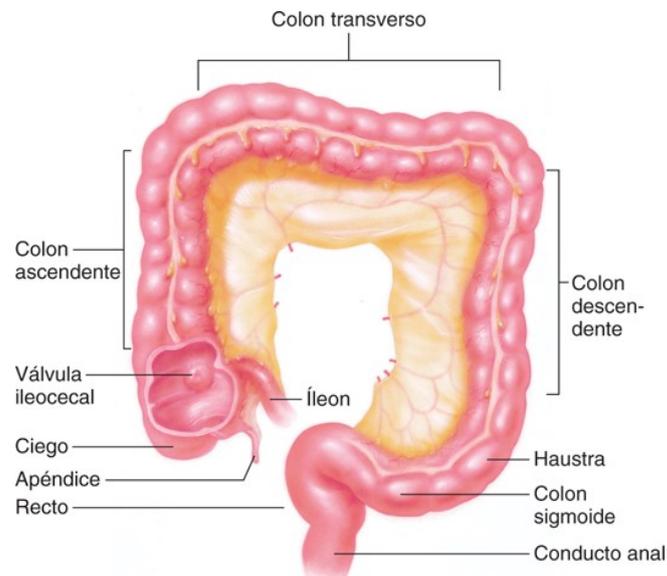


Figura 1. Esquema anatómico del intestino grueso. Fuente: Fisiología humana, 14ª edición, Stuart Ira Fox.

El colon es un órgano hueco que está recubierto por una pared, al igual que todo el intestino grueso, formada por distintas capas. Desde la parte más externa a la interna se encuentran: capa serosa, capa muscular gruesa, submucosa y mucosa. La capa mucosa engloba a su vez: epitelio, lámina propia (tejido conectivo) y *muscularis mucosae* (o muscular delgada) (Figura 2) (1,3). La capa serosa es una capa delgada de tejido conectivo que en algunos puntos se continúa con el peritoneo, mientras que la capa muscular se divide en una capa muscular interna compuesta por fibras de disposición circular, y otra capa externa formada por fibras de disposición longitudinal. La línea muscular externa se agrupa en las tenias o cintillas longitudinales, que a nivel de la porción distal del colon sigmoide se fusionan para constituir la túnica longitudinal del recto. La submucosa está formada por un tejido conectivo muy denso que contiene vasos sanguíneos de gran calibre y en algunas zonas también presenta tejido adiposo.

Introducción

La mucosa está formada por un epitelio simple cilíndrico que forma numerosas glándulas mucosas tubulares denominadas “criptas de *Lieberkühn*”, que aparecen como invaginaciones de la superficie epitelial. La lámina propia está constituida por tejido conjuntivo laxo en el que alberga células del sistema inmune (linfocitos, células plasmáticas, macrófagos), estructuras vasculares y nerviosas. La *muscularis mucosae* es una delgada capa de fibras de músculo liso con distinta orientación (2,4).

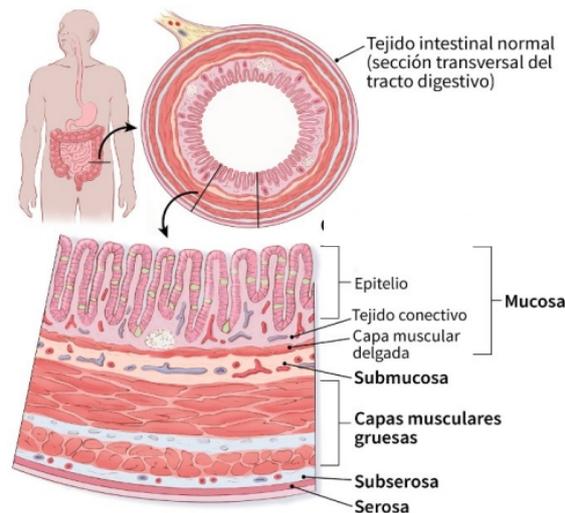


Figura 2. Capas que forman la pared del intestino grueso. Fuente: Imagen tomada de Sociedad Americana contra el cáncer. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-o-recto/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/clasificacion-de-la-etapa.html>

El colon ascendente (o derecho) se localiza en la parte anterior al riñón derecho y duodeno, se trata de una estructura retroperitoneal con irrigación vascular sustentada por ramas derivadas de la arteria mesentérica superior: arteria ileocólica y arteria cólica derecha. El colon transverso se considera una estructura intraperitoneal con una longitud variable, y su aporte vascular deriva de la arteria cólica media derivada de la arteria mesentérica superior. Los límites del colon transverso están definidos a la derecha por el ángulo hepático, y a la izquierda por la flexura esplénica. Tanto colon ascendente como colon transverso están inervados por el nervio vago. El colon descendente es una estructura retroperitoneal, y se define como el segmento de colon que comprende desde el ángulo esplénico hasta el colon sigmoide. Ambos, colon descendente y sigmoide, se localizan en el lado izquierdo, reciben suministro de sangre a través de ramas de la arteria mesentérica inferior: arteria cólica izquierda y arterias sigmoideas; y están inervados por nervios espláncnicos pélvicos (2,3). Su función consiste en transformar el contenido líquido del íleon en heces semisólidas,

Introducción

mediante la absorción de agua, sales y electrólitos, fermentación y producción de moco (2,4) .

El recto es la porción más distal del intestino grueso que se une proximalmente al colon sigmoide y converge distalmente en el canal anal. Al circular dentro de la pelvis, el recto es el órgano visceral más posterior en la cavidad pélvica con una relación anatómica diferente con las estructuras masculina y femenina. El recto mide entre 12 y 15 cm de longitud desde la unión rectosigmoidea hasta la línea dentada en el canal anal. Su curso está marcado por dos flexiones anteroposterior, con el recto primero siguiendo la concavidad del sacro en la flexión sacra, y luego cursando con una convexidad anterior en la flexión anorrectal. También hay tres flexiones laterales, hechas por pliegues submucosos en la luz, llamadas válvulas de *Houston*. La porción final del recto es la ampolla, que es un segmento expandido que descansa sobre el diafragma pélvico. El recto pasa al canal anal a nivel del músculo elevador del ano. La capa muscular interna se engrosa en la unión anorrectal, formando el esfínter anal interno mientras que la capa externa continúa como la capa longitudinal del esfínter anal. La arteria mesentérica inferior termina dando lugar a las arterias rectales superiores (hemorroidales) que irrigan el recto y el tercio superior del canal anal. Además también la arteria rectal media, que es una rama de la arteria ilíaca interna, irriga el recto distal y el canal anal proximal, así como la arteria rectal inferior, que es una rama de la arteria ilíaca interna, irriga el tercio distal del recto. El recto funciona principalmente como depósito temporal para el almacenamiento de heces y juega un papel integral en el control de la defecación, así como en el mantenimiento de la continencia (5).

Tabla 1. Características diferenciales entre las tres partes anatómicas del intestino grueso (6).

Características	Colon proximal	Colon distal	Recto
Origen embrionario	Intestino medio	Intestino grueso	Intestino grueso
Aporte sanguíneo	Arteria mesentérica superior	Arteria mesentérica inferior	Arteria mesentérica inferior
Inervación nerviosa	Vago	Sacro (S2, S3, S4)	Sacro (S2, S3, S4)
Función fisiológica principal	Absorción agua y nutrientes	Absorción agua y nutrientes	Almacenaje fecal
Otras funciones fisiológicas	Fermentación de etanol y de ácidos grasos de cadena corta	Fermentación proteica	

A pesar de las diferentes partes que consta el intestino grueso, en términos anatómicos, embrionarios y fisiológicos se han propuesto tres segmentos para entender los mecanismos del cáncer colorrectal (CCR). Estos tres grupos son: colon

proximal, colon distal y recto. Las principales diferencias entre estas tres localizaciones anatómicas están definidas según las características observadas (Tabla 1).

1.2 Fisiología del intestino grueso

Las principales funciones del intestino grueso son la absorción de agua y otras sustancias, mantener la osmolaridad de la sangre controlando los niveles de electrolitos, y almacenar las sustancias de desecho en forma de heces. Los patrones de contractilidad del colon son predominantemente no peristálticos y mezclan el contenido del colon de un lado a otro para mejorar el contacto con la mucosa absorbente. Un patrón menos frecuente de motilidad del colon que ocurre de 6 a 8 veces al día son las contracciones de propagación de alta amplitud que barren el colon, y a menudo desencadenan la necesidad de defecar. Además, el colon posee una microbiota bacteriana anaerobia capaz de fermentar diferentes componentes de la dieta y que también participa en la síntesis de algunos compuestos fundamentales para diversas funciones metabólicas (7).

Las condiciones fisiológicas del colon varían a lo largo del mismo. El pH presenta valores entre 5,6 y 5,7 en el colon ascendente y colon transversal, debido a la fermentación de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), mientras que en el tramo que abarca el colon descendente, colon sigmoide y recto, el pH aumenta hasta valores entre 6,6 y 6,8 debido a la absorción de los AGCC y la secreción de bicarbonato que parte de la mucosa intestinal. El potencial redox del colon también presenta una variación desde -200 mV a -300 mV, así como la presión de oxígeno en el lumen intestinal, que varía entre 299 y 39 mm Hg (7).

El epitelio que recubre la mucosa del intestino forma una monocapa celular polarizada formada por distintos tipos celulares. En el caso del intestino grueso, el epitelio está constituido por una única capa de células epiteliales situadas sobre la lámina propia donde se encuentran las criptas de *Lieberkühn*, unidad básica funcional del colon. Estas criptas se caracterizan por la presencia de distintos tipos celulares: colonocitos, células caliciformes y células enteroendocrinas (4). Aproximadamente la mitad superior de las criptas está revestida por un epitelio cilíndrico constituido por colonocitos y células caliciformes. Los colonocitos representan el tipo celular predominante en la mucosa y su función es la de absorber agua, electrolitos y otras moléculas de pequeño tamaño como los AGCC. Las células caliciformes son glándulas unicelulares secretoras de mucina, que están distribuidas de forma difusa entre los colonocitos, y cuya función es proteger al epitelio frente a la abrasión y adherencia e invasión por bacterias patógenas. Diseminadas a lo largo del fondo de la

Introducción

cripta se localizan las células enteroendocrinas, capaces de secretar el enteroglucagón y péptido intestinal vasoactivo que producen. En la mitad inferior de las criptas se encuentran células menos diferenciadas, existiendo un grupo de células madre, que a través de sucesivas divisiones asimétricas producen la renovación epitelial (4,7,8).

La polarización del epitelio y su permeabilidad están determinadas principalmente por la presencia de uniones estrechas (UE), que unen las células epiteliales entre sí a nivel apical. Las UE son estructuras complejas que involucran a un gran número de proteínas transmembrana conectadas entre sí y con otras proteínas intracelulares, y forman en el espacio intercelular una red de poros cuyos diámetro y profundidad variables determinan el grado de permeabilidad de la vía paracelular. La permeabilidad del epitelio en su globalidad está determinada en un 80% por la permeabilidad de la vía paracelular. La profundidad de las UE es mayor en los segmentos distales del tubo digestivo (colon) en comparación con la parte proximal (duodeno), y en consecuencia, el epitelio del duodeno y del yeyuno es más permeable que el del colon. Por otra parte, las UE delimitan dos compartimentos de la membrana plasmática del enterocito, el compartimento apical o luminal y el compartimento basolateral o sistémico, que difieren entre sí por su estructura, composición bioquímica y función. Las UE son catión-selectivas puesto que a pH fisiológico algunas de las proteínas que las componen poseen cargas negativas; esta característica favorece la distribución asimétrica de los electrolitos y permite la generación de una diferencia de potencial entre ambos compartimentos que contribuye a su polarización. Este fenómeno se ve reforzado debido a la presencia de la bomba Na^+/K^+ ATPasa en la membrana basolateral, que bombea Na^+ intracelular hacia el espacio intercelular, intercambiándolo por K^+ (en una relación de $3\text{Na}^+ / 2\text{K}^+$). Por todo ello, el epitelio del colon presenta una diferencia de potencial y resistencia iónica elevada, considerándose un epitelio cerrado o impermeable en comparación con el epitelio del intestino delgado, cuya diferencia de potencial y resistencia iónica presentan valores bajos. Por lo tanto en el epitelio del tubo digestivo existe un gradiente próximo-distal de polarización y de permeabilidad, que se relaciona de forma estrecha con sus funciones de transporte de agua y electrolitos, y de barrera (9).

El epitelio colónico se renueva continuamente a través de las células madre somáticas o “*stem cells*” (SC) presentes en la base de las criptas de *Lieberkühn* (Figura 3). La división de las SC es de tipo asimétrico, de forma que generan dos células hijas diferentes, una célula hija mantiene el fenotipo de SC y la otra se convierte en un

Introducción

progenitor, pasando a formar parte del compartimento de células proliferativas que migran hacia la superficie del tubo digestivo, sufriendo una diferenciación estructural y enzimática, hasta finalmente alcanzar el epitelio superficial del colon o recto en aproximadamente 5 días formando parte de la población celular funcional (8,10). Tras alcanzar la superficie apical de las criptas, los colonocitos más envejecidos son eliminados por la exfoliación provocada por el paso del contenido luminal, o principalmente, por activación del programa apoptótico y posterior asimilación de los productos de desecho por colonocitos adyacentes o por macrófagos subepiteliales (11).

Las SC se caracterizan por la retención de un fenotipo indiferenciado, manteniendo la capacidad de autonomía a lo largo de toda la vida del organismo, la producción continua de linajes de células diferenciadas completamente funcionales, y la capacidad de regeneración tras una lesión. Aunque son extremadamente susceptibles a la apoptosis, las células progenitoras descendientes inmediatas, concretamente hasta la tercera generación, son capaces de adquirir las características de las SC según demostraron una serie de estudios clásicos (10).

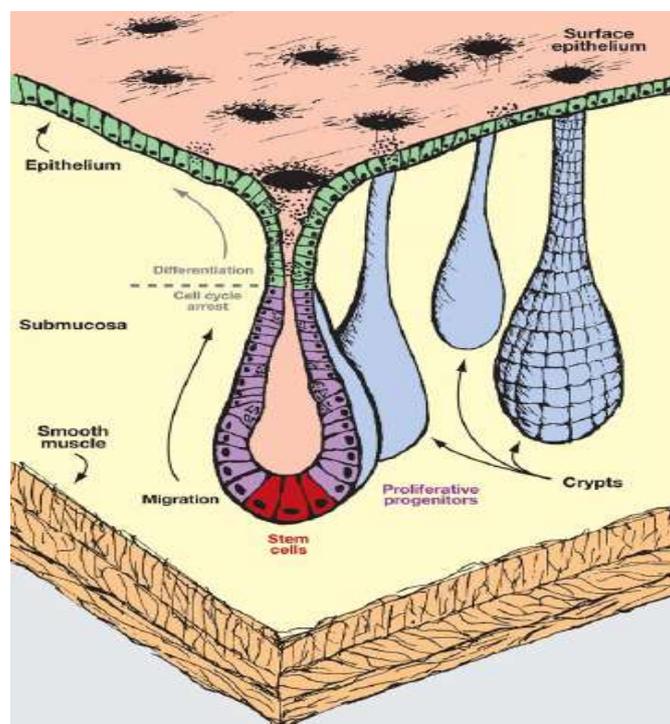


Figura 3. Estructura y distribución citológica en el intestino grueso. Fuente: imagen tomada de la publicación Sancho E, Batlle E, Clevers H. 2004 (10).

Existen evidencias que las SC son el origen de los tumores intestinales, esto es en parte debido a que presentan una vida más larga que les permite acumular

Introducción

mutaciones a lo largo de los años hasta que se desarrolla el tumor. Algunos estudios han concretado que serían las SC multipotentes las que originarían el tumor debido a su capacidad para diferenciarse en otros tipos celulares, incluyendo las células tumorales (12,13).

Diversos estudios en mamíferos apuntan a un importante papel de la vía de señalización Wnt en el CCR, concretamente mutaciones en el gen supresor tumoral APC (*Adenomatous polyposis coli*), relacionado con la ruta Wnt, provocan el cambio de esta vía de señalización hacia un estado activo de forma constitutiva, induciendo una proliferación masiva del número de SC y células progenitoras de las criptas de *Lieberkühn*, con la consiguiente aparición de carcinogénesis intestinal (14–16).

2. Cáncer colorrectal

2.1 Concepto

El término cáncer engloba un grupo numeroso de enfermedades que se caracterizan por el desarrollo de células anormales, que se dividen, crecen y se diseminan sin control pudiendo llegar a invadir cualquier tejido u órgano del cuerpo. Este fallo en el control celular es debido a mutaciones en genes que controlan la proliferación celular. Las células normales se dividen y mueren durante un periodo de tiempo programado, sin embargo la célula cancerosa o tumoral pierde la capacidad para morir y se divide casi sin límite, llegando a formar masas denominadas tumores o neoplasias que en su expansión pueden destruir o sustituir a los tejidos normales (17).

El cáncer se puede extender a los tejidos y órganos vecinos a través de un proceso de invasión local, migrando e infiltrando directamente las áreas contiguas. Además, las células tumorales pueden invadir los vasos sanguíneos y linfáticos, y viajar a través de ellos hasta otros órganos o tejidos distantes en los que puede implantarse creando nuevos focos de enfermedad o metástasis, también conocida como enfermedad diseminada, en contraposición al foco inicial del tumor, que se conoce como tumor primario. Pero ni todo cáncer origina tumores, ni todos los tumores son malignos, ya que también existen tumores que crecen a ritmo lento y que no se diseminan ni producen infiltración en tejidos contiguos, considerándose en este caso benignos (17).

El CCR es un tipo de cáncer que como su nombre indica se desarrolla en el colon o el recto, y que se puede desarrollar en cada una de las capas: mucosa, muscular o serosa. Surge como una lesión en la cripta que pueden progresar mediante cambios

Introducción

clínicos e histopatológicos pudiendo formar desde pólipos adenomatosos (tumores benignos) hasta carcinomas (cáncer maligno). El adenocarcinoma es el tipo más frecuente, constatando más del 90% de los casos de CCR (18,19). El CCR generalmente deriva de pólipos displásicos, sin embargo los pólipos son muy prevalentes en el ser humano, afectando a la mayoría de los adultos de acuerdo con la evidencia obtenida de estudios endoscópicos, y en su gran mayoría se comportan de manera benigna, progresando rara vez hasta cáncer. Además el tiempo necesario para esta transformación tan poco frecuente se estima que es como mínimo de diez años (20).

2.2 Estadios tumorales

Después del diagnóstico de CCR hay que averiguar si existe propagación, y si es así, hasta donde alcanza dicha diseminación. Este proceso en el que se determina la etapa o estadio del cáncer se conoce como estadificación y es una forma de describir dónde está ubicado el cáncer, si ha diseminado o hacia dónde, y si está afectando a otros órganos del cuerpo. Conocer el estadio puede ayudar a predecir el pronóstico (supervivencia) de un paciente, así como a tomar decisiones en cuanto al abordaje terapéutico del mismo.

En este sentido, la clasificación TNM en su 6ª edición, descrita por la *International Union Against Cancer (IUAC)* y la *American Joint Comité on Cancer (AJCC)* es la utilizada internacionalmente para la estadificación del CCR (Tabla 2) y se utilizan más que las clásicas de Astler-Coller modificada o de Dukes (21,22).

Tabla 2. Clasificación TNM según la AJCC / IUAC.

Tumor primario (T)	TX – No evaluable T0 – No hay evidencia de tumor primario Tis – Carcinoma in situ T1 – Invasión de submucosa T2 – Invasión de la muscular propia T3 – Invasión de la subserosa o tejido pericolónico o perirrectal no peritonizado T4 – Invasión de órganos o estructuras pudiendo invadir el peritoneo visceral
Ganglios linfáticos regionales (N)	NX – No evaluable N0 – No hay metástasis en ganglios linfáticos regionales N1 – Hay metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos regionales N2 – Hay metástasis en 4 ó más ganglios linfáticos regionales
Metástasis a distancia (M)	MX – No evaluable M0 – No hay metástasis a distancia M1 – Hay metástasis a distancia

Introducción

De acuerdo a lo anterior, el estadio I del CCR se define como T1 - T2, N0, M0. El estadio II se subdivide en IIA (si el tumor primario es T3, N0, M0) y IIB (para T4, N0, M0). El estadio III se subdivide en IIIA (T1 - T2, N1, M0), IIIB (T3 - T4, N1, M0) y IIIC (cualquier T, N2, M0), y por último, el estadio IV se define como cualquier T, cualquier N, y la presencia de una o más metástasis a distancia (MX) (Figura 4) (22,23).

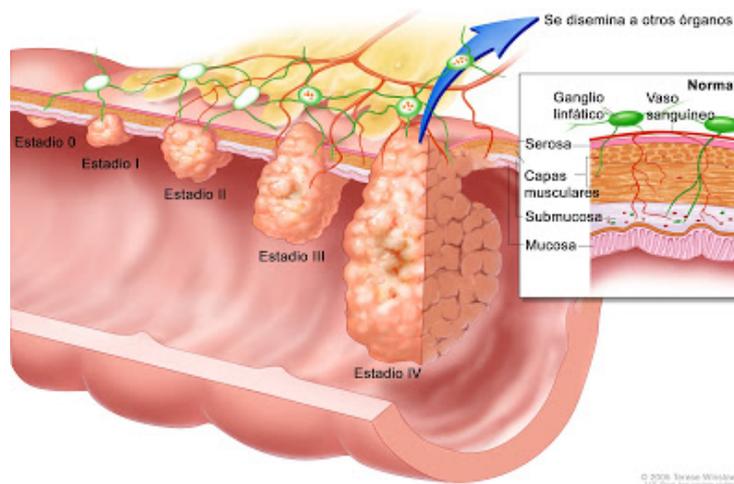


Figura 4. Desarrollo del CCR por sus diferentes estadios. Fuente: imagen tomada de la publicación Motta Ramírez GA, Alonso Blancas E, Lozano et al., 2011 (23).

Las clasificaciones clásicas de Astler-Coller modificada o la de Dukes se basan en el tumor primario y su penetración, la metástasis en ganglios linfáticos regionales y si se han extendido a lugares distantes (por ejemplo, hígado o pulmón), pero no consideran el número de ganglios afectados ni el compromiso de estructuras adyacentes al tumor como aspectos diferenciales para considerar grupos de pronóstico adverso (22).

2.3 Epidemiología

Dentro de todos los tipos de cáncer, el CCR es una de las neoplasias más frecuentes en nuestro medio y representa un problema importante de salud pública ya que en diferentes países desarrollados ocupa uno de los primeros lugares en incidencia y mortalidad. El CCR se sitúa como el tercer tipo de cáncer más frecuente en el mundo, por detrás del cáncer de mama y pulmón según la base de datos GLOBOCAN de la OMS (24). A su vez ocupa el cuarto lugar en cuanto a incidencia anual por detrás del cáncer de mama, pulmón y próstata, y el tercer lugar en cuanto a mortalidad por detrás del cáncer de pulmón y mama (Tabla 3).

Introducción

Tabla 3. Estimación de nuevos casos, incidencia y mortalidad para cada tipo cáncer a nivel mundial. Fuente: GLOBOCAN, página web “*Global Cancer Observatory*”, subsección “*Cancer Today*”. De la “*International Agency for research on Cancer*”, órgano perteneciente a la OMS. Acceso: septiembre 2022.

Tipo de cáncer	Estimación número casos	Incidencia (TB)	Incidencia (TAE)	Estimación número muertes	Mortalidad (TB)	Mortalidad (TAE)
Mama	2.261.419	58,5	47,8	684.996	17,7	13,6
Pulmón	2.206.771	28,3	22,4	1.796.144	23,0	18,0
Colorectal	1.931.590	24,8	19,5	935.173	12,0	9,0
Próstata	1.414.259	36,0	30,7	375.304	9,5	7,7
Estómago	1.089.103	14,0	11,1	768.793	9,9	7,7
Hígado	905.677	11,6	9,5	830.180	10,7	8,7
Cérvix	604.127	15,6	13,3	341.831	8,8	7,3
Esófago	604.100	7,8	6,3	544.076	7,0	5,6
Tiroides	586.202	7,5	6,6	43.646	0,56	0,43
Vejiga	573.278	7,4	5,6	212.536	2,7	1,9
Linfoma No Hodgkin	544.352	7,0	5,8	259.793	3,3	2,6
Páncreas	495.773	6,4	4,9	466.003	6,0	4,5
Leucemia	474.519	6,1	5,4	311.594	4,0	3,3
Riñón	431.288	5,5	4,6	179.368	2,3	1,8
Útero	417.367	10,8	8,7	97.370	2,5	1,8
Cavidad oral	377.713	4,8	4,1	177.757	2,3	1,9
Melanoma	324.635	4,2	3,4	57.043	0,73	0,56
Ovario	313.959	8,1	6,6	207.252	5,4	4,2
Encéfalo y Sistema nervioso central	308.102	4,0	3,5	251.329	3,2	2,8
Laringe	184.615	2,4	2,0	99.840	1,3	1,0
Mieloma múltiple	176.404	2,3	1,8	117.077	1,5	1,1
Nasofaringe	133.354	1,7	1,5	80.008	1,0	0,88
Vesícula biliar	115.949	1,5	1,2	84.695	1,1	0,84
Orofaringe	98.412	1,3	1,1	48.143	0,62	0,51
Hipofaringe	84.254	1,1	0,91	38.599	0,50	0,41
Linfoma Hodgkin	83.087	1,1	0,98	23.376	0,30	0,26
Testículo	74.458	1,9	1,8	9.334	0,24	0,22
Glándula salivar	53.583	0,69	0,57	22.778	0,29	0,23

Introducción

Vulva	45.240	1,2	0,85	17.427	0,45	0,30
Pene	36.068	0,92	0,80	13.211	0,34	0,29
Sarcoma Kaposi	34.270	0,44	0,39	15.086	0,19	0,18
Mesotelioma	30.870	0,40	0,30	26.278	0,34	0,25
Vagina	17.908	0,46	0,36	7.995	0,21	0,16
Total cáncer	19.292.789	247,5	201,0	9.958.133	127,8	100,7

TB: Tasa bruta; TAE: Tasa ajustada por edad

Atendiendo al sexo, el CCR también es uno de los cánceres más frecuentes tanto para hombres como mujeres, siendo el tercero en frecuencia e incidencia por detrás del cáncer de pulmón y próstata en el hombre, y el segundo por detrás del cáncer de mama en la mujer (Tabla 4).

Tabla 4. Estimación de nuevos casos, incidencia y mortalidad por tipo cáncer a nivel mundial según el sexo. Fuente: GLOBOCAN, página web “*Global Cancer Observatory*”, subsección “*Cancer Today*”. De la “*International Agency for research on Cancer*”, órgano perteneciente a la OMS. Acceso: septiembre 2022.

Hombre	Estimación número casos	Incidencia (TB)	Incidencia (TAE)	Estimación número muertes	Mortalidad (TB)	Mortalidad (TAE)
Pulmón	1.435.943	36,5	31,5	1.188.679	30,2	25,9
Próstata	1.414.259	36,0	30,7	375.304	9,5	7,7
Colorectal	1.065.960	27,1	23,4	515.637	13,1	11,0
Estómago	719.523	18,3	15,8	502.788	12,8	11,0
Hígado	632.320	16,1	14,1	577.522	14,7	12,9
Mujer	Estimación número casos	Incidencia (TB)	Incidencia (TAE)	Estimación número muertes	Mortalidad (TB)	Mortalidad (TAE)
Mama	2.261.419	58,5	47,8	684.996	17,7	13,6
Colorectal	865.630	22,4	16,2	419.536	10,9	7,2
Pulmón	770.828	19,9	14,6	607.465	15,7	11,2
Cérvix	604.127	15,6	13,3	341.831	8,8	7,3
Tiroides	448.915	11,6	10,1	27.740	0,72	0,50

TB: Tasa bruta; TAE: Tasa ajustada por edad

La incidencia de CCR varía según la zona geográfica, no sólo entre países sino también en áreas dentro de un mismo país, encontrándose las tasas de incidencia más altas en Europa, América del Norte y Oceanía. Estas diferencias geográficas parecen ser atribuibles a las diferencias en factores ambientales, como puede ser la

Introducción

dieta, que se imponen en un contexto de susceptibilidad genéticamente determinada. Se postula que el estilo de vida occidental unido a factores genéticos subyacentes, así como el aumento de longevidad en determinados grupos de población, podrían ser variables importantes a la hora de explicar la disparidad en la incidencia entre las distintas regiones geográficas (24,25). En el continente europeo el CCR supone el tercer tipo de cáncer después del cáncer de mama y de próstata en cuanto a incidencia mientras que es el tercer tipo de cáncer con mayor mortalidad tras el cáncer de pulmón y mama (Figura 5).

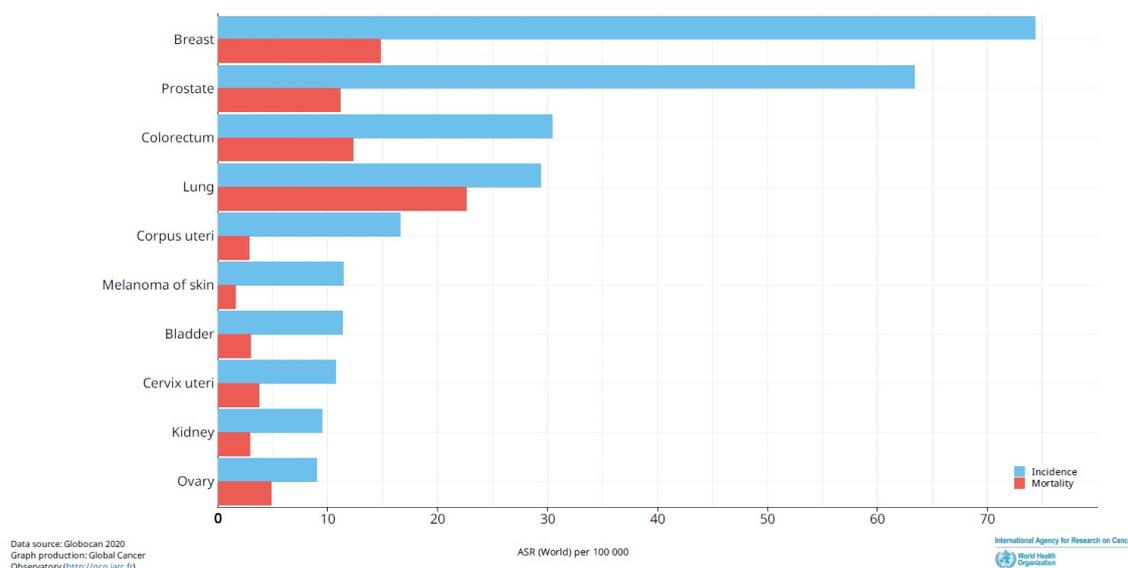


Figura 5. Estimación de la incidencia y mortalidad global por tipo de cáncer en Europa. Fuente: GLOBOCAN, página web “Global Cancer Observatory”, subsección “Cancer Today”. De la “International Agency for research on Cancer”, órgano perteneciente a la OMS. Acceso: septiembre 2022.

En España, el CCR también ocupa el tercer lugar en cuanto a incidencia por detrás del cáncer de mama y de próstata, en cambio es el segundo tipo de cáncer con mayor mortalidad tras el cáncer de pulmón (Figura 6).

Estos mismos datos diferenciados en función del sexo, posicionan al CCR como segundo tipo de cáncer con mayor incidencia después del cáncer de mama en mujeres, y segundo tras el cáncer de próstata en hombres. Mientras que en cuanto a mortalidad, el CCR es la tercera causa de muerte oncológica después del cáncer de mama y pulmón en las mujeres, y la segunda causa de muerte oncológica después del cáncer de pulmón en los hombres (Figura 7 y 8).

Introducción

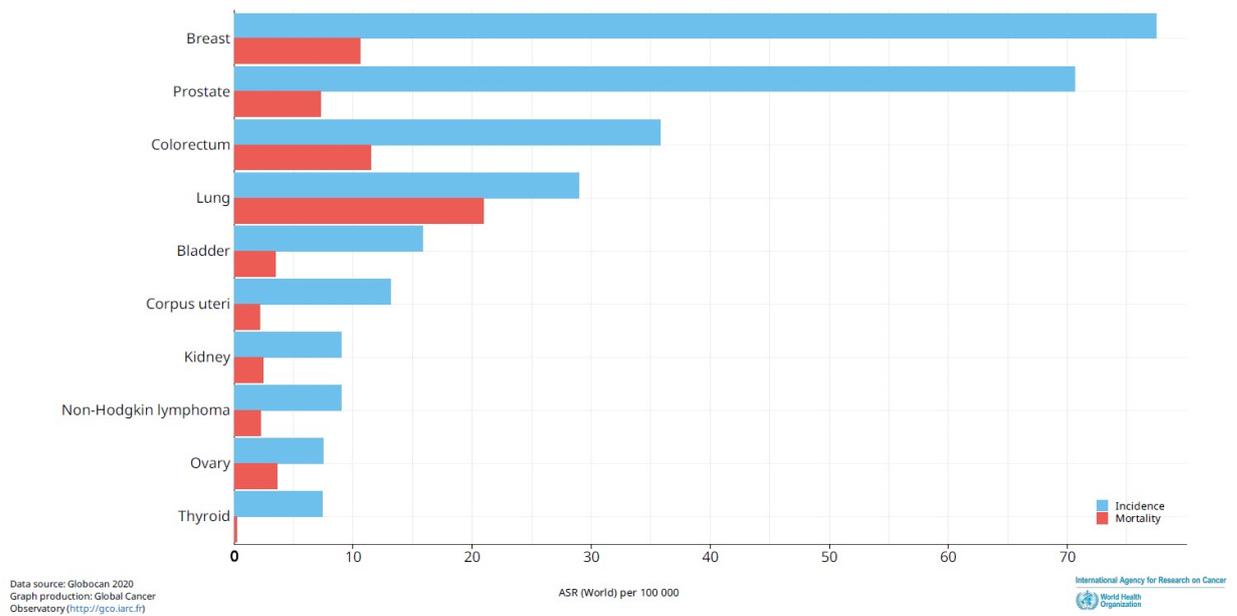


Figura 6. Estimación de la incidencia y mortalidad por tipo de cáncer en España. Fuente: GLOBOCAN, página web “Global Cancer Observatory”, subsección “Cancer Today”. De la “International Agency for research on Cancer”, órgano perteneciente a la OMS. Acceso: septiembre 2022.

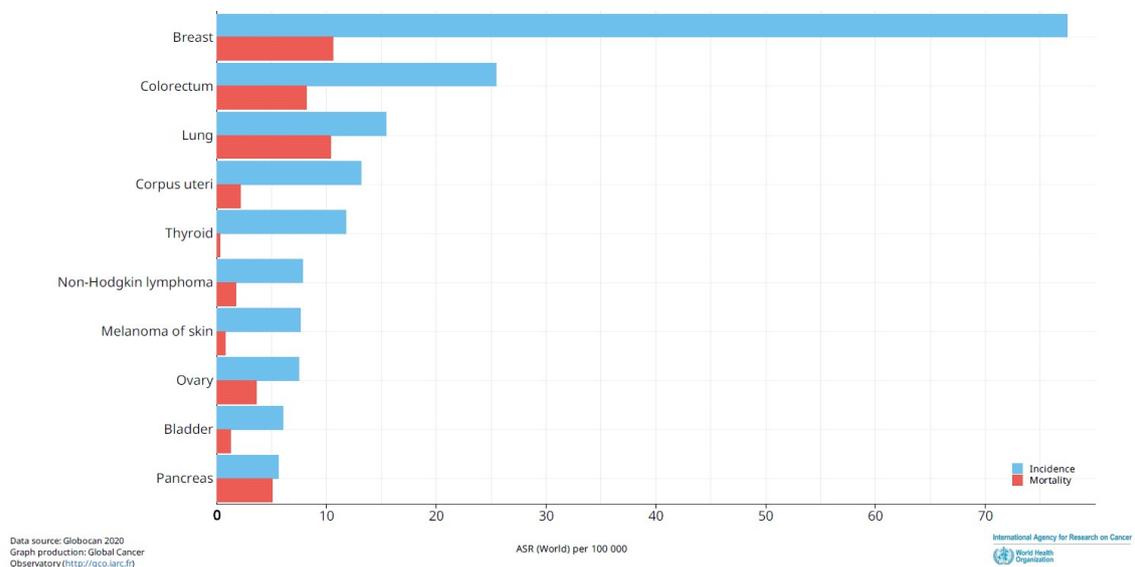


Figura 7. Estimación de la incidencia y mortalidad en el sexo femenino por tipo de cáncer en España. Fuente: GLOBOCAN, página web “Global Cancer Observatory”, subsección “Cancer Today”. De la “International Agency for research on Cancer”, órgano perteneciente a la OMS. Acceso: septiembre 2022.

Introducción

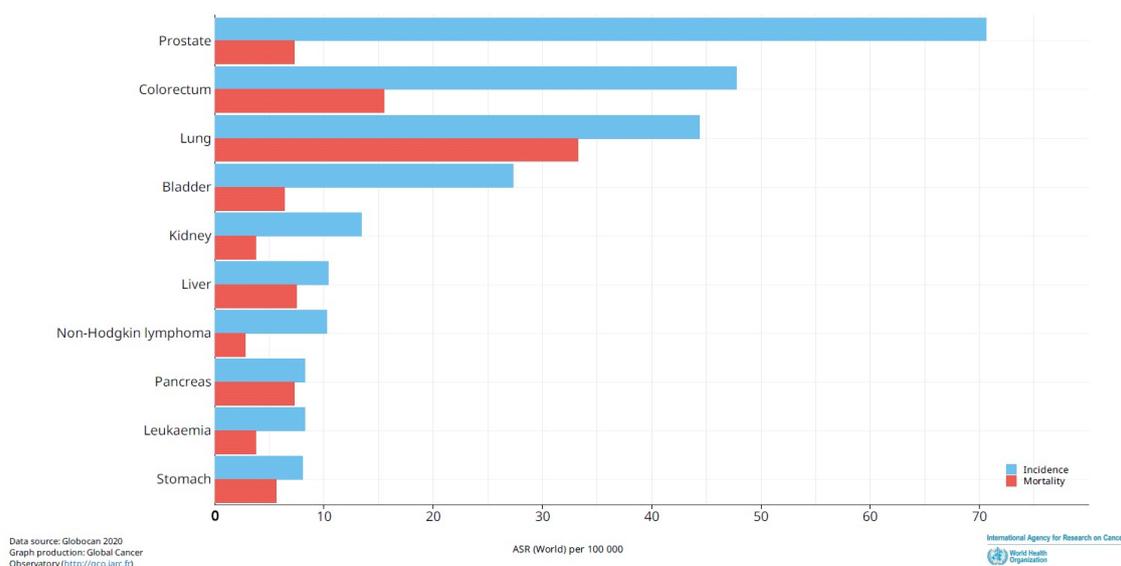


Figura 8. Estimación de la incidencia y mortalidad en el sexo masculino por tipo de cáncer en España. Fuente: GLOBOCAN, página web “*Global Cancer Observatory*”, subsección “*Cancer Today*”. De la “*International Agency for research on Cancer*”, órgano perteneciente a la OMS. Acceso: septiembre 2022.

La incidencia y mortalidad del CCR en los últimos años se ha estabilizado o incluso reducido en los países con mayores índices de desarrollo humano (IDH): EEUU, Australia, Nueva Zelanda y la mayoría de países de Europa occidental; en cambio se han incrementado en países con IDH medio-alto del este de Europa, Asia y América del Sur. Se han identificado tres patrones de tendencia en la incidencia y mortalidad por CCR en los últimos años: a) aumento tanto en la incidencia como en la mortalidad, como sucede en países con IDH medio y alto como son Rusia, China, Brasil o países bálticos (Estonia, Letonia); b) aumento en la incidencia con disminución en mortalidad, como se observa en países con IDH muy alto como Canadá, Reino Unido, Dinamarca y Singapur; y c) disminución tanto en incidencia como mortalidad, como se observa en países con mayor IDH tal como EEUU, Japón y Francia (26).

En EEUU, la incidencia del CCR durante el período 2010-2014 se redujo aproximadamente un 2% anual en ambos sexos. En cuanto a la tasa de mortalidad, durante el periodo 2011-2015 la disminución en CCR ha sido de un 2,5% en el hombre y un 2,7% en la mujer (27). En España, la incidencia de CCR en el periodo 2002-2012 ha experimentado un aumento del 1,8% anual en el hombre y del 1,6% en la mujer, mientras que la tasa de mortalidad se ha incrementado un 0,4% anual en el hombre y en cambio se ha reducido en un 0,7% anual en la mujer (26).

La reducción en la mortalidad debe estar relacionada con la mejora de la supervivencia mediante la adopción de mejores prácticas en el tratamiento y manejo

del CCR. Por otro lado, la eliminación de pólipos y los esfuerzos y mejoras en la detección temprana pueden ser responsables de la disminución de la incidencia de CCR, y aunque la introducción de pruebas de detección temprana pueden aumentar inicialmente las tasas de incidencia de CCR, se ha demostrado que reducen la incidencia a más largo plazo debido a la eliminación de pólipos precancerosos durante la colonoscopia (26).

Los resultados del EUROCORE-5 (*European Cancer Registry Study of Survival and Care of Cancer Patients*) muestran patrones y tendencias en la supervivencia de pacientes diagnosticados con CCR de diferentes países y regiones europeas. La supervivencia promedio en los países europeos a los 5 años en pacientes adultos (mayores de 15 años) diagnosticados con CCR durante el periodo de estudio (1999-2007) fue aproximadamente del 57% sin diferencias entre hombres y mujeres, pero con diferencias persistentes en los distintos países y zonas geográficas, mostrando los países de Europa del este, Reino Unido e Irlanda valores de supervivencia inferiores al valor promedio. Los resultados de los diferentes estudios EUROCORE, en los que se analizan los períodos 1999-2001, 2002-2004 y 2005-2007, muestran que la supervivencia de los pacientes con CCR ha mejorado en los últimos años en casi todos los países europeos, manteniendo así una tendencia de supervivencia en aumento (28,29).

De este modo, en comparación con otros países europeos, España ocupa una posición intermedia en cuanto a supervivencia promedio a los 5 años en CCR con un valor de supervivencia muy próximo al valor promedio europeo, y se constata una mejoría en los últimos años. Sin embargo, estos datos son orientativos, puesto que sólo se incluyeron 8 registros de cáncer de base poblacional que aportaron datos de 157.149 casos del periodo 2000-2007 (30).

2.4 Etiología

La carcinogénesis colorrectal presenta un fuerte componente genético, hecho más que evidente en los casos derivados de síndromes hereditarios. Pero otros elementos esenciales en el desarrollo del CCR son los factores ambientales, principalmente la dieta y el estilo de vida. Por ello, el CCR puede considerarse una patología multifactorial en la que los factores ambientales pueden modificar el comportamiento genético de las células epiteliales y dar lugar al inicio del proceso carcinogénico. Diferentes estudios epidemiológicos han caracterizado la historia natural del CCR como una progresión desde pólipos o adenomas hasta carcinoma debida a cambios

genéticos en las células epiteliales de la mucosa del colon (31,32). Las mutaciones en genes específicos pueden conducir a la aparición de CCR al igual que sucede en otros tipos de cáncer. Esas mutaciones pueden aparecer en oncogenes, genes supresores de tumores o genes relacionados con mecanismos de reparación de ADN (33). Sin embargo, no todos los adenomas progresan a CCR, y características como el tamaño del adenoma, la presencia de displasia de alto grado y la predominancia de vellosidades van a predecir el potencial maligno del adenoma (34).

Los resultados obtenidos a partir de ensayos controlados aleatorizados y estudios observacionales han demostrado que el riesgo de CCR podría reducirse significativamente a través de la detección temprana y la eliminación de lesiones precancerosas. Además, las posibilidades de curación y supervivencia son sustancialmente mayores cuando el tumor se detecta en una etapa temprana en comparación con una etapa tardía (35).

2.5 Factores de riesgo

Existen un gran número de factores de riesgo que pueden incidir en el CCR. Algunos de estos factores como la edad o la predisposición genética son factores no modificables, mientras que otros como los factores ambientales son factores sobre los que si existe capacidad de control por parte de las personas.

2.5.1 No modificables

i. Genética

Los CCR hereditarios, principalmente la poliposis adenomatosa familiar (PAF) y el síndrome de *Lynch* o CCR hereditario sin poliposis (HNPCC), representan tan sólo el 5% del total de casos de CCR. Se trata de trastornos genéticos específicos, la mayoría de los cuales se heredan de forma autosómica dominante, y se asocian con un riesgo elevado de desarrollar CCR. Con el fin de generar una clasificación más precisa se han establecido dos grupos: variantes con poliposis y variantes sin poliposis. En el grupo de las formas con poliposis, la PAF es la más común, y se caracteriza por la formación de múltiples pólipos potencialmente malignos en el colon. En contraste, las variantes sin poliposis están relacionadas con mutaciones en los mecanismos de reparación del ADN, y concretamente el HNPCC es el más común dentro de estas formas hereditarias. El HNPCC o síndrome de *Lynch* causa del 2-3% de todos los casos de CCR y está ocasionado por la presencia de mutaciones en uno de los alelos

Introducción

de genes que codifican para proteínas de reparación de ADN como *MSH2*, *MLH1*, *MLH6*, *PMS1* y *PMS2* (36). Existen otras formas de CCR familiar que representan aproximadamente el 25% de todos los casos de CCR, también causadas por mutaciones hereditarias, aunque no se clasifican dentro de los grupos de variantes hereditarias (37).

ii. Edad

La edad es un factor de riesgo importante en el desarrollo del CCR, cuya incidencia antes de los 40 años de edad es escasa y aumenta significativamente durante la quinta década de vida. La mediana de edad en el momento del diagnóstico de CCR es de 72 años, presentándose más del 90% de los casos de CCR esporádico a partir de los 50 años, y el 71% a partir de los 65 años (26,38). Datos más recientes obtenidos a partir de la base de datos americana SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results Programs*) sugieren que la incidencia de CCR está aumentando en el grupo de menores de 50 años mientras que está disminuyendo en los grupos de mayores de 50 años. En Europa, la incidencia de CCR durante el periodo 1990-2016 ha mostrado un aumento de aproximadamente un 2% anual en el grupo de edad comprendido entre los 20 y 49 años de edad, al igual que ha sucedido en otros países, incluido los Estados Unidos (39–41).

iii. Sexo

En cuanto al género encontramos que el riesgo de desarrollar CCR en hombres es ligeramente mayor que en las mujeres, presentando el hombre tasas de incidencia y mortalidad superiores a las mujeres (42,43). También es importante reconocer que la carga de CCR varía mucho dentro de los grupos raciales o étnicos. Las personas de raza negra tienen las tasas de CCR esporádico más altas de todos los grupos étnicos en los Estados Unidos, presentando además una mortalidad aproximadamente un 20% más alta en comparación con la raza blanca. Además, el CCR se produce a una edad más temprana y con una mayor frecuencia por debajo de los 50 años en afroamericanos. No está claro si las diferencias se deben a aspectos biológicos o a la accesibilidad a los programas de cribado de CCR, y es por ello que existen discrepancias entre las diversas sociedades científicas americanas en cuanto al inicio a los 45 años de edad de la realización de las pruebas de cribado poblacional para detección del CCR en población afroamericana (40,44).

iv. Antecedentes personales y familiares

Introducción

Otro factor de riesgo que influye en el seguimiento de los pacientes es la existencia de antecedentes personales de CCR o de pólipos adenomatosos. En un estudio observacional de seguimiento de pacientes tras resección quirúrgica de adenomas grandes (tamaño igual o superior a 1 cm) y pólipos con histología vellosa-tubulovellosa o displasia de alto grado, localizados en recto y colon sigmoides, el riesgo relativo para CCR a largo plazo era 3,5 veces mayor en comparación con la población general, mientras que los pacientes con adenomas pequeños (tamaño inferior a 1 cm) o pólipos de histología tubular presentaban un riesgo de CCR bajo (45).

Los antecedentes familiares de CCR también son un factor de riesgo importante, incluso fuera de los síndromes con predisposición genética definida. Varios estudios retrospectivos realizados a partir de registros poblacionales han demostrado que los familiares de primer y segundo grado de personas con CCR esporádico presentan riesgo de desarrollar CCR, independientemente de la edad del caso índice al diagnóstico, aunque el riesgo es especialmente elevado en familiares de casos índice de CCR con menos de 50 años de edad al diagnóstico (46,47). El análisis de los datos poblacionales contenidos en bases de datos de CCR muestran que tener un único familiar de primer grado afectado (padre, hermano o hijo) con CCR esporádico, aumenta el riesgo en casi el doble respecto a la población general (48). El riesgo es mayor si existe más de un familiar de primer grado afectado de CCR, o un familiar de primer grado y uno o más familiares de primer o segundo grado en la otra rama familiar, o incluso si el caso índice se diagnostica por debajo de los 50 años (49,50). Según los resultados de un metaanálisis sobre el riesgo de CCR en familiares de primer grado, el riesgo relativo es de 2,25 (IC 95%: 2,00–2,53), cuando hay más de un familiar con CCR el riesgo aumenta hasta 4,25 (IC 95%: 3,01–6,08), y cuando el CCR en el caso índice es diagnosticado antes de los 45 años el riesgo es de 3,87 (IC 95%: 2,40–6,22) (51).

Diversos estudios poblacionales retrospectivos han demostrado que los familiares de pacientes con adenomas también presentan un mayor riesgo de desarrollar adenomas o incluso CCR, siendo el riesgo mayor en familiares de primer grado cuando el caso índice presenta adenomas avanzados (tamaño superior a 10 mm de diámetro y/o displasia severa y/o componente histológico vellosa) y se diagnostica por debajo de los 60 años de edad (48,52). En algunos países como los Estados Unidos existen guías que recomiendan la detección temprana a partir de los 40 años de edad en aquellas personas con antecedentes de adenoma en familiares de primer grado menores de 60 años, o antecedentes de adenoma en dos familiares de primer grado

independientemente de la edad, mientras que otras guías recomiendan la detección temprana sólo con antecedentes de adenoma avanzado (38,53).

v. Enfermedades inflamatorias intestinales

Otro factor de riesgo para el CCR es la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), que por tratarse de un proceso inflamatorio crónico, produce un crecimiento celular anormal conocido como displasia, y aunque las células displásicas no son malignas, tienen más posibilidades de convertirse en anaplásicas y desarrollar un tumor. Existe una asociación bien documentada entre las formas crónicas de colitis ulcerosa (CU) y el cáncer de colon, siendo la extensión, duración y actividad de la enfermedad las variables más influyentes. Las formas extensas de CU confieren un aumento de riesgo para CCR entre 5 y 15 veces en comparación con la incidencia esperada en la población general, mientras que cuando la enfermedad se limita al lado izquierdo del colon el riesgo es 3 veces superior. El riesgo de sufrir CCR en personas con CU comienza a partir de los 8-10 años del diagnóstico de la enfermedad, y a partir de los 15 años si la afectación se limita al colon izquierdo. Existe evidencia de que algunos tratamientos farmacológicos pueden disminuir el riesgo de aparición de CCR siempre que mantengan la CU controlada, lo que justifica una reducción en la frecuencia de vigilancia (54,55).

Aunque existe menos evidencia, parece que la enfermedad de Crohn (EC) de larga evolución se asocia con un riesgo relativo similar a la CU extensa, aunque de forma menos consistente ya que no todos los estudios han llegado a las mismas conclusiones. Estudios poblacionales han obtenido un riesgo relativo para sufrir CCR en pacientes con EC de 2,5 veces superior al de la población general, que puede llegar a ser hasta 21 veces superior cuando el diagnóstico de EC se da en pacientes menores de 30 años (56,57). Un metaanálisis sobre el riesgo de CCR en EC establece que la incidencia acumulada tras 10 años de enfermedad es del 2,9% (1,5–5,3%) y aumenta a un 8,3% (4,5–15,1%) tras 30 años (58).

vi. Fibrosis quística

Los pacientes con fibrosis quística tienen un riesgo elevado de CCR. En un metaanálisis, la incidencia estandarizada agrupada resultaba ser 10,9 veces superior a la población general, y entre 2 y 5 veces mayor tras realización de trasplante pulmonar (59).

vii. Tratamiento radioterápico previo

Introducción

Aquellos pacientes que han sobrevivido a algún cáncer y que han sido tratados con radioterapia, sometidos a irradiación sobre la zona abdomino-pélvica, tienen un riesgo significativamente mayor de desarrollar neoplasia gastrointestinal, principalmente CCR. Las pautas del *Children's Oncology Group* recomiendan realizar una colonoscopia de control cada 5 años en aquellos pacientes que han superado un cáncer infantil y han recibido irradiación abdominal, pélvica, de columna o de todo el cuerpo, iniciándose dicho control 5 años después de haber finalizado la radioterapia o a partir de los 30 años de edad, aquello que suceda de forma más tardía (60,61). Los estudios poblacionales realizados a partir de bases de datos de pacientes diagnosticados de cáncer de próstata y tratados con radioterapia muestran un mayor riesgo de cáncer de recto, que es similar al observado en pacientes con antecedentes familiares de adenomas de colon. No está claro si dichos cánceres siguen una secuencia de adenoma a cáncer, y si el aumento de la detección de adenomas en dichos pacientes mejoraría la tasa y los resultados de detección del cáncer. A diferencia de los adultos supervivientes de cáncer infantil, actualmente no se recomienda una mayor vigilancia en este grupo (62,63).

2.5.2 Modificables

Existen otros factores que son potencialmente modificables: la obesidad, el consumo de tabaco, el consumo excesivo de alcohol, el consumo excesivo de carne procesada y la falta de actividad física (sedentarismo), que se han identificado como factores de riesgo en estudios observacionales, pero que en la actualidad no condicionan las recomendaciones de los programas de cribado para la detección de CCR.

i. Dieta

El factor ambiental más determinante en la aparición de CCR es la dieta, un factor ampliamente estudiado en su implicación con el estado de salud, ya que actualmente es una de las mayores fuentes de exposición a carcinógenos medioambientales. Una de las principales razones por las que existe gran interés en cuanto a la relación entre cáncer y dieta, es la observación en numerosos estudios de las importantes diferencias en la tasa de incidencia de tumores específicos entre distintos países e incluso entre poblaciones con diferentes costumbres nutricionales. La evidencia más convincente de que la ingesta de alimentos puede afectar el riesgo de CCR no se relaciona con ningún nutriente o alimento en particular, sino que sugiere la importancia de una ingesta excesiva de nutrientes en comparación con el gasto energético. Es probable que los mecanismos subyacentes asociados con la ingesta excesiva de nutrientes y la obesidad sean similares a los reconocidos para en el síndrome

metabólico (64). En relación directa con las dietas hipercalóricas encontramos los estados de sobrepeso y la obesidad, que no son más que el resultado de un desequilibrio entre el ingreso y el gasto de energía. Este balance positivo se traduce en un aumento de la masa corporal y provoca varios desajustes metabólicos relacionados con la carcinogénesis colorrectal, como el desarrollo de la resistencia a insulina e hiperinsulinemia (65). Se ha comprobado que la insulina estimula la proliferación y reduce la apoptosis en líneas celulares de cáncer de colon, promoviendo el crecimiento de tumores colorrectales en modelos animales. En un estado de hiperinsulinemia aumentan los niveles de IGF-1 (*Insulin Growth Factor I*), de forma que la activación de los receptores para este factor de crecimiento presentes en el colon produce la inhibición de la apoptosis en colonocitos y la proliferación celular, lo que puede traducirse en un fenómeno de expansión clonal de las células epiteliales colónicas. Además, la producción excesiva de reservas lipídicas (adiposidad), se asocia con aumento en los niveles de leptina y aumento en la resistencia a la propia leptina, de forma que la leptina deja de inhibir la producción de insulina en el páncreas, conduciendo a una fase de hiperinsulinemia y resistencia a insulina (64).

Aunque los datos no son completamente consistentes, el consumo prolongado de carne roja o carnes procesadas parece estar asociado con un mayor riesgo de CCR, y en particular con CCR de localización distal. La producción de hidrocarburos aromáticos policíclicos y aminos heterocíclicos cancerígenos producidos a partir de proteínas en el proceso de carbonización cuando se cocina la carne, se ha visto implicado como un riesgo para el desarrollo de CCR (66). En base a la gran cantidad de datos y a la constante asociación de CCR con el consumo de carnes procesadas en los diferentes estudios poblacionales, la OMS las ha clasificado como carcinógenos del grupo 1. En cuanto al papel carcinogénico del consumo de carne roja la evidencia es limitada, pero parece que la liberación de grupos hemo en el intestino puede favorecer la formación de compuestos N-nitroso cancerígenos y de aldehídos citotóxicos y genotóxicos por lipoperoxidación (67). Se clasifica la carne roja como carcinógenos del grupo 2A (probablemente asociados) aunque el riesgo absoluto de CCR es pequeño y variable entre las personas, por lo que el consumo moderado de este tipo de carne es una práctica aceptable dentro de una dieta sana y equilibrada (68).

ii. Sobrepeso-Obesidad y actividad física

El aumento de peso se asocia de forma significativa con un aumento leve-moderado en el riesgo de CCR durante la edad adulta, y la obesidad también parece aumentar la

Introducción

probabilidad de muerte por CCR (69). Los mayores niveles de tejido adiposo visceral, componente activo de la grasa corporal total, producen secreción de citoquinas proinflamatorias que producen inflamación crónica de bajo grado a nivel de colon y recto que conduce a la inducción de factores de estrés oxidativo, que van a producir desregulación de múltiples vías moleculares (involucradas en la diferenciación, supervivencia, apoptosis y necrosis celular) relacionadas con el desarrollo del CCR. Otros factores presentes en la obesidad, como la resistencia a la insulina e hiperinsulinemia también favorecen el desarrollo de CCR (70).

La falta de actividad física y el sobrepeso se asocian al 25-33% de los casos de CCR, mientras que una actividad física regular junto con una dieta equilibrada reduce este riesgo. Los datos obtenidos a partir de un gran estudio prospectivo realizado sobre una población europea heterogénea han demostrado una reducción de riesgo para el cáncer de colon del 20% al 25% en la población físicamente activa, particularmente en el cáncer de colon de lado derecho, donde la reducción de riesgo observada era del 35%. Además, esta asociación inversa entre actividad física y cáncer de colon de lado derecho era mayor en la población de peso normal (IMC < 25) y con baja ingesta de calórica (menos de 2.351 kcal/día), y aunque los beneficios de la actividad física también se observaban en la población con sobrepeso (IMC = 25-30), este beneficio era mayor cuanto más bajo era el IMC y más baja la ingesta calórica (71).

iii. Tabaco

El tabaquismo se asocia con una mayor incidencia y mortalidad por CCR. Un metaanálisis realizado a partir de estudios observacionales estimaba que, tanto el riesgo de desarrollar CCR como la mortalidad aumentaban entre los fumadores, siendo la asociación mayor para el cáncer de recto en comparación con el cáncer de colon (72). El tabaco también es factor de riesgo para todos los tipos de pólipos de colon, siendo especialmente elevado para los adenomas avanzados, y puede aumentar el riesgo de CCR en pacientes con HNPCC (73,74). Este efecto se debe al alto contenido de carcinógenos que contiene, aunque sólo se ha encontrado una relación significativa para a largo plazo, independientemente que hayan dejado de fumar o no (75).

iv. Alcohol

Varios estudios muestran la asociación entre el consumo de alcohol y un mayor riesgo para CCR. Los metaanálisis publicados concluyen que existe un aumento significativo en el riesgo de CCR en el caso del consumo moderado (2-3 bebidas por

día) y consumo elevado (≥ 4 bebidas por día), en cambio no en el caso del consumo leve (≤ 1 bebida por día) (76). El riesgo puede estar relacionado por el papel carcinogénico y mutagénico del acetaldehído producido en el metabolismo del alcohol, así como con la disminución en la ingesta en la dieta de folato y la interferencia en su absorción intestinal por parte del alcohol (77).

2.6 Manifestaciones clínicas

En los pacientes con CCR pueden darse distintas situaciones en cuanto a la presentación clínica de la enfermedad. Generalmente la mayoría de los casos se diagnostican en etapas tempranas como resultado de la aplicación de los programas de cribado en CCR, cuando todavía no han aparecido síntomas (78). La sintomatología debida al CCR se debe al crecimiento del tumor hacia la luz intestinal o estructuras adyacentes, poniendo en evidencia el estado avanzado del mismo, y puede ser variada. Los síntomas y signos típicos asociados con el CCR incluyen (79,80):

- Presencia de sangre en heces o sangrado rectal.
- Cambios en el hábito intestinal o en la consistencia de las heces.
- Obstrucción intestinal.
- Anemia por déficit de hierro.
- Dolor abdominal persistente.

Existen otros síntomas menos habituales como son la distensión abdominal y/o náuseas y vómitos, que pueden ser indicadores de obstrucción. Con relativa frecuencia el CCR también causa síntomas generales como astenia, anorexia, pérdida de peso o fiebre, y también síntomas dependientes de la presencia de metástasis a distancia.

Las manifestaciones clínicas también van a diferir según la localización anatómica del tumor. Tal es así, que el CCR de localización distal se manifiesta en general por la emisión de sangre con las heces (hematoquecia) y/o cambios en el hábito intestinal, condicionados por la reducción de la luz del colon, que en algunos casos pueden ocasionar obstrucción intestinal. En cambio, en el CCR de localización proximal es más frecuente la existencia de una hemorragia digestiva oculta que ocasiona una anemia ferropénica secundaria. Además, el calibre de la luz intestinal es mayor, por lo que existe menor probabilidad de aparición de síntomas obstructivos. El dolor abdominal inespecífico puede ocurrir en los estadios avanzados del CCR de cualquier localización, y su causa puede deberse a una obstrucción parcial, diseminación a

peritoneo o peritonitis por perforación intestinal. El cáncer rectal puede causar tenesmo, dolor rectal y disminución en el tamaño de las heces (81,82).

2.7 Pólipos colorrectales

Un pólipo es una protuberancia macroscópicamente visible que se proyecta en la superficie de una mucosa. Los pólipos colorrectales generalmente son asintomáticos, pero pueden ulcerarse y sangrar, causar tenesmo si se encuentran en el recto, y cuando son de gran tamaño pueden incluso producir obstrucción intestinal. En función de su histología, los pólipos colónicos pueden ser: adenomatosos (70-80%), serrados (10-20%) o de otros tipos (inflamatorios, hamartomatosos o mucosos).

Los pólipos adenomatosos o adenomas surgen del epitelio glandular, presentan una morfología displásica y una diferenciación anormal de las células epiteliales en torno a la lesión. Los adenomas son los pólipos más prevalentes en el colon, constituyendo aproximadamente el 70% del total de pólipos de colon. Además el 30-50% de los pacientes con un adenoma contiene al menos otro adenoma sincrónico (83).

En base a su histología los adenomas se clasifican en tubulares, vellosos o tubulovellosos (84):

- **Adenomas tubulares:** representan más del 80% de los adenomas de colon y se caracterizan por presentarse como una red de epitelio adenomatoso ramificado. Los adenomas tubulares se forman a partir de túbulos epiteliales, son pequeños, sésiles o pediculados, y la probabilidad de transformación maligna es baja (5%).
- **Adenomas vellosos:** representan aproximadamente el 5% de los adenomas de colon y se caracterizan por glándulas que son largas y que se extienden directamente desde la superficie hasta el centro del pólipo. Los adenomas vellosos se originan a partir de formaciones digitiformes o papilares de tejido conectivo que recubren de células epiteliales, son de tamaño superior a los adenomas tubulares, en su mayoría son sésiles, y con una probabilidad de transformación maligna elevada (40%).
- **Adenomas tubulovellosos:** representan del 5% al 15% de los adenomas de colon y son aquellos adenomas con un componente velloso del 25% al 75%.

Para ser clasificado como adenoma tubular o velloso debe presentar un componente tubular o velloso de al menos el 75%.

Introducción

Los pólipos serrados, anteriormente conocidos como pólipos hiperplásicos, son un grupo heterogéneo de lesiones con un potencial de malignidad variable. La OMS los divide en tres categorías (85):

- **Pólipo hiperplásico (PH):** constituyen el 10-30% de todos los pólipos colónicos, y representan 80% de los pólipos serrados. Son de mayor prevalencia en edades avanzadas, por lo general se van a localizar en el tramo rectosigmoidal del colon y presentan un tamaño inferior a 5 mm. Son lesiones de arquitectura normal y características proliferativas de componente celular normal sin displasia (86,87).
- **Adenoma serrado sésil (ASS):** suponen el 15-20% de los pólipos serrados y son más frecuentes en el colon proximal. Se presentan como lesiones de superficie lisa y morfología plana o sésil con un tamaño superior a 5 mm, y habitualmente están cubiertas de una capa de moco. Histológicamente presentan anormalidades arquitectónicas con un patrón de crecimiento particular, y además pueden adquirir evidencia morfológica de displasia (88). Los ASS con focos de displasia se consideran las posibles lesiones precursoras del cáncer de colon esporádico con alta inestabilidad de microsatélites (89).
- **Adenoma serrado tradicional (AST):** son poco frecuentes (1-6%) y aparecen con más frecuencia en el tramo rectosigmoideo del colon. Pueden ser pedunculados o sésiles, histológicamente presentan “dientes de sierra” prominentes y una displasia citológica difusa pero a menudo leve (90,91).

Los AST y ASS se manejan clínicamente como pólipos adenomatosos y se recomienda su escisión completa. Sin embargo, debido a su naturaleza sésil y delimitación difusa, se necesita especial cuidado para asegurar una eliminación completa a través de la vía endoscópica. Existe evidencia, tanto molecular como clínica, de que este tipo de lesiones contribuyen de forma trascendente al desarrollo de CCR (92).

El **síndrome de poliposis serrada (SPS)** es una condición rara, caracterizada por la presencia de múltiples pólipos serrados y/o de gran tamaño, que predisponen al desarrollo de CCR, atribuible a la presencia de pólipos serrados con displasia, adenomas avanzados y a la presencia de pólipos colónicos proximales grandes o múltiples. Dentro del SPS se reconocen 3 fenotipos diferentes: proximal, distal y mixto.

Introducción

El fenotipo proximal se caracteriza por la presencia de múltiples ASS localizados en el colon proximal, el fenotipo distal se caracteriza por la presencia de múltiples PH en el rectosigma, y el fenotipo mixto se caracteriza por la presencia de pólipos serrados distribuidos a lo largo de todo el colon. Ciertas características son sugestivas de una predisposición genética, que incluye la multiplicidad de lesiones, la edad temprana de diagnóstico y la mayor prevalencia de antecedentes familiares de neoplasia. Hasta un 50% de los pacientes con SPS presentan antecedentes familiares de CCR, y el riesgo de CCR en los familiares de primer grado se multiplica por 5 con respecto a la población general. En una pequeña proporción de pacientes con SPS que presentan una poliposis adenomatosa concomitante se han identificado mutaciones germinales bialélicas en el gen *MYH* (93).

Los pólipos inflamatorios son proyecciones intraluminales no neoplásicas de la mucosa de componente estromal, epitelial e inflamatorio. Pueden ser pedunculados o sésiles según su forma de implantación y generalmente son de pequeño tamaño. No presentan riesgo de malignización, sin embargo su hallazgo obliga a descartar patologías inflamatorias asociadas. Se presentan en distintos tipos de colitis crónica de larga duración: colitis ulcerativa, colitis infecciosa, diverticulosis, zonas de anastomosis, y en algunos casos sin patología conocida asociada (94).

Los pólipos hamartomatosos están compuestos por tejido epitelial y estromal, son pediculados y pueden encontrarse tanto de forma aislada como de forma múltiple. En líneas generales son benignos aunque eventualmente pueden formar parte de poliposis donde el riesgo de malignización se incrementa. El pólipo juvenil es el más frecuente y conocido, se presentan principalmente en la población pediátrica aunque excepcionalmente se pueden encontrar también en adultos. El pólipo juvenil suele presentarse en forma aislada y presenta componente hereditario autosómico dominante, en concreto se relaciona con el gen *SMAD4* o *BMPR1A*. Los pólipos de Peutz-Jeghers se presentan como una proliferación arborescente de músculo liso, que divide al pólipo en lóbulos. Se trata también de un síndrome autosómico dominante asociado al gen *LKB1/STK11* y aunque se consideran benignos, ocasionalmente puede encontrarse focos de displasia convencional (94).

Los pólipos mucosos incluyen varios tipos de pólipos reactivos que comparten la característica común del prolapso de la mucosa, que aparece como resultado de tracción, distorsión por peristalsis traumática que conduce a torsión vascular, isquemia y reparación local. Están asociados a diversos cuadros como enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad diverticular y síndrome de úlcera rectal (94).

2.8 Tipos de CCR

2.8.1 CCR hereditario

El CCR hereditario incluye síndromes causados por mutaciones germinales en genes de alta penetrancia (*APC*, *MYH*, familia de genes *MMR*, *SMAD4*, *BMPR1*, *STK11* y *PTEN*), la mayoría de los cuales se heredan de forma autosómica dominante, y están asociados con un alto riesgo de desarrollar CCR. Estas variantes de CCR hereditario están ocasionadas por la mutación de uno de los dos alelos de un gen concreto que es heredado, de forma que cuando tiene lugar una mutación adquirida puntual en el otro alelo para ese gen se pierde la función del mismo y aparece la célula tumoral, y posteriormente el carcinoma. Las formas de CCR hereditario se pueden clasificar en variantes con pólipos y variantes sin pólipos, pero de forma conjunta representan aproximadamente el 5% del total de casos de CCR (Tabla 5) (95–97).

Tabla 5. Síndromes hereditarios y genes implicados en estadios iniciales del desarrollo de CCR.

Síndrome	Genes	Característica	Herencia	Estabilidad microsatélites
HNPCC	<i>hMLH1</i> , <i>MSH2</i> , <i>MSH3</i> , <i>MSH6</i> , <i>PSM1</i> , <i>PSM2</i>	Adenoma/Carcinoma	Autosómico dominante	MSI-H/L
PAF	<i>APC</i>	Adenoma colorrectal	Autosómico dominante	MSS
PAM	<i>MYTH</i> , <i>STK11</i>	Adenoma colónico	Autosómico recesivo	MSS
SPJ	<i>SMAD4</i> , <i>BMPR1A</i> , <i>PTEN / ENG</i>	Pólipos hamartomatosos	Autosómico dominante	MSS
Peutz-Jeghers	<i>STK11</i> , <i>LKB1</i>	Pólipos hamartomatosos	Autosómico dominante	MSS
Poliposis hiperplásica	-	PH, ASS	-	MSS/MSI-L

Las variantes de HNPCC están relacionadas con mutaciones en los mecanismos de reparación del ADN, y su forma más común es el síndrome de Lynch, que constituye el 2-3% del total de casos de CCR (98). El síndrome de Lynch está ocasionado por una

Introducción

mutación germinal en uno de los alelos de alguno de genes que codifican para proteínas de reparación del ADN tales como *MSH2*, *MLH1*, *MLH6*, *PMS1* y *PMS2*, aunque la mayoría de los casos tienen lugar en el gen *MLH1* o el gen *MSH2* (99,100). Como regla general, los pacientes con síndrome de Lynch tienen una mutación heredada en un alelo de uno de estos genes reparadores del ADN y el segundo alelo se inactiva en el CCR por mutación somática, pérdida de heterocigosidad o silenciamiento epigenético por hipermetilación del promotor. Como resultado, el mal funcionamiento del sistema de reparación del ADN, va a ocasionar la acumulación de errores durante la replicación del ADN, siendo más frecuente en secuencias de ADN repetitivas, como es el ADN microsatélite, donde la polimerasa es menos fiable. Los CCR que se desarrollan en pacientes con síndrome de Lynch se caracterizan por aparecer a partir de los 20 años de edad, con una edad promedio en el momento del diagnóstico de 48 años, y un predominio por el lado derecho del colon (101).

Entre las variantes con poliposis, destaca la PAF, caracterizada por la formación de múltiples pólipos potencialmente malignos en el colon, pero que es poco frecuente dentro de las formas de CCR hereditario. La PAF y sus variantes (síndrome de Gardner, síndrome de Turcot y poliposis adenomatosa familiar atenuada (PAFA)) representan aproximadamente el 1% del total de casos de CCR (99,102). La PAF está causada en el 90% de los casos por mutaciones de la línea germinal en el gen *APC*, un gen supresor de tumores involucrado en la vía de señalización Wnt, siendo la pérdida de esta función uno de los primeros pasos de la secuencia adenoma-carcinoma colorrectal. Las personas afectadas desarrollan adenomas múltiples a edades muy tempranas y los síntomas aparecen a una edad promedio aproximada de 16 años. El riesgo de CCR es muy elevado en estos casos y puede aparecer a partir de los 20 años de edad, mientras que el 90% de las personas no tratadas lo va a desarrollar a partir de los 40 años de edad (37,103).

La poliposis asociada al gen *MYH* (PAM), que representa menos del 1% de los casos de CCR, es un síndrome autosómico recesivo debido a mutaciones bialélicas de la línea germinal en el gen *MYH*, encargado de reparar las mutaciones del ADN ocasionadas por daño oxidativo y que afecta particularmente al gen *APC* (37). Este fallo en el sistema de reparación por escisión de bases debido a estas mutaciones, conduce a menudo a mutaciones somáticas, como las transversiones G:C >> T:A, especialmente en el gen *APC* (104). Las mutaciones Y179C y G396D son las dos más importantes en la raza caucásica, pero también existen otras mutaciones en individuos de otras razas y etnias. Los portadores de estas mutaciones bialélicas pueden exhibir una amplia variabilidad fenotípica, mientras que algunos individuos presentan

manifestaciones colónicas y extracolónicas indistinguibles de la PAF clásica. La mayoría de los casos se asocian con fenotipos atenuados de poliposis que exhiben menos de 100 adenomas. Los portadores de mutaciones genéticas bialélicas tienen un riesgo 28 veces mayor de desarrollar CCR en comparación con la población general (105,106).

Otros síndromes hereditarios de CCR son el síndrome de poliposis hamartomatosa (síndrome de Peutz-Jeghers, síndrome de poliposis juvenil (SPJ)), el síndrome de poliposis serrada y el síndrome de poliposis mixta hereditaria (99). Existen otras formas conocidas como CCR familiar que constituyen aproximadamente el 10% del total de casos de CCR, que se engloban bajo una condición heterogénea abarcando síndromes hereditarios verdaderos no reconocidos y otros con formas aparentemente esporádicas que se agregan en las familias (37,107).

2.8.2 CCR esporádico

El CCR esporádico es aquel derivado de mutaciones puntuales al azar que aparecen durante la vida de un individuo sin riesgo de transmisión hereditaria, implica la interacción de factores ambientales y genéticos, y sólo se ve afectada una célula de forma individual y sus descendientes. Este tipo de CCR representa entre el 80-85% del total de los casos de CCR, y se presentan preferentemente en el colon izquierdo. La patogénesis molecular del cáncer esporádico es heterogénea ya que las mutaciones pueden dirigirse a diferentes genes, aunque en más de dos terceras partes de los casos de CCR esporádico existe una sucesión específica de mutaciones que generalmente se inician en el gen supresor tumoral *APC*, que desencadena la formación de adenomas no malignos o pólipos adenomatosos. Aproximadamente el 15% de estos adenomas evolucionan a carcinoma en un período de unos diez años (33).

En cualquier caso de CCR, independientemente de su naturaleza hereditaria o esporádica, ha sido posible establecer que el pólipo adenomatoso o adenoma es una lesión premaligna que precede en la mayoría de ocasiones a la aparición del CCR, de manera que su extirpación reduce o incluso anula el riesgo de desarrollo del mismo. El conocimiento y estudio de la secuencia adenoma-carcinoma ha resultado trascendental en la caracterización de los mecanismos moleculares que participan en el desarrollo del CCR, ya que la progresión a través de las diferentes vías de carcinogénesis colorrectal se acompaña de la acumulación de alteraciones en

Introducción

diferentes genes importantes para el control del ciclo celular, como: oncogenes, genes supresores de tumor y genes de reparación del ADN (108).

Existen descritas al menos tres vías moleculares que conducen a la carcinogénesis colorrectal: la vía supresora o de inestabilidad cromosómica (CIN), la vía mutadora o de inestabilidad de microsatélites (MSI) y la vía serrada o del fenotipo metilador de islas CpG (CIMP). Aunque puede existir una superposición de estos mecanismos dentro del mismo CCR, por lo general uno de los mecanismos va a ejercer un papel dominante (Tabla 6).

Tabla 6. Clasificación molecular de las vías de carcinogénesis (109).

	Vía supresora	Vía mutadora	Vía Serrada		Vía Mixta
Tipo CCR	Hereditario y esporádico	Hereditario	Hereditario	Esporádico	Esporádico
Estado CIMP	Ausente	Ausente	Alto	Alto	Bajo
Estado MSI	MSS	MSI-H	MSI-H	MSI-L	MSI-L / MSS
Estado CIN	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
Mutación KRAS	Presente	Presente/Ausente	Ausente	Ausente	Presente
Mutación BRAF	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Ausente
Estado MLH1	Normal	Mutado	Metilado	Metilado parcial	Normal
Metilación MGMT	Ausente	Ausente	Metilado parcial	Metilado	Metilado

MSS: estabilidad de microsatélites; MSI-H: inestabilidad de microsatélites de alto nivel; MSI-L: inestabilidad de microsatélites de bajo nivel; CIMP: fenotipo metilador de islas CpG; CIN: inestabilidad cromosómica.

El análisis realizado por Fearon y Vogelstein en 1988 ha llevado a plantear un modelo basado en una sucesión de alteraciones genéticas, las cuales producen la activación de oncogenes e inactivación de genes supresores tumorales, siendo necesarias alteraciones en varios genes para que se desarrolle un tumor colorrectal maligno. Este modelo que se corresponde con la “vía supresora o de inestabilidad cromosómica”, explica el 85% de los CCR esporádicos y los casos de PAF, y afecta con más frecuencia al colon distal (33,110). En este modelo la gran mayoría de los cánceres surgen de un pólipo que se inicia en una cripta aberrante, cuando se alteran los mecanismos normales que regulan la proliferación y la diferenciación celular, de forma que primero evoluciona a un adenoma temprano (<1 cm de tamaño, con histología tubular o tubulovelloso), posteriormente progresa a un adenoma avanzado (>1 cm de tamaño y/o con histología velloso), y en un estadio posterior adquiere un elevado grado de displasia antes de convertirse finalmente en un carcinoma con capacidad invasiva (Figura 9) (111).

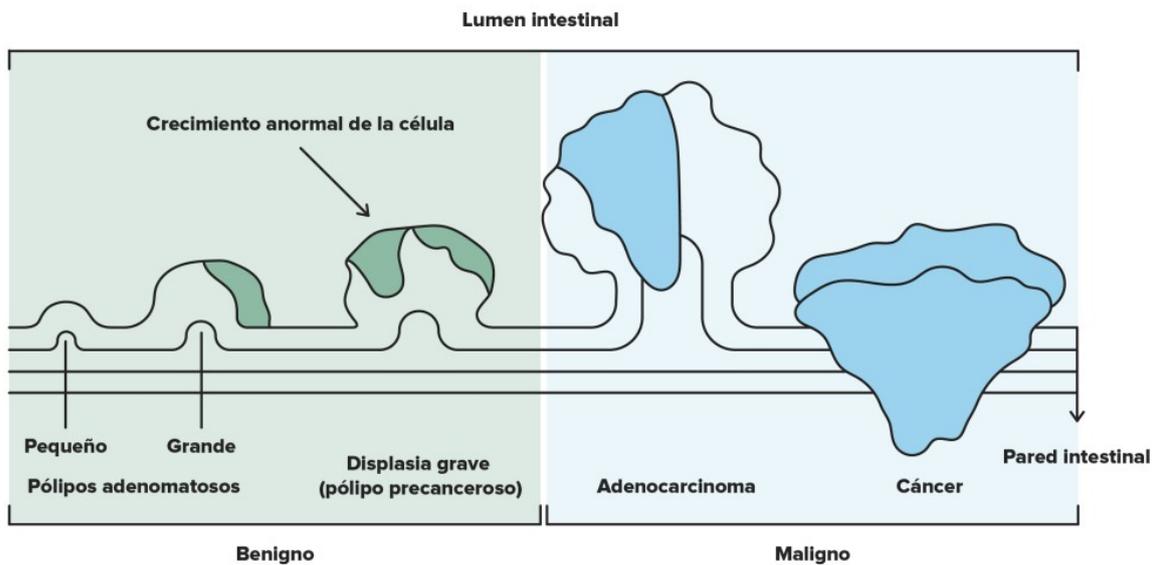


Figura 9. Representación gráfica de la evolución en el desarrollo del CCR. Fuente: imagen tomada de <https://www.clinicbarcelona.org/asistencia/enfermedades/cancer-de-colon-y-recto>

Las alteraciones de la vía supresora son:

- Mutaciones en genes *APC* y *CTNNB1*, importantes en la vía de señalización Wnt/ β -catenina, generan una resistencia a la degradación de β -catenina por lo que se acumula en citoplasma y se transloca al núcleo promoviendo la sobreexpresión de oncoproteínas, esto genera un fenotipo hiperproliferativo que favorece la ganancia de mutaciones en otros genes permitiendo la progresión a adenomas tempranos (110,112).
- El adenoma temprano progresa a adenoma intermedio debido a la mutación del oncogen *KRAS*, que produce su activación constitutiva, y que se traduce en una señal de mitosis continua e inhibición de la apoptosis (113).
- El adenoma intermedio presenta un patrón hiperproliferativo muy marcado que permite el desarrollo de un fenotipo de inestabilidad cromosómica que lleva a la pérdida de algunos genes (*DCC*, *SAMD4*, *SMAD2* e *ITF-2*), contribuyendo a la inmortalización de las células y favoreciendo la progresión al adenoma tardío (114,115).

Introducción

- El fenotipo de inmortalización del adenoma tardío conduce a la adquisición de más mutaciones, incluido gen *TP53*, que desencadena el desarrollo del adenocarcinoma (116).

Unos años después Liu et al. describieron una vía alternativa para la secuencia adenoma-carcinoma conocida como la “vía mutadora o de inestabilidad de microsatélites”, que se asocia con el HNPCC y el 15% de los CCR esporádicos (117,118). A diferencia de la vía supresora, esta vía no se ha relacionado con una cascada de eventos progresivos a escala genética, sino con la inactivación de los genes implicados en el sistema de reparación del ADN (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*), consecuencia de mutaciones en la línea germinal de alguno de los genes, o debido al silenciamiento epigenético a través de la metilación del promotor de alguno de los genes. De esta forma se predispone a la acumulación de errores de apareamiento en el ADN del genoma por defecto en los sistemas de reparación que ocurren con mayor frecuencia en secuencias repetitivas cortas del ADN, como son las zonas de ADN microsatélite, lo que supone el acúmulo de mutaciones en genes importantes en el control del ciclo celular contenidos en estas secuencias (*CTNNB1*, *TGF-βIIIR*, *IGF-IIR*, *BAX* y *PTEN*) (119–121). Mutaciones en el gen *CTNNB1* se relacionan con un fenotipo hiperproliferativo, mientras que mutaciones en los genes *TGF-βIIIR*, *IGF-IIR* y *BAX* le confieren a la célula resistencia a la apoptosis. Se ha descrito que las mutaciones en *TGF-βIIIR* y *BAX* contribuyen a la progresión del tumor pero no el inicio de éste, puesto que se han encontrado principalmente en CCR avanzado (121). Igualmente, la ganancia de una mutación o metilación en las dos copias del gen supresor *PTEN*, lleva a la inmortalización y malignización celular, favoreciendo rápidamente la progresión adenoma-carcinoma. Estudios adicionales han evaluado en casos de CCR con MSI, la presencia de mutaciones en los genes alterados en la vía supresora *TP53* y *KRAS*, y han encontrado que estas son menos frecuentes en este tipo de tumores (Figura 10) (122).

Los carcinomas serrados fueron descritos por primera vez por Jass y Smith y representan la progresión de una lesión serrada displásica (123). Los carcinomas serrados representan aproximadamente el 10% de todos los CCR y la evidencia actual respalda la existencia de una ruta alternativa para la carcinogénesis colorrectal en la que los pólipos serrados reemplazan al pólipo adenomatoso como lesión precursora del CCR. Las alteraciones genéticas más frecuentes incluyen la mutación en oncogenes *BRAF* y *KRAS*, que codifican quinasas pertenecientes a la casada de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), que es la vía de señalización celular

Introducción

implicada en la proliferación, diferenciación y apoptosis celular. Estas mutaciones en los oncogenes *KRAS* y *BRAF* se traducen en la activación constitutiva de la vía MAPK y en la proliferación celular no controlada, supervivencia celular, invasión y metástasis. Las mutaciones *KRAS* y *BRAF* son mutuamente excluyentes en pólipos colorrectales y CCR, siendo más comunes en AST la mutación *KRAS*, mientras que la mutación en *BRAF* es más frecuente en ASS (Figura 11) (124–126).

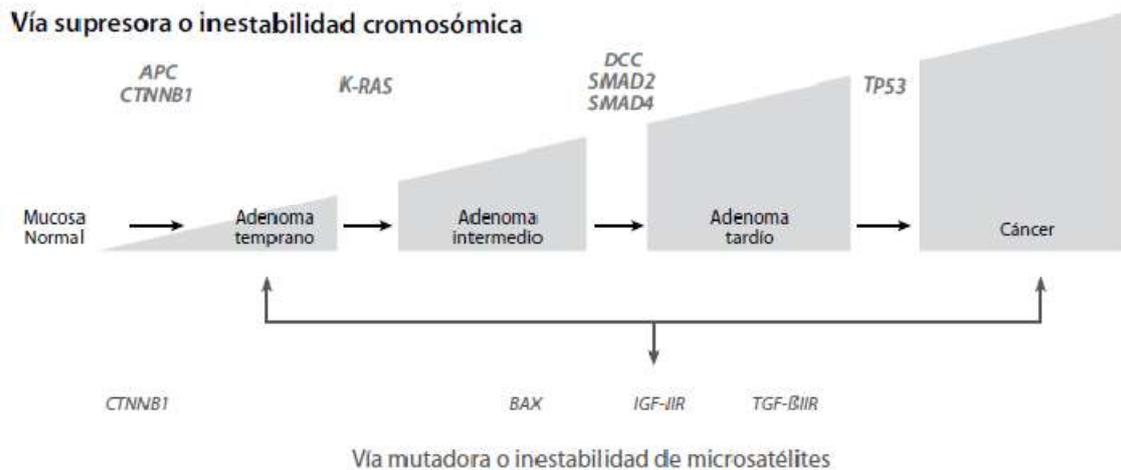


Figura 10. Proceso de carcinogénesis en CCR esporádico. Fuente: Imagen tomada de la publicación Sanabria-Salas MC et al., 2012 (108).

La hipermetilación del promotor génico o CIMP también está fuertemente relacionada con la vía serrada de carcinogénesis (125,126). La hipermetilación en las islas CpG de regiones promotoras puede causar silenciamiento transcripcional e inhibir la expresión génica de algunos genes, como puede ser el gen *MLH1*, implicado en la reparación de desajustes en el ADN (127). Esto conlleva una mayor susceptibilidad al acúmulo de mutaciones en las secuencias de ADN microsatélite (128).

En base a los estudios de correlación molecular e histológica se reconocen dos subtipos de vía serrada de carcinogénesis: la vía serrada sésil y la vía serrada alternativa (93,111).

- **Vía serrada sésil:** se caracteriza por presentar mutación en el protooncogen *BRAF* como alteración más precoz y mostrar el fenotipo metilador de islas CpG de alto nivel (CIMP-H). La lesión preneoplásica central es el ASS, se caracteriza por la presencia de MSI de alto nivel (MSI-H) y el CCR aparece con mayor frecuencia en el colon proximal. Generalmente son mucinosos y poco diferenciados.

Introducción

- **Vía serrada alternativa:** se caracteriza por mutación en el protooncogén *KRAS*, la presencia de un fenotipo metilador atenuado o de bajo grado (CIMP-L) con frecuente metilación del promotor de *MGMT*. La correlación histológica y molecular en esta vía es menor que en la vía serrada sésil, y se establece como lesión preneoplásica el AST. Además, presenta estabilidad de microsatélites (MSS) o MSI de bajo nivel (MSI-L) y CCR aparece con mayor frecuencia en el colon distal.

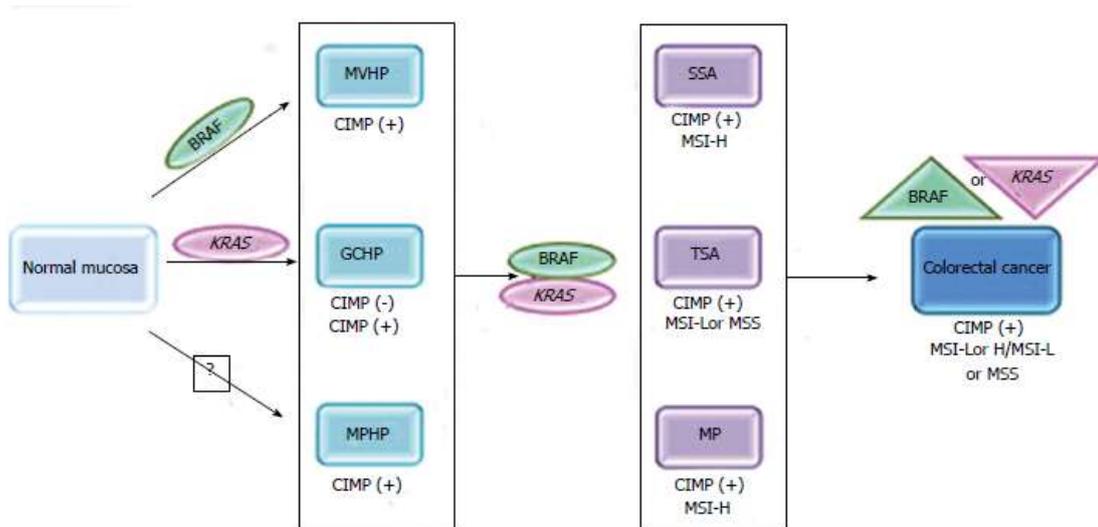


Figura 11. Esquema proceso carcinogénesis "vía serrada". Fuente: imagen tomada de Yamane L et al. Serrated colorectal carcinogénesis. World J Gastroenterol, 2014 (128).

Los estudios llevados a cabo por Mäkinen et al. (125) y Laiho et al. (129) sugieren que el pronóstico del cáncer tipo serrado era diferente al tipo convencional, y posteriormente García-Solano et al. (130) demostraron que efectivamente, las formas serradas tenían un peor pronóstico, especialmente aquellos casos de localización distal. Además, este mismo grupo de investigadores ha demostrado que las formas serradas presentan con mayor frecuencia factores histológicos de pronóstico adverso en el frente invasivo, tales como gemación tumoral, pseudofragmentos citoplasmáticos, patrón de crecimiento tumoral infiltrante y menor presencia de linfocitos peritumorales (131). Por tanto, el comportamiento clínico de las distintas variantes histológicas tumorales resulta de interacciones a muchos niveles. El reto es comprender las bases moleculares y determinar los factores que inician el desarrollo tumoral, los que dirigen su progresión y los que determinan su sensibilidad o resistencia a los tratamientos antitumorales.

2.9 Genética del CCR

2.9.1 Oncogenes

Los oncogenes son homólogos de genes celulares normales que participan en las vías de crecimiento celular y en la regulación del ciclo celular. Un cambio mutacional en un oncogén conduce a la activación constitutiva del gen, lo que resulta en una proliferación celular descontrolada (132). Entre los oncogenes implicados en el CCR esporádico se encuentran *RAS*, *SRC*, *MYC* y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (*HER2*), siendo *RAS* el de mayor importancia (133).

***RAS**

La familia del gen *RAS* está constituida por tres genes, *HRAS*, *KRAS* y *NRAS*, ubicados en los cromosomas 11, 12 y 1 respectivamente, que codifican para una serie de proteínas de membrana celular, proteínas RAS, homólogas a las proteínas G, que están implicadas en la regulación de la transducción de señales celulares relacionadas con el crecimiento y con la diferenciación celular. Las mutaciones en estos genes tienen la capacidad de transformar células normales, siendo la mutación que afecta al gen *KRAS* la más frecuente en el CCR (133,134).

Las mutaciones en *KRAS* son típicamente puntuales, suelen ocurrir en los codones 12 y 13, y en menor frecuencia en el codón 61, y dotan de resistencia frente a la hidrólisis por la GTPasa, por lo que la proteína permanece unida a GTP y es constitutivamente activa, resultando en un estímulo continuo de crecimiento celular. Las mutaciones *KRAS* se encuentran en hasta el 50% de los CCR esporádicos y en el 50% de los adenomas de colon de tamaño superior a 1 cm, pero rara vez en adenomas más pequeños. La ausencia de mutaciones *KRAS* en adenomas más pequeños sugiere que son adquiridas durante la progresión posterior del adenoma, sin embargo la presencia de mutaciones no se limita a lesiones displásicas, pudiéndose encontrar tanto en focos de criptas no displásicos previo al desarrollo del pólipo adenomatoso, como en hasta el 25% de los PH, pero su significado no está claro (134–136).

Además la bibliografía sugiere que estas mutaciones en *KRAS* son más comunes en el CCR proximal que en distal, y también se han asociado con el proceso de invasión tumoral y metástasis (134,137,138). Existe controversia en la asociación de esta mutación en *KRAS* con un peor pronóstico, y la posible explicación es la influencia de las diferentes mutaciones que puedan tener lugar dentro del gen (139). Los estudios multicéntricos RASCAL y RASCAL II evaluaron la importancia pronóstica de las

Introducción

mutaciones *KRAS* en los codones 12 o 13. Los resultados obtenidos sugieren que las mutaciones en *KRAS* podrían tener un efecto en la tasa de supervivencia de pacientes con CCR, y que la mutación específica del codón 12 podría aumentar el riesgo de recaída o muerte (140).

Los estudios más recientes respaldan el mal pronóstico con ambas mutaciones *KRAS*, tanto en el codón 12 como el 13, siendo el riesgo de recaída y de muerte hasta 1,5 veces mayor en comparación con pacientes de *KRAS* tipo salvaje. Además, los resultados muestran que en pacientes con CCR metastásico, el estado *KRAS* mutado se asocia con una supervivencia (libre de enfermedad y global) inferior en comparación con *KRAS* no mutado. En el metaanálisis realizado por Modest et al. las variantes más frecuentes del codon 12 de *KRAS* (G12V y G12D) no presentan un impacto significativo en la supervivencia global, mientras que la mutación *KRAS* G12C se asocia de forma significativa con una supervivencia global inferior en comparación con *KRAS* tipo salvaje. También se observa una tendencia similar en el caso de la variante *KRAS* G13D (141).

****BRAF***

BRAF es un protooncogen que se localiza en el cromosoma 7q34 y está constituido por 18 exones. Codifica para una proteína con actividad de tipo serina/treonina quinasa involucrada en la cascada de señalización, conocida como la ruta de la MAPK, que impulsa la proliferación, diferenciación, migración, supervivencia y angiogénesis celular. La desregulación de esta vía subyace en muchos casos de carcinogénesis. Esta vía está compuesta por la RAS (GTPasa), que activa a las proteínas de la familia RAF (ARAF, BRAF y CRAF). Las proteínas RAF activadas conducen a la fosforilación y activación de las proteínas MEK1 y MEK2, que posteriormente fosforilan y activan a las proteínas ERK que finalmente fosforilan a una serie de sustratos, incluidos múltiples factores de transcripción, y regulan varias actividades clave en la proliferación celular. Aproximadamente el 96% de todas las mutaciones en *BRAF* son una transversión de T1799A en el exón 15, lo que resulta en una sustitución de aminoácidos valina (V600E) que parece imitar la fosforilación reguladora, aumentando así la actividad en aproximadamente 10 veces en comparación con el tipo salvaje (142).

Las mutaciones BRAF V600E están presentes en el 7-10% de los CCR, y a pesar de ser poco frecuente, estudios recientes identifican dos fenotipos moleculares en base al estado de mutación BRAF V600E, puesto que van a presentar características clínicas y patológicas distintas. Un reciente metaanálisis concluye que los CCR con mutación

BRAF V600E son más comunes a partir de adenomas serrados, principalmente en el colon derecho, con una mayor incidencia en mujeres y pacientes de edad avanzada (edad > 60 años). Además, los CCR mutados BRAF V600E muestran con frecuencia poca diferenciación y presentan una histología mucinosa (143). Existe una relación de exclusión mutua entre la mutación BRAF V600E y las mutaciones en KRAS o en TP53. Además, se ha demostrado una fuerte correlación positiva entre la mutación en BRAF V600E con el estado MSI-H y con CIMP, de forma que casi la mitad de los casos de CCR MSI-H presenta también mutación en BRAF V600E. Las mutaciones BRAF V600E son particularmente frecuentes en los casos de CCR esporádicos en personas fumadoras, y se ha visto que en estos pacientes la presencia de mutación BRAF V600E parece anular el pronóstico favorable que generalmente se asocia con los tumores MSI-H (126,142,143). En estudios recientes se ha observado que la presencia de mutaciones en el gen *BRAF* reduce la supervivencia en los estadios III y IV, pero no en estadio II, por lo que la mutación de BRAF V600E puede considerarse marcador pronóstico para el CCR en estadio III-IV con poco impacto en decisiones terapéuticas. También el estado de MSI condiciona tanto el pronóstico como los resultados en el CCR con mutación en BRAF V600E, siendo la supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad más corta en pacientes con MSS, mientras que no se observa diferencias en cuanto a supervivencia entre los casos de CCR MSI-H con gen *BRAF* mutado y los casos CCR MSI-H con gen *BRAF* tipo salvaje (144–146).

Por el contrario, las mutaciones BRAF no V600E se encuentran con mayor frecuencia en hombre jóvenes, con predisposición por la localización distal, y con poca diseminación peritoneal en etapas avanzadas. Además, exhiben un comportamiento molecular completamente inverso y suelen presentarse de forma concomitante a mutaciones en el gen *KRAS*. Esto sugiere que la presencia de estas mutaciones BRAF no V600E pueden conferir la ventaja de que las células cancerosas presenten una menor capacidad proliferativa en comparación con otras mutaciones con un impacto negativo en el pronóstico del CCR (142).

2.9.2 Genes supresores

A diferencia de los oncogenes, los genes supresores de tumores normalmente tienen una función inhibitoria sobre el ciclo celular. Si estos genes se eliminan o se reduce su función, los mecanismos de control normales ya no están operativos, y tiene como consecuencia el desarrollo de un crecimiento continuo sin control. A nivel celular, los genes supresores de tumores actúan de manera recesiva de forma que la función de la proteína normal se pierde sólo cuando ambas copias del gen se inactivan por

Introducción

mutaciones puntuales, reordenamientos o deleciones. En los primeros estudios se observó una pérdida de heterocigosidad en diferentes porcentajes de casos de CCR para los cromosomas 5q (36%), 8p (50%), 17p (73%) o 18q (75%). Los presuntos genes supresores tumorales se identificaron posteriormente en 5q (gen *APC*), 18q (gen *DCC*, *SMAD4* y *SMAD2*) y 17p (gen *TP53*) (33,110).

***APC**

El gen *APC* es probablemente el más crítico en el desarrollo temprano de CCR, mientras que la presencia de mutación somática en ambos alelos está presente en el 80% de los casos de CCR esporádico, la presencia de mutaciones heterocigotas en la línea germinal es causante del síndrome de PAF, que se trata de un síndrome autosómico dominante. La importancia del gen *APC* se conoce a raíz de estudios genéticos que vinculaban la herencia del síndrome de PAF con el cromosoma 5q21, y posteriormente se identificaron mutaciones de la línea germinal que involucraban al gen *APC* presente en este locus. Las mutaciones germinales en la región del gen denominada MCR (*mutation cluster region*) que engloba la zona de unión a la β -catenina, dan lugar a la forma clásica del síndrome PAF, aunque también se han descrito mutaciones germinales a lo largo de todo el gen *APC*, y dependiendo de la posición de la mutación se distinguen distintas formas fenotípicas del síndrome PAF. La pérdida del segundo alelo del gen *APC*, ya sea por deleción o por mutación somática, tiene lugar en las lesiones malignas tempranas presentes en pacientes con el síndrome de PAF, en focos de criptas aberrantes displásicas y en pólipos adenomatosos pequeños. Esto sugiere que la pérdida de la expresión del gen *APC* es un evento muy temprano en el desarrollo del CCR (147,148).

La vía de señalización Wnt es una vía de transducción de señales conservada evolutivamente y necesaria para el desarrollo embrionario, con un papel central en el apoyo a la renovación del epitelio intestinal. La proteína APC normal parece prevenir la acumulación de β -catenina en el citosol y en el núcleo celular al mediar en su fosforilación y degradación. La mayoría de mutaciones en el gen *APC*, tanto en la línea germinal como la mutación somática, conducen al truncamiento prematuro de la proteína APC y a la pérdida de sus dominios reguladores de β -catenina, y esta pérdida de APC funcional da como resultado la acumulación nuclear de β -catenina. Por otra parte, se ha observado que la mayoría de los CCR esporádicos con gen *APC* normal presentan mutaciones en el gen *CTNNB1* que codifica para la proteína β -catenina, de forma que se produce una β -catenina aberrante sobre la que no se produce fosforilación y que al igual que en la mutación del gen *APC*, el resultado es su

Introducción

acumulación nuclear. En ambos casos, la β -catenina se une y activa al factor de transcripción Tcf-4 (149–151). La consecuencia de la activación del Tcf-4 es que evita que las células epiteliales entren en la fase de detención del ciclo celular o experimenten una diferenciación terminal, confiriéndoles a estas células resistencia frente a la apoptosis obteniendo una proliferación celular continua (152).

Actualmente se postula que la mayoría de casos de CCR esporádico se inician mediante mutaciones que activan la vía de señalización Wnt, caracterizadas por la estabilización y acumulación de la β -catenina, y que posteriormente es traslocada al núcleo donde forma un complejo con el factor de células T (Tcf-4), produciendo la activación de la expresión de los genes *c-Myc* y *ciclina D1*, así como *c-jun*, *fra-1*, *PPAR δ* , *MMP7* y *uPA*, generando señales de proliferación y evasión de la apoptosis (149,153).

Existen otras vías de señalización celular que convergen con la vía de señalización Wnt, de forma que la presencia de anomalías en estas otras vías de señalización celular puede llevar al mismo resultado que las alteraciones en la propia vía Wnt. La reciente evidencia sugiere que la proteína APC truncada en el extremo C-terminal puede tener propiedad de ganancia de función, mecanismo atribuido típicamente a oncogenes y no a genes supresores de tumores, de forma que promueve la supervivencia celular a través de la regulación del gen *BCL2*, que estimula la migración celular a través de la mediación de un factor de intercambio de nucleótidos de guanina denominado Asef y activa la proliferación de células epiteliales de colon humano (154,155).

***TP53**

El *TP53*, localizado en el cromosoma 17p, es el gen supresor tumoral que con más frecuencia se encuentra mutado en el cáncer humano, aproximadamente en el 50% de los casos. Desempeña un papel como regulador central de diferentes procesos celulares como la regulación del ciclo celular, apoptosis, desarrollo y diferenciación celular, recombinación homóloga y mecanismos de reparación del ADN. El gen *TP53* está formado por un total de 11 exones y codifica para una fosfoproteína nuclear (p53). La cantidad y actividad de *TP53* se incrementa en respuesta a una variedad de señales, como el daño en el ADN celular, factores estresantes (hipoxia) o la actividad oncogénica. La proteína p53 actúa como factor de transcripción de diversos genes implicados en varios mecanismos, como la detención del ciclo celular en G1/S y en los límites de G2/M, activación de la apoptosis y senescencia, entre otros. De este modo detiene el ciclo celular en las células dañadas permitiendo la reparación del ADN, o de

lo contrario, desencadena la cascada de apoptosis en las células dañadas, frenando así su propagación (10,156).

La disfunción de la proteína p53 es una de las características comunes para los tumores sólidos humanos, que está presente en más del 25% de los adenomas y en el 50-70% de los pacientes con CCR, y juega un papel crítico en la transición adenoma-carcinoma. En la mayoría de los casos, las mutaciones en el gen *TP53* son mutaciones sin sentido que conducen a la síntesis de una proteína disfuncional que impide su unión específica a la secuencia de reconocimiento, aunque existen otros mecanismos con el mismo efecto, como la amplificación del gen *MDM2*, el cual codifica para una ligasa de ubiquitina que se une y degrada al gen *TP53* (110,157). La pérdida de la función p53 representa un evento relativamente tardío en el desarrollo del CCR, ya que es poco frecuente su alteración en los pólipos adenomatosos o en los focos de criptas aberrantes, mientras que se encuentra mutado con mayor frecuencia en etapas más avanzadas (158).

****DCC, SMAD4, SMAD2***

Los genes *DCC*, *SMAD4* y *SMAD2* son genes supresores de tumores en el cromosoma 18q. El gen *DCC* se expresa normalmente en muchos tejidos, incluida la mucosa del colon, aunque su función normal ha sido difícil de dilucidar debido a su gran tamaño y a la falta de expresión en los CCR. Presumiblemente, las mutaciones sobre este gen conducen a la pérdida de la expresión de la proteína DCC, que se cree que tiene un papel en las interacciones célula-célula o célula-matriz. La pérdida de la expresión de DCC puede tener valor pronóstico, particularmente en pacientes con CCR en estadios tempranos, donde las tasas de supervivencia a 5 años son aparentemente peores en los casos de CCR que no expresan DCC en comparación con aquellos que si la expresan (159,160).

Se ha identificado un segundo gen supresor de tumores en el cromosoma 18q denominado gen *SMAD4*, que codifica una proteína que puede ser importante para la vía de señalización de la superfamilia de factores de crecimiento transformantes beta (TGF- β). El TGF- β es una citoquina capaz de inhibir el crecimiento y la diferenciación celular al unirse a los receptores transmembrana de tipo I (TGFBR1) y tipo II (TGFBR2), pero muchas células cancerosas son resistentes a este efecto supresor del crecimiento debido a la presencia de mutaciones en *SMAD4*, que interfiere con la producción de la proteína requerida para la señalización de TGF- β . También se han identificado otros posibles mecanismos de interferencia con la señalización normal de TGF- β en células de CCR, incluidas las mutaciones inactivadoras en el gen *TGFBR2*,

y cambios moleculares que resultan en la redirección de las señales inhibitoras del crecimiento por TGF- β hacia señales estimuladoras del crecimiento. Existe un subconjunto de CCR esporádicos en los que se han encontrado mutaciones tanto en *SMAD4* como en un tercer gen supresor de tumores que también se correlaciona con el cromosoma 18q (*SMAD2*). Las mutaciones de la línea germinal en *SMAD4* y en *BMPR1A*, un gen que codifica un miembro de la superfamilia de receptores de TGF- β , han sido identificadas en pacientes con SPJ, con un mayor riesgo de CCR invasivos (161,162).

2.9.3 Genes de reparación de emparejamiento erróneo

Existen varios genes responsables de corregir los emparejamientos nucleotídicos erróneos (MMR; "mismatch repair") y las pequeñas inserciones o deleciones que ocurren durante la replicación del ADN, incluidos *hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1* y *hPMS2*, *hMSH6* y *hMLH3*. Las mutaciones germinal en uno de estos genes parecen ser el defecto genético subyacente en la mayoría de las familias con síndrome de *Lynch*, y la pérdida de expresión de los mismos también se puede encontrar en aproximadamente el 15% de los CCR esporádicos. Sin embargo, también existen algunos CCR esporádicos con expresión defectuosa en este tipo de genes y sin mutación alguna, debido a la hipermetilación de los promotores del gen *MLH1*, que silencian la expresión génica (163–165).

Las células con deficiencia en la expresión de genes responsables de la reparación del ADN acumulan anomalías en las secuencias de ADN microsatélite, fenómeno conocido como MSI. Existen varios genes reguladores del crecimiento celular que contienen ADN microsatélite en las regiones promotoras (*TGFRB2*, *BAX*, *IGF2R*), y por lo tanto van a ser susceptibles a alteraciones en el control del crecimiento celular (166).

La mayoría de los laboratorios utilizan un panel de varios locus de microsatélites cuando realizan pruebas para averiguar el estado MSI (167). Se ha propuesto un panel que consta de tres repeticiones de dinucleótidos y dos repeticiones de mononucleótidos como prueba estándar para MSI, de forma que un tumor presenta estado MSI-H cuando al menos el 40% de los marcadores están afectados por la inestabilidad. Existe una minoría de tumores que muestran MSI-L, cuando están afectados menos del 40% de los marcadores estudiados. Casi todos los tumores MSI-H tienen deficiencia de genes de reparación del ADN mientras que la mayoría de los tumores MSI-L no tienen defectos de genes de reparación de ADN (168,169).

Los CCR MSI-H esporádicos se caracterizan por aparecer con más frecuencia en el colon proximal, presentan mayor componente mucinoso, infiltración linfocítica y están pobremente diferenciados, cuando se comparan con los MSS. Además el fenotipo MSI-H se asocia con una mayor supervivencia en tanto en casos de HNPCC como de CCR esporádico en comparación con los fenotipos MSS o MSI-L (170). Los tumores MSI-H en estadios tempranos tienen mejor pronóstico cuando no presentan mutación BRAF V600E (142). En cambio, la influencia del estado MSI en el pronóstico del CCR metastásico es menos clara, aunque existen datos que sugieren una influencia adversa de MSI-H en el pronóstico atribuido a la mayor frecuencia de mutaciones BRAF en los casos del CCR metastásico con MSI-H (171–173) .

En cambio, el fenotipo MSI-L no está asociado con el silenciamiento de ninguno de los otros genes reparadores del ADN, y algunos datos sugieren que en el CCR esporádico refleja la pérdida del gen *MSH3* (174). El fenotipo MSI-L también se ha asociado con la metilación del promotor del gen de reparación del ADN O-6 metilguanina ADN metiltransferasa (*MGMT*), pudiendo la pérdida de expresión del gen *MGMT* obtener como resultado la acumulación de desajustes G:T en el ADN. La metilación del promotor y consecuente pérdida de expresión del gen *MGMT* se relaciona con la vía serrada de carcinogénesis, y está presente en los distintos tipos de pólipos serrados. En cualquier caso, la evidencia acumulada sugiere que el fenotipo MSI-L se relaciona con un mal resultado clínico en los casos de CCR en estadio II y III (171,175).

2.10 Diagnóstico

El CCR constituye un problema de salud importante debido a su elevada incidencia y morbimortalidad. La prevención del CCR incluye por un lado la detección temprana en individuos asintomáticos, y por otra parte la vigilancia o seguimiento a largo plazo de individuos de alto riesgo. La lenta progresión a partir de las lesiones precancerosas y la mejora en el pronóstico derivado del diagnóstico de CCR en estadios tempranos del CCR, justifica la implementación de estrategias de cribado para reducir la carga de la enfermedad y el riesgo de mortalidad asociada a CCR. Las técnicas de cribado o *screening* permiten identificar sujetos asintomáticos o en fase inicial de la progresión tumoral. Las recomendaciones para la implementación de estos programas de cribado en la población se establecen en función del riesgo de CCR. Generalmente se estratifica el riesgo en función de determinados factores, principalmente la edad y la presencia de antecedentes personales o familiares de CCR o de pólipos colorrectales (176).

Introducción

Las guías clínicas elaboradas por las distintas sociedades científicas o grupos de expertos para el cribado de CCR son muy similares en cuanto a sus recomendaciones, estableciendo el inicio de estas pruebas a partir de los 50 años en personas asintomáticas de riesgo medio, con ligeras variaciones en cuanto a la frecuencia de realización, la técnica a utilizar o la edad para dejar de realizar dichas pruebas (177–179).

Los métodos actuales de detección de CCR se dividen en pruebas invasivas y no invasivas. Las pruebas no invasivas incluyen las pruebas de detección de sangre oculta en heces (SOH) y las exploraciones radiológicas. Las pruebas invasivas incluyen la sigmoidoscopia y la colonoscopia, que ofrecen una visualización directa y la detección de pólipos o neoplasia avanzada con la ventaja de poder obtener biopsias para su estudio. Además, en los últimos años han ido apareciendo nuevas modalidades que podrían llegar a constituir alternativas viables en un futuro próximo, las cuales se fundamentan en la detección de biomarcadores presentes en diversos fluidos biológicos (180).

i. Detección sangre en heces

Los pólipos colorrectales tienden a ser más friables y, por lo tanto, sangran fácilmente en comparación con la mucosa normal del colon, lo que hace que la detección de SOH sea un método de detección viable. Estas técnicas identifican a personas en riesgo de desarrollar CCR en función de la presencia de sangre microscópica en las heces con una especificidad en torno al 90% en relación con la colonoscopia, lo que las hace pruebas muy rentables con un elevado valor predictivo negativo. En varios países, entre los que se encuentra España, este tipo de pruebas han impulsado los programas de cribado de CCR mejorando las tasas de participación (177).

Existen dos tipos de pruebas para la detección de SOH: el test de guayacol (gSOH) y la prueba inmunoquímica fecal (PIF-SOH). Las guías recomiendan que la detección mediante gSOH se realice de forma anual, en tres muestras de heces obtenidas en tres días sucesivos. Las pruebas de detección gSOH presentan una sensibilidad baja para detectar pólipos y especificidad relativamente baja para la detección de CCR, por lo que es necesario realizar un examen por colonoscopia tras un resultado positivo (179,181).

La detección mediante PIF-SOH es una posibilidad que se refleja en las guías clínicas para cribado de CCR, ya sea como primera opción o como alternativa en pacientes que no pueden o no quieren hacerse una colonoscopia como prueba de cribado inicial,

o cuando el acceso a la colonoscopia es limitado. Se recomienda su realización de forma anual, y la obtención de un resultado positivo para PIF-SOH supone realizar una colonoscopia posteriormente para confirmar la presencia de lesiones precancerosas o CCR. En comparación con la detección mediante gSOH, PIF-SOH tiene una mayor sensibilidad sin pérdida de especificidad, así como una mejor detección de adenomas avanzados. En el cribado poblacional y en población de riesgo medio se recomienda el cribado con una determinación de PIF-SOH bianual entre los 50 y los 75 años de edad (182–184).

ii. Colonoscopia

Entre las diversas pruebas utilizadas en la detección de CCR, la colonoscopia es la prueba más precisa y versátil, puesto que permite localizar y biopsiar lesiones a lo largo del intestino grueso, desde el recto hasta el íleon terminal, así como detectar neoplasias sincrónicas y extirpar pólipos, todo ello de forma simultánea en el mismo procedimiento (185). La colonoscopia forma parte de las pautas de detección de CCR desde década de los años noventa, en base a ensayos controlados aleatorios que demostraron que la detección de SOH seguida de una colonoscopia se asociaba con una reducción significativa en la mortalidad relacionada con el CCR (186). Se recomienda su realización cada 10 años en individuos entre 50 y 75 años de edad con un riesgo medio, debiendo realizarse con más frecuencia cuando existen antecedentes familiares de CCR o cuando se identifican pólipos de alto riesgo (177–179).

El posterior examen histológico de las piezas obtenidas durante el examen endoscópico permite establecer las características anatomopatológicas y el estadio tumoral mediante la clasificación TNM, permitiendo así una mejor valoración del pronóstico de la enfermedad así como la individualización de los tratamientos.

iii. Técnicas moleculares

En los últimos años han surgido nuevas pruebas basadas en la biología molecular, concretamente en la detección de alteraciones genéticas y epigenéticas, que están cambiando el enfoque para la detección del CCR. Existe ya comercializada una prueba que combina la detección por PIF-SOH y distintas alteraciones en el ADN correspondientes a regiones promotoras metiladas (*BMP3* y *NFRG4*), mutaciones en *KRAS*, y la expresión de β -actina, cuyo resultado puede ser indicativo de la existencia de pólipos precancerosos o cancerosos. Este tipo de pruebas simplifican la realización del cribado de CCR, y aunque son más caras que las técnicas de detección de SOH, resultan más económicas y presentan una sensibilidad similar a la colonoscopia en

ausencia de las posibles complicaciones derivadas de estos procedimientos invasivos (187–189).

Existen también disponibles varias pruebas moleculares basadas en la detección en sangre de distintas alteraciones genéticas. Una de ellas detecta el gen *SEPT9*, cuyo producto es una proteína (septina) involucrada en la citoquinesis, y que exhibe una metilación aberrante de su región promotora en el tejido del CCR en comparación con el tejido de la mucosa colónica normal. También existe disponible un panel de ARN mensajero de 7 genes (*ANXA3*, *CLEC4D*, *LMNB1*, *PRRG4*, *TNFAIP6*, *VNN1* e *IL2RB*) que se cree que reflejan alteraciones sutiles en su expresión periférica en respuesta al CCR en lugar de servir como biomarcadores directos. Las sensibilidades de estas pruebas de detección son más bajas que las de la colonoscopia convencional (190–192).

iv. Marcadores séricos

En cuanto a la utilidad de los distintos marcadores séricos estudiados en el diagnóstico de CCR, el marcador tumoral de referencia para el CCR sigue siendo el antígeno carcinoembrionario (CEA), pero su capacidad diagnóstica en el CCR es baja. Los datos disponibles en relación a la sensibilidad y especificidad del CEA para el diagnóstico precoz del CCR desaconsejan su uso en el cribado, pudiendo estar alterado en distintas patologías o estados inflamatorios. Distintos grupos de expertos no recomiendan la utilidad de estos marcadores tumorales en el diagnóstico de CCR. En cuanto al pronóstico, se ha evidenciado que su concentración se relaciona con el tamaño tumoral, y que la existencia de niveles elevados de CEA en el preoperatorio es un indicador de mal pronóstico con mayor probabilidad de recidiva postoperatoria y en un período más breve (193,194). Sin embargo, los niveles de CEA tienen valor clínico en el seguimiento durante o después del tratamiento de pacientes con CCR tras su diagnóstico (195–197). Como normal general, los niveles de CEA se normalizan tras 1-4 meses de la intervención, de tal forma que cuando esta normalización no acontece puede ser considerado como un indicador indirecto de resección incompleta o recurrencia. Se ha estipulado que el intervalo óptimo de las determinaciones de CEA para pacientes en estadio II y III debería ser cada 2 ó 3 meses durante, como mínimo, los 2 primeros años del diagnóstico y anualmente hasta los 5 años. En el caso de pacientes con enfermedad avanzada, la determinación de los niveles de CEA permite controlar la respuesta al tratamiento quimioterapéutico (193–195).

2.11 Tratamiento actual

El cáncer de colon y el cáncer de recto requieren enfoques terapéuticos diferentes que a su vez va a depender de la etapa en la que se encuentren.

i. Quirúrgico

La cirugía es el principal tratamiento curativo en pacientes con CCR no metastásico, sin embargo, su resultado está estrechamente relacionado con la calidad de la propia cirugía, de la estadificación preoperatoria y la selección del tratamiento concomitante. Lo ideal es que la resección siga los planos anatómicos embriológicos para asegurar que se elimina el tumor y su zona principal de diseminación linfática, prestando una atención especial a los márgenes circunferenciales de resección quirúrgica (198,199). En los casos más avanzados de CCR, el tratamiento neoadyuvante con quimioterapia o con una combinación de quimioterapia y radioterapia preoperatoria puede reducir la carga tumoral e incluso el estadio tumoral, y puede ser necesario para optimizar las posibilidades de una resección exitosa (198,200).

Existen varios enfoques quirúrgicos para pacientes con cáncer rectal, según el estadio del tumor y la preservación del esfínter o prevención de estomas permanentes son objetivos adicionales, por lo que se necesita una elección de tratamiento cuidadosa y personalizada. El abordaje quirúrgico mediante una escisión mesorrectal total con intención curativa es el estándar desde hace años. Estas operaciones se realizan con un procedimiento abierto o con técnicas laparoscópicas avanzadas, aunque también existen nuevas técnicas endoscópicas transanales que se han mostrado ventajosas en casos complejos como pueden ser los pacientes obesos (201).

ii. Tratamiento sistémico

El tratamiento sistémico de pacientes con CCR se ha desarrollado sustancialmente en las últimas dos décadas con importantes mejoras en el entorno neoadyuvante para el cáncer rectal y en los entornos adyuvantes para el cáncer de colon. No hay un tratamiento neoadyuvante aceptado para el cáncer de colon, sin embargo si se recomienda la radioterapia o quimioterapia neoadyuvante para el cáncer rectal en estadio intermedio y avanzado para reducir la tasa de recurrencia local. El tratamiento neoadyuvante puede administrarse como radioterapia de ciclo corto seguido de cirugía o como quimiorradioterapia con 5-fluorouracilo o capecitabina (202,203).

La tasa de curación tras cirugía en el cáncer de colon de estadio II (T3, T4a, T4b y NOM0) es alta, y sólo el 5% de los pacientes obtienen beneficio de una quimioterapia adyuvante. Sin embargo, las pautas respaldadas por distintas sociedades científicas

recomiendan considerar la terapia adyuvante en casos de alto riesgo (204). Por el contrario, el tratamiento adyuvante es un estándar para los tumores de estadio III (cualquier T, N1–2, M0), utilizando una combinación de 5-fluorouracilo (5-FU) más oxaliplatino. Actualmente, no hay datos que respalden que la adición de terapias dirigidas como puedan ser los anticuerpos monoclonales específicos del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o anticuerpos específicos del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), mejoren el resultado en el tratamiento adyuvante (204). En los casos de cáncer rectal se puede aplicar quimiorradioterapia postoperatoria si no se ha administrado tratamiento preoperatorio y si existen ciertos factores de riesgo, basado en fluoropirimidinas (205).

El tratamiento quimioterápico de primera línea en la enfermedad metastásica suele ser una combinación de 5-FU o su homólogo de administración oral (capecitabina), leucovorina, y oxaliplatino (protocolo FOLFOX) o irinotecán (protocolo FOLFIRI) (206). Junto con estos regímenes combinados de quimioterapia, se utilizan agentes específicos, principalmente se incluyen tres grupos de fármacos: anticuerpos monoclonales frente al receptor del factor epidérmico (EGFR: cetuximab y panitumumab), anticuerpos monoclonales frente al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF: bevacizumab), y proteínas de fusión que se unen a múltiples factores de crecimiento proangiogénico (afibercept) o a moléculas con actividad quinasa (regorafenib). Los anticuerpos monoclonales contra EGFR muestran eficacia tanto en pacientes sin tratamiento quimioterápico previo como en pacientes con tumores refractarios a quimioterapia mejorando la tasa de respuesta global, la supervivencia libre de progresión e incluso la supervivencia global en pacientes con CCR metastásico. Sin embargo, un requisito previo para la eficacia de estos agentes es que los tumores no presenten mutaciones en *KRAS* y *NRAS* (207).

3. Microbiota intestinal

El tracto gastrointestinal representa la conexión del organismo humano con el medio externo, en el que existe una compleja ecología polimicrobiana que interactúa con ambos medios y tiene una importante influencia sobre el estado de salud. Esta comunidad microbiana heterogénea y metabólicamente activa vive en simbiosis con el huésped, y juega un papel importante tanto a nivel metabólico como inmunológico (208). La microbiota intestinal (MI) desempeña un papel importante en la digestión de polisacáridos no digeribles, en el metabolismo energético, en la síntesis de vitaminas,

en el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis del epitelio, e incluso interactuando con el sistema inmune (209).

3.1 Composición de la MI

En el intestino grueso humano residen más de 100 billones de bacterias con 3,3 millones de genes microbianos, 150 veces más que en el genoma humano (210). La densidad microbiana encontrada a lo largo del sistema digestivo es de 10^1 - 10^3 microorganismos por gramo en estómago y duodeno, 10^4 - 10^7 microorganismos por gramo en yeyuno e íleon, y finalmente 10^{13} - 10^{14} microorganismos por gramo en colon, siendo esta parte del intestino la de mayor densidad microbiana de todo el organismo humano (211,212).

El tracto gastrointestinal humano alberga una gran diversidad microbiana que se puede dividir en cuatro filos principales: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria* (209). Diferentes estudios en metagenómica sobre la MI, muestran la inmensa diversidad filogenética existente y se estima la existencia de más de 1000 filotipos, con al menos 160 especies prevalentes por individuo (210). La gran mayoría de las bacterias endógenas a nivel de especie en adultos sanos, aproximadamente el 90%, pertenecen principalmente a los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, mientras los filos *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Spirochaetes* y *Lentisphaerae* presentan una menor abundancia (entre <1% y el 15%) (213).

Existe una variabilidad interindividual en la composición microbiana, debido en gran parte a múltiples factores genéticos y ambientales tales como, la localización geográfica donde reside o el estilo de vida, y no menos importante, las alteraciones causadas por ciertos estados de enfermedad. Ciertos estudios recientes muestran cómo a pesar de existir un perfil microbiano característico para cada individuo, un conjunto de aproximadamente 50 taxones se muestra común en la mitad de los individuos (210,214). También se ha demostrado que los individuos comparten un conjunto de genes microbianos implicados en las principales rutas metabólicas, de este modo la desviación funcional de este grupo de genes podría asociarse a alteraciones del estado fisiológico. Sin embargo, también es destacable la diversidad genética específica de cada individuo a la que todavía no se le ha podido asignar un papel claro (215).

Las especies *Eubacterium rectale*, *Faecalibacterium prausnitzii*, pertenecientes al filo *Firmicutes*, y el género *Bacteroides* (filo *Bacteroidetes*) constituyen aproximadamente el 70% de la microbiota total en humanos, mientras que el resto de géneros

bacterianos están presentes solo en determinados subgrupos de individuos o en partes concretas del colon (216,217). El crecimiento bacteriano en el colon se encuentra facilitado tanto por el peristaltismo como por el mantenimiento de una viscosidad y temperatura óptimas, y también es facilitado por la carencia de mecanismos inmunes para hacerle frente. El colon e íleon de personas sanas están recubiertos por dos capas de moco que presentan estructuras diferentes. Mientras la capa mucosa externa contiene grandes cantidades de bacterias, la capa interna se encuentra libre de bacterias y se muestra resistente a la penetración bacteriana hacia el epitelio intestinal. En cuanto a la organización espacial de la microbiota en las heces, la superficie externa está cubierta por una capa de moco similar a la capa externa de moco que recubre la mucosa intestinal (218).

La microbiota se puede dividir en grupos bacterianos presentes en todos los individuos, que son conocidas como bacterias comensales, y bacterias presentes sólo en algunos subgrupos, denominadas bacterias ocasionales, ya sea de forma difusa o local. Las bacterias comensales incluyen ciertas familias bacterianas como *Bifidobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Lactobacillaceae* y *Enterococcaceae*, que están presentes con frecuencia pero que no son bacterias de presencia obligada en el intestino humano sano, por lo que su presencia, ausencia, o cualquier alteración en su concentración, no son reflejo del estado del colon (219).

3.2 Implicación fisiológica y metabólica de la MI

En condiciones normales la MI tiene un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis intestinal del huésped y es de gran importancia para el epitelio intestinal ya que participa de forma activa en funciones protectoras, estructurales y metabólica. El papel estructural de la MI y su implicación en funciones fisiológicas es cada vez más evidente, tal como muestran los resultados de estudios realizados principalmente con ratones manipulados sin presencia de MI. Estos ratones presentan vellosidades intestinales más largas y una atrofia de la cripta, una disminución del grosor de la mucosa intestinal y de la pared muscular, las placas de *Peyer* son más pequeñas y existen menos linfocitos intraepiteliales. A nivel fisiológico, estos ratones son más susceptibles a infecciones, presentan una renovación de células epiteliales más lenta y una vascularización reducida consecuencia de una menor capacidad de angiogénesis, también presentan una menor actividad enzimática, una menor producción de citoquinas y niveles reducidos de inmunoglobulinas séricas. En una segunda fase en estos estudios, la reconstitución de la MI en los ratones consigue restaurar el sistema inmunitario de la mucosa, aumentando a su vez la expresión de varios genes

implicados en la absorción de nutrientes, en el metabolismo, en la angiogénesis, en la función de barrera de la mucosa y en el desarrollo del sistema nervioso intestinal (220).

Algunos microorganismos del intestino complementan determinadas rutas metabólicas, como puede ser la producción de vitaminas (folato, biotina, vitamina K) y oligoelementos esenciales, o extraen directamente energía a partir de carbohidratos indigeribles como el almidón, ejerciendo un importante papel en la nutrición y equilibrio energético del hospedador (221). Algunos procesos metabólicos bacterianos a partir de los sustratos procedentes de la dieta originan metabolitos que pueden tener efectos beneficiosos, como puede ser el efecto antiinflamatorio de los AGCC procedentes de la fermentación de los polisacáridos, o también pueden dar origen a metabolitos con efectos perjudiciales, como el efecto procarcinogénico de los productos derivados de nitrógeno (aminas, derivados de amonio, ácidos fenólicos) procedentes del catabolismo proteico (222,223).

Otra de sus funciones reconocidas de la MI es la resistencia que ofrecen a la colonización intestinal por bacterias enteropatógenas y los mecanismos implicados son: la competencia por los receptores de adhesión y por los recursos nutricionales, la estabilización de la barrera mucosa intestinal y la producción de sustancias con propiedades antimicrobianas (bacteriocinas) o AGCC (acetato, butirato) que alteran el pH intestinal y previenen así también la colonización intestinal por enteropatógenos, o la estimulación de la respuesta inmune (224–227).

Es de destacar el concepto emergente de un eje microbiota-intestino-cerebro, que juega un papel en la regulación de la ansiedad, la cognición, el dolor y el comportamiento, así como en una posible contribución a la fisiopatología de desórdenes del sistema nervioso central (228).

3.3 Microbiota y sistema inmune

Una función importante del sistema inmunitario intestinal es controlar la exposición de las bacterias a los tejidos del huésped, disminuyendo así el potencial de resultados patológicos. Esto ocurre a dos niveles: por un lado, minimizando el contacto directo entre las bacterias intestinales y la superficie de las células epiteliales mediante la presencia de una capa de moco interna libre de bacterias; y por otro lado, confinando a las bacterias penetrantes y limitando su exposición al sistema inmunitario sistémico, principalmente mediante la secreción de proteínas con actividad antibacteriana secretadas por el epitelio intestinal (218).

Introducción

La MI también actúa como componente integral del sistema inmune humano regulando el potencial y las respuestas inmunológicas. La interacción entre la MI y el sistema inmune de la mucosa durante nuestra infancia es clave en su desarrollo y en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica lo largo de la vida adulta (229). A su vez, esta interacción contribuye a la maduración y modulación tanto del sistema inmune intestinal como del sistema inmune sistémico a través de componentes inmunes innatos, como los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) expresados en los diferentes tipos de células presentes en la mucosa intestinal (enterocitos, células polinucleares, mastocitos, macrófagos y células dendríticas); y a través de componentes inmunes adaptativos, como son los receptores altamente específicos expresados en la superficie de las células T y células B. El reclutamiento y la activación de todas estas células dependen y están reguladas por señales procedentes de la MI (230).

Dentro de los mecanismos de defensa de bacterias comensales frente a bacterias patógenas se encuentra la activación de la inmunidad innata del huésped a través de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o los patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMP), que incluyen componentes microbianos como lipopolisacáridos, lípidos A, flagelos, y ADN/ARN bacteriano (231). Estos PAMP/MAMP son reconocidos por PRR como los receptores *Toll-like* (TLR), los receptores de lectina tipo C (LCR) o los receptores de lectina tipo N (LNR) de las células eucariotas. Las interacciones entre PRR y PAMP/MAMP conducen a la activación de varias vías que garantizan la homeostasis intestinal, como las vías implicadas en la función de barrera mucosa o en la síntesis de péptido antimicrobiano (PA) por las células de *Paneth* (232). Un estudio reciente ha demostrado que en condiciones normales las bacterias comensales son reconocidas por los TLR presentes en la superficie intestinal, y esta interacción desencadena un bajo grado de señalización de TLR. Sin esta señalización la superficie intestinal se vuelve más susceptible a lesiones y además es menos capaz de inducir la reparación de un posible daño, alterando de este modo el mantenimiento de la homeostasis del epitelio intestinal (233).

Las células dendríticas contribuyen al mantenimiento de la homeostasis intestinal al inducir tolerancia inmune a las bacterias intestinales comensales y producen citoquinas (IL-1 β , IL-6 e IL-23) que activan a las células linfoides intestinales (CLI), que a su vez promueven respuestas inmunes adaptativas protectoras mediadas por células Th1 y Th17. Las CLI también producen citoquinas efectoras (IL-17, IL-22 e IFN- γ). La acumulación de IL-17 e IFN- γ se asocia con el desarrollo de inflamación, mientras que la IL-22 promueve la producción de PA y moco en las células epiteliales para hacer

Introducción

frente a los patógenos. Además, las CLI también participan en el procesamiento y presentación de antígenos, interactuando con las células T CD4, regulando así las respuestas inmunes adaptativas (234). Por lo tanto, las CLI se activan directamente en respuesta a MAMP a través de PRR, pero también se activan en respuesta a diversas citoquinas, aún en ausencia de contacto directo con microorganismos, lo cual indica que pueden contribuir con la inflamación inicial y actuar como integradoras de las señales que producen las células epiteliales y otras células del sistema inmune. Las alteraciones tanto en el número como en la función de las CLI conlleva la pérdida de la homeostasis en los tejidos, generalmente en el contexto de enfermedades asociadas con inflamación crónica (235).

Las bacterias principalmente implicadas en la modulación de la respuesta inmune innata y adaptativa son las bacterias filamentosas segmentadas, estrechamente relacionadas con género *Clostridium* (tipo I). Estas bacterias se adhieren a la superficie epitelial para obtener nutrientes, y este contacto con el epitelio es beneficioso también para el huésped debido a la estimulación del sistema inmunitario. Concretamente producen la estimulación de las respuestas inmunes innatas y promueven el desarrollo de los tejidos linfoides (230), modulan la actividad de células Th17, que a su vez liberan IL-17 cuyos efectos son la producción de PA, el reclutamiento de neutrófilos y la secreción de IgA, proporcionando en definitiva un ambiente inflamatorio protector frente a ciertas infecciones, pero que también se asocia a un mayor riesgo de desarrollo de EII (234,236). Algunas bacterias como *Bacteroides fragilis* poseen la capacidad de promover un ambiente protector mediante la activación de células Treg debido a la expresión del polisacárido A y su unión al TLR2 de las células T CD4 (234).

Los macrófagos también actúan en la respuesta inmune innata, y además de su actividad fagocítica, también producen IL-10, una citoquina antiinflamatoria que contribuye al mantenimiento de la homeostasis intestinal. Los neutrófilos y los eosinófilos también juegan un papel en la inmunidad innata mediante la producción de IL-22 proinflamatoria y estimulan la respuesta inmune adaptativa mediante la producción de inmunoglobulina A (IgA). Las células Fox3p+ reguladoras (Treg), que abundan en la lámina propia intestinal, suprimen las respuestas inflamatorias debido a la producción de citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β (234).

Los micronutrientes producidos por bacterias comensales, como AGCC, lípidos y vitaminas, pueden modular el sistema inmunitario del huésped y participar en la configuración de la arquitectura de la MI. Los AGCC (butirato, acetato y propionato),

Introducción

contribuyen al mantenimiento de la homeostasis intestinal a través de receptores acoplados a proteínas G (GPR), incluidos GPR43 y GPR109A. El acetato producido por *Bacteroides thetaiotaomicron* facilita el desarrollo de las células caliciformes y la secreción de moco, y *Bifidobacterium longum* puede suprimir la translocación de la toxina Shiga de *Escherichia coli* O157:H7 al promover la integridad epitelial intestinal a través de la producción de acetato. En contraste, el butirato y el propionato promueven la acumulación de células Treg y su actividad supresora al inhibir la actividad las histonas desacetilasas a través de GPR43 (234). El butirato también regula negativamente la producción de citoquinas proinflamatorias que incluyen IL-12, IL-6, TNF- α y óxido nítrico a partir de macrófagos, y en consecuencia un beneficio terapéutico potencial para la EII. Es importante destacar también que el butirato y la niacina inducen la producción de IL-18 en el epitelio intestinal, mediante la activación del receptor GPR109A, que desencadena un efecto antiinflamatorio y promueven la diferenciación de las células Treg, ejerciendo un papel protector frente a la carcinogénesis del colon (234,237). El ácido fólico derivado de la dieta y las bacterias comensales están involucrados en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica al promover la supervivencia de las células intestinales Treg. Además, los ácidos biliares sintetizados por bacterias comensales inhiben la actividad de NF- κ B sobre los macrófagos suprimiendo así la producción de IL-6, TNF- α , IL-1 β e IFN- γ . La EII se caracteriza por presentar también un desequilibrio en la composición de la MI y bajas concentraciones de ácidos biliares en el lumen intestinal, lo que podría apuntar a una posible contribución de la disbiosis en el desarrollo de la EII (234).

3.4 Dinamismo de la microbiota

La bioestructura y composición de la MI varía de forma interindividual, mientras que a nivel intraindividual son generalmente estables en el día a día pero sufren cambios sustanciales con a lo largo del tiempo (238). Existen varios estudios longitudinales en seres humanos que muestran la plasticidad de la MI, destacando que factores como la dieta, el medio ambiente, y los cambios fisiológicos pueden influir tanto en la composición como en la funcionalidad de la MI (239,240). Los cambios en la dieta, como puede ser el aumento en la ingesta de hidratos de carbono, han demostrado la capacidad que presenta la MI para adaptar su arquitectura ecológica con la rapidez y eficacia necesaria para el mantener una correcta simbiosis huésped-microbiota (241,242). Esta rápida capacidad de adaptación se considera una característica necesaria de la MI para maximizar la eficiencia de extracción de nutrientes y garantizar un estado saludable. Pero los mismos cambios en la dieta en distintas personas no van a dar lugar a la misma MI definitiva, ya que las variaciones relacionadas con la

dieta no modifican las diferencias interindividuales pre-existentes. En cambio existe la posibilidad de que personas con patrones dietéticos similares terminen compartiendo una arquitectura similar de la MI a largo plazo, demostrándose así que la presencia o ausencia de varios taxones bacterianos podría estar relacionada con la ingesta de nutrientes determinados (242). De forma menos llamativa se observa cierta plasticidad de la MI en respuesta a factores como el clima, la localización geográfica o el grado de exposición a bacterias ambientales, siendo este último factor de vital importancia para el desarrollo y mantenimiento de la funcionalidad del sistema inmunitario desde el nacimiento hasta la edad adulta (243,244).

Los cambios fisiológicos naturales también van a modificar la estructura microbiana tanto de forma temporal durante el embarazo o la lactancia, como de forma permanente como sucede en el proceso de envejecimiento (245,246). La MI envejecida se caracteriza por una reducción en la biodiversidad, una mayor abundancia de anaerobios facultativos y una disminución en la abundancia de especies bacterianas con propiedades anti-inflamatorias derivadas de la producción de butirato, tales como *Faecalibacterium prausnitzii* (247). Curiosamente, esta variación en la MI de adultos sanos está presente en varios trastornos inflamatorios sistémicos crónicos, tales como la obesidad, síndrome metabólico y enfermedades inflamatorias del intestino (224,248). Por otra parte, el consumo de fármacos, antibióticos o medicamentos antiinflamatorios, impactan sobre la composición microbiana del intestino y generan diferentes configuraciones de la microbiota, llevando consigo un aumento o disminución de la capacidad metabólica, y por lo tanto de la eficacia de algunos fármacos (249–251).

3.5 Disbiosis, respuesta inmune e inflamación en la inducción de la carcinogénesis.

Los estudios epidemiológicos han demostrado que además de los factores genéticos, también están estrechamente asociados con el riesgo de desarrollar CCR otros factores como la inflamación, la infección, la terapia antimicrobiana y la dieta, que a su vez también están relacionados con los cambios en la diversidad y actividad de los microorganismos que colonizan el tracto gastrointestinal (208).

La alteración de la estructura de la MI o disbiosis, consiste en procesos no necesariamente excluyentes, como la pérdida de microorganismos beneficiosos, la expansión de microorganismos nocivos o la pérdida de la diversidad microbiana. Esta alteración en el equilibrio de la MI se ha asociado con distintos tipos de enfermedad:

Introducción

obesidad, EII, enfermedades autoinmunes, adenomas y cáncer (208). Varios estudios han relacionado este desequilibrio en la comunidad microbiana con la etiología de los adenomas colorrectales y del CCR, donde se postula si el cáncer es el producto de la disbiosis o si es la alteración en el microbioma normal el resultado de la progresión del cáncer. Existe evidencia acerca de que la alteración de las comunidades microbianas que colonizan determinados órganos se asocia de forma directa o indirecta con el proceso de carcinogénesis (252).

Los microorganismos intestinales pueden promover la aparición y la progresión del CCR mediante diferentes procesos, como la inducción de una respuesta inflamatoria y estrés oxidativo, la biosíntesis de genotoxinas o la producción de metabolitos tóxicos. El desequilibrio de la MI en favor de patógenos oportunistas contribuye a una evolución hacia un estado de inflamación crónica que puede acabar desarrollando pólipos adenomatosos y finalmente CCR (Figura 12) (222).

Se ha observado que la MI de los ratones presenta una notable similitud con la MI humana, y los estudios realizados en estos animales han demostrado que se producen cambios en la composición de la MI en enfermedades como la obesidad, diabetes, hígado graso, aterosclerosis, enfermedades alérgicas, enfermedades gastrointestinales, enfermedades autoinmunes y cáncer (253). Zackular et al. demostraban en el estudio realizado sobre un modelo murino que el MI experimentaba cambios dinámicos durante el desarrollo del proceso inflamatorio y en la carcinogénesis, contribuyendo de forma activa en los procesos que promueven la carcinogénesis (254).

Se ha demostrado que la colonización intestinal con *Enterococcus faecalis* y *Bacteroides vulgatus* en animales que previamente estaban libres de microorganismos conduce a la activación de las vías de señalización de NF- κ B en las células epiteliales. Además la inoculación de la microbiota presente en el intestino de ratones con tumores en ratones previamente libres de microorganismos aumenta significativamente el proceso de carcinogénesis en el colon en comparación con ratones control, colonizados a partir de la microbiota procedente de ratones sanos. Estudios realizados también sobre modelo murino en el que se colonizaban los ratones libres de microorganismos con MI humana, tanto de pacientes con CCR como de individuos sanos, también sugiere que la estructura inicial del MI condicionar la susceptibilidad del colon a la carcinogénesis. Por lo tanto, se puede concluir que la evidencia disponible sugiere que la alteración de la homeostasis huésped-microbiota es clave para la instauración del proceso inflamatorio cuya prolongación en el tiempo

tiene como consecuencia varios cambios que conducen a la carcinogénesis del colon (222).

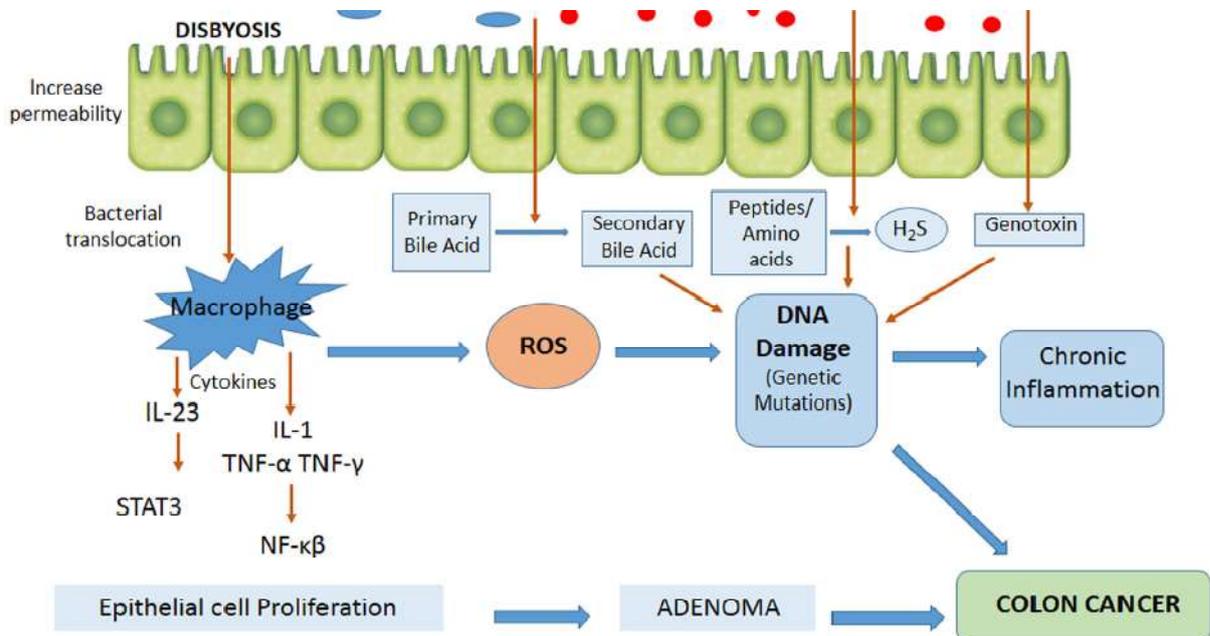


Figura 12. Papel de la disbiosis bacteriana e inducción de la carcinogénesis del colon. Fuente: imagen tomada de la publicación Nistal et al., 2015 (222).

i. Respuesta inmune innata

Dentro de las funciones esenciales del sistema inmune innato se incluyen la detección de microorganismos y actuar como primera línea de defensa frente a la invasión e infección por parte de éstos, la regulación del proceso inflamatorio, limitar el daño sobre el hospedador, el mantenimiento de la homeostasis inmunológica, y la activación de respuestas inmunes adaptativas. La activación del sistema inmune innato por las bacterias comensales tiene como resultado la liberación de citoquinas proinflamatorias por parte de los macrófagos, las células dendríticas y las células NK ("*natural-killer*"), como son IL-12, IL-23, TNF- α e INF- γ , con la consecuente activación de las células del sistema inmune adaptativo, incluidos los linfocitos T y B, y varios mediadores inflamatorios. Una de las principales consecuencias de esta respuesta inflamatoria es la activación de factores de transcripción de determinadas vías de señalización celular en las células epiteliales (NF- κ B y STAT3) y la generación de ROS y RNS, lo que lleva a estrés oxidativo, daño en el ADN, proliferación aberrante, y finalmente el desarrollo de adenomas y del CCR (222).

Diferentes tipos de células, entre las que se encuentran las del epitelio intestinal, expresan PRR que median en la interacción entre el sistema inmune y la microbiota

Introducción

comensal cuando hay una traslocación bacteriana. Entre estos PRR se encuentran los TLR, presentes en la superficie celular, y los receptores citoplasmáticos NOD-like (NLR). Este tipo de receptores reconocen patrones relacionados con las bacterias como el lipopolisacárido (LPS), peptidoglucano, flagelos o ADN/ARN microbiano. Los PAMP activan los PRR en varios tipos de células como macrófagos, miofibroblastos y células epiteliales, induciendo la producción de citoquinas proinflamatorias y la activación de las vías intracelulares de supervivencia NF- κ B y STAT3 (253,255). La activación de NF- κ B produce un incremento tanto en la liberación de citoquinas como la señalización de Wnt, lo que pueden transformar a las células epiteliales intestinales e iniciarse un proceso oncogénico (256). Se han realizado estudios en ratones con el objetivo de aclarar el papel de los receptores TLR2, TLR4, NOD1 y NOD2, NLRP6, demostrando que son relevantes en la formación de tumores en ratones, y además se ha demostrado que existen polimorfismos relacionados con algunas enfermedades en humanos, incluyendo el CCR (252,255).

Uno de los primeros estudios que describen la asociación entre la microbiota, el sistema inmune innato y el cáncer, muestra que la activación del adaptador de la señal de transducción del sistema inmune (MyD88), que es una proteína para la señalización de TLR e IL-1/IL-18, tiene un papel fundamental en el desarrollo de tumores intestinales espontáneos e inducidos por carcinógenos (257). En un modelo de cáncer asociado a colitis inducido por carcinógeno se ha observado que, mientras que la señalización a través de TLR4 promueve el desarrollo de pólipos intestinales, la señalización MyD88 mediada a través de TLR2 parece ejercer un efecto protector (258). Este efecto contradictorio podría explicarse por que MyD88 también interviene en la señal a través del receptor de IL-18, una citoquina que promueve la reparación de tejidos, tiene papel protector frente tumores y participa en el mantenimiento de la homeostasis de la microbiota. De hecho, se ha demostrado que ratones libres de cualquiera de ambos, MyD88 o IL-18, muestran una susceptibilidad similar a la formación de pólipos. Por lo tanto, la ausencia de MyD88 puede inducir carcinogénesis al bloquear una vía dependiente de IL-18 que controla la composición microbiana a través de los inflamomas, que son un subconjunto de NLRs capaces de ensamblar y oligomerizar en una estructura activadora de la cascada de la caspasa-1, esencial para la producción de IL-1 β e IL-18. A su vez, esa deficiencia asociada a la falta de IL-18 junto con la disbiosis puede provocar un proceso de inflamación crónica con aumento de la señalización de IL-6 y la consiguiente activación de STAT3, inhibiendo la apoptosis y favoreciendo el proceso de carcinogénesis (258).

Introducción

Los estudios realizados muestran que los inflamasomas median de algún modo en la homeostasis intestinal y en el proceso de carcinogénesis. Diversos estudios realizados sobre ratones con deficiencia inducida en caspasa-1 u otros componentes del inflamasoma, como NLRP3, NLRP6 y NLRP12, han evidenciado un aumento en la susceptibilidad a la formación de pólipos. De forma específica, se ha observado que ratones deficientes en NLRP6 desarrollan un estado inflamatorio asociado a disbiosis bacteriana que promueve la proliferación de células epiteliales y la carcinogénesis a través de la inducción de la señalización de IL-6. En este estudio también se ha observado que ratones *wild type* que conviven con ratones deficientes en NLRP6 muestran una mayor predisposición al desarrollo de CCR inducido por inflamación, lo que sugiere la posible transferencia de MI alterada a ratones *wild type* y la consiguiente inflamación del colon debido a la activación del eje IL-6 como factores clave en la inducción del proceso carcinogénico (259).

Se ha demostrado que la señalización por IL-6 es el eje central en la patogénesis del CCR inducido por inflamación, y se sugiere que la IL-6 producida por las células mieloides de la lámina propia impide la apoptosis en las células epiteliales intestinales normales y premalignas a través de la activación de STAT3. En los estudios realizados en modelo murino se ha observado un aumento de los niveles de IL-6 en ratones *wild type* que conviven con ratones deficientes en NLRP6 y ASC, mientras que es así cuando conviven con ratones deficientes en NLRP6 y CCL5, lo que sugiere que el incremento en los niveles de IL-6 precisa de la transferencia de una microbiota alterada pero también de la potenciación inducida por CCL5 (Figura 13) (259).

El receptor citoplasmático NOD2 está relacionado con el desarrollo de la EC en los seres humanos. Estudios realizados con ratones han demostrado que la deficiencia de NOD2 se asocia con disbiosis, y esta alteración de la microbiota puede promover el proceso inflamatorio y el de carcinogénesis. Además se ha evidenciado el desarrollo de cáncer en ratones *wild type* que convivían con ratones deficientes en NOD2, asociándose este hecho a la transferencia de MI desde los ratones deficientes en NOD2 a los ratones *wild type* (256).

Los estudios realizados hasta el momento sugieren que la alteración de la señalización inmune innata podría promover el crecimiento de bacterias promotoras del proceso carcinogénico dentro de la MI. Existe suficiente evidencia para afirmar que la translocación bacteriana a través del epitelio intestinal produce la activación de TLR y NLR, y participa de forma activa en la promoción de la inflamación, sin embargo no

Introducción

queda claro si las deficiencias en la señalización inmune innata por sí mismas conducen a la disbiosis en ausencia de inflamación (256,258).

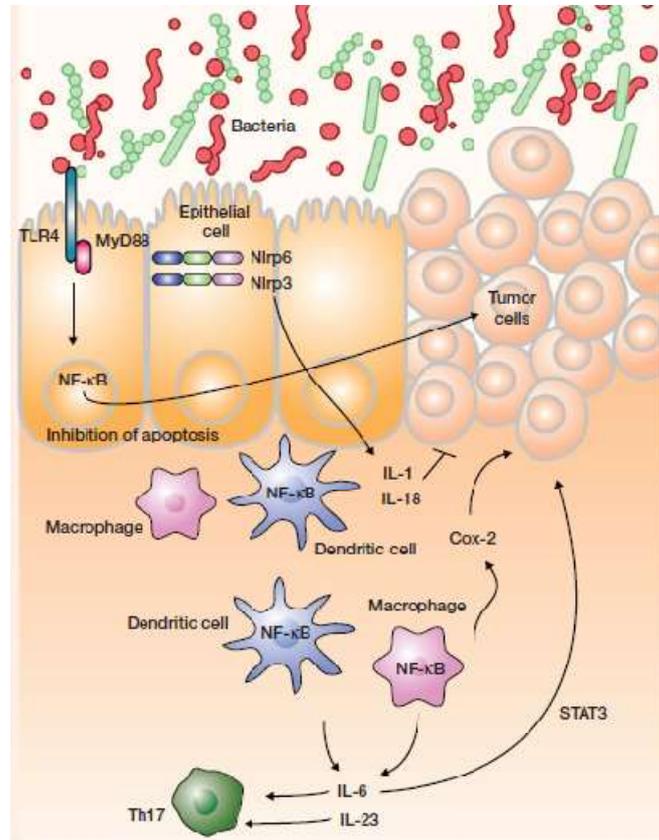


Figura 13. Receptores microbianos y su respuesta en el CCR. Fuente: imagen tomada de la publicación Kostic, Chun, Meyerson, & Garrett, 2013 (260).

ii. Inflamación

Como ya se ha comentado, existen estudios que han demostrado que la inflamación crónica, como la que tiene lugar en EII, tipo EC o CU, aumenta el riesgo de transformación neoplásica y CCR. Esta inflamación crónica conduce a la producción de citoquinas y ROS que generan un microambiente que promueve la carcinogénesis y a su vez producen alteraciones en la estructura de la comunidad microbiana (223,261). En algunos casos, se ha visto que la inflamación promueve la carcinogénesis a partir de un microambiente de disbiosis que favorece la expansión de cepas bacterianas genotóxicas. Un reciente estudio realizado en ratones deficientes en IL-10 muestra como la inflamación intestinal modifica la comunidad microbiana y promueve la proliferación de bacterias genotóxicas, apoyando la idea de que el CCR

Introducción

puede ser causado por microorganismos específicos que se desarrollan dentro de un ambiente inflamatorio (262).

La inflamación produce la inestabilidad del ADN puesto que produce daño sobre éste y compromete su mecanismo de reparación. En general, más del 20% de los cánceres están precedidos por un estado de inflamación crónica, como se ha observado en el carcinoma hepatocelular y en el CCR. Sin embargo, el papel de la inflamación no se limita al inicio del proceso de carcinogénesis, sino que también resulta relevante en el crecimiento del tumor (263). La inflamación crónica es un factor de riesgo importante para el CCR ya que conlleva el reclutamiento de células inmunes y la liberación de mediadores inflamatorios como TNF- α , IL-6, IL1b y otras citoquinas que activan el NF- κ B para iniciar una cascada de eventos que culminan en carcinogénesis de colon (264).

Un proceso inflamatorio que se acompaña de activación oncogénica puede conducir a la amplificación de la cascada de señalización NF- κ B-IL-6-STAT3, lo que resulta en el inicio o progresión del cáncer. La activación de NF- κ B ocurre en la mayoría de los tumores por estímulos inflamatorios o mutaciones oncogénicas, y da como resultado una expresión génica proinflamatoria, proliferativa y anti-apoptótica. Su identificación como el primer vínculo molecular entre la inflamación y el CCR resalta el importante papel del microambiente tisular como fuente de citoquinas inflamatorias procarcinogénicas, en su mayoría potentes activadoras de NF- κ B (264). NF- κ B contribuye al inicio del tumor por la supresión de la apoptosis en los enterocitos, y en las células mieloides está implicado en la proliferación celular por medio de la producción de citoquinas proinflamatorias. Además, se ha demostrado recientemente que la elevada señalización de NF- κ B en células epiteliales mejora la activación de la vía Wnt- β -catenina e induce la desdiferenciación de células intestinales, adquiriendo así capacidad para iniciar el proceso de carcinogénesis (265). Generalmente, la activación de NF- κ B resulta en la expresión de citoquinas inflamatorias, como TNF- α , IL-1, IL-6 y IL-8, moléculas de adhesión, enzimas que participan en la síntesis de prostaglandinas, óxido nítrico sintasa, factores angiogénicos y genes anti-apoptóticos, que proporcionan ventajas de supervivencia a las células precancerosas o tumorales en el intestino (264).

Las células mieloides infiltrantes de tumores producen citoquinas proinflamatorias que inducen la señalización de STAT3 y de NF- κ B para aumentar la proliferación celular y suprimir la apoptosis. La activación de STAT3 por parte de IL-6 producida por las células mieloides resulta clave en la carcinogénesis temprana asociada a colitis, donde STAT3 aumenta la proliferación celular premaligna e inhibe la apoptosis. STAT3 está

implicado en el proceso de carcinogénesis de varios tejidos y en el proceso inflamatorio del cáncer de hígado, pulmón, páncreas y colon (264).

iii. Toxinas

La disbiosis intestinal promueve la proliferación de algunos microorganismos que han desarrollado mecanismos de supervivencia como la expresión de proteínas que dañan al ADN y que producen mutaciones en el huésped por favorecer la proliferación celular, afectar a la estabilidad del genoma y dotar de resistencia frente a la apoptosis celular. Entre ellos podemos mencionar *Enterococcus faecalis*, *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli* o *Fusobacterium nucleatum* (208,252,263).

Toxina FadA producida por *Fusobacterium nucleatum

F. nucleatum es una bacteria comensal que posee la capacidad de inducir el CCR a través de la expresión del factor de virulencia FadA, una molécula de adhesión a la superficie de las células epiteliales del colon que facilita la fijación e invasión por parte de este microorganismo y es capaz de interactuar con E-cadherina, una proteína importante en el mantenimiento de la integridad de las células epiteliales, provocando la pérdida de contacto en las uniones intercelulares, y en consecuencia aumentando la permeabilidad paracelular y proporcionando una oportunidad de penetración para otras especies bacterianas, lo que va a producir la estimulación del sistema inmunitario del huésped. Además, FadA es capaz de activar la ruta de señalización de la β -catenina y la expresión de determinados factores de transcripción que estimulan la proliferación y crecimiento de células epiteliales (252,266).

F. nucleatum posee capacidad de unión a la mucosa normal y a pólipos adenomatosos, lo que sugiere que podría promover el desarrollo del CCR en la mucosa normal o acelerar el proceso de carcinogénesis en los adenomas existentes. Se ha demostrado que el número de copias detectadas del gen FadA es significativamente mayor en individuos con CCR en comparación con individuos sanos, por lo que podría ser utilizado como un biomarcador de riesgo de CCR (266).

Toxina Bft producida por *Bacteroides fragilis

Las cepas enterotoxigénicas de *B. fragilis* (ETBF) producen la toxina Bft, también conocida como "fragilisina", una metaloproteasa de 20 kDa causante de trastornos diarreicos en el ser humano y en animales. Esta exotoxina es capaz de inducir la proliferación de las células epiteliales del colon a través de la activación del oncogén c-Myc y desencadenar la respuesta inflamatoria mediante la inducción y producción de

Introducción

IL-8 por parte de las células epiteliales. También promueve la carcinogénesis desencadenando una respuesta inflamatoria basada en un aumento de expresión de STAT3, que conduce al reclutamiento de linfocitos Th17 pro-inflamatorios. Además, esta toxina tiene la capacidad de unirse a las células epiteliales del colon y estimular la escisión del dominio extracelular de E-cadherina, aumentando así la permeabilidad de la barrera intestinal y activando la señalización intracelular de la vía β -catenina. Debido a la influencia de la toxina Bft en la estructura y fisiología del epitelio gastrointestinal se sugiere que la presencia de ETBF puede contribuir a enfermedades crónicas del tipo EII, u otras disfunciones crónicas o lesiones precancerosas y cancerosas (252,267). En algunos estudios se ha observado que ETBF estaba presente en biopsias de mucosa de pacientes con afecciones precancerosas y pacientes con CCR, llegando a encontrar una asociación significativa en las lesiones precancerosas, por lo que ETBF podría ser un potencial marcador del pronóstico del CCR e incluso con utilidad en su diagnóstico (267).

***Toxinas producidas por enterobacterias**

Estudios recientes muestran que las toxinas que se transcriben de forma más activa en el tejido tumoral y tejido normal adyacente en pacientes con CCR son las derivadas de *E. coli*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella flexneri*. Estos resultados apuntan hacia la posibilidad de que existe una implicación de estas toxinas en el proceso de carcinogénesis. Algunas de las toxinas dentro de la amplia gama que producen determinadas cepas de enterobacterias resultan ser potencialmente perjudiciales para los seres humanos, ya que pueden dañar directamente el ADN o interrumpir procesos de señalización celular de forma específica.

Las toxinas citoletales (Cdt) pertenecen a la familia de las ciclomodulinas, toxinas proteicas de acción intracelular producidas por algunas bacterias gramnegativas, cuya acción principal es la inhibición del punto de control en G2/M del ciclo celular en células eucariotas. Las Cdt en su forma activa presentan tres subunidades, siendo las subunidades CdtA y CdtC las encargadas de la internalización en las células epiteliales, y la subunidad CdtB la que presenta actividad enzimática y produce la ruptura y el daño sobre el ADN. Se ha demostrado que la actividad ADNasa de Cdt producidas por cepas de *E. coli*, ejercen un daño en el ADN que favorece el desarrollo del CCR. Por otra parte, se ha podido comprobar cómo las infecciones crónicas de hígado e intestino en modelo murino con cepas de *Helicobacter hepaticus* o *Campylobacter jejuni* productoras de Cdt se han asociado con procesos displásicos,

Introducción

confirmando de esta forma la capacidad de las bacterias productoras de estas toxinas para inducir lesiones preneoplásicas (220,252).

Existen cepas de *E. coli* que albergan una isla genómica de 54 kb que codifica para un complejo multienzimático llamado policétido sintetas (PKS), una sintetasa de péptidos no ribosomales que sintetiza “colibactinas”. Las colibactinas son toxinas que inducen la ruptura del ADN de doble cadena, producen aberraciones cromosómicas y detienen el ciclo celular en la fase G2/M. PKS está fuertemente asociada con las cepas de *E. coli* del grupo filogenético B2, y además se asocia frecuentemente con otros factores de virulencia como otras ciclomodulinas o adhesinas. La infección en ratones con cepas de *E. coli* PKS se ha relacionado con la expresión de genes implicados en la producción colibactina y en la inducción del daño sobre el ADN celular. La capacidad de la colibactina para promover la carcinogénesis *in vivo* ha sido recientemente demostrada también en ratones infectados y tratados con el carcinógeno azoximetano (AOM), demostrando una alta incidencia de adenocarcinoma invasivo en aquellos ratones infectados con cepas de *E. coli* PKS en comparación con ratones infectados con cepas *E. coli* PKS deficientes o con bacterias control sin PKS. En otros estudios se ha observado que las cepas de *E. coli* PKS se detectan con mayor frecuencia en pacientes con CCR en comparación con pacientes con enfermedades intestinales no inflamatorias o pacientes sanos, por lo que podría existir la posibilidad de que la acción conjunta entre la respuesta inflamatoria del hospedador y la presencia de cepas *E. coli* PKS genere un microambiente propicio para que tenga lugar el proceso de carcinogénesis. Además, estos estudios han demostrado que la colonización por cepas *E. coli* productoras de colibactina tiene lugar en un intestino en el que previamente ya se ha iniciado un proceso inflamatorio, probablemente inducido por otras bacterias. En diversos estudios se ha demostrado la presencia de *E. coli* PKS así como la sobrerrepresentación de *E. coli* productor de colibactina en pacientes con CCR en comparación con pacientes sanos (268).

Encontramos también cepas de *E. coli* productoras del factor necrotizante citotóxico tipo 1 (CnF1), otro tipo de ciclomodulina que posee la capacidad de inducir el proceso inflamatorio y alterar la señalización celular que regula el proceso de proliferación celular. Este tipo de toxina regula positivamente la actividad de la Rho-GTPasa, a la que activa de forma permanente, y de esta forma se induce a que las células en reposo inicien el ciclo de replicación celular y sinteticen ADN, interfiriendo entonces en la citocinesis normal y generando células multinucleadas y aneuploidías. Además, la unión de CnF1 a las células epiteliales tiene como consecuencia una mayor proliferación celular y una protección frente a la apoptosis, lo que puede favorecer el

proceso oncogénico. También va a producir activación de NF-kB y liberación de citoquinas proinflamatorias en las células epiteliales, y va a potenciar la motilidad celular. Se ha demostrado que las cepas de *E. coli* productor de CnF1 son más frecuentes en la mucosa intestinal de pacientes con CCR en comparación con pacientes con diverticulosis, pero es difícil determinar si son causa del cáncer. De este modo, cabe esperar que las cepas de *E. coli* productoras de CnF1 puedan contribuir al desarrollo de CCR, ya que afectan a las vías habituales de señalización en carcinogénesis. Se establece la hipótesis de que estas bacterias pueden actuar como bacterias tipo *passenger*, reforzando y favoreciendo el desarrollo del CCR (269).

iv. Producción de metabolitos tóxicos

El estrés celular oxidativo y nitrosativo producen alteraciones a distintos niveles que conducen hacia el desequilibrio de la homeostasis celular. Estas alteraciones se producen a nivel de las vías de transducción de señales celulares, en la actividad de los factores de transcripción, en la degradación de proteínas, y en la organización del citoesqueleto (270). Durante el proceso inflamatorio, las bacterias intestinales activan la producción de óxido nítrico y otras especies reactivas secundarias por parte de los macrófagos, las cuales pueden producir daño sobre el ADN celular. Las bacterias anaerobias desnitrificantes pueden generar directamente el óxido nítrico como un intermediario en el ciclo del nitrógeno, y tanto lactobacilos como bifidobacterias son capaces de generar cantidades significativas de óxido nítrico a partir de una dieta rica en nitratos. Las ROS liberadas por las células inmunes en respuesta a las citoquinas proinflamatorias causan un daño oxidativo fragmentando el ADN celular y produciendo mutaciones puntuales que pueden contribuir a la CIN y estimular vías de señalización que activan factores de transcripción implicados en la regulación del crecimiento celular (NRF2 y NF-kB), favoreciendo el desarrollo del CCR (263).

Las bacterias intestinales contribuyen al metabolismo de nutrientes y producen pequeñas moléculas que pueden contribuir al proceso de carcinogénesis. Se han identificado varios metabolitos microbianos con potencial acción carcinógena, como son los ácidos biliares secundarios (222). Las bacterias comensales del colon, tales como *E. coli*, *Klebsiella oxytoca* y *Pseudomonas aeruginosa*, expresan la enzima alcohol deshidrogenasa, que cataliza la fermentación de etanol que ingerimos a acetaldehído, el cual presenta propiedades carcinogénicas (223). Los metabolitos derivados de la fermentación de proteínas también pueden estar implicados en el desarrollo del CCR, de forma que si se produce un aumento en la ingesta de proteínas con la dieta, y por lo tanto un aumento de los desechos resultantes de su digestión

Introducción

(nitrato, amonio, aminas, aminoácidos de cadena ramificada y H₂S) en el colon, éstos pueden estimular el crecimiento de bacterias reductoras de sulfato, como los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfomonas* (222). El H₂S es producto de la reducción del sulfato derivado de la dieta y del metabolismo de otros compuestos, incluidos los aminoácidos de azufre y la taurina. Además el H₂S presenta propiedades inflamatorias y resulta tóxico para los colonocitos, inhibe la oxidación del butirato, aumenta la proliferación de colonocitos a través de la vía de señalización ERK1/2, inhibe la síntesis de moco y presenta acción genotóxica debido a que genera radicales libres. Se ha demostrado que los pacientes con CCR presentan una mayor concentración de H₂S en comparación con los sujetos sanos (222,223).

Otras especies bacterianas incluidas en el género *Bacteroides* y algunos *Firmicutes*, son responsables de la fermentación de aminoácidos aromáticos que conducen a productos potencialmente carcinogénicos, como el ácido fenilacético, fenoles, indoles y p-cresol, que debido a su capacidad de alquilación del ADN producen mutaciones. Se ha demostrado que la ingesta de una dieta rica en proteínas, especialmente con un elevado consumo de carne roja o de carne procesada, se asocia con la proliferación de bacterias que van a metabolizar los compuestos nitrogenados ingeridos generando metabolitos que favorecen el desarrollo de adenomas y del CCR (222).

La MI juega un papel importante en el metabolismo de los ácidos biliares, principalmente en el proceso de 7 α -hidroxilación, donde el ácido cólico y ácido quenodesoxicólico se convierten en ácido desoxicólico y ácido litocólico respectivamente, que son compuestos más hidrófilos conocidos como ácidos biliares secundarios, y que debido a su carácter anfipático pueden alterar y dañar las membranas celulares, e incluso presentan cierta actividad antimicrobiana que afecta a la composición de la MI. Los ácidos biliares secundarios también se han relacionado con la carcinogénesis en varios modelos animales y en estudios epidemiológicos, y se han detectado elevados niveles en las heces de pacientes con CCR. El ácido desoxicólico daña la mucosa del tracto intestinal y contribuye a un aumento de ROS, produce daño sobre el ADN e inestabilidad genómica, favoreciendo así el desarrollo tumoral (222,223).

La fermentación por parte de la MI de los hidratos de carbono no digeribles presentes en la fibra, resulta en una elevación de los niveles de AGCC (acetato, propionato, butirato o L-lactato), los cuales presentan potentes propiedades antiinflamatorias, antiproliferativas y pro-apoptóticas, y por lo tanto un efecto antineoplásico global. Es por ello, que una dieta rica en fibra supone un aporte elevado de AGCC, con la

consiguiente reducción del pH intestinal que favorece los procesos de fermentación, los efectos inhibidores del crecimiento de patógenos y disminuye la absorción de carcinógenos, reduciendo así el riesgo de CCR (222,223). El butirato sirve como fuente importante de energía para las células epiteliales intestinales y promueve muchas de las funciones del intestino grueso, como la motilidad del colon, la mejora del flujo sanguíneo visceral, y la regulación de la expresión de algunos genes a nivel intracelular. La capacidad del butirato para regular la expresión genética es debida a su inhibición sobre la actividad de las histona desacetilasas, lo que produce una hiperacetilación de las histonas y permite el acceso de los factores de transcripción al ADN nucleosómico. Sin embargo, es probable que el butirato tenga otros efectos intracelulares, incluida la hiperacetilación de proteínas no histonas, la alteración de la metilación del ADN, la inhibición selectiva de la fosforilación de histonas y la modulación de la señalización intracelular, produciendo modificaciones sobre el proceso de apoptosis y sobre ciclo celular. En algún estudio se ha observado una disminución de los principales transportadores de butirato (MCT1 y SMCT1) en los colonocitos de pacientes con CCR en comparación con personas sanas, lo que se traduce en una disminución de la disponibilidad del butirato a nivel intracelular. Además, los estudios realizados sobre el microbioma confirman que las bacterias productoras de butirato están poco representadas en pacientes con CCR en comparación con personas sanas (271). Con respecto a la distribución de otros AGCC, el hígado tiene la mayor capacidad de metabolización del propionato, mientras que en la sangre periférica se encuentran las mayores concentraciones de acetato (271).

3.6 Disbiosis: Modelo “*driver-passenger*”

Los estudios de caracterización de la composición bacteriana mediante diferentes técnicas de secuenciación han mostrado diferencias significativas a nivel de la mucosa rectal cuando se ha comparado entre personas con adenomas y personas sanas, evidenciando una mayor proporción de *Proteobacterias*, y en concreto una sobreabundancia de bacterias potencialmente patógenas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Helicobacter*, *Acinetobacter* y otros, existiendo además una menor abundancia de *Bacteroidetes* en las muestras de sujetos con adenomas. Estos hallazgos sugieren que los cambios en la composición de la MI podrían desempeñar un papel en el desarrollo de adenomas (272,273). Diversos estudios que han analizado la MI a partir de muestras de tejido procedentes de individuos con CCR también han evidenciado la presencia de una disbiosis, con una sobreabundancia del género *Fusobacterium* y de otros géneros como *Peptostreptococcus* o *Mogibacterium*, junto con una disminución de los géneros *Faecalibacterium*, *Blautia* y *Bifidobacterium*

Introducción

en el tejido tumoral frente al tejido normal (274–276). En otros estudios se ha caracterizado la microbiota a partir de muestras fecales de individuos con CCR, mostrando en este caso un enriquecimiento significativo en *Fusobacterium*, *Enterococcaceae*, *Campylobacter*, *Erysipelotrichaceae*, *Collinsella*, *Peptostreptococcus* y *Anaerotruncus*, y una disminución en miembros del *cluster Clostridium IV*, tales como *F. prausnitzii* y *Roseburia*. Cuando se ha comparado la microbiota fecal de pacientes con CCR y personas sanas se ha observado una mayor abundancia de los géneros *Enterococcus*, *Escherichia/Shigella*, *Klebsiella*, *Streptococcus* y *Peptostreptococcus* en las muestras de pacientes con CCR. Por lo tanto, la microbiota asociada al CCR está enriquecida en ciertos patógenos oportunistas proinflamatorios, como los géneros *Fusobacterium*, *Enterococcaceae* y *Campylobacter*, y otros microorganismos relacionados con trastornos metabólicos, como el género *Erysipelotrichaceae*, mientras se encuentra empobrecido en bacterias anaerobias obligadas y otras implicadas en la preservación de la homeostasis intestinal, tales como los microorganismos productores de butirato y bacterias protectoras, como son las bifidobacterias (274–278).

A partir de los datos del estudio de casos y controles publicado por Wu et al. (277) y con el objetivo de conocer el papel de la disbiosis intestinal en el desarrollo del CCR, se buscaron asociaciones mediante un análisis bioinformático, obteniendo distintos grupos de coabundancia (CAG) (279) de los cuales seis se mostraban asociados de forma significativa con el desarrollo o la protección en el CCR: *Fusobacterium* CAG, *Prevotella* CAG, *Barnesiella* CAG, *Coprobacillus* CAG, *Faecalibacterium* CAG y *Bifidobacterium* CAG. Según este análisis, los géneros asociados a CCR, *Fusobacterium* y *Erysipelotrichaceae*, se engloban en el *Fusobacterium* CAG, y de forma análoga, los géneros *Escherichia*, *Shigella* y *Klebsiella* se incluyen dentro del *Prevotella* CAG. Por otro lado, el *Bifidobacterium* CAG se compone de géneros no asociados a CCR como *Bifidobacterium* y *Lachnospiraceae*. Otros géneros bacterianos asociados con la producción de beneficio para el hospedador son los pertenecientes al *cluster Clostridium IV* (*Faecalibacterium*, *Blautia*, *Roseburia*, *Dorea* y *Lachnospiraceae*), que se agrupan en el *Faecalibacterium* CAG. Por último, el *Barnesiella* CAG incluía géneros bacterianos procancerígenos como *Porphyromonadaceae* y *Eubacterium*, y otros géneros bacterianos pertenecientes al *cluster Clostridium IV* (*Ruminococcus*, *Butyrococcus* y *Oscillibacter*) con efecto protector frente al CCR. Por lo que se postula sobre la existencia de 3 CAG procarcinogénicos (*Fusobacterium* CAG, *Prevotella* CAG y *Coprobacillus* CAG) y 2 CAG protectores (*Bifidobacterium* CAG y *Faecalibacterium* CAG).

Introducción

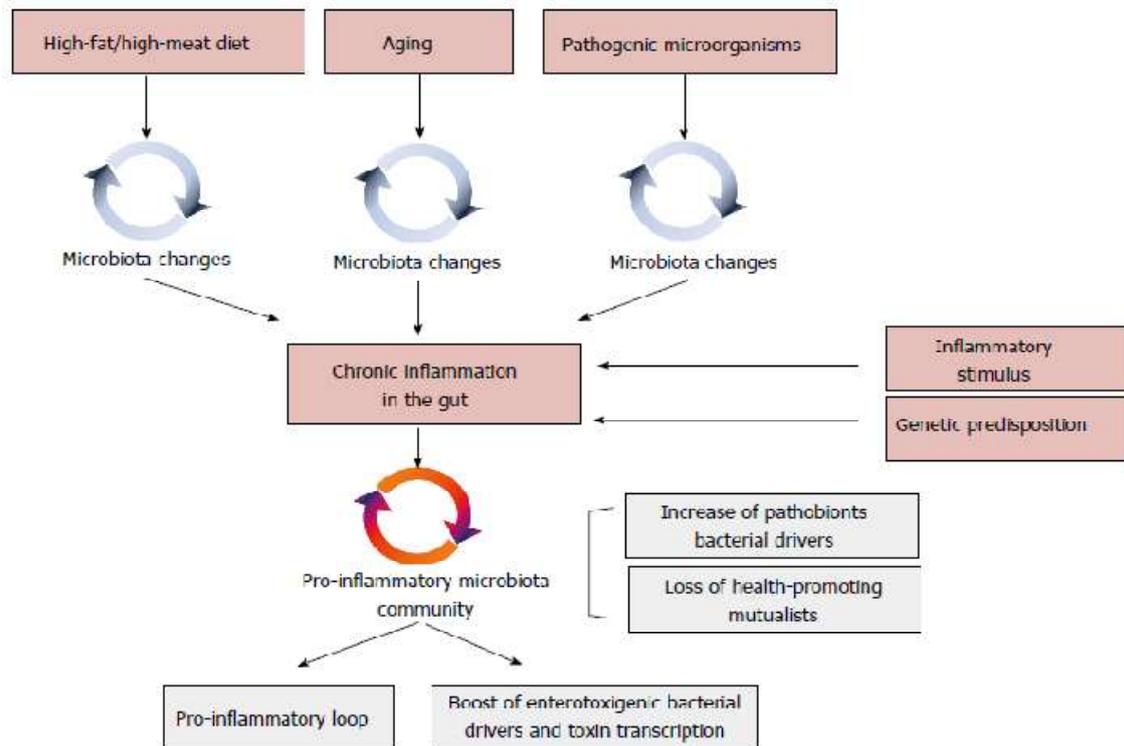


Figura 14. Desencadenantes ambientales, tales como la dieta, la edad, las infecciones por patógenos, pueden modificar la composición microbiana, y en hospedador genéticamente susceptible, conducir a la inflamación crónica del intestino. Fuente: imagen tomada de la publicación Candela et al., 2014 (280).

Sin embargo, por tratarse de estudios descriptivos, no se puede concluir que la disbiosis sea causa o consecuencia de la aparición de CCR, y además no proporciona información sobre los posibles mecanismos implicados en el desarrollo del CCR o sobre los posibles factores desencadenantes de la disbiosis. Por lo que se requiere realizar estudios que ofrezcan una visión más integral de la interacción entre el medio ambiente y la genética del CCR, y esclarecer el papel de la disbiosis microbiana, junto a otros factores como la dieta y la inflamación, en el desarrollo del CCR (Figura 14) (280).

El modelo “*driver-passenger*” descrito por Tjalsma et al. (281) propone la participación de la MI en el inicio y desarrollo del CCR. En concreto, lo describe como un modelo dinámico que establece la existencia de ciertas bacterias comensales tipo *driver*, que son las que ocasionan el daño sobre el ADN de las células del epitelio intestinal, contribuyendo al inicio del proceso carcinogénico. Este proceso de carcinogénesis induce que se produzcan alteraciones en el microambiente intestinal que favorecen la proliferación de bacterias oportunistas tipo *passenger*. El modelo *driver-passenger* implica que conforme se desarrolla el proceso tumoral, las bacterias *driver* pueden desaparecer del tejido epitelial debido al desplazamiento por parte de las bacterias

Introducción

passenger, las cuales presentan una ventaja adaptativa y competitiva en el microambiente tumoral, siendo capaces a su vez de favorecer el desarrollo del CCR (Figura 15). Este modelo propone que la progresión de la enfermedad provoca cambios en el microambiente como resultado del crecimiento del tumor, lo que tiene a su vez como resultado una alteración de la comunidad microbiana, de modo que las bacterias *driver* son gradualmente superadas por las bacterias *passenger*, sugiriendo que ambos tipos bacterianos deben presentar una asociación temporal diferente respecto al tejido tumoral, y por ello presentar roles diferentes en la patogénesis del CCR (281).

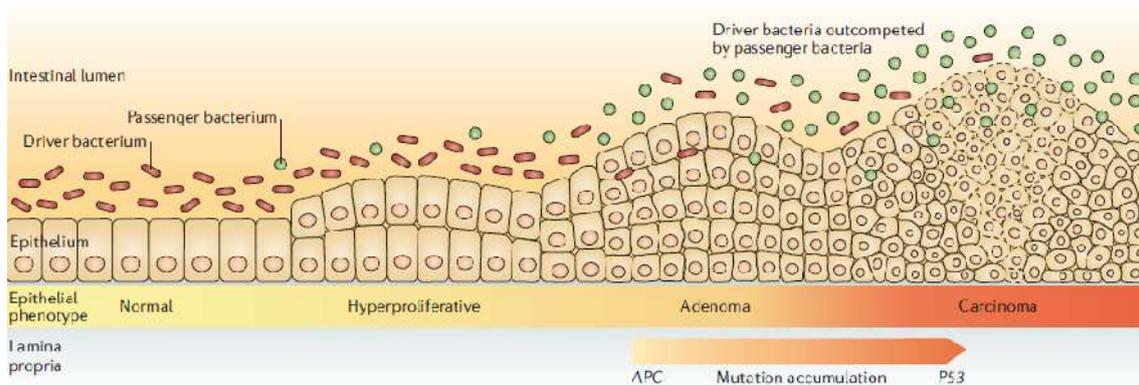


Figura 15. Modelo bacteriano "driver-passenger" en el desarrollo del CCR. Fuente: imagen tomada de la publicación Tjalsma et al., 2012 (281).

Las bacterias *driver* del CCR se definen como bacterias intestinales con características pro-cancerígenas, que pueden causar inflamación, aumento de la proliferación celular y/o producción de sustancias genotóxicas que contribuyen a la acumulación de mutaciones durante la secuencia adenoma-carcinoma, pudiendo iniciar el desarrollo del CCR. Una de estas características es la producción de compuestos que dañan el ADN de las células epiteliales, como puede ser la producción de superóxido extracelular por *E. faecalis*, que adquiere su potencial tras la conversión a peróxido de hidrógeno, o como la producción de genotoxinas como la colibactina por parte de ciertas cepas de *E. coli*. El daño ocasionado sobre el ADN celular produce la activación de algunas rutas de señalización y aumenta la tasa de mutación de las células afectadas. Las cepas de ETBF también están implicadas en el inicio del CCR a través de la producción de fragilisina, que también tiene actividad genotóxica sobre las células epiteliales del colon, y que además estimula la escisión de la proteína supresora de tumores E-cadherina en las células epiteliales intestinales causando la proliferación celular y la permeabilización de la barrera intestinal. (280,281).

Introducción

Es probable que algunas enterobacterias (*Shigella*, *Citrobacter* y *Salmonella spp.*), además de producir genotoxinas que causan daño sobre el ADN celular y contribuyen a la acumulación de mutaciones, también pueden tener cierto papel en el inicio del CCR generando un estado similar de inflamación prolongada al producido cepas de ETBF. Estas enterobacterias potencialmente patógenas son muy poco frecuentes en el intestino de personas sanas, en cambio se ha observado que pueden encontrarse sobrerrepresentadas en la mucosa no tumoral de personas afectas de CCR. Concretamente, el género *Shigella* se encuentra sobrerrepresentado en la mucosa colónica de pacientes con adenoma, por lo que podría asociarse con las primeras etapas del CCR (280,281). Estas bacterias *driver* posiblemente actúan en conjunto con otras bacterias auxiliares (*α -bugs*), que generalmente son enterobacterias con actividad proinflamatoria que van a desplazar a otras bacterias con actividad protectora frente al desarrollo de cáncer tales como *F. prausnitzii*, o los géneros *Roseburia* o *Bifidobacterium*, favoreciendo así el desplazamiento de estas especies bacterianas protectoras, y la subsiguiente colonización de los tejidos por parte de bacterias *driver*, dando lugar al inicio del proceso carcinogénico (282).

Las bacterias *passenger* son bacterias características del intestino que están presentes en una proporción relativamente pobre en el tracto intestinal sano con respecto a otras bacterias, pero que presentan una ventaja adaptativa al microambiente tumoral, hecho que les permite competir con las bacterias *driver*. Las alteraciones a nivel fisiológico y metabólico que tienen lugar en el colon durante el proceso de carcinogénesis, incluidos los cambios en la función de barrera, la ruptura y el sangrado del epitelio del colon, o la presencia de nutrientes y cofactores específicos del microambiente tumoral como ROS, alteran el microambiente intestinal. Es probable que estas alteraciones afecten a la composición de la MI de forma que algunas bacterias se adapten mejor al nuevo entorno, presentando así ventaja competitiva. Sin embargo, a diferencia de las bacterias *driver*, que son siempre pro-cancerígenas, las bacterias *passenger* pueden ser de naturaleza pro-cancerígena o protectora, según el microorganismo (280).

Los patógenos oportunistas que causan infecciones asociadas al CCR, como *F. nucleatum*, *Streptococcus gallolyticus spp gallolyticus* y *Clostridium septicum*, pueden considerarse *passenger* del CCR, pero pueden estar presentes de forma transitoria en el tejido tumoral del CCR porque el desarrollo continuo del tumor puede atraer nuevas especies mejor adaptadas que reemplacen a los *passenger* iniciales (274,275,281). Además existen otras bacterias *passenger* asociadas con el CCR, como *Corynebacteriaceae*, *Roseburia* y *Faecalibacterium*, que ejercen un posible papel

protector debido a productos de su metabolismo, preservando así el nicho intestinal y evitando una progresión rápida de la enfermedad (283).

3.7 *Fusobacterium nucleatum*

El género *Fusobacterium* se trata de un grupo de bacterias gramnegativas anaerobias no formadoras de esporas que forman parte de la microbiota humana normal oral e intestinal. Las especies que lo componen son altamente heterogéneas, y algunas de ellas han sido reconocidas como patógenos oportunistas implicados principalmente en la periodontitis, pero también en la EII, el absceso pancreático y el absceso hepático (284).

El género *Fusobacterium* se encuentra en bajo nivel de abundancia en muestras de tejido colónico y de heces en personas sanas. Se ha sugerido que los miembros del género *Fusobacterium* producen un beneficio sobre el epitelio intestinal debido a que producen butirato, utilizado como fuente de energía por las células epiteliales del colon. Sin embargo, también pueden tener papel patógeno en el intestino, ya que tienen características proinflamatorias e invasivas. Además, en aquellos pacientes afectados de CCR con sobreabundancia de *Fusobacterium spp.* en tejido tumoral parece ser más probable que exista diseminación a los ganglios linfáticos regionales. A día de hoy no se ha establecido un vínculo entre el CCR y las infecciones clínicas con *Fusobacterium spp.*, a pesar de que estas bacterias podrían residir en las metástasis del CCR. Además, tal como sucede con otras especies intestinales, *Fusobacterium spp.* pueden ser colonizadores secundarios del intestino, y por ello, su crecimiento y actividad pueden depender de la presencia de otros microorganismos, por lo que aún no se ha determinado su papel en la progresión del CCR. Los análisis metagenómicos y las técnicas de secuenciación del gen del ARN ribosomal 16S han demostrado un enriquecimiento del género *Fusobacterium* en el CCR (274–276).

F.nucleatum se ha propuesto como un agente involucrado en el desarrollo de la EII (285). También se ha relacionado con la progresión del CCR, pero aún se desconocen los mecanismos subyacentes exactos. Un mecanismo potencial de CCR impulsado por *F. nucleatum* es la invasión de las células epiteliales y la activación de respuestas oncogénicas e inflamatorias a través de su adhesina FadA. La FadA se une a la E-cadherina de la membrana de las células epiteliales, favoreciendo la invasión, y activa a continuación la señalización de β -catenina, lo que conlleva a su vez una mayor activación de genes implicados en la vía NF- κ B, secreción de citoquinas (IL-6, IL-8 e IL-18) y oncogenes (286).

Introducción

Estudios recientes han demostrado que *F. nucleatum* aumenta la producción de ROS y citoquinas inflamatorias (IL-6 y TNF) en el CCR, llevando consigo una reducción de la actividad de las enzimas reparadoras de desajustes del ADN, y causan el silenciamiento epigenético de MLH1 (284). Además, también existen estudios de cohortes realizados que muestran cierta asociación entre los niveles elevados de *Fusobacterium spp.* con CCR CIMP y MSI-H (287).

La inmunidad adaptativa mediada por células T juega un papel importante en la regulación de la progresión tumoral, y las células T infiltrantes de tumores pueden ser un indicador de una respuesta inmune del huésped a los tumores. Existen estudios que han demostrado que el estado MSI-H se asocia con altos niveles de células T infiltrantes. Sin embargo, el estado MSI no es el único determinante de la respuesta inmune al CCR porque las cantidades de células T infiltrantes se superponen considerablemente entre MSI-H y MSS (284). La evidencia experimental puede ser consistente con un hallazgo reciente de que una mayor abundancia de *F. nucleatum* en el tejido del CCR se asocia a una menor densidad de células T en el microambiente tumoral. Estos resultados indican que *F. nucleatum* modula de forma supresiva el microambiente inmunitario tumoral, por la afectación sobre la respuesta inmune adaptativa mediada por células T antitumorales, cuyo papel es importante en la prevención y progresión tumoral (284). Kostic et al. observaron que *F. nucleatum* producía una expansión selectiva de las células inmunes mieloides presentes en el microambiente tumoral, y éstas pueden suprimir la respuesta de las células T, ya sea por el mecanismo autolimitante de Th1 mediante la producción de ROS e IL-10, o de tipo Th2 mediante la expresión de arginasa, TGF- β e IL-10 (288). Además, se ha demostrado que la proteína inhibidora de *F. nucleatum* detiene las células T humanas en la fase G1 del ciclo celular, y puede inducir la apoptosis en células mononucleares mediada a través de la agregación de las células inmunes. Esto indica que *F. nucleatum* modula de forma supresora el microambiente inmunitario tumoral y sugiere una relación compleja microbioma-inmunidad-alteraciones moleculares en la carcinogénesis colorrectal (284).

4. Biología molecular en la caracterización de la microbiota: Secuenciación genómica.

4.1 Introducción

Los primeros métodos de secuenciación de ADN aparecieron en la década de los años setenta, en primer lugar apareció la tecnología convencional de secuenciación ideada

Introducción

por Sanger y años más tarde los métodos de escisión química de Maxam-Gilbert. El método de Maxam-Gilbert se basa en la modificación química del ADN y la posterior escisión del esqueleto del ADN en sitios adyacentes a los nucleótidos modificados. El método de secuenciación enzimática de Sanger se desarrolló en 1977 y utiliza nucleótidos específicos que carecen de un grupo 3'-OH (didesoxinucleótidos), que producen la terminación de la cadena nucleotídica, y que están marcados de forma radiactiva o fluorescente para su detección en geles de secuenciación o en máquinas de secuenciación automatizadas (289,290).

La reacción de secuenciación enzimática imita a la replicación del ADN celular, combinando una ADN polimerasa, una cadena simple de ADN molde, un cebador oligonucleotídico sintético con 3'-OH libre y nucleótidos trifosfato (NTP) en cada una de las cuatro reacciones de extensión que van a tener lugar. En cada una de estas reacciones está presente sólo uno de los cuatro didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTP), de forma que cada reacción va a producir cadenas de ADN de distintas longitudes que van a terminar cuando se incorpora el ddNTP específico. Finalmente se someten los productos de las reacciones a electroforesis y revelado, obteniendo un patrón de bandas para cada una de las cuatro reacciones que permite deducir la secuencia nucleotídica (291).

Aunque la química del método original de Maxam-Gilbert se ha modificado para ayudar a eliminar los reactivos tóxicos, las mejoras en la metodología, la automatización y el desarrollo de software para interpretar y analizar las secuencias, han permitido al método Sanger seguir siendo el método de secuenciación estándar para la secuenciación del ADN en la actualidad, pero con la limitación de que es un proceso relativamente lento y permite realizar un escaso número de reacciones en paralelo (292). Todos los secuenciadores comercializados actualmente para protocolos de secuenciación de ADN o análisis de fragmentos utilizan tintes fluorescentes y electroforesis capilar, con una capacidad de capilares que puede variar entre 4 y 96. Todos estos secuenciadores generan 600-1000 bases de secuencia precisa y la tecnología continua siendo muy útil para aplicaciones donde no se requiere un alto rendimiento (292).

Los avances tecnológicos en los últimos años han conducido al desarrollo de la secuenciación de próxima generación (NGS), también conocida como secuenciación masiva en paralelo, en referencia a la capacidad mejorada para generar datos de secuencias de decenas de miles a miles de millones de moldes de ADN de forma simultánea, permitiendo que el número de bases a secuenciar por unidad monetaria

haya aumentado exponencialmente (293). El coste en el desarrollo de una secuencia de ADN antes del año 2008, basado en la metodología Sanger, es muy superior al encontrado en métodos de secuenciación posteriores a enero de 2008, debido a la aparición de plataformas de secuenciación NGS (Figura 16).

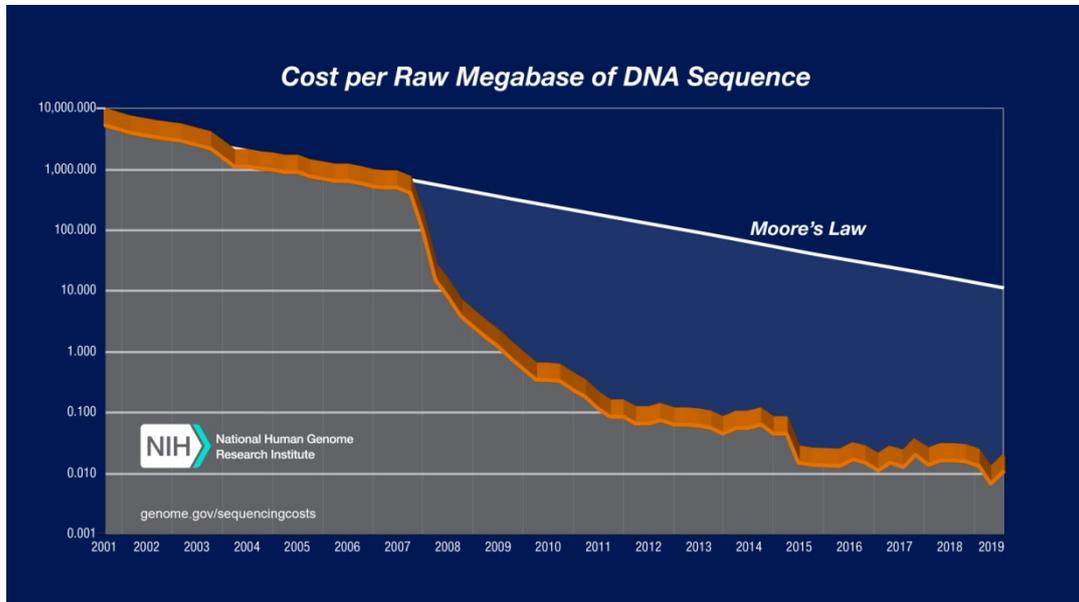


Figura 16. Coste por cada millón de bases (Mb; megabase) secuenciadas de ADN. Disponible en: <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Sequencing-Costs-Data>. Acceso en Abril 2020.

4.2 Generalidades NGS

La tecnología NGS se basa en la amplificación de cadenas simples a partir de una librería de fragmentos y realizar la secuenciación sobre los productos de amplificación. Las librerías de fragmentos de ADN se obtienen por alineamientos específicos, debido a la unión entre secuencias adaptadoras ligadas a estos mismos fragmentos de ADN y secuencias complementarias o *linkers* presentes en la superficie de la plataforma. Debido al uso de secuencias adaptadoras, los fragmentos de ADN pueden ser amplificados selectivamente por PCR y no se requiere ninguna etapa de clonación bacteriana para amplificar el fragmento genómico en un intermedio bacteriano como es habitual en la secuenciación tradicional. Esta metodología NGS presenta la ventaja de secuenciar millones de fragmentos de ADN de forma paralela en menor tiempo de análisis, con el potencial añadido de detectar todos los tipos de variaciones genómicas en un único experimento, incluyendo variantes de nucleótido único o mutaciones puntuales, pequeñas inserciones o deleciones, y también variantes estructurales tanto equilibradas (inversiones o traslocaciones) como desequilibradas (deleciones o duplicaciones). Además, el rendimiento de lectura de secuencias es significativamente

Introducción

mayor para NGS, donde puede variar desde varios cientos de miles a decenas de millones de lecturas por cada carrera en comparación con las 96 lecturas de la secuenciación convencional. Por otro lado, existen dos diferencias clave en las lecturas obtenidas por NGS: la longitud de las secuencias de lectura es mucho más corta que la de un secuenciador capilar y cada método de lectura NGS tiene un error característico, distinto al establecido para lecturas de secuencia capilar. Estas diferencias afectan a cómo se utilizan las lecturas en el análisis bioinformático, dependiendo de su aplicación (Tabla 7) (294).

Tabla 7. Especificaciones técnicas de las principales plataformas de secuenciación.

Plataforma de secuenciación		Rendimiento (bases por carrera)	Lecturas por carrera (millones)	Longitud de lectura	Tiempo por carrera (días)
Illumina	HiSeq X	1,6 – 1,8 Tb	6.000	2 x 150 pb	< 3
	MiSeq	300 Mb – 15 Gb	50	2 x 300 pb	0,2 – 2,7
Life technologies	Solid	80 Gb – 320 Gb	1.200 – 2.400	50-2 x 50 pb	7
	Ion Torrent	600 Mb – 2 Gb	3 – 5	200 – 400 pb	0,1
		10 – 15 Gb	60 – 80	200 – 400 pb	0,1
PacBio	Sequel	500 Mb – 16 Gb	55 – 880	>60 kb	<0,1 – 0,3
	RS II	500 Mb – 16 Gb	55 – 880	>60 kb	<0,1 – 0,3
Nanopore	PromethION	>12 Tb	1.250	230 – 300 kb	2
	MinION	>42 Gb	>4,4	230 – 300 kb	2

4.3 Secuenciación genómica de segunda generación.

Los métodos de secuenciación de segunda generación se pueden agrupar en dos categorías principales: (i) secuenciación por hibridación y (ii) secuenciación por síntesis. En estos métodos las reacciones se ejecutan en paralelo y en volúmenes pequeños, y por lo tanto el coste por cada par de bases secuenciado es nominal.

i. Secuenciación por hibridación (o captura).

La secuenciación por hibridación se basa en la fragmentación del ADN y la unión de los fragmentos a adaptadores que contienen secuencias complementarias a los *primers* de secuenciación. Este método utiliza sondas específicas para capturar aquellos fragmentos de ADN que contienen las secuencias de interés. En esta metodología se basan técnicas de análisis y diagnóstico genético, para la identificación de SNPS en genes específicos (polimorfismos de un solo nucleótido) relacionados con enfermedades o la identificación de anomalías cromosómicas macroscópicas (reordenamientos, deleciones, duplicaciones, variantes de número de copias) (292).

Introducción

Se trata de una metodología que permite un análisis muy sensible y preciso de genes de interés, aunque es una metodología más compleja y costosa.

ii. Secuenciación por síntesis (o amplificación)

Estos métodos permiten la incorporación de nucleótidos usando una variedad de enzimas y esquemas de detección que permiten recopilar datos de forma sincronizada con la síntesis enzimática. Generalmente incluyen la fragmentación previa del ADN/ARN a secuenciar, la generación de una librería o biblioteca de secuenciación que resulta de la unión de adaptadores (oligonucleótidos) específicos en cada extremo de los fragmentos de ADN a secuenciar, y la amplificación de las secuencias de ADN previa fijación covalentemente a un soporte sólido mediante los adaptadores sintéticos (291). Generalmente utilizan un soporte sólido que contiene unos pocillos donde tienen lugar las reacciones de secuenciación de moléculas de ADN, no utilizan didesoxinucleótidos terminadores, aunque algunas tecnologías utilizan nucleótidos terminadores reversibles que permiten la incorporación de nucleótidos bloqueados, y posteriormente se eliminan esos restos de bloqueo para permitir la incorporación de la siguiente base en la secuencia. Los fragmentos de ADN son amplificados por PCR o por métodos isotérmicos, y tras ello cada molde obtenido se somete a reacciones de síntesis de ADN a partir de los extremos 3'OH libres, detectándose cada incorporación nucleotídica debido a que están marcados o acoplados a reacciones químicas. Los soportes utilizados permiten establecer una coordenada X-Y fija para cada molde de ADN y de igual forma asignar de forma específica cada señal de incorporación a cada molde de ADN (291,292).

Debido a que los métodos de síntesis están detectando la incorporación de nucleótidos de una población de fragmentos de ADN amplificados en cada coordenada X-Y, y debido a los distintos tipos de ruido de fondo que se acumulan derivados de las reacciones de incorporación de nucleótidos, la longitud de las lecturas y por tanto también de las secuencias de ADN es limitada (291). Se han desarrollado muchas tecnologías para permitir la generación de millones de lecturas de secuenciación de ADN en una sola carrera, que pueden durar horas o varios días, dependiendo del rendimiento. Estos métodos se basan en lecturas mucho más cortas de hasta 300-500 bases aproximadamente con una tasa de error intrínseca más alta en relación con la secuenciación de Sanger, y ofrecen una cobertura de secuenciación que varía entre millones y miles de millones de lecturas permitiendo obtener una secuencia precisa para su comparación con secuencias consenso (291,292).

Introducción

Las pruebas basadas en la tecnología NGS también presentan unas limitaciones que deben ser conocidas por los usuarios para una adecuada interpretación de los resultados obtenidos. En primer lugar hay que tener en cuenta que este tipo de secuenciación masiva y paralela también conlleva un aumento de errores en relación con la cobertura o profundidad con la que se secuencian los genes. En las pruebas NGS, la cobertura de lecturas de un mismo fragmento es más baja en comparación con Sanger, por lo que hay más probabilidad de que se omitan regiones con variantes considerables para proporcionar un diagnóstico adecuado. Por otra parte, en el proceso de amplificación de la secuenciación por síntesis se pueden generar errores, especialmente en regiones con alto contenido de G-C, que finalmente pueden terminar por afectar al posterior análisis de datos. Otra limitación es la reducción de la longitud de las secuencias (40-400 pb) en comparación con Sanger (800-1000 pb), lo que genera mayor dificultad en el análisis de datos. Además, a medida que progresa la secuenciación se produce la escisión de bases en los sucesivos ciclos de adición de nucleótidos, lo que se traduce en un aumento del ruido que acaba limitando la longitud de las lecturas. El uso de varias plataformas con diferentes tecnologías puede ser una buena opción para evitar este tipo de limitaciones (291,292).

**Ion Torrent*

Es una metodología de secuenciación de ADN por semiconductores que está disponible desde el año 2010, basada en la detección de los iones de hidrógeno liberados cada vez que se produce la incorporación de un nucleótido a la cadena de ADN en crecimiento, y cuya secuencia de nucleótidos es transformada en información digital en un chip semiconductor (295). El proceso comienza con la fragmentación del ADN en fragmentos de 200 a 1500 pb a los que se les añaden dos adaptadores distintos a cada extremo, y se unen mediante uno de los adaptadores a las secuencias de oligonucleótidos complementarias existentes en la superficie de partículas de emulsión. A continuación se produce la amplificación mediante PCR en emulsión (emPCR), tras la que se obtienen millones de partículas con múltiples copias de una misma secuencia de ADN adheridas. Las partículas se hacen fluir a través del chip que contiene los micropocillos de forma que únicamente una partícula ingresa a cada uno de los micropocillos. Cuando los reactivos de secuenciación fluyen a través de los micropocillos y se incorpora el nucleótido apropiado, se emite un ion de hidrógeno y se registra la señal (292).

Cada incorporación de un desoxinucleotridifosfato (dNTP) en la cadena de ADN en crecimiento implica la formación de un enlace covalente y la liberación de pirofosfato junto con un ión de hidrógeno. La reacción tiene lugar en micropocillos dentro de un

Introducción

chip semiconductor, cada micropocillo contiene una única molécula de ADN molde y una polimerasa. Estos pocillos son secuencialmente inundados con uno de los 4 dNTPs, y si el dNTP introducido es complementario al siguiente nucleótido desapareado en la cadena molde la ADN polimerasa lo incorpora a la cadena de ADN en crecimiento. El ion de hidrogeno que se libera en la reacción modifica el pH de la solución, que puede ser registrado como un cambio de voltaje por un sensor de iones o un medidor de pH. Al final de cada ciclo las moléculas del dNTP no incorporadas son eliminadas de los micropocillos antes de iniciar siguiente ciclo. Si en la secuencia molde existen homopolímeros se incorporarán varias moléculas del mismo dNTP en un solo ciclo, liberándose varios átomos de hidrógeno y por tanto incrementándose proporcionalmente la señal. Las reacciones de secuenciación ocurren en millones de micropocillos que cubren un chip semiconductor de oxido metálico y cada uno contiene su correspondiente detector, que convierte la información química derivada de la liberación de cada ión hidrógeno en un impulso eléctrico que es transmitido a un ordenador, y se traduce en una secuencia de ADN, sin requerir conversión, ya que los eventos de incorporación de nucleótidos se miden directamente. El procesamiento de señales y la obtención de la secuencia de ADN pueden llevarse a cabo con el software apropiado para ello. Los principales beneficios de la secuenciación por semiconductores son la alta velocidad de secuenciación y el bajo coste. Mientras que la limitación más importante, al igual que ocurre con la pirosecuenciación, la encontramos en zonas donde se secuencian homopolímeros, donde resulta difícil diferenciar longitudes de 7 o 8 unidades del mismo nucleótido (292,295).

**Illumina*

Dentro de las tecnologías de secuenciación de segunda generación destaca la desarrollada por Solexa y LynxTherapeutics, posteriormente adquirida por Illumina, que salió al mercado en el año 2006. En esta tecnología se utilizan nucleótidos terminadores reversibles, se trata de didesoxinucleótidos marcados con grupos fluoróforo, igual que en la secuenciación por Sanger, con la diferencia de que se puede eliminar la fluorescencia una vez obtenida la imagen y desbloquear el carbono 3', de esta forma puede aceptar una nueva base para continuar la reacción de secuenciación (296). Al igual que el método de secuenciación 454, los primeros pasos consisten en la fragmentación del ADN en moléculas de aproximadamente 500 pb y su unión con adaptadores apropiados en cada extremo. Estos fragmentos a continuación son los sustratos para el proceso de amplificación por PCR mediada por puente, que tiene lugar sobre en una superficie sólida o celda de flujo, dónde también tiene lugar posteriormente el proceso de secuenciación. La celda de flujo es un microdispositivo

Introducción

de vidrio sellado que consta de 8 canales, que permite la amplificación por PCR puente de los fragmentos de ADN en su superficie, y utiliza la ADN polimerasa para producir múltiples copias o grupos a partir de una molécula única obteniendo librerías de ADN con aproximadamente un millón de copias del fragmento ADN original. Se puede agregar una librería de ADN a cada canal, la misma librería en todos los canales, o combinaciones de éstas (292,297).

El primer paso para la amplificación es depositar la librería de fragmentos de ADN obtenida en la celda de flujo. La celda contiene distribuidos de una forma espaciada sobre su superficie secuencias de oligonucleótidos que son complementarias a los adaptadores ligados a los fragmentos de ADN, de modo que las moléculas de ADN quedan ancladas y van a actuar como molde para la ADN polimerasa que realiza la etapa de extensión desde el extremo 3', obteniéndose fragmentos de ADN de doble cadena. A continuación, se produce la desnaturalización para obtener de nuevo ADN de cadena simple, y el extremo libre hibrida con un oligonucleótido complementario adyacente de la superficie sólida formando un puente en forma de U invertida. Esta molécula de ADN vuelve a servir de molde para la polimerasa obteniendo de nuevo un fragmento de ADN de doble cadena, pero en esta ocasión ambas cadenas están unidas entre sí mediante puentes de hidrógeno y por enlaces covalentes a la superficie sólida. Seguidamente, se produce una nueva desnaturalización para obtener dos moléculas de ADN de cadena simple complementarias separadas y fijadas a la superficie sólida por uno de sus extremos mientras que los extremos libres hibridan por puentes de hidrógeno con otro de los oligonucleótidos adyacentes de la superficie sólida, formando nuevos puentes en forma de U invertida. Este proceso de amplificación por puentes es repetido 35 veces generando *clusters* de aproximadamente 1000-2000 moléculas de ADN. Tras cada ciclo, las cadenas de sentido negativas son liberadas de la superficie sólida mediante un proceso de escisión específico de oligonucleótidos, obteniendo al final un grupo de moléculas de ADN de cadena simple iguales en cada *cluster*. El extremo 3'OH libre es bloqueado para prevenir uniones no específicas, los cebadores de secuenciación son hibridados a los extremos del ADN molde (Figura 17). Finalmente se transfiere la celda de flujo con los *clusters* al secuenciador (294,297).

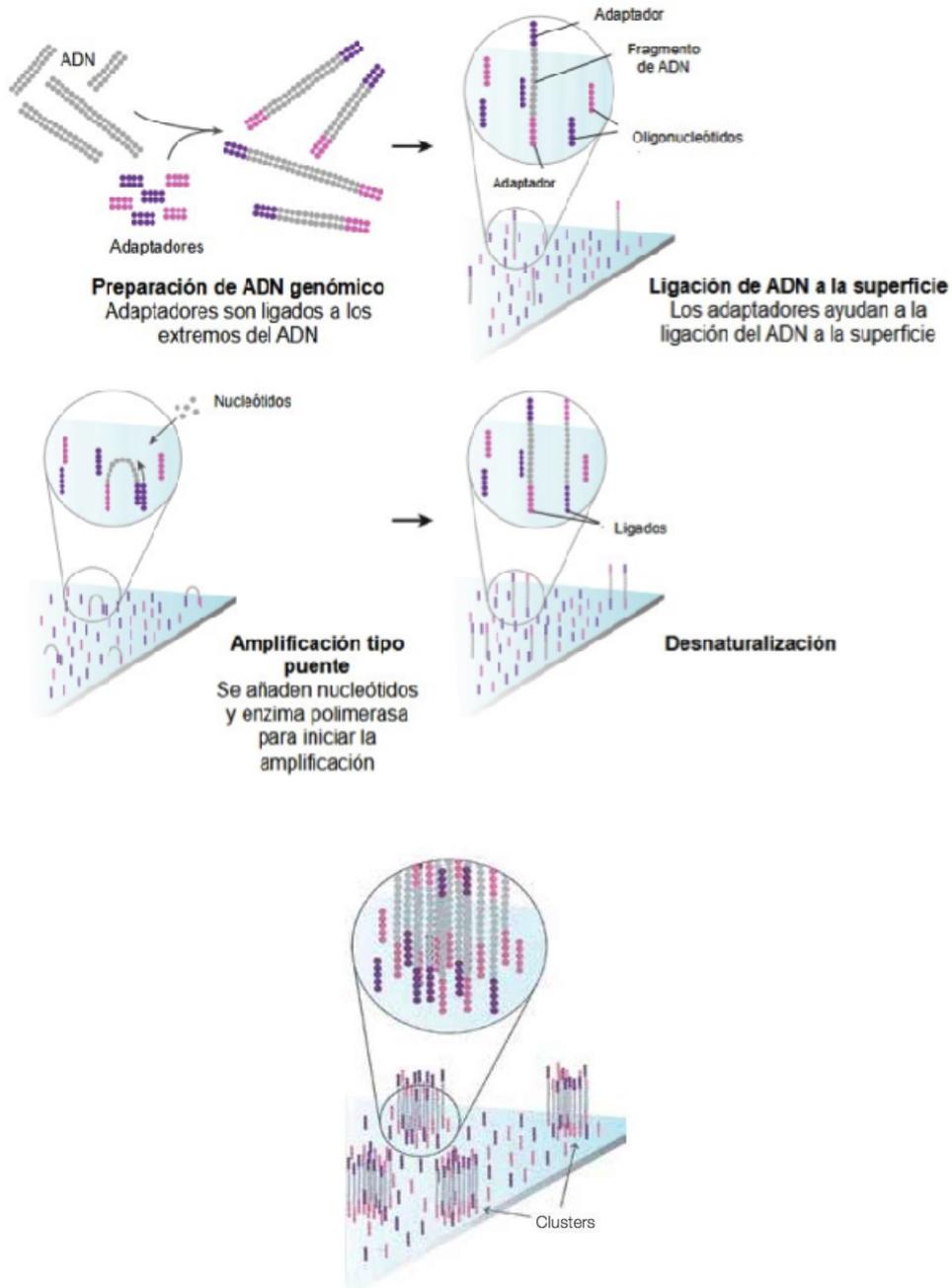


Figura 17. Preparación y amplificación por PCR puente en metodología Illumina. Fuente: Imagen adaptada de Mardis et al. 2008 (294).

El sistema Illumina utiliza un enfoque de secuenciación por síntesis en el que los cuatro nucleótidos se agregan simultáneamente con la ADN polimerasa, a diferencia de la pirosecuenciación. En la reacción de secuenciación, se bloquea uno de los adaptadores, y se comienza la reacción de secuenciación desde el otro extremo mediante un cebador específico. Cada nucleótido lleva un marcador fluorescente específico y se encuentran químicamente bloqueados en 3' de forma que cada incorporación es un evento único. Después de cada paso de emisión de señal, se

Introducción

elimina el grupo que bloquea la posición 3' y la cadena queda preparada para la próxima incorporación nucleotídica por la ADN polimerasa. Esta serie de pasos continúa durante un número específico de ciclos, según lo determinado por la configuración del instrumento definida por el usuario, lo que permite longitudes de lectura discretas de entre 35-75 bases. Un algoritmo *base-calling* evalúa la calidad de las lecturas para cada secuencia y realiza el control de calidad de cada carrera, eliminando las de baja calidad (294).

La terminación de la síntesis del ADN tiene lugar tras la adición de un único nucleótido con bloqueo reversible y marcado con un fluoróforo diferente. Para la incorporación de estos nucleótidos la polimerasa debe estar modificada en su centro activo. Después de la incorporación del nucleótido, los restantes que no han sido incorporados son retirados mediante un lavado, y es en ese momento cuando tiene lugar la medición de la señal mediante la excitación de los fluoróforos por dos tipos de láser, uno para identificar la incorporación de T o G, y otro para la incorporación de A o C. Además se utilizan dos filtros diferentes para diferenciar las señales emitidas entre G/T y A/C. Las señales llegan a una cámara que determina el nucleótido incorporado y obtiene una foto de múltiples *clusters* a la par, identificado por su posición espacial en el eje X-Y cada uno de ellos. Después le sigue el paso de escisión, el cual elimina el bloqueo de la posición 3' y el fluoróforo, y un lavado adicional antes de iniciar un nuevo ciclo (Figura 18).

La extensión sincrónica nucleótido a nucleótido hace posible la secuenciación de homopolímeros pero de tamaño reducido debido a que un posible error en la incorporación del nucleótido durante el ciclo de secuencia puede generar un efecto de desfase en la secuenciación de ese *cluster*, de forma que las señales obtenidas en los ciclos esten alteradas. El gran éxito de secuenciación de esta plataforma radica en su habilidad para realizar billones de reacciones a la vez, teniendo lugar todas ellas en la superficie sólida. Normalmente, estos secuenciadores cuentan con hasta ocho cámaras distintas que reciben el nombre de líneas, y cada línea es independiente pudiéndose secuenciar mezclas de librerías distintas sin que exista contaminación entre líneas. Dado que el dispositivo de captura de imagen no puede obtener una imagen de todos los *clusters* presentes en una línea, se obtienen varias imágenes de múltiples localizaciones de una línea, y a estas localizaciones se les llama *tiles*. Cada imagen puede contener cientos de miles de *clusters*, y cada *cluster* está formado por una molécula que consta de 1000-2000 copias, de forma que se obtiene un elevado nivel de intensidad en la señal emitida. Sin embargo, la distancia física entre las copias de ADN que forman un *cluster* se encuentra por debajo del límite de difracción,

Introducción

permitiendo que la imagen a percibir se corresponda con un solo punto. Los datos obtenidos por esta tecnología de secuenciación es una serie de imágenes obtenidas de la emisión de millones de *clusters* en una combinación específica de línea, *tile*, ciclo y fluoróforo, y estas imágenes sirven de entrada al algoritmo de *base-calling*.

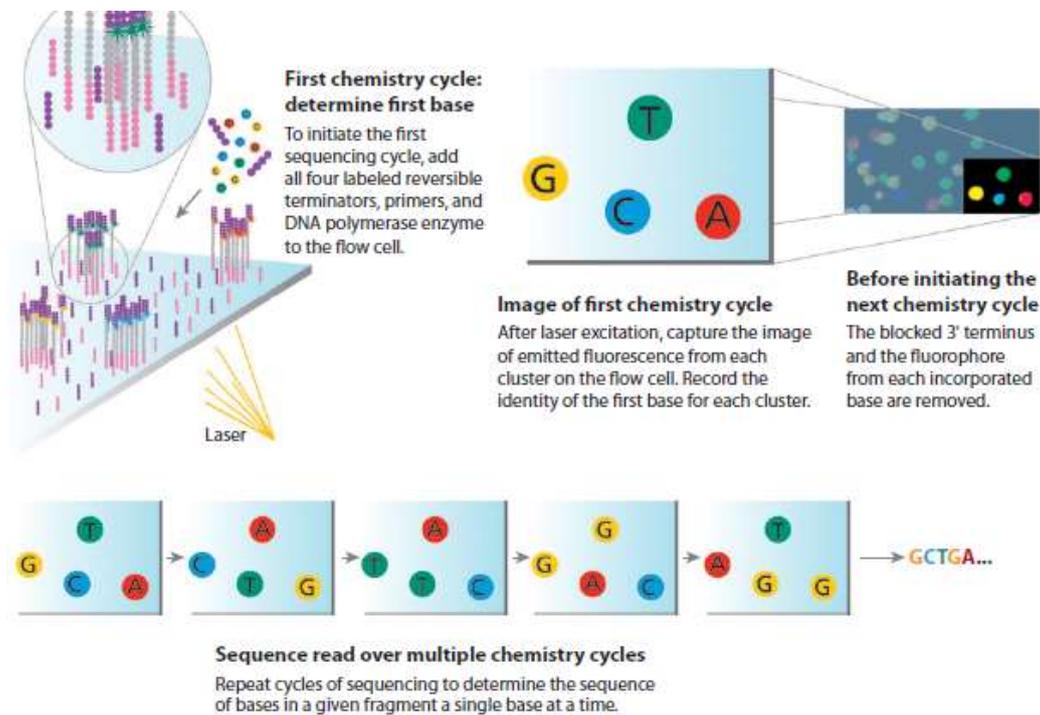


Figura 18. Secuenciación por Illumina. Fuente: Imagen adaptada de Mardis et al. 2008 (294).

Una vez que se obtienen las imágenes, es necesario diferenciar en cada posición a qué base se corresponde cada imagen así como su calidad, por lo que se utiliza un algoritmo en el que es prioritario transformar la imagen a una intensidad utilizando el programa de *multiplexing Firecrest*, que identifica cada posición del *cluster* y extrae la intensidad mediante el filtrado de imágenes, realiza los *clusters*, elimina el ruido de fondo y detecta *clusters* basados en características morfológicas en la imagen. Actualmente se realiza en tiempo real durante el proceso de secuenciación, creando un archivo de intensidades que contienen la posición de cada *cluster* en línea, *tile*, y coordenadas X e Y junto con una matriz de cuatro intensidades, una por cada nucleótido en cada ciclo. Los valores de intensidades muestran una correlación lineal con los datos obtenidos con las imágenes generadas.

Por otra parte, se utiliza un módulo llamado *Bustard* para el *base-calling*, que descodifica la señal y aplica una serie de correcciones para el *cross-talk*, *phasing* y *prephasing*. Las plataformas Illumina poseen dos láseres y cuatro filtros para detectar

Introducción

los cuatro fluoróforos distintos anclados a cada nucleótido. Las frecuencias de emisión de estos cuatro fluoróforos se superponen, por lo que las cuatro imágenes generadas no son independientes, y es aquí donde el módulo *Bustard* las decodifica mediante una matriz de frecuencias. En cuanto al fenómeno *phasing/prephasing*, hay que destacar que dependiendo de la eficacia de los fluidos y de la reacción de secuenciación, un número pequeño de moléculas de cada *cluster* pueden adelantarse (*prephasing*) o retrasarse (*phasing*) del resto de moléculas durante la incorporación de nucleótidos en cada ciclo. Este efecto es mitigado aplicando correcciones basadas en la misma frecuencia de bases durante la fase de *base-calling*. Otros problemas que pueden aparecer en este tipo de secuenciación son aquellos relacionados con la pérdida de color que sufre el fluoróforo, debido a que el proceso de secuenciación es lento. Además, la presencia del láser puede crear especies reactivas y al mismo tiempo, el ADN está sometido a condiciones ambientales adversas. Es por todo ello que la intensidad de la señal fluorescente disminuye con el tiempo. La escisión insuficiente del fluoróforo puede crear una distorsión residual, y diferentes tipos de fluoróforos pueden tener diferentes probabilidades de escisión, por lo que una mala escisión de alguno de ellos puede crear un sesgo de un nucleótido determinado, que aumentará con el número de ciclos de secuenciación.

La tecnología Illumina permite la secuenciación de un solo extremo o de extremos emparejados ("*paired end*"). En la secuenciación de extremos emparejados (PES), se produce la secuenciación de ambos extremos del fragmento de ADN, generando dos lecturas por cada fragmento de la librería de ADN. Para generar una segunda lectura, se realiza otra ronda de amplificación del puente, seguida de la división de la cadena hacia adelante, antes de realizar la segunda ronda de secuenciación. Ambas lecturas se procesan juntas de manera computacional (298). Esta modalidad de secuenciación masiva PES permite la realización de millones de secuencias en paralelo, incorporándose cada uno de los cuatro nucleótidos marcados con un indicador fluorescente diferente, y que van a actuar como terminadores de la síntesis, detectándose posteriormente la emisión de fluorescencia. Los nucleótidos se desbloquean después de la detección para permitir la entrada de un nuevo nucleótido en el siguiente ciclo de síntesis. Los últimos modelos permiten secuenciar en paralelo más de 3000 millones de *clusters* con una longitud de lectura en las secuencias obtenidas menor que con los secuenciadores 454, ya que oscilan entre 35 y 150 bases. Sin embargo, la capacidad de realizar lecturas en paralelo es mucho mayor que en 454, pudiendo obtener hasta 6×10^{12} lecturas en una sola tanda.

La metodología de secuenciación por Illumina permite su aplicación a la secuenciación genómica, secuenciación de exoma y metagenómica, secuenciación de ARN, y estudios de metiloma. Un problema que puede surgir con esta metodología es la falta de sincronía en las reacciones de síntesis entre los miembros individuales de un grupo, lo que interfiere en la generación de una secuencia precisa y reduce el número de ciclos que se pueden realizar. También se debe tener cuidado de no sobrecargar el soporte, por lo que requiere una cuantificación precisa de la cantidad de ADN que se carga en la matriz. Dentro de la gran cantidad de datos generados, también puede realizarse el análisis de los errores de secuenciación generados a partir del proceso de secuenciación, ayudando de este modo a la identificación de variantes de secuencia reales (299).

4.4 Secuenciación genómica de tercera y cuarta generación.

Se han desarrollado nuevos secuenciadores que son capaces de secuenciar de forma directa sin necesidad de amplificación previa mediante una metodología que se conoce como “secuenciación de molécula única”. Las ventajas de este tipo de secuenciadores se deben a la posibilidad de secuenciar en tiempo real (sin necesidad de pausas entre los flujos de nucleótidos) y realizar lecturas de moléculas de ADN de miles de bases de longitud. Por otro lado, la precisión de estos métodos es algo menor que la que se obtiene con la metodología NGS.

La secuenciación de tercera generación tiene como objetivo secuenciar moléculas largas de ADN (y ARN). El actual líder tecnológico comercializado en esta área es PacificBiosciences (PacBio), que ha comercializado dos sistemas, el modelo original RSII y más recientemente, el Sequel™. La secuenciación de PacBio, también conocida como secuenciación “*single molecule real time*” (SMRT), permite la secuenciación de fragmentos muy largos, hasta 30–50 kb o más. El método SMRT implica la unión de una ADN polimerasa modificada con el ADN unido a secuenciar y la utilización de una “*zero-mode wave guide*” (ZMW) en una celda de flujo SMRT. Debido al diseño de ZMW y la longitud de onda de la luz, las imágenes se producen sólo en la parte inferior de la ZMW donde se encuentra el ADN unido a la ADN polimerasa. Cada uno de los nucleótidos está marcado por un fluoróforo distinto, y a medida que se incorpora cada nucleótido en la cadena en crecimiento, se obtiene de inmediato la señal fluorescente, y posteriormente se libera grupo fluorescente que se aleja del fondo de la ZMW, quedando preparado para la incorporación del siguiente nucleótido (300,301).

Introducción

La preparación del molde de ADN es única en el proceso PacBio ya que implica la producción de una "SMRTbell", una molécula de ADN circular de doble cadena con una secuencia adaptadora conocida que es complementaria a los cebadores utilizados para iniciar la síntesis de ADN. Esto permite que la ADN polimerasa lea numerosos moldes de ADN en cada ZMW hasta que la polimerasa se detiene, para construir una secuencia consenso circular. Como los adaptadores ligados a cada lado del ADN insertado tienen sitios de cebado para la síntesis de ADN, la polimerasa de secuenciación puede atravesar la SMRTbell circular en la dirección 5'→3' en cualquiera de las cadenas de ADN, proporcionando información complementaria de ambas cadenas del SMRTbell (301).

Una ventaja importante del proceso de imágenes y detección de secuenciación en tiempo real PacBio es que se puede medir la velocidad de cada adición de nucleótidos durante la síntesis, denominada duración entre pulsos (IPD). Muchos nucleótidos con modificaciones en la base, como algunas metilaciones en A o C, van a modificar la IPD, y por lo tanto pueden identificarse como una base modificada, permitiendo detectar y catalogar muchas modificaciones diferentes para estudios epigenéticos, como los sitios de metilación (292,302). Además, esta metodología también presenta la ventaja de proporcionar lecturas largas que favorecen el ensamblaje en el estudio de genomas. En consecuencia resulta relativamente sencillo ensamblar secuencias completas de genoma bacteriano a partir de unas pocas SMRT y determinar los patrones de metilación. La limitación de la secuenciación PacBio SMRT es una tasa de error alta, aunque esto generalmente se supera debido a la profundidad de lectura obtenida en cada ZMW para cada SMRTbell. En la práctica, es frecuente utilizar los ensamblajes PacBio combinados con otros métodos, como la secuenciación Illumina, para una mayor precisión en la obtención de secuencias del genoma (292,301). En términos de rendimiento, el PacBio RSII (2013) utiliza chips con 150000 ZMW, que cuando se optimizan, pueden generar hasta 350 Mb de secuencia por cada celda SMRT. Las continuas actualizaciones tecnológicas y el uso de otros métodos auxiliares para conseguir aislar fragmentos de ADN grandes para la secuenciación de PacBio están permitiendo proporcionar mayor cantidad de lecturas, más largas y más precisas (292).

En cuanto al fundamento de la secuenciación de cuarta generación, se basa en la posibilidad de hacer pasar moléculas largas de ADN a través de nanoporos, y medir las diferencias de corriente obtenidas al paso de cada nucleótido por un detector. En teoría, se podrían pasar más de 100 kb de ADN a través del nanoporo, y con muchos canales se podrían lograr entre decenas y cientos de Gb de secuencia a un coste

relativamente bajo (292,303). La secuenciación de ADN basada en nanoporos se propuso por primera vez a finales de la década de los 90 y recientemente *Oxford Nanopore Technologies* ha logrado su comercialización con los secuenciadores: MinION portátil (con 512 canales de células de flujo de nanoporos), GridION (formado por 5 minION en un módulo) y PromethION (con 48 células de flujo de 3000 nanoporos cada una). Estos secuenciadores utilizan nanoporos de proteínas en una membrana polimérica con resistencia eléctrica, y a medida que cada nucleótido pasa a través del nanoporo tiene lugar una interrupción de la corriente eléctrica que es característica para cada nucleótido quedando registrada a tiempo real (304). Debido a su tamaño pequeño y portátil, el MinION tiene potencial para muchas aplicaciones donde los requisitos de portabilidad y espacio son muy importantes. Actualmente, la tasa de error de lectura es relativamente alta en comparación con metodología de secuenciación por síntesis, por lo que se requiere una cobertura de datos de secuencia más alta y enfoques computacionales novedosos para poder analizar los datos resultantes. La tecnología Nanopore se ha utilizado para secuenciar muestras ambientales y metagenómica, y actualmente se está utilizando para la identificación de cepas bacterianas. La tecnología Nanopore también puede identificar modificaciones de bases, similares a la tecnología PacBio, lo que permite identificar fácilmente los eventos epigenéticos (305).

4.5 Aplicaciones secuenciación genómica

*Cáncer

El Proyecto del Genoma Humano ha proporcionado mucha información sobre secuencias de genes relacionados con el cáncer utilizando para ello técnicas de amplificación por PCR y de secuenciación por metodología Sanger sobre el ADN extraído de material tumoral. El grupo de investigación de Vogelstein también ha aplicado este enfoque para analizar casi todos los genes humanos conocidos e identificar mutaciones puntuales en el CCR y cáncer de mama. Posteriormente, también se financiaron estudios a mayor escala bajo esta metodología para caracterizar las vías implicadas en el cáncer de pulmón. Los problemas de este enfoque es que no ofrece la posibilidad de ampliar los estudios debido a las grandes cantidades de tejido tumoral necesarias para recuperar ADN, la escasa sensibilidad para mutaciones de bajo nivel o para tumores con una gran proporción de células normales, y las dificultades relacionadas con la homología en las familias de genes. (306).

Introducción

La secuenciación del genoma completo (WGS) mediante NGS ha ayudado a identificar variantes genéticas, incluidas las variantes de un solo nucleótido (SNV; “*single-nucleotide variant*”) o polimorfismos de un solo nucleótido (SNP; “*single-nucleotide polymorphism*”), pequeñas inserciones y deleciones, y variantes estructurales y genómicas. En el año 2008, Wheeler et al. publicaron la secuenciación de ADN del primer genoma diploide perteneciente a un individuo obtenido por tecnología NGS, demostrando así la adquisición de una nueva secuencia humana que incluye nuevos genes no identificados previamente por secuenciación genómica tradicional, de una forma más rápida y significativamente menos costosa que la tecnología tradicional basada en la electroforesis capilar (307). En el mismo año, Ley et al. publicaron la secuenciación completa del genoma típico de leucemia mieloide aguda y demostraron que la interpretación precisa de las mutaciones somáticas se puede realizar comparando con un tejido normal del mismo paciente (308). Todos los estudios de WGS en cáncer a gran escala han utilizado el enfoque basado en la comparación de las secuencias obtenidas de tumores sólidos con las de los tejidos periféricos. Sin embargo, resulta complicado interpretar cómo van a afectar a la funcionalidad de las proteínas las variantes obtenidas mediante NGS. El máximo beneficio de NGS sólo se logra si se dispone de un soporte bioinformático de alto rendimiento, capaz de utilizar e interpretar las secuencias de lectura corta obtenidas. Además las diferencias existentes entre las diversas plataformas NGS en cuanto a formato de datos o longitud de lecturas hacen necesario disponer de herramientas para evaluar la calidad de las secuencias, la alineación, el ensamblaje y el procesamiento de los datos (306).

También se han diseñado métodos para secuenciar ARN utilizando también plataformas NGS (ARN-seq), para así poder evaluar la expresión posterior de mutaciones identificadas en ADN y proporcionar información de la trascendencia de los mecanismos epigenéticos implicados en el cáncer (metilación, empaquetamiento de cromatina). Desarrollos metodológicos posteriores basados en NGS han permitido evaluar la metilación (Methyl-seq) y el empaquetado de cromatina del ADN genómico, en los que la interpretación de los datos obtenidos resulta óptima cuando se compara con los obtenidos para el tejido adyacente no tumoral (309,310). Para estudios epigenómicos y de los mecanismos reguladores del genoma, los investigadores pueden utilizar la secuenciación de la metilación del ADN y la inmunoprecipitación de la cromatina seguida de secuenciación (ChIP-Seq). Además, la aplicación de diferentes algoritmos sobre los datos obtenidos permite obtener múltiples tipos de variaciones a partir del mismo conjunto de datos (306).

Introducción

Los estudios han demostrado que las mutaciones en los genes relacionados con el cáncer no son específicas del tipo de tejido tumoral y que existen mutaciones que pueden estar activas en cualquier tipo de cáncer. Esto ha tenido como resultado el desarrollo de pruebas NGS para múltiples genes que pueden aplicarse a los distintos tipos de cáncer permitiendo una gestión racional del escaso tejido tumoral del que a menudo se dispone (311).

Actualmente cada vez es mayor el número de mutaciones que se pueden conocer o caracterizar a partir de una muestra procedente de un paciente. Continuamente están surgiendo nuevos métodos, como la “biopsia líquida”, para analizar la sangre u otros fluidos corporales (líquido cefalorraquídeo, orina). Como resultado de la liberación del contenido celular durante la apoptosis, todas las células del cuerpo pueden liberar ADN a la circulación, conocido como “ADN libre circulante”, pero además pueden también en alguna ocasión arrojar células a la circulación, lo que se conoce como “células tumorales circulantes” (CTC) (312,313).

*Microbioma

Las técnicas microbiológicas clásicas siguen aplicándose en la actualidad en todos los laboratorios microbiológicos clínicos, siendo éstas muy limitadas por su baja sensibilidad en cuando a la detección de especies o taxones bacterianos que comparten características bioquímicas y metabólicas. La aparición en los años 80 de los primeros métodos basados en el análisis de ADN extraído directamente de una muestra, con independencia de la realización de cultivos *in vitro* previos, permitió a los investigadores disponer de una herramienta clave para investigar varios aspectos de las comunidades microbianas, como la composición taxonómica y la metagenómica funcional. Los primeros métodos basados en el ADN extraído de una comunidad microbiana trataban de buscar genes específicos mediante la hibridación con sondas específicas fluorescentes *in situ* (FISH). Alternativamente, los genes específicos se amplificaban mediante PCR, se clonaban en *E.coli* y posteriormente se sometían a la secuenciación mediante metodología Sanger, aunque con un bajo rendimiento y sin poder proporcionar una visión exhaustiva de la diversidad microbiana (314).

La técnica más utilizada en la investigación microbiológica actual para la identificación de microorganismos se basa en la secuenciación del gen 16S ARNr. Se trata de un gen que está presente en todas las bacterias y se caracteriza por presentar secuencias altamente conservadas pero también secuencias hipervariables. Este hecho ofrece la ventaja de poder utilizar cebadores universales que coinciden con secciones de zonas conservadas para realizar técnicas de amplificación por PCR y

Introducción

producir amplicones que abarquen regiones diferenciales con la variabilidad suficiente para poder diferenciar entre especies bacterianas. Los productos obtenidos tras secuenciación se pueden comparar con las secuencias contenidas en las bases de datos de referencia para rastrear la ecología y evolución de los microorganismos (314,315).

Las técnicas microbiológicas independientes del cultivo que se han desarrollado durante la última década se basan en la secuenciación de alto rendimiento del ADN bacteriano. La aparición de la tecnología NGS ha posibilitado una investigación de manera eficiente y completa de las comunidades microbianas, permitiendo detectar la totalidad de especies bacterianas, incluidas las menos abundantes, basándose en los polimorfismos genéticos de algunos genes comunes a todos los procariotas, y la posterior comparación con bases de datos para la identificación taxonómica (315).

En la actualidad esta metodología es la de elección para la secuenciación del ADN de muestras procedentes de un organismo en combinación con otros análisis como la transcriptómica, proteómica, o metabolómica. A partir de entonces se iniciaron programas de investigación a gran escala con financiación gubernamental, como el proyecto Metagenómica del tracto intestinal humano (MetaHIT) y el Proyecto del microbioma humano (HMP). MetaHIT se inició en el año 2008 y tenía como objetivo secuenciar los genomas microbianos de muestras fecales derivadas de individuos con EII y obesidad frente individuos sanos (210,316). El HMP, desarrollado entre 2008 y 2013, trataba de caracterizar la diversidad de la microbiota presente en múltiples localizaciones del organismo en individuos sanos, para poder crear un catálogo de la composición promedio de la microbiota que sirviera de referencia para estudios posteriores (317). El estudio metagenómico de la microbiota fecal humana ha permitido aclarar una larga serie de aspectos previamente desconocidos sobre su fisiología, interacciones con la mucosa del tracto gastrointestinal y con otros órganos, sus alteraciones durante enfermedades agudas o crónicas, y su posible papel en la patogénesis de enfermedades tanto gastrointestinales como no gastrointestinales (315).

Estas técnicas aportan unas ventajas considerables en el estudio de la microbiota humana. En primer lugar, permiten la identificación simultánea de una gran cantidad de taxones que permiten comprender la complejidad y la diversidad de la MI humana mejor que cualquier otra técnica conocida. También identifican especies bacterianas generalmente no cultivables o con dificultad para su cultivo, superando así muchas limitaciones de las técnicas microbiológicas clásicas. Además han permitido detectar

taxones bacterianos previamente desconocidos en la microbiota humana y clasificarlos taxonómicamente con un alto grado de precisión. En última instancia, nos permiten estimar la abundancia relativa de los taxones individuales, proporcionando información cuantitativa muy importante para entender la estructura de la microbiota (315).

Las técnicas de secuenciación de molécula simple resuelven algunos de los principales problemas de la NGS, proporcionando lecturas mucho más largas en un tiempo notablemente reducido sin necesidad de amplificación previa de muestras y con una alta cobertura, pero con una alta fracción de inserciones y supresiones. Hasta la fecha, el principal objetivo se centra en la aplicación de estas nuevas tecnologías en el análisis del microbioma, y se está estudiando también para evaluar las comunidades microbianas en el futuro cercano. La combinación de datos de NGS y secuenciación de molécula simple resulta *a priori* una opción muy interesante en este ámbito (314).

Los estudios realizados con las diversas plataformas NGS han proporcionado una amplia gama de fenotipos de enfermedades relacionadas con la composición de la microbiota: EII, obesidad, diabetes, alergias, autismo, depresión, enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer e incluso las enfermedades pulmonares. A pesar de la gran cantidad de literatura, todavía hay muchas áreas de incertidumbre, y la comprensión del papel de la MI en la fisiopatología humana aún está lejos de poder afectar significativamente a la práctica clínica (315). Para muchas enfermedades crónicas, la participación de la microbiota en la fisiopatología y en la etiopatogenia no está completamente clara, aunque la evidencia existente respalda esta hipótesis. Por ello se debe estimar la capacidad de utilizar los datos taxonómicos y metagenómicos obtenidos de las distintas localizaciones anatómicas como biomarcadores en el diagnóstico o pronóstico para ciertas enfermedades en un futuro cercano (318).

5. Epigenética

La pérdida de estabilidad genómica y/o epigenómica se ha observado en la mayoría de las lesiones neoplásicas tempranas en el colon, y es probable que sea el evento molecular y fisiopatológico central en el inicio y desarrollo del proceso carcinogénico del CCR. Además, esa pérdida de estabilidad también acelera la acumulación de mutaciones y alteraciones epigenéticas en genes supresores de tumores y oncogenes, que impulsan la transformación maligna de las células del colon y su expansión clonal, seleccionando aquellas células malignas con un comportamiento más agresivo. Un paradigma predominante es que la célula “origen” de la mayoría de los CCR se trata

Introducción

de una célula madre o similar que reside en la base de las criptas del colon. En este modelo, las mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores conducen a la formación de células madre cancerosas, que son esenciales para el inicio y mantenimiento del tumor (111).

Las alteraciones más comunes observadas en CCR incluyen los productos de los genes *APC*, catenina-beta1 (*CTNNB1*), *KRAS*, *BRAF*, *SMAD4*, factor de crecimiento transformante-receptor beta 2 (*TGFBR2*), *TP53*, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato catalítico 3-quinasa subunidad alfa (*PIK3CA*), dominio interactivo rico en AT 1A (*ARID1A*), factor de transcripción de la familia SRY (*SOX9*), familia con similitud de secuencia 123B (*FAM123B*; también conocida como *AMER1*) y *ERBB2*, que promueven la carcinogénesis al perturbar la función de vías de señalización fundamentales, incluidas las vías de señalización Wnt- β -catenina, vía del factor de crecimiento epidérmico (EGF-MAPK), fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y TGF- β ; o al afectar genes que regulan los comportamientos centrales de las células, como la reparación y proliferación del ADN. El CCR se inicia con frecuencia por alteraciones que afectan la vía de señalización de Wnt, y las células neoplásicas progresan posteriormente por la desregulación de otras vías de señalización, incluidas las vías RAS-RAF-MAPK, TGF- β y PI3K-AKT (111).

Además de las mutaciones genéticas, las alteraciones epigenéticas ocurren comúnmente en pólipos y CCR, y parecen también estar implicadas en la progresión del cáncer. La evaluación del epigenoma del CCR ha revelado que en prácticamente todos los casos existen genes metilados de manera aberrante, y en el metiloma del CCR existe un promedio de cientos de miles de genes anormalmente metilados, de los cuales se supone que un subconjunto presenta un papel crítico en el desarrollo del CCR. La evaluación de los genes metilados en el CCR también ha revelado la existencia de un subgrupo molecular específico del CCR, el CIMP, que presenta una frecuencia particularmente alta de genes metilados. Estos avances han llevado a que determinadas alteraciones epigenéticas se tengan en cuenta como biomarcadores clínicos para aplicación en diagnóstico, pronóstico y terapéutica (319).

Los investigadores han relacionado los errores en la metilación del ADN con diversas patologías y el cáncer. La metilación del ADN es un mecanismo regulador epigenético que utilizan las células para mantener los genes en estado represivo, y consiste en la conversión de bases de citosina en 5-metilcitosina por enzimas de ADN metiltransferasa. En los mamíferos, la metilación de secuencias CpG se encuentra distribuida globalmente en todo el genoma, pero existen zonas de alto contenido en

Introducción

secuencias CpG, o “islas CpG”, que con frecuencia se encuentran cerca de los sitios de inicio de transcripción de genes en la región 5' (región promotora), y que pueden provocar el silenciamiento transcripcional a través de los efectos sobre la unión del factor de transcripción y los cambios producidos en la estructura de la cromatina. Las modificaciones en la metilación del ADN relacionadas con el proceso carcinogénico son tanto la hipermetilación de las islas CpG en los promotores de genes, que pueden silenciar los genes supresores de tumores, como la hipometilación de elementos genéticos repetitivos, que pueden conducir a la inestabilidad genómica o la activación de oncogenes (111). Se ha demostrado que los genomas de las células cancerosas están hipometilados en general en comparación con las células normales, con la excepción de algunos casos de hipermetilación en genes involucrados en la regulación del ciclo celular, reparación del ADN y otros eventos, en los que el silenciamiento propaga la metástasis. Es más, en determinados tipos de cáncer como es el CCR, la hipermetilación es detectable de forma temprana y podría servir como marcador de la enfermedad (320).

El genoma humano contiene 28 millones de islas CpG que se pueden encontrar en estado metilado, hidroximetilado o no metilado. El estado de metilación influye en las interacciones proteína-ADN, en la expresión génica y en la estructura-estabilidad de la cromatina, desempeñando un papel vital en la regulación de los procesos celulares. El papel de la metilación del ADN en los procesos fisiológicos y patológicos requiere una evaluación precisa de su distribución a nivel genómico, y los avances en la aplicación de las técnicas de secuenciación para la creación de perfiles de metilación del ADN han permitido el mapeo de perfiles de metilación de ADN completos, conocido como metiloma. Entre esas técnicas se encuentran la conversión mediante bisulfito de citosinas no metiladas en uracilo, la inmunoprecipitación con anticuerpos específicos para ADN metilado, y la escisión mediante endonucleasas de restricción dependientes de metilación. Todas estas técnicas se siguen de secuenciación o hibridación por *microarrays*, y van a generar resultados comparables pero que difieren en el alcance de la cobertura genómica de secuencias CpG, en la resolución, en la precisión cuantitativa y en el coste. Ninguno de estos métodos existentes proporciona una resolución de secuencias CpG óptima, una cobertura integral de todo el genoma o un coste asequible para un laboratorio clínico, particularmente cuando se analizan muchas muestras (321).

El método más completo es el basado en la secuenciación del genoma completo tras tratamiento con bisulfito (WGBS; “*whole-genome bisulfite sequencing*”), considerado el único enfoque capaz de producir una resolución única CpG, siendo quizás el método

Introducción

más utilizado, generalmente considerado superior a los métodos basados en enriquecimiento. En el WGBS, que incluye MethylC-seq (322) y BS-seq (323), se miden los niveles de metilación de citosina en todo el genoma y estima la proporción de metilación en aquellos lugares de enriquecimiento en islas CpG. Sin embargo, este método requiere volver a secuenciar todo el genoma para cada experimento, por lo que resulta costoso. Además, los genomas que han sido sometidos previamente a conversión con bisulfito tienen menor complejidad de secuencia y un contenido reducido de GC, por lo que el rendimiento de los métodos basados en WGBS también están influenciados por las diferencias potenciales en la eficiencia de la amplificación del ADN y la capacidad de alinear con precisión las lecturas de secuenciación convertidas con bisulfito, lo cual es más difícil que la alineación de lecturas convencionales (324). Una razón *a priori* importante por la que el WGBS se puede considerar superior a los métodos de secuenciación basados en el enriquecimiento, mediante captura o amplificación previa de determinadas áreas de interés del genoma, es que la transformación de los resultados obtenidos a estimaciones directas de los niveles de metilación de CpG es sencilla. Tras alinear las secuencias con el genoma de referencia se pueden contar e inferir las citosinas convertidas y no convertidas para inferir los niveles de metilación (321).

La secuenciación con bisulfito de representación reducida (RRBS) reduce el coste debido a que mide la metilación sólo de regiones ricas en islas CpG, requiere menos lecturas para lograr la misma profundidad, y alcanza la medición de entre el 10% y 15% de las islas CpG del genoma humano (325). Los métodos de enzimas de restricción, como es MRE-seq, incorporan digestiones paralelas utilizando varias endonucleasas de restricción, pudiendo cubrir cerca del 30% del genoma (326). Estas enzimas producen cortes sólo en los sitios de restricción con islas CpG no metiladas, de forma que las islas CpG metiladas podrían inferirse por la ausencia de lecturas en los sitios de corte que debería tener lugar en el caso de una digestión perfecta (321). Los métodos basados en la inmunoprecipitación del ADN metilado (MeDIP-seq) o en la unión de proteínas al ADN metilado (MBDseq), presentan la ventaja de un menor sesgo en cuanto a secuencias específicas de CpG en comparación con los métodos de enzimas de restricción (326,327). Sin embargo, la relación de enriquecimiento con los niveles absolutos de metilación está confundida por variables como la densidad de CpG, y además actualmente MeDIP-seq proporciona menor resolución en comparación con MRE-seq o métodos basados en bisulfito. Finalmente, también se dispone de plataformas basadas en *arrays*, ampliamente utilizadas, y que generalmente combinan la conversión de bisulfito preiva a la hibridación en matrices.

Introducción

Se trata de métodos con baja cobertura genómica puesto que se limitan a la detección de regiones de metilación concreta pero con una alta precisión cuantitativa (321).

II. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

Durante los últimos años se han publicado numerosos estudios que evidencian cómo la microbiota intestinal podría ejercer un importante papel en la promoción y progresión del CCR. La disbiosis microbiana se caracteriza por la proliferación de determinados microorganismos oportunistas con capacidad de promover un estado proinflamatorio, que desencadena la aparición de mutaciones génicas y expresión de determinadas proteínas capaces de alterar los mecanismos de reparación del ADN y por tanto contribuir a una inestabilidad genómica que ofrece resistencia frente a la apoptosis celular.

En base al conocimiento adquirido acerca de la implicación de los factores que contribuyen al desarrollo del CCR puede ser posible conocer como la microbiota intestinal puede contribuir cuantitativa y cualitativamente al desarrollo del mismo. Además las alteraciones epigenéticas tales como la metilación de promotores en genes humanos podría estar ocasionada por determinadas bacterias y ser la base para el desarrollo de determinados subtipos histológicos de CCR. Por tanto, la identificación de estas bacterias y sus consecuencias moleculares permitiría conocer mejor la carcinogénesis colorrectal y promover el uso de tratamientos probióticos o antibióticos específicos que muestren eficacia en las etapas más tempranas del desarrollo tumoral según su ruta patogénica.

A raíz de la introducción de las distintas técnicas de secuenciación tanto del ARNr 16S bacteriano como del genoma completo, *F. nucleatum* se ha postulado como un candidato potencial a biomarcador en el CCR. El estudio de investigación previo realizado dentro de la misma línea de investigación en pacientes con CCR, concluye que existe una alta abundancia de bacterias con actividad proinflamatoria, siendo *F. nucleatum* la bacteria más predominante en la mucosa tumoral. Además, el CCR tipo serrado mostró una composición bacteriana diferente respecto al CCR tipo convencional, destacando la sobrerrepresentación de *F. nucleatum* en este tipo de tumor (328).

En cuanto a la relación entre el microbioma y las alteraciones epigenéticas existe muy poco publicado. Dentro de esta misma línea de investigación se ha realizado un estudio de asociación entre microbioma y metiloma en el que destaca la asociación entre la hipermetilación de los genes de dedos de zinc en muestras de tejido tumoral con diversos géneros bacterianos entre los que se encuentra nuevamente *Fusobacterium spp.* (329)

Por todo ello, formulamos como principal hipótesis que la composición microbiana intestinal, y más específicamente la abundancia relativa de *F. nucleatum*, se relaciona

Justificación e Hipótesis

con alteraciones epigenéticas, y por lo tanto también presenta asociación con la ruta molecular implicada en la promoción y desarrollo del CCR.

III. OBJETIVOS

Objetivos

- Analizar el microbioma entre muestras de tejido T y muestras de tejido NT en el CCR.
- Estudiar la asociación de los genes que presentan diferencias significativas en el perfil de metilación entre muestras T y NT respecto a la abundancia del género *Fusobacterium*.
- Analizar la correlación existente entre la cuantificación relativa de *F. nucleatum* con los genes que presentan diferencias significativas en el perfil de metilación entre muestras T y NT respecto a la abundancia del género *Fusobacterium*.
- Identificar asociaciones entre la cuantificación relativa de *F. nucleatum* y las distintas características clínicas y moleculares incluidas en el estudio.
- Estudiar la utilidad potencial de la cuantificación relativa de *F. nucleatum* para el diagnóstico/cribado del CCR y para diferenciar entre los tipos de CCR.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño, población y criterios de estudio

Se trata de un estudio descriptivo transversal que incluye un total de 154 muestras pareadas procedentes de disecciones de pieza quirúrgica, correspondientes a 77 pacientes, procedentes de tejido tumoral y tejido no tumoral periférico de pacientes con CCR, recogidas durante el periodo que abarca desde el año 2004 hasta el 2016, y conservadas en el Biobanco del Hospital General Universitario Santa Lucía de Cartagena.

-Criterios de inclusión: individuos con edad superior a 18 años, previa firma de consentimiento informado para realización de colonoscopia y para el uso de sus muestras biológicas con fin investigador (Anexo I), y que no presentaban ninguna otra enfermedad intestinal.

-Criterio de exclusión: individuos que se encontraban en tratamiento antibiótico prolongado o que hubieran recibido tratamiento antibiótico en los tres meses previos a la intervención quirúrgica o colonoscopia.

2. Variables del estudio

Se recogieron los datos clínicos correspondientes al CCR (tipo histológico, localización y estadio del tumor) y los datos demográficos de los pacientes (sexo, edad).

Los criterios histológicos seguidos para establecer el tipo de CCR comprenden, en el caso del CC, la presencia de glándulas únicas o estructuras glandulares complejas revestidas por células cilíndricas o cuboidales con citoplasma basófilo o anfófilo. Los núcleos están estratificados, son redondos u ovalados, y el número de mitosis suele ser abundante. La denominada necrosis "sucia" suele ocupar la luz glandular (330).

En cuanto a los criterios histológicos para el diagnóstico de CCR tipo SAC, incluyen la presencia de epitelio serrado, citoplasma abundante claro o eosinofílico, núcleos vesiculares, ausencia o menos de un 10% de necrosis de la superficie total, producción de mucina y presencia de bolas celulares y bastones papilares en las áreas mucinosas (125).

El CCR tipo hmMSI-H se caracteriza por no presentar morfología serrada, presencia de células en anillo de sello y histología de carcinoma medular, producción de mucina, linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) y peritumorales, respuesta inflamatoria "Crohn-like", pobre diferenciación, heterogeneidad tumoral y borde tumoral pujante o "pushin", y *BRAF* mutado (331).

Material y métodos

La localización del tumor se consideró con respecto al ángulo esplénico como proximal (ciego, colon ascendente y transverso) o distal (colon descendente, colon sigmoide y recto), mientras que para el estadiaje del tumor se realizó según la clasificación TNM según la AJCC/IUAC.

3. Toma de muestras y almacenamiento

Las muestras de mucosa de pacientes con CCR fueron tomadas de las piezas de resección quirúrgica de la parte más superficial del tumor y de la mucosa normal adyacente al tumor. Todas las biopsias de mucosa tomadas presentaron una masa de 20-30 mg y fueron depositadas inmediatamente en tubos estériles con OCT (*Optimal Cutting Temperature*). Todas las muestras fueron almacenadas a -80 °C hasta su procesamiento.

4. Extracción de ADN a partir de tejido

Para la extracción del ADN se tomaron entre 5-15 mg (10 mm³) de muestra de tejido congelado usando el punzón de biopsia estéril desechable, disgregándolo mediante el uso del TissueRuptor® (QIAGEN, Hilden, Alemania) en 180 µl de tampón de lisis tisular ATL. A continuación, las muestras fueron incubadas con proteinasa K a 36 °C durante 3 horas a 300 rpm. Posteriormente se procedió a la extracción del ADN mediante el kit QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) de forma automatizada en el extractor QIAcube® (QIAGEN), siguiendo el protocolo del fabricante: "*Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol)*". El ADN extraído fue cuantificado (ng/µl) mediante el uso de un espectrofotómetro NanoDrop 1000® (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). La calidad o pureza del extraído de ADN fue determinada por los cocientes 260/230 y 260/280. El producto final de extracción fue almacenado a -80 °C para los posteriores procedimientos.

5. Estudio del microbioma bacteriano mediante NGS

Los datos metagenómicos de microbioma se obtuvieron por pirosecuenciación con IlluminaMiSeq System® después de construir las librerías de ADN para su secuenciación, proporcionando así información sobre la distribución del microbioma como abundancia relativa a nivel de géneros para cada muestra.

Protocolo:

Las secuencias específicas de genes utilizadas en este protocolo se dirigen a la región 16S RNAr V3 y V4, seleccionadas de Klindworth et al. (332), que a su vez están unidas a las secuencias de los adaptadores. Estas secuencias de cebadores para las

Material y métodos

regiones V3 y V4 crean un único amplicón de aproximadamente 460 pb y se describen a continuación:

*Cebador directo 16S:

5'TCGTCCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

*Cebador inverso16S:

5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATC

La secuencia del adaptador de Illumina que se agregan a las secuencias específicas del locus son:

*Adaptador directo: 5'TCGTCCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG- [cebador directo 16S]

*Adaptador inverso: 5'TCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG- [cebador inverso 16S]

Paso 1- Preparación de librerías ADN 16S:

1.1 PCR del amplicón.

En primer lugar se realiza una PCR para amplificar las regiones diana 16S siguiendo las instrucciones del fabricante.

	Volumen por muestra
Muestra ADN (extraído) 5 ng/μl en Tris pH 8,5 10 mM	2,5 μl
Cebador Directo (1μM)	5 μl
Cebador Reverso (1μM)	5 μl
2x KAPA HiFiHotStart Ready Mix	12,5 μl
Total	25 μl

La reacción de amplificación PCR se realiza en un termociclador utilizando el siguiente programa:

- 1- Desnaturalización inicial: 95 °C durante 3 minutos.
- 2- 25 ciclos de: 95 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos.
- 3- Extensión final: 72 °C durante 5 minutos.

Material y métodos

Los productos de PCR se visualizan mediante electroforesis capilar de alta resolución con el sistema *QIAxcel*® (Qiagen), comprobando que la banda del ADN amplificado se corresponde con el tamaño correcto (550 Kb).

1.2 Lavado de producto PCR.

En este paso se utilizan microesferas “AMPure XP” para purificar el amplicón 16S obtenido de restos de cebadores libres y de especies diméricas de cebadores.

	Volumen por muestra
Solución tampón Tris pH 8,5 10 mM	52,5 µl
Microesferas AMPure XP	20 µl
Etanol 80%	400 µl

Antes de agregar las microesferas a cada muestra debemos atemperar y asegurar la homogeneización de la suspensión de éstas con ayuda del vórtex, y posteriormente mezclar bien mediante agitación a 1800 rpm durante 2 minutos. Tras su incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos (ADN queda fijado a las microesferas), colocar la placa en un soporte magnético durante 2 minutos, de forma que obtenemos un sobrenadante claro. A continuación, con la placa sobre el soporte magnético retirar y desechar el sobrenadante.

Seguidamente se realiza un lavado de las microesferas con etanol al 80% sobre el soporte magnético, desechando el sobrenadante tras 30 segundos de incubación (este proceso se repite una segunda vez), dejandosecar a temperatura ambiente las microesferas durante 10 minutos. Finalmente y para liberar el ADN purificado de las microesferas, se añaden 52,5 µl de solución tampón Tris 10 mM pH 8,5 a cada muestra fuera del soporte magnético, y asegurando la correcta resuspensión de las microesferas. De nuevo dejar incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos y colocar de nuevo en el soporte magnético durante 2 minutos hasta obtener un sobrenadante claro donde es suspendido el ADN, que vamos a transferir a una nueva placa de PCR (aproximadamente 50 µl de sobrenadante).

1.3 PCR de etiquetado.

A partir de 5 µl del sobrenadante obtenido en el paso anterior se realiza una nueva PCR utilizando cebadores de etiquetado 1 y 2 tal como indica el fabricante.

Material y métodos

	Volumen por muestra
Muestra ADN	5 µl
Cebador etiquetado 1	5 µl
Cebador etiquetado 2	5 µl
2x KAPA HiFiHotStart Ready Mix	25 µl
Agua de grado PCR	10 µl
Total	50 µl

La reacción de amplificación PCR se realiza utilizando el siguiente programa:

- 1- Desnaturalización inicial: 95 °C durante 3 minutos.
- 2- 8 ciclos de: 95 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos.
- 3- Extensión final: 72 °C durante 5 minutos.

1.4 Lavado de producto PCR

Se realiza un lavado del producto de la PCR obtenido en el punto 2.3 siguiendo los mismos pasos que en el punto 2.2.

	Volumen por muestra
Solución tampón Tris pH 8,5 10 mM	27,5 µl
Micoesferas AMPure XP	56 µl
Etanol 80%	400 µl

Tras el proceso de purificación obtenemos un volumen de suspensión de 25 µl donde tenemos nuestras librerías de amplicones de ADN etiquetadas.

Paso 2. Procedimiento de secuenciación genómica.

a) El primer paso es diluir las librerías de ADN obtenidas alcanzando una concentración final de la solución tampón Tris 4 nM, y seguidamente se mezclan alícuotas de 5 µl de estas diluciones agrupando librerías con índices únicos. Para el estudio metagenómico es suficiente alcanzar más de 100.000 lecturas por muestra para lograr un análisis completo de la composición bacteriana.

b) A continuación, las librerías de ADN agrupadas se desnaturalizan con NaOH 0,2N en tubos de microcentrífuga, y tras golpe de centrifuga (280 g a 20 °C durante 1

Material y métodos

minuto), se deja incubar durante 5 minutos. De esta forma se obtiene ADN de cadena simple.

Seguidamente se agrega el tampón de hibridación (HT1) al tubo que contiene ADN desnaturalizado dando como producto una librería desnaturalizada 20 pM en NaOH 1 mM, dejándolo en hielo hasta proceder con la dilución final.

En el caso de la técnica utilizada, el fabricante recomienda partir de una dilución final de 4 pM y se ajuste en los experimentos posteriores según proceda.

c) En cada conjunto de librerías agrupadas se incluye una librería de control interno (PhiX) para validar aquellos casos de baja diversidad microbiana. Esta librería control también es sometida a mismo proceso de desnaturalización y diluida con HT1 hasta alcanzar la misma concentración que para las librerías agrupadas desnaturalizadas (4pM).

d) Como último paso previo a la secuenciación genómica se deben combinar las agrupaciones de librerías de amplicones desnaturalizados y la librería control PhiX desnaturalizada en un tubo de microcentrífuga de forma que esta última constituya al menos un 5% del volumen final de la mezcla.

A continuación, inmediatamente antes de cargar la mezcla en el cartucho de reactivos para la secuenciación genómica, se somete la mezcla de librerías a un proceso de desnaturalización por calor (96 °C durante 2 minutos) e inmediatamente después se pasa la mezcla a un baño de agua helada durante 5 minutos.

6. Estudio perfiles de metilación ADN en mucosa tumoral mediante *microarray*

Los datos de metilación se midieron con el Infinium® HumanMethylation450 BeadChip (Illumina Inc., San Diego, CA, USA), ofreciendo una cobertura de todo el genoma con una amplia región de genes e islas CpG, y concretamente presenta más de 450.000 sitios de metilación, tanto dentro como fuera de las islas CpG. El ensayo utilizado para el estudio de metilación de ADN de todo el genoma es el Infinium® HD (Illumina Inc., San Diego, CA, USA), que proporciona una alta resolución para comprender los cambios epigenéticos al proporcionar datos cuantitativos de la metilación a nivel de cada sitio CpG de forma específica y permite la selección incluso de regiones de baja densidad de islas CpG, asegurando una cobertura del 99% de los genes RefSeq.

Material y métodos

La cobertura de los genes se establece abarcando sitios en la región promotora, en la región 5'UTR, en el primer exón, en el cuerpo de gen y en la región 3'UTR, para así proporcionar una visión amplia y completa del estado de metilación. Este enfoque basado en múltiples sitios se extiende a las islas CpG, ofreciendo cobertura para el 96% de éstas, abarcando múltiples sitios tanto dentro como en las partes más distales de las mismas, así como aquellas regiones que las flanquean. Además de los genes y las islas CpG, también se incluyen sitios múltiples adicionales propuestas y consensuadas por expertos en metilación. El ensayo Infinium® HD para la metilación del ADN permite el estudio multiplex de miles de locus CpG por muestra y de un número de muestras elevado de forma automatizada.

El protocolo del ensayo de metilación combina la conversión de bisulfito de ADN genómico y la amplificación del genoma completo con captura directa. La intensidad de la señal se mide con el sistema iScan® (Illumina Inc., San Diego, CA, USA), un escáner de *array* que genera una medida estandarizada del grado de metilación en un locus concreto (valor β), de forma que permite analizar y comparar las muestras estudiadas.

La metodología Infinium® HD aplica dos tipos de ensayos, Infinium I e Infinium II, para mejorar la profundidad de la cobertura del análisis de metilación. El ensayo Infinium I emplea dos tipos de partícula por locus CpG, una para estados metilados y otra para los no metilados. El diseño Infinium II usa un solo tipo de partícula, en la que el estado de metilado o no metilado es determinado durante la fase de extensión tras la hibridación (Figura 19).

Se utilizan sondas de forma que el extremo de 3' de las sondas se coloca directamente frente al sitio CpG (para Infinium I) o inmediatamente adyacente al sitio (para Infinium II). La extensión de una base específica del alelo de las sondas incorpora un nucleótido marcado con biotina (C o G) o un nucleótido marcado con dinitrofenilo (A o T).

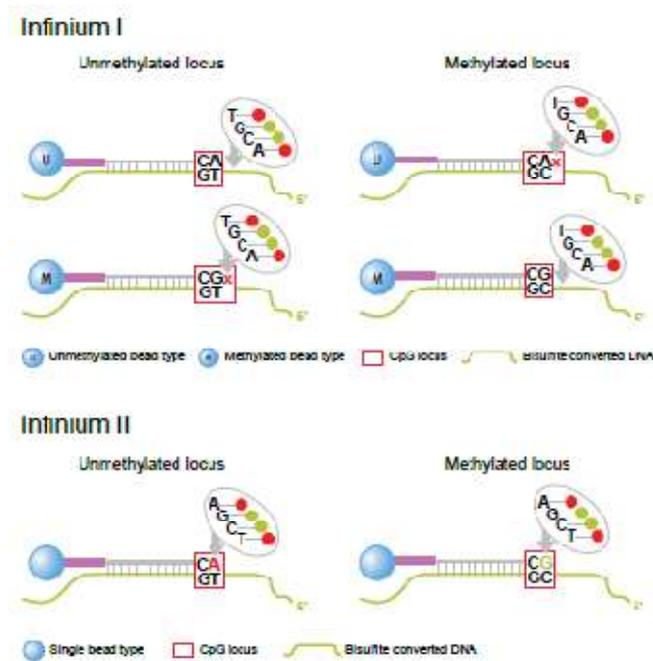


Figura 19. Fundamento de los ensayos Infinium I e Infinium II. Imagen disponible en: https://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_humanmethylation450.pdf.

Protocolo:

El ensayo requiere 500 ng de ADN para el ensayo manual o 1000 ng de ADN para la entrada del ensayo automatizado en la conversión de bisulfito.

Paso 1 - Conversión de bisulfito

El ADN se trata con bisulfito de sodio usando un kit de conversión de bisulfito y después del tratamiento, las citosinas no metiladas se convierten en uracilo, aunque las citosinas metiladas permanecen sin cambios.

Paso 2 - Amplificación

Tras la conversión a bisulfito las muestras se desnaturalizan y neutralizan previamente a la amplificación. El ADN desnaturalizado se amplifica isotérmicamente a 37 °C (20-24 h), de forma que se aumenta la cantidad de ADN por muestra en varios miles de veces.

Paso 3 - Fragmentación, precipitación y resuspensión.

El producto amplificado se somete a un proceso de fragmentación enzimática de punto final, para evitar la sobrefragmentación, y a continuación se somete a precipitación con

Material y métodos

isopropanol y se centrifuga a 4 °C, para resuspenderse posteriormente en un tampón de hibridación.

Paso 4 - Hibridación con *BeadChips*

Posteriormente se dispensan las muestras de ADN fragmentadas y resuspendidas en *BeadChips*, que son partículas con secuencias nucleotídicas adheridas al chip, y se incuban a 48 °C (16-24 h) para que tenga lugar la hibridación de las muestras con los *BeadChips*.

Se aplican doce muestras a cada *BeadChip*, que las mantiene separadas mediante un sello *IntelliHyb*, y tras la incubación los fragmentos de ADN de las muestras hibridan con fragmentos locus-específicos, que se encuentran unidos covalentemente a 1 de más de 500.000 tipos de partículas.

En el ensayo Infinium I, dos tipos de partículas se corresponden con cada locus CpG, concretamente un tipo de partícula corresponde al estado metilado (C) y el otro al estado no metilado (T) del sitio CpG. En el caso del ensayo Infinium II, sólo existe un tipo de partícula que se corresponde con cada locus CpG.

Paso 5 - Lavado, extensión y marcado.

A continuación tiene lugar un procedimiento de lavado para eliminar el ADN no hibridado y dar paso a la fase de extensión y medición de la señal. La extensión y el marcaje se llevan a cabo en cámaras de flujo capilar. La extensión de base única de los oligos en el *BeadChip*, a partir del fragmento de ADN hibridado como molde, incorpora etiquetas detectables y determina el nivel de metilación de los sitios CpG.

Paso 6 - Obtención de imagen.

El sistema iScan® realiza utiliza un láser para excitar el fluoróforo del producto de extensión de base única obtenido y el escáner graba las imágenes de luz de alta resolución emitida por los fluoróforos.

Los datos crudos de intensidad de fluorescencia fueron normalizados empleando el módulo de metilación del programa Genome Studio (V21010.3, Illumina), empleando normalización por controles e incluyendo el filtro corrector de señal de fondo para poder comparar datos de hibridaciones realizadas en distintos *arrays*. Las intensidades normalizadas se utilizan para el cálculo de los valores β de metilación de ADN para cada sitio CpG específico, que pueden tomar cualquier valor entre 0 (no metilado) y 1

Material y métodos

(completamente metilado). Las diferencias de metilación de islas CpG se consideran significativas cuando $\beta > 0,6$.

$$\beta = \frac{\text{intensidad señal gen metilado (M)}}{\text{intensidad señal gen metilado (M)} + \text{intensidad señal gen no metilado(NM)}}$$

También nos proporciona parámetros para el análisis de metilación diferencial entre muestras T y NT mediante el cálculo del $\log_2 \text{fold-change}$ (LogFC), que es la relación de la media del porcentaje de metilación para un gen entre muestras tumorales y muestras no tumorales (*baseline*). Normalmente suele considerarse que los genes con un LogFC >1 y < -1 son significativos, aunque este dato hay que compararlo con el valor de p. Por convenio, se considera que este valor es significativo cuando el valor de $p \leq 0,05$.

7. Tratamiento con bisulfito para estudio de validación

El proceso de conversión de bisulfito a partir del ADN extraído de las muestras de mucosa tumoral tiene como finalidad realizar posteriores análisis de estado de metilación del ADN. Para este proceso se utilizó el kit *EZ DNA Methylation-Direct™* (ZymoResearch Corp., Orange, CA, USA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, permitiendo recuperar ADN convertido a bisulfito listo para su amplificación por PCR. Esta técnica implica tratar el ADN metilado con bisulfito, convirtiendo por un lado las citosinas no metiladas en uracilo ($\underline{C} \rightarrow U$), mientras que las citosinas metiladas permanecen sin cambios durante el tratamiento ($C \rightarrow C$).

Tras la conversión, el perfil de metilación del ADN se puede determinar mediante amplificación por PCR seguida de secuenciación de ADN. De esta forma el resultado final es que las citosinas no metiladas convertidas a uracilo se detectan como timina (T) (figura 20, posiciones 4 y 8), mientras que las citosinas metiladas no se ven afectadas (figura 20, posición 3 y 9).

ADN molde	5'- GAC <u>C</u> GTT <u>C</u> CAGGT -3'
ADN tras tratamiento con bisulfito	5'- GAC <u>U</u> GTT <u>U</u> CAGGT -3'
ADN secuenciado	5'- GACTGTTTCAGGT -3'

Figura 20. Ejemplo de resultados de secuenciación de ADN después del tratamiento con bisulfito.

El fabricante establece que debemos partir de cantidades de ADN comprendidas entre 50 pg y 2 μ g, y concretamente se recomienda una cantidad inicial de ADN de 200 a

Material y métodos

500 ng para obtener resultados óptimos, recuperándose tras el procedimiento de conversión más del 80% del ADN de inicio. Además con este procedimiento se alcanza una eficiencia de conversión superior al 99,5% de los residuos de citosina no metilados y una protección de más del 99,5% de las citosinas metiladas.

Protocolo:

1. Añadir 20 μ l de ADN de cada muestra a 130 μ l de la solución reactiva de conversión "CT" en tubos para PCR (o pocillos de una placa de PCR). Si el volumen de ADN es inferior a 20 μ l, compensar con agua.
2. Colocar los tubos de PCR (placa) en el termociclador con el siguiente programa:
 - (1). 98 °C durante 8 minutos
 - (2). 64 °C durante 3.5 horas
 - (3). Opcional - Almacenamiento a 4 °C (hasta 20 horas).
3. Agregar 600 μ l de tampón de unión "M" en una columna "Zymo-Spin™ IC" y colocarla en un tubo de recolección y a continuación cargar la muestra del paso 2 en la misma columna "Zymo-Spin™ IC" que contiene el tampón de unión. Cerrar la tapa y mezclar invirtiendo la columna varias veces.
4. Centrifugar a > 10000 g durante 30 segundos y desechar el tampón contenido ahora en el tubo de recolección.
5. Agregar 100 μ l de tampón de lavado "M" a la columna y centrifugar a > 10000 g durante 30 segundos.
6. Agregar 200 μ l de tampón de desulfonación "M" a la columna e incubar a temperatura ambiente (20-30 °C) durante 15-20 minutos. Después centrifugar a > 10000 g durante 30 segundos.
7. Agregar 200 μ l de tampón de lavado "M" a la columna y centrifugar a > 10000 g durante 30 segundos.
8. Repetir el paso 7.

Material y métodos

- Colocar la columna en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, y agregar 10 µl de tampón de elución "M" de forma directa sobre la matriz que contiene la columna (donde está retenido el ADN).
- Centrifugar durante 30 segundos a > 10000 g para eluir el ADN.

8. Pirosecuenciación

Se analizaron y cuantificaron las firmas de metilación del ADN de diferentes islas CpG usando la pirosecuenciación.

El ADN convertido con bisulfito se amplificó previamente por PCR en las siguientes condiciones: 1 µl de ADN, 4 µl de tampón de polimerasa 5X, dNTP 0,2 mM, MgCl₂ 0,6 mM, 0,3 µM de cebadores directos o inversos marcados con biotina y 0,05 U/µl de polimerasa *GoTaq Hot-Start* (Promega, Madison, WI, USA).

El protocolo de PCR se realizó de la siguiente manera:

- Desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 min
- 35 ciclos de 94 °C 10 segundos, 64 °C 10 segundos y 72 °C 50 segundos
- Extensión a 72 °C 7 min.

Los cebadores se diseñaron utilizando el software *Pyromark Assay Design 2.0* (QIAGEN) seleccionando aquellos con mejor *score*:

EGFR: (*score 89*)

EGFR-pyroF: AGGGTGTTTGATAAGATTTGAAG

EGFR-biotpyroR: [Bt_n]CTTTATTCCAATCCCCACCTCCCCTAC

EGFR-pyroseq: GATTTTAGGATTTTAGAGTATTATT

mirLET7D: (*score 89*)

mirLET7D-pyroF: TGTATTTTAGTTTGGGTGATAGAG

mirLET7D-biotpyroR: [Bt_n]TACTTAAAATCCAACCTCAAATCACAA

mirLET7D-pyroseq: AAAATTGATAATTAATGTTAAAAG

PCLH1: (*score 90*)

PCLH1-pyroF: GTGTTTGTGTTTAGATGGAGTGATGT

PCLH1-biotpyroR: [Bt_n]CCTCCTCACCTTCAAAAATCATT

PCLH1-pyroseq: ATGTTTATTTTTGTATTTAGTTTG

Material y métodos

COBL: (score 96)

COBL-pyroF: GGGATTGGTTTTAGGATTTTTTATAGATA

COBL-biotpyroR: [Btñ]ACCTCAAATAATCTACCCACCTTAA

COBL-pyroseq: TGGTTTTAGGATTTTTTATAGATAT

SFRP5: (score 89)

SFRP5-pyroF: TGTTTATTTTTTAGGTTTTGTGTTAGTAAT

SFRP5-biotpyroR: [Btñ]ACCCTACCAACTATACCTTACTTAC

SFRP5-pyroseq: TTAGGTTTTGTGTTAGTAATAA

CILP2: (score 90)

CILP2-pyroF: TGGGATGTAGTTTGGAGGATTG

CILP2-biotpyroR: [Btñ]CCCCTCTAAATCCCCCCCCTTAATAC

CILP2-pyroseq: TTTGGAGGATTGAGTG

PTPLAD2: (score 84)

PTPLAD2-pyroF: ATATAAAGATTAGGAAGTTGTAATTAGAGT

PTPLAD2-biotpyroR: [Btñ]AAATTCTCCAAATTTCTACAACACTACT

PTPLAD2-pyroseq: AGTTGTAATTAGAGTTTGGT

ZNF788: (score 77)

ZNF788-pyroF: TTTTAAAGAGGAAGTGAATAGAATTAGTT

ZNF788-biotpyroR: [Btñ]CTCCTTCCCCCAAAAAATTAACA

ZNF788-pyroseq: GTTGTTATTTAGGGTTTTGAA

Los productos de PCR se verificaron utilizando el sistema de electroforesis capilar de alta resolución de ADN *QIAxcel*® (Qiagen). La pirosecuenciación se realizó utilizando el equipo *PyroMark*® Q24 (Qiagen) según el protocolo del fabricante. El nivel de metilación se evaluó utilizando el software *PyroMark Q24 2.0.6* (Qiagen) mediante el cual se calculó el porcentaje de metilación para cada isla CpG. Los resultados se presentan como el porcentaje (media ± DE) de los diferentes sitios de CpG estudiados para cada una de las regiones analizadas de los distintos genes.

9. Estudio de cuantificación mediante qPCR

Se llevo a cabo la cuantificación bacteriana tanto a nivel bacteriano global como para *F. nucleatum*. La qPCR se realizó mediante el uso de cebadores genéricos y específicos del 16S ARN, con la sonda inespecífica *SYBR*® *Green PCR Master Mix* (QuantiTec-QIAGEN), en un volumen final de reacción de 20 µl.

Tabla 8. Cebadores utilizados en el análisis mediante qPCR.

Grupo	Nombre	Secuencia	Tmp	Tamaño	Referencia
Total bacteria	Forward	5'-CGT GCC AGC CGC GG-3'	60 °C	293 pb	(Mira-Pascual et al., 2014b)
	Reverse	5'-TGG ACT ACC AGG GTA TCT AAT CCT G-3'			
<i>F. nucleatum</i>	Forward	5'-CAA CCA TTA CTT TAA CTC TAC CAT GTT CA-3'	60 °C	111 pb	(Mira-Pascual et al., 2014b)
	Reverse	5'-GTT GAC TTT ACA GAA GGA GAT TAT GTA AAA ATC-3'			
β-actina	Forward	5'-CCTCCATCGTCCACCGCAAATG-3 '	60 °C	198 pb	-
	Reverse	5'-TGCTGTACCTTCACCGTTCCA-3 '			

La amplificación se llevó a cabo en el termociclador 7500F (Applied Biosystems), con las siguientes condiciones de reacción:

1° - Desnaturalización inicial: 95 °C durante 10 minutos.

2° - 40 ciclos de: 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto

Para monitorizar la especificidad de los productos de amplificación, se analizaron las curvas de *Melting*. Para el análisis de las curvas de amplificación y de las curvas de *Melting* se utilizó el software *Sequence Detection v 1.2.3*. (Applied Biosystems). Se usaron controles negativos con agua estéril para verificar que la señal de fluorescencia es derivada de la existencia de ADN y no de otros constituyentes de la mix utilizada para la PCR. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

La cuantificación relativa de *F. nucleatum* se llevó a cabo en base al valor del ciclo umbral o “*thresholdcycle*” (Ct) registrado en el software según dos modelos distintos:

- **Cuantificación relativa ($2^{-\Delta Ct}$):** Se basa en la normalización del valor de Ct obtenido para el gen diana objeto de estudio (*F. nucleatum*) frente al Ct para el gen 16S ARN bacteriano en la misma muestra. De esta forma se obtienen valores directamente proporcionales a la cantidad absoluta bacteriana permitiendo la comparación entre muestras tumorales.

$$\Delta Ct = Ct (F. nucleatum) - Ct(16S ARN)$$

- **Cuantificación relativa normalizada ($2^{-\Delta\Delta Ct}$):** Este método se basa en un modelo desarrollado por *Applied Biosystems*, donde los valores de ΔCt obtenidos para las muestras tumorales se normalizan con los valores de ΔCt obtenidos para un calibrador o control, que en nuestro caso son las muestras no tumorales, de forma que obtenemos el incremento normalizado de *F. nucleatum* en muestras tumorales frente a las muestras no tumorales (333).

$$\Delta\Delta Ct = [Ct(F. nucleatum) - Ct(16S ARN)]_{TUMORAL} - [Ct(F. nucleatum) - Ct(16S ARN)]_{NORMAL}$$

10. Inestabilidad de microsatélites (MSI)

El análisis del estado MSI se ha llevado a cabo mediante el kit MSI Analysis System versión 1.2 (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. En líneas generales, este análisis realiza la comparación de perfiles alélicos de marcadores de microsatélites previa amplificación mediante PCR utilizando cebadores marcados con fluorocromos a partir de muestras de tejido normal y tejido tumoral. Concretamente, con esta técnica se produce la detección de siete marcadores: cinco mononucleótidos (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 y MONO-27) y dos pentanucleótidos (Penta C y Penta D) (Tabla 9).

Tabla 9. Marcadores del kit MSI Analysis System versión 1.2 (Promega).

Marcador	Secuencia principal	Rango tamaño (pb)	Alelos 2800M (pb)	Fluorocromos
NR-21	(A) ₂₁	80-105	102	JOE
BAT-26	(A) ₂₆	80-118	115	FL
BAT-25	(A) ₂₅	107-129	124	JOE
NR-24	(A) ₂₄	100-135	132	TMR
MONO-27	(A) ₂₇	131-165	151	JOE
Penta C	(AAAAG) ₃₋₁₅	137-225	175, 180	TMR
Penta D	(AAAAG) ₂₋₁₇	120-250	182, 187	FL

JOE: 6-carboxi-4'5'-dicloro-2'7'-dimetoxifluoresceína; FL: fluoresceína; TMR: carboxi-tetrametilrodamina.

Los marcadores mononucleótidos se utilizan para la determinación de MSI, han sido seleccionados por su alta sensibilidad y especificidad a las alteraciones en las muestras que contienen defectos en genes MMR, y casi todos los individuos son homocigotos para el mismo alelo común para un marcador determinado. Los marcadores pentanucleótidos se seleccionaron por su alto nivel de polimorfismo y bajo grado de MSI, lo que ayuda a confirmar que la muestra problema y la muestra normal emparejada son del mismo individuo, de forma que ayudan a evitar confusiones y detectar la contaminación de las muestras.

Material y métodos

Además se añaden fragmentos de ADN estándar de tamaño conocido (2800M) como control interno en la PCR para garantizar el tamaño exacto de los alelos y ajustar la variación de un ciclo a otro.

El sistema de análisis MSI está optimizado para amplificar 1 ó 2 ng de ADN genómico en un volumen total de reacción de 10 μ l.

Protocolo:

- 1- Preparación de la mezcla de amplificación.

	Volumen por muestra
Tampón GoldST [®] R 10X	1 μ l
MSI 10X Primer Pair Mix	1 μ l
ADN Taq polimerasa	0,15 μ l
Agua de grado PCR	5,85 μ l
Total	8 μ l

- 2- Transferir 8 μ l de mezcla de amplificación a cada pocillo de reacción y transferir a continuación 2 μ l de cada muestra de ADN (1–2 ng) a cada pocillo.
- 3- Control de amplificación positivo: diluir el ADN 2800M 0,5–1 ng/ μ l en agua libre de nucleasas y pipetear 2 μ l del ADN diluido en el fondo de cada pocillo y homogeneizar.
- 4- Control de amplificación negativo: pipetear 2 μ l de agua libre de nucleasas en lugar muestra de ADN en un pocillo de reacción que contenga mezcla de amplificación y homogeneizar.
- 5- Protocolo PCR:
 - 1) 1 ciclo de 95°C durante 9 minutos;
 - 2) 10 ciclos de: 94 °C durante 30 segundos, 45 segundos a 60 °C, 30 segundos a 72 °C
 - 3) 35 ciclos de: 94 °C durante 30 segundos, 45 segundos a 58 °C, 45 segundos a 72 °C.
 - 4) Extensión: 72°C durante 60 minutos.

A continuación se procede a la separación de productos de PCR mediante electroforesis capilar, en la que se utiliza el patrón de tamaño GeneScan500LIZ

Material y métodos

(Applied Biosystems, Foster City, CA), marcado con el fluoróforo LIZ, diseñado para medir el tamaño de fragmentos de ADN en el intervalo de 35 a 500 nucleótidos y proporciona 16 fragmentos monocatenarios marcados (35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490 y 500 nucleótidos).

Protocolo:

- 1- Preparar mezcla de carga y mezclar durante 10-15 segundos mediante agitación vorticial.

	Volumen por muestra
GeneScan500LIZ	0,5 µl
Formamida	9,5 µl
Total	10 µl

- 2- Pipetear 10 µl de la mezcla de formamida/ILS preparada en pocillos individuales para cada muestra amplificada o control.
- 3- Agregar 1 µl de muestra de ADN amplificado a los pocillos que contienen la mezcla formamida/ILS y centrifugar la placa brevemente para eliminar las burbujas de aire de los pocillos si es necesario.
- 4- Desnaturalice las muestras a 95 °C durante 3 minutos, enfriar inmediatamente durante 3 minutos.
- 5- Detección de fragmentos amplificados con analizador genético Applied Biosystems 3130 siguiendo el protocolo del fabricante.

Los datos obtenidos se analizan con el software de análisis de fragmentos GeneMapper® (Applied Biosystems), para determinar el estado de MSI de las muestras estudiadas. Este software transforma los datos sin procesar en electroferogramas con tablas de datos adjuntas que muestran las longitudes de los fragmentos (pb) y alturas de los picos (RFU) (Figura 21).

Los casos se categorizaron como MSI-H o MSS/MSI-L según los criterios del NCI que establecen que el grupo de tumores MSI-H se define por presentar alteración en ≥ 30 -40% de los marcadores analizados, mientras que el grupo MSI-L presenta alteración en < 30 -40% de los marcadores. En el panel utilizado de 5 marcadores equivale a:

Material y métodos

- MSI-H: inestabilidad en ≥ 2 marcadores mononucleótidos.
- MSI-L: inestabilidad en 1 sólo marcador mononucleótido.
- MSS: no existe ninguna inestabilidad en los marcadores analizados.

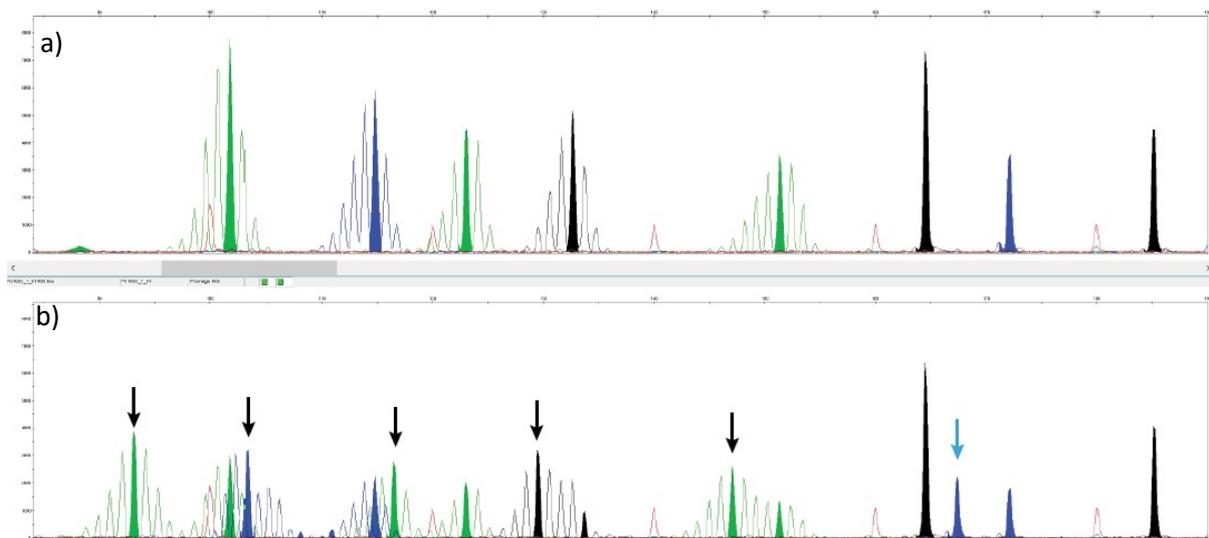


Figura 21. Ejemplo de ensayo mediante análisis MSI utilizado: a) electroferograma de una muestra norma; b) electroferograma de una muestra problema MSI-H (aparición de nuevos alelos indicados por flechas negras).

11. Fenotipo metilador de islas CpG (CIMP)

La metodología MLPA (“*multiplex ligation-dependent probe amplification*”) aplicada al caso particular de la metilación, permite detectar los cambios en el patrón de metilación del ADN en genes concretos en una misma reacción. En nuestra investigación se ha utilizado la técnica SALSA® MS-MLPA® Probemix ME042-C1 CIMP (MRC-Holanda) para evaluar el estado de CIMP de las muestras de CCR. Esta herramienta permite detectar la metilación aberrante de las islas CpG en las regiones de regulación de la transcripción de los 8 genes para los cuales se han descrito estados de metilación alterados del CIMP. Permite así detectar la metilación aberrante de una o más secuencias de los genes *CACNA1G*, *CDKN2A*, *CRABP1*, *IGF2*, *MLH1*, *NEUROG1*, *RUNX3* y *SOCS1*.

SALSA MS-MLPA Probemix ME042-C1 CIMP contiene 48 sondas MS-MLPA frente a productos de amplificación de entre 124 y 492 nucleótidos. En total, 31 sondas MS-MLPA contienen un sitio de reconocimiento para el enzima de restricción HhaI y proporcionan información sobre el estado de metilación de las regiones promotoras de los genes *CACNA1G*, *CDKN2A*, *CRABP1*, *IGF2*, *MLH1*, *NEUROG1*, *RUNX3* y *SOCS1* (Tabla 10). También se obtiene información del cambio de número de copias de cada región promotora en la muestra analizada.

Tabla 10. Sondas incluidas en el kit SALSA® MS-MLPA® Probemix ME042-C1 CIMP.

Tamaño (nucleótidos)	Sonda	Gen	Localización cromosómica
218	13990-L15566	<i>CACNA1G</i>	17q21.33
250	10123-L26834		
273	10122-L16074		
184	11869-L27058	<i>CDKN2A</i>	9p21.3
195	14001-L00962		
232	14003-L16397		
335	14004-L00955		
206	13989-L15565	<i>CRABP1</i>	15q25.1
265	13993-L15569		
310	13996-L15572		
318	13997-L15573		
141	13984-L15560	<i>IGF2</i>	11p15.5
172	16653-L19928		
418	14000-L15576		
130	15288-L07712	<i>MLH1</i>	3p22.2
178	13988-L19727		
355	14006-L07710		
463	02260-L01747		
166	13987-L15563	<i>NEUROG1</i>	5q31.1
201	10126-L13261		
212	13369-L16567		
283	13994-L15570		
364	14007-L10468		
391	13998-L27056		
258	13992-L26835		
346	14005-L15577	<i>RUNX3</i>	1p36.11
371	11131-L16234		
155	15034-L27192	<i>SOCS1</i>	16p13.13
238	15035-L27059		
300	15037-L16786		
399	14393-L16073		

También incluye 15 sondas de referencia que no se ven afectadas por la digestión de HhaI y se dirigen a regiones relativamente no alteradas en CCR (Tabla 11). Además, se incluye una sonda de control de la digestión en esta mezcla de sondas que indica si se llevo a cabo la digestión por la endonucleasa de restricción, que contiene nueve fragmentos de control de calidad que generan productos de amplificación entre 64 y 121 nucleótidos (Tabla 12).

Material y métodos

Tabla 11. Sondas de referencia del kit SALSA® MS-MLPA® Probemix ME042-C1 CIMP.

Tamaño (nucleótidos)	Sonda	Gen	Localización cromosómica
445	15733-L17713	<i>TRIM45</i>	1p13
190	08262-L08125	<i>SPAST</i>	2p22
427	15730-L17710	<i>PROM2</i>	2q11
328	04007-L03430	<i>BMPR2</i>	2q33
484	09682-L10062	<i>CAV3</i>	3p25
151	07241-L26836	<i>POU1F1</i>	3p11
454	10685-L11267	<i>PKHD1</i>	6p12
407	01237-L24913	<i>UPF2</i>	10p14
382	00973-L00560	<i>TSPAN15</i>	10q21
161	08222-L07936	<i>PLEKHA1</i>	10q26
244	18664-L24018	<i>ANO5</i>	11p14
292	15724-L17704	<i>KIF21A</i>	12q12
492	14883-L27057	<i>RPGRIP1</i>	14q11
475	13594-L15051	<i>CACNA1A</i>	19p13
124	S0864-L26216	<i>KCNJ6</i>	21q22

Tabla 12. Fragmentos de control de calidad de la sonda del kit SALSA® MS-MLPA® Probemix ME042-C1 CIMP.

Nombre	Número fragmentos	Tamaño (nucleótidos)	Utilidad
Fragmentos Q (cantidad)	4	64, 70, 76 y 82	Sólo se evidencian en presencia de menos de 100 ng de ADN de muestra o falla la etapa de ligadura
Fragmentos D (desnaturalización)	2	88 y 96	Señal baja para estos fragmentos en comparación con el fragmento de referencia indica una desnaturalización de ADN incompleta
Fragmento referencia	1	92	
Fragmento cromosoma X	1	100	Indicativo del sexo del paciente
Fragmento cromosoma Y	1	105	Indicativo del sexo del paciente

Para la realización del estudio se necesitan entre 50-100 ng de ADN de cada muestra en un volumen total de 5 µl de tampón Tris-EDTA de 5 a 10 mM.

Protocolo:

- 1- Desnaturalización inicial: 5 minutos a 98 °C.
- 2- Fase de hibridación: añadir 3 µl de master mix de hibridación a temperatura ambiente.
 - a. Incubación: 1 minuto a 95 °C.
 - b. Hibridación sonda-muestra: 16 horas a 60 °C.

- 3- Fase digestión de híbridos sonda-muestra.
 - a. A la temperatura de 20 °C: añadir 13 µl tampón A, mezclar y transferir 10 µl a otro tubo.
 - b. A la temperatura de 48 °C:
 - i. Añadir 10 µl de master mix-ligasa al primer tubo (reacción sin digestión)
 - ii. Añadir 10 µl de master mix-digestión al segundo tubo (digestión)
 - c. Incubación: 30 minutos a 48 °C.
 - d. Inactivación de ligasa y enzima digestión HhaI: 5 minutos a 98 °C.

- 4- Fase PCR amplificación de los híbridos sonda-muestra.
 - a. Llevar tubos a temperatura ambiente y añadir 5 µl de master mix-polimerasa.
 - b. Programa termociclador: (95 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 60 segundos) x 35 ciclos; 72 °C durante 20 minutos.

La separación de los fragmentos obtenidos tras la reacción de amplificación se realiza en el instrumento de electroforesis capilar ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La metilación de cada posición en cada muestra analizada en relación con la referencia se calcula utilizando el software Coffalyser.NetTM (MRC-Holanda) en combinación con la hoja de Coffalyser MLPA correspondiente al lote específico de la prueba. Es necesario incluir un número suficiente (≥ 3) de muestras de referencia, en nuestro caso mucosa de colon no tumoral, para normalizar los datos y establecer el nivel de metilación de referencia (promedio) para cada sonda específica de metilación. Todas las muestras se normalizan frente a múltiples ejecuciones de muestras de referencia (normalización inter-muestras), y además dentro de cada muestra las sondas se ajustan a las sondas de referencia (normalización intra-muestra).

Para determinar si una muestra tiene un nivel de metilación significativamente mayor para una determinada sonda se compara el resultado de metilación obtenido para esa muestra con el nivel de metilación de referencia para esa sonda concreta. De forma que cuando la relación entre la metilación obtenida para la muestra problema y el nivel de metilación referencia para la sonda es superior a 1 se incrementa la metilación y cuando la dicha relación es igual o inferior al nivel de referencia no hay incremento de la metilación. La detección del estado de metilación requiere la confirmación mediante otras técnicas basadas en PCR o la pirosecuenciación.

Una muestra se clasifica como no-CIMP cuando ninguno de los ocho genes analizados presenta metilación, CIMP-L cuando 1 a 4 genes presentan metilación y CIMP-H cuando 5 o más genes presentan metilación.

12. Estudio mutaciones

*KRAS

El kit theascreen® KRAS Pyro (Qiagen) es una prueba in vitro basada en la pirosecuenciación para la detección cuantitativa de mutaciones en los codones 12, 13 y 61 del gen *KRAS* humano en el ADN genómico derivado de muestras de tejido. Consta de dos ensayos, uno para detectar mutaciones en los codones 12 y 13, y el segundo para detectar mutaciones en el codón 61. Las dos regiones son amplificadas mediante PCR separado y secuenciadas en la región definida (Figura 22).

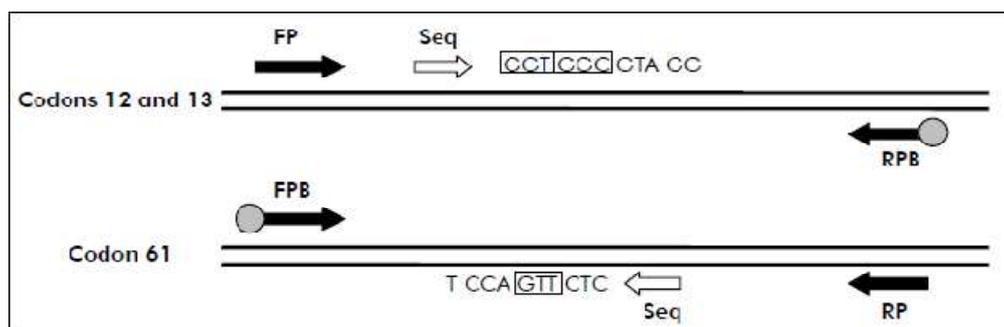


Figura 22. Esquema de la prueba realizada con theascreen® KRAS Pyro. (Imagen tomada del manual: theascreen® KRAS Pyro® Kit Handbook, 2015).

En primer lugar se realiza la PCR utilizando cebadores dirigidos a los codones 12/13.

KRAS-F: 5'-TGA CTGAATATAACTTGTGGTAGTTG-3'

KRAS-biotR: 5'[biotin]-TCGTCCACAAAATGATTCTGAA-3'

	Volumen por muestra
Muestra ADN	5 µl
PyroMark PCR Master mix	12,5 µl
CoralLoad®	2,5 µl
Cebador codón 12/13 ó Cebador codón 61	1 µl
Agua de grado PCR	4 µl
Total	25 µl

Material y métodos

El protocolo de PCR de amplificación se realizó de la siguiente manera:

1. Activación inicial: 95 °C durante 15 min.
2. 42 ciclos de: 95 °C 20 segundos, 53 °C 30 segundos y 72 °C 20 segundos
3. Extensión final: 72 °C 5 min.

Los amplicones obtenidos se inmovilizan en perlas Streptavidin Sepharose® High Performance (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia).

	Volumen por muestra
Producto PCR amplificación biotinilado	10 µl
Master mix de inmovilización	
Streptavidin Sepharose High Performance	2 µl
Tampón de unión PyroMark	40 µl
Agua de grado PCR	28 µl
Total	80 µl

A continuación, se somete la mezcla a agitación durante 15 minutos a 1400 rpm a temperatura ambiente, y seguidamente se transfieren las perlas a la placa de pirosecuenciación que contiene el cebador de secuenciación (5'-GCACTCTTGCCTACG-3'), diluido previamente en un tampón de *annealing*. Seguidamente se somete la placa a una incubación de 80 °C durante 2 minutos y posteriormente se dejan reposar la placa a temperatura ambiente durante 10–15 minutos.

El procedimiento de pirosecuenciación se realiza en el equipo PyroMark® Q24 tras cargar la placa y el cartucho de reactivos con los volúmenes correspondientes de nucleótidos, enzimas y sustratos para la reacción que nos proporciona el software según el número de muestras a procesar (Figura 23).



Figura 23. Ilustración del cartucho PyroMark Q24 (visto desde arriba): mezcla de enzimas (E), mezcla de sustrato (S) y los nucleótidos (A, T, C, G). (Imagen tomada del manual: theascreen® KRAS Pyro® Kit Handbook, 2015).

Material y métodos

Cada serie de muestras incluye un control de ADN genotipo KRAS tipo salvaje para las regiones secuenciadas, necesario para la interpretación adecuada de los resultados y la identificación de mutaciones de bajo nivel.

El análisis de los resultados se realiza utilizando el software PyroMark Q24:

- *KRAS* tipo salvaje: cuando la frecuencia de mutación es inferior al límite de detección.
- *KRAS* bajo nivel mutación: cuando la frecuencia de mutación es del 3% del límite de detección.
- *KRAS* mutado: cuando la frecuencia de mutación es mayor del 3% del límite de detección.

****BRAF***

Utilizamos un método basado en la pirosecuenciación para el análisis del gen *BRAF*. Los cebadores se eligieron usando el programa Pyrosequencing Assay by Design (Qiagen).

En primer lugar se lleva a cabo la amplificación por PCR de una región de 224 pares de bases del exón 15 en el gen *BRAF*, incluido el codón 600, utilizando los cebadores:

BRAF-F: 5'-CCTCACAGTAAAAATAGGTG-3'

BRAF-biotR: 5'[biotin]-GATTTTTGTGAATACTGGGAA-3'

Para un rendimiento óptimo se precisa de 20 ng o más de ADN genómico, premezcla de PCR (BioFact, Daejeon, Corea), 1 µl de ambos cebadores (10 pmol /µl), y 1 µl de tampón de uracilo-ADN glicosilasa (UDG).

La amplificación se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente protocolo:

- 1- 50 °C durante 3 min.
- 2- Desnaturalización a 95 °C durante 2 min.
- 3- 40 ciclos de: 95 °C durante 20 segundos, a 52 °C durante 40 segundos, y a 72 °C durante 30 segundos.
- 4- Extensión final: a 72 °C durante 5 min.

La obtención del producto de amplificación por PCR se confirma mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% y se visualiza mediante tinción con bromuro de etidio.

Material y métodos

Para el proceso de pirosecuenciación se utiliza la tecnología PyroMark® de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se inmovilizan 16-18 µl de producto de PCR obtenido en perlas de Streptavidin Sepharose™ High Performance (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) y se procesan para obtener ADN monocatenario.

Posteriormente se lleva a incubación con 15 pmol del cebador de secuenciación (5'-TGATTTTGGTCTAGCTACA-3') en bloque térmico a 80 °C durante 2 min. La pirosecuenciación se realiza en el equipo PyroMark® Q24 con el kit de reactivos Pyro Gold (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, de forma similar a la descrita previamente para la pirosecuenciación del gen *KRAS*.

Cada serie de muestras incluye un control de ADN del genotipo BRAF tipo salvaje para las regiones secuenciadas, necesario para la interpretación adecuada de los resultados y la identificación de mutaciones de bajo nivel.

El análisis de los resultados se realiza utilizando el software PyroMark Q24:

- *BRAF* tipo salvaje: cuando la frecuencia de mutación es inferior al límite de detección.
- *BRAF* bajo nivel mutación: cuando la frecuencia de mutación es del 3% del límite de detección.
- *BRAF* mutado: cuando la frecuencia de mutación es mayor del 3% del límite de detección.

* *PIK3CA*

Utilizamos el método de pirosecuenciación para el análisis del gen *PIK3CA* que codifica la proteína PI3K.

Los cebadores utilizados para la amplificación por PCR son:

*Exón 9

PIK3CA-F: 5'-ACCTGTGACTCCATAGAAAATCTTT-3'

PIK3CA-biotR: 5'-[biotin]- AACAGCTCAAAGCAATTTCTACACG-3'

*Exón 20

PIK3CA-F: 5'-CAATCCATTTTTGTTGTCCA-3'

PIK3CA-biotR: 5'-[biotin]-CAAGAGGCTTTGGAGTATTTCA-3'

Material y métodos

La mezcla de reacción para la PCR del exón 9 contiene los cebadores directo e inverso (10 mmol / L cada uno), 0,2 mmol/L de cada nucleótido (dNTPMix con dUTP), 0,2 U de AmpErase Uracil-N glucosilasa (Applied Biosystems), 2 mmol/L de MgCl₂, 1 Tampón de PCR, 0,9 U de AmpliTaq Gold 360 (Applied Biosystems) y 3,5 µl del eluido de ADN genómico en un volumen final de 35 µl. En el caso del exón 20 la mezcla de PCR contiene los mismos componentes descritos para el exón 9, excepto que se usaron 2,5 µl de eluido de ADN y volumen final de 25 µl.

Las condiciones de la reacción de amplificación fueron:

- 1- 50 °C durante 10 minutos (AmpErase Uracil-N glucosilasa).
- 2- Desnaturalización inicial a 94 °C, 10 minutos (AmpliTaQ Gold 360).
- 3- Ciclo (x50): 95 °C durante 30 segundos; 60 °C durante 30 segundos (para exón 9) o 57 °C durante 30 segundos (para exón 20); y extensión final 72 °C durante 7 minutos.

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa para confirmar la amplificación exitosa de los productos de 81pb (exón 9) y 74 pb (exón 20).

La pirosecuenciación se realizó en el sistema PyroMark® Q24 (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En los ensayos de pirosecuenciación del exón 9, la presencia de mutaciones se confirma utilizando tres cebadores de secuenciación diferentes y mediante la aparición de un desplazamiento en el marco de lectura en presencia de una secuencia mutante en relación con la secuencia de tipo salvaje. Se detectan las mutaciones c.1634A > G, c.1624A > G y c.1633G > A, respectivamente.

Los cebadores utilizados para el exón 9 son:

PIK3CA-RS1: 5'-CCATAGAAAATCTTTCTCCT-3'

PIK3CA-RS2: 5'-TTCTCCTTGCTTCAGTGATTT-3'

PIK3CA-RS3:5'-TAGAAAATCTTTCTCCTGCT-3'

En el caso del exón 20, se utiliza un solo el cebador y se detectan las mutaciones c.3140A > G y c.3139C > T.

PIK3CA-RS: 5'-GTTGTCCAGCCACCA-3'

El orden de dispensación de nucleótidos está diseñado de modo que si alguna de las mutaciones comunes estuviera presente, aparecería un cambio en el marco de lectura, y uno o varios picos adicionales después del nucleótido mutado.

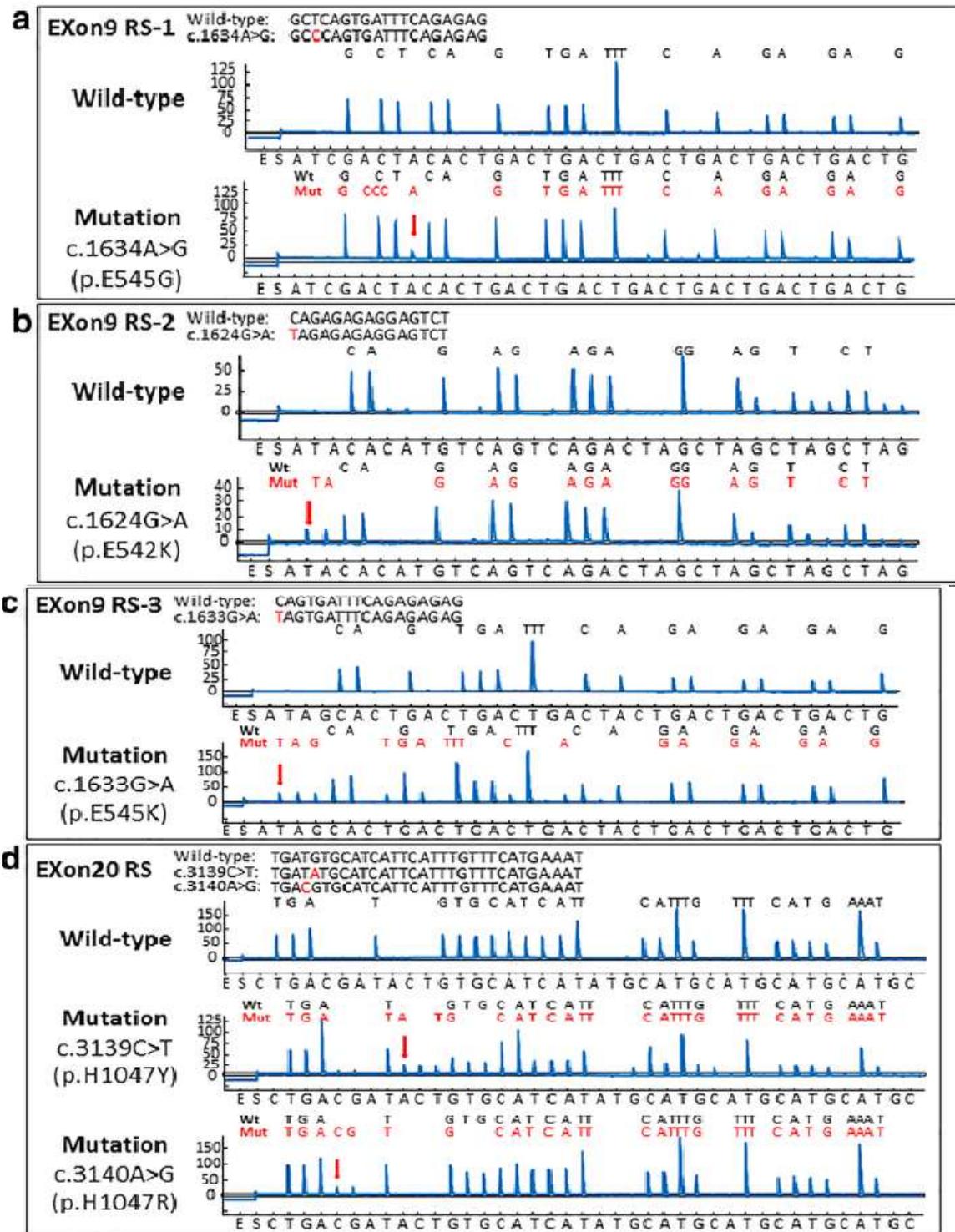


Figura 24. Pirogramas *PIK3CA* exón 9 y exón 20.

- Exón 9 de tipo salvaje secuenciado con el cebador 9-RS1 y la mutación c.1634A> G (flecha), causando un cambio en el marco de lectura y un nuevo pico en A (punta de flecha), que sirve como garantía de calidad.
- Exón 9 de tipo salvaje secuenciado con el cebador 9-RS2 y la mutación c.1624G > A (flecha), causando un cambio en el marco de lectura y un nuevo pico en A (punta de flecha).

Material y métodos

- c) Exón 9 de tipo salvaje secuenciado con el cebador 9-RS3 y la mutación c.1633G > A (flecha), causando un cambio en el marco de lectura y nuevos picos (puntas de flecha).
- d) Exón 20 de tipo salvaje secuenciado con el cebador del exón 20 y la mutación c.3139C > T (flecha), causando un cambio en el marco de lectura y un nuevo pico en T (punta de flecha). El exón 20 de tipo salvaje secuenció con el cebador del exón 20 y la mutación c.3140A > G (flecha), causando un cambio en el marco de lectura y un nuevo pico en G (punta de flecha). Mut, mutante; WT, tipo salvaje.

13. Análisis estadístico

El estudio de la diversidad (diversidad alfa) del microbioma en las muestras T y NT se realiza mediante el Índice de Shannon (IS), expresado como un número positivo sin límite superior, y que refleja la heterogeneidad de una comunidad microbiana en base al número de géneros presentes y su abundancia relativa. Las diferencias del IS entre muestras T y NT a nivel global, como para las existentes según el tipo de localización o las existentes entre muestras T se calcularon mediante la aplicación de pruebas paramétricas (prueba T de Student o ANOVA) o no paramétricas (Kruskal-Wallis) según si el IS seguía una distribución normal o asimétrica.

El análisis de componentes principales (PCA; "*Principal Component Analysis*") tiene la finalidad de reducir las dimensiones de una matriz de múltiples variables en una de menor dimensionalidad preservando la variabilidad de los datos originales (Wold, Esbensen y Geladi, 1987). La nueva matriz queda definida por los componentes principales (PC; "*Principal Component*"), que son combinaciones lineales de las variables originales. El PCA construye una transformación lineal que escoge un nuevo sistema de coordenadas para el conjunto original de datos en el cual la varianza de mayor tamaño del conjunto de datos es capturada en el primer eje, la segunda varianza más grande es el segundo eje, y así sucesivamente. El éxito de la reducción de dimensiones es evaluada por la varianza explicada de cada PC de forma que valores altos de varianza explicada indican que el PC capta de forma robusta el patrón de variabilidad de los datos originales. Existen casos donde con pocos PC se describe la mayor parte de la variabilidad de los datos de forma que contienen la mayor parte información pudiendo ignorar el resto de PC.

Para el estudio de diferencias existentes entre la abundancia de los géneros bacterianos entre muestras T y NT se aplica en primer lugar la prueba U de Mann-Withey resultando significativas aquellas diferencias de abundancia con un valor de $p < 0,05$. Seguidamente se utiliza el análisis de discriminación lineal (LDA; "*linear discrimination analysis*") para lograr la máxima diferenciación entre muestras T y NT

Material y métodos

con el menor número de variables que suponen mayor poder de discriminación en un modelo de predicción.

El estudio de correlación entre la abundancia relativa del género *Fusobacterium spp.* y el nivel de metilación genética entre muestras T y NT se realiza mediante el análisis de correlación de Pearson empleando la función R statscor (). A partir de la combinación de los resultados de metilación diferencial obtenidos del estudio del metiloma y la correlación del género *Fusobacterium spp.* con los genes que presentaban un mayor nivel de metilación estadísticamente significativo en muestras T se realiza el estudio de validación mediante pirosecuenciación entre las muestras T y NT para los genes resultantes. También se realiza el análisis de correlación lineal entre la cuantificación relativa de *F. nucleatum* y el porcentaje de metilación de las islas CpG de los genes resultantes, así como el estudio de asociación con los distintos marcadores de interés en el CCR.

Para el análisis estadístico comparativo de cuantificación relativa *F. nucleatum* según los distintos marcadores de interés en el CCR se utilizaron las pruebas paramétricas (prueba T de Student, ANOVA) o las pruebas no paramétricas (U de Mann Whitney, Kruskal-Wallis) según procedía en función del tipo de distribución. También se realiza el análisis multivariante por regresión lineal para el control de sesgo. Por último, la evaluación de la cuantificación relativa de *F. nucleatum* como prueba en el diagnóstico de CCR se ha realizado mediante el modelo matemático de curva ROC y análisis multivariantes por regresión logística.

En todos los análisis estadísticos llevados a cabo se ha considerado estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. Salvo el estudio de correlación de la abundancia del género *Fusobacterium* y el nivel de metilación genético que se han realizado con el programa R versión 3.4.0 en RStudio IDE versión 1.0.143, el resto de análisis estadísticos descritos se han realizado con el paquete estadístico SPSS versión 21.0 para Windows (SPSS, Inc., Chicago IL).

14. Consideraciones éticas

El Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital General Santa Lucía de Cartagena aprobó este proyecto de investigación. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado para el uso de sus muestras biológicas con fin investigador (Anexo I).

V. RESULTADOS

Resultados

1. Descripción de casos.

A continuación se muestra la descripción de las características demográficas, de localización y de estadio del CCR, así como la descripción de las características moleculares de los casos recogidos para el estudio (tabla 13 y 14).

Tabla 13. Características demográficas, de localización y de estadio de los casos de CCR incluidos en el estudio.

	Convencional (n=31)	Serrado (n=46)	<i>p</i> *	hmMSI (n=11)	<i>p</i> **
Edad Media [IC95%]	72,57 [69,1-76,0]	70,0 [67,2-72,7]	0,237	72,8 [65,3-80,4]	0,198
Sexo					
Hombre	17 (22%)	26 (34%)		5 (6,5%)	
Mujer	14 (18%)	20 (26%)	0,884	6 (8%)	0,396
Localización CCR					
Proximal	15 (19,5%)	29 (37,5%)		8 (10,5%)	
Distal	16 (21%)	17 (22%)	0,244	3 (4%)	0,446
Estadio CCR					
0-I	5 (6,5%)	7 (9%)		0 (0%)	
IIA-B	11 (14%)	15 (19,5%)		4 (5%)	
IIIA-B-C	13 (17%)	18 (23,5%)		3 (4%)	
IV	2 (2,5%)	6 (8%)	0,834	4 (5%)	0,032

*Significación estadística (*p*) para las comparaciones de las variables entre CC y SAC

**Significación estadística (*p*) para las comparaciones dentro de los CCR serrados (Serrado vs hmMSI)

Resultados

Tabla 14. Características moleculares de los casos de CCR incluidos en el estudio.

	Convencional	Serrado	p^*	hmMSI	p^{**}
CIMP (n=69)					
Negativo	8	11		4	
Bajo grado	19	13		0	
Alto grado	4	14	0,040	5	0,047
MSI (n=77)					
Ausencia (MSS)	29	21		0	
Bajo grado	2	15		3	
Alto grado	0	10	< 0,001	8	< 0,001
BRAF (n=69)					
Normal	31	25		3	
Mutado	0	13	< 0,001	5	0,058
KRAS (n=69)					
Normal	11	23		9	
Mutado	19	16	0,090	1	0,021
PIK3CA (n=62)					
Normal	22	32		5	
Mutado	6	2	0,125	1	0,216

*Significación estadística (p) para las comparaciones de las variables entre CC y SAC

**Significación estadística (p) para las comparaciones dentro de los CCR serrados (Serrado vs hmMSI)

2. CAPÍTULO 1: Estudio del microbioma

El estudio de microbioma se ha realizado sobre un total de 49 muestras totales, 26 de mucosa NT y 23 de mucosa T (12 CC, 7 SAC y 4 hmMSI), y se obtuvieron un total de 224 géneros bacterianos distintos a nivel global.

2.1 Análisis de la diversidad microbiana

Los datos de composición bacteriana de las muestras obtenidos por NGS se analizan mediante el índice de Shannon para valorar la diversidad de géneros bacterianos existentes entre los distintos tipos de muestras (figuras 25 y 26).

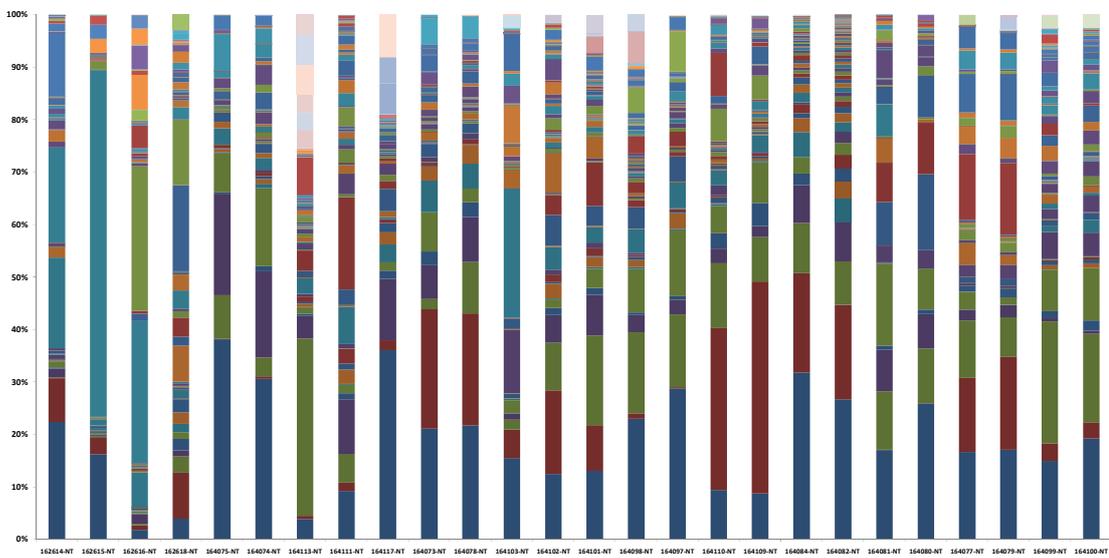


Figura 25. Diagrama de abundancia relativa para muestras NT por NGS.

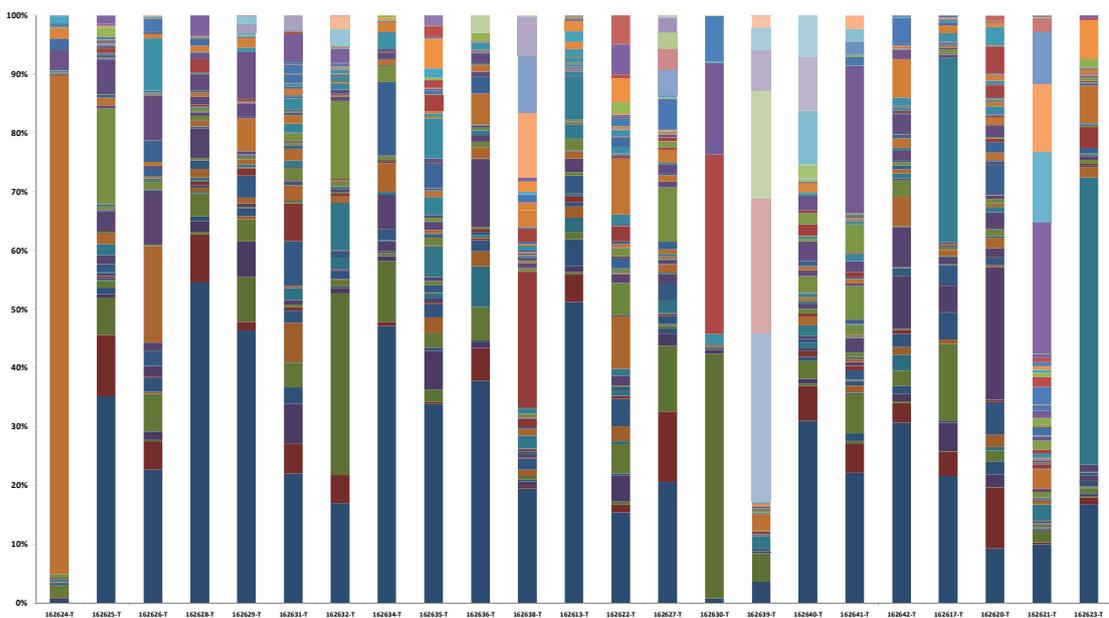


Figura 26. Diagrama de abundancia relativa para muestras T por NGS.

Resultados

El análisis estadístico muestra que la diversidad de géneros bacterianos en muestras T es algo inferior a la de muestras NT (figura 27), pero sin llegar a una diferencia significativa (Shannon=1,91 [1,65-2,17] vs. 2,06 [1,89-2,24]; $p = 0,34$).

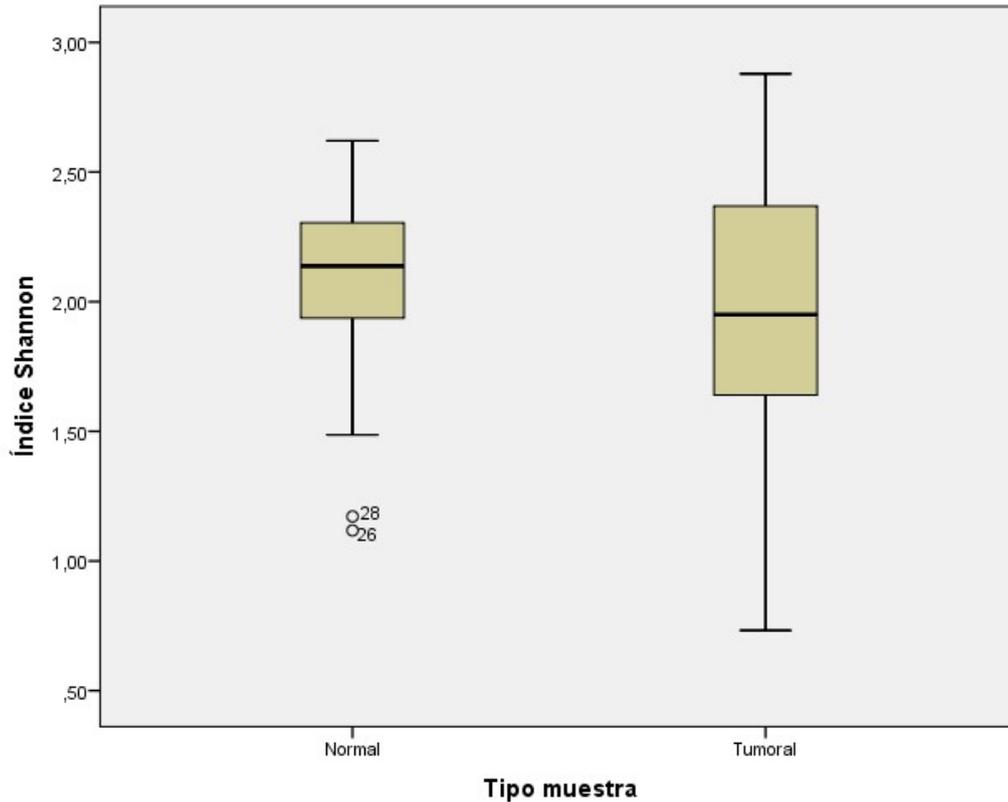


Figura 27. Diagrama de cajas del índice de Shannon en función del tipo de muestra.

El análisis de la diversidad de géneros bacterianos realizado entre muestras NT y T según la localización determina que existen diferencias significativas (ANOVA: $F = 5,521$; $p = 0,003$), y concretamente es debido a muestras T de localización distal (Figura 28, Tabla 15).

En cambio no se obtienen diferencias significativas en la diversidad de géneros bacterianos cuando se analizan las muestras T según el tipo de CCR (Kruskal-Wallis=0,90; $p = 0,825$) (Figura 29).

Resultados

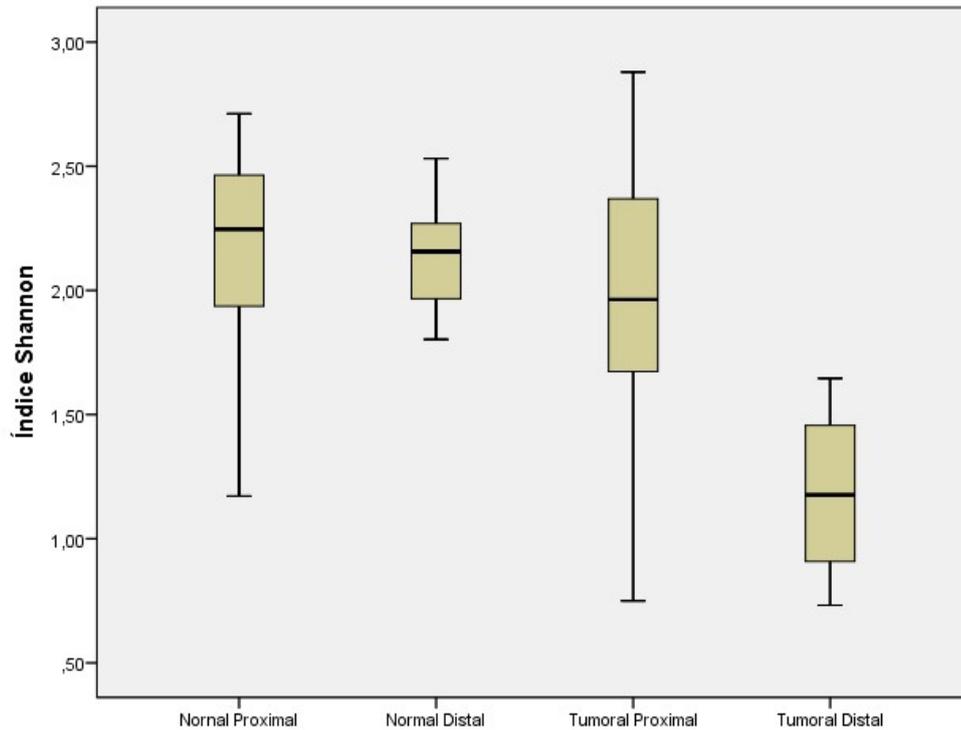


Figura 28. Diagrama de cajas del índice de Shannon en función del tipo de muestra y localización.

Tabla 15. Estudio comparativo del Índice de Shannon entre los distintos tipos de muestra según localización.

	Diferencia medias	IC95%	t	p
Normal Proximal vs Normal Distal	0,001	[-0,31; 0,31]	0,01	0,99
Normal Proximal vs Tumoral Proximal	0,21	[-0,15; 0,56]	1,19	0,24
Normal Proximal vs Tumoral Distal	0,98	[0,47; 1,49]	4,06	0,001
Normal Distal vs Tumoral Proximal	0,21	[-0,16; 0,57]	1,16	0,26
Normal Distal vs Tumoral Distal	0,98	[0,63; 1,34]	6,04	< 0,001
Tumoral Proximal vs Tumoral Distal	0,77	[0,18; 1,36]	2,71	0,01

Resultados

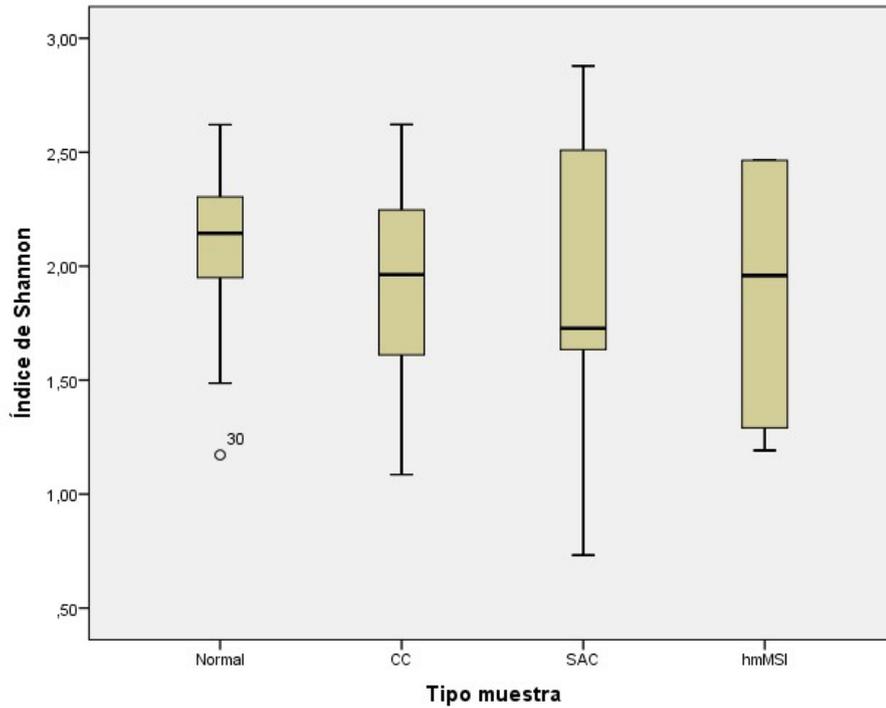


Figura 29. Diagrama de cajas del índice de Shannon en función del tipo de CCR.

2.2 Análisis de componentes principales (PCA)

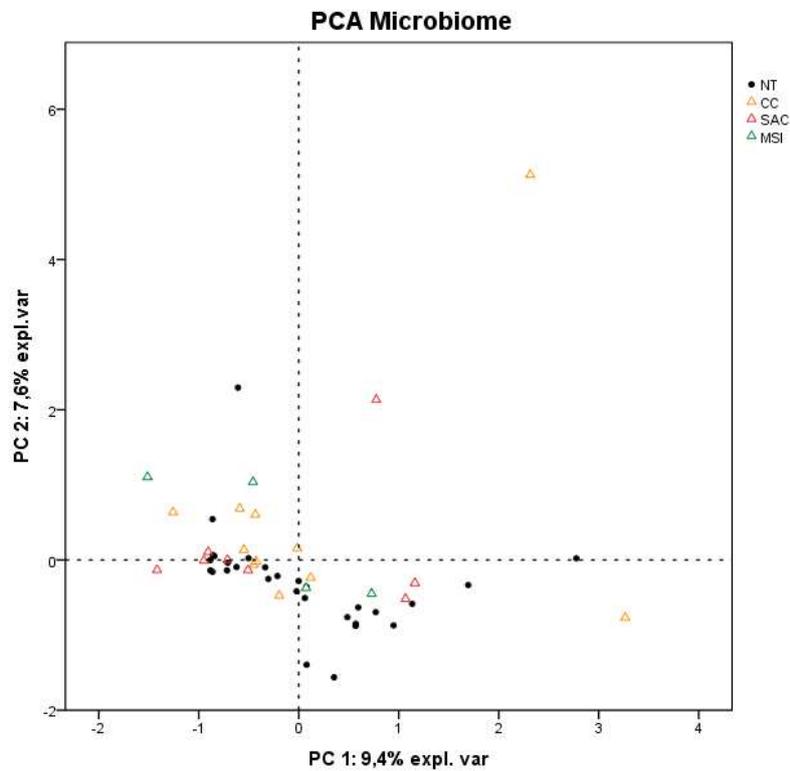


Figura 30. Gráfico del PCA para datos del microbioma.

NT: No tumoral, CC: CCR convencional, SAC: CCR serrado, MSI: CCR tipo hmMSI

Resultados

El PCA de los datos de microbioma no muestra una diferencia clara entre los casos estudiados según el resultado obtenido. Con los 2 PCs de mayor peso se explica un 17% de la variabilidad total de las muestras sin conseguir una diferenciación clara entre los distintos tipos de muestras. Es necesario un mínimo de 9 PC para alcanzar al menos el 50% de la varianza explicada por los datos, y se requieren un total de 51 PC para alcanzar el 100% de la varianza explicada.

2.3 Análisis diferencial del microbioma

El análisis diferencial del microbioma en los distintos tipos de muestras para encontrar posibles marcadores microbiológicos demostraba la existencia de 20 géneros bacterianos con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en su abundancia relativa entre muestras T y NT (Tabla 16).

Tabla 16. Géneros bacterianos con diferencias significativas en su abundancia relativa entre muestras T y NT.

Género bacteriano	Diferencia medianas (%)	U de Mann-Whitney (p)
<i>Bacteroides</i>	9,2	0,035
<i>Streptococcus</i>	0,72	0,005
<i>Eubacterium</i>	0,61	0,008
<i>Fusobacterium</i>	0,25	0,012
<i>Dialister</i>	0,07	0,034
<i>Agrobacterium</i>	0,05	< 0,001
<i>Delftia</i>	0,04	< 0,001
<i>Acinetobacter</i>	0,02	0,036
<i>Stenotrophomonas</i>	0,005	0,002
<i>Acidaminococcus</i>	-0,001	0,002
<i>Thermanaerovibrio</i>	-0,003	0,001
<i>Butyrivibrio</i>	-0,006	0,010
<i>Eisenbergiella</i>	-0,008	0,044
<i>Citrobacter</i>	-0,030	0,029
<i>Pseudoflavonifactor</i>	-0,033	0,019
<i>Parasutterella</i>	-0,057	0,027
<i>Akkermansia</i>	-0,138	0,004
<i>Instentibacter</i>	-0,2	0,017
<i>Lachnoclostridium</i>	-0,96	0,021
<i>Escherichia</i>	-5,4	0,030

Resultados

En cambio, cuando se aplica el método LDA (*linear discrimination analysis*) para lograr una máxima diferenciación entre muestras T y NT con el mínimo número de géneros se obtienen aquellos cuya diferencia en la abundancia presentan mayor poder discriminatorio en un modelo de predicción (Tabla 17).

Tabla 17. Resultado del LDA para el microbioma.

Género bacteriano	Coficiente de la función discriminante
<i>Bacteroides</i>	1,160
<i>Eubacterium</i>	0,920
<i>Acinetobacter</i>	0,689
<i>Fusobacterium</i>	0,466
<i>Pseudomonas</i>	-0,408
<i>Paraprevotella</i>	-0,549
<i>Haemophilus</i>	-0,640
<i>Lachnoclostridium</i>	-0,927

3. CAPÍTULO 2: Estudio género *Fusobacterium*-metiloma

A partir de los datos obtenidos en el análisis del metiloma realizado previamente con *Infinium® HumanMethylation450 BeadChip*, se ha realizado el estudio de correlación del nivel de metilación con la abundancia del género *Fusobacterium spp.* y posteriormente la validación de los resultados obtenidos mediante pirosecuenciación. Los resultados proceden del estudio del metiloma de 21 muestras totales, 3 de mucosa NT y 18 de mucosa T (12 CC, 6 SAC), incluyendo un total de 18569 genes.

3.1 Estudio de correlación *Fusobacterium spp.*- nivel de metilación

Estas 21 muestras también estaban incluidas en el estudio del microbioma por Illumina. A partir de estos datos se realizó el estudio de la correlación del nivel de metilación de los genes con la abundancia del género *Fusobacterium spp.*, (Tabla 18).

Tabla 18. Principales genes cuyo nivel de metilación presenta correlación significativa, positiva o negativa, con la abundancia relativa de *Fusobacterium spp.*

Correlación positiva		Correlación negativa	
Gen	Coefficiente	Gen	Coefficiente
<i>RELA</i>	0,84	<i>EDAR</i>	-0,77
<i>DTYMK</i>	0,83	<i>C2orf76</i>	-0,74
<i>RAB11FIP5</i>	0,83	<i>CCDC14</i>	-0,73
<i>MTOR</i>	0,80	<i>ZFP64</i>	-0,73
<i>PSPH</i>	0,78	<i>SFMBT1</i>	-0,73
<i>HIVEP2</i>	0,77	<i>SESTD1</i>	-0,72
<i>FAM193B</i>	0,77	<i>ZBTB39</i>	-0,72
<i>C20orf112</i>	0,76	<i>NBPF7</i>	-0,70
<i>CEP164</i>	0,76	<i>XCL2</i>	-0,70
<i>SLC25A13</i>	0,76	<i>PROCA1</i>	-0,69

3.2 Combinación de resultados de correlación y metilación diferencial

Combinando los resultados del estudio de metilación diferencial obtenidos del análisis realizado con *Infinium® HumanMethylation450 BeadChip* y los resultados del análisis

Resultados

de correlación entre el nivel de metilación y *Fusobacterium spp.*, sólo 4 genes que presentan con una fuerte correlación negativa (coeficiente < -0,5) entre su nivel de metilación y la abundancia de *Fusobacterium spp.* ($p < 0,05$) presentan también una metilación diferencial entre muestras T y NT significativa (Tabla 19).

Tabla 19. Genes hipermetilados en muestras T con correlación negativa con *Fusobacterium spp.*

Gen	Coefficiente correlación	LogFC	p
<i>CILP2</i>	-0,505	0,689	0,025
<i>SYCP2L</i>	-0,524	1,251	0,042
<i>DRD1</i>	-0,567	1,572	0,042
<i>PTPLAD2</i>	-0,609	1,809	0,048

LogFC: *log2-fold-change* entre muestras T y NT; **p:** valor de p ajustado tras corrección de Benjamini-Hochberg.

Por otro lado, 5 genes muestran una correlación positiva (>0,2) entre su nivel de metilación y la abundancia de *Fusobacterium spp.* y presentan una metilación diferencial entre muestras T y NT, aunque una correlación débil (<0,5) (Tabla 20).

Tabla 20. Genes hipermetilados en muestras T con correlación positiva con *Fusobacterium spp.*

Gen	Coefficiente correlación	LogFC	p
<i>EGFR</i>	0,299	0,581	0,035
<i>PLCH1</i>	0,297	0,646	0,035
<i>COBL</i>	0,296	0,491	0,038
<i>mirLET7D</i>	0,286	0,622	0,046
<i>SFRP5</i>	0,281	1,463	0,031

LogFC: *log2-fold-change* entre muestras T y NT; **p:** valor de p ajustado tras corrección de Benjamini-Hochberg.

3.3 Estudio de validación por pirosecuenciación de metilación diferencial

Se realiza el estudio de validación por pirosecuenciación de los resultados de metilación diferencial obtenidos entre muestras T y NT para aquellos genes de interés en el género *Fusobacterium* (Tabla 21).

Tabla 21. Validación de resultados de metilación de islas CpG entre muestras T y NT para genes de interés en género *Fusobacterium*.

Gen	Número muestras (T/NT)	Medianas (%) (T/NT)	U de Mann-Whitney	<i>p</i>
<i>PTPLAD2</i>	36/3	53/37	36	0,300
<i>SFRP5</i>	45/3	46/42	59,5	0,701
<i>CILP2</i>	54/10	28/26	199	0,149
<i>PLCH1</i>	46/10	75/56	57	<0,001*
<i>mirLET7D</i>	44/3	83/78	26,5	0,001*
<i>EGFR</i>	42/10	43/40	130	0,040*
<i>COBL</i>	54/10	77/70	114,5	0,002*

p; grado significación de U M-W.

3.4 Estudio de la correlación entre *Fusobacterium nucleatum* y el porcentaje de metilación

Para el estudio de correlación con la cuantificación relativa de *F. nucleatum* en muestras T, además de los genes incluidos en la tabla anterior que mostraron una correlación positiva o negativa con la abundancia de *Fusobacterium spp.*, se incluye también el gen *ZNF788*, consecuencia de resultado obtenido en el análisis integrado del microbioma-metiloma realizado en un estudio previo dentro la línea de investigación en la que también se ha desarrollado este estudio. Dicho estudio concluye que el gen *ZNF788* presenta un mayor nivel de metilación en muestras T y permite clasificar las muestras T y NT.

Resultados

Tabla 22. Correlación del Logaritmo de la cuantificación relativa de *F. nucleatum* y los porcentajes de metilación de islas CpG.

Gen	Correlación Pearson (r)	F	p
<i>EGFR</i>	0,0001	0,015	0,904
<i>PLCH1</i>	0,104	0,593	0,444
<i>COBL</i>	-0,137	1,184	0,281
<i>mirLET7D</i>	0,136	0,845	0,363
<i>SFRP5</i>	-0,129	0,775	0,383
<i>CILP2</i>	0,022	0,031	0,861
<i>PTPLAD2</i>	0,108	0,435	0,514
<i>ZNF788</i>	0,278	5,179	0,026

F: ANOVA Regresión; p; valor de p de F.

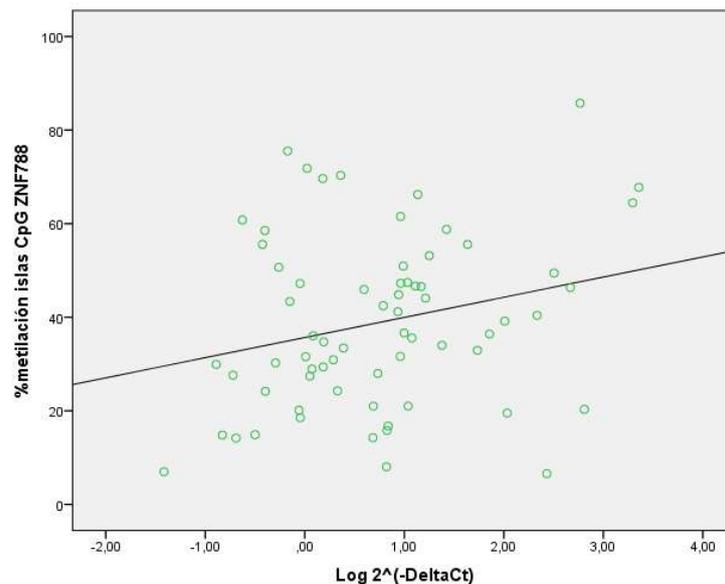


Figura 31. Gráfico de dispersión de datos y de recta de ajuste para el único gen con regresión lineal $p < 0,05$ (gen *ZNF788*).

El modelo predictivo que mejor ajusta por regresión lineal para el porcentaje de metilación de islas CpG de *ZNF788* incluye como variables predictoras el estado CIMP y la cuantificación relativa FN mientras que excluye del modelo el resto de variables (Tabla 23).

Resultados

Tabla 23. Análisis multivariante de la predicción del porcentaje de metilación de islas CpG del gen *ZNF788*.

Variables predictoras	Coefficiente no estandarizado	p
Constante	31,73	
Estado CIMP (CIMP-L / CIMP-H)	14,22	0,016
Cuantificación relativa <i>F. nucleatum</i>	4,22	0,048
Variables excluidas		p
Estado MSI		0,051
Edad		0,86
Estadio CCR		0,67
Localización		0,57
Sexo		0,40

4. CAPÍTULO 3: Análisis diferencial de la cuantificación relativa de *Fusobacterium nucleatum* en los distintos marcadores de interés en el CCR.

En el análisis mediante qPCR para FN y carga bacteriana total, tan sólo el 9% (7 de 77) de las muestras NT mostraron un “ ΔCt ” de 10 o menos ciclos de amplificación, el 56% (43 de 77) mostraron un “ ΔCt ” superior a los 10 ciclos de amplificación, y el 35% (27 de 77) una carga para FN no detectable. En cambio, el 40% (31 de 77) de muestras T mostraron un “ ΔCt ” de 10 o menos ciclos de amplificación, el 43% (33 de 77) mostraron un “ ΔCt ” superior a los 10 ciclos de amplificación, y el 17% (13 de 77) una carga para FN no detectable.

En cuanto al cálculo de la cuantificación relativa normalizada el 26% (20 de 77) de las muestras presenta un valor < 1 , lo que se traduce en que la cuantificación relativa de FN en muestras T es inferior a la determinada en muestras NT, mientras que en el 74% (57 de 77) de las muestras la cuantificación relativa de FN es superior en las muestras T.

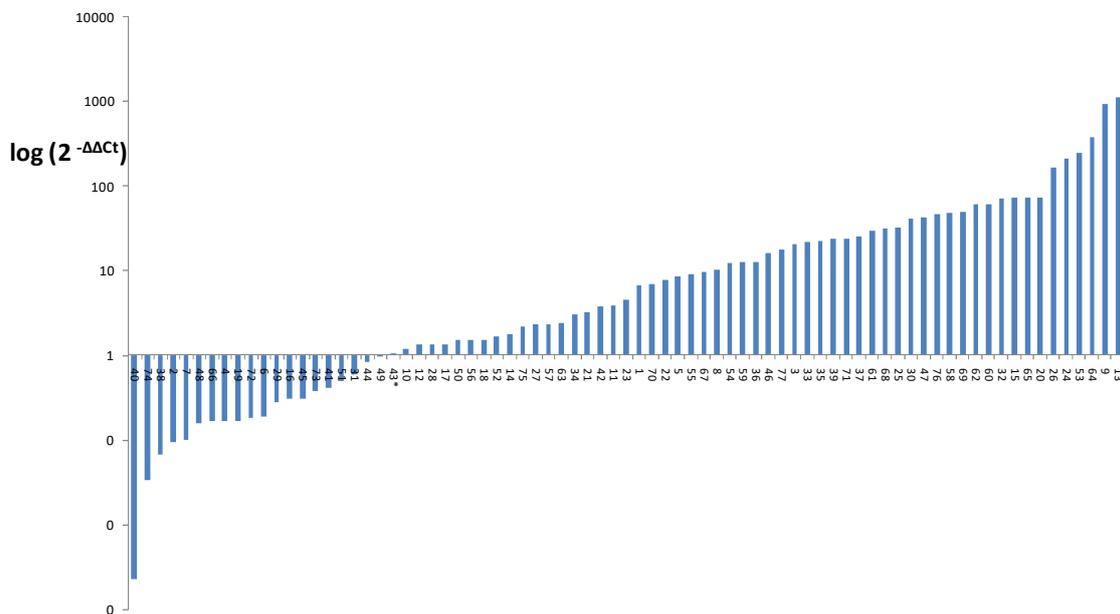


Figura 32. Distribución de la cuantificación relativa normalizada ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) en escala logarítmica.

La cuantificación relativa normalizada de *F. nucleatum* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) sigue una distribución asimétrica (coeficiente asimetría = 5,2) por lo que el análisis estadístico se realiza tomando logaritmo de cuantificación relativa normalizada para transformarla en una distribución normal y hacer uso de pruebas paramétricas.

Resultados

A continuación se muestra el resultado del análisis estadístico para el logaritmo de la cuantificación relativa normalizada de FN en función de las variables sexo y localización.

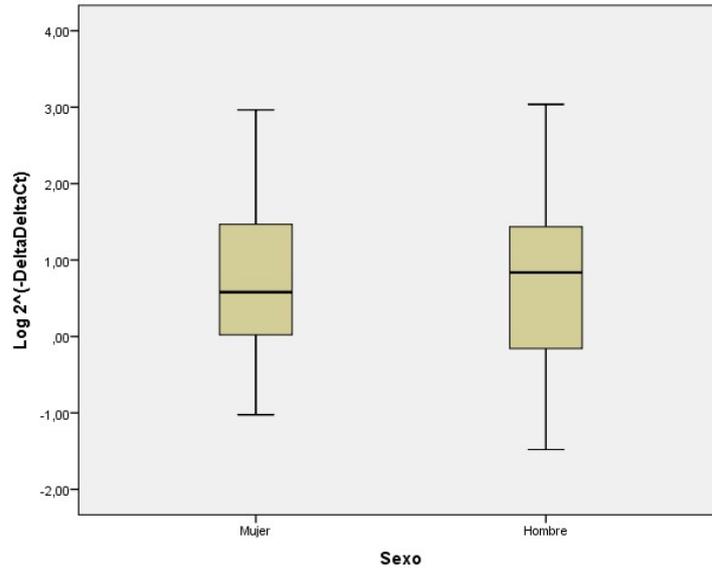


Figura 33. Diagrama de cajas: Cuantificación relativa normalizada de FN según “Sexo”.

Tabla 24. Comparación de la Cuantificación relativa normalizada de FN según “Sexo”.

	Diferencia medias	IC95%	T	P
$\text{Log } 2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$	-0,017	[-0,50; 0,46]	-0,07	0,94

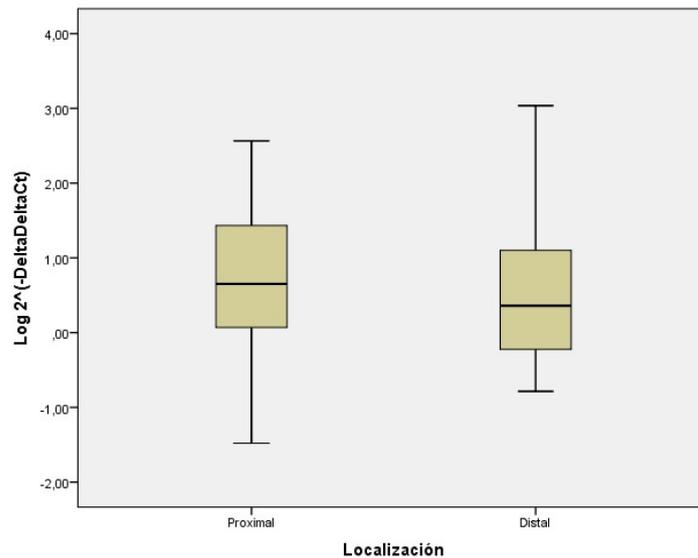


Figura 34. Diagrama de cajas: Cuantificación relativa normalizada de FN según “Localización”.

Tabla 25. Comparación de la Cuantificación relativa normalizada de FN según “Localización”.

	Diferencia medias	IC95%	T	P
$\text{Log } 2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$	0,15	[-0,38; 0,69]	0,34	0,57

Resultados

El ANOVA del logaritmo de la cuantificación relativa normalizada ($\text{Log } 2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$) para el tipo de CCR muestra que existen diferencias significativas entre las medias de al menos dos de los tipos de CCR (F de Fisher-Snedecor = 5,37; $p = 0,007$).

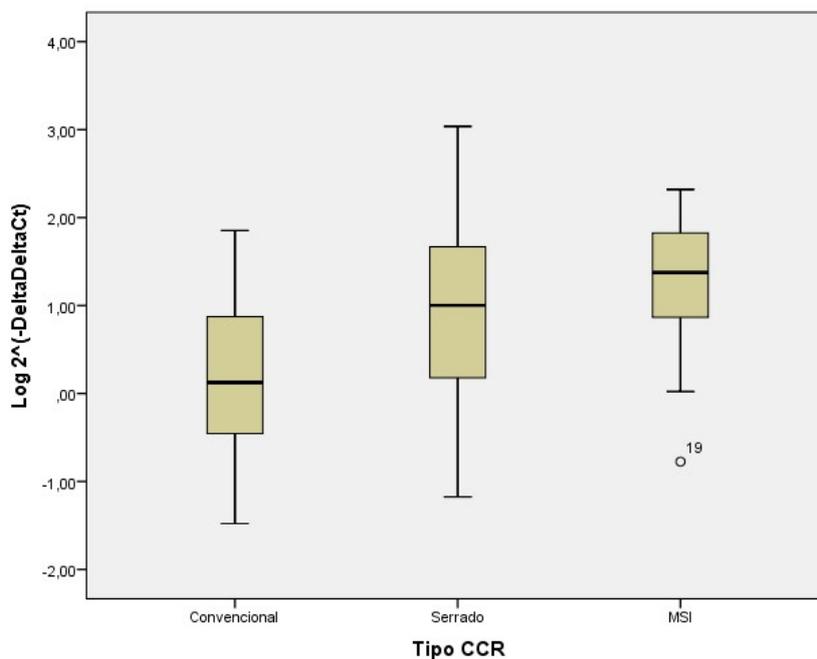


Figura 35. Diagrama de cajas: Cuantificación relativa normalizada de FN según “Tipo de CCR”.

En el análisis entre grupos se evidencia que las diferencias existentes tienen lugar entre el CC y SAC, incluso en comparación con el subtipo hmMSI, mientras que no existen tal diferencia entre SAC y subtipo hmMSI.

Tabla 26. Comparación de la Cuantificación relativa normalizada de FN según “Tipo de CCR”.

Tipos CCR comparados	Diferencia medias	IC95%	t	p
CC vs SAC	-0,68	[-1,21; -0,16]	-2,63	0,011
CC vs hmMSI	-1,01	[-1,62; -0,39]	-3,31	0,002
SAC vs hmMSI	-0,32	[-1,13; 0,48]	-0,80	0,426

Cuando realizamos el análisis teniendo en cuenta tanto el tipo de CCR como su localización se observa que las diferencias significativas de la cuantificación relativa normalizada de FN en función del tipo de CCR tienen lugar a nivel de localización proximal (Kruskal-Wallis = 10,14; $p = 0,006$) y no las hay a nivel de localización distal (Kruskal-Wallis = 2,92; $p = 0,23$).

Resultados

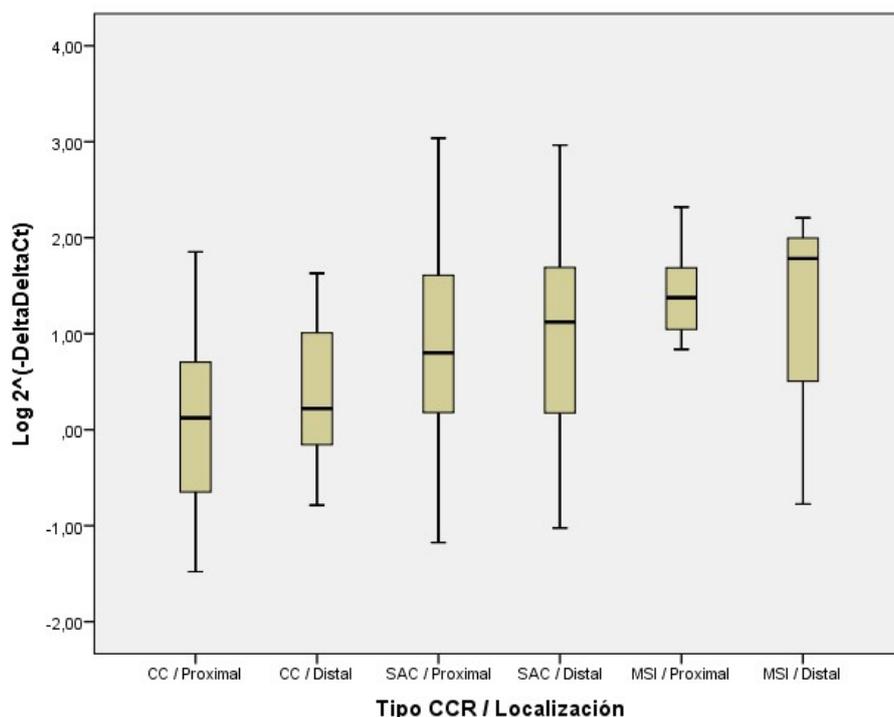


Figura 36. Diagrama de cajas: Cuantificación relativa normalizada de FN según “Tipo de CCR” y “Localización”.

Tabla 27. Comparación de la Cuantificación relativa normalizada de FN según “Tipo de CCR” en función de su “Localización”.

Tipo CCR proximal	SAC (n=21)		hmMSI (n=8)	
	U de MW	<i>p</i>	U de MW	<i>p</i>
CC (n=16)	90	0,017	21	0,008
SAC (n=21)			68	0,44
Tipo CCR distal	SAC (n=14)		hmMSI (n=3)	
	U de MW	<i>p</i>	U de MW	<i>p</i>
CC (n=15)	69	0,12	14	0,36
SAC (n=14)			17	0,61

El análisis en el caso de la variable que hace referencia al tamaño tumoral (T) se decide establecer un grupo en el que se incluyen los casos Tis, T1 y T2 de forma conjunta debido al escaso número de casos en los dos primeros obteniendo un resultado de diferencia significativo.

Debido a las distribuciones asimétricas del logaritmo de la cuantificación relativa normalizada ($\text{Log } 2^{(-\Delta\Delta C_t)}$) para el grupo que engloba a Tis, T1 y T2, se realiza el análisis mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, que evidencia también

Resultados

diferencia significativa entre al menos dos de los grupos (Kruskal-Wallis = 19,85; $p < 0,0001$).

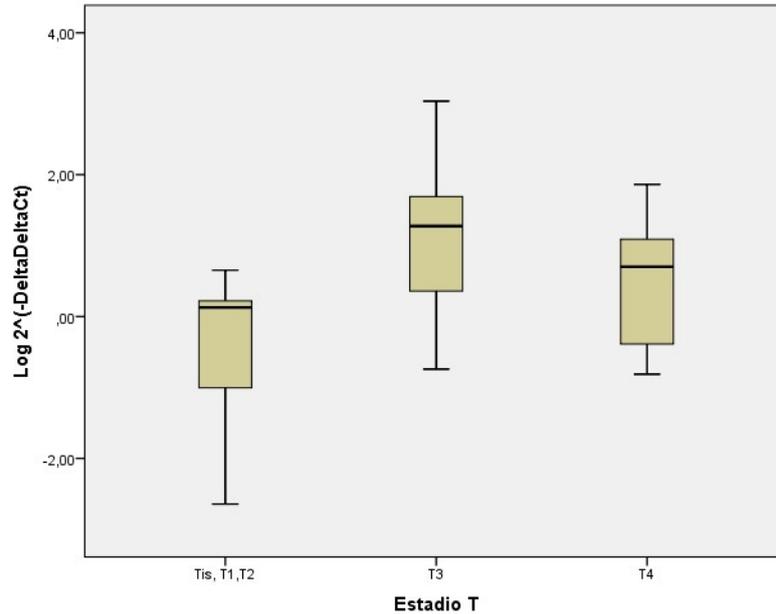


Figura 37. Diagrama de cajas: Cuantificación relativa normalizada de FN según “T”.

Tabla 28. Comparación de la Cuantificación relativa normalizada de FN según “T”.

Estadio T	T3 (n=46)		T4 (n=14)	
	U de MW	<i>p</i>	U de MW	<i>p</i>
Tis, T1, T2 (n=17)	116	0,000021	66	0,035
T3 (n=46)			206	0,043

El análisis en el caso del estadio del CCR se decide establecer un grupo en el que se incluyen los casos correspondientes a estadio 0 y estadio I de forma conjunta debido al escaso número de casos en los dos primeros. El ANOVA del logaritmo de la cuantificación relativa normalizada ($\text{Log } 2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$) para el estadio de CCR muestra que existen diferencias significativas entre las medias de al menos dos de los grupos (Valor F de Fisher-Snedecor = 10,434; $p < 0,0001$).

Resultados

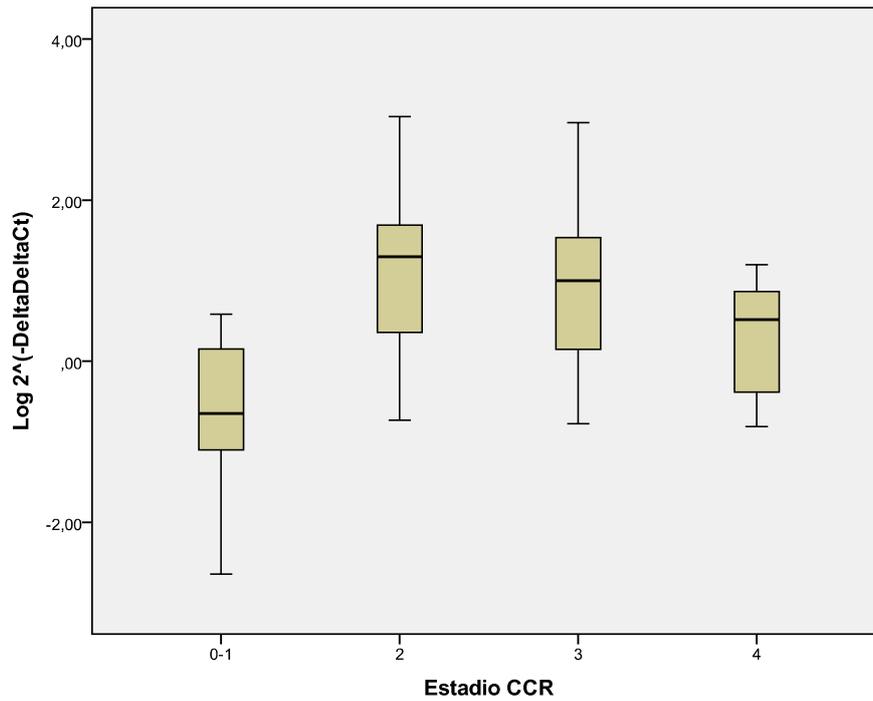


Figura 38. Diagrama de cajas: Cuantificación relativa normalizada de FN según “Estadio CCR”.

A continuación, se muestran los resultados del análisis mediante prueba paramétrica T entre los grupos de estadio de CCR, que evidencia las diferencias existentes entre las medias de los cuatro grupos dos a dos.

Tabla 29. Comparación de la Cuantificación relativa normalizada de FN según “Estadio CCR”.

	II			III			IV (n=8)		
	Diferencia medias	t	p	Diferencia medias	t	p	Diferencia medias	t	p
0-I (n=12)	-1,75 [-2,43;-1,07]	-5,24	0,00001	-1,47 [-2,11;-0,82]	-4,59	0,00004	-0,92 [-1,75;-0,10]	-2,36	0,03
II (n=26)				0,28 [-0,23;0,79]	1,10	0,28	0,82 [0,06;1,60]	2,19	0,04
III (n=31)							0,545 [-0,19;1,28]	1,50	0,14

Resultados

El ANOVA del logaritmo de la cuantificación relativa normalizada de FN ($\text{Log } 2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$) para el estado MSI muestra que no existen diferencias significativas entre las medias (Valor F de Fisher-Snedecor = 2,589; $p = 0,09$).

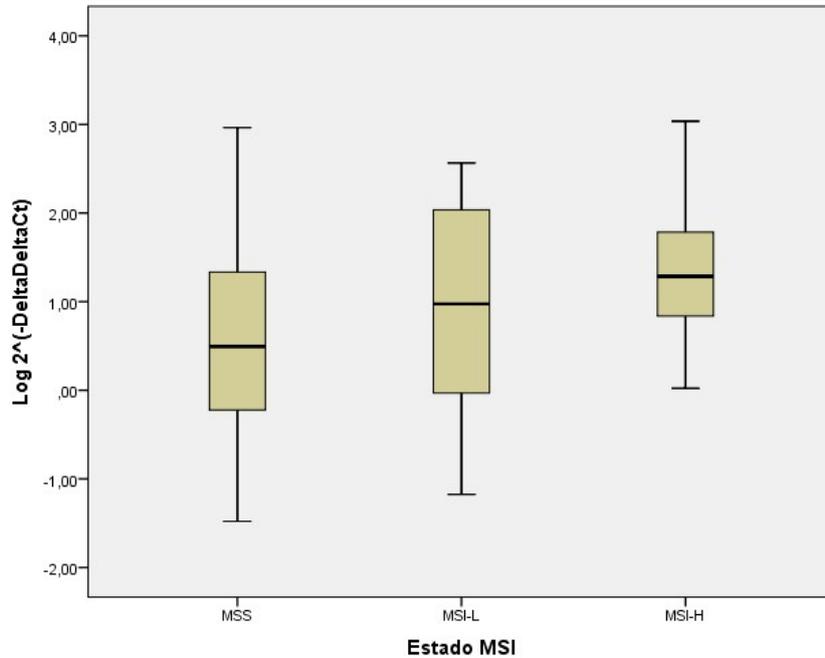


Figura 39. Diagrama de cajas: Cuantificación relativa normalizada de FN según “Estado MSI”.

Pero el análisis por separado entre los distintos estados MSI muestra que si que existen diferencias significativas entre MSS y MSI-H.

Tabla 30. Comparación de la Cuantificación relativa normalizada de FN según “Estado MSI”.

	MSI-L (n=16)			MSI-H (n=10)		
	Diferencia medias	t	p	Diferencia medias	t	p
MSS (n=50)	-0,34 [-0,93;0,25]	-1,13	0,26	-0,74 [-1,40;-0,08]	-2,24	0,03
MSI-L				-0,40 [-1,33;0,51]	-0,91	0,37

Resultados

El ANOVA del logaritmo de la cuantificación relativa normalizada de FN ($\text{Log } 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$) para el estado CIMP muestra que no existen diferencias significativas entre las medias (F de Fisher-Snedecor = 2,939; $p = 0,06$), pero roza la significación.

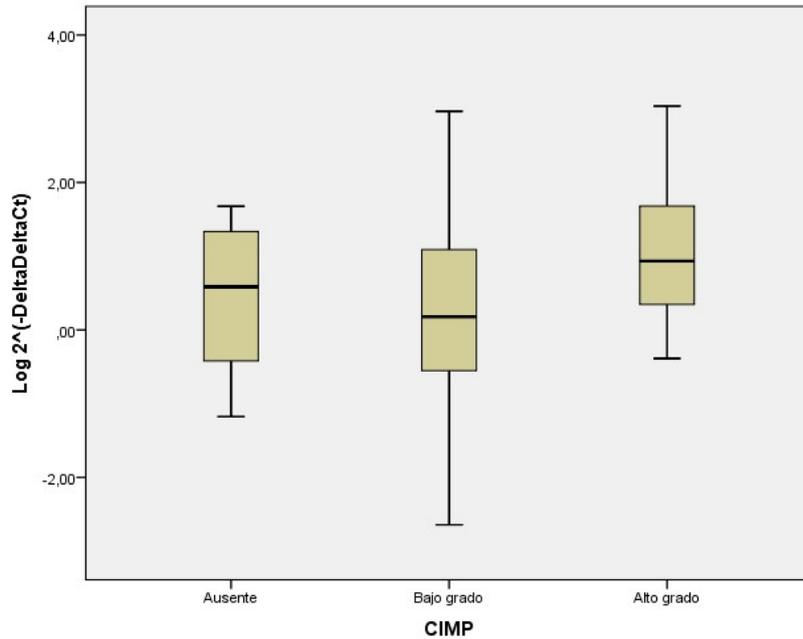


Figura 40. Diagrama de cajas: Cuantificación relativa normalizada de FN según “Estado CIMP”.

En el análisis por separado entre los distintos subgrupos CIMP muestra que si que existe diferencias significativas o casi significativas, entre el CIMP-H en comparación con el CIMP-L y con la ausencia de CIMP, respectivamente. En cambio no existen diferencias entre los niveles de CIMP-L y ausencia de CIMP.

Tabla 31. Comparación de la Cuantificación relativa normalizada de FN según “Estado CIMP”.

	Diferencia medias	IC95%	T	<i>p</i>
CIMP Ausente vs. BAJO	0,13	[-0,52; 0,79]	0,41	0,67
CIMP Ausente vs ALTO	-0,62	[-1,25; 0,006]	-2,01	0,052
BAJO vs. ALTO	-0,75	[-1,42; -0,88]	-2,28	0,027

Resultados

El análisis estadístico del logaritmo de la cuantificación relativa normalizada de FN ($\text{Log } 2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$) en función del estado de los genes *KRAS* y *BRAF* también muestra diferencias significativas. Sin embargo, no existen diferencias entre la cuantificación relativa con relación al gen *PIK3CA*.

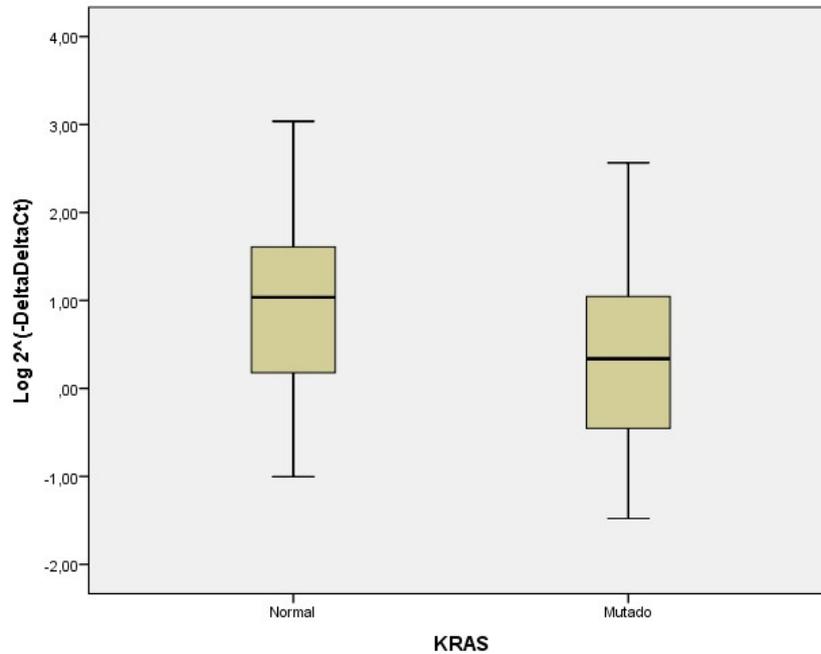


Figura 41. Diagrama de cajas: Cuantificación relativa normalizada de FN según “*KRAS*”.

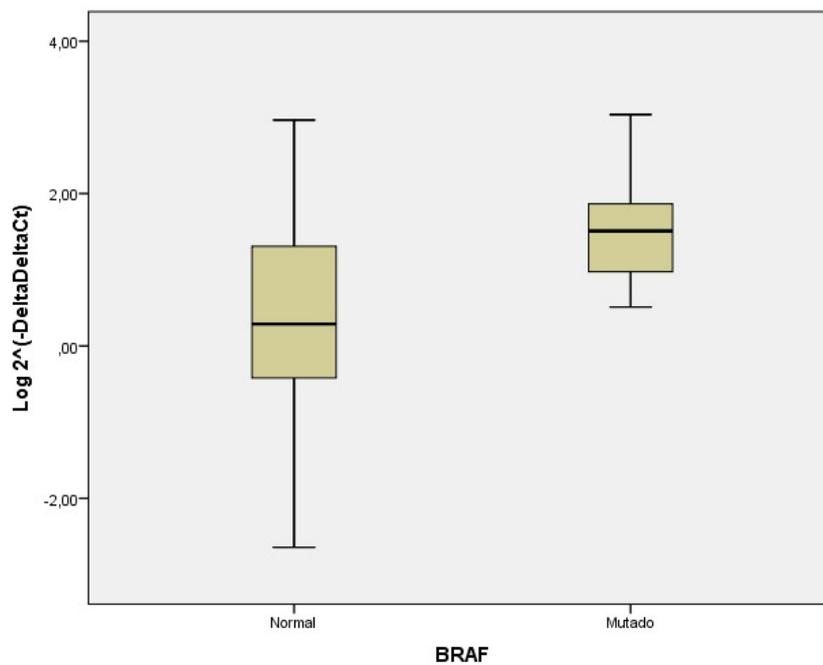


Figura 42. Diagrama de cajas: Cuantificación relativa normalizada de FN según “*BRAF*”.

Resultados

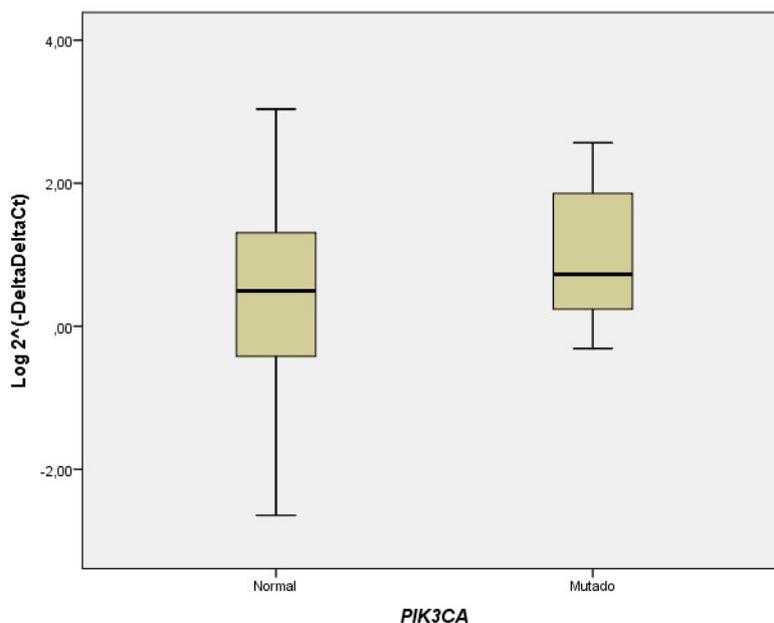


Figura 43. Diagrama de cajas: Cuantificación relativa normalizada de FN según “*PIK3CA*”.

Tabla 32. Comparación de la Cuantificación relativa normalizada de FN según “*KRAS*, *BRAF* y *PIK3CA*”.

	Diferencia medias	IC95%	T	p
Log 2^(-ΔΔCt) vs <i>KRAS</i>	0,54	[0,02; 1,06]	2,07	0,042
Log 2^(-ΔΔCt) vs <i>BRAF</i>	-1,09	[-1,73; -0,46]	-3,43	0,001
Log 2^(-ΔΔCt) vs <i>PIK3CA</i>	0,54	[-0,28; 1,37]	1,32	0,19

El análisis multivariante realizado por regresión lineal permite obtener las variables que se asocian de forma independiente con la cuantificación relativa normalizada de FN (Tabla 33).

Tabla 33. Análisis multivariante de la cuantificación relativa normalizada de FN.

Variable	Coefficiente no estandarizado	IC95%	p
Estado MSI (MSI-H)	1,32	0,13 – 2,50	0,03
Estadio CCR (II-III-IV)	1,30	0,64 – 1,96	0,0002
Tipo de CCR (SAC/hmMSI)	0,65	0,12 – 1,18	0,04
Edad	-0,01	-0,04 – 0,02	0,49
Localización (Distal)	0,05	-0,45 – 0,54	0,85
Sexo (Hombre)	0,02	-0,47 – 0,52	0,92
Estado CIMP (CIMP-H)	0,13	-0,67 – 0,92	0,75
<i>BRAF</i> (mutado)	0,22	-0,77 – 1,21	0,65
<i>KRAS</i> (mutado)	-0,30	-0,84 – 0,24	0,27
<i>PIK3CA</i> (mutado)	0,67	-0,12 – 1,46	0,09

5. CAPÍTULO 4: Cuantificación relativa de *Fusobacterium nucleatum* en el diagnóstico del CCR.

Mediante el análisis ROC podemos medir la capacidad diagnóstica global de la cuantificación relativa de FN para el CCR, así como seleccionar el punto de corte más óptimo.

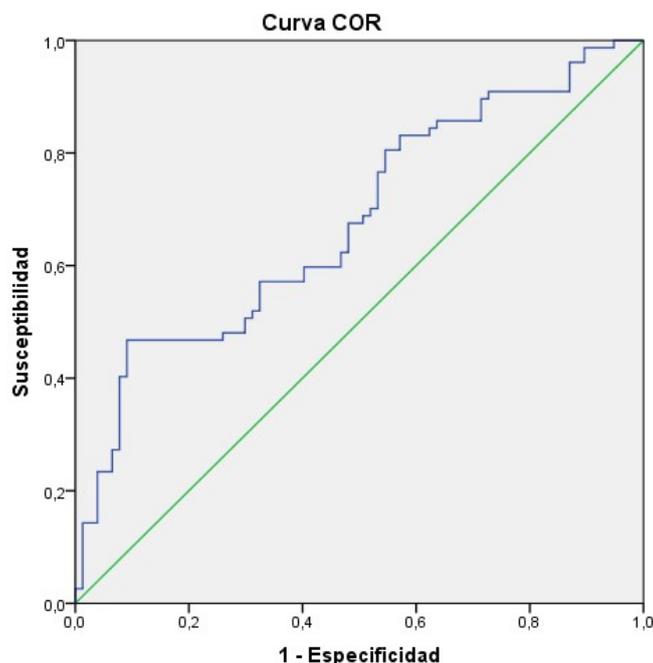


Figura 44. Curva ROC para Cuantificación relativa de FN según tipo muestra (T vs NT).

Tabla 34. AUC Curva ROC para cuantificación relativa de FN según tipo muestra (T vs NT).

AUC	IC95%	
	Límite inferior	Límite superior
0,678	0,594	0,763

El punto de corte óptimo es aquel que maximiza el “Índice de Youden”, que en nuestro caso es cuando se dan diferencias $\leq 10,2$ ciclos entre los valores de Ct de las reacciones qPCR para *F. nucleatum* y carga bacteriana total en las muestras de tejido de colon. De esta forma la sensibilidad es del 47% y la especificidad del 91%, con una eficiencia diagnóstica para CCR del 69%, o lo que es lo mismo, esa diferencia de $\leq 10,2$ ciclos clasifica de forma correcta al 69% de los sujetos de nuestro estudio.

Como requisitos se establece que el valor de Ct para la qPCR de *F. nucleatum* sea inferior a 40 ciclos y que el Ct de la carga bacteriana total sea 25 ± 3 ciclos.

Resultados

***Análisis predictivo para el diagnóstico de CCR a partir de las variables: cuantificación relativa *F. nucleatum*, sexo y edad.**

Para llevar a cabo la potencial utilidad de la cuantificación relativa de *F. nucleatum* en el cribado del CCR, se realiza el análisis predictivo mediante regresión logística en el que podemos observar que ni la edad ni el sexo del paciente influyen de forma significativa en la predicción de la presencia o ausencia de CCR, que sí se consigue con la cuantificación relativa de FN.

Tabla 35. Análisis multivariante para predicción de CCR.

Variables predictoras	Odds Ratio	IC95%	p
Cuantificación relativa <i>F.nucleatum</i>	2,23	1,51 - 3,30	0,0001
Edad	0,98	0,95 – 1,02	0,32
Sexo	0,93	0,47 – 1,83	0,83

***Análisis predictivo para el tipo de CCR a partir de las variables: cuantificación relativa *F. nucleatum*, sexo y edad.**

En cuanto al análisis predictivo por regresión logística para la potencial utilidad de la cuantificación de FN en la diferenciación del tipo de CCR (CC, SAC/hmMSI) se obtiene que nuevamente ni la edad ni el sexo del paciente influyen de forma significativa en la predicción del tipo de CCR, mientras si lo sigue haciendo la cuantificación relativa de FN.

Tabla 36. Análisis multivariante para predicción del tipo de CCR.

Variables predictoras	Odds Ratio	IC95%	p
Cuantificación relativa <i>F. nucleatum</i>	2,00	1,22 - 3,28	0,006
Edad	0,98	0,94 – 1,03	0,48
Sexo	1,13	0,42 – 3,00	0,81

***Análisis multivariante para tipo de CCR**

En el análisis multivariante realizado mediante regresión logística permite obtener que variables diferencian mejor entre CC y SAC/hmMSI, confirmando en nuestra cohorte de pacientes que tanto la cuantificación relativa de FN como el estado MSI-L/MSI-H son variables predictoras independientes de SAC/hmMSI.

Resultados

Tabla 37. Análisis multivariante para tipo de CCR (CC vs SAC/hmMSI).

Variables	Odds Ratio	IC95%	p
Cuantificación relativa <i>F. nucleatum</i>	2,29	1,23 - 4,23	0,009
Estado MSI-L/H (vs MSS)	22,78	3,82 – 135,74	0,001
Sexo (Hombre)	3,27	0,82 – 13,07	0,09
Edad	0,96	0,89 – 1,04	0,34
Estado CIMP (CIMP-H)	2,41	0,46 – 12,46	0,29
Localización (Distal)	0,62	0,17 – 2,26	0,47
Estadio tumoral (I-II vs III-VI)	0,33	0,05 – 2,28	0,26

En cambio, el análisis multivariante realizado mediante regresión logística entre SAC y hmMSI, únicamente el estado MSI (OR: 27,00; IC95 [3,67 – 198,70]; $p = 0,001$) es variable predictora independiente del CCR tipo hmMSI.

VI. DISCUSIÓN

Discusión

La etiología del CCR es compleja y multifactorial e incluye alteraciones genéticas y epigenéticas (334). También podrían intervenir factores extrínsecos como la disbiosis intestinal, pero existe una variabilidad interindividual, debido a múltiples factores genéticos y ambientales, por ello resulta de especial interés investigar sobre la posible existencia de un denominador microbiano común, y aunque aún no se ha demostrado el papel directo de los microorganismos en el desarrollo del CCR, recientes estudios muestran como alteraciones de la composición microbiana están ligadas a la presencia de procesos carcinogénicos y cómo ciertas bacterias intestinales están implicadas en la patogénesis del CCR. El interés por el estudio de la microbiota intestinal se ha visto reforzado en los últimos años con la aparición de diversas técnicas moleculares, entre las que destaca la NGS, que facilitan la caracterización y el seguimiento de una enorme variedad de grupos microbianos, incluyendo aquellos microorganismos no cultivables. Estas técnicas han permitido ampliar conocimientos sobre la dinámica del microbioma en el ser humano en distintos escenarios y han relacionado determinados perfiles microbianos a diversas enfermedades de gran importancia e impacto en la actualidad, entre ellas el CCR (277,335).

Los estudios de Kostic et al.(275) y Castellarin et al. (274) fueron los primeros que evidenciaron la sobreabundancia de *Fusobacterium spp.* en el tejido tumoral en comparación con el tejido adyacente sano en el CCR, y más concretamente secuencias correspondientes a *F. nucleatum*. Existe un importante número de estudios publicados en la última década, utilizando variedad de enfoques moleculares (secuenciación gen 16S ARNr, secuenciación de ADN (DNA-seq), secuenciación de ARN (ARN-seq), qPCR o FISH), que concluyen indicando la posibilidad de que *F. nucleatum* pueda formar parte del proceso de carcinogénesis en el CCR, y por tanto de poder constituir un nuevo biomarcador en el diagnóstico.

***Estudio del microbioma.**

En el análisis de la diversidad del microbioma no se observan diferencias significativas entre muestras T y NT aunque existe una disminución en la diversidad microbiana en muestras T (Figura 27), que en algún estudio si ha llegado a ser significativa (336–338). La interpretación de este hecho es que en la mucosa tumoral existe una colonización por aquellas bacterias para las cuales las condiciones del entorno se vuelven más favorables a expensas de otras especies bacterianas que no se adaptan, mostrando así una reducción en la diversidad y riqueza bacteriana en los casos de CCR en comparación con pacientes sanos (338). En cuanto al análisis de las muestras T y NT en función de la localización proximal o distal si se observa una

Discusión

reducción significativa en la diversidad de la composición microbiana para las muestra T de localización distal en comparación al resto de muestras incluidas en el estudio, independientemente del tipo CCR (Figura 28, Tabla 15). En referencia a la diversidad microbiana según el tipo de CCR, tampoco se han obtenido diferencias significativas en nuestro estudio (Figura 29).

A pesar de que no se ha identificado un perfil de composición microbiana específico en el CCR, y que esta composición varía durante la progresión del CCR, existen algunas especies bacterianas que se repiten en los distintos estudios publicados con diferencias en cuanto a su abundancia entre muestras T y NT, e incluso con diferencias en los distintos estadios dentro del proceso evolutivo del CCR.

En el análisis realizado sobre los datos del microbioma, el PCA no ha ofrecido ninguna combinación de PC con diferencias entre las muestras T y NT (Figura 30), lo que nos hace pensar que existe una composición similar entre ellas. Algún estudio como el realizado por Saito et al. también realizan este tipo de análisis donde si encuentran una combinación de PC que consigue diferenciar entre muestras de pacientes sanos y pacientes con CCR (339). El análisis diferencial realizado sobre el microbioma observamos diferencias en la abundancia relativa de géneros bacterianos entre muestras T y NT (Tabla 16). En primer lugar destaca la sobreabundancia del género *Bacteroides* en las muestras T, seguido de los géneros *Streptococcus*, *Eubacterium* y *Fusobacterium*. De otra parte, el género *Escherichia* presenta una mayor diferencia significativa en su abundancia a favor de muestras N, seguido de los géneros *Lachnoclostridium*, *Instentibacter* y *Akkermansia*. De otra parte cuando aplicamos el método LDA, es el género *Bacteroides* el que también presenta el mayor coeficiente de función discriminante a favor de muestras T, pero también los géneros *Eubacterium*, *Acinetobacter* y *Fusobacterium* presentan poder discriminatorio a favor de éstas. Mientras que son los géneros *Lachnoclostridium*, *Haempophilus*, *Paraprevotella* y *Pseudomonas* los géneros con coeficientes de función discriminante en favor de muestras NT (Tabla 17).

El género *Bacteroides* se trata de un género que ha demostrado contribuir a la carcinogénesis colorrectal, y concretamente las cepas ETBF, como consecuencia de la producción de una genotoxina (fragilisina), que además de la acción genotóxica sobre las células epiteliales del colon produce una respuesta inflamatoria y estimula la escisión de la proteína supresora de tumores E-cadherina en las células epiteliales

Discusión

intestinales causando la proliferación celular y la permeabilización de la barrera intestinal (340).

El género *Streptococcus* es un género con actividad inflamatoria considerado procarcinógeno, considerado tipo *passenger* y que se ha relacionado con adenomas y CCR. En concreto, la especie *Streptococcus gallolyticus* provoca una infección asociada a CCR ampliamente descrita. Esta bacteria coloniza pobremente el tejido colónico sano pero cuando se altera la estructura de la pared colónica como es el caso de un adenoma o CCR accede a las fibras de colágeno expuestas en la membrana basal por las que tiene gran afinidad (341).

Del género *Fusobacterium* hay que destacar que se trata del género que con más evidencia se ha asociado a CCR, lo que sugiere que debe existir un mecanismo común de alteración en la microbiota intestinal relacionado con el CCR. Tal como se ha descrito a nivel de la cavidad oral, la colonización por *Fusobacterium spp.* precisa de la presencia de otras bacterias como son las especies del género *Streptococcus* (342), hallazgo que podría tener su réplica en lo que sucede en las células epiteliales del colon, donde también en nuestro estudio se evidencia un aumento significativo de la abundancia de ambos géneros en muestras T en comparación con NT. Existen varios estudios realizados sobre cohortes de pacientes con CCR de diferentes áreas geográficas, utilizando distintas técnicas moleculares NGS, en los que se evidencia una sobreexpresión del género *Fusobacterium* en muestras T en comparación con muestras NT y que lo clasifican como un género tipo *passenger* según el modelo de Tjasma et al. (275,336,339,343,344). En el publicado por Mira-Pascual et al. (343) realizado sobre una cohorte española se evidenciaba tanto el aumento en la abundancia del género *Fusobacterium* como del género *Bacteroides* en las muestras de tejido tumoral, tal como hemos encontrado en nuestro estudio. Además también los resultados del estudio de Kostic et al. (275) o de Ai et al.(336) en cohortes europeas ponen de manifiesto un incremento de especies del género *Fusobacterium* en muestras de tejido tumoral. En los estudios realizados por Saito et al. sobre cohorte japonesa (339) o Carvalho et al. sobre cohorte sudamericana (344), también concluyen una sobreabundancia significativa del género *Fusobacterium* en muestras de tejido tumoral sobre muestras de tejido normal.

El género *Eubacterium*, junto con otros géneros también productores de butirato a partir de la fibra ingerida con la dieta, se han encontrado en mayor abundancia de forma significativa en muestras de adenomas avanzados en comparación con mucosa sana (345), lo que sugiere un papel protector de este género consecuencia de la

Discusión

actividad antiinflamatoria del butirato. Se puede especular que esta acción tiene como finalidad el preservar su nicho intestinal e involuntariamente prevendría la rápida progresión tumoral. La evidencia en cuanto al género *Acinetobacter* es muy escasa y puntualmente algún estudio establece una sobreabundancia en adenomas y carcinoma rectal (346,347)

Los miembros pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, donde se incluye el género *Escherichia*, tienen la capacidad de provocar un estado de inflamación basal de bajo grado debido a la producción continua de LPS de su membrana externa (248), lo que corresponde a un género tipo *driver* según el modelo de Tjasma et al. Además, la especie más representativa dentro del género *Escherichia*, *E. coli*, posee la capacidad de producir genotoxinas (colibactina) que dañan al ADN celular, y regular a la baja las proteínas reparadoras del ADN promoviendo así la carcinogénesis (340). La mayor abundancia del género *Escherichia* en las muestras NT en nuestro estudio podría interpretarse por el hecho de que realmente se trata de tejido procedente de pacientes con CCR, por lo que es muy posible que exista ya un proceso proinflamatorio y por lo tanto un estado de disbiosis, pudiendo presentar así colonización por géneros tipo *driver* considerados procarcinógenos.

El género *Pseudomonas* se ha mostrado más abundante en las muestras de tejido sano respecto tanto a pólipos colorrectales como a muestras de tejido tumoral (348), y aunque no se considera procarcinógeno, podría tener papel como género tipo *driver* incluso previamente a la formación de pólipos. En el estudio de Gao et al. (348), en el que se comparaban los datos de microbioma obtenidos mediante secuenciación del gen 16S ARNr a partir de muestras de tejido tumoral y mucosa sana adyacente en CCR las abundancias tanto del género *Escherichia* como *Pseudomonas* estaban reducidas en el tejido tumoral respecto al tejido sano adyacente. Además, Carvalho et al. también demuestra resultados homólogos a los nuestros en cuanto a la mayor presencia de géneros *Pseudomonas* y *Paraprevotella* en muestras de tejido normal, aunque existe discrepancia en relación al género *Bacteroides*, ya que también estaba sobreexpresado en muestras de tejido normal mientras que en nuestro estudio es al contrario (344).

El género *Haemophilus* se trata de un patógeno oportunista que presenta actividad inflamatoria y procarcinógena, y que se puede considerar un género tipo *driver*. Existe escasa evidencia de una mayor abundancia del género *Haemophilus* en adenomas avanzados respecto a pacientes sanos (349). Un estudio reciente realizado en

Discusión

población china ha demostrado la utilidad del marcador bacteriano fecal *m3* perteneciente al género *Lachnoclostridium* en la detección de adenomas colorrectales, aunque su capacidad diagnóstica para CCR no ha resultado ser tan buena como la detección de *F. nucleatum* (350).

***Estudio del género *Fusobacterium*-metiloma.**

En el estudio de Kostic et al. (288), al correlacionar la abundancia relativa de *Fusobacterium spp.* con la expresión del genoma del huésped en el CCR, identificaron un perfil de expresión genética relacionado con la respuesta inflamatoria e inmunitaria asociado a este género bacteriano. Concretamente se correlacionaba con genes marcadores de células inmunitarias asociadas con macrófagos asociados al tumor (*CD209*, *CD206/MRC1*, *IL-6*, *IL-8* y *CXCL10*), células mieloides supresoras (*CD33*, *IL-6*) y células dendríticas (*CD11c/ITGAX*, *CD209*, *TNF*, *CD80*).

En nuestro estudio hemos combinado los datos de la correlación existente entre la abundancia relativa del género *Fusobacterium* y el nivel de metilación genética con los datos obtenidos del análisis de metilación diferencial, en concreto con aquellos genes que presentan un nivel de metilación significativamente superior en muestras T en comparación con muestras NT (Tablas 19 y 20). Posteriormente se ha realizado el estudio de validación mediante pirosecuenciación para 2 genes con correlación negativa (*CILP2* y *PTPLAD2*) y 5 genes con correlación positiva (*EGFR*, *PLCH1*, *COBL*, *mirLET7D* y *SFRP5*), confirmándose que los genes *EGFR*, *PLCH1*, *mirLET7D* y *COBL* presentan un estado de hipermetilación a favor de las muestras T en correlación con la abundancia del género *Fusobacterium* (Tabla 21).

El producto de transcripción del gen *EGFR* es una proteína transmembrana que actúa como receptor de factor de crecimiento epidérmico en la superficie celular. Tras su activación por ligando se produce la formación de un homodímero que estimula la actividad intrínseca de la proteína intracelular tirosina quinasa, produciendo así una activación en cascada de transducción de señales intracelulares (vía MAPK, AKT, JNK), relacionada con la síntesis de ADN y la proliferación celular. Se considera un protooncogén, de modo que algunas mutaciones pueden producir una sobreexpresión de la proteína EGFR, provocando así una división celular descontrolada, hecho que se asocia con distintos tipos de cáncer epitelial, entre los que se encuentra el CCR. En nuestro estudio existe una mayor metilación en las muestras T a nivel de las islas CpG estudiadas, localizadas tanto en la zona promotora como en el cuerpo del gen *EGFR*.

Discusión

El producto del gen *PLCH1* es una isoenzima que se relaciona con procesos de transducción de señales. Concretamente está relacionada con la vía de la fosfolipasa C, produciendo moléculas de segundo mensajero a partir del PIP2 (fosfatidilinositol bifosfato) tales como el DAG (diacilglicerol) e IP3 (inositol 1,4,5 trifosfato). Estas moléculas modulan la actividad de enzimas implicadas en la cascada de señalización celular calcio dependientes. Sus productos terminan alterando respuestas celulares relacionadas con la proliferación, diferenciación celular, apoptosis y remodelaje de citoesqueleto entre otras. En este caso, las islas CpG estudiadas se encuentran principalmente en el promotor del gen, por lo que la metilación produce el silenciamiento del gen en el CCR.

El producto del gen *mirLET7D* es un microARN (miARN), un ARN no codificante pequeño (20 a 24 nucleótidos) que participa en la regulación postranscripcional en organismos multicelulares. El miARN maduro forma parte del RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN), que reconoce los ARN mensajeros diana a través del apareamiento entre bases nitrogenadas y produce la inhibición de la traducción o la desestabilización del ARN mensajero en cuestión. En este caso se produce la inhibición de *let-7*, que se trata de un regulador directo de la expresión de genes RAS en las células humanas. Los genes *KRAS*, *NRAS* y *HRAS* en humanos presentan secuencias de unión para *let-7* en sus regiones 3'UTR. La metilación de las islas CpG localizadas en el promotor de este gen produce el silenciamiento de la expresión del miARN, por lo que no se bloquea la traducción de los ARN mensajeros de *let-7*, y de esta forma se produce una regulación al alza de la expresión de estos genes.

El gen *COBL* codifica para una proteína reguladora de actina a la que se le atribuye un papel crítico en el crecimiento y ensamblaje de las microvellosidades del borde en cepillo de las células del epitelio del colon, las cuales tienen un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis intestinal. Esta proteína es responsable de la polimerización de filamentos de actina, estabilizando dímeros de actina-GTP longitudinal mediante dos dominios WH2 consecutivos, y formando así los núcleos de actina en la constitución del citoesqueleto celular. El gen está regulado por la señalización de calcio/calmodulina y la metilación de la arginina provocada por la arginina metiltransferasa-2 (PRMT2). La metilación al alza de las islas CpG del promotor del gen *COBL* se traduciría en una alteración estructural en las células epiteliales del colon.

Discusión

Sería interesante en este punto diseñar nuevos estudios para entender como podría afectar esta hipermetilación a nivel de islas CpG sobre la expresión de estos genes y esclarecer si puede tener implicación en el proceso de carcinogénesis o progresión del CCR.

Existe más que suficiente evidencia bibliográfica acerca de la presencia de niveles superiores de *F. nucleatum* en muestras de tejido tumoral en comparación con muestras de tejido sano en CCR (274,287,328,351,352), en base a datos cuantitativos obtenidos por distintas técnicas de biología molecular. En este estudio hemos estudiado la correlación entre la cuantificación relativa de *F. nucleatum* y el porcentaje de metilación de los genes que presentan correlación con el género *Fusobacterium*. Además se ha incluido en este análisis al gen *ZNF788*, uno de los genes obtenidos con mayor poder discriminatorio entre muestras T y NT en uno de los estudios realizados previamente. El resultado obtenido en este análisis de correlación entre el porcentaje de metilación de islas CpG en estos genes respecto a la cuantificación relativa de *F. nucleatum* no ha demostrado correlación alguna excepto para el gen *ZNF788*, que si hemos obtenido una correlación positiva significativa (Tabla 22, Figura 31). El gen *ZNF788* pertenece a la familia de los dedos de zinc y es realmente un pseudogen, es decir, estructuralmente es un gen pero sin la capacidad de codificar para una proteína, debido a mutaciones acumuladas a lo largo de la evolución, por lo que es inactivo.

A raíz de este hallazgo hemos realizado un análisis multivariante para la predicción del porcentaje de metilación del gen *ZNF788* teniendo en cuenta, además de la cuantificación relativa de *F. nucleatum*, el resto de variables recogidas en el estudio tanto demográficas (edad, sexo) como propias del tumor (localización, estadio tumoral, estado MSI, estado CIMP) para identificar posibles variables de confusión. El resultado obtenido se traduce en que las variable predictoras que mejor se correlacionan con el porcentaje de metilación de las islas CpG del gen *ZNF788* es el estado CIMP en primer lugar seguido de la cuantificación relativa de *F. nucleatum* (Tabla 23).

***Análisis diferencial de la cuantificación relativa de *F. nucleatum* en el CCR.**

F. nucleatum utiliza el factor de virulencia FadA para adherirse a las células e invadirlas, activando así la vía de señalización de la β -catenina y promoviendo el CCR. De la evidencia de la que disponemos hasta la fecha se deduce que existe una importante presencia de *F. nucleatum* en el tejido tumoral del CCR en comparación

Discusión

con el tejido sano adyacente, con un aumento gradual en la abundancia desde el tejido sano hacia adenoma y hasta CCR, mostrando una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de *F. nucleatum* y el CCR (274,287,351). Esta mayor presencia y mayores niveles de *F. nucleatum* en muestras de tejido tumoral también se demuestran en los datos que hemos obtenido (Figura 32). En nuestro estudio nos hemos centrado en el análisis de la cuantificación relativa de *F. nucleatum* dentro de las muestras del tejido tumoral, con especial interés en cuanto las posibles diferencias entre los distintos tipos de CCR e incluso en función de los distintos marcadores tumorales incluidos en el estudio.

La posible influencia del sexo en los resultados no se ha tenido en cuenta en algunos de los estudios realizados, y al tratarse de un factor de riesgo directamente relacionado con el estilo de vida de hombres y mujeres podría conducir a que los estudios estén en cierto modo sesgados. En nuestro estudio si se ha recogido el sexo de los casos incluidos pero no se han observado diferencias en cuanto a la cuantificación relativa de *F. nucleatum* en función del mismo (Figura 33, Tabla 24).

En cuanto a la localización anatómica intestinal del tumor (proximal o distal) y la cantidad de *F. nucleatum*, el estudio realizado a partir de dos cohortes americanas por Mima et al. (353) demuestra que la proporción de CCR enriquecido en *F. nucleatum* aumenta de forma lineal a lo largo del colon desde el extremo distal hacia el proximal, esta diferencia en favor de la localización proximal del CCR también se ha documentado en cohortes asiáticas (354–356). En nuestro estudio observamos una mayor cuantificación relativa de *F. nucleatum* a favor de la localización proximal aunque no ha llegado a alcanzar la significación estadística (Figura 34, Tabla 25).

Desde 2010, la OMS establece una clasificación racional desde el punto de vista histopatológico a raíz de los estudios realizados por Mäkinen et al. (125), en la que además de CC, se acepta SAC como entidad de CCR, la cual presenta factores histológicos adversos que condicionan un peor pronóstico en comparación con el CC (130,131). Además se han propuesto dos posibles subtipos de CCR como resultado de la progresión de la vía serrada con diferencias tanto en el desarrollo de la respuesta inmune como de resultados clínicos obtenidos. En primer lugar SAC, con la típica morfología serrada, y en segundo lugar el hmMSI-H, con características histológicas y moleculares MSI (357,358). Nuestro estudio establece que existe una diferencia significativa en la cantidad de *F. nucleatum* favorable a SAC en comparación con CC, tal como se ha concluido en varios estudios realizados en los que se ha encontrado asociación entre *F. nucleatum* y SAC (328,340), y aunque el nivel de *F. nucleatum* es

Discusión

superior en el subtipo hmMSI-H frente al SAC, no lo es de forma significativa (Figura 35, Tabla 26). Además, cuando comparamos la cuantificación relativa de *F. nucleatum* considerando también la localización (proximal vs distal) además del tipo de CCR, se puede observar como las diferencias significativas entre el CC y SAC/hmMSI tienen lugar a nivel proximal (Figura 36, Tabla 27).

En nuestro estudio se observa que los niveles de *F. nucleatum* en los tumores primarios más grandes e invasivos (T3/T4) son más elevados en comparación con los tumores más superficiales o menos invasivos (Tis/T1/T2) (Figura 37, Tabla 28), existen diversos artículos publicados que muestran una mayor proporción de muestras de tejido tumoral con alto nivel de *F. nucleatum* en tumores T3/T4 respecto a tumores T1/T2 (344,352,354). Cuando analizamos la cuantificación de *F. nucleatum* haciendo uso del estadio de CCR, donde además del tamaño e invasión a nivel de capas del colon se tiene en cuenta la diseminación a ganglios y metástasis, también se observa una diferencia significativa en la cantidad de *F. nucleatum* a favor de estadios más avanzados (II, III y IV) en comparación con los estadios que sólo llegan a invadir la capa muscular del colon (0, I) (Figura 38, Tabla 29). Esta tendencia también se observa en el artículo de Ito et al. pero sin alcanzar la significación estadística (359).

El proceso de carcinogénesis para el desarrollo del CCR está condicionado por tres vías moleculares principales: CIN, MSI o CIMP. Existe un consenso internacional para clasificar en distintos subtipos moleculares según la presencia o ausencia de estas características moleculares que condicionan el tipo de vía carcinogénica. Por un lado la vía clásica (secuencia adenoma-carcinoma), impulsada por CIN o MSI y comprende los adenomas convencionales, y por otro lado la vía serrada, impulsada de inicio por CIMP y secundariamente por MSI.

En el estudio de Mima et al. (352) realizado a partir de datos de dos cohortes de pacientes americanos se realiza en primer lugar un análisis univariante en el que se obtiene una asociación significativa entre un mayor nivel de *F. nucleatum* y estado MSI-H, CIMP-H y *BRAF* mutado, pero cuando se realiza el análisis multivariante para evaluar esta asociación respecto al estado MSI, CIMP, *BRAF*, *KRAS* y *PIK3CA* únicamente se obtiene asociación con el estado MSI-H. Otro estudio realizado sobre una cohorte de pacientes japoneses analizaba la presencia o ausencia de *F. nucleatum* realizada mediante qPCR y los resultados revelaron una asociación significativa de la presencia de *F. nucleatum* con el estado MSI-H y el estado *BRAF* mutado (284). Nuestros datos abogan por una diferencia significativa en la cantidad de *F. nucleatum* entre las muestras de tejido tumoral a favor del estado MSI-H en

Discusión

comparación con estado MSS, mientras que las diferencias no alcanzan la significación entre estado MSS/MSI-L o MSI-L/MSI-H (Figura 39, Tabla 30).

Tahara et al. (287) realizaron un estudio en pacientes de EEUU y Japón en el cual, a partir de muestras de tejido tumoral, tejido adyacente normal y muestras de tejido sano, se analizaba la asociación entre el nivel de *Fusobacterium*, independientemente de que se tratara de *F. nucleatum* o de *Fusobacterium spp.*, frente las características moleculares (MSI, CIMP, *BRAF* y *KRAS*). Este estudio concluye que existe una mayor prevalencia de muestras de tejido tumoral con alto contenido en *Fusobacterium* con la característica de estado CIMP-H o CIMP-L, pero no todas las muestras de tejido tumoral con estado CIMP-L o CIMP-H presentaban niveles altos de *Fusobacterium*. De hecho no se obtuvieron diferencias significativas cuando se analizó únicamente la presencia o ausencia de *Fusobacterium spp.* o *F. nucleatum* en función del estado CIMP en las muestras de tejido tumoral. En nuestro estudio se evidencia que existen diferencias significativas en los niveles de *F. nucleatum*, presentando cargas mayores las muestras de tejido tumoral con características de estado CIMP-H (Figura 40, Tabla 31) y *BRAF* mutado (Figura 42, Tabla 32).

Otros estudios realizados sobre cohortes japonesas en el que también se analiza el nivel de *F. nucleatum* en muestras de tejido tumoral obtienen un nivel de *F. nucleatum* mayor con diferencia significativa a favor del estado MSI-H y CIMP-H (355,359). En el estudio realizado por Ono et al. también se analizaron las mutaciones de los genes *BRAF* y *KRAS*, con diferencias significativas para un nivel alto de *F. nucleatum* a favor del estado *BRAF* mutado mientras que no se demostró diferencia en cuanto al estado de *KRAS* (355). Estos resultados también coinciden con los presentados en este estudio para los estado MSI-H, CIMP-H y *BRAF* mutado.

El análisis multivariante realizado para la cuantificación relativa de *F. nucleatum* teniendo en cuenta todas las variables recogidas en el estudio tanto demográficas (edad, sexo) como propias del tumor (localización, estadio, estado MSI, estado CIMP, mutaciones oncogenes) para identificar posibles variables de confusión, ha mostrado que únicamente el tipo de CCR, el estadio del CCR y el estado MSI son variables independientes (Tabla 33). De este modo, los mayores niveles de *F. nucleatum* se asocian con el CCR tipo SAC/hmMSI, estadios tumorales avanzados (II, III y IV) y estado MSI-H.

***Cuantificación relativa de *Fusobacterium nucleatum* en el diagnóstico del CCR.**

Los numerosos estudios publicados hasta la actualidad coinciden mayoritariamente en la presencia de mayores niveles de abundancia de *F. nucleatum* en tejido tumoral frente a tejido normal adyacente. La realización de este tipo de estudios donde se comparan muestras de tejido tumoral frente a mucosa de tejido normal es una limitación remarcada en todos estos estudios y que se debe tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados obtenidos.

Del resultado del análisis mediante curva ROC de la cuantificación relativa de *F. nucleatum* como biomarcador para discriminar entre muestras T y NT (Figura 44) se concluye que dicha variable presenta una eficiencia diagnóstica para CCR del 69% (sensibilidad 47% y especificidad 91%), o lo que es lo mismo, el punto de corte establecido permite clasificar de forma correcta al 69% de los sujetos. Probablemente, si se hubieran incluido muestras de tejido normal obtenidas de pacientes sanos, la sensibilidad obtenida habría sido mayor.

En el reciente metaanálisis publicado por Villar-Ortega et al. (360) en el que se incluyen aquellos trabajos de investigación que intentan establecer una posible asociación entre *F. nucleatum* y CCR, se concluye que existe una asociación significativa entre *F. nucleatum* y CCR cuando se compara tejido tumoral con tejido sano adyacente. El modelo predictivo realizado mediante análisis multivariante demuestra no sólo la asociación de la cuantificación relativa de *F. nucleatum* con la presencia de CCR (Tabla 35) sino también con los tipos SAC/hmMSI (Tabla 36). Además, el modelo predictivo realizado mediante análisis multivariante para ver posibles asociaciones entre las distintas variables recogidas en el estudio y el tipo de CCR ha mostrado una asociación significativa de SAC/hmMSI con la cuantificación relativa de *F. nucleatum* y el estado MSI-L/MSI-H de forma independiente, por lo que el riesgo de SAC/hmMSI vs CCR tipo CC aumenta de forma independiente a medida que lo hace la cuantificación relativa de *F. nucleatum* (Tabla 37). En cambio hemos observado que la única variable predictora para diferenciar entre CCR tipo SAC y hmMSI ha resultado ser el estado MSI-H.

Actualmente la principal prueba para el cribado de CCR es la detección de SOH en heces, una prueba no invasiva que posee una buena sensibilidad y una especificidad cada vez mejor, incluso combinando ya la posibilidad de detección de alguna mutación específica del ADN de las células presentes en las heces. Aun así, la posibilidad de poder combinar esta prueba con la detección del nivel de *F. nucleatum* como

Discusión

biomarcador microbiano de CCR debe ser objeto de estudio, por la posibilidad de incrementar la especificidad del diagnóstico del CCR mediante pruebas no invasivas. Estudios publicados hasta la fecha señalan una sobreabundancia de *F. nucleatum* en las heces de pacientes con CCR en comparación con controles sanos, por lo que se señala como marcador útil para detectar el CCR, mostrando una sensibilidad y especificidad del 80,2% y 80,7%, respectivamente, que aumentan al 92-93% cuando se combina con la detección de SOH (360).

Sería de interés realizar el estudio de asociación entre la cuantificación relativa de *F. nucleatum* y CCR de forma simultánea en muestras de tejido y muestras de heces, con la finalidad de ver si los hallazgos son reproducibles en heces, puesto que de confirmarse tendría un gran interés diagnóstico de cribado de CCR por la fácil obtención de estas muestras sin necesidad de llevar a cabo procedimientos invasivos. De hecho, la idea de utilizar distintos biomarcadores bacterianos como forma no invasiva en la predicción de CCR se ha estudiado también de forma reciente y los resultados obtenidos son prometedores. La combinación de biomarcadores bacterianos con diferencias en cuanto a su abundancia en heces, no sólo entre pacientes con CCR y pacientes sanos, sino con diferencias también en las distintas etapas del proceso carcinogénico junto con datos de los pacientes (edad, sexo) han permitido distinguir con éxito entre CCR, adenomas y pacientes sanos (361).

Limitaciones

Una de las limitaciones de nuestro estudio es que las muestras consideradas NT proceden de pacientes con CCR y no de pacientes realmente sanos. Esto se debe tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados obtenidos ya que es muy probable que ya se haya iniciado un proceso proinflamatorio y existan por tanto alteraciones en la microbiota intestinal, pudiendo encontrar una mayor abundancia en muestras NT de bacterias tipo *driver* como los géneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Akkermansia*, o detectar bacterias como *F. nucleatum* cuya detección en tejido sano es poco habitual, o en el caso de detectarse es a niveles bajos. De hecho, existen estudios donde se ha documentado que la carga de *F. nucleatum* en mucosa de tejido normal en pacientes con CCR es superior a la presente en mucosa normal de pacientes sanos aunque sin resultar significativas (359).

Otra limitación es que no es posible establecer ningún tipo de relación de causalidad, consecuencia de que se trata de un estudio de cohortes transversal, por lo que

Discusión

únicamente podemos hablar de asociación para nuestros hallazgos. La realización de estudio longitudinales iniciados antes de la aparición de cualquier patología de colon a lo largo del tiempo es la única metodología de investigación para poder establecer relación causal entre las alteraciones de la microbiota intestinal y el proceso de carcinogénesis del CCR.

VII. CONCLUSIONES

Conclusiones

- Encontramos como biomarcadores potenciales bacterianos de CCR a los géneros *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Acinetobacter* y *Fusobacterium*.
- Los genes *PLCH1*, *mirLET7D*, *EGFR* y *COBL* se encuentran en un estado de hipermetilación significativo asociado a la abundancia del género *Fusobacterium spp.* en muestras de tejido tumoral.
- Sólo el gen *ZNF788* ha mostrado una correlación positiva entre su porcentaje de metilación y la cuantificación relativa de *F. nucleatum*. Sin embargo el porcentaje de metilación del gen *ZNF788* ha presentado una mayor asociación con el estado CIMP.
- Encontramos una asociación significativa a favor de mayores niveles de *F. nucleatum* con el CCR tipo SAC/hmMSI, estadios tumorales avanzados, estado MSI-H, estado CIMP-H y *BRAF* mutado cuando se realiza el análisis de forma univariante. Mientras que el análisis multivariante confirma una asociación de forma independiente con el CCR tipo SAC/hmMSI, estadios tumorales avanzados y estado MSI-H.
- Debido a la buena especificidad obtenida para la cuantificación relativa de *F. nucleatum* consideramos que dicho parámetro puede mejorar el cribado/diagnóstico del CCR, incluso llegando a poder diferenciar entre CC y SAC.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

1. Miguel A. Carrasco Arróniz, Aracely Cruz Palacios, Óscar Alfaro Zebadúa. Capítulo 25. Anatomía y fisiología del colon. En: Gastroenterología. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A;
2. Kyung Won Chung, Harold M. Chung. Temas Clave Anatomía. 6ª.
3. Lin PH, Chaikof EL. Embryology, anatomy, and surgical exposure of the great abdominal vessels. Surg Clin North Am. febrero de 2000;80(1):417-33, xiv.
4. Luiz Carlos Junqueira, José Carneiro. Histología Básica. 12ª. Médica Panamericana; 2015. 556 p.
5. Wang YHW, Wiseman J. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Rectum. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 [citado 4 de septiembre de 2019]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537245/>
6. Li F ying, Lai M de. Colorectal cancer, one entity or three. J Zhejiang Univ Sci B. marzo de 2009;10(3):219-29.
7. Longo D, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Jameson L, Loscalzo J. Harrison. Principios de medicina interna. 18ª. McGraw-Hill Interamericana;
8. van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. Annu Rev Physiol. 2009;71:241-60.
9. Juan Pablo Arancibia, Miguel Arredondo, Zoltán Berger Fleiszig, Catalina Carrasco, Carlos Defilippi, Maricela Díaz-Sotomayor, et al. Fisiología gastrointestinal y nutrición [Internet]. Oscar Brunser, Sylvia Cruchet, Martin Gotteland, editores. Nestlé Chile S.A.; 2013. 331 p. Disponible en: http://www.dinta.cl/wp-content/uploads/2018/11/libro_fisiologia_gastrointestinal.pdf
10. Sancho E, Batlle E, Clevers H. Signaling pathways in intestinal development and cancer. Annu Rev Cell Dev Biol. noviembre de 2004;20:695-723.
11. Loktionov A. Cell exfoliation in the human colon: myth, reality and implications for colorectal cancer screening. Int J Cancer. 1 de junio de 2007;120(11):2281-9.
12. McKinnell RG, Parchment RE, Perantoni AO, Pierce GB, Damjanov I. The Biological Basis of Cancer [Internet]. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006 [citado 5 de abril de 2020]. Disponible en: </core/books/biological-basis-of-cancer/E6DAF213205F8DEAC3FB15844E5C086A>
13. Boman BM, Fields JZ, Cavanaugh KL, Guetter A, Runquist OA. How dysregulated colonic crypt dynamics cause stem cell overpopulation and initiate colon cancer. Cancer Res. 1 de mayo de 2008;68(9):3304-13.
14. Boman B, Huang E. Human colon cancer stem cells: a new paradigm in gastrointestinal oncology. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. junio de 2008;26(17):2828-38.
15. Casali A, Batlle E. Intestinal stem cells in mammals and Drosophila. Cell Stem Cell. 6 de febrero de 2009;4(2):124-7.

Bibliografía

16. Batlle E. A new identity for the elusive intestinal stem cell. *Nat Genet.* julio de 2008;40(7):818-9.
17. Puente J, de Velasco G. Sociedad Española de Oncología Médica. [citado 8 de septiembre de 2019]. ¿Qué es el cáncer y cómo se desarrolla? - SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica © 2019. Disponible en: <https://seom.org/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla?showall=1>
18. Teresa Mas de Xaxars Rivero. Descripció i quantificació de la microbiota intestinal associada al càncer colorectal [Internet]. 2012. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/5799/46e946cd879cc3983c662d58128b158af3fe.pdf>
19. Grávalos C, Gonzalez Flores E. Sociedad Española de Oncología Médica. [citado 23 de septiembre de 2019]. Cáncer de colon y recto - SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica © 2019. Disponible en: <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/colon-recto?showall=1>
20. Pickhardt PJ, Pooler BD, Kim DH, Hassan C, Matkowskyj KA, Halberg RB. The Natural History of Colorectal Polyps: Overview of Predictive Static and Dynamic Features. *Gastroenterol Clin North Am.* 2018;47(3):515-36.
21. Compton CC, Greene FL. The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond. *CA Cancer J Clin.* diciembre de 2004;54(6):295-308.
22. Van Cutsem E, Dicato M, Haustermans K, Arber N, Bosset JF, Cunningham D, et al. The diagnosis and management of rectal cancer: expert discussion and recommendations derived from the 9th World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, 2007. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* junio de 2008;19 Suppl 6:vi1-8.
23. Motta Ramírez GA, Alonso Blancas E, Lozano Dubernard G, Urbina de la Vega JF, Valenzuela Tamariz J. La evaluación del cáncer colorrectal por tomografía computarizada multidetector. *Gac Mex Oncol.* 1 de septiembre de 2011;10(5):252-64.
24. Global Cancer Observatory. *Cancer Today* [Internet]. [citado 23 de septiembre de 2019]. *Cancer today.* Disponible en: <http://gco.iarc.fr/today/home>
25. REDECAN [Internet]. [citado 25 de septiembre de 2019]. Estimaciones de la incidencia del cáncer en España, 2019. Disponible en: <http://redecn.org/es/page.cfm?id=210&title=estimaciones-de-la-incidencia-del-cancer-en-espana,-2019>
26. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut.* 2017;66(4):683-91.
27. Cronin KA, Lake AJ, Scott S, Sherman RL, Noone A, Howlader N, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, part I: National cancer statistics. *Cancer.* 1 de julio de 2018;124(13):2785-800.
28. Holleczeck B, Rossi S, Domenic A, Innos K, Minicozzi P, Francisci S, et al. On-going improvement and persistent differences in the survival for patients with colon and rectum cancer across Europe 1999-2007 - Results from the EURO CARE-5 study. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. octubre de 2015;51(15):2158-68.

Bibliografía

29. De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO CARE--5-a population-based study. *Lancet Oncol.* enero de 2014;15(1):23-34.
30. REDECAN - Estimaciones de la Incidencia y la Supervivencia del Cáncer en España y su Situación en Europa [Internet]. [citado 1 de octubre de 2019]. Disponible en: <http://redecn.org/es/page.cfm?id=196&title=estimaciones-de-la-incidencia-y-la-supervivencia-del-cancer-en-espana-y-su-situacion-en-europa>
31. Jackman RJ, Mayo CW. The adenoma-carcinoma sequence in cancer of the colon. *Surg Gynecol Obstet.* septiembre de 1951;93(3):327-30.
32. Lee S, Bang S, Song K, Lee I. Differential expression in normal-adenoma-carcinoma sequence suggests complex molecular carcinogenesis in colon. *Oncol Rep.* octubre de 2006;16(4):747-54.
33. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1 de junio de 1990;61(5):759-67.
34. Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, et al. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med.* 30 de diciembre de 1993;329(27):1977-81.
35. Peng L, Weigl K, Boakye D, Brenner H. Risk Scores for Predicting Advanced Colorectal Neoplasia in the Average-risk Population: A Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2018;113(12):1788-800.
36. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodríguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 19 de enero de 2017;18(1).
37. Stoffel EM, Kastrinos F. Familial colorectal cancer, beyond Lynch syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* julio de 2014;12(7):1059-68.
38. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Smith RA, Brooks D, Andrews KS, et al. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *CA Cancer J Clin.* junio de 2008;58(3):130-60.
39. Vuik FE, Nieuwenburg SA, Bardou M, Lansdorp-Vogelaar I, Dinis-Ribeiro M, Bento MJ, et al. Increasing incidence of colorectal cancer in young adults in Europe over the last 25 years. *Gut.* octubre de 2019;68(10):1820-6.
40. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* enero de 2019;69(1):7-34.
41. Meester RGS, Mannalithara A, Lansdorp-Vogelaar I, Ladabaum U. Trends in Incidence and Stage at Diagnosis of Colorectal Cancer in Adults Aged 40 Through 49 Years, 1975-2015. *JAMA.* 21 de 2019;321(19):1933-4.

Bibliografía

42. Murphy G, Devesa SS, Cross AJ, Inskip PD, McGlynn KA, Cook MB. Sex disparities in colorectal cancer incidence by anatomic subsite, race and age. *Int J Cancer*. 1 de abril de 2011;128(7):1668-75.
43. Schoenfeld P, Cash B, Flood A, Dobhan R, Eastone J, Coyle W, et al. Colonoscopic screening of average-risk women for colorectal neoplasia. *N Engl J Med*. 19 de mayo de 2005;352(20):2061-8.
44. Perdue DG, Perkins C, Jackson-Thompson J, Coughlin SS, Ahmed F, Haverkamp DS, et al. Regional differences in colorectal cancer incidence, stage, and subsite among American Indians and Alaska Natives, 1999-2004. *Cancer*. 1 de septiembre de 2008;113(5 Suppl):1179-90.
45. Atkin WS, Morson BC, Cuzick J. Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas. *N Engl J Med*. 5 de marzo de 1992;326(10):658-62.
46. Samadder NJ, Smith KR, Hanson H, Pimentel R, Wong J, Boucher K, et al. Increased Risk of Colorectal Cancer Among Family Members of All Ages, Regardless of Age of Index Case at Diagnosis. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. diciembre de 2015;13(13):2305-2311.e1-2.
47. Samadder NJ, Curtin K, Tuohy TMF, Rowe KG, Mineau GP, Smith KR, et al. Increased risk of colorectal neoplasia among family members of patients with colorectal cancer: a population-based study in Utah. *Gastroenterology*. octubre de 2014;147(4):814-821.e5; quiz e15-16.
48. Tuohy TMF, Rowe KG, Mineau GP, Pimentel R, Burt RW, Samadder NJ. Risk of colorectal cancer and adenomas in the families of patients with adenomas: A population-based study in Utah. *Cancer*. 2014;120(1):35-42.
49. Taylor DP, Burt RW, Williams MS, Haug PJ, Cannon-Albright LA. Population-based family history-specific risks for colorectal cancer: a constellation approach. *Gastroenterology*. marzo de 2010;138(3):877-85.
50. Taylor DP, Stoddard GJ, Burt RW, Williams MS, Mitchell JA, Haug PJ, et al. How well does family history predict who will get colorectal cancer? Implications for cancer screening and counseling. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. mayo de 2011;13(5):385-91.
51. Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *Am J Gastroenterol*. octubre de 2001;96(10):2992-3003.
52. Cottet V, Pariente A, Nalet B, Lafon J, Milan C, Olschwang S, et al. Colonoscopic screening of first-degree relatives of patients with large adenomas: increased risk of colorectal tumors. *Gastroenterology*. octubre de 2007;133(4):1086-92.
53. Rex DK, Boland CR, Dominitz JA, Giardiello FM, Johnson DA, Kaltenbach T, et al. Colorectal cancer screening: Recommendations for physicians and patients from the U.S. Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastrointest Endosc*. julio de 2017;86(1):18-33.
54. Ekobom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med*. 1 de noviembre de 1990;323(18):1228-33.

Bibliografía

55. Rutter MD. Surveillance programmes for neoplasia in colitis. *J Gastroenterol.* enero de 2011;46 Suppl 1:1-5.
56. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement. *Lancet Lond Engl.* 11 de agosto de 1990;336(8711):357-9.
57. Friedman S, Rubin PH, Bodian C, Harpaz N, Present DH. Screening and surveillance colonoscopy in chronic Crohn's colitis: results of a surveillance program spanning 25 years. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* septiembre de 2008;6(9):993-8; quiz 953-4.
58. Canavan C, Abrams KR, Mayberry J. Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 15 de abril de 2006;23(8):1097-104.
59. Yamada A, Komaki Y, Komaki F, Micic D, Zullo S, Sakuraba A. Risk of gastrointestinal cancers in patients with cystic fibrosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2018;19(6):758-67.
60. Henderson TO, Oeffinger KC, Whitton J, Leisenring W, Neglia J, Meadows A, et al. Secondary gastrointestinal cancer in childhood cancer survivors: a cohort study. *Ann Intern Med.* 5 de junio de 2012;156(11):757-66, W-260.
61. Children's Oncology Group [Internet]. [citado 12 de octubre de 2019]. Disponible en: <http://www.survivorshipguidelines.org/>
62. Baxter NN, Tepper JE, Durham SB, Rothenberger DA, Virnig BA. Increased risk of rectal cancer after prostate radiation: a population-based study. *Gastroenterology.* abril de 2005;128(4):819-24.
63. Desautels D, Czaykowski P, Nugent Z, Demers AA, Mahmud SM, Singh H. Risk of colorectal cancer after the diagnosis of prostate cancer: A population-based study. *Cancer.* 15 de abril de 2016;122(8):1254-60.
64. Lund EK, Belshaw NJ, Elliott GO, Johnson IT. Recent advances in understanding the role of diet and obesity in the development of colorectal cancer. *Proc Nutr Soc.* mayo de 2011;70(2):194-204.
65. Johnson IT, Lund EK. Review article: nutrition, obesity and colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther.* 15 de julio de 2007;26(2):161-81.
66. Chan DSM, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, et al. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PLoS One.* 2011;6(6):e20456.
67. Bastide NM, Pierre FHF, Corpet DE. Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: a meta-analysis and a review of the mechanisms involved. *Cancer Prev Res Phila Pa.* febrero de 2011;4(2):177-84.
68. Bouvard V, Loomis D, Guyton KZ, Grosse Y, Ghissassi FE, Benbrahim-Tallaa L, et al. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol.* diciembre de 2015;16(16):1599-600.

Bibliografía

69. Karahalios A, English DR, Simpson JA. Weight change and risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 1 de junio de 2015;181(11):832-45.
70. Martinez-Useros J, Garcia-Foncillas J. Obesity and colorectal cancer: molecular features of adipose tissue. *J Transl Med*. 22 de enero de 2016;14:21.
71. Friedenreich C, Norat T, Steindorf K, Boutron-Ruault MC, Pischon T, Mazuir M, et al. Physical activity and risk of colon and rectal cancers: the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. diciembre de 2006;15(12):2398-407.
72. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Maisonneuve P. Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA*. 17 de diciembre de 2008;300(23):2765-78.
73. Botteri E, Iodice S, Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis. *Gastroenterology*. febrero de 2008;134(2):388-95.
74. Pande M, Lynch PM, Hopper JL, Jenkins MA, Gallinger S, Haile RW, et al. Smoking and colorectal cancer in Lynch syndrome: results from the Colon Cancer Family Registry and the University of Texas M.D. Anderson Cancer Center. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 de febrero de 2010;16(4):1331-9.
75. Cross AJ, Boca S, Freedman ND, Caporaso NE, Huang WY, Sinha R, et al. Metabolites of tobacco smoking and colorectal cancer risk. *Carcinogenesis*. julio de 2014;35(7):1516-22.
76. Cai S, Li Y, Ding Y, Chen K, Jin M. Alcohol drinking and the risk of colorectal cancer death: a meta-analysis. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP*. noviembre de 2014;23(6):532-9.
77. Harnack L, Jacobs DR, Nicodemus K, Lazovich D, Anderson K, Folsom AR. Relationship of folate, vitamin B-6, vitamin B-12, and methionine intake to incidence of colorectal cancers. *Nutr Cancer*. 2002;43(2):152-8.
78. Moreno CC, Mittal PK, Sullivan PS, Rutherford R, Staley CA, Cardona K, et al. Colorectal Cancer Initial Diagnosis: Screening Colonoscopy, Diagnostic Colonoscopy, or Emergent Surgery, and Tumor Stage and Size at Initial Presentation. *Clin Colorectal Cancer*. marzo de 2016;15(1):67-73.
79. Hamilton W, Round A, Sharp D, Peters TJ. Clinical features of colorectal cancer before diagnosis: a population-based case-control study. *Br J Cancer*. 22 de agosto de 2005;93(4):399-405.
80. Saidi HS, Karuri D, Nyaim EO. Correlation of clinical data, anatomical site and disease stage in colorectal cancer. *East Afr Med J*. junio de 2008;85(6):259-62.
81. Scheppach W, Bresalier RS, Tytgat GNJ, editores. *Gastrointestinal and Liver Tumors* [Internet]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2004 [citado 14 de noviembre de 2019]. Disponible en: <https://www.springer.com/gp/book/9783642622076>
82. Thompson MR, O'Leary DP, Flashman K, Asiimwe A, Ellis BG, Senapati A. Clinical assessment to determine the risk of bowel cancer using Symptoms, Age, Mass and Iron deficiency anaemia (SAMI). *Br J Surg*. septiembre de 2017;104(10):1393-404.

Bibliografía

83. Carlsson G, Petrelli NJ, Nava H, Herrera L, Mittelman A. The value of colonoscopic surveillance after curative resection for colorectal cancer or synchronous adenomatous polyps. *Arch Surg Chic Ill 1960*. noviembre de 1987;122(11):1261-3.
84. O'Brien MJ, Winawer SJ, Zauber AG, Gottlieb LS, Sternberg SS, Diaz B, et al. The National Polyp Study. Patient and polyp characteristics associated with high-grade dysplasia in colorectal adenomas. *Gastroenterology*. febrero de 1990;98(2):371-9.
85. Rex DK, Ahnen DJ, Baron JA, Batts KP, Burke CA, Burt RW, et al. Serrated lesions of the colorectum: review and recommendations from an expert panel. *Am J Gastroenterol*. septiembre de 2012;107(9):1315-29; quiz 1314, 1330.
86. Snover DC, Jass JR, Fenoglio-Preiser C, Batts KP. Serrated polyps of the large intestine: a morphologic and molecular review of an evolving concept. *Am J Clin Pathol*. septiembre de 2005;124(3):380-91.
87. Weston AP, Campbell DR. Diminutive colonic polyps: histopathology, spatial distribution, concomitant significant lesions, and treatment complications. *Am J Gastroenterol*. enero de 1995;90(1):24-8.
88. Higuchi T, Sugihara K, Jass JR. Demographic and pathological characteristics of serrated polyps of colorectum. *Histopathology*. julio de 2005;47(1):32-40.
89. Guarinos C, Sánchez-Fortún C, Rodríguez-Soler M, Pérez-Carbonell L, Egoavil C, Juárez M, et al. Clinical subtypes and molecular characteristics of serrated polyposis syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. junio de 2013;11(6):705-11; quiz e46.
90. Davila RE, Rajan E, Baron TH, Adler DG, Egan JV, Faigel DO, et al. ASGE guideline: colorectal cancer screening and surveillance. *Gastrointest Endosc*. abril de 2006;63(4):546-57.
91. O'Brien MJ. Hyperplastic and serrated polyps of the colorectum. *Gastroenterol Clin North Am*. diciembre de 2007;36(4):947-68, viii.
92. Arain MA, Sawhney M, Sheikh S, Anway R, Thyagarajan B, Bond JH, et al. CIMP status of interval colon cancers: another piece to the puzzle. *Am J Gastroenterol*. mayo de 2010;105(5):1189-95.
93. Carballal S, Moreira L, Balaguer F. Serrated polyps and serrated polyposis syndrome. *Cirugia Espanola*. marzo de 2013;91(3):141-8.
94. Arévalo F, Aragón V, Alva J, Pérez Narrea M, Cerrillo G, Montes P, et al. Colorectal polyps: update on diagnosis. *Rev Gastroenterol Peru Organo Of Soc Gastroenterol Peru*. junio de 2012;32(2):123-33.
95. Burt RW, DiSario JA, Cannon-Albright L. Genetics of colon cancer: impact of inheritance on colon cancer risk. *Annu Rev Med*. 1995;46:371-9.
96. Gala M, Chung DC. Hereditary colon cancer syndromes. *Semin Oncol*. agosto de 2011;38(4):490-9.
97. Jo WS, Chung DC. Genetics of hereditary colorectal cancer. *Semin Oncol*. febrero de 2005;32(1):11-23.

Bibliografía

98. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 de diciembre de 2008;26(35):5783-8.
99. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*. 6 de marzo de 2003;348(10):919-32.
100. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*. 18 de febrero de 2004;96(4):261-8.
101. Porkka N, Lahtinen L, Ahtiainen M, Böhm JP, Kuopio T, Eldfors S, et al. Epidemiological, clinical and molecular characterization of Lynch-like syndrome: A population-based study. *Int J Cancer*. 1 de julio de 2019;145(1):87-98.
102. Guanti G, Bukvić N. Hereditary colorectal cancer syndromes. *Acta Chir Iugosl*. 2000;47(4 Suppl 1):23-5.
103. Half E, Bercovich D, Rozen P. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis*. 12 de octubre de 2009;4:22.
104. Sánchez de Abajo A, Caldés Llopis T. Poliposis asociada al gen MYH. *Gastroenterol Hepatol Contin*. 1 de julio de 2009;8(4):210-4.
105. Grover S, Kastrinos F, Steyerberg EW, Cook EF, Dewanwala A, Burbidge LA, et al. Prevalence and phenotypes of APC and MUTYH mutations in patients with multiple colorectal adenomas. *JAMA*. 1 de agosto de 2012;308(5):485-92.
106. Theodoratou E, Campbell H, Tenesa A, Houlston R, Webb E, Lubbe S, et al. A large-scale meta-analysis to refine colorectal cancer risk estimates associated with MUTYH variants. *Br J Cancer*. 7 de diciembre de 2010;103(12):1875-84.
107. Castells A, Castellví-Bel S, Balaguer F. Concepts in familial colorectal cancer: where do we stand and what is the future? *Gastroenterology*. agosto de 2009;137(2):404-9.
108. Sanabria MC, Umaña A, Serrano ML, Sánchez M, Mesa J, Hernández GA. Vías de carcinogénesis colorrectal y sus implicaciones clínicas. *Rev Colomb Cancerol*. 1 de enero de 2012;16(3):170-81.
109. Noffsinger AE. Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:343-64.
110. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1 de septiembre de 1988;319(9):525-32.
111. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, et al. Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primer*. 05 de 2015;1:15065.
112. Scholer-Dahirel A, Schlabach MR, Loo A, Bagdasarian L, Meyer R, Guo R, et al. Maintenance of adenomatous polyposis coli (APC)-mutant colorectal cancer is dependent on Wnt/beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 11 de octubre de 2011;108(41):17135-40.

Bibliografía

113. Haigis KM, Kendall KR, Wang Y, Cheung A, Haigis MC, Glickman JN, et al. Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nat Genet.* mayo de 2008;40(5):600-8.
114. Herbst A, Bommer GT, Kriegl L, Jung A, Behrens A, Csanadi E, et al. ITF-2 is disrupted via allelic loss of chromosome 18q21, and ITF-2B expression is lost at the adenoma-carcinoma transition. *Gastroenterology.* agosto de 2009;137(2):639-48, 648.e1-9.
115. Langeveld D, van Hattem WA, de Leng WWJ, Morsink FH, Ten Kate FJW, Giardiello FM, et al. SMAD4 immunohistochemistry reflects genetic status in juvenile polyposis syndrome. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 de agosto de 2010;16(16):4126-34.
116. Kamada R, Nomura T, Anderson CW, Sakaguchi K. Cancer-associated p53 tetramerization domain mutants: quantitative analysis reveals a low threshold for tumor suppressor inactivation. *J Biol Chem.* 7 de enero de 2011;286(1):252-8.
117. Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S, Willson JK, Parsons RE, Jen J, et al. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat Genet.* enero de 1995;9(1):48-55.
118. Morán A, Ortega P, de Juan C, Fernández-Marcelo T, Frías C, Sánchez-Pernaute A, et al. Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol.* 15 de marzo de 2010;2(3):151-8.
119. Kim IJ, Kang HC, Park JH, Shin Y, Ku JL, Lim SB, et al. Development and applications of a beta-catenin oligonucleotide microarray: beta-catenin mutations are dominantly found in the proximal colon cancers with microsatellite instability. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 de agosto de 2003;9(8):2920-5.
120. Souza RF, Wang S, Thakar M, Smolinski KN, Yin J, Zou TT, et al. Expression of the wild-type insulin-like growth factor II receptor gene suppresses growth and causes death in colorectal carcinoma cells. *Oncogene.* 15 de julio de 1999;18(28):4063-8.
121. Yashiro M, Hirakawa K, Boland CR. Mutations in TGFbeta-RII and BAX mediate tumor progression in the later stages of colorectal cancer with microsatellite instability. *BMC Cancer.* 18 de junio de 2010;10:303.
122. Samowitz WS, Holden JA, Curtin K, Edwards SL, Walker AR, Lin HA, et al. Inverse relationship between microsatellite instability and K-ras and p53 gene alterations in colon cancer. *Am J Pathol.* abril de 2001;158(4):1517-24.
123. Jass JR, Smith M. Sialic acid and epithelial differentiation in colorectal polyps and cancer--a morphological, mucin and lectin histochemical study. *Pathology (Phila).* octubre de 1992;24(4):233-42.
124. Sebolt-Leopold JS, Herrera R. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer.* diciembre de 2004;4(12):937-47.
125. Mäkinen MJ. Colorectal serrated adenocarcinoma. *Histopathology.* enero de 2007;50(1):131-50.

Bibliografía

126. Leggett B, Whitehall V. Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*. junio de 2010;138(6):2088-100.
127. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 20 de julio de 1999;96(15):8681-6.
128. Yamane L, Scapulatempo-Neto C, Reis RM, Guimarães DP. Serrated pathway in colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 14 de marzo de 2014;20(10):2634-40.
129. Laiho P, Kokko A, Vanharanta S, Salovaara R, Sammalkorpi H, Järvinen H, et al. Serrated carcinomas form a subclass of colorectal cancer with distinct molecular basis. *Oncogene*. 11 de enero de 2007;26(2):312-20.
130. García-Solano J, Pérez-Guillermo M, Conesa-Zamora P, Acosta-Ortega J, Trujillo-Santos J, Cerezuola-Fuentes P, et al. Clinicopathologic study of 85 colorectal serrated adenocarcinomas: further insights into the full recognition of a new subset of colorectal carcinoma. *Hum Pathol*. octubre de 2010;41(10):1359-68.
131. García-Solano J, Conesa-Zamora P, Trujillo-Santos J, Mäkinen MJ, Pérez-Guillermo M. Tumour budding and other prognostic pathological features at invasive margins in serrated colorectal adenocarcinoma: a comparative study with conventional carcinoma. *Histopathology*. diciembre de 2011;59(6):1046-56.
132. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science*. 6 de diciembre de 1996;274(5293):1672-7.
133. Houlston RS. What we could do now: molecular pathology of colorectal cancer. *Mol Pathol MP*. agosto de 2001;54(4):206-14.
134. Takayama T, Ohi M, Hayashi T, Miyanishi K, Nobuoka A, Nakajima T, et al. Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology*. septiembre de 2001;121(3):599-611.
135. Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, Kukitsu T, Takanashi K, Ishiwatari H, et al. Aberrant crypt foci: detection, gene abnormalities, and clinical usefulness. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. julio de 2005;3(7 Suppl 1):S42-45.
136. Pretlow TP, Brasitus TA, Fulton NC, Cheyer C, Kaplan EL. K-ras mutations in putative preneoplastic lesions in human colon. *J Natl Cancer Inst*. 15 de diciembre de 1993;85(24):2004-7.
137. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(6):459-65.
138. Harada K, Hiraoka S, Kato J, Horii J, Fujita H, Sakaguchi K, et al. Genetic and epigenetic alterations of Ras signalling pathway in colorectal neoplasia: analysis based on tumour clinicopathological features. *Br J Cancer*. 19 de noviembre de 2007;97(10):1425-31.
139. Tosi F, Magni E, Amatu A, Mauri G, Bencardino K, Truini M, et al. Effect of KRAS and BRAF Mutations on Survival of Metastatic Colorectal Cancer After Liver Resection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Colorectal Cancer*. 2017;16(3):e153-63.

Bibliografía

140. Russo A, Bazan V, Agnese V, Rodolico V, Gebbia N. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer: Kirsten Ras in CRC (RASCAL) and TP53CRC collaborative studies. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. mayo de 2005;16 Suppl 4:iv44-49.
141. Modest DP, Ricard I, Heinemann V, Hegewisch-Becker S, Schmiegel W, Porschen R, et al. Outcome according to KRAS-, NRAS- and BRAF-mutation as well as KRAS mutation variants: pooled analysis of five randomized trials in metastatic colorectal cancer by the AIO colorectal cancer study group. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2016;27(9):1746-53.
142. Caputo F, Santini C, Bardasi C, Cerma K, Casadei-Gardini A, Spallanzani A, et al. BRAF-Mutated Colorectal Cancer: Clinical and Molecular Insights. *Int J Mol Sci*. 28 de octubre de 2019;20(21).
143. Wang J, Shen J, Huang C, Cao M, Shen L. Clinicopathological Significance of BRAFV600E Mutation in Colorectal Cancer: An Updated Meta-Analysis. *J Cancer*. 2019;10(10):2332-41.
144. Tsilimigras DI, Ntanasis-Stathopoulos I, Bagante F, Moris D, Cloyd J, Spartalis E, et al. Clinical significance and prognostic relevance of KRAS, BRAF, PI3K and TP53 genetic mutation analysis for resectable and unresectable colorectal liver metastases: A systematic review of the current evidence. *Surg Oncol*. junio de 2018;27(2):280-8.
145. Samowitz WS, Sweeney C, Herrick J, Albertsen H, Levin TR, Murtaugh MA, et al. Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers. *Cancer Res*. 15 de julio de 2005;65(14):6063-9.
146. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D, et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 de enero de 2010;28(3):466-74.
147. Spirio LN, Samowitz W, Robertson J, Robertson M, Burt RW, Leppert M, et al. Alleles of APC modulate the frequency and classes of mutations that lead to colon polyps. *Nat Genet*. diciembre de 1998;20(4):385-8.
148. Lamlum H, Ilyas M, Rowan A, Clark S, Johnson V, Bell J, et al. The type of somatic mutation at APC in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to Knudson's «two-hit» hypothesis. *Nat Med*. septiembre de 1999;5(9):1071-5.
149. Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell*. 13 de octubre de 2000;103(2):311-20.
150. Uthoff SM, Eichenberger MR, McAuliffe TL, Hamilton CJ, Galandiuk S. Wingless-type frizzled protein receptor signaling and its putative role in human colon cancer. *Mol Carcinog*. mayo de 2001;31(1):56-62.
151. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*. 21 de marzo de 1997;275(5307):1787-90.
152. Kim PJ, Plescia J, Clevers H, Fearon ER, Altieri DC. Survivin and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Lancet Lond Engl*. 19 de julio de 2003;362(9379):205-9.

Bibliografía

153. Garcia-Foncillas J (Jesús), Salgado E (e), Zarate R (Ruth), Zabalegui M (m), Bandres E (Eva), García F (f), et al. Carcinogénesis colónica: proceso de transformación neoplásica. 2003 [citado 8 de enero de 2020]; Disponible en: <http://dadun.unav.edu/handle/10171/39676>
154. Brocardo M, Lei Y, Tighe A, Taylor SS, Mok MTS, Henderson BR. Mitochondrial targeting of adenomatous polyposis coli protein is stimulated by truncating cancer mutations: regulation of Bcl-2 and implications for cell survival. *J Biol Chem.* 29 de febrero de 2008;283(9):5950-9.
155. Zhang L, Theodoropoulos PC, Eskiocak U, Wang W, Moon YA, Posner B, et al. Selective targeting of mutant adenomatous polyposis coli (APC) in colorectal cancer. *Sci Transl Med.* 19 de 2016;8(361):361ra140.
156. Aghagolzadeh P, Radpour R. New trends in molecular and cellular biomarker discovery for colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 7 de julio de 2016;22(25):5678-93.
157. Ilyas M, Straub J, Tomlinson IP, Bodmer WF. Genetic pathways in colorectal and other cancers. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. diciembre de 1999;35(14):1986-2002.
158. Kirsch DG, Kastan MB. Tumor-suppressor p53: implications for tumor development and prognosis. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* septiembre de 1998;16(9):3158-68.
159. Thiagalingam S, Lengauer C, Leach FS, Schutte M, Hahn SA, Overhauser J, et al. Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nat Genet.* julio de 1996;13(3):343-6.
160. Popat S, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of the relationship between chromosome 18q genotype, DCC status and colorectal cancer prognosis. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. septiembre de 2005;41(14):2060-70.
161. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science.* 2 de junio de 1995;268(5215):1336-8.
162. Itatani Y, Kawada K, Sakai Y. Transforming Growth Factor- β Signaling Pathway in Colorectal Cancer and Its Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci.* 20 de noviembre de 2019;20(23).
163. Chung DC, Rustgi AK. DNA mismatch repair and cancer. *Gastroenterology.* noviembre de 1995;109(5):1685-99.
164. Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, et al. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science.* 18 de marzo de 1994;263(5153):1625-9.
165. Shibata D, Peinado MA, Ionov Y, Malkhosyan S, Perucho M. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nat Genet.* marzo de 1994;6(3):273-81.
166. Fujiwara T, Stolker JM, Watanabe T, Rashid A, Longo P, Eshleman JR, et al. Accumulated clonal genetic alterations in familial and sporadic colorectal carcinomas with

Bibliografía

- widespread instability in microsatellite sequences. *Am J Pathol.* octubre de 1998;153(4):1063-78.
167. Hatch SB, Lightfoot HM, Garwacki CP, Moore DT, Calvo BF, Woosley JT, et al. Microsatellite instability testing in colorectal carcinoma: choice of markers affects sensitivity of detection of mismatch repair-deficient tumors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 de marzo de 2005;11(6):2180-7.
 168. de la Chapelle A, Hampel H. Clinical relevance of microsatellite instability in colorectal cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 de julio de 2010;28(20):3380-7.
 169. Gelsomino F, Barbolini M, Spallanzani A, Pugliese G, Cascinu S. The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: A review. *Cancer Treat Rev.* diciembre de 2016;51:19-26.
 170. Schwitalle Y, Kloor M, Eiermann S, Linnebacher M, Kienle P, Knaebel HP, et al. Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. *Gastroenterology.* abril de 2008;134(4):988-97.
 171. Hamelin R, Chalastanis A, Colas C, El Bchiri J, Mercier D, Schreurs AS, et al. Clinical and molecular consequences of microsatellite instability in human cancers. *Bull Cancer (Paris).* enero de 2008;95(1):121-32.
 172. Malesci A, Laghi L, Bianchi P, Delconte G, Randolph A, Torri V, et al. Reduced likelihood of metastases in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 de julio de 2007;13(13):3831-9.
 173. Raut CP, Pawlik TM, Rodriguez-Bigas MA. Clinicopathologic features in colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Mutat Res.* 21 de diciembre de 2004;568(2):275-82.
 174. Haugen AC, Goel A, Yamada K, Marra G, Nguyen TP, Nagasaka T, et al. Genetic instability caused by loss of MutS homologue 3 in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 15 de octubre de 2008;68(20):8465-72.
 175. Halford SER, Sawyer EJ, Lambros MB, Gorman P, Macdonald ND, Talbot IC, et al. MSI-low, a real phenomenon which varies in frequency among cancer types. *J Pathol.* noviembre de 2003;201(3):389-94.
 176. Zavoral M, Suchanek S, Majek O, Fric P, Minarikova P, Minarik M, et al. Colorectal cancer screening: 20 years of development and recent progress. *World J Gastroenterol.* 14 de abril de 2014;20(14):3825-34.
 177. Bray C, Bell LN, Liang H, Collins D, Yale SH. Colorectal Cancer Screening. *WMJ Off Publ State Med Soc Wis.* 2017;116(1):27-33.
 178. US Preventive Services Task Force, Bibbins-Domingo K, Grossman DC, Curry SJ, Davidson KW, Epling JW, et al. Screening for Colorectal Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA.* 21 de junio de 2016;315(23):2564-75.
 179. Wilt TJ, Harris RP, Qaseem A, High Value Care Task Force of the American College of Physicians. Screening for cancer: advice for high-value care from the American College of Physicians. *Ann Intern Med.* 19 de mayo de 2015;162(10):718-25.

Bibliografía

180. Issa IA, Nouredine M. Colorectal cancer screening: An updated review of the available options. *World J Gastroenterol*. 28 de julio de 2017;23(28):5086-96.
181. 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;5:1-22.
182. Lin JS, Piper MA, Perdue LA, Rutter CM, Webber EM, O'Connor E, et al. Screening for Colorectal Cancer: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *JAMA*. 21 de junio de 2016;315(23):2576-94.
183. Guittet L, Bouvier V, Mariotte N, Vallee JP, Levillain R, Tichet J, et al. Comparison of a guaiac and an immunochemical faecal occult blood test for the detection of colonic lesions according to lesion type and location. *Br J Cancer*. 21 de abril de 2009;100(8):1230-5.
184. Cubiella J, Marzo-Castillejo M, Mascort-Roca JJ, Amador-Romero FJ, Bellas-Beceiro B, Clofent-Vilaplana J, et al. Clinical practice guideline. Diagnosis and prevention of colorectal cancer. 2018 Update. *Gastroenterol Hepatol*. noviembre de 2018;41(9):585-96.
185. Rex DK, Schoenfeld PS, Cohen J, Pike IM, Adler DG, Fennerty MB, et al. Quality indicators for colonoscopy. *Gastrointest Endosc*. enero de 2015;81(1):31-53.
186. Shaukat A, Mongin SJ, Geisser MS, Lederle FA, Bond JH, Mandel JS, et al. Long-term mortality after screening for colorectal cancer. *N Engl J Med*. 19 de septiembre de 2013;369(12):1106-14.
187. Dhaliwal A, Vlachostergios PJ, Oikonomou KG, Moshenyat Y. Fecal DNA testing for colorectal cancer screening: Molecular targets and perspectives. *World J Gastrointest Oncol*. 15 de octubre de 2015;7(10):178-83.
188. Ahlquist DA. Multi-target stool DNA test: a new high bar for noninvasive screening. *Dig Dis Sci*. marzo de 2015;60(3):623-33.
189. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Levin TR, Lavin P, Lidgard GP, et al. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *N Engl J Med*. 3 de abril de 2014;370(14):1287-97.
190. Lofton-Day C, Model F, Devos T, Tetzner R, Distler J, Schuster M, et al. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clin Chem*. febrero de 2008;54(2):414-23.
191. Han M, Liew CT, Zhang HW, Chao S, Zheng R, Yip KT, et al. Novel blood-based, five-gene biomarker set for the detection of colorectal cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 de enero de 2008;14(2):455-60.
192. Marshall KW, Mohr S, Khettabi FE, Nossova N, Chao S, Bao W, et al. A blood-based biomarker panel for stratifying current risk for colorectal cancer. *Int J Cancer*. 1 de marzo de 2010;126(5):1177-86.
193. Eche N, Pichon MF, Quillien V, Gory-Delabaere G, Riedinger JM, Basuyau JP, et al. Standards, options and recommendations for tumor markers in colorectal cancer. *Bull Cancer (Paris)*. diciembre de 2001;88(12):1177-206.

Bibliografía

194. Ma CJ, Hsieh JS, Wang WM, Su YC, Huang CJ, Huang TJ, et al. Multivariate analysis of prognostic determinants for colorectal cancer patients with high preoperative serum CEA levels: prognostic value of postoperative serum CEA levels. *Kaohsiung J Med Sci*. diciembre de 2006;22(12):604-9.
195. Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 de noviembre de 2006;24(33):5313-27.
196. Liu Z, Zhang Y, Niu Y, Li K, Liu X, Chen H, et al. A systematic review and meta-analysis of diagnostic and prognostic serum biomarkers of colorectal cancer. *PLoS One*. 2014;9(8):e103910.
197. Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Klapdor R, Lamerz R, et al. Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. abril de 2003;39(6):718-27.
198. van de Velde CJH, Boelens PG, Tanis PJ, Espin E, Mroczkowski P, Naredi P, et al. Experts reviews of the multidisciplinary consensus conference colon and rectal cancer 2012: science, opinions and experiences from the experts of surgery. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol*. abril de 2014;40(4):454-68.
199. Quirke P, West NP, Nagtegaal ID. EURECCA consensus conference highlights about colorectal cancer clinical management: the pathologists expert review. *Virchows Arch Int J Pathol*. febrero de 2014;464(2):129-34.
200. Breugom AJ, Boelens PG, van den Broek CBM, Cervantes A, Van Cutsem E, Schmol HJ, et al. Quality assurance in the treatment of colorectal cancer: the EURECCA initiative. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. agosto de 2014;25(8):1485-92.
201. Goldenberg BA, Holliday EB, Helewa RM, Singh H. Rectal Cancer in 2018: A Primer for the Gastroenterologist. *Am J Gastroenterol*. 2018;113(12):1763-71.
202. van Gijn W, Marijnen CAM, Nagtegaal ID, Kranenbarg EMK, Putter H, Wiggers T, et al. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12-year follow-up of the multicentre, randomised controlled TME trial. *Lancet Oncol*. junio de 2011;12(6):575-82.
203. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkau R, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med*. 21 de octubre de 2004;351(17):1731-40.
204. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Mosconi S, Mandalà M, Cervantes A, et al. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. octubre de 2013;24 Suppl 6:vi64-72.
205. Glimelius B, Tiret E, Cervantes A, Arnold D, ESMO Guidelines Working Group. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. octubre de 2013;24 Suppl 6:vi81-88.
206. Van Cutsem E, Cervantes A, Nordlinger B, Arnold D, ESMO Guidelines Working Group. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. septiembre de 2014;25 Suppl 3:iii1-9.

Bibliografía

207. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 12 de septiembre de 2013;369(11):1023-34.
208. García-Castillo V, Sanhueza E, McNerney E, Onate SA, García A. Microbiota dysbiosis: a new piece in the understanding of the carcinogenesis puzzle. *J Med Microbiol*. diciembre de 2016;65(12):1347-62.
209. Xu K, Jiang B. Analysis of Mucosa-Associated Microbiota in Colorectal Cancer. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 14 de septiembre de 2017;23:4422-30.
210. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 4 de marzo de 2010;464(7285):59-65.
211. Dethlefsen L, Eckburg PB, Bik EM, Relman DA. Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol Evol*. septiembre de 2006;21(9):517-23.
212. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep*. julio de 2006;7(7):688-93.
213. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 13 de junio de 2012;486(7402):207-14.
214. Tap J, Mondot S, Levenez F, Pelletier E, Caron C, Furet JP, et al. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ Microbiol*. octubre de 2009;11(10):2574-84.
215. Schloissnig S, Arumugam M, Sunagawa S, Mitreva M, Tap J, Zhu A, et al. Genomic variation landscape of the human gut microbiome. *Nature*. 3 de enero de 2013;493(7430):45-50.
216. Franks AH, Harmsen HJ, Raangs GC, Jansen GJ, Schut F, Welling GW. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol*. septiembre de 1998;64(9):3336-45.
217. Harmsen HJM, Raangs GC, He T, Degener JE, Welling GW. Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol*. junio de 2002;68(6):2982-90.
218. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*. 8 de junio de 2012;336(6086):1268-73.
219. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Verstraelen H, Osowska S, Doerffel Y. Biostructure of fecal microbiota in healthy subjects and patients with chronic idiopathic diarrhea. *Gastroenterology*. agosto de 2008;135(2):568-79.
220. Gagnière J, Raisch J, Veziat J, Barnich N, Bonnet R, Buc E, et al. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 14 de enero de 2016;22(2):501-18.

Bibliografía

221. Koropatkin NM, Cameron EA, Martens EC. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol.* 11 de abril de 2012;10(5):323-35.
222. Nistal E, Fernández-Fernández N, Vivas S, Olcoz JL. Factors Determining Colorectal Cancer: The Role of the Intestinal Microbiota. *Front Oncol.* 2015;5:220.
223. Louis P, Hold GL, Flint HJ. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat Rev Microbiol.* octubre de 2014;12(10):661-72.
224. Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology.* enero de 2009;136(1):65-80.
225. Fukuda S, Toh H, Taylor TD, Ohno H, Hattori M. Acetate-producing bifidobacteria protect the host from enteropathogenic infection via carbohydrate transporters. *Gut Microbes.* octubre de 2012;3(5):449-54.
226. O' Shea EF, O' Connor PM, Raftis EJ, O' Toole PW, Stanton C, Cotter PD, et al. Subspecies diversity in bacteriocin production by intestinal *Lactobacillus salivarius* strains. *Gut Microbes.* octubre de 2012;3(5):468-73.
227. Keeney KM, Finlay BB. Enteric pathogen exploitation of the microbiota-generated nutrient environment of the gut. *Curr Opin Microbiol.* febrero de 2011;14(1):92-8.
228. Cryan JF, O'Mahony SM. The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behavior. *Neurogastroenterol Motil Off J Eur Gastrointest Motil Soc.* marzo de 2011;23(3):187-92.
229. Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature.* 13 de septiembre de 2012;489(7415):231-41.
230. Lucas C, Barnich N, Nguyen HTT. Microbiota, Inflammation and Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 20 de junio de 2017;18(6).
231. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 19 de marzo de 2010;140(6):805-20.
232. Salzman NH, Underwood MA, Bevins CL. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin Immunol.* abril de 2007;19(2):70-83.
233. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell.* 23 de julio de 2004;118(2):229-41.
234. Kayama H, Takeda K. Functions of innate immune cells and commensal bacteria in gut homeostasis. *J Biochem (Tokyo).* febrero de 2016;159(2):141-9.
235. Zeng B, Shi S, Ashworth G, Dong C, Liu J, Xing F. ILC3 function as a double-edged sword in inflammatory bowel diseases. *Cell Death Dis.* 08 de 2019;10(4):315.
236. Schnupf P, Gaboriau-Routhiau V, Cerf-Bensussan N. Host interactions with segmented filamentous bacteria: an unusual trade-off that drives the post-natal maturation of the gut immune system. *Semin Immunol.* 30 de noviembre de 2013;25(5):342-51.

Bibliografía

237. Singh N, Gurav A, Sivaprakasam S, Brady E, Padia R, Shi H, et al. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity*. 16 de enero de 2014;40(1):128-39.
238. Faith JJ, Guruge JL, Charbonneau M, Subramanian S, Seedorf H, Goodman AL, et al. The long-term stability of the human gut microbiota. *Science*. 5 de julio de 2013;341(6141):1237-43.
239. Candela M, Biagi E, Maccaferri S, Turrone S, Brigidi P. Intestinal microbiota is a plastic factor responding to environmental changes. *Trends Microbiol.* agosto de 2012;20(8):385-91.
240. Candela M, Biagi E, Turrone S, Maccaferri S, Figini P, Brigidi P. Dynamic efficiency of the human intestinal microbiota. *Crit Rev Microbiol.* junio de 2015;41(2):165-71.
241. Walker AW, Ince J, Duncan SH, Webster LM, Holtrop G, Ze X, et al. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J.* febrero de 2011;5(2):220-30.
242. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*. 7 de octubre de 2011;334(6052):105-8.
243. Jalanka-Tuovinen J, Salonen A, Nikkilä J, Immonen O, Kekkonen R, Lahti L, et al. Intestinal microbiota in healthy adults: temporal analysis reveals individual and common core and relation to intestinal symptoms. *PLoS One*. 2011;6(7):e23035.
244. Ohnmacht C, Marques R, Presley L, Sawa S, Lochner M, Eberl G. Intestinal microbiota, evolution of the immune system and the bad reputation of pro-inflammatory immunity. *Cell Microbiol.* mayo de 2011;13(5):653-9.
245. Koren O, Goodrich JK, Cullender TC, Spor A, Laitinen K, Bäckhed HK, et al. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell*. 3 de agosto de 2012;150(3):470-80.
246. Biagi E, Candela M, Fairweather-Tait S, Franceschi C, Brigidi P. Aging of the human metaorganism: the microbial counterpart. *Age Dordr Neth.* febrero de 2012;34(1):247-67.
247. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimaraes V, Sokol H, Doré J, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol.* 9 de junio de 2009;9:123.
248. Cani PD, Osto M, Geurts L, Everard A. Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut Microbes.* agosto de 2012;3(4):279-88.
249. Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol.* 18 de noviembre de 2008;6(11):e280.
250. Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiol Read Engl.* noviembre de 2010;156(Pt 11):3216-23.

Bibliografía

251. Mäkivuokko H, Tiihonen K, Tynkkynen S, Paulin L, Rautonen N. The effect of age and non-steroidal anti-inflammatory drugs on human intestinal microbiota composition. *Br J Nutr.* enero de 2010;103(2):227-34.
252. Garrett WS. Cancer and the microbiota. *Science.* 3 de abril de 2015;348(6230):80-6.
253. Arslan N. Obesity, fatty liver disease and intestinal microbiota. *World J Gastroenterol.* 28 de noviembre de 2014;20(44):16452-63.
254. Zackular JP, Baxter NT, Iverson KD, Sadler WD, Petrosino JF, Chen GY, et al. The gut microbiome modulates colon tumorigenesis. *mBio.* 5 de noviembre de 2013;4(6):e00692-00613.
255. Schwabe RF, Jobin C. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer.* noviembre de 2013;13(11):800-12.
256. Sheflin AM, Whitney AK, Weir TL. Cancer-promoting effects of microbial dysbiosis. *Curr Oncol Rep.* octubre de 2014;16(10):406.
257. Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88. *Science.* 6 de julio de 2007;317(5834):124-7.
258. Irrazábal T, Belcheva A, Girardin SE, Martin A, Philpott DJ. The multifaceted role of the intestinal microbiota in colon cancer. *Mol Cell.* 24 de abril de 2014;54(2):309-20.
259. Hu B, Elinav E, Huber S, Strowig T, Hao L, Hafemann A, et al. Microbiota-induced activation of epithelial IL-6 signaling links inflammasome-driven inflammation with transmissible cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11 de junio de 2013;110(24):9862-7.
260. Kostic AD, Chun E, Meyerson M, Garrett WS. Microbes and inflammation in colorectal cancer. *Cancer Immunol Res.* septiembre de 2013;1(3):150-7.
261. Petersen C, Round JL. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell Microbiol.* julio de 2014;16(7):1024-33.
262. Arthur JC, Perez-Chanona E, Mühlbauer M, Tomkovich S, Uronis JM, Fan TJ, et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science.* 5 de octubre de 2012;338(6103):120-3.
263. Francescone R, Hou V, Grivennikov SI. Microbiome, inflammation, and cancer. *Cancer J Sudbury Mass.* junio de 2014;20(3):181-9.
264. Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, Hu B, Jin C, Flavell RA. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer.* noviembre de 2013;13(11):759-71.
265. Schwitalla S, Fingerle AA, Cammareri P, Nebelsiek T, Göktuna SI, Ziegler PK, et al. Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell.* 17 de enero de 2013;152(1-2):25-38.
266. Rubinstein MR, Wang X, Liu W, Hao Y, Cai G, Han YW. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe.* 14 de agosto de 2013;14(2):195-206.

Bibliografía

267. Zamani S, Taslimi R, Sarabi A, Jasemi S, Sechi LA, Feizabadi MM. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: A Possible Etiological Candidate for Bacterially-Induced Colorectal Precancerous and Cancerous Lesions. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:449.
268. Faïs T, Delmas J, Barnich N, Bonnet R, Dalmasso G. Colibactin: More Than a New Bacterial Toxin. *Toxins*. 10 de 2018;10(4).
269. Stone TW, Darlington LG. Microbial carcinogenic toxins and dietary anti-cancer protectants. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2017;74(14):2627-43.
270. Moldogazieva NT, Lutsenko SV, Terentiev AA. Reactive Oxygen and Nitrogen Species-Induced Protein Modifications: Implication in Carcinogenesis and Anticancer Therapy. *Cancer Res*. 01 de 2018;78(21):6040-7.
271. Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther*. 15 de enero de 2008;27(2):104-19.
272. Shen XJ, Rawls JF, Randall T, Burcal L, Mpande CN, Jenkins N, et al. Molecular characterization of mucosal adherent bacteria and associations with colorectal adenomas. *Gut Microbes*. junio de 2010;1(3):138-47.
273. Sanapareddy N, Legge RM, Jovov B, McCoy A, Burcal L, Araujo-Perez F, et al. Increased rectal microbial richness is associated with the presence of colorectal adenomas in humans. *ISME J*. octubre de 2012;6(10):1858-68.
274. 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*. febrero de 2012;22(2):299-306.
275. Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, Michaud M, Duke F, Earl AM, et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res*. febrero de 2012;22(2):292-8.
276. McCoy AN, Araújo-Pérez F, Azcárate-Peril A, Yeh JJ, Sandler RS, Keku TO. *Fusobacterium* is associated with colorectal adenomas. *PLoS One*. 2013;8(1):e53653.
277. Wu N, Yang X, Zhang R, Li J, Xiao X, Hu Y, et al. Dysbiosis signature of fecal microbiota in colorectal cancer patients. *Microb Ecol*. agosto de 2013;66(2):462-70.
278. 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*. junio de 2013;58(6):1717-26.
279. Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*. 9 de agosto de 2012;488(7410):178-84.
280. Candela M, Turrone S, Biagi E, Carbonero F, Rampelli S, Fiorentini C, et al. Inflammation and colorectal cancer, when microbiota-host mutualism breaks. *World J Gastroenterol*. 28 de enero de 2014;20(4):908-22.

Bibliografía

281. Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR, Dutilh BE. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat Rev Microbiol.* 25 de 2012;10(8):575-82.
282. Sears CL, Pardoll DM. Perspective: alpha-bugs, their microbial partners, and the link to colon cancer. *J Infect Dis.* 1 de febrero de 2011;203(3):306-11.
283. Marchesi JR, Dutilh BE, Hall N, Peters WHM, Roelofs R, Boleij A, et al. Towards the human colorectal cancer microbiome. *PloS One.* 2011;6(5):e20447.
284. Nosho K, Sukawa Y, Adachi Y, Ito M, Mitsuhashi K, Kurihara H, et al. Association of *Fusobacterium nucleatum* with immunity and molecular alterations in colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 14 de enero de 2016;22(2):557-66.
285. Strauss J, Kaplan GG, Beck PL, Rioux K, Panaccione R, Devinney R, et al. Invasive potential of gut mucosa-derived *Fusobacterium nucleatum* positively correlates with IBD status of the host. *Inflamm Bowel Dis.* septiembre de 2011;17(9):1971-8.
286. Dulal S, Keku TO. Gut microbiome and colorectal adenomas. *Cancer J Sudbury Mass.* junio de 2014;20(3):225-31.
287. Tahara T, Yamamoto E, Suzuki H, Maruyama R, Chung W, Garriga J, et al. *Fusobacterium* in colonic flora and molecular features of colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 1 de marzo de 2014;74(5):1311-8.
288. Kostic AD, Chun E, Robertson L, Glickman JN, Gallini CA, Michaud M, et al. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe.* 14 de agosto de 2013;14(2):207-15.
289. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* diciembre de 1977;74(12):5463-7.
290. Maxam AM, Gilbert W. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* 1980;65(1):499-560.
291. McCombie WR, McPherson JD, Mardis ER. Next-Generation Sequencing Technologies. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1 de noviembre de 2019;9(11).
292. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol.* 2018;122(1):e59.
293. Stein LD. The case for cloud computing in genome informatics. *Genome Biol.* 2010;11(5):207.
294. Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008;9:387-402.
295. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature.* 20 de julio de 2011;475(7356):348-52.
296. Turcatti G, Romieu A, Fedurco M, Tairi AP. A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. *Nucleic Acids Res.* marzo de 2008;36(4):e25.

Bibliografía

297. Fedurco M, Romieu A, Williams S, Lawrence I, Turcatti G. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic Acids Res.* 9 de febrero de 2006;34(3):e22.
298. Chaitankar V, Karakulah G, Ratnapriya R, Giuste FO, Brooks MJ, Swaroop A. Next generation sequencing technology and genomewide data analysis: Perspectives for retinal research. *Prog Retin Eye Res.* 2016;55:1-31.
299. Chen L, Liu P, Evans TC, Ettwiller LM. DNA damage is a pervasive cause of sequencing errors, directly confounding variant identification. *Science.* 17 de 2017;355(6326):752-6.
300. Eid J, Fehr A, Gray J, Luong K, Lyle J, Otto G, et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science.* 2 de enero de 2009;323(5910):133-8.
301. Rhoads A, Au KF. PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* octubre de 2015;13(5):278-89.
302. Zhang W, Sun Z, Menghe B, Zhang H. Short communication: Single molecule, real-time sequencing technology revealed species- and strain-specific methylation patterns of 2 *Lactobacillus* strains. *J Dairy Sci.* mayo de 2015;98(5):3020-4.
303. Clarke J, Wu HC, Jayasinghe L, Patel A, Reid S, Bayley H. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nat Nanotechnol.* abril de 2009;4(4):265-70.
304. Greninger AL, Naccache SN, Federman S, Yu G, Mbala P, Bres V, et al. Rapid metagenomic identification of viral pathogens in clinical samples by real-time nanopore sequencing analysis. *Genome Med.* 29 de septiembre de 2015;7:99.
305. Cao MD, Ganesamoorthy D, Elliott AG, Zhang H, Cooper MA, Coin LJM. Streaming algorithms for identification of pathogens and antibiotic resistance potential from real-time MinION(TM) sequencing. *GigaScience.* 26 de 2016;5(1):32.
306. Mardis ER. The Impact of Next-Generation Sequencing on Cancer Genomics: From Discovery to Clinic. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 3 de septiembre de 2019;9(9).
307. Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, Shen Y, Chen L, McGuire A, et al. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature.* 17 de abril de 2008;452(7189):872-6.
308. Ley TJ, Mardis ER, Ding L, Fulton B, McLellan MD, Chen K, et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature.* 6 de noviembre de 2008;456(7218):66-72.
309. Kernaleguen M, Daviaud C, Shen Y, Bonnet E, Renault V, Deleuze JF, et al. Whole-Genome Bisulfite Sequencing for the Analysis of Genome-Wide DNA Methylation and Hydroxymethylation Patterns at Single-Nucleotide Resolution. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2018;1767:311-49.
310. Buenrostro JD, Giresi PG, Zaba LC, Chang HY, Greenleaf WJ. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nat Methods.* diciembre de 2013;10(12):1213-8.

Bibliografía

311. Berger MF, Mardis ER. The emerging clinical relevance of genomics in cancer medicine. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(6):353-65.
312. Haber DA, Velculescu VE. Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Cancer Discov.* junio de 2014;4(6):650-61.
313. Khan KH, Cunningham D, Werner B, Vlachogiannis G, Spiteri I, Heide T, et al. Longitudinal Liquid Biopsy and Mathematical Modeling of Clonal Evolution Forecast Time to Treatment Failure in the PROSPECT-C Phase II Colorectal Cancer Clinical Trial. *Cancer Discov.* 2018;8(10):1270-85.
314. Hiergeist A, Gläsner J, Reischl U, Gessner A. Analyses of Intestinal Microbiota: Culture versus Sequencing. *ILAR J.* 2015;56(2):228-40.
315. Ticinesi A, Nouvenne A, Tana C, Prati B, Cerundolo N, Miraglia C, et al. The impact of intestinal microbiota on bio-medical research: definitions, techniques and physiology of a «new frontier». *Acta Bio-Medica Atenei Parm.* 17 de 2018;89(9-S):52-9.
316. Li J, Jia H, Cai X, Zhong H, Feng Q, Sunagawa S, et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol.* agosto de 2014;32(8):834-41.
317. Weinstock GM. Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature.* 13 de septiembre de 2012;489(7415):250-6.
318. Shreiner AB, Kao JY, Young VB. The gut microbiome in health and in disease. *Curr Opin Gastroenterol.* enero de 2015;31(1):69-75.
319. Lao VV, Grady WM. Epigenetics and colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 18 de octubre de 2011;8(12):686-700.
320. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet.* agosto de 2005;6(8):597-610.
321. Stevens M, Cheng JB, Li D, Xie M, Hong C, Maire CL, et al. Estimating absolute methylation levels at single-CpG resolution from methylation enrichment and restriction enzyme sequencing methods. *Genome Res.* septiembre de 2013;23(9):1541-53.
322. Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature.* 19 de noviembre de 2009;462(7271):315-22.
323. Laurent L, Wong E, Li G, Huynh T, Tsirigos A, Ong CT, et al. Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res.* marzo de 2010;20(3):320-31.
324. Krueger F, Kreck B, Franke A, Andrews SR. DNA methylome analysis using short bisulfite sequencing data. *Nat Methods.* 30 de enero de 2012;9(2):145-51.
325. Bock C, Tomazou EM, Brinkman A, Müller F, Simmer F, Gu H, et al. Genome-wide mapping of DNA methylation: a quantitative technology comparison. *Nat Biotechnol.* octubre de 2010;28(10):1106-14.
326. Nair SS, Coolen MW, Stirzaker C, Song JZ, Statham AL, Strbenac D, et al. Comparison of methyl-DNA immunoprecipitation (MeDIP) and methyl-CpG binding domain (MBD) protein

Bibliografía

- capture for genome-wide DNA methylation analysis reveal CpG sequence coverage bias. *Epigenetics*. enero de 2011;6(1):34-44.
327. Maunakea AK, Nagarajan RP, Bilenky M, Ballinger TJ, D'Souza C, Fouse SD, et al. Conserved Role of Intragenic DNA Methylation in Regulating Alternative Promoters. *Nature*. 8 de julio de 2010;466(7303):253-7.
328. Galán Ros J. Caracterización de la microbiota intestinal mediante "NGS" en patología neoplásica de colon [Internet]. UMU; 2015. Disponible en: <https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/45918/1/Tesis%20Jorge%20Gal%c3%a1n%20combinada.pdf>
329. Huertas López F. DNA methylation and metagenomic sequencing data integration in colorectal cancer study. [TFM en bioinformática]. Universidad de Murcia;
330. Redston M. Epithelial Neoplasms of the Large Intestine. En: Odze R, Goldblum J, editores. *Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract, and Pancreas (Second Edition)* [Internet]. Philadelphia: W.B. Saunders; 2009 [citado 31 de julio de 2023]. p. 597-637. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781416040590500266>
331. Bellizzi AM, Frankel WL. Colorectal cancer due to deficiency in DNA mismatch repair function: a review. *Adv Anat Pathol*. noviembre de 2009;16(6):405-17.
332. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res*. enero de 2013;41(1):e1.
333. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. 1 de diciembre de 2001;25(4):402-8.
334. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. marzo de 2015;65(2):87-108.
335. Sobhani I, Amiot A, Le Baleur Y, Levy M, Auriault ML, Van Nhieu JT, et al. Microbial dysbiosis and colon carcinogenesis: could colon cancer be considered a bacteria-related disease? *Ther Adv Gastroenterol*. mayo de 2013;6(3):215-29.
336. Ai D, Pan H, Li X, Gao Y, Liu G, Xia LC. Identifying Gut Microbiota Associated With Colorectal Cancer Using a Zero-Inflated Lognormal Model. *Front Microbiol*. 24 de abril de 2019;10:826.
337. Dai Z, Coker OO, Nakatsu G, Wu WKK, Zhao L, Chen Z, et al. Multi-cohort analysis of colorectal cancer metagenome identified altered bacteria across populations and universal bacterial markers. *Microbiome*. 11 de abril de 2018;6:70.
338. Silva M, Brunner V, Tschurtschenthaler M. Microbiota and Colorectal Cancer: From Gut to Bedside. *Front Pharmacol*. 2021;12:760280.
339. Saito K, Koido S, Odamaki T, Kajihara M, Kato K, Horiuchi S, et al. Metagenomic analyses of the gut microbiota associated with colorectal adenoma. *PLoS ONE*. 22 de febrero de 2019;14(2):e0212406.

Bibliografía

340. DeDecker L, Coppedge B, Avelar-Barragan J, Karnes W, Whiteson K. Microbiome distinctions between the CRC carcinogenic pathways. *Gut Microbes*. 2021;13(1):1854641.
341. Boleij A, van Gelder MMHJ, Swinkels DW, Tjalsma H. Clinical Importance of *Streptococcus gallolyticus* infection among colorectal cancer patients: systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. noviembre de 2011;53(9):870-8.
342. Kaplan CW, Lux R, Haake SK, Shi W. The *Fusobacterium nucleatum* outer membrane protein RadD is an arginine-inhibitable adhesin required for inter-species adherence and the structured architecture of multispecies biofilm. *Mol Microbiol*. enero de 2009;71(1):35-47.
343. Mira-Pascual L, Cabrera-Rubio R, Ocon S, Costales P, Parra A, Suarez A, et al. Microbial mucosal colonic shifts associated with the development of colorectal cancer reveal the presence of different bacterial and archaeal biomarkers. *J Gastroenterol*. febrero de 2015;50(2):167-79.
344. de Carvalho AC, de Mattos Pereira L, Datorre JG, dos Santos W, Berardinelli GN, Matsushita M de M, et al. Microbiota Profile and Impact of *Fusobacterium nucleatum* in Colorectal Cancer Patients of Barretos Cancer Hospital. *Front Oncol*. 29 de agosto de 2019;9:813.
345. Chen W, Liu F, Ling Z, Tong X, Xiang C. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PloS One*. 2012;7(6):e39743.
346. Bundgaard-Nielsen C, Baandrup UT, Nielsen LP, Sørensen S. The presence of bacteria varies between colorectal adenocarcinomas, precursor lesions and non-malignant tissue. *BMC Cancer*. 29 de abril de 2019;19:399.
347. Thomas AM, Jesus EC, Lopes A, Aguiar S, Begnami MD, Rocha RM, et al. Tissue-Associated Bacterial Alterations in Rectal Carcinoma Patients Revealed by 16S rRNA Community Profiling. *Front Cell Infect Microbiol*. 9 de diciembre de 2016;6:179.
348. Gao Z, Guo B, Gao R, Zhu Q, Qin H. Microbiota dysbiosis is associated with colorectal cancer. *Front Microbiol*. 2015;6:20.
349. Kasai C, Sugimoto K, Moritani I, Tanaka J, Oya Y, Inoue H, et al. Comparison of human gut microbiota in control subjects and patients with colorectal carcinoma in adenoma: Terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing analyses. *Oncol Rep*. enero de 2016;35(1):325-33.
350. Liang JQ, Li T, Nakatsu G, Chen YX, Yau TO, Chu E, et al. A novel faecal *Lachnospirillum* marker for the non-invasive diagnosis of colorectal adenoma and cancer. *Gut*. julio de 2020;69(7):1248-57.
351. Flanagan L, Schmid J, Ebert M, Soucek P, Kunicka T, Liska V, et al. *Fusobacterium nucleatum* associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer and disease outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. agosto de 2014;33(8):1381-90.
352. Mima K, Nishihara R, Qian ZR, Cao Y, Sukawa Y, Nowak JA, et al. *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. *Gut*. diciembre de 2016;65(12):1973-80.

Bibliografía

353. Mima K, Cao Y, Chan AT, Qian ZR, Nowak JA, Masugi Y, et al. Fusobacterium nucleatum in Colorectal Carcinoma Tissue According to Tumor Location. Clin Transl Gastroenterol. noviembre de 2016;7(11):e200.
354. Yamaoka Y, Suehiro Y, Hashimoto S, Hoshida T, Fujimoto M, Watanabe M, et al. Fusobacterium nucleatum as a prognostic marker of colorectal cancer in a Japanese population. J Gastroenterol. 1 de abril de 2018;53(4):517-24.
355. Ono T, Yamaguchi T, Takao M, Kojika E, Iijima T, Horiguchi S ichiro. Fusobacterium nucleatum load in MSI colorectal cancer subtypes. Int J Clin Oncol. 1 de octubre de 2022;27(10):1580-8.
356. Yu J, Chen Y, Fu X, Zhou X, Peng Y, Shi L, et al. Invasive Fusobacterium nucleatum may play a role in the carcinogenesis of proximal colon cancer through the serrated neoplasia pathway. Int J Cancer. 15 de septiembre de 2016;139(6):1318-26.
357. Conesa-Zamora P, García-Solano J, García-García F, Turpin MDC, Trujillo-Santos J, Torres-Moreno D, et al. Expression profiling shows differential molecular pathways and provides potential new diagnostic biomarkers for colorectal serrated adenocarcinoma. Int J Cancer. 15 de enero de 2013;132(2):297-307.
358. García-Solano J, Turpin MC, Torres-Moreno D, Huertas-López F, Tuomisto A, Mäkinen MJ, et al. Two histologically colorectal carcinomas subsets from the serrated pathway show different methylome signatures and diagnostic biomarkers. Clin Epigenetics. 09 de 2018;10(1):141.
359. Ito M, Kanno S, Nosho K, Sukawa Y, Mitsuhashi K, Kurihara H, et al. Association of Fusobacterium nucleatum with clinical and molecular features in colorectal serrated pathway. Int J Cancer. 2015;137(6):1258-68.
360. Villar-Ortega P, Expósito-Ruiz M, Gutiérrez-Soto M, Ruiz-Cabello Jiménez M, Navarro-Marí JM, Gutiérrez-Fernández J. The association between Fusobacterium nucleatum and cancer colorectal: A systematic review and meta-analysis. Enfermedades Infecc Microbiol Clin Engl Ed. mayo de 2022;40(5):224-34.
361. Wu Y, Jiao N, Zhu R, Zhang Y, Wu D, Wang AJ, et al. Identification of microbial markers across populations in early detection of colorectal cancer. Nat Commun. 24 de mayo de 2021;12(1):3063.

Bibliografía

IX. ANEXO

ANEXO 1. Documento de información al donante (v.3)

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.

En el **Hospital General Universitario Santa Lucía**, igual que en la mayoría de hospitales, además de la asistencia a los pacientes, se realiza investigación biomédica. La finalidad de esta investigación es progresar en el conocimiento de las enfermedades y en su prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Esta investigación biomédica requiere recoger datos clínicos y muestras biológicas de pacientes y donantes sanos para analizarlos y obtener conclusiones con el objetivo de conocer mejor las enfermedades y avanzar su diagnóstico y/o tratamiento.

Las muestras y datos clínicos obtenidos para el diagnóstico o control de las enfermedades, una vez utilizadas con esta finalidad, resultan también útiles y necesarias para la investigación. De hecho, muchos de los avances científicos obtenidos en los últimos años en medicina son fruto de este tipo de estudios.

Solicitamos su autorización para incorporar al **Biobanc-Mur Nodo Área II** del hospital el material biológico sobrante de las pruebas que, como parte del actual proceso asistencial, se le han realizado o se le van a realizar en este centro, con el fin de que puedan ser utilizadas en investigación biomédica.

Siguiendo lo establecido por la Ley 14/2007, de Investigación Biomédica, la Ley Orgánica 15/1999, de Protección de Datos Personales, y sus normas de desarrollo, le solicitamos que lea detenidamente este documento de información y el consentimiento informado que se le adjunta al final para su firma, si está de acuerdo en participar en esta propuesta .

¿Qué es un biobanco?: Institución para favorecer la investigación y la salud.

Un biobanco es una institución, regulada por leyes específicas, que facilita la investigación biomédica, es decir, aquella dirigida a promover la salud de las personas.

Las muestras incluidas en un biobanco pueden ser cedidas para investigación en Medicina, siempre bajo la supervisión de un comité científico y otro de ética. Las muestras se cederán generalmente sin información personal asociada, aunque a veces podrá ser necesario el acceso a la historia clínica o al resultado de otras pruebas para completar la investigación.

La investigación biomédica es, hoy en día, un fenómeno global por lo que ocasionalmente estas muestras podrán ser cedidas a grupos de investigación fuera de España, siempre que se cumplan los requisitos de la legislación española y lo aprueben los correspondientes comités.

Muestras biológicas e información asociada: En ningún caso se le practicarán más pruebas de las imprescindibles para su adecuada atención médica.

Se guardará y dispondrá del material biológico sobrante que se le extraiga durante el proceso asistencial (muestras de sangre, líquidos biológicos y/o tejidos), sin que este hecho le cause molestias adicionales. La donación de muestras excedentes de este proceso asistencial no impedirá que usted o su familia puedan usarlas, cuando sea necesario por motivos de salud, siempre que estén disponibles.

Las muestras y la información asociada a las mismas se custodiarán y/o guardarán en el **Biobanco Biobanc-Mur Nodo Área II** del **Hospital General Universitario Santa Lucía** hasta su extinción. Este Biobanco forma parte como nodo de la Red Temática de Investigación Cooperativa (RETIC) de Biobancos del Instituto de Salud Carlos III con la referencia **RD09/0076/00065**, y está en proceso de Registro con el desarrollo de la normativa regional de Biobancos que aplica la normativa nacional.

Este biobanco acoge colecciones organizadas de muestras biológicas e información asociada en las condiciones y garantías de calidad y seguridad que exige la legislación anteriormente referida y los códigos de conducta aprobados por los Comités de Ética. Dichas muestras y su información asociada quedan disponibles para aquellos investigadores que lo soliciten al biobanco.

Cualquier estudio de investigación para el que se solicite la utilización de estos datos o muestras deberá disponer siempre de la aprobación del Comité de Ética de la Investigación (CEI) competente, que velará para que los investigadores desarrollen sus estudios siguiendo siempre las más estrictas normas éticas y legales. Además, el comité científico del biobanco garantizará que los proyectos sean de excelencia científica.

A partir de las muestras donadas, en los casos en que la investigación lo requiera, se realizarán estudios genéticos, y a partir de ellos se puede obtener información acerca de su salud y la de sus familiares. Siempre se actuará velando por la protección de esta información (ver apartado de protección de datos y confidencialidad).

Por este consentimiento, los responsables del Biobanco del Hospital podrán consultar su historial clínico, solamente en el caso de que ello sea imprescindible para la realización del proyecto para el que se soliciten las muestras y previa autorización por parte del Comité de Ética correspondiente.

En caso de ser necesaria alguna muestra adicional, la institución sanitaria se podría poner en contacto con usted para solicitarle nuevamente su colaboración. En este caso se le informará de los motivos y se le solicitará de nuevo su consentimiento.

Protección de datos y confidencialidad: Las muestras se conservarán codificadas.

Los datos personales que se recojan serán obtenidos, tratados y almacenados cumpliendo en todo momento el deber de secreto, de acuerdo con la legislación vigente en materia de protección de datos de carácter personal.

La identificación de las muestras biológicas del Biobanco será sometida a un proceso de codificación. A cada muestra se le asigna un código de identificación, que será el utilizado por los investigadores. Únicamente el personal autorizado por el biobanco podrá relacionar su identidad con los citados códigos. Mediante este proceso los investigadores que soliciten muestras al biobanco no podrán conocer ningún dato que revele su identidad. Asimismo, aunque los resultados obtenidos de la investigación realizada con sus muestras se publiquen en revistas científicas, su identidad no será facilitada. En aquellos estudios en los que no se prevean resultados potencialmente útiles para su salud, y de acuerdo con el correspondiente Comité de Ética, las muestras y datos podrán ser anonimizados, es decir, no habrá ninguna posibilidad de volver a asociar la muestra con su identidad.

Sus muestras y los datos clínicos asociados a las mismas, pasarán a formar parte del fichero del Biobanco, inscrito en la Agencia de Protección de datos.

Responsable del fichero: Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia.

Dirección Postal: Calle Luis Fontes Pagan, 9-1, 30003 Murcia

Usted podrá ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación y objeción, así como obtener información sobre el uso de sus muestras y datos asociados, dirigiéndose a:

Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia

Responsable del nodo Calle Luis Fontes Pagan, 9-1, 30003 Murcia

Tel.: 968359757 E-mail: juanp.erna@carm.es

Carácter altruista de la donación. La cesión de muestras biológicas que usted realiza al Biobanco del Hospital General Universitario Santa Lucía es gratuita.

La donación tiene por disposición legal carácter altruista, por lo que usted no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma, ni tendrá derechos sobre posibles beneficios comerciales de los descubrimientos que puedan conseguirse como resultado de la investigación biomédica. Sin embargo, los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de muchas otras pueden ayudar al avance médico y, por ello, a otras personas.

Participación voluntaria. Su negativa NO repercutirá en su asistencia médica, presente o futura.

Su participación es totalmente voluntaria. Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar. Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento posterior a la firma sin tener que explicar los motivos y esto no repercutirá negativamente en su asistencia médica, presente o futura.

Revocación del consentimiento: si usted decide firmar este consentimiento, podrá también cancelarlo libremente.

Si en un futuro usted quisiera anular su consentimiento, sus muestras biológicas serían destruidas y los datos asociados a las mismas serían retirados del biobanco. También podría solicitar la anonimización de las muestras, en cuyo caso se eliminaría la relación entre sus datos personales (que revelan su identidad) y sus muestras biológicas y datos clínicos asociados. Los efectos de esta cancelación o anonimización no se podrían extender a la investigación que ya se hubiera llevado a cabo.

Si deseara anular su consentimiento, deberá solicitarlo por escrito al Director del Biobanco, en la dirección anteriormente indicada.

Información sobre los resultados de la investigación: se le proporcionará información si usted desea recibirla.

En el caso de que usted lo solicite expresamente, el Biobanco podrá proporcionarle información acerca de cuáles son las investigaciones en que se han utilizado sus muestras y de los resultados globales de dichas investigaciones, salvo en el caso de cancelación o anonimización.

Los métodos utilizados en investigación Biomédica suelen ser diferentes de los aprobados para la práctica clínica, por lo que no deben de ser considerados con valor clínico para usted. Sin embargo, en el caso que estas investigaciones proporcionen datos que pudieran ser clínica o genéticamente relevantes para usted e interesar a su salud o a la de su familia, le serán comunicados si así lo estima oportuno. Asimismo, podría darse el caso de obtenerse información relevante para su familia, le corresponderá a usted decidir si quiere o no comunicárselo. Si Ud. quiere que se le comunique dicha información relevante debe consignarlo en la casilla que aparece al final de este documento.

Si usted no desea recibir esta información, tenga en cuenta que la ley establece que, cuando la información obtenida sea necesaria para evitar un grave perjuicio para la salud de sus familiares biológicos, un Comité de expertos estudiará el caso y deberá decidir si es conveniente informar a los afectados o a sus representantes legales.

Por favor, pregunte al personal sanitario que le ha comunicado esta información sobre cualquier duda que pueda tener, ahora o en el futuro, en relación con este consentimiento. Asimismo, puede comentar sus dudas con su médico, quien le pondrá en contacto con el personal sanitario autorizado.

Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina. De esta forma está usted colaborando a vencer las enfermedades y ayudar a multitud de enfermos actuales y futuros.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO

Nombre y Apellidos (donante)..... NHC:..... <div style="text-align: center; color: gray; font-size: small;">Etiqueta identificativa del paciente</div> Edad: Sexo: DNI:.....	Persona del centro que informa DNI:.....
---	--

El abajo firmante autoriza al **Hospital General Universitario Santa Lucía** a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean incorporadas en el **Biobanco Biobanc-Mur Nodo Área II**, y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.

Confirmo que:

1. Autoriza al **Hospital General Universitario Santa Lucía** a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean incorporadas en el **Biobanc-Mur Nodo Área II**, y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.

SI NO

2. Desea que se le comunique la información derivada de la investigación que realmente sea relevante y aplicable para su salud o la de su familia

SI NO Teléfono o E-mail de contacto:

3. Autoriza a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales

SI NO Teléfono o E-mail de contacto:

4. He expresado mi deseo de que se respeten las siguientes excepciones respecto al objetivo y métodos de las investigaciones:

.....
.....

DONANTE	PERSONA QUE INFORMA
Firma	Firma

En....., a.....de.....de.....

CONSENTIMIENTO INFORMADO ANTE TESTIGOS

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.

Nombre y Apellidos (donante)..... NHC:..... <p align="center" style="color:lightgrey;">Etiqueta identificativa del paciente</p> Edad: Sexo: DNI:.....	Persona del centro que informa DNI:.....
---	--

Nombre y apellidos del testigo que firma.....DNI:.....
 Relación con el donante:.....

El abajo firmante confirma que el donante:

1. Autoriza al **Hospital General Universitario Santa Lucía** a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean incorporadas en el **Biobanc-Mur Nodo Área II**, y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.

SI NO

2. Desea que se le comunique la información derivada de la investigación que realmente sea relevante y aplicable para su salud o la de su familia

SI NO Teléfono o E-mail de contacto:

3. Autoriza a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales

SI NO Teléfono o E-mail de contacto:

4. He expresado mi deseo de que se respeten las siguientes excepciones respecto al objetivo y métodos de las investigaciones:

.....

5. Me autoriza a firmar en su nombre.

TESTIGO	PERSONA QUE INFORMA
Firma	Firma

En....., a.....de.....de.....

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MENORES

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.

Nombre y Apellidos (donante)..... NHC:..... <p align="center" style="color: gray;">Etiqueta identificativa del paciente</p> Edad: Sexo: DNI:.....	Persona del centro que informa DNI:.....
---	--

Nombre y apellidos del tutor legal que firma.....DNI:.....
 Relación con el donante:.....

El abajo firmante confirma que:

1. Se me ha informado que, llegada la mayoría de edad de mi representado, este tendrá derecho a revocar o modificar este consentimiento, para lo cual deberá estar debidamente informado. En caso de que no ejerza dicho derecho, se considerará que el actual documento de consentimiento informado sigue vigente.

SI NO

2. Desea que se le comunique la información derivada de la investigación que realmente sea relevante y aplicable para su salud o la de su familia

SI NO Teléfono o E-mail de contacto:

3. Autoriza a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales

SI NO Teléfono o E-mail de contacto:

4. He expresado mi deseo de que se respeten las siguientes excepciones respecto al objetivo y métodos de las investigaciones:

.....

5. Me autoriza a firmar en su nombre.

TUTOR	ASENTIMIENTO DEL MENOR CAPACITADO	PERSONA QUE INFORMA
Firma	Firma	Firma

En....., a.....de.....de.....

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.

POR EL DONANTE:

Yo, D./Dña.con DNIanulo el consentimiento prestado en fecha.....de.....de 20... y no deseo proseguir la donación voluntaria al biobanco **Biobanc-Mur Nodo Área II**, que doy por finalizada a día de hoy.

SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LA MUESTRA.

SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE MIS DATOS PERSONALES.

La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.

SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS PERSONALES Y MUESTRAS.

Firmado:

En....., a.....de.....de.....

POR EL TUTOR/REPRESENTANTE LEGAL DEL DONANTE:

Yo, D./Dña.....con DNI.....como representante legal de D./Dña..... con DNI.....anulo el consentimiento prestado en fecha.....de.....de 20... y no deseo proseguir la donación voluntaria al biobanco **Biobanc-Mur Nodo Área II**, que doy por finalizada a día de hoy.

SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LA MUESTRA.

SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LOS DATOS PERSONALES.

La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.

SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE LOS DATOS PERSONALES Y MUESTRAS.

Firmado:

En....., a.....de.....de.....

X. TABLAS Y FIGURAS

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Características diferenciales entre las tres partes anatómicas del intestino grueso (6).

Tabla 2. Clasificación TNM según la AJCC / IUAC.

Tabla 3. Estimación de nuevos casos, incidencia y mortalidad para cada tipo cáncer a nivel mundial. Fuente: GLOBOCAN, página web “*Global Cancer Observatory*”, subsección “*Cancer Today*”. De la “*International Agency for research on Cancer*”, órgano perteneciente a la OMS. Acceso: septiembre 2022.

Tabla 4. Estimación de nuevos casos, incidencia y mortalidad por tipo cáncer a nivel mundial según el sexo. Fuente: GLOBOCAN, página web “*Global Cancer Observatory*”, subsección “*Cancer Today*”. De la “*International Agency for research on Cancer*”, órgano perteneciente a la OMS. Acceso: septiembre 2022.

Tabla 5. Síndromes hereditarios y genes implicados en estadios iniciales del desarrollo de CCR.

Tabla 6. Clasificación molecular de las vías de carcinogénesis (109).

Tabla 7. Especificaciones técnicas de las principales plataformas de secuenciación.

Tabla 8. Cebadores utilizados en el análisis mediante qPCR.

Tabla 9. Marcadores del kit *MSI Analysis System* versión 1.2 (Promega)

Tabla 10. Sondas incluidas en el kit *SALSA® MS-MLPA® Probemix ME042-C1 CIMP*.

Tabla 11. Sondas de referencia del kit *SALSA® MS-MLPA® Probemix ME042-C1 CIMP*.

Tabla 12. Fragmentos de control de calidad de la sonda del kit *SALSA® MS-MLPA® Probemix ME042-C1 CIMP*.

Tabla 13. Descripción de las características demográficas, de localización y de estadio de los casos de CCR incluidos en el estudio.

Tabla 14. Características moleculares de los casos de CCR incluidos en el estudio.

Tabla 15. Estudio comparativo del Índice de Shannon entre los distintos tipos de muestra según localización.

Tabla 16. Géneros bacterianos con diferencias significativas en su abundancia relativa entre muestras T y NT.

Tabla 17. Resultado del LDA para el microbioma.

Tabla 18. Principales genes cuyo nivel de metilación presenta correlación positiva o negativa con la abundancia relativa de *Fusobacterium spp.*

Tabla 19. Genes hipermetilados en muestras T con correlación negativa con *Fusobacterium spp.*

Tabla 20. Genes hipermetilados en muestras T con correlación positiva con *Fusobacterium spp.*

Tabla 21. Validación de los resultados de metilación de las islas CpG entre muestras T y NT en genes de interés para *Fusobacterium spp.*

Tabla 22. Correlación del logaritmo de la cuantificación relativa normalizada de *Fusobacterium nucleatum* y los porcentajes de metilación de islas CpG.

Tabla 23. Análisis multivariante de la predicción del porcentaje de metilación de islas CpG del gen *ZNF788*.

Tabla 24. Comparación de la cuantificación relativa normalizada de FN según "Sexo".

Tabla 25. Comparación de la cuantificación relativa normalizada de FN según "Localización".

Tabla 26. Comparación de la cuantificación relativa normalizada de FN según "Tipo de CCR".

Tabla 27. Comparación de la cuantificación relativa normalizada de FN según "Tipo de CCR" en función de su "Localización".

Tabla 28. Comparación de la cuantificación relativa normalizada de FN según "T".

Tabla 29. Comparación de la cuantificación relativa normalizada de FN según "Estadio CCR".

Tabla 30. Comparación de la cuantificación relativa normalizada de FN según "Estado MSI".

Tabla 31. Comparación de la cuantificación relativa normalizada de FN según "Estado CIMP".

Tabla 32. Comparación de la cuantificación relativa normalizada de FN según “*KRAS*, *BRAF* y *PIK3CA*”.

Tabla 33. Análisis multivariante para la cuantificación relativa normalizada de FN.

Tabla 34. AUC Curva ROC para cuantificación relativa de FN según tipo muestra (T vs NT).

Tabla 35. Análisis Análisis multivariante para predicción de CCR.

Tabla 36. Análisis multivariante para predicción del tipo de CCR.

Tabla 37. Análisis multivariante para tipo de CCR (CC vs SAC/hmMSI).

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Esquema anatómico del intestino grueso. Fuente: Fisiología humana, 14ª edición, Stuart Ira Fox.

Figura 2. Capas que forman la pared del intestino grueso. Fuente: Imagen tomada de Sociedad Americana contra el cáncer. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-o-recto/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/clasificacion-de-la-etapa.html>

Figura 3. Estructura y distribución citológica en el intestino grueso. Fuente: imagen tomada de la publicación Sancho E, Batlle E, Clevers H. 2004 (10).

Figura 4. Desarrollo del CCR por sus diferentes estadios. Fuente: imagen tomada de la publicación Motta Ramírez GA, Alonso Blancas E, Lozano et al., 2011 (23).

Figura 5. Estimación de la incidencia y mortalidad global por tipo de cáncer en Europa. Fuente: GLOBOCAN, página web “*Global Cancer Observatory*”, subsección “*Cancer Today*”. De la “*International Agency for research on Cancer*”, órgano perteneciente a la OMS. Acceso: septiembre 2022.

Figura 6. Estimación de la incidencia y mortalidad por tipo de cáncer en España. Fuente: GLOBOCAN, página web “*Global Cancer Observatory*”, subsección “*Cancer Today*”. De la “*International Agency for research on Cancer*”, órgano perteneciente a la OMS. Acceso: septiembre 2022.

Figura 7. Estimación de la incidencia y mortalidad en el sexo femenino por tipo de cáncer en España. Fuente: GLOBOCAN, página web “*Global Cancer Observatory*”, subsección “*Cancer Today*”. De la “*International Agency for research on Cancer*”, órgano perteneciente a la OMS. Acceso: septiembre 2022.

Figura 8. Estimación de la incidencia y mortalidad en el sexo masculino por tipo de cáncer en España. Fuente: GLOBOCAN, página web “*Global Cancer Observatory*”, subsección “*Cancer Today*”. De la “*International Agency for research on Cancer*”, órgano perteneciente a la OMS. Acceso: septiembre 2022.

Figura 9. Representación gráfica de la evolución en el desarrollo del CCR. Fuente: imagen tomada de <https://www.clinicbarcelona.org/asistencia/enfermedades/cancer-de-colon-y-recto>

Figura 10. Proceso de carcinogénesis en CCR esporádico. Fuente: Imagen tomada de la publicación Sanabria-Salas MC et al., 2012 (108).

Figura 11. Esquema proceso carcinogénesis “vía serrada”. Fuente: imagen tomada de Yamane L et al. Serrated colorectal carcinogénesis. World J Gastroenterol, 2014 (128).

Figura 12. Papel de la disbiosis bacteriana e inducción de la carcinogénesis del colon. Fuente: imagen tomada de la publicación Nistal et al., 2015 (222).

Figura 13. Receptores microbianos y su respuesta en el CCR. Fuente: imagen tomada de la publicación Kostic, Chun, Meyerson, & Garrett, 2013 (260).

Figura 14. Desencadenantes ambientales, tales como la dieta, la edad, las infecciones por patógenos, pueden modificar la composición microbiana, y en hospedador genéticamente susceptible, conducir a la inflamación crónica del intestino. Fuente: imagen tomada de la publicación Candela et al., 2014 (280).

Figura 15. Modelo bacteriano “*driver-passenger*” en el desarrollo del CCR. Fuente: imagen tomada de la publicación Tjalsma et al., 2012 (281).

Figura 16. Coste por cada millón de bases (Mb; megabase) secuenciadas de ADN. Disponible en: <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Sequencing-Costs-Data>. Acceso en Abril 2020.

Figura 17. Preparación y amplificación por PCR puente en metodología *Illumina*. Fuente: Imagen adaptada de Mardis et al. 2008 (294).

Figura 18. Secuenciación *Illumina*. Fuente: Imagen adaptada de Mardis et al. 2008 (294).

Figura 19. Fundamento de los ensayos Infinium I e Infinium II. (Imagen disponible en: https://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_humanmethylation450.pdf).

Figura 20. Ejemplo de resultados de secuenciación de ADN después del tratamiento con bisulfito.

Figura 21. Ejemplo de ensayo mediante análisis MSI utilizado.

Figura 22. Esquema de la prueba realizada con *therascreen*® KRAS Pyro. (Imagen tomada del manual: *therascreen*® KRAS Pyro® Kit Handbook, 2015).

Figura 23. Ilustración del cartucho PyroMark Q24 (visto desde arriba): mezcla de enzimas (E), mezcla de sustrato (S) y los nucleótidos (A, T, C, G). (Imagen tomada del manual: theascreen® KRAS Pyro® Kit Handbook, 2015).

Figura 24. Pirogramas *PIK3CA* exón 9 y exón 20.

Figura 25. Diagrama de abundancia relativa para muestras NT por NGS.

Figura 26. Diagrama de abundancia relativa para muestras T por NGS.

Figura 27. Diagrama de cajas del índice de Shannon en función del tipo de muestra.

Figura 28. Diagrama de cajas del índice de Shannon en función del tipo de muestra y localización.

Figura 29. Diagrama de cajas del índice de Shannon en función del tipo de CCR.

Figura 30. Gráfico del PCA para datos del microbioma.

Figura 31. Gráfico de dispersión de datos y de recta de ajuste para el único gen con regresión lineal $p < 0,05$ (gen *ZNF788*).

Figura 32. Distribución de la cuantificación relativa normalizada ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) en escala logarítmica.

Figura 33. Diagrama de cajas: Cuantificación relativa de FN según "Sexo".

Figura 34. Diagrama de cajas: Cuantificación relativa de FN según "Localización".

Figura 35. Diagrama de cajas: Cuantificación relativa de FN según "Tipo de CCR".

Figura 36. Diagrama de cajas: Cuantificación relativa de FN según "Tipo de CCR" y "Localización"

Figura 37. Diagrama de cajas: Cuantificación relativa de FN según "Estadio T".

Figura 38. Diagrama de cajas: Cuantificación relativa de FN según "Estadio CCR".

Figura 39. Diagrama de cajas: Cuantificación relativa de FN según "Estado MSI".

Figura 40. Diagrama de cajas: Cuantificación relativa de FN según "Estado CIMP".

Figura 41. Diagrama de cajas: Cuantificación relativa de FN según "KRAS".

Figura 42. Diagrama de cajas: Cuantificación relativa de FN según “*BRAF*”.

Figura 43. Diagrama de cajas: Cuantificación relativa de FN según “*PIK3CA*”.

Figura 44. Curva ROC para Cuantificación relativa de FN según tipo muestra (T vs NT),

XI. ABREVIATURAS

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico

AGCC: ácidos grasos de cadena corta

AJCC: *American Joint Comite on Cancer*

AOM: azoximetano

APC: *Adenomatous polyposis coli*

ASS: adenoma serrado sésil

AST: adenoma serrado tradicional

CAG: grupos de coabundancia

CCR: cáncer colorrectal

CEA: antígeno carcinoembrionario

Cdt: toxinas citoletales

CIN: inestabilidad cromosómica

CIMP: fenotipo hipermetilador de islas CpG

CIMP-L : fenotipo hipermetilador de islas CpG de bajo grado (*low*)

CIMP-H: CIMP: fenotipo hipermetilador de islas CpG de alto grado (*high*)

CLI: células linfoides intestinales

CTC: células tumorales circulantes

CU: Colitis ulcerosa

ddNTP: didesoxinucleótido trifosfato

dNTP: desoxinucleótido trifosfato

EC: Enfermedad Crohn

EII: enfermedad inflamatoria intestinal

emPCR: PCR en emulsión

ETBF: cepas enterotoxigénicas de *Bacteroides fragilis*

FISH: hibridación con sondas específicas fluorescentes *in situ*

GPR: receptor acoplado a proteína G

HMP: *Human microbiome project*

Abreviaturas

HNPCC: cáncer colorrectal hereditario sin poliposis

IDH: índice desarrollo humano

IMC: índice masa corporal

IPD: duración entre pulsos

IUAC: *International Union Against Cancer*

LCR: receptores de lectina tipo C

LNR: receptores de lectina tipo N

LPS: lipopolisacárido

MAMP: patrones moleculares asociados a microorganismos

MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno

MI: microbiota intestinal

MMR: genes de reparación de emparejamientos erróneos (*mismatch repair*)

MSI: inestabilidad de microsatélites

MSI-L: inestabilidad de microsatélites de bajo nivel (*low*)

MSI-H: inestabilidad de microsatélites de alto nivel (*high*)

MSS: estabilidad de microsatélites

NGS: secuenciación de próxima generación

NLR: receptores citoplasmáticos NOD-*like*

NTP: nucleótido trifosfato

OMS: Organización Mundial de la Salud

PA: péptido antimicrobiano

PAF: poliposis adenomatosa familiar

PAFA: poliposis adenomatosa familiar atenuada

PAM: poliposis asociada al gen *MYH*

PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos

PES: secuenciación de extremos emparejados

PH: pólipo hiperplásico

PIF-SOH: prueba inmunoquímica fecal de detección sangre oculta en heces

PRR: receptores de reconocimiento de patrones

Abreviaturas

qSOH: test de guayacol de detección sangre oculta en heces

RNS: especies reactivas de nitrógeno

ROS: especies reactivas de oxígeno

RRBS: secuenciación con bisulfito de representación reducida

SC: células madre somáticas (*stem cells*)

SEER: *Surveillance, Epidemiology and End Results Programs*

SMRT: *single molecular real time*

SNV: variante de un sólo nucleótido

SNP: polimorfismo de un solo nucleótido

SOH: sangre oculta en heces

SPJ: síndrome poliposis juvenil

SPS: síndrome poliposis serrada

TLR: receptores *Toll-like*

UE: uniones estrechas

WGS: secuenciación de genoma completo

WGSB: secuenciación de genoma completo tras tratamiento con bisulfito

ZMW: *zero-mode wave guide*

XII. RESUMEN. *SUMMARY*

Objetivo: Estudio del microbioma y metiloma a partir de muestras de tejido intestinal de pacientes con CCR para establecer asociaciones entre el perfil de metilación genética a nivel de islas CpG y la abundancia relativa respecto al género *Fusobacterium*. A su vez, se lleva a cabo el estudio de asociación entre la cuantificación relativa de *Fusobacterium nucleatum* y las características clínicas y moleculares en el CCR, así como la utilidad potencial de la medición del nivel de *F. nucleatum* en el diagnóstico/cribado del CCR.

Material y métodos: Se incluyen un total de 154 muestras emparejadas correspondientes a 77 pacientes con CCR, tanto de tejido tumoral (T) como de tejido no tumoral periférico (NT), clasificadas según tipo de CCR (CC, SAC y hmMSI), localización (proximal, distal) y estadio según criterios TNM. El estudio del microbioma bacteriano en muestras T y NT se realiza mediante tecnología NGS (*IlluminaMiSeq System*®). El estudio del perfil de metilación del ADN a nivel de islas CpG en muestras T se realiza mediante el *array Infinium*® *HumanMethylation450 BeadChip* y los resultados se validan por pirosecuenciación. El estado MSI se determina mediante el kit *MSI Analysis System* (Promega) y el estado CIMP con la técnica *SALSA*® *MS-MLPA*® *Probemix ME042-C1 CIMP* (MRC-Holanda). También se determinan mediante pirosecuenciación las mutaciones de los genes: *KRAS*, *BRAF* y *PIK3CA*. Finalmente se realiza la cuantificación bacteriana global y de *F. nucleatum* por qPCR. Las diferencias existentes entre muestras T y NT en cuanto a microbioma se han estudiado mediante el método PCA (*Principal Component Analysis*), la prueba U de Mann-Withey-Wilcoxon y el análisis LDA (*linear discrimination analysis*). El análisis de correlación de Pearson entre la abundancia relativa del género *Fusobacterium* y el nivel de metilación de los genes estudiados se ha realizado con la función R *statscor* utilizando RStudio IDE versión 1.0.143. Para el resto de análisis estadísticos, tanto del estudio de validación del porcentaje de metilación, del análisis de correlación entre la cuantificación relativa de *F. nucleatum* y los porcentajes de metilación, o de asociación con los distintos marcadores de interés, se ha utilizado el paquete estadístico SPSS versión 21.0.

Resultados: El análisis de la diversidad de géneros bacterianos realizado entre muestras T y NT según la localización determina que existen diferencias significativas que específicamente son debidas a muestras T de localización distal, con una menor diversidad, mientras que no existen diferencias de diversidad microbiana según el tipo de CCR. El PCA de los datos de microbioma no muestra diferencias entre los casos. Entre los géneros bacterianos con diferencias significativas en su abundancia relativa entre muestras T y NT se encuentran *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* y

Acinetobacter, que se presentan como los géneros con mayor poder discriminatorio en el modelo predictivo obtenido mediante el método LDA a favor de muestras T, mientras que únicamente el género *Lachnoclostridium* se presenta como género en el modelo predictivo a favor de muestras NT. El estudio de validación realizado a partir de los datos obtenidos por el análisis de correlación para el nivel de metilación genético y la abundancia relativa del género *Fusobacterium* ha confirmado una correlación positiva con la metilación de los genes *PLCH1*, *mirLET7D*, *EGFR* y *COBL*. En cambio el nivel de *F. nucleatum* ha mostrado correlación positiva únicamente con el gen *ZNF788*.

No se encuentran diferencias en la cuantificación de *F. nucleatum* en cuanto a sexo y localización. Existen diferencias significativas entre CC y SAC/hmMSI que se dan a nivel proximal, y entre los tumores de mayor tamaño (T3, T4) o estadios avanzados (II, III, IV) frente a los de menor tamaño (Tis, T1, T2) o estadio (0, I). También existen diferencias significativas entre MSS y MSI-H, entre CIMP-H y CIMP-L, y para los estados mutados de los genes *KRAS* y *BRAF*, mientras que no se encuentran para *PIK3CA*. El análisis multivariante confirma que el estado MSI, estadio CCR y el tipo de CCR son las variables que presentan asociación significativa de forma independiente con la cuantificación relativa de *F. nucleatum*. La cuantificación relativa de *F. nucleatum* presenta una eficiencia diagnóstica para CCR del 69%. Se establece el punto de corte óptimo en una diferencia ≤ 10 ciclos en Ct de *F. nucleatum* y Ct de carga bacteriana total obtenidos por qPCR. El modelo predictivo establece que la cuantificación relativa de *F. nucleatum* es predictor independiente de CCR (OR=2,23; IC95% [1,51-3,30]) y del tipo de CCR SAC/hm-MSI frente a CC (OR=2,00; IC95% [1,22–3,28]).

Conclusiones: Se han encontrado potenciales biomarcadores potenciales bacterianos para CCR (géneros *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* y *Acinetobacter*). Además los genes *PLCH1*, *mirLET7D*, *EGFR* y *COBL* han mostrado un estado hipermetilado asociado a la abundancia del género *Fusobacterium spp.* en muestras T, mientras que sólo el porcentaje de metilación del gen *ZNF788* ha mostrado correlación positiva con la cuantificación relativa de *F. nucleatum*. El nivel de *F. nucleatum* se asocia de forma significativa al tipo de CCR SAC/hmMSI, estadios avanzados, estado MSI-H, estado CIMP-H y *BRAF* mutado, aunque el análisis multivariante confirma la asociación de forma independiente con el CCR tipo SAC/hmMSI, estadios avanzados y estado MSI-H. Debido a la buena especificidad obtenida para la cuantificación relativa de *F. nucleatum* se propone dicho parámetro como candidato a la mejora del cribado/diagnóstico del CCR mediante técnicas no invasivas, incluso llegando a poder diferenciar entre CC y SAC/hmMSI.

Objective: Study of the microbiome and methylome from intestinal tissue samples from CRC patients to establish associations between the CpG islands genetic methylation profile and the genus *Fusobacterium* relative abundance. Subsequently, an association study between *Fusobacterium nucleatum* relative quantification and the clinical and molecular characteristics in CRC, as well as the potential usefulness of *F. nucleatum* relative quantification in the diagnosis/screening of CRC, were carried out.

Material and methods: 154 paired samples, 77 tumor tissue (T) and 77 peripheral non-tumor tissue (NT), corresponding to 77 patients with CRC, classified according CRC type (CC, SAC and hmMSI), location. (proximal, distal) and stage according TNM criteria. The microbiome study is carried out using NGS technology (*IlluminaMiSeq System*®). The CpG islands DNA methylation profile is carried out using the *Infinium*® *HumanMethylation450 BeadChip* array and the results are validated by pyrosequencing. MSI status is determined using the *MSI Analysis System kit* (Promega) and CIMP status with the *SALSA*® *MS-MLPA*® *Probemix ME042-C1* CIMP technique (MRC-Netherlands). Gene mutations: *KRAS*, *BRAF* and *PIK3CA* are also determined by pyrosequencing. Finally, qPCR were carried out to total bacterial and *F. nucleatum* quantification. PCA (Principal Component Analysis) method, U Mann-Withey-Wilcoxon test and LDA analysis (“linear discrimination analysis”) were carried out to analyze microbiome differences between T and NT samples Pearson correlation analysis between *Fusobacterium* genus relative abundance and genes methylation level was carried out with the R *statscor* function using RStudio IDE version 1.0.143. Genes methylation validation study, correlation analysis between *F. nucleatum* relative quantification and CpG island methylation percentages and for the different markers of interest was carried out using the SPSS version program. 21.0.

Results: The diversity analysis of microbial populations between T and NT samples according the location determines specifically significant differences due to T samples of distal location, with less diversity, while there are no microbial diversity differences according to CRC type. The microbiome data PCA shows no differences between cases. *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* and *Acinetobacter* are the genera with the highest discriminatory power in the predictive model obtained by LDA method favorable to T samples. Only *Lachnoclostridium* appears as a genus in the predictive model in favor of NT samples. The validation study for the genes methylation level and *Fusobacterium* relative abundance has confirmed a positive correlation with *PLCH1*,

mirLET7D, *EGFR* and *COBL* genes. The *F. nucleatum* relative quantification has shown positive correlation only with *ZNF788* gene.

Were no differences for the quantification of *F. nucleatum* by sex or location. There are high *F. nucleatum* relative quantification levels with significant differences for proximal SAC/hmMSI CRC, larger tumors (T3, T4) and advanced stages (II, III, IV). There are also *F. nucleatum* relative quantification significant differences between MSS and MSI-H, CIMP-H and CIMP-L, *KRAS* and *BRAF* mutated states, while they are not found for *PIK3CA*. The multivariate analysis confirms that MSI status, CRC stage and CRC type are the variables with an significant association with *F. nucleatum* relative quantification. The *F. nucleatum* relative quantification has showed a diagnostic efficiency for CRC of 69%. The optimal cut-off point is established at a difference ≤ 10 cycles between *F. nucleatum* and total bacterial loads obtained by qPCR. The predictive model establishes that *F. nucleatum* relative quantification is an independent predictor for CRC (OR=2.23; 95% CI [1.51-3.30]) and for SAC/hm-MSI CRC versus CC (OR=2.00, 95%CI [1.22–3.28]).

Conclusions: *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* and *Acinetobacter* are potential bacterial CRC biomarkers. *PLCH1*, *mirLET7D*, *EGFR* and *COBL* genes have shown a hypermethylated state associated with the abundance of *Fusobacterium spp.* in T samples, while only *ZNF788* CpG methylation percentage has shown positive correlation with *F. nucleatum* relative quantification. Higher *F. nucleatum* level is significantly associated with SAC/hmMSI CRC type, advanced stage, MSI-H status, CIMP-H status and *BRAF* mutation, although multivariate analysis confirms the independent association with SAC/hmMSI CRC, advanced stages and MSI-H status. Due to *F. nucleatum* relative quantification good specificity, this parameter is proposed as an improving CRC screening/diagnosis candidate as non-invasive techniques, even being able to differentiate between CC and SAC/hmMSI.