



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**

Caracterización de la Microbiota Intestinal  
mediante "NGS" en Patología Neoplásica  
de Colon

D. Jorge Galán Ros

2015



# UNIVERSIDAD DE MURCIA

## FACULTAD DE MEDICINA

Caracterización de la microbiota intestinal mediante  
“NGS” en patología neoplásica de colon.

**Jorge Galán Ros**

2015



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Anatomía y fisiología del colon y recto.....</b>	<b>3</b>
3.1 Fisiología de las células epiteliales .....	7
<b>2. Cáncer colorrectal.....</b>	<b>8</b>
2.1 Concepto.....	8
2.2 Epidemiología e Incidencia.....	9
2.3 Estadíos del tumor.....	17
2.4 Etiología.....	20
2.5 Tipos de CCR.....	24
2.5.1 CCR familiar.....	24
2.5.2 CCR esporádico.....	25
2.6 Manifestaciones clínicas.....	29
2.7 Cribado.....	29
2.8 Diagnóstico.....	33
2.9 Terapias actuales.....	34
2.10 Genética del CCR.....	36
<b>3. Microbiota gastrointestinal.....</b>	<b>39</b>
3.1 Composición.....	39
3.2 Papel en la fisiología intestinal.....	40
3.3 Dinamismo.....	41
3.4 Implicación en el inicio y desarrollo del CCR.....	43

3.4.1 Modelo bacteriano <i>driver-passenger</i> .....	49
3.4.2 Posibles mecanismos bacterianos implicados en el desarrollo del CCR.....	51
3.4.3 Respuesta inmune innata a los microorganismos y su papel en el CCR.....	63
<b>4. Biología molecular en la caracterización y cuantificación de la microbiota.</b>	
<b>Secuenciación de próxima generación (NGS).....</b>	<b>66</b>
4.1 Introducción.....	66
4.2 Tipos.....	67
4.3 Aplicaciones.....	76
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>81</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>83</b>
<b>1. Pacientes y muestras.....</b>	<b>85</b>
1.1 Muestras empleadas para el estudio de poblaciones bacterianas mediante NGS y qPCR.....	86
1.2 Muestras empleadas para el estudio de validación mediante qPCR en una serie independiente de pacientes.....	86
<b>2. Toma de muestras y almacenamiento.....</b>	<b>86</b>
<b>3. Extracción y amplificación del DNA.....</b>	<b>87</b>
<b>4. Secuenciación mediante NGS.....</b>	<b>90</b>
<b>5. Análisis bioinformático.....</b>	<b>94</b>
<b>6. Estudio de validación mediante qPCR.....</b>	<b>99</b>
<b>7. Análisis estadístico.....</b>	<b>100</b>
<b>8. Consideraciones éticas.....</b>	<b>101</b>

---

<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>109</b>
<b>1. CAPÍTULO 1: Análisis diferencial de la composición microbiana en muestras de mucosa normal y tumoral en pacientes con CCR.....</b>	<b>111</b>
1.1 Introducción.....	111
1.2 Pacientes.....	111
1.3 Resultados.....	112
<b>2. CAPÍTULO 2: Análisis diferencial de la composición microbiana en muestras de mucosa en pacientes con CCR de tipo serrado y convencional.....</b>	<b>120</b>
2.1 Introducción.....	120
2.2 Pacientes.....	120
2.3 Resultados.....	121
<b>3. CAPÍTULO 3: Análisis diferencial de la composición microbiana entre muestras tumorales según su estadio TNM.....</b>	<b>126</b>
3.1 Introducción.....	126
3.2 Pacientes.....	126
3.3 Resultados.....	127

<b>4. CAPÍTULO 4: Análisis diferencial de la composición microbiana entre muestras de mucosa tumoral en colon proximal y distal de pacientes con CCR.....</b>	<b>130</b>
4.1 Introducción.....	130
4.2 Pacientes.....	130
4.3 Resultados.....	132
<b>5. CAPÍTULO 5: Caracterización de la microbiota intestinal según la secuencia: tejido normal-adenoma-adenocarcinoma.....</b>	<b>136</b>
5.1 Introducción.....	136
5.2 Pacientes.....	136
5.3 Resultados.....	137
<b>6. CAPÍTULO 6: Diversidad microbiana en muestras de heces de sujetos sanos y enfermos.....</b>	<b>142</b>
6.1 Introducción.....	142
6.2 Pacientes.....	142
6.3 Resultados.....	143
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>149</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>163</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>167</b>
<b>VIII. RESÚMEN. SUMMARY.....</b>	<b>191</b>
<b>IX. ABREVIATURAS.....</b>	<b>197</b>

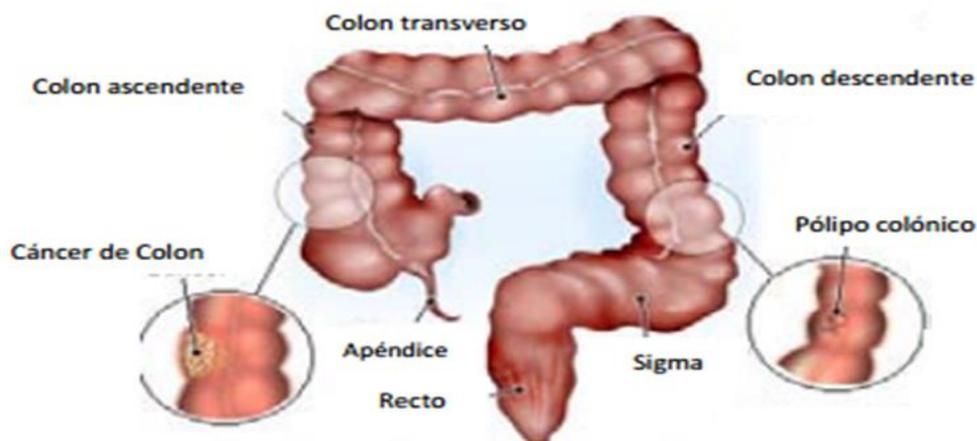
# I. INTRODUCCIÓN

---



## 1. Anatomía y fisiología del colon

Dentro del sistema digestivo, el colon y el recto forman un segmento conocido comúnmente como el intestino grueso. Se define como la porción del intestino desde la válvula íleocecal hasta el ano, con una longitud aproximada de 1,5 metros. Se encuentra dividido en los siguientes segmentos: ciego (con el apéndice), colon, recto y conducto anal. El colon es subdividido en cuatro partes: colon ascendente, transverso, descendente y sigmoide (Figura 1).



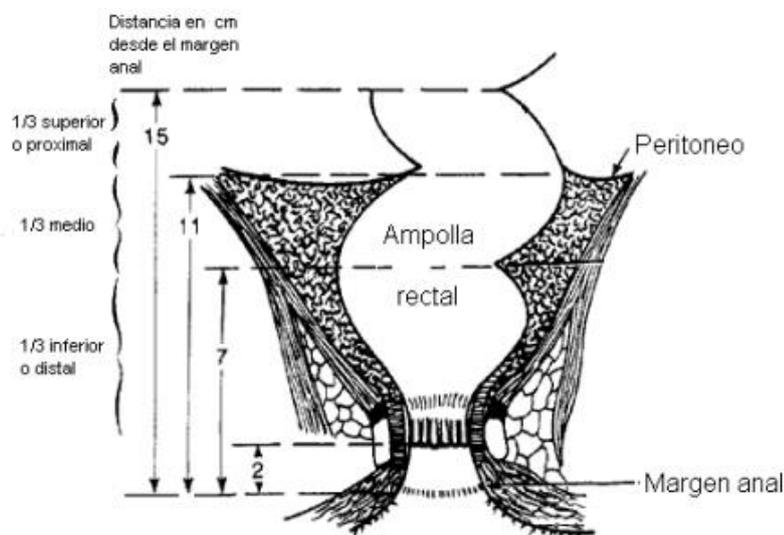
**Figura 1.** Esquema de la estructura anatómica del intestino grueso. Fuente: imagen tomada del repositorio de imágenes (*Suite of Health Care Products*).

El colon derecho localiza en la parte anterior al riñón derecho y duodeno. Se trata de una estructura retroperitoneal formada por el ciego (con el apéndice) y el colon ascendente. Su irrigación vascular está sustentada por las ramas derivadas de la arteria mesentérica superior (SMA). El colon transverso se considera una estructura intraperitoneal con una longitud variable y su aporte vascular deriva de la arteria cólica media. Los límites del colon transverso están definidos a la derecha por el ángulo hepático y a la izquierda por la flexura esplénica. 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. El colon descendente localiza en el lado izquierdo y recibe su suministro de

## Introducción

sangre a través de la arteria mesentérica inferior (AMI) (Lin & Chaikof, 2000; Sagar & Pemberton, 1997).

El recto es la porción final del tubo digestivo y es una estructura extraperitoneal que se puede dividir en tres porciones, la parte distal a aproximadamente 3 a 6 cm del margen anal, la parte media de 6 a 8-10 cm y la parte distal que suele extenderse hasta aproximadamente 12- 15 cm del margen anal (Figura 2) (Van Cutsem et al., 2008).



**Figura 2.** División del recto en tercio superior o proximal, tercio medio y tercio inferior o distal. Fuente: imagen tomada de (Carballal, Moreira, & Balaguer, 2013)

En la parte interna del recto se encuentran las valvas de *Houslon*, las cuales consisten en unos pliegues mucosos de la pared hacia la luz del tubo. Rodeando al recto se encuentra el mesorecto, el cual está constituido por tejido graso que contiene estructuras linfáticas, vasculares y nerviosas (Heald & Moran, 1998).

El aporte sanguíneo del recto proximal se realiza principalmente a través de tres arterias, que son: 1) la arteria hemorroidal superior, rama terminal de la arteria mesentérica inferior, 2) la arteria hemorroidal media, rama de la arteria hipogástrica y 3) la arteria hemorroidal inferior, rama de la arteria pudenda interna. El drenaje venoso viene dado por las venas hemorroidales superiores que desembocan en la vena porta a través de la vena mesentérica inferior. El tercio medio y distal del recto reciben aporte sanguíneo de

las arterias hemorroidales medias e inferiores respectivamente, que se dirigen hacia la vena cava inferior (Irving & Catchpole, 1992; Sakorafas, Zouros, & Peros, 2006).

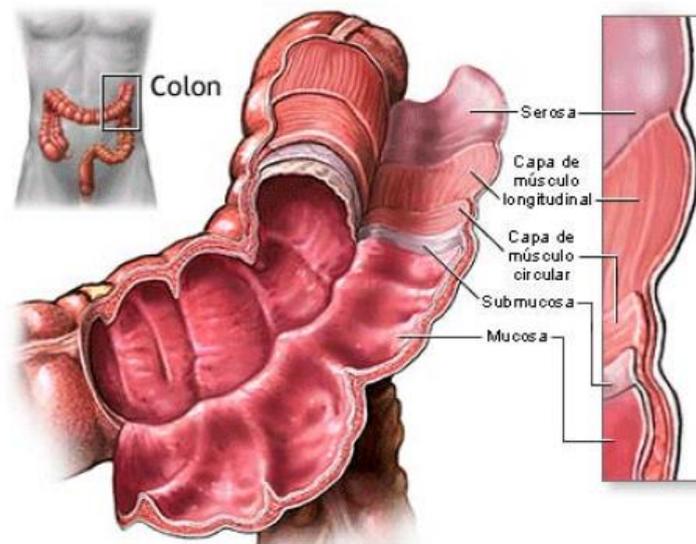
Entre las funciones principales del colon y el recto se encuentran la absorción de agua y electrolitos, así como la compactación, transporte y eliminación de los alimentos no digeridos.

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

Características	Colon proximal	Colon distal	Recto
<b>Fisiología</b>			
<b>Origen embrionario</b>	Intestino medio	Intestino grueso	Intestino grueso
<b>Aporte sanguíneo</b>	Arteria mesentérica superior	Arteria mesentérica inferior	Arteria mesentérica inferior
<b>Funciones</b>	Absorción de agua y nutrientes	Absorción de agua y nutrientes	Almacenamiento fecal
<b>Carcinogénesis</b>			
<b>Mecanismos moleculares</b>	MSI	CIN	MSS;CIN
<b>Factores de riesgo</b>			
<b>Fibra</b>	Mayor efecto protector	Menor efecto protector	Poco o nulo efecto protector

**Tabla 1.** Características diferenciales entre las tres partes anatómicas del intestino grueso.

El colon es un órgano hueco cubierto, que consta desde la parte más interna a la más externa de una membrana mucosa formada por el epitelio, la lámina propia y una capa muscular de la mucosa, una submucosa, dos capas musculares (una circular y otra longitudinal) y una capa serosa. (Figura 3).



**Figura 3.** Conjunto de capas que conforman la pared del intestino grueso. Fuente: imagen tomada del repositorio de imágenes (*Suite of Health Care Products*).

Las condiciones fisiológicas del colon varían a lo largo del mismo. En cuanto al Ph, el colon ascendente y transversal presentan unos valores de entre 5,6 y 5,7, lo cual es atribuido a la rápida fermentación de los ácidos grasos de cadena corta. El pH en colon descendente, sigma y recto aumenta a 6,6-6,8 debido a la fermentación de los ácidos grasos de cadena corta y secreción de bicarbonato por la mucosa. El potencial *redox* del colon varía desde 200 mV hasta los -300 mV y la presión de oxígeno en el lumen se sitúa entre 299 y 39 mmHg, es decir la cantidad de oxígeno presente en el lumen representa del 18% al 25%.

La existencia en el recto de un sistema doble venoso, hace que los tumores rectales tengan dos posibles vías de diseminación sanguínea: la primera hacia el hígado a través de la vena porta, y la segunda hacia el pulmón a través de la vena cava inferior.

La diseminación del CCR se explica principalmente mediante tres vías: a) locorregional, a través de la submucosa y capa muscular, extendiéndose hacia estructuras adyacentes y ganglios linfáticos regionales; b) venosa por vía portal, con metástasis a distancia y sobre todo hepáticas, y c) transcelómica a peritoneo, que da lugar a carcinomatosis peritoneal.

En cuanto a la localización, el 60% se sitúan a nivel del colon, siendo más frecuente a nivel distal que proximal, mientras el 40% restante se localiza en recto o unión

rectosigmoidea. Se define tumor rectal si el extremo distal se localiza a menos de 16 cm del anillo anal, y tumor colónico si se encuentra por encima de dicha localización.

Para establecer el grado de diferenciación de un tumor, se utilizan de forma general los criterios de *Broders*, los cuales clasifican a los tumores en grados de severidad del 1 al 4, de acuerdo con la cantidad de estructuras glandulares, la polaridad de los núcleos y la orientación basal. Los tumores bien diferenciados son aquellos en los que el 95% están constituidos por glándulas y corresponden a tumores de bajo grado, y generalmente se consideran como los de comportamiento menos agresivo. Por el contrario, los tumores de alto grado son tumores poco diferenciados que presentan de un 5–49% de glándulas, y generalmente son los de comportamiento más agresivo.

### **1.1 Fisiología de las células epiteliales intestinales**

Los CCR se desarrollan en las células epiteliales. Para entender cómo se inicia este proceso, es imprescindible conocer el funcionamiento de las células epiteliales del tracto gastrointestinal (TGI) y las células encargadas de la regeneración celular.

El colon y el recto son órganos que cambian su epitelio aproximadamente cada cinco días y las *stem cells* (SCs) son las encargadas de regular este complejo proceso. Histológicamente el epitelio se estructura uniformemente en las criptas de *Lieberkühn* que contienen entre 2000 y 3000 células y constituyen una unidad funcional (Figura 4). Al menos se estima que hay hasta 14000 criptas/cm<sup>2</sup> (Cheng, Bjerknes, & Amar, 1984).

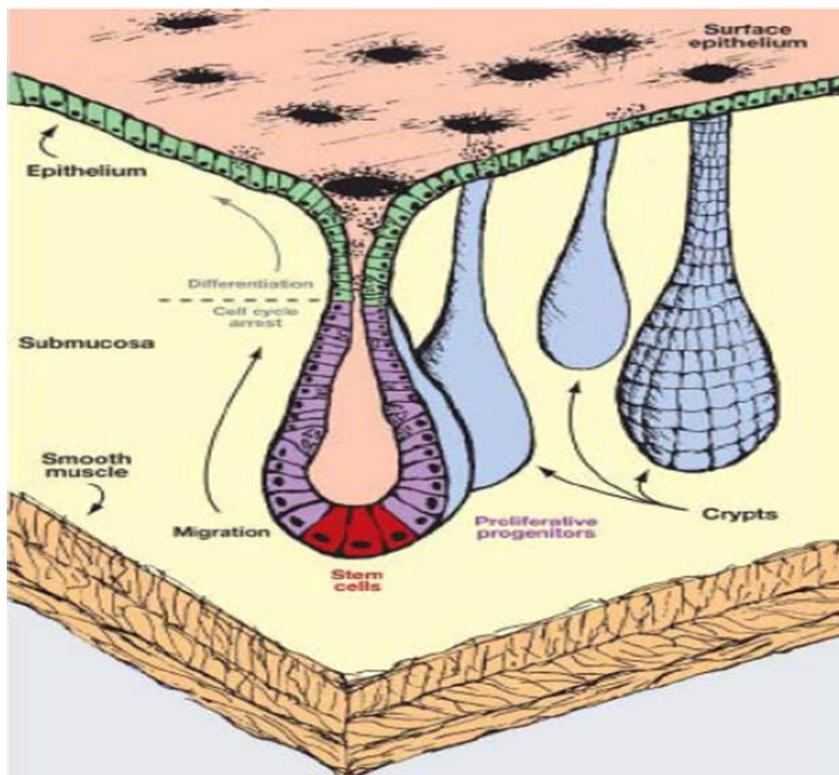
Existen tres tipos de células diferentes que forman la cripta: colonocitos o célula columnares, células secretoras de mucina y células endocrinas. En cada cripta hay hasta 20 SCs responsables de la renovación de las células de la cripta. Se pueden diferenciar tres tipos de SCs según su capacidad para diferenciarse, que depende de su estadio de desarrollo: células totipotentes, células pluripotentes y células multipotentes.

Una función de las SCs es ayudar a mantener la homeostasis y también participar en la reparación del tejido cuando se produce una lesión (Verfaillie, Pera, & Lansdorp, 2002). Las SCs se localizan en la parte más basal de la cripta y cuando se dividen, una célula hija mantiene las características de SCs y la otra se diferencia en los diferentes posibles tipos y va subiendo a la parte superior de la cripta hasta la luz del colon o recto.

## Introducción

Existen evidencias que las SCs son el origen de los tumores intestinales. Como ya se ha comentado anteriormente, los tumores necesitan años para desarrollarse y los colonocitos tienen una vida media muy corta para poder ser el origen.

En cambio, las SCs tienen una vida más larga y pueden acumular mutaciones asociadas a un tumor a lo largo de los años. Recientes estudios apoyan que las SCs multipotentes son las que originan el tumor dado que son capaces de diferenciarse en otros tipos celulares incluyendo las células tumorales.



**Figura 4.** Estructura citológica de las criptas de *Lieberkühn*. Fuente: imagen tomada de la publicación (Sancho, Batlle, & Clevers, 2004)

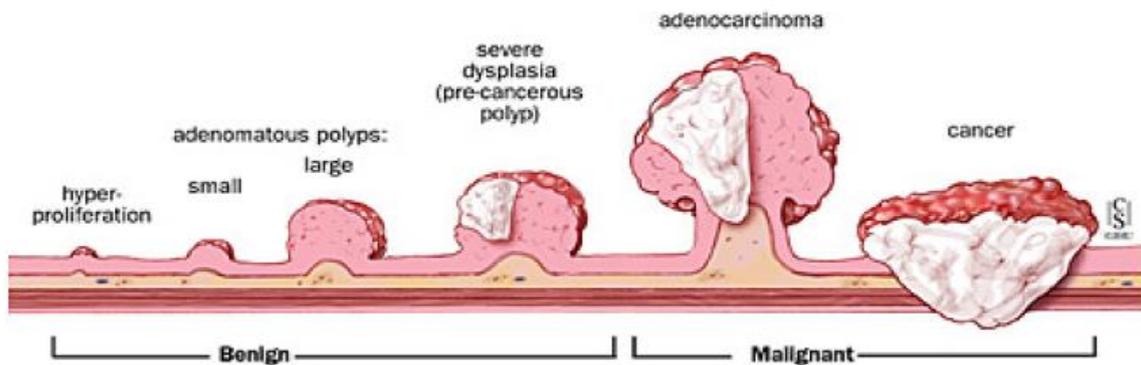
## 2. Cáncer colorrectal

### 2.1 Concepto

El cáncer se define como el crecimiento celular no controlado y con capacidad de invasión causando daño a tejidos y órganos.

Éste descontrol celular es debido a mutaciones en genes que controlan la proliferación celular. El CCR es un tipo de cáncer que como su nombre indica se desarrolla en el colon

o el recto. Consiste en un crecimiento incontrolado de las células del colon o recto y se puede desarrollar en cada una de las capas: mucosa, muscular y serosa. Progresa mediante cambios clínicos e histopatológicos de una lesión en la cripta a pequeños tumores benignos (pólipos adenomatosos) y finalmente a cánceres malignos (carcinomas) (Figura 5).



**Figura 5.** Representación gráfica de la evolución en el desarrollo del CCR. Fuente: imagen tomada de (Mas de Xaxars Rivero, 2012)

El CCR se desarrolla a lo largo de un periodo de tiempo que puede durar incluso años. En primer lugar surge del tejido glandular del colon o recto, el cual evolucionará hasta un adenoma canceroso. El adenocarcinoma es el tipo más frecuente, estando presente en más del 90% de los casos. En cambio, otros tumores son relativamente raros e incluyen los tumores carcinoides (0,1% de los casos), el linfoma (1,3%) y los tumores estromales gastrointestinales (menos del 1%) (Boring, Squires, Tong, & Montgomery, 1994; Network, 2010).

## 2.2 Epidemiología e Incidencia

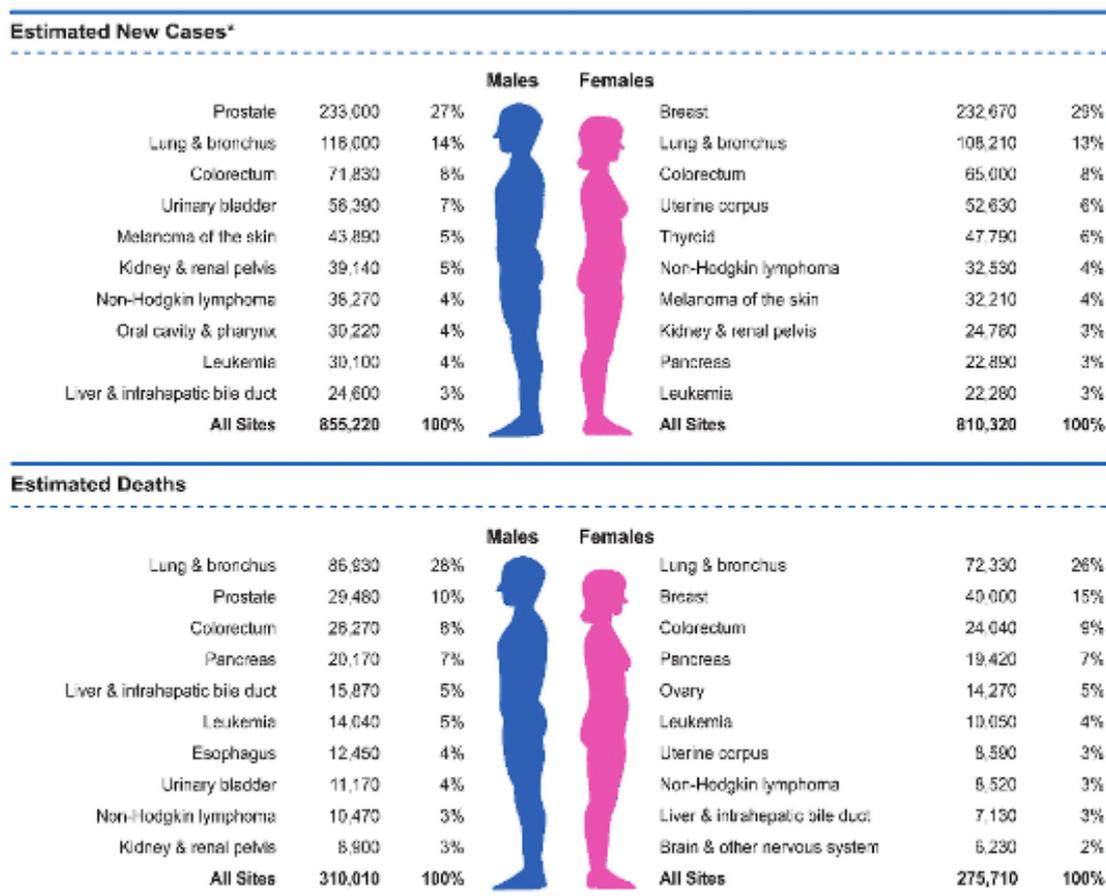
Dentro de todos los tipos de cáncer, el CCR es una de las neoplasias más frecuentes en nuestro medio y representa un problema importante de salud pública ya que en diferentes países desarrollados ocupa uno de los primeros lugares en incidencia y mortalidad tanto hombres como mujeres (Tabla 2) (Colella, Llinás, & Colella, 2010).

## Introducción

	ESTIMATED NEW CASES			ESTIMATED DEATHS		
	BOTH SEXES	MALE	FEMALE	BOTH SEXES	MALE	FEMALE
<b>All sites</b>	<b>1,665,540</b>	<b>855,220</b>	<b>810,320</b>	<b>585,720</b>	<b>310,010</b>	<b>275,710</b>
<b>Oral cavity &amp; pharynx</b>	<b>42,440</b>	<b>30,220</b>	<b>12,220</b>	<b>8,390</b>	<b>5,730</b>	<b>2,660</b>
Tongue	13,590	9,720	3,870	2,150	1,450	700
Mouth	11,920	7,150	4,770	2,070	1,130	940
Pharynx	14,410	11,550	2,860	2,540	1,900	640
Other oral cavity	2,520	1,800	720	1,630	1,250	380
<b>Digestive system</b>	<b>289,610</b>	<b>162,730</b>	<b>126,880</b>	<b>147,260</b>	<b>84,970</b>	<b>62,290</b>
Esophagus	18,170	14,660	3,510	15,450	12,450	3,000
Stomach	22,220	13,730	8,490	10,990	6,720	4,270
Small intestine	9,160	4,880	4,280	1,210	640	570
Colon†	96,830	48,450	48,380	50,310	26,270	24,040
Rectum	40,000	23,380	16,620			
Anus, anal canal, & anorectum	7,210	2,660	4,550	950	370	580
Liver & intrahepatic bile duct	33,190	24,600	8,590	23,000	15,870	7,130
Gallbladder & other biliary	10,650	4,960	5,690	3,630	1,610	2,020
Pancreas	46,420	23,530	22,890	39,590	20,170	19,420
Other digestive organs	5,760	1,880	3,880	2,130	870	1,260
<b>Respiratory system</b>	<b>242,550</b>	<b>130,000</b>	<b>112,550</b>	<b>163,660</b>	<b>90,280</b>	<b>73,380</b>
Larynx	12,630	10,000	2,630	3,610	2,870	740
Lung & bronchus	224,210	116,000	108,210	159,260	86,930	72,330
Other respiratory organs	5,710	4,000	1,710	790	480	310
<b>Bones &amp; joints</b>	<b>3,020</b>	<b>1,680</b>	<b>1,340</b>	<b>1,460</b>	<b>830</b>	<b>630</b>
<b>Soft tissue (including heart)</b>	<b>12,020</b>	<b>6,550</b>	<b>5,470</b>	<b>4,740</b>	<b>2,550</b>	<b>2,190</b>
<b>Skin (excluding basal &amp; squamous)</b>	<b>81,220</b>	<b>46,630</b>	<b>34,590</b>	<b>12,980</b>	<b>8,840</b>	<b>4,140</b>
Melanoma-skin	76,100	43,890	32,210	9,710	6,470	3,240
Other nonepithelial skin	5,120	2,740	2,380	3,270	2,370	900
<b>Breast</b>	<b>235,030</b>	<b>2,360</b>	<b>232,670</b>	<b>40,430</b>	<b>430</b>	<b>40,000</b>
<b>Genital system</b>	<b>338,450</b>	<b>243,460</b>	<b>94,990</b>	<b>58,970</b>	<b>30,180</b>	<b>28,790</b>
Uterine cervix	12,360		12,360	4,020		4,020
Uterine corpus	52,630		52,630	8,590		8,590
Ovary	21,980		21,980	14,270		14,270
Vulva	4,850		4,850	1,030		1,030
Vagina & other genital, female	3,170		3,170	880		880
Prostate	233,000	233,000		29,480	29,480	
Testis	8,820	8,820		380	380	
Penis & other genital, male	1,640	1,640		320	320	
<b>Urinary system</b>	<b>141,610</b>	<b>97,420</b>	<b>44,190</b>	<b>30,350</b>	<b>20,610</b>	<b>9,740</b>
Urinary bladder	74,690	56,390	18,300	15,580	11,170	4,410
Kidney & renal pelvis	63,920	39,140	24,780	13,860	8,900	4,960
Ureter & other urinary organs	3,000	1,890	1,110	910	540	370
<b>Eye &amp; orbit</b>	<b>2,730</b>	<b>1,440</b>	<b>1,290</b>	<b>310</b>	<b>130</b>	<b>180</b>
<b>Brain &amp; other nervous system</b>	<b>23,380</b>	<b>12,820</b>	<b>10,560</b>	<b>14,320</b>	<b>8,090</b>	<b>6,230</b>
<b>Endocrine system</b>	<b>65,630</b>	<b>16,600</b>	<b>49,030</b>	<b>2,820</b>	<b>1,300</b>	<b>1,520</b>
Thyroid	62,980	15,190	47,790	1,890	830	1,060
Other endocrine	2,650	1,410	1,240	930	470	460
<b>Lymphoma</b>	<b>79,990</b>	<b>43,340</b>	<b>36,650</b>	<b>20,170</b>	<b>11,140</b>	<b>9,030</b>
Hodgkin lymphoma	9,190	5,070	4,120	1,180	670	510
Non-Hodgkin lymphoma	70,800	38,270	32,530	18,990	10,470	8,520
<b>Myeloma</b>	<b>24,050</b>	<b>13,500</b>	<b>10,550</b>	<b>11,090</b>	<b>6,110</b>	<b>4,980</b>
<b>Leukemia</b>	<b>52,380</b>	<b>30,100</b>	<b>22,280</b>	<b>24,090</b>	<b>14,040</b>	<b>10,050</b>
Acute lymphocytic leukemia	6,020	3,140	2,880	1,440	810	630
Chronic lymphocytic leukemia	15,720	9,100	6,620	4,690	2,800	1,890
Acute myeloid leukemia	18,860	11,530	7,330	10,460	6,010	4,450
Chronic myeloid leukemia	5,980	3,130	2,850	810	550	260
Other leukemia†	5,800	3,200	2,600	6,780	3,870	2,910
<b>Other &amp; unspecified primary sites†</b>	<b>31,430</b>	<b>16,370</b>	<b>15,060</b>	<b>44,680</b>	<b>24,780</b>	<b>19,900</b>

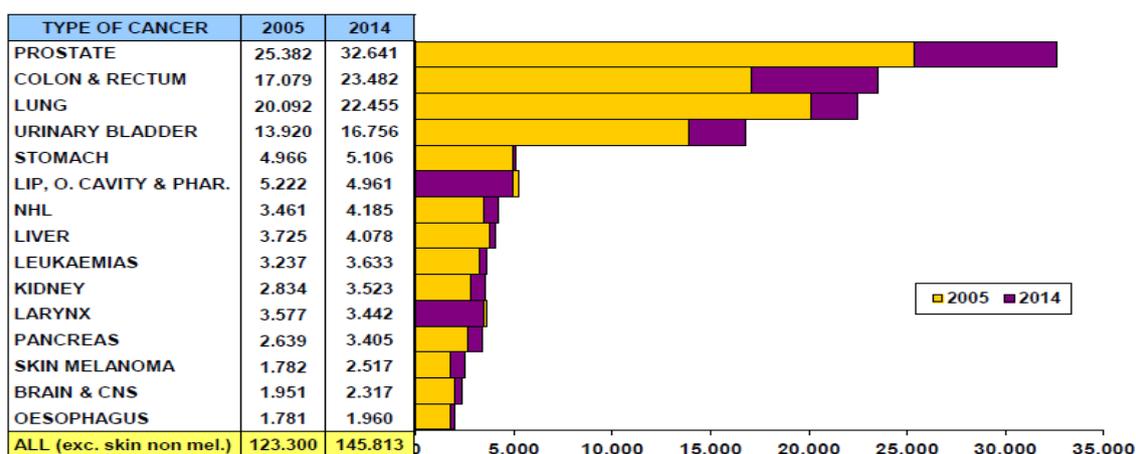
**Tabla 2.** Número de casos nuevos y muertes por CCR en Estados Unidos. Fuente: imagen tomada de la publicación CA CANCER J CLIN 2014;64:9-22

En EEUU supone el tercer tipo de cáncer más frecuente entre hombres y mujeres. Además representa la tercera causa de muerte por cáncer, tras el cáncer de pulmón y próstata en hombres así como de pulmón y mama en mujeres (Tabla 3) (Siegel, Ma, Zou, & Jemal, 2014).

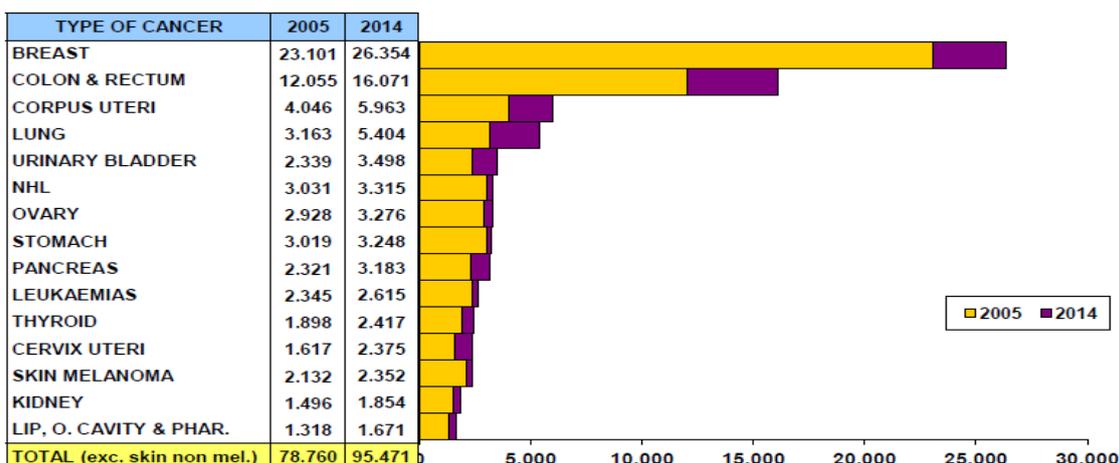


**Tabla 3.** Distribución por sexo y tipo de cáncer. Incidencia y mortalidad en Estados Unidos. Fuente: imagen tomada de la publicación CA CANCER J CLIN 2014;64:9-22

En los países occidentales supone el segundo tumor con más incidencia después del tumor de mama en mujeres y de próstata en hombres, y la segunda causa de muerte oncológica después del cáncer de pulmón en los hombres y el de mama en las mujeres (Tablas 4 y 5) (Colella et al., 2010).



**Tabla 4.** Número estimado de la incidencia de casos/ año en varones por tipo de cáncer en España durante el periodo 2005-2014. Fuente: imagen tomada de la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN). 2014.



**Tabla 5.** Número estimado de la incidencia de casos/ año en mujeres por tipo de cáncer en España durante el periodo 2005-2014. Fuente: imagen tomada de la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN). 2014.

A nivel mundial se estima que existen más de 1 millón de nuevos casos de CCR cada año (Tenesa & Dunlop, 2009). La base de datos americana SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results Programs*) predice una supervivencia relativa, a los cinco años tras el diagnóstico, del 63% en la población blanca de EE.UU y del 53% en la raza negra. Los registros de tumores europeos hablan de una supervivencia a los 5 años significativamente menor, del 41% y 42% respectivamente (Tenesa & Dunlop, 2009).

En los últimos diez años, EEUU ha asistido a una reducción de la incidencia anual en un 1,7% (Siegel et al., 2014). Esta disminución de la incidencia del CCR y la mejoría de la supervivencia son consecuencia de una combinación de factores. Por un lado, el mayor despistaje mediante la realización de endoscopias y el uso de la polipectomía endoscópica, y por otro lado los cambios en el estilo de vida, la dieta, el uso de bajas dosis de ácido acetilsalicílico y la reducción del hábito tabáquico.

Los datos en España del último documento oficial, “La Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN)” del 2014, recoge una estimación en el número de casos nuevos por año en torno a 23.482 casos en hombres y 16.071 casos en mujeres (Tablas 6 y 7). La tasa de supervivencia a los 5 años es superior al 50% en ambos sexos.

TYPE OF CANCER	CASES	95% CI	CR	ASRw	ASRe	Scenario
LIP, ORAL CAVITY AND PHARYNX	4.961	( 3.884 - 6.193 )	21,8	12,7	17,8	B
OESOPHAGUS	1.960	( 1.736 - 2.209 )	8,6	4,8	6,8	B
STOMACH	5.106	( 4.649 - 5.601 )	22,4	11,0	16,4	B
COLON & RECTUM	23.482	( 21.216 - 26.004 )	103,2	49,8	75,2	CB
COLON	15.198	( 13.121 - 17.522 )	66,8	31,5	48,0	C
RECTUM	8.284	( 7.377 - 9.264 )	36,4	18,3	27,2	B
LIVER	4.078	( 3.496 - 4.709 )	17,9	9,5	13,8	A
GALLBLADDER & BILIARY TRACT	1.081	( 861 - 1.336 )	4,8	2,1	3,3	B
PANCREAS	3.405	( 3.060 - 3.781 )	15,0	7,5	11,1	A
LARYNX	3.442	( 3.003 - 3.918 )	15,1	8,9	12,5	A
LUNG	22.455	( 19.952 - 25.212 )	98,7	51,7	75,8	C
SKIN MELANOMA	2.517	( 2160 - 2905 )	11,1	6,1	8,6	A
PROSTATE	32.641	( 26.966 - 38.998 )	143,5	67,6	103,4	*
TESTIS	997	( 893 - 1.109 )	4,4	4,3	4,4	A
KIDNEY	3.523	( 3.128 - 3.952 )	15,5	8,5	12,2	A
URINARY BLADDER	16.756	( 15.091 - 18.534 )	73,7	36,7	54,9	B
BRAIN & CENTRAL NERVOUS SYSTEM	2.317	( 2.078 - 2.578 )	10,2	6,5	8,4	A
THYROID	801	( 709 - 902 )	3,5	2,3	3,0	A
HODGKIN'S LYMPHOMA	923	( 819 - 1.035 )	4,1	3,7	3,9	A
NON HODGKIN'S LYMPHOMA	4.185	( 3.666 - 4.752 )	18,4	10,8	14,6	A
MYELOMA	1.466	( 1.013 - 2.110 )	6,4	3,0	4,6	C
LEUKAEMIAS	3.633	( 3.044 - 4.306 )	16,0	9,4	12,4	B
OTHER CANCERS	6.084	( 5.205 - 7.049 )	26,7	14,3	20,3	A
TOTAL (except skin non melanoma)	145.813	( 138.709 - 153.734 )	641,0	331,0	483,3	-

**Tabla 6.** Estimación sobre incidencia en hombres en los tumores más frecuentes. Fuente: imagen tomada de la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN). 2014.

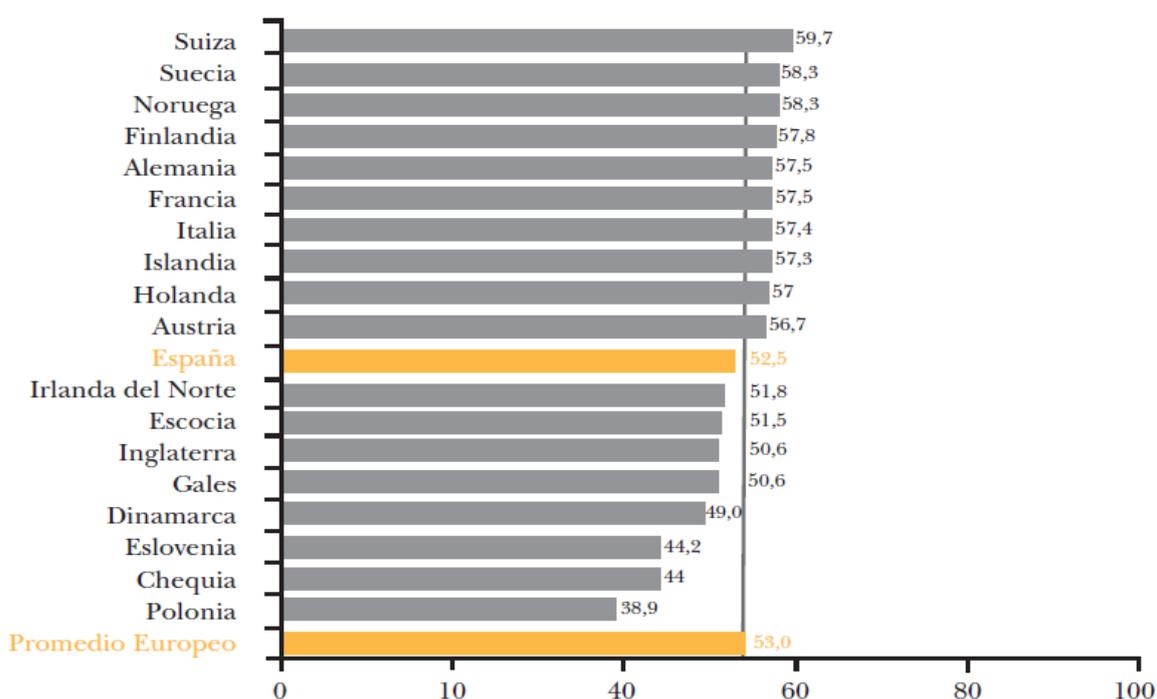
TYPE OF CANCER	CASES	95% CI	CR	ASRw	ASRe	Scenario
LIP, ORAL CAVITY AND PHARYNX	1.671	( 1.473 - 1.886 )	7,1	3,4	4,8	A
OESOPHAGUS	387	( 302 - 488 )	1,6	0,7	1,1	B
STOMACH	3.248	( 2.924 - 3.598 )	13,8	5,3	8,0	B
COLON & RECTUM	16.071	( 14.623 - 11.712 )	68,1	27,7	41,1	BC
COLON	11.687	( 10.529 - 12.934 )	49,5	19,8	29,5	B
RECTUM	4.384	( 3.515 - 5.450 )	18,6	7,9	11,6	C
LIVER	1.552	( 1.288 - 1.848 )	6,6	2,3	3,6	A
GALLBLADDER & BILIARY TRACT	1.033	( 874 - 1.212 )	4,4	1,4	2,2	B
PANCREAS	3.183	( 2.836 - 3.562 )	13,5	4,9	7,5	A
LARYNX	295	( 127 - 663 )	1,3	0,7	1,0	C
LUNG	5.404	( 4.856 - 6.003 )	22,9	11,8	16,6	B
SKIN MELANOMA	2.352	( 2.038 - 2.695 )	10,0	5,7	7,5	A
BREAST	26.354	( 22.991 - 30.117 )	111,7	63,0	85,0	C
CERVIX UTERI	2.375	( 1.969 - 2.839 )	10,1	6,3	8,2	B
CORPUS UTERI	5.963	( 5.232 - 6.759 )	25,3	13,0	18,5	A
OVARY	3.276	( 2.904 - 3.681 )	13,9	7,4	10,2	A
KIDNEY	1.854	( 1.600 - 2.139 )	7,9	3,9	5,4	A
URINARY BLADDER	3.498	( 2.989 - 4.059 )	14,8	5,9	8,8	B
BRAIN & CENTRAL NERVOUS SYSTEM	1.646	( 1.443 - 1.866 )	7,0	4,0	5,2	A
THYROID	2.417	( 2.252 - 2.590 )	10,2	6,6	8,9	A
HODGKIN'S LYMPHOMA	669	( 582 - 765 )	2,8	2,6	2,7	A
NON HODGKIN'S LYMPHOMA	3.315	( 2.944 - 3.716 )	14,1	6,9	9,5	A
MYELOMA	1.233	( 862 - 1.751 )	5,2	2,0	3,0	C
LEUKAEMIAS	2.615	( 2.199 - 3.090 )	11,1	5,7	7,3	B
OTHER CANCERS	5.060	( 4.302 - 5.882 )	21,4	9,0	12,8	A
TOTAL (except skin non melanoma)	95.471	( 91.414 - 100.025 )	404,7	200,3	278,8	-

**Tabla 7.** Estimación sobre incidencia en mujeres en los tumores más frecuentes. Fuente: imagen tomada de la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN). 2014.

Los resultados del EURO CARE-4 (*European Cancer Registry Study of Survival and Care of Cancer Patients*) muestran que la supervivencia media a los 5 años ajustada por edad para los pacientes adultos (> 15 años) diagnosticados ente 2000-2007 presenta marcadas diferencias entre la población europea.

La supervivencia media en España es del 57.1% y se sitúa por encima de la media europea (57%) (Berrino et al., 2007). Los resultados de los diferentes estudios EURO CARE, 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 (Berrino et al., 2007). Los incrementos en la supervivencia entre los períodos 1999-2001 y 2005-2007 fueron notables: 52.1% (IC 95%: 51.6-52.6) versus 57.6% (IC 95%: 57.1-58.1).

De este modo, en comparación con otros países europeos, España ocupa una posición intermedia en cuanto a incidencia y mortalidad por CCR, y se constata una mejoría en los últimos años (Figura 6).



**Figura 6.** Resultados expresados en porcentaje de supervivencia a 5 años. Período de diagnóstico entre 1995 y 1999 y seguimiento hasta 2003. Fuente: imagen tomada de EURO CARE- 4 (Berrino et al., 2007)

Sin embargo, estos datos son orientativos, puesto que en EURO CARE sólo participan 8 registros de tumores que cubren el 16% de la población española. Además, en el análisis de supervivencia no se tienen en cuenta el sexo, la histología o el estadio del tumor.

La supervivencia del CCR depende fundamentalmente del estadio tumoral en el momento del diagnóstico. Así, en los pacientes con estadio I, II, III y IV, de acuerdo con la clasificación TNM, la supervivencia a los 5 años es del 95-100%, el 70-85%, el 50-70% y el 5-15%, respectivamente (Ahlquist & Pasha, 2003).

Por otro lado, una de las características que presenta el CCR es su variabilidad geográfica, no sólo entre diferentes países sino también en áreas dentro de un mismo país. Esta variación geográfica en la incidencia demuestra en gran medida la importancia de los factores ambientales. 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 regiones geográficas (Parkin, Bray, Ferlay, & Pisani, 2005).

Entre los factores que más impactan sobre la incidencia del CCR esporádico, encontramos la edad, el sexo o la raza. La edad supone factor clave en su desarrollo, ya que aumenta de forma importante por encima de los 45 o 50 años para todos los grupos de población. El 90% de todos los CCR esporádicos se desarrollan a partir de los 50 años, aunque en un pequeño porcentaje de casos, el cáncer puede desarrollarse a una edad anterior de los 40 años (Horner et al., 2009)

En cuanto a las tasas de incidencia y mortalidad por sexo, encontramos que son mayores en hombres que en mujeres (Murphy et al., 2011). También es importante reconocer que la carga de CCR varía mucho dentro de los grupos raciales / étnicos (Perdue et al., 2008).

La distribución anatómica del CCR varía en las series estudiadas. En un estudio realizado en nuestro medio, se muestra que a mayoría de los tumores se localizan en el recto (37%) y sigma (31%), siendo menos frecuentes en colon ascendente (9%), ciego (8%), colon descendente (5%), colon transversal (4%), ángulo hepático (4%) y ángulo esplénico (2%) (Piñol et al., 2004). Además, en los últimos años hemos asistido a un desplazamiento aparente en la distribución anatómica del CCR, con menos lesiones izquierdas y más cánceres en el derecho (Mensink, Kolkman, Van Baarlen, & Kleibeuker, 2002).

El cáncer de recto tiene una ligera predilección por el hombre y su prevalencia aumenta de forma constante después de los 50 años (Network, 2010). Debido a que el cáncer de recto tiene una tasa de recurrencia local más alta, en parte debido a su localización extraperitoneal, y una mayor morbilidad, requiere de estrategias diagnósticas y terapéuticas diferenciadas (Colella et al., 2010).

En general, existe acuerdo en que el 70-80% de los casos de cáncer son esporádicos, mientras que una pequeña proporción de ellos corresponde a formas hereditarias, ya sea la poliposis adenomatosa familiar (FAP) (menos del 1%), el cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC) o síndrome de Lynch (2-5%), o la poliposis asociada al gen MYH (<1%) (Barnetson et al., 2007). Sin embargo, se estima que en un 15-20% adicional de casos puede existir un componente hereditario asociado aún no bien establecido (Piñol et al., 2004).

Diferentes estudios epidemiológicos han caracterizado la historia natural del CCR en una secuencia adenoma-carcinoma, la cual se caracteriza por cambios genéticos en las células epiteliales de la mucosa del colon, constituyendo un elemento esencial en la etiología del mismo. (Jackman & Mayo, 1951).

Sin embargo no todos los adenomas progresan a cáncer, siendo solo aquellos adenomas mayores de 1 cm los que presentan un 15% de posibilidades de progresar a carcinoma en un período de 10 años (Stryker et al., 1987). Esto viene determinado por ciertas características, tales como el tamaño, presencia de displasia de alto grado y la predominancia de vellosidades, que predicen el potencial maligno de un adenoma (S. J. Winawer et al., 1993).

En los últimos años hemos asistido a importantes avances en el conocimiento de los mecanismos moleculares que participan en el desarrollo del cáncer digestivo, especialmente a nivel colorrectal.

El concepto actual de carcinogénesis colorrectal implica una cascada de fallos genéticos que afectan a genes reparadores del DNA, a oncogenes y genes supresores de tumores. La acumulación de estas alteraciones genéticas en el epitelio colónico requiere algunos años, normalmente décadas, lo que está de acuerdo con la edad media de los pacientes diagnosticados de CCR (alrededor de 65-70 años).

En este sentido, podemos afirmar que las neoplasias colorrectales mantienen una elevada incidencia en España, sin embargo su mortalidad ha disminuido gracias a su detección más precoz, a la mejora de las técnicas y estrategias quirúrgicas y al desarrollo de tratamientos neoadyuvantes (López-Abente et al., 2004) .

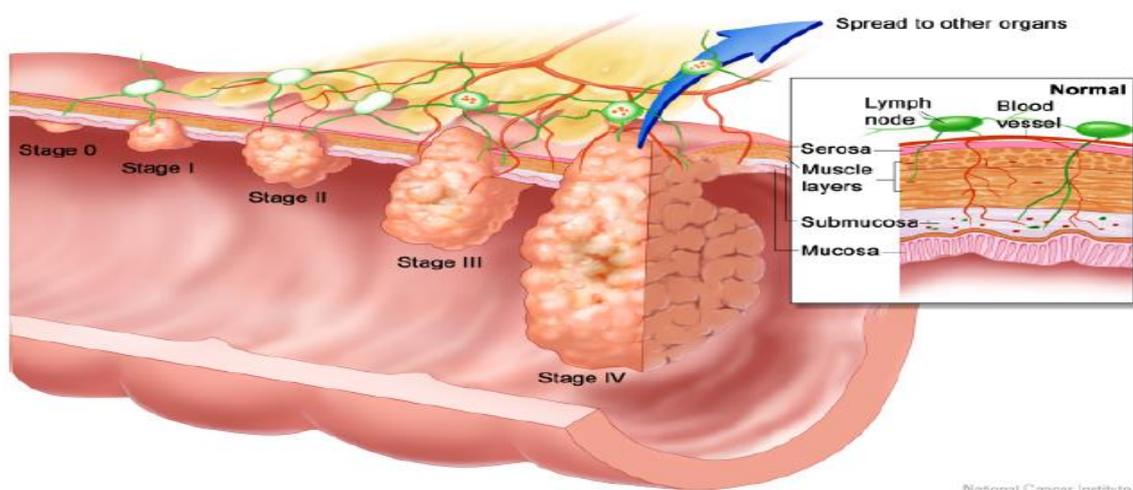
### **2.3 Estadíos del tumor**

En un paciente diagnosticado de CCR, antes de tomar decisiones terapéuticas, es primordial establecer la estadificación precisa de la enfermedad, la relación del tumor con las estructuras vecinas y la presencia de factores que agraven el pronóstico del paciente. Esta información será tanto más importante cuanto más particularizadas sean las estrategias terapéuticas del grupo en el que trabajemos.

En este sentido, la clasificación TNM (Tabla 8), 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 y se utilizan más que las clásicas de *Astler-Coller* modificada o de *Dukes* (Compton & Greene, 2004; Van Cutsem et al., 2008).

## Introducción

En ella, la valoración del tumor primario (T) incluye TX cuando el tumor primario no puede ser evaluado, T0 si no hay evidencia de tumor primario, Tis si es carcinoma in situ, T1 cuando el tumor invade la submucosa, T2 si invade la muscular propia, T3 si penetra a través de la muscular propia e invade la subserosa o el tejido perirrectal no peritonealizado y T4 si invade directamente otros órganos o estructuras o perfora el peritoneo visceral (Figura 7).



**Figura 7.** Desarrollo del CCR por sus diferentes estadios. Fuente: imagen tomada de la publicación (Jemal & Siegel, 2011).

La valoración ganglionar (N) incluye, NX que indica que los ganglios linfáticos no pueden ser evaluados, N0 si no hay metástasis en ganglios linfáticos regionales, N1 cuando hay metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos regionales y N2 si hay metástasis en 4 o más ganglios linfáticos (Tabla 8).

La presencia de metástasis a distancia incluye MX si las metástasis a distancia no pueden ser evaluadas, M0 si no hay metástasis a distancia y M1 cuando las hay (Tabla 8).

Categorías		Descripción
<b>Tumor primario (T)</b>		
TX		El tumor primario no puede evaluarse
TO		No hay evidencia de tumor primario
Tis		Carcinoma in situ (carcinoma intraepitelial o intramucoso)
T1		El tumor invade la submucosa
T2		El tumor invade la muscular propia
T3		El tumor atraviesa la muscular propia y llega a la subserosa o al tejido pericolónico o perirrectal no peritonealizado
pT3a		Expansiones opcionales de T3
pT3b		Invasión mínima: < 1 mm por fuera de la muscular propia
pT3c		Invasión ligera: 1-5 mm por fuera de la muscular propia
pT3d		Invasión moderada: > 5-15 mm por fuera de la muscular propia
T4		Invasión extensa: > 15 mm por fuera de la muscular propia El tumor invade directamente otros órganos o estructuras (T4a) o perfora el peritoneo visceral (T4b)
<b>Ganglios linfáticos regionales (N)</b>		
NX		Los ganglios linfáticos regionales no pueden evaluarse
N0		No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales
N1		Hay metástasis en uno a 3 ganglios linfáticos regionales
N2		Hay metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales
<b>Metástasis a distancia (M)</b>		
MX		La presencia de metástasis a distancia no puede evaluarse
M0		No hay metástasis a distancia
M1		Hay metástasis a distancia
<p>TNM: tumor, adenopatía, metástasis.  cTNM: indica clasificación pretratamiento, basada en la exploración clínica, pruebas de imagen, endoscopia, biopsia o exploración quirúrgica.  pTMN: indica clasificación histopatológica posquirúrgica.  ypTMN: indica clasificación histopatológica posquirúrgica efectuada tras tratamiento neoadyuvante.</p>		

**Tabla 8.** Clasificación TNM según la *American Joint Committee on Cancer / International Union Against Cancer*. Fuente: imagen tomada de la publicación (Colella et al., 2010)

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 (T1-2, N1, M0), IIIB (T3-4, 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 (M1) (Tabla 9).

	T	N	M
<b>Estadio 0</b>	Tis	N0	M0
<b>Estadio I</b>	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
<b>Estadio IIA</b>	T3	N0	M0
<b>Estadio IIB</b>	T4	N0	M0
<b>Estadio IIIA</b>	T1, T2	N1	M0
<b>Estadio IIIB</b>	T3, T4	N1	M0
<b>Estadio IIIC</b>	Cualquier T	N2	M0
<b>Estadio IV</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1

TNM: tumor, adenopatía, metástasis.

**Tabla 9.** Estadiaje del CCR según la *American Joint Comité on Cancer / International Union Against Cancer*. Fuente: imagen tomada de la publicación (Colella et al., 2010)

Las clasificaciones clásicas de *Astler-Coller* modificada o la de *Dukes* se basan: 1) estadio A: tumor no penetrante en la pared intestinal, 2) estadio B: tumor penetrante en la pared intestinal sin metástasis en nódulos linfoides, 3) estadio C: tumor penetrante en la pared intestinal con metástasis en nódulos linfoides de la misma región, 4) estadio D: tumores que se han extendido a lugares distantes (por ejemplo, hígado o pulmón) pero no considera el número de ganglios afectados ni el compromiso de estructuras adyacentes al tumor como aspectos diferenciales para considerar grupos de pronóstico adverso (Singletary et al., 2002; Van Cutsem et al., 2008). Otra clasificación empleada es la clasificación auxiliar R (Sasapu et al., 2006; J. Walker & Quirke, 2002).

### 2.4 Etiología

La mediana de edad al diagnóstico es de 72 años, donde el 90% presentan más de 50 años y un 71% más de 65 años. La longevidad se ha asociado con mayor incidencia de cáncer de colon y es el factor de riesgo de más peso dentro de los de tipo no hereditario.

Tradicionalmente, las mayores tasas de incidencia y mortalidad se han relacionado con países económicamente desarrollados. Incluso se ha observado una diferencia en la incidencia en inmigrantes por asimilación a la de la zona receptora (Parkin et al., 2005)

Esto hace pensar que podría estar influenciado por factores medioambientales tales como un mayor consumo de dietas ricas en grasa o carnes rojas y la falta de actividad física que se evidencia en mayores tasas de obesidad. Asimismo, las dietas con bajo contenido en fibra y la ingesta habitual de alcohol también supondrían un mayor riesgo en el desarrollo del CCR.

Hablando en términos generales se acepta que el riesgo de padecer CCR en la población general es de un 5% y en la población con enfermedad inflamatoria intestinal (EII) este riesgo se encuentra aumentado de 2 a 5 veces. Por tanto el riesgo que tienen los pacientes con EII de padecer CCR es de un 15% aproximadamente.

En relación a las diferencias entre colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, hasta hace relativamente poco tiempo, se consideraba que el riesgo de CCR era mayor para los pacientes con colitis ulcerosa.

Actualmente, se considera que los pacientes con enfermedad de Crohn que afecta al colon de manera extensa (situación que se presenta afortunadamente con una frecuencia muy baja) tienen un riesgo de CCR similar al de los pacientes con colitis ulcerosa.

Los dos factores que, en la colitis ulcerosa, se han relacionado claramente con un aumento del riesgo de CCR son la duración de la enfermedad y la extensión de la afectación de la colitis.

Es lógico pensar que si la EII tiene una actividad importante durante más tiempo ello implicaría un mayor riesgo de CCR. Sin embargo, los diferentes estudios realizados no han demostrado que exista una relación entre la actividad de la enfermedad y el riesgo de CCR. Los dos factores más relacionados son, como hemos indicado, la extensión de la enfermedad y el tiempo de evolución de la misma.

El riesgo acumulado en pacientes con pancolitis es aproximadamente del 30% a los 30 años, con una incidencia de 0.5-1% anual. Esto conlleva un riesgo evidente a partir de 10 años de evolución, lo que obliga a un seguimiento intensivo de estos pacientes con fines de detección precoz.

La enfermedad de Crohn supone un mayor riesgo cuando afecta a determinadas porciones del colon. En este caso el riesgo relativo se ha estimado en 3.2 si se trata de afectación del área ileocólica o de 5.6 en afectación colónica exclusivamente. Si el diagnóstico de la EEI ocurre antes de los 30 años este riesgo aumenta a 20.9 (Saltz et al., 2008).

Los pacientes que han desarrollado con anterioridad un CCR, cáncer de ovario o útero tienen más riesgo que la población general.

La incidencia de CCR metacrónico se sitúa entre 1 y 9%. El intervalo entre un primer y segundo tumor se ha estimado en 8.7 años y esto marca la base del seguimiento con colonoscopia en pacientes con un primer tumor resecado (Mulcahy & Benson, 2002).

Asimismo, una historia personal de pólipos confiere un riesgo notable. El pólipo es una protuberancia visible macroscópicamente que se proyecta en la superficie de una mucosa. Pueden ser pediculados o sésiles según su forma de implantación (Figura 8). Los pediculados tienen un tallo de implantación de unos 1,5 cm e implican menos malignidad y los sésiles tienen una base de implantación amplia, sin tallo, de unos 2 cm e implican mayor malignidad.



**Figura 8.** Pólipo sésil (izquierda) y pólipo pediculado (derecha). Fuente: imagen tomada de (Lamas Díaz, 2012)

En función de su histología, los pólipos colónicos pueden ser:

- adenomatosos (70-80%)
- serrados (10-20%)
- otros, como inflamatorios, hamartomatosos, mucosos.

Los adenomas se consideran un precursor importante del cáncer. Su incidencia aumenta con la edad, y se pueden encontrar hasta en un 25% de la población en torno a los 50 años, y quizá en un 50% de los pacientes con más de 70 años (Marcuello et al., 2004).

Los adenomas surgen del epitelio glandular, presentan una morfología displásica y diferenciación anormal de las células epiteliales en torno a la lesión.

Varios estudios longitudinales han demostrado un alto riesgo de desarrollo tumoral en individuos cuyos adenomas no se extirparon, y por otra parte se ha visto que la polipectomía disminuye el riesgo de cáncer.

Por tanto el papel premaligno de los adenomas está bien establecido. Según su histología pueden dividirse en

- Adenoma convencional
  - Es el tipo de adenoma más frecuente. Nace por la proliferación de células epiteliales displásicas de la mucosa, a partir de mutaciones en la vía del gen APC y  $\beta$ -catenina (Montgomery, 2006) (Hamilton et al., 2000).
  - Tubulares: se forman a partir de túbulos epiteliales, son pequeños, sésiles o pediculados. Es menos probable su transformación maligna (5%).

- Vellosos: se originan a partir de formaciones digitiformes o papilares de tejido conectivo que se recubren de células epiteliales. Suelen ser mayores que los tubulares, en su mayoría sésiles, y es el tipo que tiene mayor potencial de malignizar (40%)
  - Tubulovellosos: con características de ambos tipos.
- Adenoma serrado

El 20 % de los CCR se originan a partir de adenomas serrados (O'Brien, 2007). Estos pólipos siguen una vía distinta a la tradicional secuencia adenoma-adenocarcinoma (Huang, Farraye, Yang, & O'Brien, 2011).

Entre los principales tipos encontramos:

- Adenoma serrado tradicional: Se trata de un subtipo de lesión poco frecuente (1-6%) (Spring et al., 2006), habitualmente pediculada y más común en el colon izquierdo (60%) (Davila, Rajan, & Baron, 2006). Presenta dientes de sierra muy prominentes y displasia citológica similar a los adenomas, lo que la diferencia del adenoma serrado sésil. Su oncogénesis está más relacionada al gen K-Ras (O'Brien, 2007).
- Adenoma serrado sésil: Supone un 15-20% de las lesiones serradas y se considera la lesión preneoplásica clave en la vía serrada de carcinogénesis (Leggett & Whitehall, 2010; Moreira, 2011) . El aspecto macroscópico revela lesiones planas o poco elevadas, mayores de 5 mm, habitualmente cubiertas por una capa de moco, y de predominio en colon proximal (O'Brien, 2007).

Son adenomas con arquitectura serrada que carecen de la atipia citológica del resto de adenomas. Nacen a partir de defectos en la reparación del DNA (inestabilidad de microsatélite) (Aust, Baretton, & Pathology, 2010).

- Pólipo hiperplásico: Constituye el subtipo más numeroso dentro de las lesiones serradas (se estima que alrededor del 80-90%) (Snover, Jass, Fenoglio-Preiser, & Batts, 2005). Mediante endoscopia se puede identificar como una lesión poco elevada, normalmente < 5 mm, pálida o blanquecina, o de coloración similar a la mucosa circundante.

### 2.5 Tipos de CCR

Tradicionalmente, el CCR lo podemos clasificar en esporádico y familiar (hereditario).

#### 2.5.1 CCR familiar

Se desarrollan a edades más jóvenes (<50 años) y sólo en aproximadamente el 10% de los casos se conoce la genética de la enfermedad, pero existe otra parte importante de CCR familiares (hasta el 20%) en que la predisposición genética es aún desconocida.

El CCR familiar se puede dividir en diferentes síndromes: HNPCC, FAP, HPS (poliposis hamartomatosa), HMPS (síndrome de poliposis mixta hereditaria) y síndrome de poliposis serrada.

Los dos principales tipos de CCR familiar son:

#### **i. HNPCC (*Hereditary Non Poliposis Colorectal Cancer*) o Síndrome de Lynch.**

La principal característica de este tipo de cáncer es su desarrollo en ausencia de pólipos. Supone entre el 1 y el 6% de los casos de CCR en el mundo. Se inicia a edades más jóvenes y generalmente se localiza en el colon proximal siendo más agresivo y produciendo un elevado riesgo de producción de tumores extracolónicos. Presenta un patrón de herencia autosómico dominante. Se produce por mutaciones durante la reparación de los genes MMR con MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS1, PMS2. La deficiencia de estos genes provoca inestabilidad genética y por tanto los MSI se ven afectados por el MSI-H.

#### **ii. FAP (Familial adenomatous polyposis).**

Es un síndrome autosómico dominante que afecta hasta el 1.1% de los casos de CCR. Generalmente surgen centenares de pólipos en la pared delo colon/recto durante la segunda o tercera década de la vida del paciente. Estos pólipos no son malignos pero algunos de ellos derivan en carcinomas. Pese a la poca prevalencia de este tipo de tumores y dada la facilidad en producir pólipos, se utiliza como modelo de estudio en la carcinogénesis. El origen es debido a la mutación de los genes supresores de tumores APC. La mutación del APC genera una proteína truncada y conduce a la formación

constitutiva de complejos  $\beta$ -catenina/ TCF nuclear activa. Se altera la vía de la WNT, ya sea del gen APC, GSK3B o de otros son suficientes para formar lesiones premalignas del intestino con las criptas aberrantes o pólipos pequeños.

Otros síndromes familiares como HPS, HMPS, la MAP o el síndrome de la poliposis hiperplásica serrática se encuentra en menos del 1,1% de los casos de CCR, son autosómicos dominantes, excepto por MAP que contiene mutaciones de diferentes vías de transducción de la señal.

### **2.5.2 CCR esporádico**

Es el tipo más frecuente de CCR, dado que aproximadamente el 80-90% de los casos son de origen espontáneo. La mayoría de éstos tumores se encuentran en el lado izquierdo del colon. Actualmente existen dos vías por medio de las cuales las lesiones precursoras (adenomas) conducen a la formación del CCR: la vía de los adenomas convencionales y la vía de los pólipos serrados (Noffsinger, 2009)

#### **i. Vía convencional**

Ésta vía sigue la secuencia adenoma-carcinoma caracterizada por la desactivación del gen APC, y está ampliamente aceptada en la génesis del CCR (Hanahan & Weinberg, 2000). Tiene como punto final el carcinoma convencional (CC), el cual es el tipo más frecuente ya que está presente en el 80-85% de los CCR esporádicos.

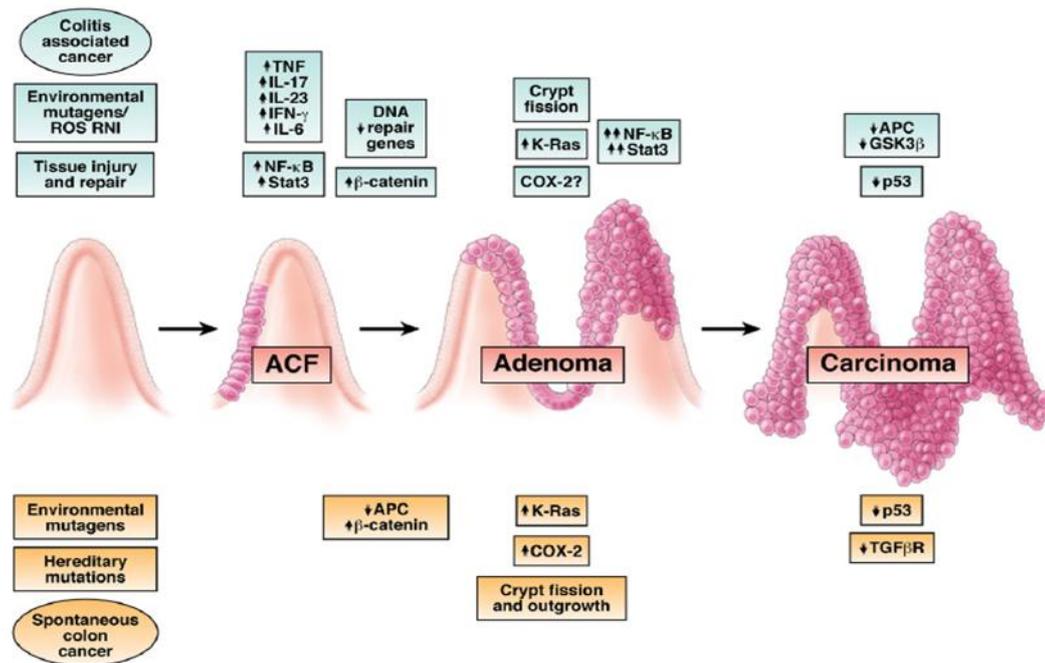
Se basa en la pérdida de estabilidad cromosómica (CIN), caracterizada por la elevada frecuencia de descompensación alélica (especialmente los brazos de los cromosomas 5q, 8p, 17p y 18q), las amplificaciones cromosómicas y las translocaciones.

El análisis de las mutaciones encontradas en las distintas etapas que van desde el epitelio que ha adquirido una mayor velocidad de crecimiento (hiperplásico) hasta los carcinomas con capacidad metastásica, llevó a Eric R. Fearon y Bert Vogelstein a plantear en 1989 un modelo genético de esta enfermedad (Muñoz, 1997).

Éste modelo está basado en una cascada de alteraciones genéticas que afectan a genes reparadores del DNA, oncogenes y genes supresores de tumores, siendo necesarias al

menos siete mutaciones para que se desarrolle un tumor maligno (Powell et al., 1992; Vogelstein et al., 1989)

Éstos cambios tardan normalmente varias décadas en producirse, y de ahí la frecuencia de aparición de la patología en edad avanzada (Figura 9).



**Figura 9.** Modelo de carcinogénesis colorrectal de la vía convencional (epitelio normal-adenoma-carcinoma). Fuente: imagen tomada de la publicación (Terzić, Grivennikov, Karin, & Karin, 2010).

La primera alteración detectada en el epitelio normal es la delección de un fragmento del brazo largo del cromosoma 5 que incluye el gen APC y conduce al desarrollo de adenomas de pequeño tamaño (< 1 cm) (Muñoz, 1997).

En un alto porcentaje de adenomas con gran tamaño (> 1 cm) aparece una mutación en el gen K-RAS que da lugar a una proteína atrapada en su estado activado que envía de forma continua señales mitóticas e impide la apoptosis. Esto favorece el crecimiento del adenoma y la posible expansión clonal de alguna célula inicialmente alterada. En esta fase se puede observar sobreexpresión del oncogen bcl-2 en un 70% y alteraciones en c-Myc (Muñoz, 1997).

A medida que progresa la evolución desde adenoma se pierden algunas alteraciones pero persisten las de K-RAS y APC, y se producen deleciones en 18q y 17p que incluyen las regiones donde se localizan los genes DCC (Deleted in Colon Carcinoma) y p53. La mutación en éstos genes provoca la aparición de carcinomas invasivos que durante el proceso de metástasis sufren otras múltiples alteraciones en todos los cromosomas, como las originadas en Rb o c-Myc que le confieren malignidad (Muñoz, 1997).

### ii. Vía serrada

La caracterización molecular genética y epigenética de los pólipos y adenocarcinomas serrados en los últimos años, junto con su mejor caracterización histológica, ha proporcionado pruebas convincentes a favor de la llamada «vía serrada» de la carcinogénesis, y su distinción de la secuencia adenoma-carcinoma clásica (Leggett & Whitehall, 2010). El carcinoma serrado (CS) es un punto final de esta vía serrada, y ha sido reconocido como una entidad distinta entre los adenocarcinomas de colon (Hamilton et al., 2000) y representa entre el 7,5 y el 9,2% de todos ellos, según las series publicadas con más número de casos (García-Solano et al., 2010; Tuppurainen et al., 2005).

Por ejemplo, a diferencia de la vía clásica de carcinogénesis, donde la pérdida de heterocigosidad o pérdida alélica en los genes APC y p53 es la característica principal, este es un fenómeno poco frecuente en las lesiones serradas. Las alteraciones moleculares propias de la «vía serrada» incluyen: 1) la activación de la vía de señalización de las MAPK cinasas (mutación en BRAF y KRAS), 2) el silenciamiento epigenético de genes a través de la hipermetilación de sus regiones promotoras, y 3) la adquisición del fenotipo de inestabilidad de microsatélites (MSI) secundaria a metilación del promotor del gen MLH1, integrante de la familia de los genes reparadores del DNA cuya mutación germinal es responsable del síndrome de Lynch.

Tomando como base los estudios de correlación molecular e histológica, se reconocen 2 subtipos de vía serrada de carcinogénesis: la «vía serrada sésil» y la «vía serrada alternativa» (Carballal et al., 2013).

- La llamada «vía serrada sésil» se caracteriza por presentar mutación en el protooncogén BRAF como alteración más precoz, y mostrar el llamado *CpG Island Methylator Phenotype* (CIMP-high), caracterizado por la metilación

aberrante de genes supresores de tumores que contribuirían a la progresión neoplásica. La lesión preneoplásica central en esta vía es el ASS, y típicamente los CCR aparecen con más frecuencia en el colon proximal. Esta vía se caracteriza por la presencia de MSI secundaria a metilación de MLH1. Se pueden diferenciar dos tipos de inestabilidad de microsatélites; la de alto grado (MSI-H, *high microsatellite instability*) y la de bajo grado (MSI-L, *low microsatellite instability*). En los MSI-H quedan inactivos los genes de reparación del DNA (MMR *mismatch repair genes*), por la acumulación de mutaciones y presentan inestabilidad en dos o más marcadores. El MSI-L presenta inestabilidad en un solo marcador.

- La llamada «vía serrada alternativa» se caracteriza por mutación en el protooncogén KRAS, la presencia de un fenotipo metilador más atenuado (llamado CIMP-low), y frecuente metilación del promotor de MGMT. La correlación histológica y molecular en esta vía es menor que en la «vía serrada sé sil», y la lesión preneoplásica se cree que es el adenoma serrado tradicional (AST).

*Mäkinen et al.* (Mäkinen et al., 2001) y *Laiho et al.* (Laiho et al., 2007) sugirieron que el CS tenía un pronóstico diferente al resto de CC, y posteriormente *García Solano et al.* (García-Solano et al., 2010) demostraron que el CS tiene peor pronóstico que el CC, especialmente los de localización distal. En relación a lo anterior, este mismo grupo ha demostrado que el CS presenta con más frecuencia factores histológicos de pronóstico adverso en el frente invasivo, tales como gemación tumoral (GT), pseudofragmentos citoplasmáticos (PsCt), patrón de crecimiento tumoral infiltrante (PCT) y menor presencia de linfocitos peritumorales (LPT) (García-Solano, Conesa-Zamora, Trujillo-Santos, Mäkinen, & Pérez-Guillermo, 2011).

Por tanto, el comportamiento clínico de las distintas variantes histológicas CCR resulta de interacciones a muchos niveles. El reto es comprender las bases moleculares de la susceptibilidad al CCR 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.

## **2.6 Manifestaciones clínicas**

Generalmente el CCR que se encuentra en estadíos poco avanzados no suelen estar acompañados de ningún tipo de sintomatología, pero en estadíos más avanzados del tumor, la sintomatología puede ser diversa.

Los síntomas más frecuentes son:

- Detección de sangre en heces
- Cambios de hábitos intestinales (diarrea o estreñimiento)
- Dolor abdominal o rectal
- Ictericia
- Anemia
- Pérdida de peso sin motivos aparentes

Por otra parte, según si la localización del tumor es distal, proximal, recto-sigma, se pueden detectar síntomas más específicos y que permitan una localización más rápida del tumor.

## **2.7 Cribado**

Dado que el CCR constituye un importante problema de salud dada su elevada incidencia y morbimortalidad asociada, es catalogada como una entidad susceptible de cribado

Para ello se disponen de métodos diagnósticos que permiten detectar la enfermedad en fases iniciales y por consiguiente un tratamiento más efectivo. Por tanto el objetivo del cribado es reducir tanto la incidencia (mediante la detección y resección de los adenomas) como la mortalidad por CCR.

Existen diferentes estrategias de cribado disponibles en la actualidad para la población de riesgo medio (individuos de edad  $\geq 50$  años sin otros factores de riesgo para el desarrollo de CCR) (Sidney Winawer et al., 2003; S. J. Winawer et al., 1997).

### 2.7.1 Detección de sangre oculta en heces.

Cinco estudios de casos y controles (Scholefield, Moss, Sufi, Mangham, & Hardcastle, 2002) y cuatro ensayos clínicos aleatorizados (ECA) (Mandel et al., 1993; Towler, Irwig, Glasziou, Weller, & Kewenter, 1998) han evaluado el cribado mediante detección de sangre oculta en heces (SOH), mostrando una reducción de la mortalidad. El ECA de Minnesota (único ECA con rehidratación de las heces) (Mandel et al., 1993) muestra la mayor reducción de la mortalidad, del 33% (RR: 0,67; IC del 95%: 0,50-0,87), y ésta persiste a los 18 años de seguimiento (Mandel, Church, Ederer, & Bond, 1999). Además, es el único ECA que ha publicado datos de reducción de la incidencia de CCR (17%-20%) (Mandel et al., 2000).

La sensibilidad y especificidad de la prueba de detección de SOH para la detección de CCR es del 30%-40% y del 96%-98%, respectivamente, en muestras no rehidratadas (Mandel et al., 2000; Pignone, Rich, Teutsch, Berg, & Lohr, 2002). La rehidratación aumenta la sensibilidad hasta el 60%, pero baja la especificidad al 90%, y en consecuencia aumentan los falsos positivos (Pignone, Rich, et al., 2002).

La detección de SOH, por sí misma, no presenta efectos adversos y puede efectuarse en una sola muestra fecal obtenida habitualmente tras la realización de un tacto rectal en la consulta médica.

### 2.7.2 Sigmoidoscopia

Ciertos estudios de casos y controles (Newcomb, Norfleet, Storer, Surawicz, & Marcus, 1992; Selby, Friedman, Quesenberry Jr, & Weiss, 1992) demuestran que la sigmoidoscopia reduce la mortalidad por CCR localizado en el trayecto explorado.

La sigmoidoscopia posee una sensibilidad elevada (70%-80%) para las lesiones situadas al alcance de ésta (Imperiale et al., 2000; Lieberman et al., 2000). Cuando la sigmoidoscopia detecta un carcinoma o un adenoma  $\geq 1$  cm es aconsejable efectuar un estudio completo del colon, dada la mayor incidencia de lesiones sincrónicas proximales al trayecto explorado (Imperiale et al., 2000; Lieberman et al., 2000).

La sigmoidoscopia, en comparación con la colonoscopia, es una prueba más segura, aunque no exenta de riesgo. Teniendo esto en cuenta, y de manera conservadora, se establece un intervalo de 5 años entre sigmoidoscopias (Sidney Winawer et al., 2003).

### **2.7.3 Detección de sangre en heces y sigmoidoscopia.**

No existe evidencia de que la combinación de detección de SOH y sigmoidoscopia sea más eficaz que cada una de ellas por separado.

### **2.7.4 Enema opaco.**

En cuanto a ésta técnica, no existen evidencias de que sea eficaz en el cribado del CCR. El enema opaco puede ayudar a completar la exploración del colon cuando la colonoscopia es incompleta.

### **2.7.5 Colonoscopia.**

La colonoscopia es la única técnica que permite explorar y biopsiar-resecar las lesiones de todo el colon y recto, siendo la prueba más sensible y específica de todas las estrategias de cribado. Por ello, algunos autores han preconizado la utilización de la colonoscopia como única técnica de cribado en grupos de riesgo medio-alto.

Esta circunstancia se basa en el hecho de que hasta el 50% de los pacientes con adenomas avanzados proximales no presenta lesiones distales, con lo que si se hubiese utilizado la sigmoidoscopia como técnica de cribado, éstos no se hubiesen detectado (Imperiale et al., 2000).

Según la historia natural del CCR y los estudios indirectos con la prueba de SOH y el seguimiento post polipectomía, se recomienda de manera conservadora, un intervalo de 10 años entre colonoscopias (SJ Winawer et al., 2002).

Un estudio de casos y controles (Müller & Sonnenberg, 1995) muestra que la colonoscopia reduce la mortalidad por CCR en un 57% (OR: 0,43; IC del 95%: 0,30-0,63).

La sensibilidad para detectar cáncer es probablemente superior al 90% (Haseman, Lemmel, Rahmani, & Rex, 1997). No obstante, otro estudio sugiere que las lesiones planas pueden pasar desapercibidas en la colonoscopia, por lo que si se asume que el 10-30% de los adenomas son de este tipo, la sensibilidad de la colonoscopia podría ser inferior a lo estimado (Rembacken et al., 2000).

En cuanto a las complicaciones de esta técnica, la tasa de perforación o hemorragia asociada a la colonoscopia es de 1-3 casos por 1.000 exploraciones (Sidney Winawer et al., 2003). Otras complicaciones descritas son las asociadas a la sedación, sobre todo en pacientes ancianos con problemas cardiovasculares (Sidney Winawer et al., 2003).

Las complicaciones ocurren, fundamentalmente, cuando se realizan procedimientos terapéuticos, como la polipectomía. La mortalidad asociada a la colonoscopia es de 0,3 casos por 1.000 exploraciones.

### **2.7.6 Colonoscopia virtual.**

No se disponen de ECA que evalúen la eficacia del cribado mediante colonoscopia virtual en términos de incidencia o mortalidad por CCR. Un reciente ECA demuestra cómo la colonoscopia virtual es igual de eficaz que la colonoscopia convencional en la detección de neoplasias colorrectales en individuos de riesgo medio (Pickhardt et al., 2003).

La sensibilidad y especificidad de la colonoscopia virtual es del 85%-90% y del 70%-80%, respectivamente, para lesiones mayores de 1 cm (Pignone, Rich, et al., 2002; Sidney Winawer et al., 2003). Estos valores dependen fundamentalmente del tamaño y forma de la lesión, y de la experiencia del radiólogo (Pignone, Rich, et al., 2002; Walsh & Terdiman, 2003).

Se trata de un procedimiento no invasivo, exento de complicaciones mayores. Sin embargo, al insuflar el aire, algunos pacientes refieren molestias abdominales (Walsh & Terdiman, 2003).

### **2.7.7 Coste efectividad del cribado del cáncer colorrectal.**

Los resultados de una revisión sistemática (Pignone, Saha, Hoerger, & Mandelblatt, 2002), que incluye siete estudios, demuestra cómo el cribado del CCR es coste-efectivo en relación con el no cribado. En EE.UU., la relación de coste-efectividad de las diferentes estrategias de cribado disponibles oscila entre 10.000 y 25.000 dólares por año de vida ganado.

## **2.8 Diagnóstico**

La sintomatología del CCR suele aparecer en fases avanzadas de la enfermedad y suele estar influida por la localización del tumor primario. Entre las pruebas diagnósticas más habitualmente utilizadas para su detección, se encuentran:

### **2.8.1 Radiología.**

La radiografía abdominal simple es sólo útil en el caso de los pacientes que se presentan como una emergencia con sospecha de obstrucción intestinal o perforación. El enema opaco es una prueba inicial ampliamente utilizada en los pacientes en que se sospecha de CCR.

El enema de doble contraste no está indicado a priori, ya que las lesiones pueden pasar desapercibidas y tampoco es útil para valoración de la zona anastomótica. Estaría indicado ante la imposibilidad de realizar una colonoscopia completa o por una mala tolerancia por parte del paciente.

### **2.8.2 Endoscopia.**

La endoscopia de fibra óptica proporciona un método simple para visualizar directamente y biopsiar lesiones sospechosas de malignidad. Este método es más sensible que el enema de doble contraste baritado en la detección de adenomas pequeños y permite la biopsia o excisión total de lesiones accesibles.

### **2.8.3 Ultrasonografía.**

La ecografía puede ser utilizada para detectar metástasis hepáticas siendo un método tan sensible y más barato que la tomografía computerizada (TC). Además permite establecer la extensión local del tumor, fundamentalmente en los casos de cáncer de recto. La ecografía endorrectal es utilizada en los tumores de localización rectal, determina el grado de invasión a través de la pared con una sensibilidad del 80-90%, y la afectación ganglionar con una sensibilidad del 50-75%.

### **2.8.4 Tomografía con emisión de positrones (PET).**

Este sistema resulta más sensible y específico en la detección de metástasis que la TC o RM. Por tanto, la combinación TC-PET sería más sensible para la detección de la enfermedad extrahepática que la TC sola.

### **2.8.5 Marcadores tumorales.**

El antígeno carcinoembrionario no es lo suficientemente sensible ni específico para ser considerado un marcador diagnóstico primario. Preoperatoriamente puede ser utilizado como un indicador pronóstico si está elevado

## **2.9 Terapias actuales.**

### **2.9.1 Tratamiento quirúrgico**

El único tratamiento de intención curativa del CCR es la cirugía, con la que globalmente se consigue un 50% de supervivencia a los cinco años.

En el abordaje quirúrgico se requiere la excisión de un margen de cinco centímetros de mucosa normal proximal y distal a la localización del tumor.

La técnica quirúrgica empleada varía según la localización del tumor. Con independencia de lo anteriormente expuesto, la intervención quirúrgica está indicada en aquellos casos en los que el tumor produzca obstrucción, perforación o compresión.

### **2.9.2 Tratamientos adyuvantes**

Con el fin de evitar recaídas, muchos estudios apoyan la terapia adyuvante a la cirugía en aquellos estadios (B y C según *Duke*) donde la supervivencia a los cinco años tras cirugía es del 45% y del 25% respectivamente.

### **2.9.2.1 Radioterapia**

El papel de la radioterapia es un tema controvertido. En un estudio no aleatorio se identificaron tres situaciones en las que la radioterapia local aportó un cierto beneficio: a) en los estadios T4 N0 M0, T4 N1-2 N0; b) en los estadios T4 N0 M0 con perforación intestinal o fístula al diagnóstico; c) en los casos con cirugía subóptima con enfermedad residual (Willett, Fung, Kaufman, Efid, & Shellito, 1993).

### **2.9.2.2 Quimioterapia**

Se basa en la posibilidad de eliminar, después de una cirugía curativa, mediante un tratamiento sistémico la enfermedad microscópica residual.

El citotóxico considerado más activo en el CCR es el 5-fluorouracilo (5-FU), aunque esto parece estar cambiando en los últimos años (Bokemeyer et al., 2009).

### **2.9.2.3 Inmunoterapia**

En los últimos años se está desarrollando la inmunoterapia pasiva específica con anticuerpos monoclonales, como el dirigido contra el antígeno 17-1 A, que ha demostrado una disminución del riesgo de recaída y mortalidad similar a la quimioterapia, aunque con menos efectos secundarios en pacientes con CCR en estadio C (Riethmüller et al., 1998).

Otros como el bevacizumab es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), mediador clave de la angiogénesis, que bloquea la unión del VEGF a sus receptores en las células endoteliales vasculares y como consecuencia inhibe la angiogénesis tumoral. El cetuximab es un anticuerpo monoclonal que inhibe de forma competitiva la unión del ligando al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que se encuentra sobreexpresado en las células tumorales. Tanto el bevacizumab como el cetuximab son activos en el tratamiento sistémico del CCR, y presentan sinergismo cuando se administran de forma simultánea a la irradiación (Willett et al., 2007).

Por este motivo se está investigando su uso, todavía en estudios fase I-II, en combinación con radioquimioterapia neoadyuvante en el tratamiento preoperatorio del cáncer de recto localmente avanzado (Czito et al., 2007; Hofheinz et al., 2006; Rödel et al., 2008).

### **2.10 Genética del cáncer colorrectal.**

El CCR es el proceso canceroso donde mejor se ha podido establecer una secuencia de cambios genéticos concretos correlacionada con etapas específicas de la progresión tumoral.

#### **2.9.1 Inactivación de genes supresores**

##### **i. APC**

El gen supresor APC juega un papel crítico en el desarrollo del CCR esporádico, encontrándose mutado en más del 70% de los casos. Normalmente, en el citoplasma de una célula, los niveles de  $\beta$ -catenina están regulados mediante su unión a APC. El complejo APC-GSK-3  $\beta$  se unen a  $\beta$ -catenina, que sufre una fosforilación que conduce a su degradación en el proteosoma (Rubinfeld et al., 1996). La mutación APC o la activación de Wnt, bloquea la fosforilación de la  $\beta$ -catenina y favorece su acumulación. Posteriormente es trasladada al núcleo y puede formar un complejo con el factor de células T (TCF), activando la expresión de los genes c-Myc y ciclina D1, así como c-jun, fra-1, PPAR $\delta$ , MMP7 y uPA generando señales de proliferación y evasión de apoptosis (Catalán et al., 2003).

Dentro de las neoplasias hereditarias, las mutaciones en línea germinal de APC son las responsables del síndrome PAF, el cual afecta al 0.01% de la población y se transmite con un patrón autosómico dominante, con una penetrancia del 100%. Se caracteriza por la presencia de cientos e incluso miles de pólipos adenomatosos con una alta tasa de transformación maligna, de tal manera que a los 40 años todos los portadores han desarrollado un cáncer. La localización más frecuente es en el colon izquierdo y presentan una histopatología similar a la de los esporádicos (Tinat et al., 2008).

**ii. p53**

Si la pérdida de APC es crítica en la formación de un adenoma, la mutación de p53 es clave en el paso de adenoma a carcinoma. Se han detectado mutaciones de p53 en un 70% de cánceres de colon esporádicos (Ilyas, Straub, Tomlinson, & Bodmer, 1999). El gen p53 codifica para una fosfoproteína nuclear que actúa como supresora de tumores. Normalmente, la mayoría de tumores presentan una inactivación en los 2 alelos del gen, cuyas mutaciones son del tipo *missense* en uno y por delección del 17p en el otro alelo. La función del p53 consiste en la parada del ciclo celular cuando existen daños en el DNA celular, lo que conduce a un programa de muerte celular. Su inactivación suele coincidir con la transformación de adenomas grandes en carcinomas invasivos.

**iii. TGF-B**

Es una citoquina capaz de influir en el crecimiento y diferenciación celular, en la modulación de la respuesta inmune y en la modificación del microambiente necesario para la progresión de las células cancerígenas. La cascada de señalización inducida por TGF- $\beta$  se inicia por su unión a uno de sus tres receptores. Un tercio de los tumores colorrectales tienen mutaciones somáticas que inactivan TGFBR2, debido a defectos en los genes (MMR) (Li, Guo, Bernabeu, & Kumar, 2001; Platten, Wick, & Weller, 2001). La mayoría de estos tumores muestran inactivación de ambos alelos por la existencia de mutaciones que cambian el marco de lectura (Markowitz et al., 1995). La inactivación de esta ruta coincide con la transición de adenoma a displasia de alto grado o carcinoma.

**2.9.2 Activación de oncogenes****i. RAS Y BRAF**

Dentro de la familia de genes RAS se conocen los 3 miembros H-RAS, N-RAS y KRAS, y es el último el que presenta mayor frecuencia de mutación en los carcinomas de colon.

Estos genes codifican en condiciones normales una serie de proteínas de membrana las cuales transmiten la señalización producida mediante la activación de receptores de membrana. Cuando hay mutaciones de KRAS, la actividad GTP-asa queda bloqueada y la proteína ras permanece constitutivamente activada y unida a GTP. Dichas mutaciones suelen ocurrir en los codones 12 y 13, y en mucho menor frecuencia en el codón 61 (Malumbres & Barbacid, 2003).

La mutación en B-RAF implica una actividad de tipo serintreonina quinasa, la cual es un sustrato de la actividad de KRAS. Las mutaciones de B-RAF son generalmente excluyentes con las mutaciones del KRAS y se detectan en aproximadamente el 8-10% de los CCR (Hernández-Losa et al., 2012).

La mutación en ambas vías, implica la activación de la cascada de señalización intracelular con activación de la proteína mitógeno kinasa activada (MAPK) con resultado de la proliferación celular.

En adenomas grandes, mayores de 1 cm, aparece hasta en un 50% de casos una mutación en el gen K-RAS (Chan, Zhao, Leung, & Yuen, 2003).

### ii. PI3K

La vía de transmisión de señales fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K-AKT) parece tener un papel en la oncogénesis del CCR. Un tercio de los CCR portan mutaciones somáticas en la ruta PI3K o pérdida de función de PTEN, inhibidor de la ruta PI3K, con resultado de estimulación de esta vía implicada en supervivencia celular y evasión de apoptosis.

El estudio del genoma completo de tumores primarios y de metástasis a distancia en el mismo paciente ha mostrado la sorprendente coincidencia en las mutaciones, lo que implica que no se requieren nuevas mutaciones para que se desprendan células tumorales y preñan a distancia. El hecho de que todas las mutaciones de la metástasis estén presentes en el primario implica que la diseminación es rápida, requiere menos de 24 meses desde la aparición de la última mutación en el tumor primario.

El reto actual del conocimiento molecular de la enfermedad reside en trasladar los hallazgos en la genómica del CCR a tests clínicos con utilidad pronóstica o predictiva.

Como hemos descrito, ya se conocen mutaciones en línea germinal en genes supresores de tumor que indican un riesgo elevado de cáncer, y se usan para guiar el seguimiento y medidas preventivas como cirugía profiláctica. Es el caso de las mutaciones en APC causantes del síndrome de Adenopoliposis Familiar y en los reparadores MLH1, MSH2 y MSH6 asociados al HNPCC.

En cuanto a los marcadores predictivos, sólo la mutación en el gen KRAS como factor predictivo negativo de respuesta a anticuerpos anti-EGFR se usa de forma rutinaria en la práctica asistencial. Sin embargo, el conocimiento de variantes en genes implicados en la

ruta de los fármacos habituales de cáncer de colon, podría ayudar a predecir el comportamiento del tumor ante el tratamiento. Del estudio de esta relación entre las diferencias genéticas individuales y la respuesta a los fármacos se ocupa la farmacogenética (Lares-Asseff & Trujillo-Jiménez, 2001).

### **3. Microbiota gastrointestinal**

El intestino humano alberga una gran diversidad microbiana, la cual juega un importante papel tanto en la modulación del sistema inmunitario como en el metabolismo del individuo. Ante la sospecha de la posible implicación que puede presentar la microbiota en el desarrollo del CCR, se han llevado a cabo diversos estudios comparativos entre muestras de tejido neoplásico y normal adyacente, de pacientes con CCR (Mira-Pascual et al., 2014b), así como de muestras de heces de pacientes sanos y enfermos (T. Wang et al., 2012), para analizar y comparar los perfiles microbianos existentes en éstos individuos mediante la secuenciación del gen bacteriano 16S.

#### **3.1 Composición**

En el intestino grueso humano residen más de 100 billones de bacteria con 3,3 millones de genes microbianos, 150 veces más que el genoma humano (Junjie Qin et al., 2010). Las bacterias constituyen nichos ecológicos que se encuentran en equilibrio y conforman lo que se conoce como microbiota-microbioma intestinal (Turnbaugh et al., 2007). La densidad microbiana encontrada a lo largo del sistema digestivo es de 10<sup>11</sup>-10<sup>13</sup> microorganismos por gramo en estómago y duodeno, 10<sup>10</sup>-10<sup>12</sup> microorganismos por gramo en yeyuno e íleon y finalmente 10<sup>13</sup>-10<sup>14</sup> microorganismos por gramo en colon y heces (L. Dethlefsen, Eckburg, Bik, & Relman, 2006; O'Hara & Shanahan, 2006).

Diferentes estudios en metagenómica sobre la microbiota intestinal, muestran la inmensa diversidad filogenética existente. De este modo, se estima la existencia de más de 1.000 filotipos a nivel de especie, con al menos 160 especies prevalentes por individuo (Junjie Qin et al., 2010). La gran mayoría de las bacterias endógenas a nivel de especie en adultos sanos, pertenecen principalmente a dos filos, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, representando más del 90% de las categorías filogenéticas conocidas en el intestino humano. Los filos

*Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Spirochaetes* y *Lentisphaerae* presentan una menor abundancia (<1% -15%) (Consortium, 2012; P. B. Eckburg et al., 2005).

Existe una variabilidad interindividual en la composición microbiana, debido en gran parte a múltiples factores genéticos y ambientales tales como localización geográfica o el estilo de vida (Benson et al., 2010), y no menos importante, las alteraciones causadas por estados de enfermedad. Ciertos estudios recientes muestran cómo a pesar de existir un perfil microbiano característico de cada individuo, un conjunto de unos 50 taxones son comunes en la mitad de los individuos (J. Qin et al., 2010; Tap et al., 2009).

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 se asociaría con una alteración del estado fisiológico (P. J. Turnbaugh et al., 2009). Sin embargo, la diversidad genética específica por individuo es importante y aún permanece en gran parte sin asignar (Schloissnig et al., 2013).

### 3.2 Papel en la fisiología del huésped

Los microorganismos intestinales ejercen una profunda influencia tanto en la fisiología como en el metabolismo humano. De hecho, algunos microorganismos del intestino complementan varias rutas metabólicas, por ejemplo, la producción de vitaminas y oligoelementos esenciales o la extracción de energía de los carbohidratos indigeribles (Koropatkin, Cameron, & Martens, 2012). Por tanto juegan un importante papel en la nutrición y equilibrio energético del hospedador (Backhed et al., 2004).

Probablemente, ésta simbiosis entre la microbiota y el individuo humano es producto de la fuerza evolutiva (Clemente, Ursell, Parfrey, & Knight, 2012). Otra de sus funciones reconocidas es la resistencia que ofrecen al asentamiento de enteropatógenos gracias a su colonización. El mecanismo implicado en este efecto barrera son: la competencia por los recursos alimenticios (Neish, 2009), la inhibición del crecimiento de patógenos por medio de la producción de acetato (Fukuda et al., 2011), la síntesis de bacteriocinas (Corr et al., 2007), o por la estimulación de la respuesta inmune (Keeney & Finlay, 2011).

La microbiota intestinal también actúa como un componente integral del sistema inmune humano, calibrando finamente el potencial inmunológico y las respuestas inmunológicas

a diferentes edades (M. Candela et al., 2013; Maynard, Elson, Hatton, & Weaver, 2012). La estrecha interacción entre la microbiota intestinal y el sistema inmune de la mucosa, ha demostrado ser crucial para el desarrollo del sistema inmunitario durante nuestra infancia, así como para el mantenimiento de la homeostasis inmunológica lo largo de la vida adulta (Maynard et al., 2012; J. L. Round & Mazmanian, 2009).

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 (S. M. Collins & Bercik, 2009, 2013).

### **3.3 Dinamismo de la microbiota**

Hasta hace unos años, se pensaba que la composición microbiana intestinal era estable en la edad adulta (Guarner & Malagelada, 2003; Zoetendal, Akkermans, & De Vos, 1998). Más recientemente, varios estudios longitudinales en seres humanos, muestran la plasticidad de este ecosistema, destacando que la dieta, el medio ambiente, y los cambios fisiológicos pueden influir tanto en la composición como en la funcionalidad de la microbiota intestinal (Candela, Biagi, Maccaferri, Turrone, & Brigidi, 2012; Marco Candela et al., 2013).

*Faith et al* (Faith et al., 2013) han investigado la plasticidad de la microbiota intestinal a largo plazo en sujetos sanos, demostrando que el 40% de la microbiota de un individuo es variable en el transcurso de tiempo de 5 años.

El efecto de los cambios en los hábitos alimenticios es la manifestación más sencilla para demostrar la capacidad que presenta la microbiota de adaptar su arquitectura ecológica en respuesta a estímulos ambientales, con la rapidez y eficacia necesarias para el mantenimiento de una correcta simbiosis entre huésped-microbiota. De este modo, se observaron respuestas de la composición microbiana a la dieta y parece estar impulsado principalmente por el tipo de fermentación tras ingerir hidratos de carbono (A. W. Walker et al., 2011; G. D. Wu et al., 2011).

Estas fluctuaciones pueden ser consideradas como una característica necesaria del ecosistema microbiano intestinal, capaz de adaptarse rápidamente a las exigencias de

acogida, para maximizar la eficiencia de extracción de nutrientes y garantizar el estado saludable del huésped.

Sorprendentemente, los mismos cambios de la dieta en diferentes personas, no dieron lugar a una misma microbiota definitiva, ya que las variaciones relacionadas con la dieta no modificaron las diferencias interindividuales. Por el contrario, a largo plazo, las personas con patrones dietéticos similares pueden terminar compartiendo una arquitectura similar de la microbiota intestinal.

De hecho, se ha demostrado que la presencia o ausencia de varios taxones bacterianos puede estar asociada con la ingesta de diferentes nutrientes (G. D. Wu et al., 2011).

Junto con la influencia de la dieta, se ha observado una cierta plasticidad del ecosistema intestinal humano en respuesta a factores de estrés ambientales menos llamativos, como son el clima y la geografía (De Filippo et al., 2010; Jalanka-Tuovinen et al., 2011), o el grado de exposición a las bacterias ambientales, siendo este último de vital importancia para el desarrollo y mantenimiento de la funcionalidad del sistema inmunitario desde el nacimiento hasta la edad adulta (Blaser & Falkow, 2009; Ohnmacht et al., 2011).

Por otra parte, el consumo de fármacos, antibióticos o medicamentos antiinflamatorios, impactan sobre la composición microbiana del intestino (Les Dethlefsen & Relman, 2011; Jernberg, Löfmark, Edlund, & Jansson, 2007) y generan diferentes configuraciones de la microbiota, llevando consigo un aumento o disminución de la capacidad para promover o reducir la metabolización y eficacia de los fármacos (Viswanathan, 2013).

A lo largo de la edad adulta, distintos cambios fisiológicos naturales se suman a la lista de agentes implicados en la modificación de la estructura microbiana, tanto de forma temporal (el embarazo o la lactancia) como de forma permanente (el proceso de envejecimiento) (Koren et al., 2012).

El envejecimiento puede tener un impacto directo en la estructura de la microbiota intestinal por medio de procesos fisiológicos relacionados con la edad, ya que implican una inflamación local y sistémica (es decir, inmunosenescencia), e indirectamente provoca cambios en los hábitos alimenticios y estilos de vida (Biagi, Candela, Fairweather-Tait, Franceschi, & Brigidi, 2012). Cuando aumenta el umbral para el gusto y olfato, junto con problemas en la masticación causados por la pérdida de la dentadura y masa muscular, pueden conducir al consumo de una dieta pobre en fibras y proteínas,

que se sabe que tienen un fuerte impacto sobre la composición microbiana (A. W. Walker et al., 2011; G. D. Wu et al., 2011).

La microbiota intestinal envejecida se caracteriza típicamente por una reducción en la biodiversidad, una mayor abundancia de anaerobios facultativos oportunistas, y una disminución en la abundancia de especies con propiedades anti-inflamatorias, es decir de microorganismos productores de butirato, tales como *Faecalibacterium prausnitzii* (Hayashi, Sakamoto, Kitahara, & Benno, 2003; Mäkivuokko, Tiihonen, Tynkkynen, Paulin, & Rautonen, 2010; Mariat et al., 2009; Rajilić-Stojanović et al., 2009).

Curiosamente, esta variación en la microbiota de adultos sanos se acompaña de varios trastornos inflamatorios sistémicos crónicos, tales como la obesidad, síndrome metabólico y enfermedades inflamatorias del intestino (Cani & Delzenne, 2009; Maslowski & Mackay, 2011; Neish, 2009).

### **3.4 Implicación en el inicio y desarrollo del CCR.**

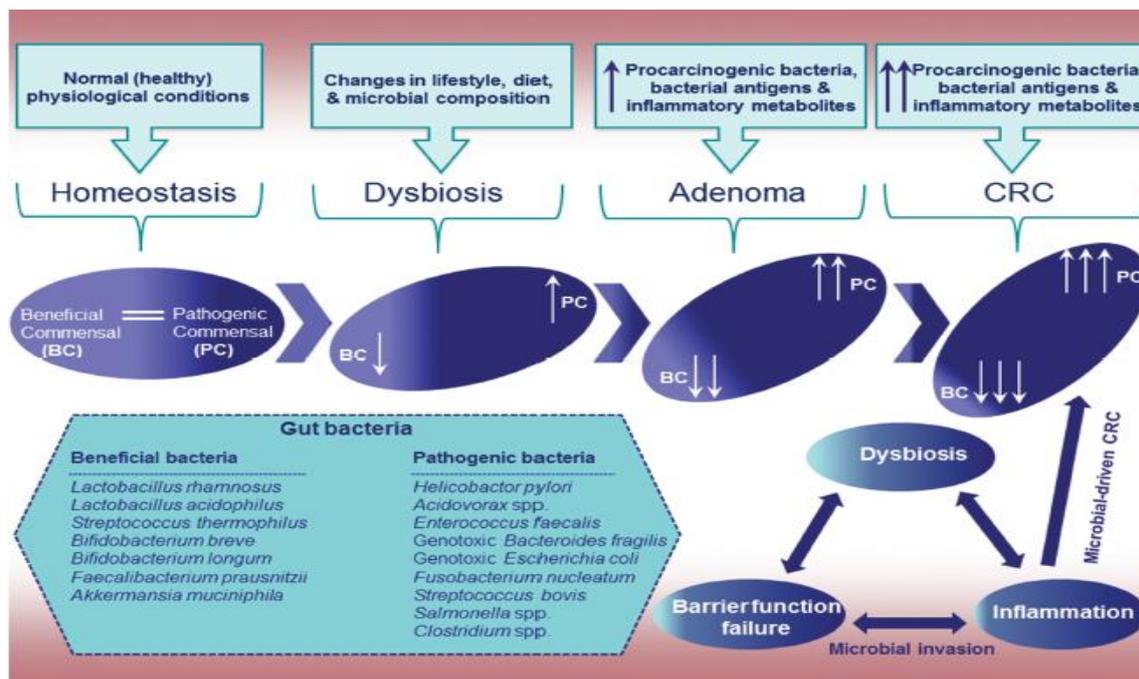
Como ya es conocido, el principal conductor de mutaciones implicado en el desarrollo de CCR incluye los genes supresores APC,  $\beta$ -catenina y p53 (Vogelstein & Kinzler, 1998), así como los oncogenes Kirsten del sarcoma de rata (KRAS) (Lengauer, Kinzler, & Vogelstein, 1998), el homólogo B1 del oncogén V-raf del sarcoma murino viral (BRAF) (Carballal et al., 2013) y el de la mielocitomatosis (Myc) (Lakatos & Lakatos, 2008; Sheng et al., 1998).

Sin embargo, aunque en los últimos años se han descrito un número importante de mutaciones genéticas en CCR, los factores desencadenantes que conducen a su acumulación están por determinar.

Los factores ambientales se postulan como una de las principales causas que intervienen en la aparición del CCR (Lichtenstein et al., 2000). La inflamación crónica y la dieta han sido tradicionalmente como conductores prominentes del CCR (Bingham, 2000; Hope, Hold, Kain, & El-Omar, 2005), sin embargo recientemente un nuevo factor implicado en el desarrollo del CCR está emergiendo; la microbiota intestinal humana (Candela et al., 2011; Plottel & Blaser, 2011; Harold Tjalsma, Boleij, Marchesi, & Dutilh, 2012) (Figura 11).

## Introducción

La microbiota intestinal participa de forma directa en la homeostasis del sistema inmune intestinal (Figura 10). Además, se ha demostrado como ciertos componentes microbianos poseen la capacidad de iniciar tanto la inflamación como la regulación de las células inmunes dentro de la lámina propia del intestino.



**Figura 10.** Diagrama esquemático de la microbiota intestinal y la progresión de tejido normal a adenoma-CCR. Fuente: imagen tomada de la publicación (Dulal & Keku, 2014)

De este modo, las bacterias filamentosas segmentadas, que en los vertebrados se cree que están estrechamente relacionados con los *Clostridium* tipo I, modulan la inducción de células T helper 17 (Th17) dentro del intestino, y de este modo promueven un ambiente inflamatorio que es, de hecho, protector contra ciertas infecciones entéricas, pero por otro lado se asocia con un mayor riesgo de desarrollar enfermedades autoinmunes (Schnupf, Gaboriau-Routhiau, & Cerf-Bensussan, 2013).

Por otro lado, las bacterias también poseen la capacidad de promover un ambiente protector, mediante la activación de células T reguladoras (Treg) y síntesis de citoquinas antiinflamatorias (Kamada & Núñez, 2014). Por ejemplo, *Bacteroides fragilis* produce un producto llamado polisacárido A, que promueve el desarrollo de las células Treg a través de la estimulación del *Toll-like receptor* (TLR2) (June L Round et al., 2011). Del

mismo modo, algunos grupos del género *Clostridium* producen un ácido graso de cadena corta (AGCC) llamado butirato, el cual estimula la diferenciación extratímica de las células Treg (Arpaia et al., 2013) y la producción de interleucina 10 (IL-10), confiriendo un ambiente protector contra la inflamación intestinal (Furusawa et al., 2013).

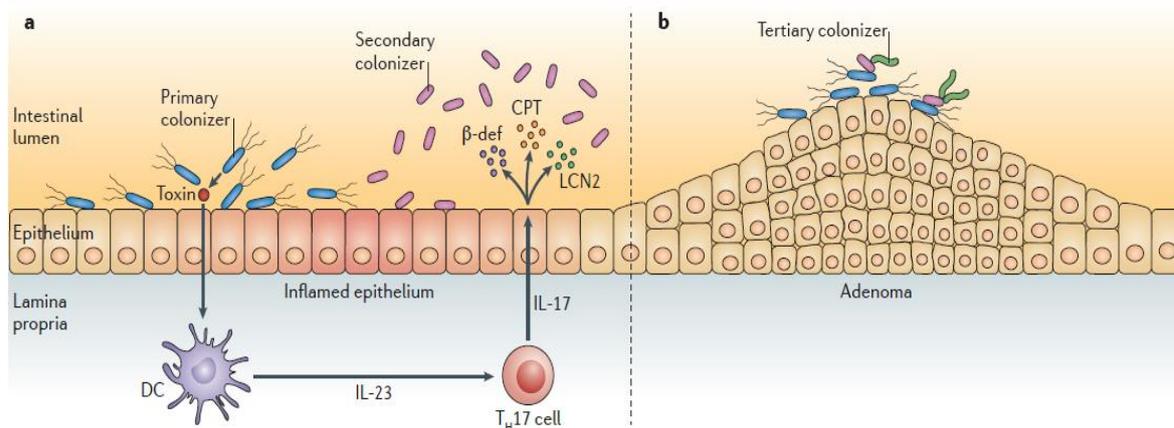
Es importante destacar la producción bacteriana de butirato y niacina, que actúan a través del receptor GPR109A para desencadenar propiedades anti-inflamatorias y promover la diferenciación de las Treg. La activación de GPR109A induce la producción de IL-18 a partir del epitelio intestinal, que junto a la inducción de células Treg, resulta fundamental en la protección frente a la inflamación y carcinogénesis del colon (Singh et al., 2014).

Finalmente, *F. prausnitzii* es un organismo clostridial cuya presencia en el intestino humano se correlaciona con la protección de la EII, aunque el mecanismo subyacente implicado en esta protección es actualmente desconocido (Miquel et al., 2013).

En individuos sanos, el intestino se encuentra constituido por un núcleo microbiano representado principalmente por bacterias anaerobias estrictas, tales como los filos bacterianos de *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. Sin embargo, cuando existe una perturbación la composición microbiana normal queda desplazada en favor de un aumento de bacterias anaerobias facultativas (disbiosis), las cuales pueden incluir microorganismos potencialmente dañinos implicados en procesos inflamatorios (Winter, Lopez, & Bäumler, 2013).

La disbiosis microbiana se asocia con trastornos inflamatorios intestinales, pero no está claro si la disbiosis se produce como consecuencia de un proceso inflamatorio o si otros factores, tales como la dieta o la genética del hospedador inducen la disbiosis que desencadena la inflamación.

La obesidad se caracteriza por desencadenar un estado de inflamación sistémico crónico de bajo nivel (Lumeng & Saltiel, 2011), por lo que contribuye entre un 15%-20% al desarrollo de todos los cánceres (Calle & Kaaks, 2004). Varios estudios han podido relacionar la obesidad con estados de disbiosis microbiana intestinal, mostrando un aumento de la proporción de *Firmicutes* y una disminución de *Bacteroides* (Winter et al., 2013), así como una disminución de la abundancia microbiana total (Le Chatelier et al., 2013).



**Figura 11.** Dos modelos para la colonización bacteriana en tejido intestinal inflamado y adenomatoso. Fuente: imagen tomada la publicación (Harold Tjalsma et al., 2012)

Se piensa que los procesos inflamatorios mediados por bacterias intestinales, pueden poseer un impacto en la carcinogénesis. El tejido intestinal en proceso de carcinogénesis se encuentra deteriorado y por tanto facilita la translocación bacteriana y la inducción de citoquinas que mantienen un entorno inflamatorio dentro del tumor (Calle & Kaaks, 2004).

En efecto, el deterioro de la barrera intestinal por productos microbianos conlleva a la invasión del adenoma, promoviendo así citoquinas inflamatorias tumorales tales como las IL-17 y IL-23. Estas citoquinas conducen a su vez a un mayor crecimiento tumoral (Grivennikov et al., 2012). En algunos casos, la inflamación promueve la tumorigénesis creando un microambiente de disbiosis intestinal, que favorece la expansión de cepas bacterianas tumorogénicas (Figura 11).

Un reciente trabajo en modelos de ratón deficientes en IL-10, mostró como la inflamación intestinal modifica la comunidad microbiana y promueve la proliferación de bacterias genotóxicas (Arthur et al., 2012). Estos hallazgos apoyan la idea de que el CCR puede ser causado por microorganismos específicos que se desarrollaron dentro de un ambiente inflamatorio.

Otros estudios realizados mediante secuenciación de próxima generación (NGS) han permitido caracterizar la microbiota intestinal e identificar cambios específicos en los ecosistemas microbianos asociados a CCR. Éstos estudios mostraron cómo las heces de pacientes con CCR estaban significativamente enriquecidas en *Fusobacterium*, *Enterococcaceae*, *Campylobacter*, *Erysipelotrichaceae*, *Collinsella*, *Peptostreptococcus* y *Anaerotruncus*, y empobrecidas en los miembros del clúster *Clostridium IV*, tales como *F. prausnitzii* y *Roseburia*. En la mucosa intestinal, los pacientes con CCR mostraron un aumento de *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus* y *Mogibacterium*, mientras *Faecalibacterium*, *Blautia* y *Bifidobacterium* disminuyeron (W. Chen, Liu, Ling, Tong, & Xiang, 2012; Marchesi et al., 2011; N. Wu et al., 2013).

Por lo tanto, la microbiota asociada a CCR está enriquecida de patógenos proinflamatorios oportunistas, como por ejemplo *Fusobacterium*, *Enterococcaceae* y *Campylobacter* (Castellarin et al., 2012; Kostic, Chun, Robertson, et al., 2013; N. Wu et al., 2013; Zheng, Meng, Zhao, Singh, & Song, 2008), y de microorganismos comúnmente asociados con trastornos metabólicos, como *Erysipelotrichaceae* (Martínez et al., 2009; Peter J Turnbaugh et al., 2009), mientras se encuentra empobrecido de microorganismos implicados en preservar la homeostasis intestinal (Louis & Flint, 2009), tales como los microorganismos productores de butirato (*F. prausnitzii* y *Roseburia*) y de bacterias protectoras como las bifidobacterias (Fanning et al., 2012; Fukuda et al., 2011).

Estos datos reflejan un ecosistema microbiano de actividad pro-inflamatoria que puede conducir a comprometer el mutualismo “microbiota-hospedador” y finalmente consolidar el estado de enfermedad.

Recientemente, se han llevado a cabo varios estudios donde comparan la microbiota intestinal entre muestras de mucosa tumoral y normal emparejada, permitiendo detectar cuáles son los microorganismos más predominantes en el tumor. De este modo, la mucosa tumoral mostró una disminución global de la diversidad microbiana respecto a los tejidos no cancerosos, además de una reducción de *Faecalibacterium* y un aumento de *Fusobacterium*, *Bacillus* y *Phascolarctobacterium*. Estos microorganismos proinflamatorios pueden modular el microambiente tumoral, que afecta al curso de la progresión del CCR (W. Chen et al., 2012; Kostic, Chun, Robertson, et al., 2013; McCoy et al., 2013).

Con el fin de conocer la participación de la disbiosis bacteriana intestinal en el desarrollo del CCR, se han establecido grupos de coabundancia (CAG), donde se relacionan diferentes microorganismos y se agrupan mediante un análisis bioinformático. Un reciente estudio (Candela et al., 2014) ha establecido grupos de CAG asociados al desarrollo del CCR y se identificaron seis CAG: *Fusobacterium* CAG, *Prevotella* CAG, *Barnesiella* CAG, *Coprobacillus* CAG, *Faecalibacterium* CAG y *Bifidobacterium* CAG, observando que los microorganismos asociados a CCR *Fusobacterium* y *Erysipelotrichaceae*, pertenecen al mismo CAG (*Fusobacterium*). Análogamente, los grupos asociados a CCR como *Enterobacteriaceae*, *Escherichia*, *Shigella* y *Klebsiella* varían de forma conjunta dentro del mismo grupo (*Prevotella*).

Por otro lado, el CAG *Bifidobacterium* es constituido por grupos no asociados a CCR como *Bifidobacterium* y *Lachnospiraceae* (un miembro de la familia de la agrupación *Clostridium* IV). Otros mutualistas pertenecientes al *Clostridium* grupo IV, como *Faecalibacterium*, *Blautia*, *Roseburia*, *Dorea* y *Lachnospiraceae*, se agrupan en el CAG *Faecalibacterium*. Por último, se identificó un CAG (*Barnesiella*) que incluyó microorganismos pro-cancerígenos como *Porphyromonadaceae* y *Eubacterium*, y miembros protectores del cluster *Clostridium* IV (*Ruminococcus*, *Butyrococcus* y *Oscillibacter*).

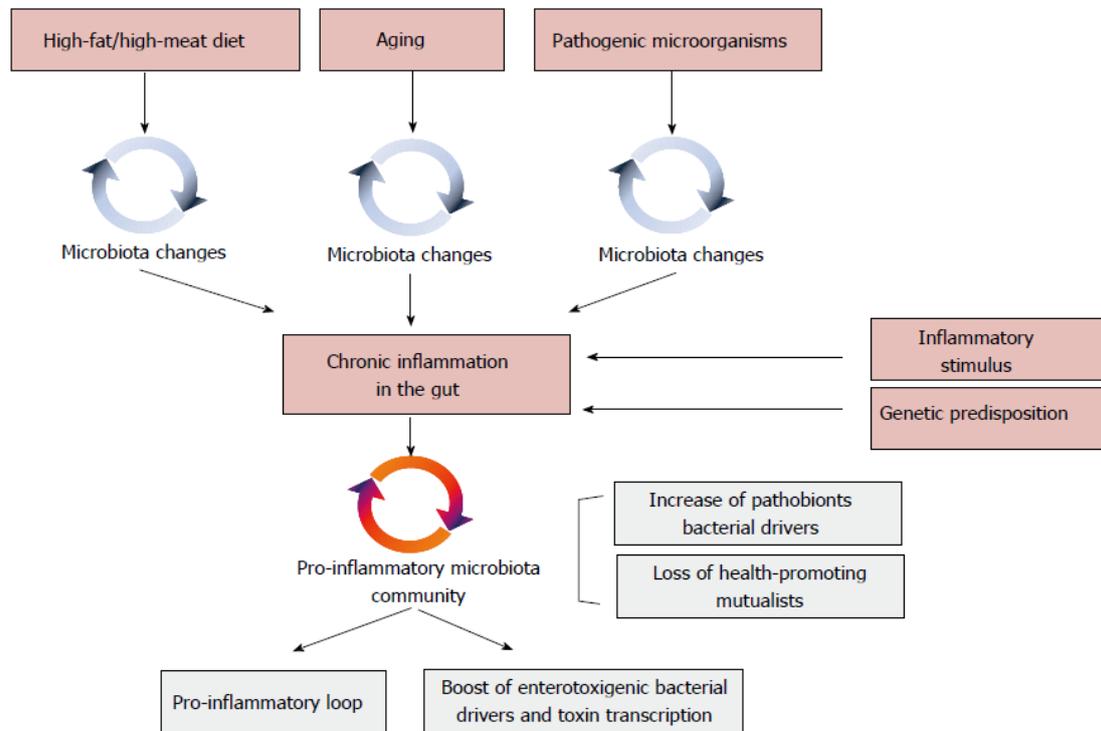
Por tanto, se puede plantear la hipótesis de la existencia de 3 CAG procarcinogénicos CAG (*Fusobacterium* CAG, *Prevotella* CAG y *Coprobacillus* CAG) y 2 CAG protectores (*Bifidobacterium* CAG y *Faecalibacterium* CAG).

Sin embargo, la naturaleza de los estudios llevados a cabo, no nos han permitido comprender si la disbiosis es una causa o una consecuencia de la aparición de la enfermedad.

Además, estos estudios descriptivos no nos proporcionan información acerca de los mecanismos por los cuales los microorganismos intestinales pueden influir en el desarrollo del CCR, o aún más importante, los factores desencadenantes que desplazan la microbiota hacia una configuración cancerígena.

Por tanto, se requieren realizar estudios que nos ofrezcan una visión más integral de la interacción entre el medio ambiente y la genética del CCR, y por tanto de la participación de la disbiosis microbiana, junto a otros factores como la dieta y la inflamación, en el desarrollo del CCR (Figura 12). Para ello está emergiendo un nuevo enfoque de estudios

basados en la secuenciación NGS en modelos de ratones libres de gérmenes (GF) y monoasociados a determinadas cepas bacterianas (Harold Tjalsma et al., 2012).



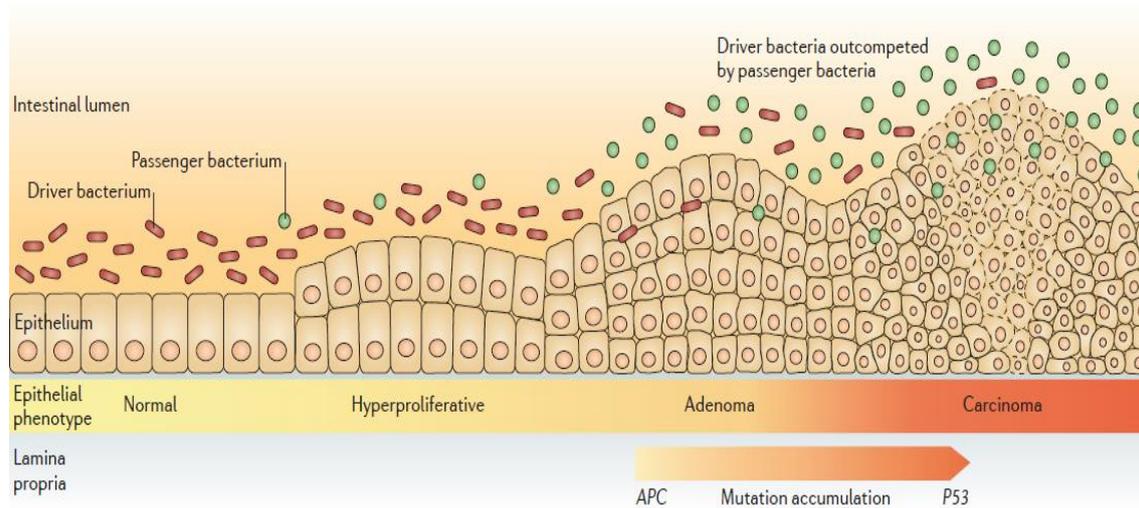
**Figura 12.** Desencadenantes ambientales, tales como la dieta, la edad, las infecciones por patógenos, pueden modificar la composición microbiana que, en un huésped genéticamente susceptible, puede conducir a la inflamación crónica del intestino. Fuente: imagen tomada de la publicación (Candela et al., 2014).

### 3.4.1 Modelo bacteriano *driver-passenger*

Recientemente, *Tjalsma et al* (Harold Tjalsma et al., 2012) han propuesto un modelo dinámico basado en ecología microbiana, el cual explicaría la participación bacteriana en el inicio y progresión del CCR.

Este modelo bacteriano es conocido con el nombre de *driver-passenger*. Según este modelo, el desarrollo del CCR es iniciado por bacterias *driver* con características pro-cancerígenas, que contribuyen al daño del DNA celular y por tanto en la iniciación del CCR. (Figura 13) Por tanto, el microambiente local está alterado debido a la tumorigénesis en curso y, en este desarrollo, las bacterias *drivers* quedan sustituidas por

las bacterias *passengers*, las cuales muestran una ventaja adaptativa y competitiva en el microambiente tumoral, siendo capaces de favorecer la progresión tumoral (Figura 13).



**Figura 13.** Modelo bacteriano *driver-passenger* en el desarrollo del CCR. Fuente: imagen tomada de la publicación (Harold Tjalsma et al., 2012)

Por ejemplo, algunos nutrientes y cofactores específicos del microambiente tumoral, tales como las especies reactivas de oxígeno, pueden ser utilizados selectivamente por bacterias *passenger* (Bliska & van der Velden, 2012).

Las bacterias *drivers* se definen como aquellas bacterias intestinales que muestran características pro-cancerígenas y poseen un carácter transitorio o autóctono, tal que pueden iniciar el proceso de la carcinogénesis.

Se han identificado varios candidatos de bacterias *drivers*, como son las cepas de *Enterococcus faecalis* productoras de superóxido (Huycke, Abrams, & Moore, 2002), cepas de *Escherichia coli* productoras de genotoxinas (Arthur et al., 2012), y las cepas toxigénicas de *B. fragilis* (Ulger Toprak et al., 2006). Además, los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* con características pro-inflamatorias, tales como *Shigella*, *Citrobacter* y *Salmonella* se han asociado con las primeras etapas del CCR (Ahmed et al., 2007; Shen et al., 2010).

Ocasionalmente, las bacterias *drivers* actúan en concierto con bacterias auxiliares (o  $\alpha$ -bugs) en la promoción de la carcinogénesis (Sears & Pardoll, 2011). Generalmente son enterobacterias con actividad proinflamatoria que desplazan a bacterias con actividad protectora frente al CCR, debido a la generación de compuestos con carácter antiinflamatorio, tales como *F. prausnitzii*, *Roseburia* o *Bifidobacterium*, favoreciendo así la subsiguiente colonización de tejidos por parte de bacterias *drivers*.

Las bacterias *passengers* son siempre miembros autóctonos de la comunidad microbiana intestinal. Además presentan un estado colonizador relativamente pobre en el tracto intestinal sano, por lo que muestran una ventaja competitiva en el microambiente tumoral. Sin embargo, a diferencia de las bacterias *drivers*, que son siempre pro-cancerígenos, las bacterias *passengers* pueden ser de naturaleza pro-cancerígena o protectora, en función del microorganismo.

Mientras que en algunos casos el tejido carcinógeno se ha demostrado estar colonizado selectivamente por oportunistas patógenos, como *Fusobacterium nucleatum* (Castellarin et al., 2012; Kostic, Chun, Robertson, et al., 2013; Marchesi et al., 2011), *Streptococcus gallolyticus* (Boleij & Tjalsma, 2013) y *Clostridium septicum* (Wentling, Metzger, Dozois, Chua, & Krishna, 2006), que pueden estar involucrados en la progresión del CCR, en otras circunstancias los tejidos tumorales estuvieron enriquecidos por bacterias pasajeras mutualistas, como *Corynebacteriaceae*, *Roseburia* y *Faecalibacterium*, lo que sugiere un posible papel protector de estos microorganismos frente al CCR (Marchesi et al., 2011).

### **3.4.2 Posibles mecanismos bacterianos implicados en el desarrollo del CCR**

El microbioma intestinal constituye un importante motor en la configuración del metaboloma intestinal (Holmes, Li, Athanasiou, Ashrafian, & Nicholson, 2011).

Uno de los mecanismos mejor comprendidos para la iniciación del cáncer es a través de la liberación de compuestos genotóxicos que inducen mutaciones en las células del epitelio intestinal. A continuación se muestran varios ejemplos de cómo la microbiota intestinal puede promover la aparición y progresión del CCR por diferentes procesos (Candela et al., 2011), tales como la inducción de un estado inflamatorio crónico, la

biosíntesis de genotoxinas que interfieren tanto en la regulación del ciclo celular como en el daño directo al DNA, la producción de metabolitos tóxicos y la activación de aminas heterocíclicas de la dieta a compuestos pro-cancerígenos.

### 3.4.2.1 Inducción del estado inflamatorio

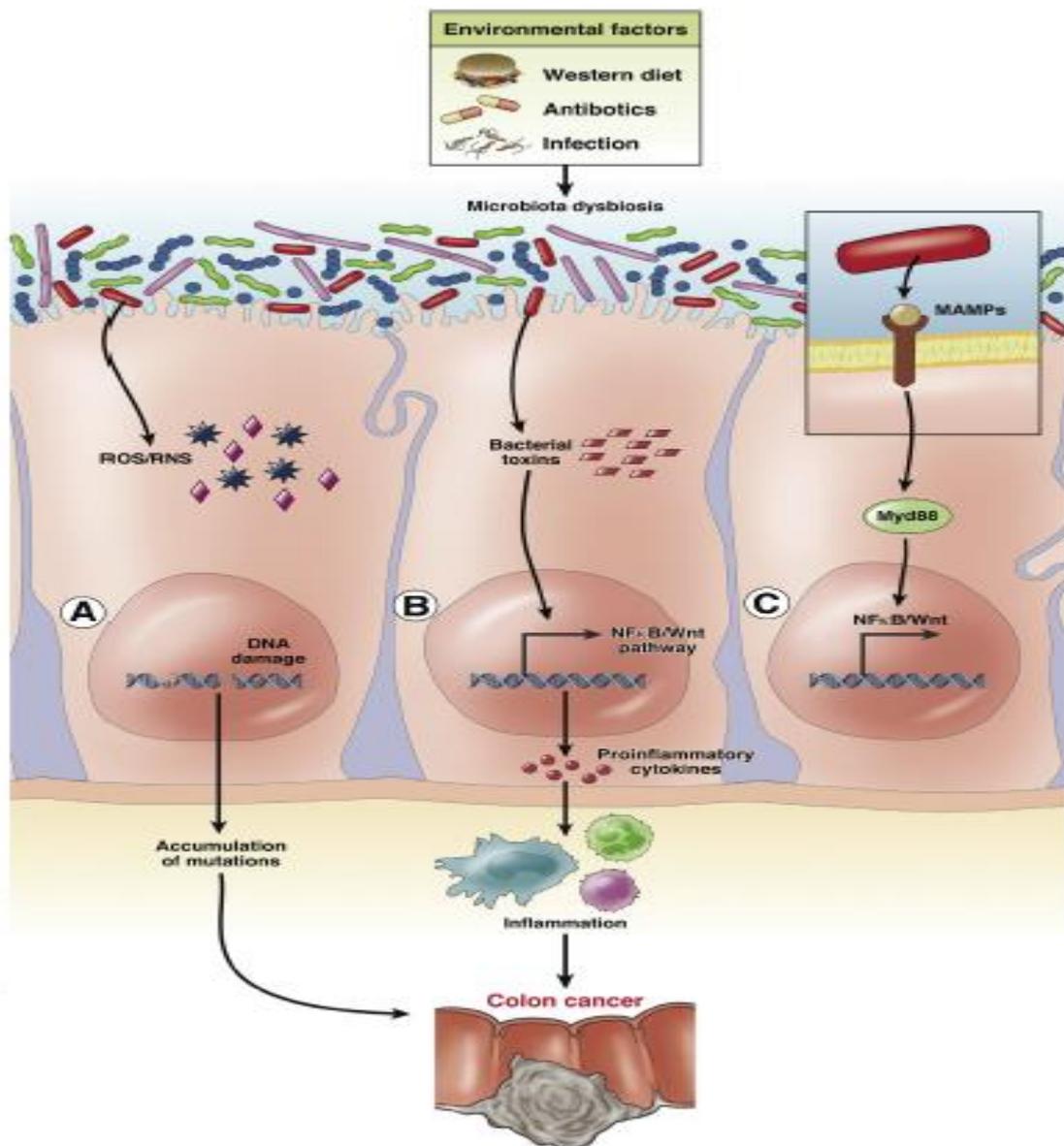
Los trastornos inflamatorios crónicos están asociados con un mayor riesgo de desarrollo del cáncer, mediante la inducción de mutaciones, inhibiendo la apoptosis o estimulando la angiogénesis y proliferación celular (Medzhitov, 2008). La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa se asocian a menudo con un aumento de riesgo a desarrollar CCR y datos epidemiológicos sugieren que la duración y la gravedad de la colitis crónica representan un factor de riesgo significativo para la asociación de la colitis al CCR (Gupta et al., 2007; Rutter et al., 2004). Además, numerosos estudios muestran la implicación de la microbiota intestinal en la inflamación dependiente de carcinogénesis intestinal (Uronis et al., 2009b).

El factor nuclear NF-Kb está implicado en la regulación de la supervivencia, inflamación e inmunidad celular, por lo que juega un papel fundamental en la conexión entre la inflamación y el cáncer. Varios experimentos realizados en modelos de ratón con colitis asociada a cáncer, han mostrado el papel dual de NF-kB en la carcinogénesis en función del tipo de célula (Greten et al., 2004). Mientras que en los enterocitos contribuye al inicio del tumor por la supresión de la apoptosis, en las células mieloides está implicado en la promoción del crecimiento del tumor por medio de la producción de mediadores inflamatorios.

Además, se ha demostrado recientemente que la elevada señalización de NF-kB puede activar mutaciones en la vía de señalización Wnt, lo que lleva a la diferenciación de las células epiteliales en células iniciadoras del tumor (Schwitalla et al., 2013).

Generalmente, la activación de NF-kB resulta en la expresión de citoquinas inflamatorias (por ejemplo, factor de necrosis tumoral alfa, interleucina (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 (Femia et al., 2010; Horst et al., 2009).

Por tanto, la activación de NF- $\kappa$ B a través del reconocimiento bacteriano por medio de los receptores TLRs, podría explicar cómo las bacterias juegan un papel en el desarrollo del cáncer de un epitelio normal (Kraus & Arber, 2009; Lee et al., 2010) (Figura 14).



**Figura 14.** Papel de la disbiosis bacteriana en la activación de NF- $\kappa$ B y desarrollo del CCR. . Fuente: imagen tomada de la publicación (Abreu & Peek, 2014).

Además, los desequilibrios de la microbiota en favor de patógenos oportunistas proinflamatorios como los pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y *Clostridium difficile*, se han propuesto como agentes implicados en la progresión tumoral (Lupp et al., 2007; Stecher & Hardt, 2008).

Del mismo modo, en el contexto del modelo bacteriano *driver-passenger*, se ha sugerido que varias bacterias *drivers* como *Shigella*, *Citrobacter*, *Salmonella* y *B. fragilis* toxigénico, y otras bacterias *passengers* como *F. nucleatum*, *Streptococcus gallolyticus* y *Clostridium septicum*, están implicadas en la carcinogénesis por la inducción de una respuesta pro-inflamatoria (Harold Tjalsma et al., 2012).

Un reciente estudio llevado a cabo en ratones *knockout* GF IL-10 (IL10 - / -) con colitis inducida mediante azoximetano (AOM), mostró como la detección de los microorganismos por parte de los TLRs es esencial en el desarrollo de colitis asociada a CCR (Uronis et al., 2009a).

Por tanto, la inflamación representa un vínculo molecular entre la respuesta inmunitaria del huésped, la microbiota intestinal y la actividad genotóxica con la inflamación asociada al CCR (Schwabe & Wang, 2012) .

### 3.4.2.2 Biosíntesis de genotoxinas

En la población humana sana, la microbiota intestinal contiene varias cepas bacterianas productoras de toxinas (Paul B Eckburg et al., 2005), cuyos efectos a largo plazo aún son desconocidos en cuanto al proceso carcinogénico.

Los factores de virulencia bacterianos como las toxinas, afectan a procesos esenciales de la célula eucariota, tales como la señalización celular, mecanismos de reparación del DNA o el ataque directo al genoma (Lax, 2005), lo que provoca una reacción inflamatoria que produce radicales libres. Por ello se piensa que pueden estar implicados en la iniciación y progresión del CCR.

#### **Función de la toxina *FadA* producida por *F. nucleatum***

*F. nucleatum* es una bacteria comensal Gram-positiva, que posee la capacidad de inducir CCR a través de la expresión del factor de virulencia FadA, la cual es una molécula de adhesión a la superficie (Ikegami, Chung, & Han, 2009), que facilita la fijación e invasión de este microorganismo a las células epiteliales del colon (Han et al., 2005). Además, es capaz de interactuar con E-cadherina, proteína importante en el mantenimiento de la integridad de las células epiteliales del colon (Figura 15).

Concretamente, FadA provoca pérdida de contacto en la unión célula-célula del epitelio del colon, que en última instancia resulta en un aumento de la permeabilidad paracelular, lo que proporciona una oportunidad para otras especies bacterianas para penetrar en el epitelio, desencadenando una estimulación del sistema inmunitario del huésped (Fardini et al., 2011).

Además, FadA es capaz de activar la ruta de señalización de la  $\beta$ -catenina y la expresión de un número de genes que transcriben factores de transcripción, marcadores de células madre y factores que estimulan la proliferación y crecimiento de células epiteliales (Rubinstein et al., 2013) (Figura 15).

Curiosamente, *Fusobacterium* posee la capacidad de unión a la mucosa normal y a pólipos adenomatosos, lo que sugiere que este organismo podría promover el desarrollo de CCR en la mucosa normal o acelerar la carcinogénesis en los adenomas existentes.

Basándonos en el hecho de que el número de copias detectadas del gen FadA es significativamente mayor en individuos con CCR que individuos controles sanos, se ha propuesto que este gen podría ser utilizado como un biomarcador de riesgo de CCR (Rubinstein et al., 2013).

### **Efecto de la fragilisina producida por la cepa *B. fragilis* enterotoxigénica**

Las toxinas bacterianas poseen un gran potencial para poder inducir CCR, tal como la fragilisina. Esta toxina es una metaloproteasa producida por miembros del género *Bacteroides*, capaz de promover diferentes efectos a nivel del epitelio:

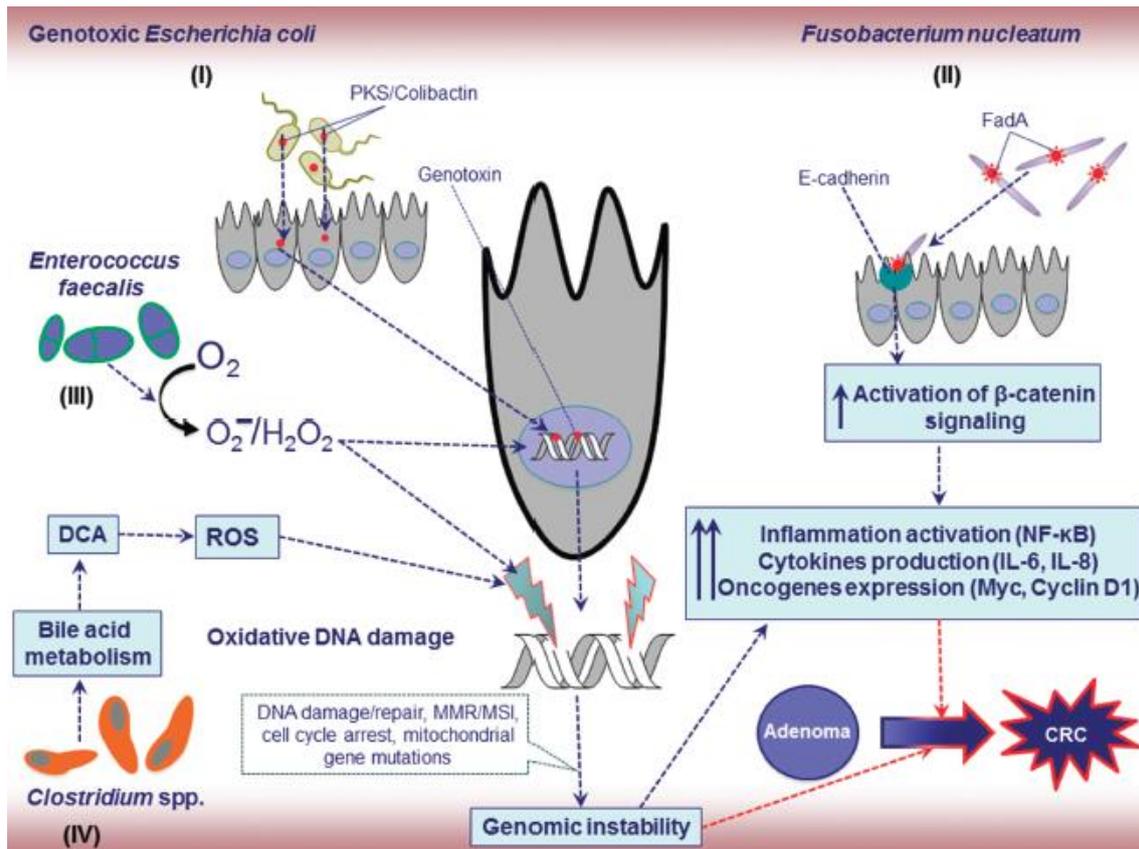
- Induce proliferación de las células epiteliales del colon a través de la activación del oncogén c-Myc (S. Wu, Morin, Maouyo, & Sears, 2003) y desencadena la respuesta inflamatoria mediante la inducción y producción de IL-8 por las células epiteliales de colon (Sanfilippo et al., 2000) .

- Promueve la tumorigénesis desencadenando una respuesta inflamatoria basada en un aumento de expresión de STAT3, que conduce al reclutamiento de un subconjunto de linfocitos altamente pro-inflamatorios (Th 17) (S. Wu et al., 2009).
- Presenta la capacidad de unión a las células epiteliales del colon y estimulan la escisión de la E-cadherina, aumentando así la permeabilidad de la barrera intestinal y la señalización intracelular a través de la vía  $\beta$ -catenina / Wnt, la cual es activa constitutivamente en casi todos los CCR. Como resultado, esta toxina estimula la proliferación y migración de las células cancerosas del colon humano (S. Wu et al., 2003).

Es de destacar, que la forma enterotoxigénica de *B. fragilis* sólo está presente en aproximadamente el 10% al 20% de la población sana, mientras que en pacientes con CCR se incrementa en aproximadamente un 40% (Sears, 2009; Ulger Toprak et al., 2006). Sin embargo, aunque la toxina de *B. fragilis* se ha propuesto como uno de los principales mecanismos sospechosos de conducción al CCR, (Housseau & Sears, 2010; S. Wu et al., 2009), estudios muy recientes muestran que las toxinas más activamente transcritas en tejido tumoral y normal adyacente de pacientes con CCR son las derivadas de *E. coli*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella flexneri*, lo que sugiere una fuerte implicación de las toxinas de enterobacterias en la tumorigénesis.

### **Efecto de las toxinas producidas por las enterobacterias**

Un número determinado de cepas de bacterias Gram negativas producen una gama de toxinas, donde algunas de ellas resultan ser potencialmente perjudiciales para los seres humanos, ya sea dañando directamente el DNA o interrumpiendo específicamente la señalización celular (Figura 15). En el contexto de la inflamación se ha demostrado un aumento de las cepas *E. coli* toxigénicas, favoreciendo así su adhesión al epitelio intestinal (Schwabe & Wang, 2012).



**Figura 15.** Mecanismos moleculares de determinados microorganismos relacionados con el desarrollo de CCR. Fuente: imagen tomada de la publicación (Dulal & Keku, 2014).

Las toxinas citoletales (CDT), pertenecen a una familia de toxinas proteicas de acción intracelular producidas por algunas bacterias Gram-negativas. Su acción a nivel de la célula eucariota trae varias consecuencias, siendo la más característica la inhibición del punto de control en G2/M del ciclo celular (Lara-Tejero & Galán, 2002).

La CDT en forma activa consta de tres subunidades, donde CDTA y CDTC se encargan de la internalización, y CDTB con actividad enzimática induce la ruptura del DNA de doble cadena y recluta la quinasa ataxia telangiectasia mutada, lo que desencadena una respuesta de daño al DNA (Nešić, Hsu, & Stebbins, 2004), la cual ofrece una barrera eficaz a la tumorigénesis a través de la inducción de la muerte celular o senescencia (Bartkova et al., 2006).

Las células expuestas a dosis subletales de CDTs de *Helicobacter hepaticus* o *Haemophilus ducreyi* muestran un aumento de la frecuencia de mutaciones, una acumulación de aberraciones cromosómicas y un aumento del crecimiento celular independiente de anclaje (Ge et al., 2007). Del mismo modo, se ha comprobado como la actividad DNA-asa de esta toxina (CTD) producida por cepas de *E. coli*, ejercen un daño en el DNA que favorecen el desarrollo de CCR (Arthur et al., 2012; Cuevas-Ramos et al., 2010; Nešić et al., 2004).

Por otra parte, se ha podido comprobar cómo las infecciones crónicas de hígado e intestino de ratón con cepas de *H. hepaticus* o *Campylobacter jejuni* productoras de CDTs, se han asociado con procesos displásicos (Ge et al., 2007), lo que confirma la capacidad de las bacterias productoras de CDTs para inducir lesiones preneoplásicas *in vivo*. Muy recientemente, Buc et al (Buc et al., 2013) han demostrado una alta prevalencia de cepas de *E. coli* productoras de genotoxinas y ciclomodulina asociadas a mucosa de pacientes con CCR.

Además, algunas cepas comensales de *E. coli* contienen una isla de patogenicidad llamada policétido sintasa (PKS) que codifica para un conjunto de enzimas llamadas colibactinas (Nougayrède et al., 2006), las cuales inducen la rotura del DNA de doble cadena que conduce a inestabilidad genómica (Arthur et al., 2012; Cuevas-Ramos et al., 2010) (Figura 15).

La infección de ratones con cepas de *E. coli* PKS +, se ha relacionado con la expresión de genes implicados en la producción colibactina y en la inducción de daño al DNA celular (Cuevas-Ramos et al., 2010). La capacidad de la colibactina para promover la tumorigénesis *in vivo* ha sido recientemente demostrada en ratones knockout GF IL-10 tratados con el carcinógeno AOM y monocolonizados con *E. coli* PKS+, los cuales mostraron una alta incidencia de adenocarcinoma invasivo si se compara con ratones infectados con cepas isogénicas PKS deficientes o con bacterias control PKS- como *E. faecalis* (Arthur et al., 2012).

Otros autores, muestran cómo las cepas de *E. coli* PKS+ se detectan en un mayor porcentaje (66,7%) en pacientes con CCR que en pacientes con enfermedad intestinal no inflamatorias o pacientes control sin CCR (20%), lo que sugiere que existe una acción conjunta entre la respuesta inflamatoria del hospedador y las cepas *E. coli* PKS+, dando lugar a un microambiente que promueve un daño directo en el DNA y por tanto la

tumorigénesis (Arthur et al., 2012). Estos autores también demostraron que la colonización por cepas *E. coli* productoras de colibactina se establece en un intestino que presenta un proceso inflamatorio previo, probablemente inducido por bacterias *drivers*.

Otro grupo de toxinas son las que poseen la capacidad de inducir inflamación y alterar la señalización celular encargada de regular la proliferación celular. Las bacterias *E. coli* productoras del factor necrotizante citotóxico tipo 1 (CnF1), regulan positivamente la actividad de las Rho GTPasas (Fiorentini et al., 1997), induciendo diversas disfunciones en las células epiteliales, tales como apoptosis, neutralización, liberación de citoquinas pro-inflamatorias, expresión de COX2, activación de NF- $\kappa$ B y potenciación de la motilidad celular.

Además, CnF1 induce a las células en reposo a entrar en ciclo celular y a sintetizar su DNA (Falzano et al., 2006), además de interferir en la citocinesis normal, lo que resulta en la producción de células multinucleadas y en la aparición de aneuploidías. De este modo, cabe esperar que las cepas de *E. coli* productoras de CnF1 puedan contribuir al desarrollo del cáncer ya que implica las vías habituales de señalización en carcinogénesis. Nuestra hipótesis es que estas bacterias puedan actuar como *passengers*, reforzando y favoreciendo el desarrollo del CCR, pero no causándolo (Fabbri, Travaglione, Ballan, Loizzo, & Fiorentini, 2013).

La capacidad proinflamatoria de CnF1 ha sido recientemente confirmada en *Drosophila*, donde es capaz de activar NF- $\kappa$ B, uno de los principales factores de transcripción de la respuesta inmune innata, de forma independiente a la vía mediada por los TLRs.

De hecho, la activación de la Rac2 GTP-asa mediada por CnF1 activa la inmunidad innata protectora a través de la señalización de la Rip quinasa que funciona aguas arriba de NF- $\kappa$ B (Boyer et al., 2011). El conjunto de estos datos apoyan el estratégico papel de las cepas de *E. coli* toxigénicas en el inicio y progresión del CCR.

### **3.4.2.3 Producción de metabolitos tóxicos**

Entre los principales metabolitos microbianos implicados en el desarrollo de un estado inflamatorio, encontramos los siguientes:

### **Óxido nítrico**

Durante el proceso inflamatorio, las bacterias intestinales inducen en el huésped la activación de macrófagos a producir óxido nítrico y otras especies reactivas secundarias, los cuales tienen la capacidad de dañar el DNA. Además, las bacterias anaerobias desnitrificantes pueden generar directamente el óxido nítrico como un intermediario en el ciclo del nitrógeno, donde en una reacción de múltiples pasos, permite reducir el nitrato a nitrógeno (Lundberg, Weitzberg, Cole, & Benjamin, 2004). Algunos autores, tales como *Sobko et al.* (Sobko et al., 2006) han demostrado cómo los lactobacilos y las bifidobacterias son capaces de generar cantidades significativas de óxido nítrico a partir de una dieta rica en nitratos. Sin embargo, el papel biológico de las bacterias productoras del óxido nítrico no está claro.

### **Especies reactivas del oxígeno (ROS)**

Otro potente agente causal de mutaciones son las especies reactivas de oxígeno (ROS). Los ROS pueden ser generados tanto por las células inmunes durante la inflamación como por la microbiota intestinal.

Existen distintos estudios *in vivo* e *in vitro* que han demostrado la producción de radicales hidroxilo por *E. faecalis* (Huycke et al., 2001; Huycke & Moore, 2002), la cual es responsable de la producción de altas cantidades de O<sub>2</sub> extracelular que posteriormente forma radicales hidroxilo y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Curiosamente, la producción de superóxido se limita específicamente a los enterococos que colonizan el colon (Huycke, Joyce, & Wack, 1996; Winters, Schlinke, Joyce, Glore, & Huycke, 1998).

Los ROS son potentes mutágenos que causan mutaciones puntuales, roturas en el DNA y proteínas de unión al DNA que podrían contribuir a la inestabilidad cromosómica y por tanto supone un riesgo en el desarrollo de CCR (Cooke, Evans, Dizdaroglu, & Lunec, 2003; Evans, Dizdaroglu, & Cooke, 2004; D. Wang, Kreutzer, & Essigmann, 1998).

### **Alcohol**

El alcohol es otra molécula implicada en el desarrollo de CCR. Éste se ingiere por vía oral y alcanza el colon por la circulación sanguínea. 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 a acetaldehído (Salaspuro, 1996), el cual es conocido por sus propiedades carcinogénicas (Seitz et al., 1990).

### **Sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>O)**

Se trata de un compuesto producido por las bacterias sulfato reductoras como parte de su metabolismo normal. Los miembros de este grupo de bacterias reductoras son *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Desulfobacter*, y *Desulfococcus*, y usan lactato, piruvato, o acetato como fuente de energía durante la reducción de sulfato a H<sub>2</sub>S (Christl, Murgatroyd, Gibson, & Cummings, 1992; Gibson, 1990; Strocchi, Furne, Ellis, & Levitt, 1994). Este compuesto no actúa como un agente que daña el DNA de forma directa, sino que modula la proliferación, la apoptosis, y la diferenciación de las células epiteliales del colon (Deplancke et al., 2003) por medio de la vía RAS-MEK-ERK (Deplancke et al., 2003; Pruitt & Der, 2001). Por ello, esto nos lleva a pensar que el H<sub>2</sub>S es un agente potencial de desarrollo de tumores.

### **Otros**

Los ácidos biliares secundarios se han detectado en niveles elevados en las heces de pacientes con CCR y se ha demostrado que tiene propiedades carcinógenas *in vitro* (Degirolamo, Modica, Palasciano, & Moschetta, 2011). Otro ejemplo de cómo los metabolitos bacterianos pueden influir en el desarrollo del CCR, sería la producción por el género *Bacteroides*, de lípidos poliinsaturados tipo éter, como es el fecapentano (De Kok, Van Maanen, Lankelma, Ten Hoor, & Kleijnans, 1992), que inducen daño oxidativo del DNA a través de la generación de 8-oxo-DG o alquilando directamente el DNA (Huycke & Gaskins, 2004; Shioya, Wakabayashi, Yamashita, Nagao, & Sugimura, 1989; Zarkovic et al., 1993).

#### **3.4.2.4 Activación de aminas heterocíclicas de la dieta**

Los componentes de la dieta pueden ser diferencialmente metabolizados por miembros de la microbiota intestinal lo que puede influir en el desarrollo de CCR.

Por ejemplo, las dietas que contienen altas cantidades de proteínas, tales como la carne roja, están implicadas como un factor potencial en el desarrollo del CCR. En este caso, las bacterias del intestino metabolizan proteínas a nitrosamina y aminas heterocíclicas que han sido identificadas como factores de riesgo para el desarrollo de CCR (C. Gill & Rowland, 2002; Hughes, Cross, Pollock, & Bingham, 2001; Macfarlane, Steed, & Macfarlane, 2009; Norat & Riboli, 2001).

La dieta humana es abundante en un gran número de aminas heterocíclicas (Schut & Snyderwine, 1999). Una fuente importante de estos compuestos son el pescado y la carne roja tras el proceso de cocción (Hatch, Knize, & Colvin, 2001). Por ejemplo, la 2-amino-3-metil-3H-imidazo [4,5-f] quinolina (IQ), es una amina heterocíclica que se considera como un procarcinógeno (Sugimura & Sato, 1983).

Las bacterias anaeróbicas del colon como *Eubacterium*, tienen la capacidad de convertir el compuesto IQ a 2-amino-3-metil-3Himidazo [4,5-f] quinolina-7-ona (HOIQ), el cual presenta propiedades mutagénicas (Bashir, Kingston, Carman, Van Tassell, & Wilkins, 1987), e induce intercambios entre cromátidas hermanas y síntesis de DNA de forma no programada (Kassie et al., 2001; Wild, Kaiser, King, & Harnasch, 1986).

### 3.4.2.5 Otros compuestos no toxigénicos

Por otro lado, las dietas ricas en fibra se han considerado como protectoras contra el desarrollo del CCR. La digestión microbiana de los hidratos de carbono presentes en la fibra, resulta en una elevación de los niveles de ácidos grasos de cadena corta (SCFA), en particular del butirato.

El butirato es un metabolito beneficioso, ya que es una de las principales fuente de energía para las células epiteliales del colon, además de modular la expresión de varios genes (Donohoe et al., 2012). Además posee un efecto protector contra el CCR, ya que presenta una actividad antiproliferativa en la mayoría de las líneas celulares cancerosas y una potente capacidad para desencadenar la apoptosis (Heerdt, Houston, & Augenlicht, 1994).

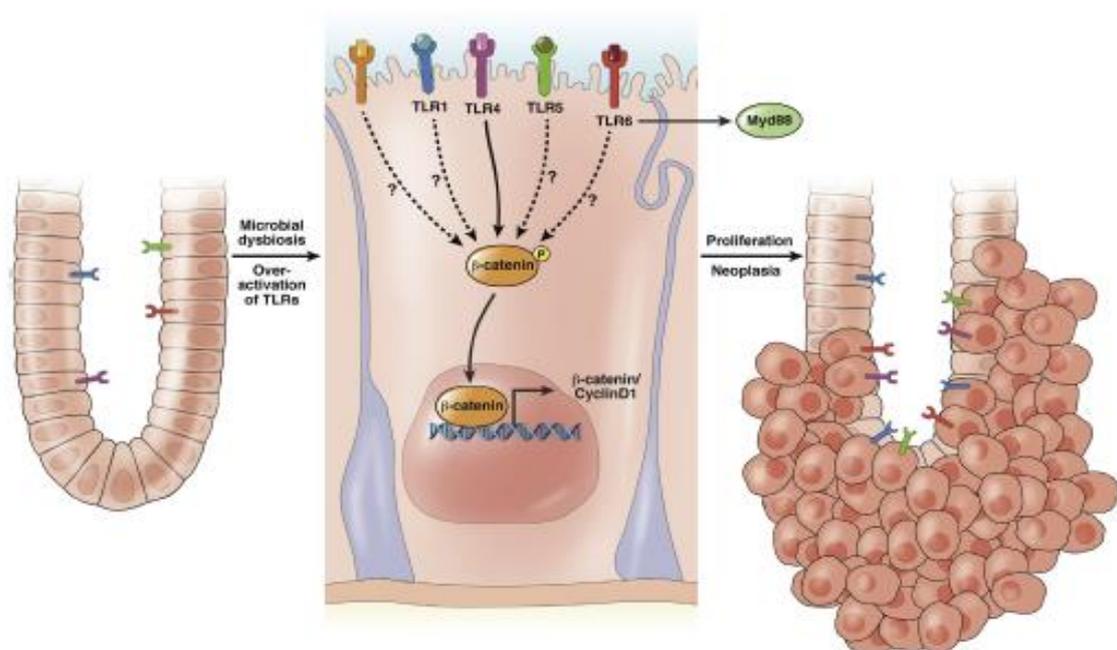
Existe controversia acerca de si el aumento en la producción de butirato es el mecanismo a través del cual la fibra dietética protege de CCR. De hecho, diferentes estudios muestran como el butirato promueve la carcinogénesis de colon en diferentes modelos animales (Caderni et al., 2000; Mandir, Englyst, & Goodlad; Pajari et al., 2003) y en humanos (Alberts et al., 2000; Bonithon-Kopp et al., 2000; Schatzkin et al., 2000).

De modo que el efecto de la fermentación microbiana sobre la dieta en alto contenido en fibra y la producción de butirato asociados al desarrollo del CCR es complejo y depende de la genética del huésped, y particularmente de la composición microbiana y la presencia de otros metabolitos como la grasa. Una mejor comprensión de las interacciones entre estos factores podría resolver el papel que desempeña el butirato.

### 3.4.3 Respuesta inmune innata a los microorganismos y su papel en el CCR

Algunos estudios de asociación entre la microbiota, el sistema inmune innato y el cáncer muestran que la activación de la proteína adaptadora para TLR, IL-1 y IL-18 del factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88), posee un papel fundamental tanto en el desarrollo de tumores de forma espontánea como de forma inducida (Figura 16) (Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2007).

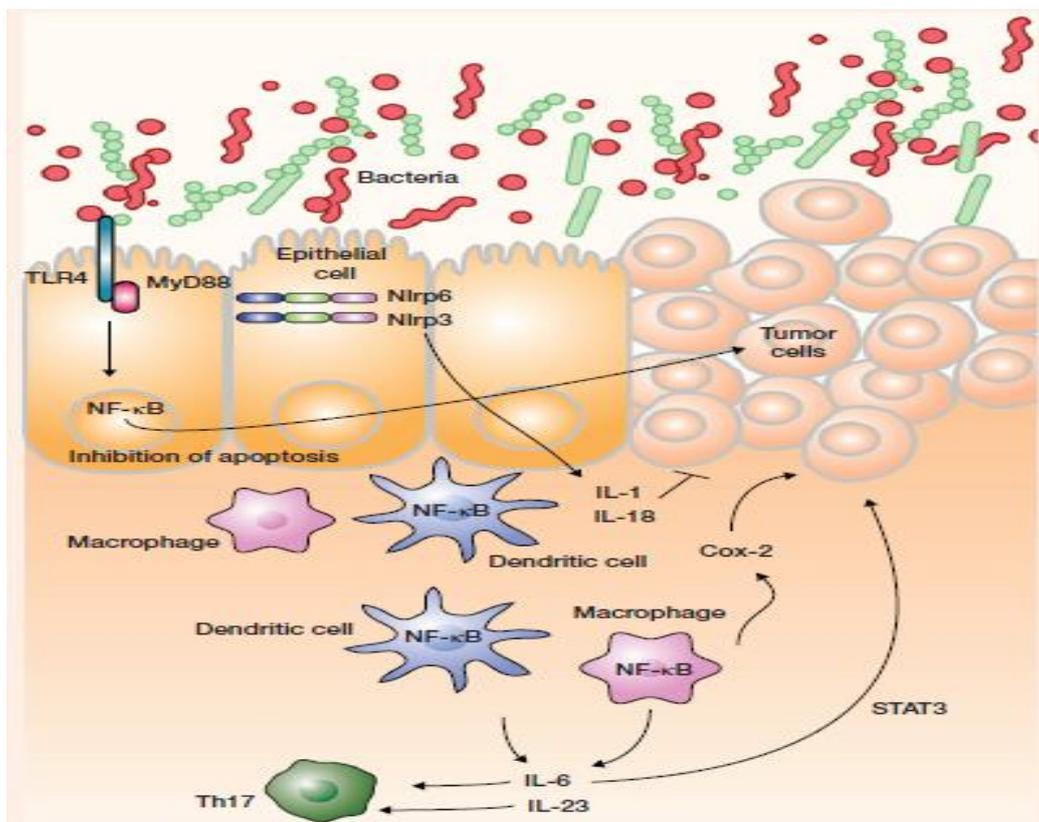
Por otro lado, la señalización de MyD88 mediada a través de TLR2 parece ejercer un efecto protector en la colitis asociada a cáncer (CAC) inducida mediante sodio dextrano sulfato (DSS) (Lowe et al., 2010; Salcedo et al., 2010), a diferencia de la señalización a través del receptor TLR4 que promueve el desarrollo de pólipos intestinales (Fukata et al., 2007). Este efecto contradictorio podría explicarse por el hecho de que MyD88 también envía señales a través del receptor de IL-18, y en consecuencia los ratones Myd88<sup>-/-</sup> y IL18<sup>-/-</sup> muestran una susceptibilidad similar a la formación de pólipos (Salcedo et al., 2010).



**Figura 16.** Activación bacteriana de los receptores TLR y promoción del CCR. Fuente: imagen tomada de la publicación (Abreu & Peek, 2014)

Por lo tanto, la ausencia de MyD88 puede inducir la tumorigénesis mediante el bloqueo de vías dependientes de IL-18 que controla la composición microbiana a través de inflammasomas. La señalización del inflammasoma activa la caspasa-1, la cual es esencial en la producción de IL-1 $\beta$  e IL-18 (Figura 17). Los ratones deficientes en las caspasa-1 (Hu et al., 2010) u otros miembros del inflammasoma, tales como NLRP3 (Zaki, Vogel, Body-Malapel, Lamkanfi, & Kanneganti, 2010), NLRP6 (G. Y. Chen, Liu, Wang, Bertin, & Núñez, 2011) y NLRP12 (Allen et al., 2012), tiene un incremento en la susceptibilidad a la formación de pólipos (Figura 18).

De forma particular, se ha visto como ratones deficientes en NLRP6 desarrollan un estado inflamatorio asociado a disbiosis bacteriana por medio de CCL5 (Elinav et al., 2011), que promueve la proliferación de células epiteliales y la carcinogénesis a través de la inducción de la señalización de IL-6 (Hu et al., 2013). En este modelo de estudio, el cáncer es transmisible a los de tipo *wild type* mediante la transferencia de la microbiota intestinal, lo que sugiere que la composición microbiana alterada a partir de ratones deficientes en NLRP6 es suficiente para inducir la formación de tumores (Hu et al., 2013).



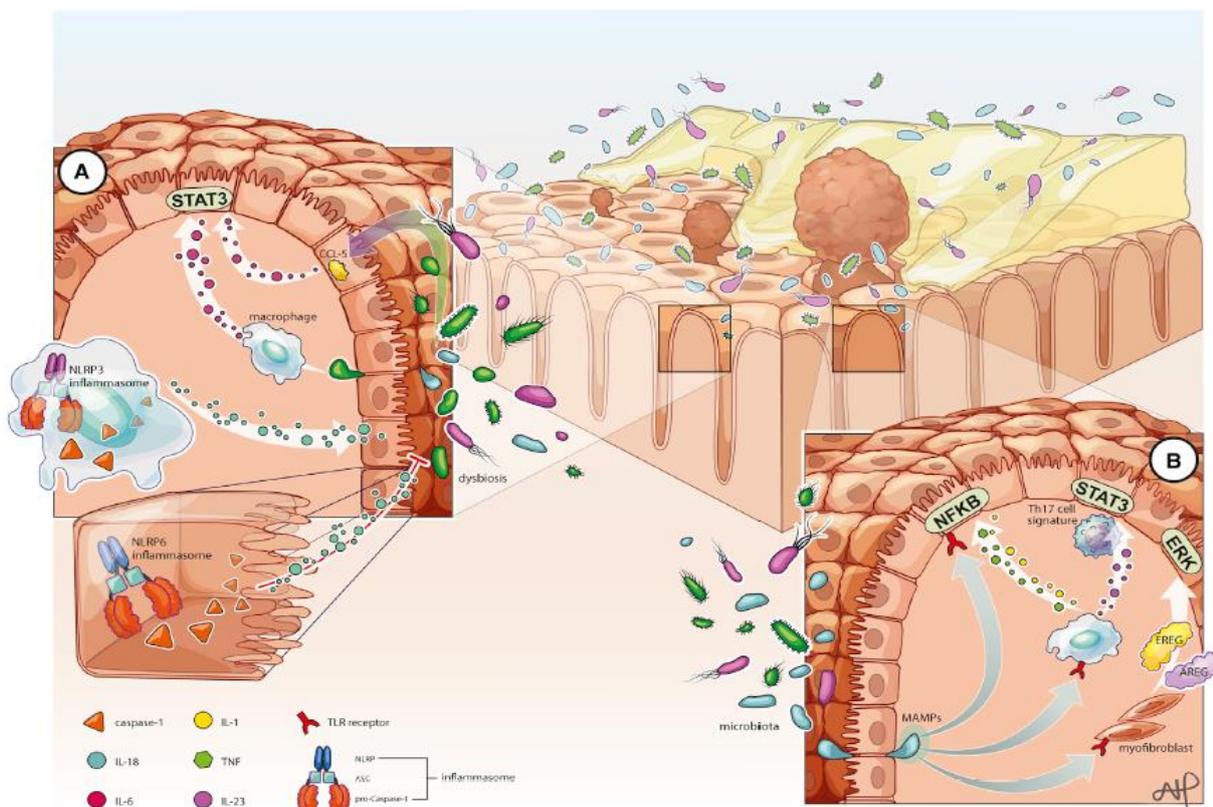
**Figura 17.** Receptores microbianos y su respuesta en el CCR. Fuente: imagen tomada de la publicación (Kostic, Chun, Meyerson, & Garrett, 2013).

NOD2 es un receptor de reconocimiento de patrones citoplasmáticos que está relacionado con el desarrollo de la enfermedad de Crohn en los seres humanos. En ratones, la deficiencia de NOD2 se ha asociado no sólo con disbiosis e inflamación, sino también con cáncer.

Se ha podido comprobar cómo una microbiota alterada asociada a la deficiencia NOD2 puede promover inflamación y carcinogénesis. Además la enfermedad fue transferible a los ratones de tipo wild type a través de los microorganismos del intestino (Couturier-Maillard et al., 2013).

Este trabajo, junto con los estudios del inflammasoma discutidos anteriormente, sugiere que la alteración de la señalización inmune innata podría estar implicada en el desarrollo de cáncer promovido por las bacterias de dentro de la microbiota intestinal.

Un punto importante que queda por comprender, es si las deficiencias en la señalización inmune innata conducen disbiosis en ausencia de inflamación. De hecho, otros estudios muestran que la disbiosis no está presente en animales NOD deficientes (Robertson et al., 2013; Shanahan et al., 2013).



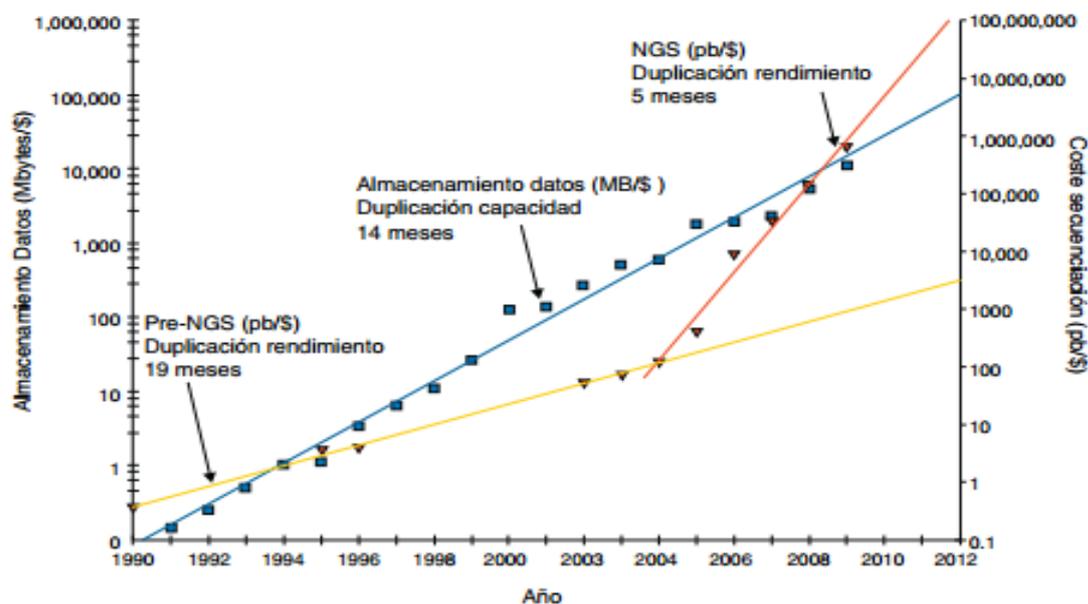
**Figura 18.** Papel que desempeña la disbiosis microbiana junto a la desregulación de la respuesta inmunitaria innata en el desarrollo del CCR. Fuente: imagen tomada de la publicación (Irrazábal, Belcheva, Girardin, Martin, & Philpott, 2014).

### 4. Biología molecular en la caracterización y cuantificación de la microbiota. Secuenciación de próxima generación (NGS)

#### 4.1 Introducción

La tecnología convencional de secuenciación ideada por *Sanger* (Sanger, Nicklen, & Coulson, 1977) presenta como principal limitación el escaso número de reacciones en paralelo capaz de realizar (de 96 a 384). Por lo tanto, el uso de esta técnica para la realización de experimentos de secuenciación supone un considerable tiempo para su análisis y precio por base secuenciada (1 € por cada 2.5 kb) (Metzker, 2005; Tucker, Marra, & Friedman, 2009).

Los avances tecnológicos en los últimos 10 años han conducido al desarrollo de la secuenciación de nueva generación (*next generation sequencing* [NGS]), también conocida como secuenciación masiva en paralelo, del inglés *massive parallel sequencing* (MPS). Esta «nueva generación» ha mejorado drásticamente en los últimos años, logrando que el número de bases que se pueden secuenciar por unidad de precio haya aumentado exponencialmente (Figura 19) (Stein, 2010).



**Figura 19.** Historial de cambios en los precios de los sistemas de almacenamiento y en los costes de las tecnologías de secuenciación. Fuente: imagen tomada la publicación (Stein, 2010)

Por tanto, las nuevas plataformas se distinguen por su capacidad 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).

## 4.2 Tipos

Las tres principales plataformas de secuenciación de DNA en paralelo de forma masiva que están en uso en la actualidad:

- i. Roche 454 GsFlex (Dressman, Yan, Traverso, Kinzler, & Vogelstein, 2003; Margulies et al., 2005)
- ii. Genome Analyzer o HiSeq de Illumina (Bentley et al., 2008)
- iii. SOLiD Applied Life Technologies (Shendure et al., 2005)

Además se han desarrollado otros dos sistemas de secuenciación masiva en paralelo: Helicos Heliscope™ (www.helicosbio.com) y Pacific Biosciences SMRT (www.pacificbiosciences.com).

Cada plataforma incorpora complejos procesos enzimáticos y químicos, sistemas ópticos de alta resolución y una alta tecnología de hardware y software (Tabla 10).

	Equipo	Compañía	Método de secuenciación	DNA molde	Longitud lecturas (pb)	Tiempo carrera (h)	nt/carrera (Gb)
<b>2ª Generación de secuenciadores</b>	GS-FLX (454)	Roche	Polimerasa (pírosecuenciación)	PCR Emulsión	250-400	10	0,4
	SOLEXA	Illumina	Polimerasa (terminadores reversibles)	PCR Puente	35-75	48	18
	ABI SOLID	Applied Biosystems	Ligasa (octámeros con código de dos bases)	PCR Emulsión	25-75	168	30
<b>3ª Generación de secuenciadores</b>	Helicos tSMS	Helicos BioSciences	Polimerasa	Molécula única	25-45	192	37
	Pacific Biosciences	Pacific Biosciences	Polimerasa	Molécula única	1000	NA	NA
	ZX Genetics	ZX Genetics	Microscopía electrónica	Molécula única	NA	NA	NA

**Tabla 10.** Comparación de las distintas plataformas de secuenciadores. Fuente: imagen tomada la publicación (Bautista, 2010).

Con NGS se busca amplificar cadenas simples de una biblioteca de fragmentos y llevar a cabo las reacciones de secuenciación sobre las hebras amplificadas.

Las bibliotecas de fragmentos se obtienen por alineamientos específicos de los *linkers* de la plataforma a los fragmentos generados directamente del genoma.

Gracias al empleo de secuencias adaptadoras las moléculas pueden ser amplificadas 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.

Es importante destacar que las plataformas de Helicos y Pacífico Biosystems son los llamados secuenciadores de "una sola molécula" y no requieren ningún tipo de amplificación de fragmentos de DNA previa a la secuenciación.

Otra diferencia entre estas plataformas y los secuenciadores capilares es el tiempo de ejecución requerido para generar datos ya que los secuenciadores de última generación requieren largos tiempos de lectura, entre 8 h y 10 días dependiendo de la plataforma y del tipo de lectura. Por otro lado, el rendimiento de lectura de secuencias en cada carrera es significativamente mayor que la secuenciación convencional de 96 lecturas que tiene un promedio de 750 pb por carrera. De este modo, la secuenciación NGS tiene un rendimiento que puede variar desde varios cientos de miles de lecturas (Roche / 454) a decenas de millones (Illumina y Applied Biosystems sólido).

A continuación mostramos las principales características de cada una de las tres plataformas de próxima generación más utilizadas así como sus ventajas y desventajas.

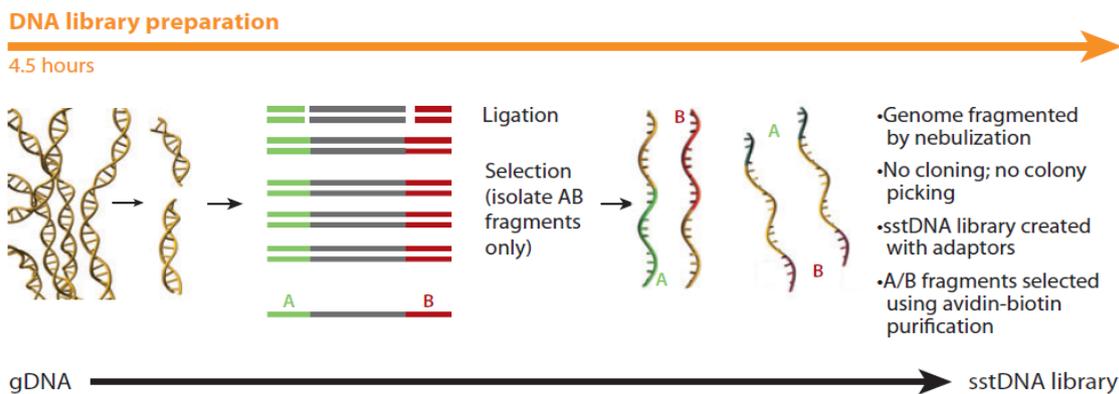
### **i. Roche / 454 FLX Pyrosequencer**

Este secuenciador de última generación fue el primero en comercializarse en 2004 por la empresa 454 que posteriormente fue adquirida por Roche.

Se basa en un sistema de secuenciación altamente paralelizable, con un rendimiento significativamente mayor que los instrumentos de electroforesis capilar. El aparato permite secuenciar 25 millones de bases, con un 99% de precisión en una tanda de 4 horas, lo que supone un rendimiento 100 veces superior a la cantidad de bases secuenciadas en ese tiempo en un secuenciador de 96 capilares.

Se trata de una tecnología basada en la pirosecuenciación, donde cada incorporación de nucleótido por la ADN polimerasa resulta en la liberación de pirofosfato, que tras una serie de reacciones finalmente se produce una emisión luminiscente por acción de la enzima luciferasa. La cantidad de emisión producida es proporcional al número de nucleótidos incorporados (hasta el punto de saturación del detector).

El método del 454 de Roche (Figura 20) consiste en fragmentar el DNA, generando una población de fragmentos que posteriormente se ligan a unas secuencias adaptadoras comunes a todos los fragmentos.



**Figura 20.** Método de secuenciación de 454 Roche. Preparación de la librería de DNA. Fuente: imagen tomada una la publicación (Mardis, 2008)

Una vez ligados los adaptadores, se mezclan con una población de perlas de agarosa, en cuya superficie llevan oligonucleótidos complementarios a las secuencias adaptadoras del conjunto de fragmentos, que se denomina biblioteca.

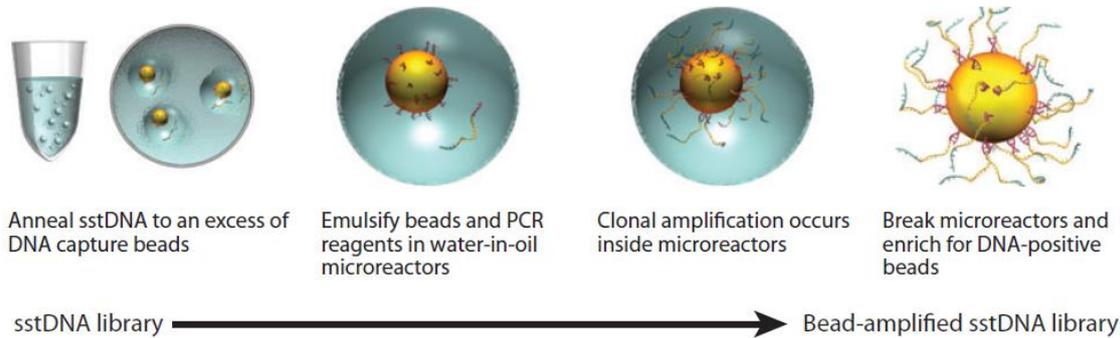
De este modo, cada perla queda asociada a un único fragmento. La mezcla entre los fragmentos (con adaptadores) y las esferas se realiza por un método de dilución límite, de modo que se obtiene un único fragmento unido a una esfera. Cada complejo fragmento DNA-esfera queda suspendido en una micela (agua-aceite) donde se llevará a cabo la PCR en emulsión (Figura 21).

Estas micelas contienen todos los reactivos de la PCR, y tras cumplir los ciclos térmicos de la PCR en emulsión, las micelas producirán aproximadamente un millón de copias de cada fragmento de ADN en la superficie de cada perla. Estas moléculas individuales que han sido amplificadas, posteriormente se secuenciarán en masa.

## Introducción

### Emulsion PCR

8 hours

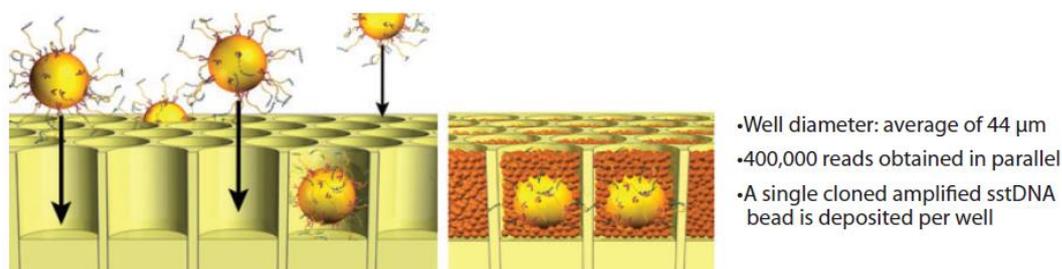


**Figura 21.** Método de secuenciación de 454 Roche. PCR en emulsión sobre perlas de agarosa. Fuente: imagen tomada la publicación (Mardis, 2008).

Una vez finalizada esta reacción, se rompe la emulsión y se recuperan las perlas donde se llevó a cabo la amplificación. Estas perlas contienen enzimas que catalizan las etapas de la reacción de pirosecuenciación y son depositadas en una placa de secuenciación (PTP; picoTiter plate), la cual contiene 1.6 millones de pocillos y cada uno de ellos solo puede contener una única perla, lo que proporciona una ubicación fija en donde cada reacción de secuenciación se puede monitorizar (Figura 22).

### Sequencing

7.5 hours



Amplified sstDNA library beads → Quality filtered bases

**Figura 22.** Método de pirosecuenciación de 454 Roche. Fuente: imagen tomada la publicación (Mardis, 2008).

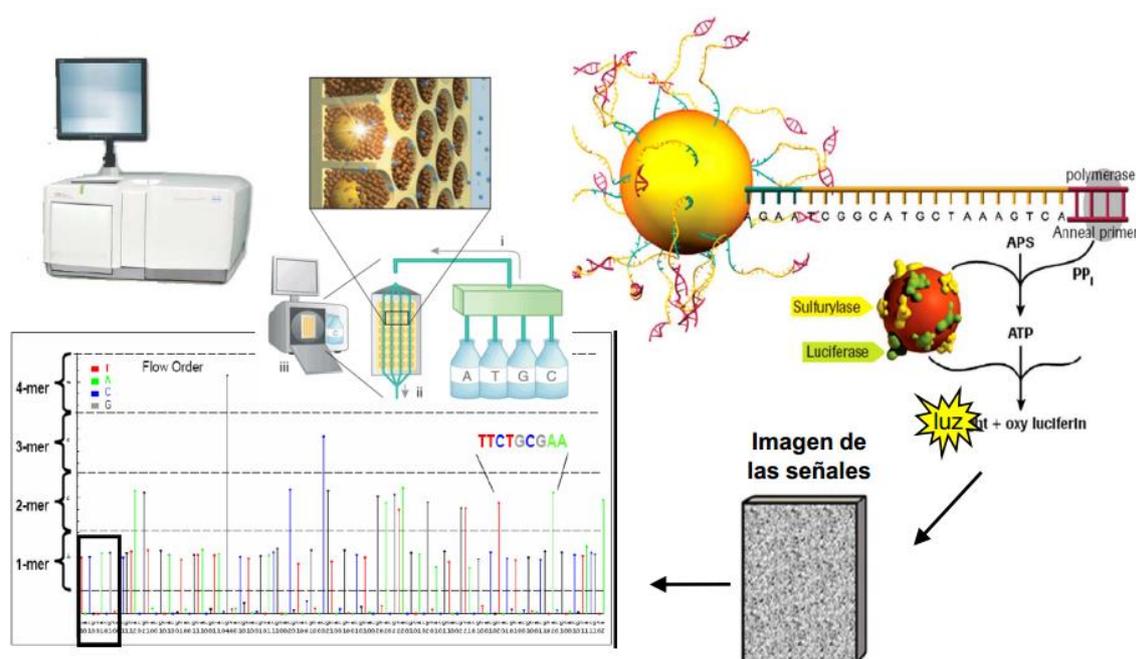
En este tipo de NGS no se utilizan nucleótidos terminadores. Se realizan ciclos donde se ofrece una base de forma secuencial a cada pocillo. Durante la incorporación de una base en una molécula naciente de DNA se libera pirofosfato, el cual se convierte en luz mediante dos procesos enzimáticos.

La luz emitida en cada pocillo por la incorporación de la base ofrecida, es monotorizada mediante la detección luminométrica por la liberación del pirofosfato durante la reacción de síntesis. Una cámara CCD colecta los datos de la incorporación de cada nucleótido en cada ciclo y posición, generando imágenes tras cada incorporación (Figura 23).

Los primeros cuatro nucleótidos (TCGA) del fragmento adaptador ligado al cebador de secuenciación para la construcción de la biblioteca de DNA, se corresponden con el flujo secuencial de nucleótidos a la placa de secuenciación.

De esta forma se ofrece la adenina (A) a todos los pocillos. En aquellos que se incorpora se observará la emisión de luz (dependiendo la cantidad de A incorporada, será la intensidad de la luz emitida). Una vez obtenidas las imágenes, se quita la base, y se ofrece la base T observándose entonces los pocillos que incorporan T. Se vuelve a eliminar la base no incorporada y se ofrece la base G, y luego la C para terminar el primer ciclo. La tanda de reacción finaliza después de 100 ciclos y el tamaño promedio de lectura es de 400 bases, por lo que en una tanda se obtienen cerca de 1 millón de secuencias (es decir 400 millones de bases/10 horas de carrera).

Esta estrategia permite que el software 454 permita calibrar la luz emitida por la incorporación de un solo nucleótido. Sin embargo, en el caso de homopolímeros es determinado por la cantidad de pirofosfato liberado.



**Figura 23.** Esquema representativo del proceso de pirosecuenciación. Fuente: Imagen tomada de [http://www.454.com/downloads/news-events/how-genome-sequencing-is-done\\_FINAL.pdf](http://www.454.com/downloads/news-events/how-genome-sequencing-is-done_FINAL.pdf)

### ii. Illumina Genoma Analizador

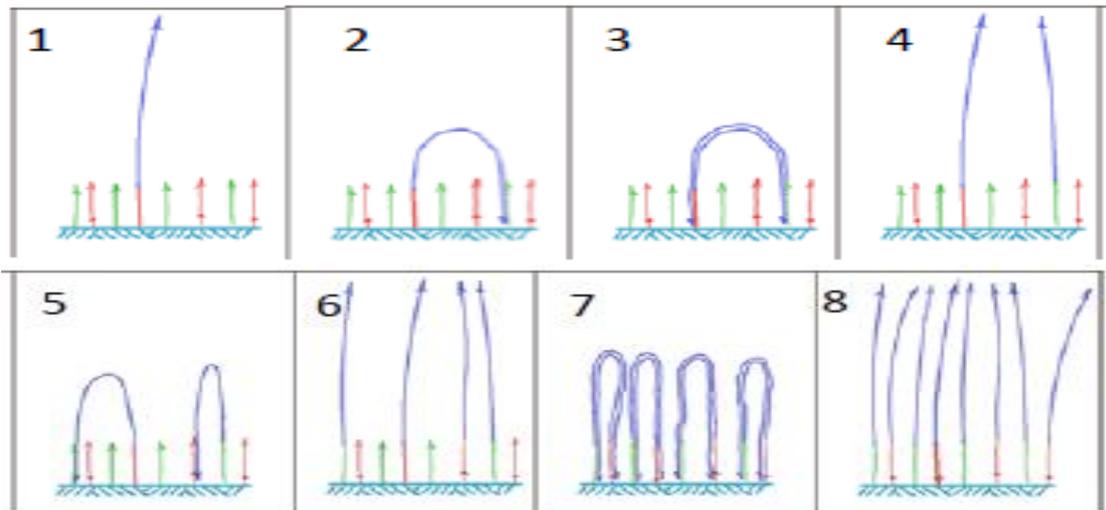
La segunda tecnología de secuenciación masiva que salió al mercado (2006) fue la de Solexa (luego adquirida por Illumina).

En esta tecnología, se utilizan nucleótidos terminadores marcados con moléculas fluorescentes (dideoxinucleótidos) al igual que en la secuenciación por Sanger.

Además de la paralelización masiva (es decir la capacidad de realizar millones de secuencias en cada tanda), la diferencia con el método convencional es la posibilidad de eliminar la fluorescencia una vez obtenida la imagen y desbloquear el carbono 3', de modo que pueda aceptar una nueva base para continuar la reacción de secuenciación, haciendo que la incorporación de un nucleótido terminador sea reversible.

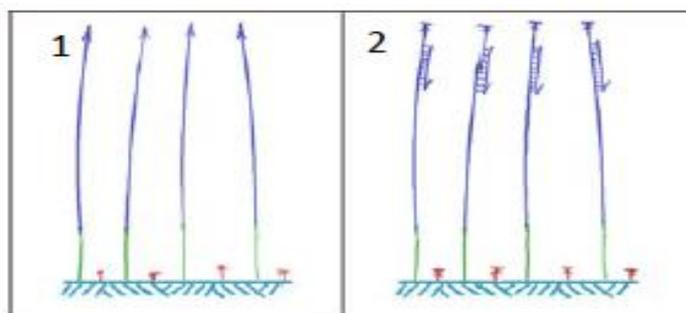
En este caso, las longitudes de las secuencias obtenidas son menores que los secuenciadores 454 (en la actualidad hasta 150 bases), sin embargo la capacidad de realizar lecturas en paralelo es mucho mayor que en 454 (hasta 250 millones de secuencias). Como resultado es posible obtener hasta  $6 \times 10^{12}$  lecturas en una sola tanda. Al igual que el método de secuenciación de Roche, los primeros pasos consisten en la fragmentación del ADN y ligación de adaptadores. Luego hay un paso de amplificación (en este caso, la amplificación es en una superficie sólida: "flow cell", donde también se dará luego la reacción de secuenciación).

En cuanto a la amplificación y reacción de secuenciación, el primer paso es depositar la librería en la flow cell por complementariedad con los adaptadores (paso 1). Luego se produce la amplificación en puente (pasos 2 y 3) en sucesivos ciclos (pasos 4, 5, 6, 7 y 8) hasta obtener un grupo o "cluster" con la amplificación clonal del fragmento inicial (paso 8) (Figura 24).



**Figura 24.** Amplificación en puente. Fuente: imagen adaptada (Mardis, 2008)

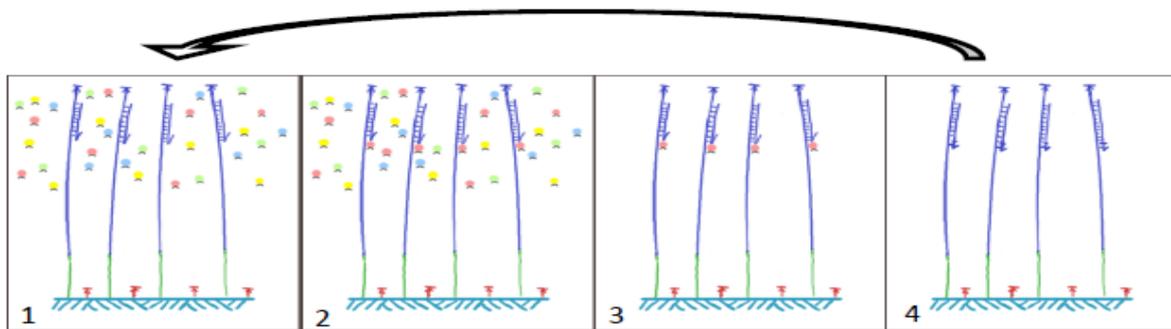
En la reacción de secuenciación, se bloquea uno de los adaptadores (paso 1), y se comienza la reacción de secuenciación desde el otro extremo (paso 2) mediante un cebador específico (Figura 25).



**Figura 25.** Reacción de secuenciación de Illumina. Fuente: imagen adaptada (Mardis, 2008)

Durante la reacción, a diferencia de la pirosecuenciación, se ofrecen los cuatro nucleótidos terminadores marcados cada uno con un fluorocromo diferente (paso 1), al igual que el método de Sanger.

Durante la reacción, y a diferencia de la pirosecuenciación, se ofrecen los cuatro nucleótidos terminadores marcados cada uno con un fluorocromo diferente (paso 1), al igual que el método de Sanger (Figura 26).



**Figura 26.** Reacción de secuenciación de *Illumina*. Fuente: imagen adaptada (Mardis, 2008)

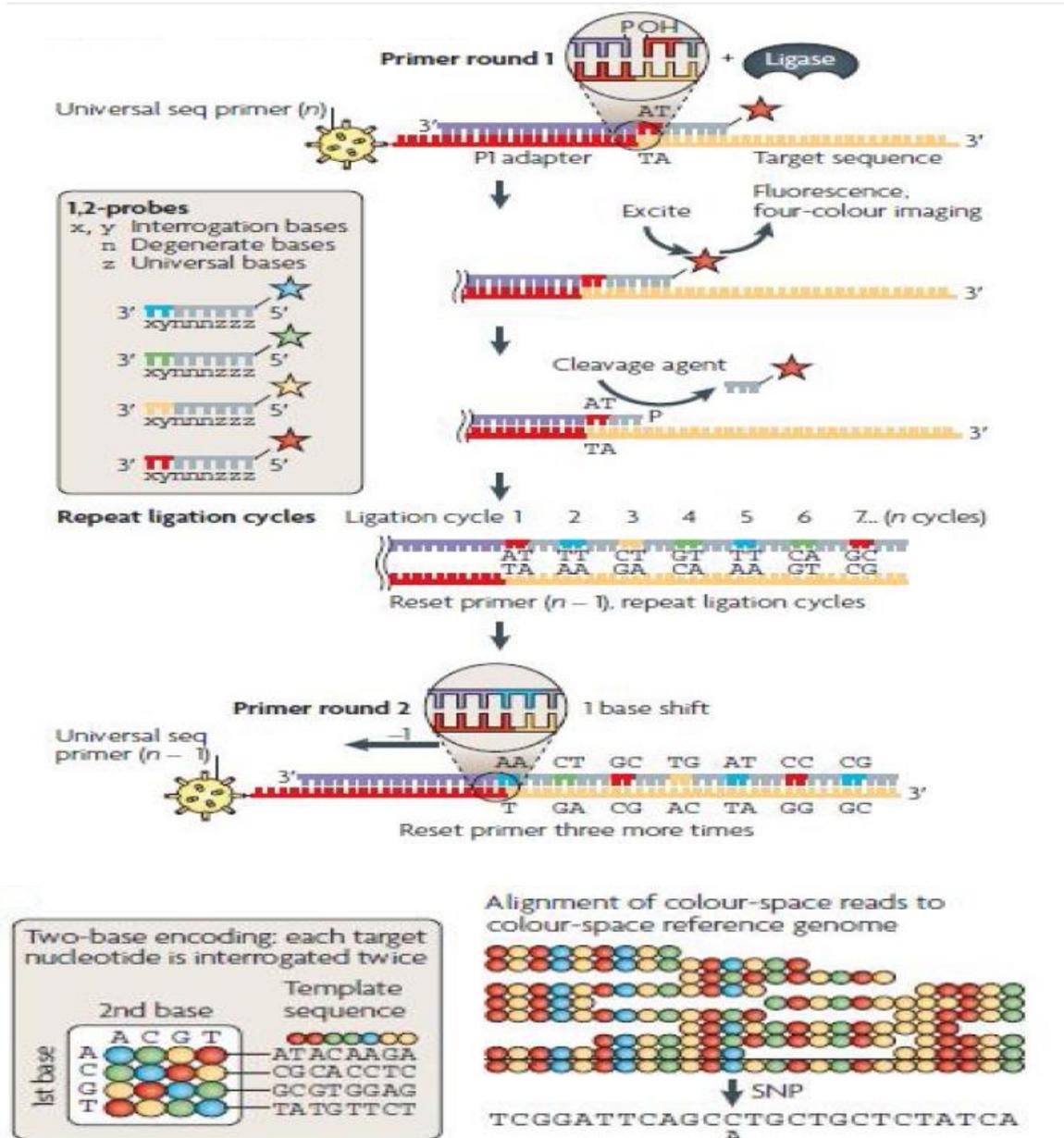
Los últimos modelos de Illumina permiten secuenciar en paralelo más de 3000 millones de *clusters* con una longitud de lectura desde 35 a 150 bases.

### iii. Applied Biosystems secuenciador SOLiD™

La plataforma SOLiD utiliza una biblioteca de fragmentos de DNA, los cuales se encuentran ligados a los adaptadores. La amplificación se lleva a cabo mediante una PCR en emulsión con pequeñas perlas magnéticas que amplificaran los fragmentos para una posterior secuenciación, siendo todo ello similar a las otras plataformas de próxima generación (Figura 27)

A diferencia de las otras plataformas, SOLiD utiliza una DNA ligasa con un enfoque único para secuenciar los fragmentos amplificados. La "secuenciación por ligación" es un método enzimático de secuenciación que emplea esta DNA ligasa en lugar de una polimerasa para identificar la secuencia objetivo (Figura 27).

Para llevar a cabo este procedimiento, se usa el método *polony* (tecnología SOLiD, Applied Biosystems), el cual emplea un reservorio de todos los oligonucleótidos posibles con una longitud determinada y marcados de acuerdo a la posición secuenciada. Los oligonucleótidos se templan y se ligan, donde la unión preferente entre DNA ligasas y su secuencia específica produce una señal correspondiente a la secuencia complementaria en esa posición concreta (Figura 27).



**Figura 27.** Secuenciación por ligación. Fuente: imagen tomada la publicación (Mardis, 2008).

#### iv. Otros métodos

Desde 2005 hasta la fecha, otras tecnologías de secuenciación masiva han sido desarrolladas y otras se encuentran en desarrollo y constituyen una nueva generación de secuenciadores (Tabla 11).

Algunas de estas tecnologías (SMRT, Helicos) proponen la secuenciación a partir de una única molécula de DNA en tiempo real. Una de ellas (Pacific Biosciences) en teoría no

tiene límite en cuánto a la longitud de las secuencias generadas y eventualmente podría secuenciar cromosomas enteros en una única lectura (Tabla 11).

Otras, como Oxford nanopore e Ion Torrent (recientemente lanzada al mercado) ofrecen novedosas soluciones y no requieren marcaje fluorescente ni cámaras registradoras de imágenes. En particular, Ion Torrent se basa en el registro de los cambios de pH producidos durante la incorporación de bases durante la síntesis de DNA. Se trata de micro-pHímetros que reducen notablemente los costos de secuenciación y prometen ser herramientas útiles en el área de diagnóstico (Tabla 11).

Plataforma	Tecnología	Longitud de reads	Año	Web
SOLiD (Applied Biosystem)	Ligación	50 bases	2007	<a href="http://www.appliedbiosystems.com">www.appliedbiosystems.com</a>
Genetic Analysis System (Helicos)	true Single Molecule Sequencing	25 a 55 bases	2008	<a href="http://www.helicosbio.com">www.helicosbio.com</a>
SMRT (Pacific Biosciences)	Single Molecule Real time	>1000 bases (en teoría sin límite)	ND	<a href="http://www.pacificbiosciences.com">www.pacificbiosciences.com</a>
Ion Torrent	Micro pHímetros	>200 bases	2011	<a href="http://www.iontorrent.com">www.iontorrent.com</a>
Oxford Nanopore	Label free, electrical	ND	ND	<a href="http://www.nanoporetech.com">www.nanoporetech.com</a>

**Tabla 11.** Características de otras tecnologías de secuenciación masiva.

### 4.3 Aplicaciones

La producción de un gran número de lecturas a bajo coste permite el uso de las plataformas de NGS en muchas aplicaciones. La primera aplicación obvia es para la secuenciación de genomas. Dentro de otras posibles aplicaciones encontramos la secuenciación de ARN (ej. descubrimiento de ARN pequeños, nuevas variantes génicas, nuevos genes, etc.) y amplicones de PCR (secuenciado de ARNr16S y su aplicación en metagenómica). Otra aplicación sería para identificar marcadores epigenéticos, interacciones entre DNA-proteína, determinar estructura de cromatina (ChIP-Seq, Methylseq, DNase-seq) son algunas de las aplicaciones cada vez más utilizadas.

Por último, una de las principales aplicaciones sería en la metagenómica, la cual se basa en el estudio genómico de todos microorganismos de una comunidad microbiana mediante la extracción directa del DNA. La aparición de la secuenciación masiva ha facilitado a los investigadores la tarea de identificación y caracterización de diferentes microorganismos en diferentes ambientes.

Un entorno que se caracteriza por la secuenciación de próxima generación es el microbioma humano; el cuerpo humano contiene varios entornos altamente específicos que están habitados por diferentes bacterias, hongos y virus, los cuales pueden variar de acuerdo con el estado de salud del individuo.

Estos ambientes incluyen la piel, las cavidades oral y nasal, el TGI, y la vagina, entre otros. Particularmente, se ha estudiado en profundidad la parte inferior del intestino de los seres humanos, primero caracterizado por la clasificación de 16S rRNA y más recientemente por 454 pirosecuenciación en los seres humanos adultos y en los lactantes.

La caracterización de la microbiota humana y su aparente interacción con el huésped humano, ha dado lugar a la inclusión del Proyecto Microbioma Humano en el National Institutes of Health (NIH) Roadmap (<http://nihroadmap.nih.gov/hmp/>).

Gracias a las ventajas que ofrece la NGS, nos brinda una oportunidad para poder comprender mejor cómo influye el microbioma humano en los procesos neoplásicos del colon y qué implicación puede tener en el hecho de que haya distintas rutas patogénicas y CCRs con diferentes pronósticos dependiendo de la localización anatómica dentro del colon y de las características histológicas del tumor.



## **II. OBJETIVOS**

---



Cada vez son más las evidencias que demuestran que el desequilibrio de las poblaciones que conforman la microbiota (disbiosis) es un factor causal en el desarrollo de procesos inflamatorios como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa y neoplásicos como el CCR o los adenomas.

Se ha demostrado que en estas enfermedades, la producción de determinados productos bacterianos pueden inducir una alteración en la regulación de la respuesta inmune y en el control de los mecanismos de proliferación celular.

La secuenciación de próxima generación (NGS), dado el abaratamiento de sus costes y su elevada cobertura de secuencia, ofrece una excelente oportunidad para caracterizar cualitativa y cuantitativamente la microbiota en distintas condiciones patológicas y fisiológicas del colon humano.

El principal objetivo de este estudio ha sido caracterizar la microbiota intestinal en muestras de heces de pacientes sanos y enfermos así como en muestras de mucosa de tejido normal y tumoral de pacientes enfermos para poder determinar los diferentes perfiles microbianos asociados al estado de enfermedad y proponer posibles biomarcadores bacterianos de diagnóstico y evolución del CCR.

Además se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Analizar los diferentes perfiles microbianos entre adenocarcinoma convencional y serrado
- Estudiar la evolución en la composición microbiana según el estadio tumoral
- Establecer posibles diferencias de las poblaciones bacterianas entre adenocarcinoma de colon distal y proximal
- Caracterizar la microbiota intestinal a lo largo de la secuencia: tejido normal-adenoma-adenocarcinoma.
- Analizar las diferencias en la composición microbiana entre muestras de heces de pacientes sanos y enfermos.



### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

---



## 1. Pacientes y muestras

Durante el periodo comprendido entre mayo de 2014 a enero de 2015, se recogieron un total de 164 muestras procedentes de disecciones de pieza quirúrgica de CCR y 36 muestras de polipectomías. Además se recogieron un total de 279 muestras de heces con test SOH positivo durante este periodo.

Tras la revisión de los datos clínicos (tipo, localización y estadio del tumor) y epidemiológicos de los pacientes (sexo, edad y raza) se incluyeron un total de 75 muestras, en donde pretendemos estudiar los siguientes grupos de casos:

- 20 muestras normales de colon proximal y distal en pacientes con cáncer.
- 19 muestras patológicas de colon proximal y distal provenientes de pacientes con adenocarcinoma serrado de diferentes estadios.
- 20 muestras patológicas de colon proximal y distal provenientes de pacientes con adenocarcinoma convencional de diferentes estadios.
- 9 muestras patológicas de colon proximal y distal provenientes de pacientes con adenoma
- 4 muestras de heces normales de pacientes con colon intacto y SOH-
- 3 muestras de heces patológicas de pacientes con cáncer y SOH+

Por tanto, se analizaron 59 muestras de tejido correspondientes a 42 pacientes con CCR (26 hombres y 16 mujeres con una media de edad de 71.59 años), donde 27 fueron tomadas de hemicolectomía derecha y 32 de hemicolectomía izquierda. Las muestras de mucosa de 9 pacientes diagnosticados de adenoma (5 hombres y 4 mujeres con una media de edad de 73.22 años), fueron tomadas mediante colonoscopia. Un total de 7 muestras de heces correspondieron a 4 pacientes sanos (3 hombres y 1 mujer) y 3 pacientes con CCR (2 hombres y 1 mujer).

Todos los individuos incluidos en nuestro estudio eran mayores de 18 años y no presentaban ninguna otra enfermedad intestinal. Se estableció como criterio de exclusión, aquellos pacientes en tratamiento antibiótico prolongado o que hubieran recibido tratamiento antibiótico en los tres meses previos a la intervención quirúrgica o colonoscopia. En nuestra serie de pacientes no existen diferencias significativas en cuanto a la edad, sexo o raza.

### **1.1 Muestras empleadas para el estudio de poblaciones bacterianas mediante NGS y qPCR**

El estudio de NGS se llevó a cabo en 31 muestras de mucosa, donde n= 10 correspondían a tejido normal (adyacente a tumor), n=19 a tejido tumoral y n=2 a tejido adenomatoso.

Del mismo modo, un total de 7 muestras de heces fueron analizadas mediante NGS, donde n=3 correspondían a heces (SOH-) de pacientes sanos y n=4 correspondían a heces (SOH+) de pacientes con CCR.

Todos aquellos grupos que mostraron diferencias significativas entre las comparaciones objeto de estudio fueron cuantificados y validados por qPCR.

### **1.2 Muestras empleadas para el estudio de validación mediante qPCR en una serie independiente de pacientes**

El estudio de validación se llevó a cabo mediante qPCR en 37 muestras de una serie independiente de 30 pacientes, donde n=10 correspondían a tejido normal adyacente a tumor, n=20 a tejido tumoral y n=7 a tejido adenomatoso.

## **2. Toma de muestra y almacenamiento**

Las muestras de mucosa de pacientes con CCR fueron tomadas de la parte más superficial del tumor y de la mucosa normal adyacente al tumor.

Las muestras de mucosa de pacientes con adenomas fueron tomadas de la parte más superficial de la masa del pólipo y de la mucosa normal adyacente.

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.

### **3. Extracción y amplificación del DNA.**

#### **3.1 Extracción de DNA a partir de tejido.**

Para la extracción del DNA se tomaron entre 5-15 mg de muestra de tejido, disgregándolo mediante el uso del TissueRuptor<sup>®</sup> de Quiagen en 180 ml de buffer ATL. A continuación, las muestras fueron incubadas con proteinasa K a 36°C durante 3 horas a 300 rpm.

Posteriormente se empleó el kit QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit de Qiagen de forma automatizada en el extractor QIAxcel<sup>®</sup> de Quiagen, mediante el protocolo de “Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol)”, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta el análisis mediante NGS o qPCR

El DNA 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 DNA fue determinada por los cocientes 260/230 y 260/280.

#### **3.2 Extracción de DNA a partir de heces.**

Todas las muestras resultantes con test SOH +, fueron centrifugadas a 12.000 rpm durante 1 minuto. Tras la centrifugación, el sedimento se resuspendió en 1 ml del sobrenadante e inmediatamente fueron congeladas a -80°C hasta su posterior procesamiento.

Para la extracción del DNA en muestras de heces se tomaron entre 220-250 mg de muestra, y se llevó a cabo mediante el empleo del QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini kit de Qiagen en el extractor QIAxcel<sup>®</sup> de Qiagen de forma automatizada, mediante el protocolo “Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells (Spin-Column Protocol)”, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su procesamiento.

La cuantificación y calidad del DNA se realizó del mismo modo que para las muestras de tejido.

### 3.3 Amplificación del DNA por PCR.

Para la realización de este trabajo escogimos el kit tipo “shot-gun” Lib-L con los adaptadores A y B de la química Titanium, para amplificar el gen 16S rRNA bacteriano por un solo extremo (forward). Dadas las características de este estudio, donde se pretende realizar un análisis basado en metagenómica, la zona escogida para amplificar corresponde a la región variable V1-V3 del citado gen.

La estructura general de los *primers* utilizados fue la siguiente:

- El *primer forward* incluye: el adaptador A (FA) de 30 pb, un código de barras de 8 pb (MID), donde las últimas dos base corresponden al separador (*linker*), y el resto (22 pb) corresponden al oligonucleótido *forward* degenerado (Figura 28).
- El *primer reverse* incluye: el adaptador B (FB) de 30 pb y el oligonucleótido *reverse* de 22 pb (Figura 28).



**Figura 28.** Estructura de los *primers forward* y *reverse* pertenecientes al kit Lib-L

Finalmente, los cebadores utilizados en nuestro estudio correspondieron con los del tipo 27F2 y 533R (Figura 29), los cuales proporcionan un mayor rendimiento en el número de lecturas y en la identificación bacteriana. Aunque son muy similares al par de *primers* clásicos 27F1 / 534R, presentan dos diferencias fundamentales como son la incorporación de una base degenerada M en lugar de una citosina (27F2) y el cambio de una base hacia el extremo 5' de la posición 534R a la 533R (Figura 29).

**Titanium-LibL-A-27F**

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG XXXXXXXX TCAGAGTTTGATCMTGGCTCAG

**Titanium-LibL-B-533R**

CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG ----- GCTTACCGGGCKGCTGGCAGG

**Figura 29.** Estructura general de los oligonucleótidos utilizados en este estudio

En este estudio usamos un set de 19 *primers forward* del tipo 27 F2 y un *primer reverse* del tipo 533 R (Figura 30), de este modo cada muestra objeto de estudio quedará amplificada por un primer específico 27 F2 y uno general 533 R

A)

**Titanium-LibL-A-27F-01**  
 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAACCACCTCAGAGTTTGATCMTGGCTCAG  
**Titanium-LibL-A-27F-02**  
 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAACCGGAATCAGAGTTTGATCMTGGCTCAG  
**Titanium-LibL-A-27F-03**  
 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAACCTTCCTCAGAGTTTGATCMTGGCTCAG  
**Titanium-LibL-A-27F-04**  
 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGCCGAATCAGAGTTTGATCMTGGCTCAG  
**Titanium-LibL-A-27F-05**  
 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGCCGAATCAGAGTTTGATCMTGGCTCAG  
**Titanium-LibL-A-27F-06**  
 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGGTTCCTCAGAGTTTGATCMTGGCTCAG  
**Titanium-LibL-A-27F-07**  
 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAATACGCCTCAGAGTTTGATCMTGGCTCAG  
**Titanium-LibL-A-27F-09**  
 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACATCTCTCAGAGTTTGATCMTGGCTCAG  
**Titanium-LibL-A-27F-10**  
 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACAGACTCTCAGAGTTTGATCMTGGCTCAG  
**Titanium-LibL-A-27F-11**  
 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACCAACCATCAGAGTTTGATCMTGGCTCAG  
**Titanium-LibL-A-27F-12**  
 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACCAAGCTCAGAGTTTGATCMTGGCTCAG  
**Titanium-LibL-A-27F-13**  
 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACCTAGGTTT CAGAGTTTGATCMTGGCTCAG  
**Titanium-LibL-A-27F-14**  
 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACCTTCCATCAGAGTTTGATCMTGGCTCAG  
**Titanium-LibL-A-27F-15**  
 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGAAGCATCAGAGTTTGATCMTGGCTCAG  
**-Titanium-LibL-A-27F-16**  
 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACTCGACATCAGAGTTTGATCMTGGCTCAG  
**-Titanium-LibL-A-27F-17**  
 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACTCGAGTTT CAGAGTTTGATCMTGGCTCAG  
**-Titanium-LibL-A-27F-18**  
 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACTGACACTCAGAGTTTGATCMTGGCTCAG  
**-Titanium-LibL-A-27F-19**  
 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGACGACATCAGAGTTTGATCMTGGCTCAG  
**-Titanium-LibL-A-27F-20**  
 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGAGTCTCTCAGAGTTTGATCMTGGCTCAG

B)

**Titanium-LibL-B-533R**  
 CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGGCTTACCGGGCKGCTGGCAGG

**Figura 30.** A) Conjunto de oligonucleótidos *forward* LibL-A-27F. B) Oligonucleotido *reverse* general LibL-B-533R

La amplificación por PCR de la región variable V1-V3 del gen 16S rRNA (1000 pb aproximadamente), se realizó con 1.5 unidades de Taq DNA polimerasa (Hot Start FlexiGoTaq, Promega, Madison, EEUU) en presencia de dNTPs (100 µM final cada uno), los oligonucleótidos 27F2 y 533R (Figura 30) a una concentración final de 0.5 µM, el buffer de la enzima y una media de 100 ng de DNA, a un volumen final de reacción de 50 microlitros.

La PCR se llevó a cabo en el termociclador (Verity™, Applied Biosystems) con el siguiente programa de temperatura y tiempo: desnaturalización inicial a 94 ° C durante 3 minutos, seguido de 25 ciclos a 94 ° C durante 15 segundos, 55 ° C durante 45 minutos y 72 ° C durante 1 minuto con un paso final de extensión a 72 ° C durante 7 minutos.

Para la validación de la técnica de PCR, todas las reacciones de amplificación incluyeron controles positivos y negativos sin DNA molde.

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en el QIAxcel-One Step Electrophoresis System ® de Quiagen, comprobando que la banda del DNA amplificado corresponde con el tamaño correcto (1 Kb).

Todos los productos de amplificados se almacenaron a -20°C para su posterior pirosecuenciación.

#### **4. Secuenciación mediante NGS.**

La pirosecuenciación 454 se llevó a cabo mediante el uso de la plataforma de Titanium (Roche / 454 Life Sciences) en la estación experimental del ZAIDIN, Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Granada.

Las principales etapas en las que se divide el proceso de pirosecuenciación mediante el 454- Junior Roche fueron:

- La construcción de una librería de DNA
- Preparación de la PCR en emulsión
- Secuenciación.

Para llevar a cabo el proceso de pirosecuenciación se siguieron las instrucciones y recomendaciones del protocolo de Roche.

#### 4.1 Construcción de una librería de DNA

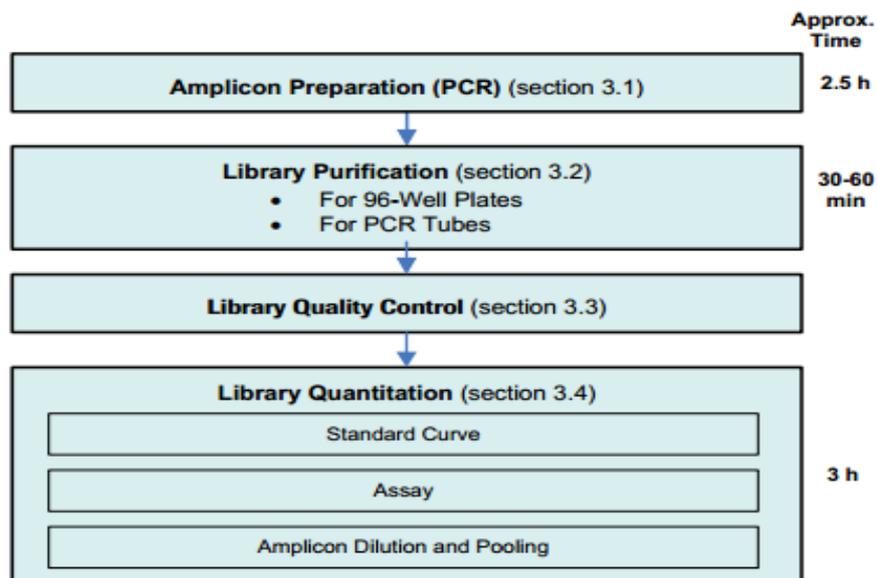
El procedimiento para preparar la biblioteca de amplicones se muestra en la Figura 31.

Se basa en la generación de fragmentos que incluyen los adaptadores A y B, mediante una PCR (apartado 3.3).

Posteriormente el conjunto o *pool* de amplicones junto a una biblioteca control, fueron chequeados en un chip de Agilent Bioanalyzer DNA7500 para poder así descartar la posible existencia de dímeros de cebadores.

Para la cuantificación de la biblioteca de amplicones, se utilizó el sistema fluorométrico Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit.

Finalmente, toda la librería se diluyó a una concentración final de  $1 \times 10^8$  moléculas /ul.



**Figura 31.** Flujo de trabajo para la construcción de la librería de DNA.

## 4.2 Preparación de la emulsión de DNA

La amplificación en emulsión (amplificación emPCR) de una biblioteca de DNA implica 7 pasos, que se describen en la Figura 32.

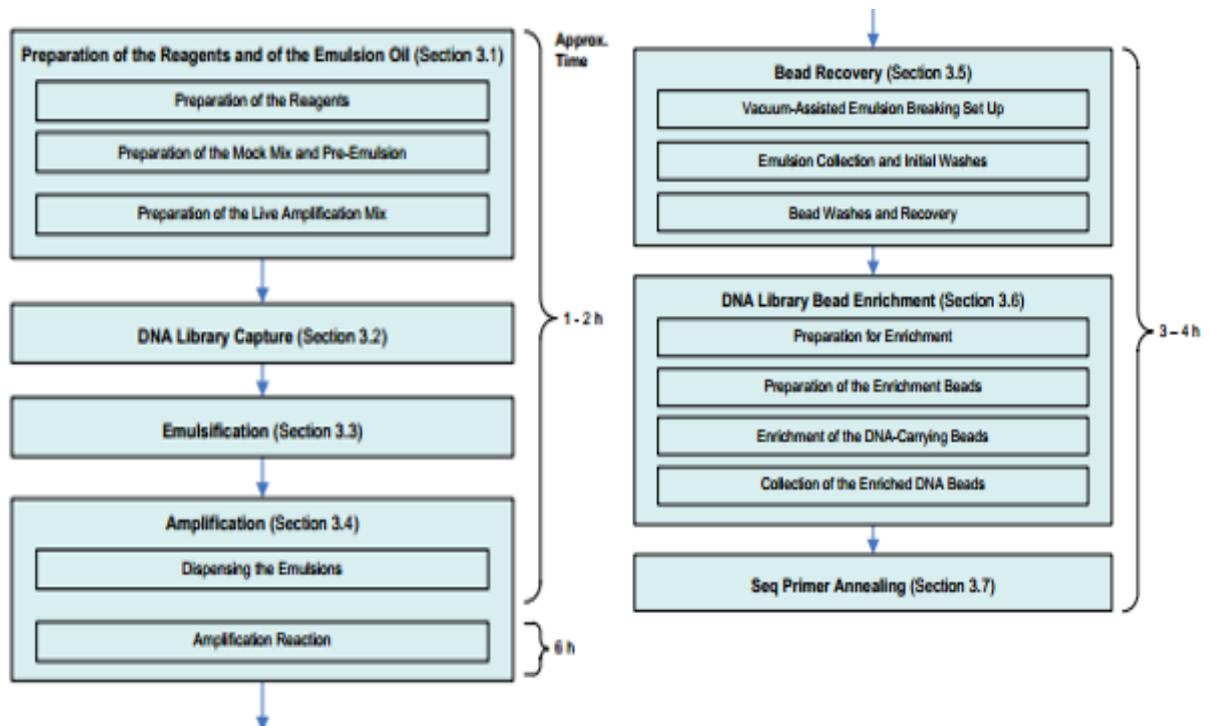


Figura 32. Pasos para la preparación de la PCR en emulsión

Por tanto, esta etapa se compone de tres pasos fundamentales:

- Unión de los fragmentos de DNA que componen la librería a las bolas de captura y amplificación clonal en emulsión
- Rotura de las emulsiones y recuperación de las bolas amplificadas
- Enriquecimiento

### 4.3 Secuenciación

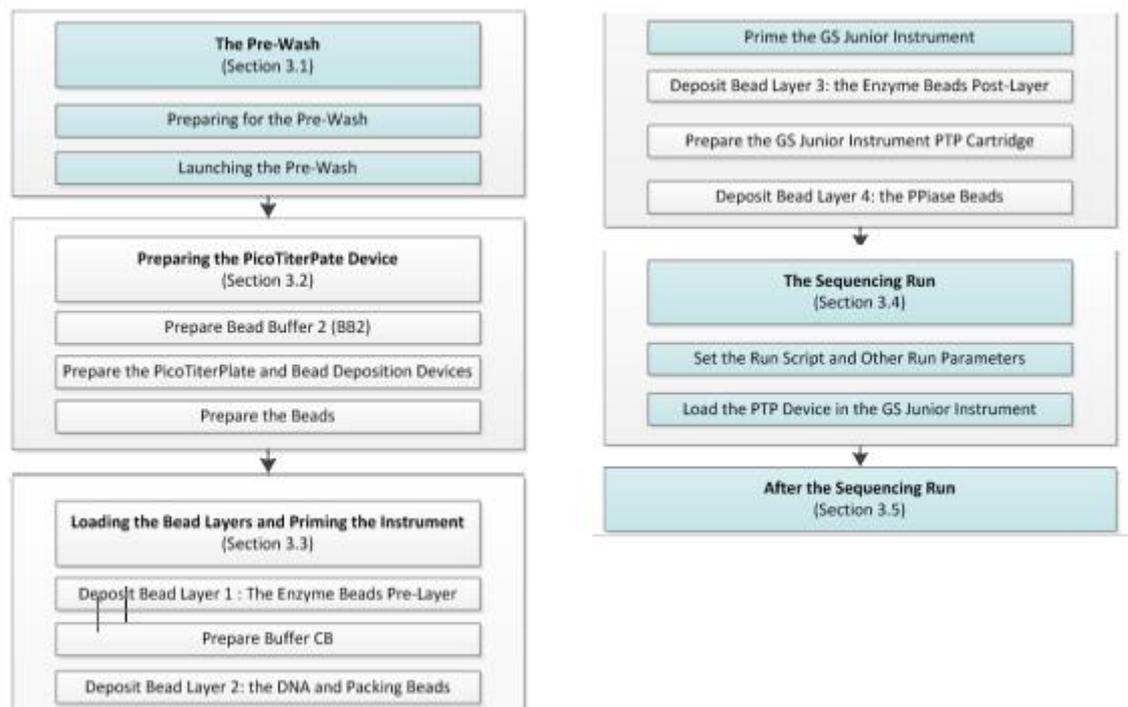
El esquema general del flujo de trabajo para llevar a cabo la secuenciación se muestra en la Figura 33, resaltándose en verde las tareas realizadas en el instrumento GS Junior.

Esta etapa se compone de tres pasos fundamentales:

- Preparación de la reacción
- Control de calidad de la reacción
- Análisis de datos

La secuenciación se realizó mediante el empleo de los kits: “GS Junior Titanium Sequencing Kit” y “GS Junior Titanium Pico TiterPlate Kit”, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los resultados de secuenciación se analizaron con el software versión 2.5.3 de Roche, mediante el procesamiento de señales procedentes de los amplicones.



**Figura 33.** Protocolo de trabajo para llevar a cabo el proceso de secuenciación

### 5. Análisis bioinformático.

El análisis bioinformático de secuencias se llevó a cabo en la Virtual Box del sistema operativo Ubuntu de Linux, mediante la creación y uso de diferentes comandos. Además para un posterior análisis de datos trabajamos con el programa “R” (versión 3.1.1).

Tras la extracción y secuenciación masiva del DNA genómico de las comunidades microbianas que habitan en el lumen intestinal de las muestras previamente indicadas (apartado 1), se llevaron a cabo los siguientes pasos para procesar y analizar los datos adquiridos:

- Análisis de calidad: “FAST QC”
- Filtrado de secuencias: “Prinseq-lite.pl script”
- Búsqueda de quimeras: “USEARCH”
- Clasificación taxonómica: “RDP classifier”

- **FastQC**

Mediante el uso de este programa logramos visualizar las estadísticas de calidad correspondientes a las lecturas de cada muestra llevadas a cabo en el instrumento GS Junior. De este modo nos permitió detectar posibles desviaciones de la información que causarían problemas en la posterior interpretación de los datos.

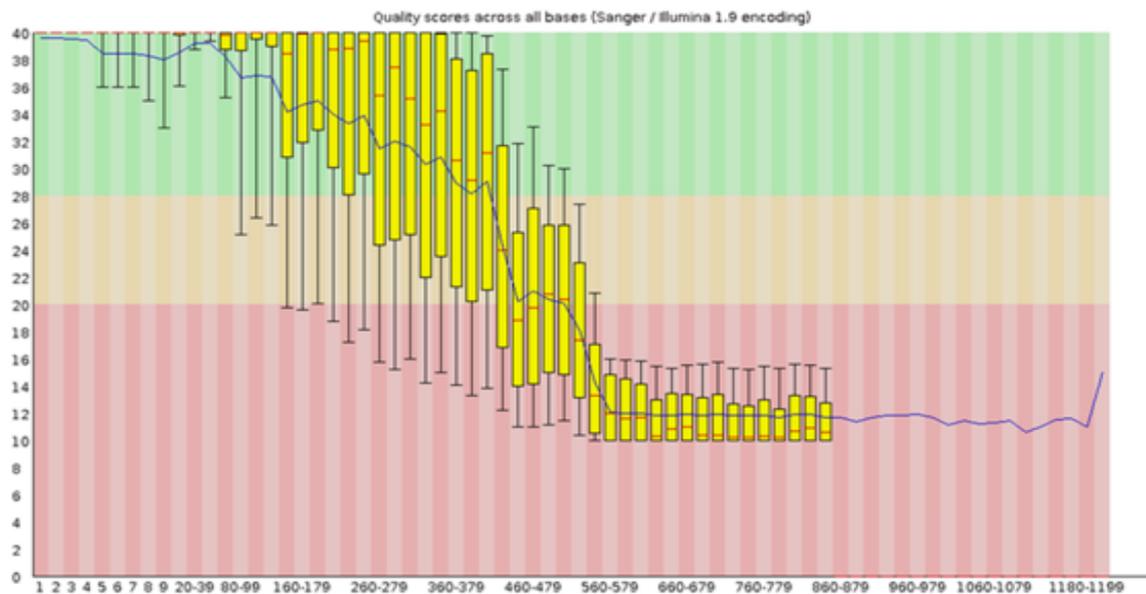
Para ello usamos el siguiente script:

```
for file in ${sff[@]} ; do ./fastqc -o ~/F14BIOINFO-008/FastaQual/ ~/F14BIOINFO-008/FastaQual/${file} .fastq;done
```

Por lo tanto, tras el análisis de calidad de secuencias en cada una de las 38 muestras, observamos que un determinado porcentaje de las lecturas eran de baja calidad ( $Q < 30$ ). (Figura 34).

Por ello procederemos a realizar una limpieza de todas aquellas secuencias que son de baja calidad mediante el uso del programa *Prinseq*.

Measure	Value
Filename	CUSTOM1.fastq
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	20758
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	73-1200
%GC	53



**Figura 34.** Análisis de calidad de las lecturas realizadas en la muestra 1 tras el proceso de secuenciación

- **Prinseq-lite.pl script**

Este programa fue diseñado principalmente para el procesamiento de lecturas procedentes del 454 Roche, pero puede utilizarse con todas las tecnologías.

Debido a la gran dimensión de nuestros archivos, para el procesamiento de nuestros datos utilizamos la versión “Prinseq-lite”

Mediante el uso de este programa, se pudo filtrar, formatear y recortar nuestras secuencias, en base a unos criterios de calidad permitiendo así asegurar que los datos utilizados en el resto del análisis bioinformático no se vean comprometidos por la presencia de secuencias de baja calidad o de artefactos que pueden conducir a conclusiones erróneas.

Por lo tanto realizamos una limpieza de nuestras secuencias que consistió en:

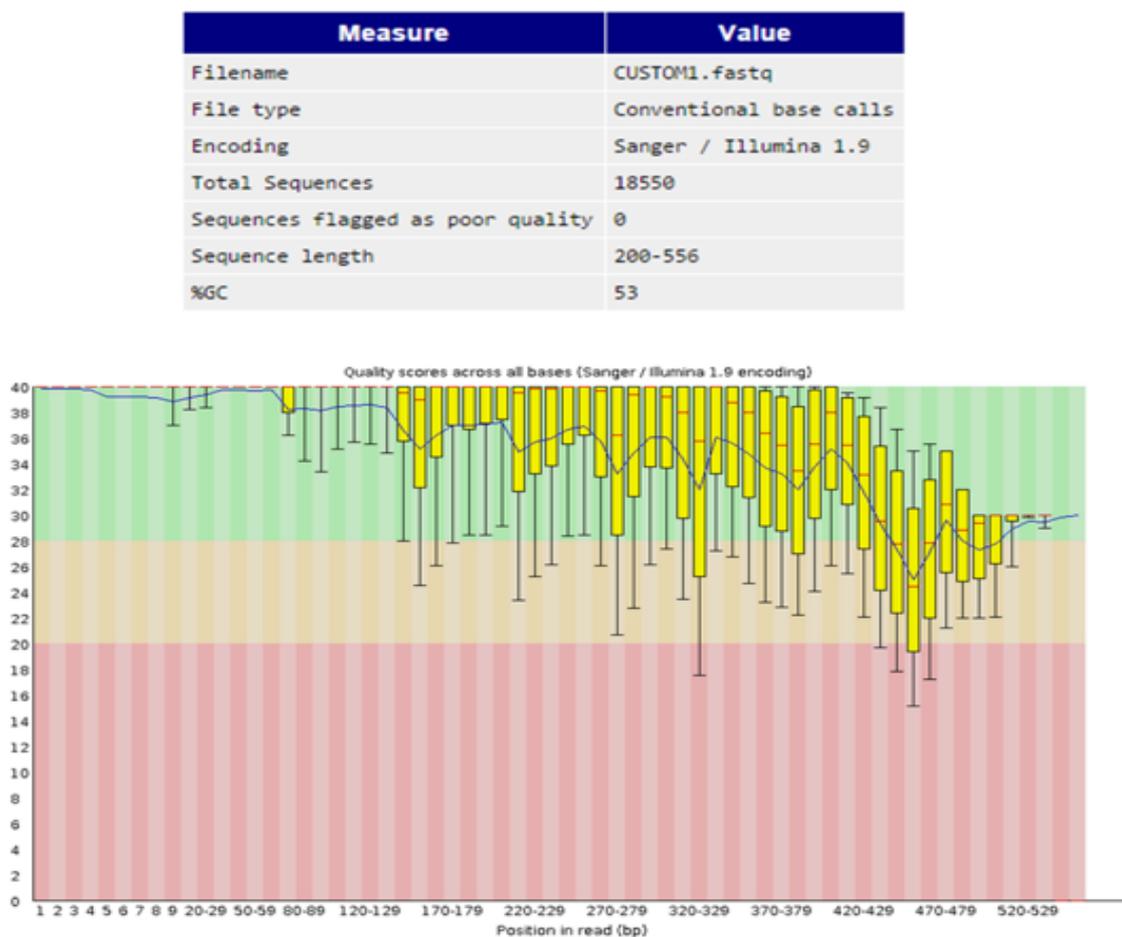
## Material y métodos

- La eliminación de todas las secuencias con una longitud de lectura menor a 200 pb, aplicando el siguiente script: `-min_len 200`
- La filtración de todas las secuencias de baja calidad aplicando un score de calidad de 30 (Q=30), mediante el siguiente script: `-trim_qual_right 30`

Para ello usamos el siguiente script:

```
for file in ${sff[@]} ; do echo $file; prinseq-lite.pl -fastq $file.fastq -out_good  
~/F14BIOINFO-008/Cleaned/$file -out_format 1 -out_bad null -min_len 200 -  
trim_qual_right 30 -trim_qual_type mean -trim_qual_window 10; done
```

Tras el análisis de filtrado de secuencias mediante el programa Prinseq, aplicamos un análisis de calidad, y observamos que el 99% de las secuencias eran de alta calidad (Figura 35).



**Figura 35** Análisis de calidad de las lecturas realizadas en la muestra 1 tras el proceso de secuenciación.

- **USEARCH**

Se basa en el uso de un algoritmo (UCHIME) diseñado para la detección de secuencias quiméricas mediante el uso de los comandos *uchime\_ref* y *uchime\_denovo*.

Después de filtrar nuestras secuencias mediante el programa Prinseq, buscaremos las secuencias potencialmente quimeras mediante el uso de esta herramienta. A partir de nuestros archivos FASTA y con un alineamiento de referencia con secuencias completas del gen 16S rRNA revisadas previamente y confirmadas como secuencias no quiméricas, se pudo analizar la probabilidad de que fracciones de una misma secuencia pertenezcan a entidades filogenéticas alejadas. La base de datos utilizada fué *usearch\_global* y contiene secuencias del gen 16S rRNA pertenecientes al dominio *Bacteria*.

Una vez realizadas las alineaciones se asigna una puntuación, siendo aquellas con valores más altos las que indican una señal más fuerte de quimeras. Se estableció como valor de corte (0,28 por defecto).

Para ello usamos el siguiente script:

```
for file in ${sff[@]} ;do echo $file; usearch -uchime_ref $file.fasta -db
../db/rdp_gold.udb -nonchimera ../noChimera/$file.fasta -strand plus; done
```

- **RDP classifier**

El clasificador *Ribosomal Database Project* (RDP), se basa en un nuevo teorema bayesiano, capaz de clasificar de forma rápida y precisa las secuencias bacterianas 16S rRNA según el orden taxonómico de *Bergey* para procariotas (2ª ed., Liberar 5,0, Springer Verlag, Nueva York, NY, 2004). Nos proporciona asignaciones taxonómicas hasta el dominio de género, proporcionándonos un nivel de confianza para cada asignación.

La mayoría de las clasificaciones (98%) presentan un alto nivel de confianza (> 95%), además de una elevada precisión (98%). El clasificador RDP es adecuado tanto para el análisis de secuencias de rRNA individuales como para el análisis de bibliotecas de miles de secuencias.

Mediante el uso de este programa obtuvimos un cladograma por tanda de lectura de cada una de las muestras. Por lo tanto, obtuvimos 38 archivos independientes donde cada uno corresponde a una muestra con la totalidad de sus lecturas. A cada una de las lecturas (de

## Material y métodos

---

las secuencias) se le asignó un taxón bacteriano con un score determinado, llegando como máximo a nivel de género.

Para ello usamos el siguiente script:

```
for file in ${sff[@]} ; do echo $file; java -Xmx1g -jar
~/SharedHost/rdp_classifier_2.9/dist/classifier.jar classify -f fixrank -o ../RDP/$file.rdp -
q $file.fasta; done
```

Una vez hemos obtenido la asignación taxonómica de cada una de las lecturas, para poder seguir analizando los datos, trabajamos en el programa R-Studio. En este análisis aplicamos un filtro donde todas aquellas asignaciones taxonómicas con un score < 0.8 quedarían eliminadas por su baja fiabilidad.

Para ello utilizamos el siguiente script:

```
md1<- as.data.frame(read.csv("~/BASE DE DATOS_MICROBIOTA.csv", header = T,
sep=";", row.names=1 ))metadata<-grep("MD.",colnames(md1), value = T)
sample.tmp<-c() sample.df<-c()
```

```
for(sampleinrownames(md1)){ sample.tmp<as.data.frame(read.table(file=paste(sample,"
.rdp",sep=""), sep="\t")[c(1,3,5,6,8,9,11,12,14,15,17,18,20)])colnames(sample.tmp)<-
c("READID", "domain", "domainScore", "phylum", "phylumScore", "class",
"classScore", "order", "orderScore", "family", "familyScore", "genus", "genusScore")
sample.tmp <- sample.tmp [ which (sample.tmp$familyScore >=0.8),]sapply(metadata,
function(x) sample.tmp[,x]<<-as.factor(md1[c(sample),c(x)])) sample.tmp$SAMPLE <-
as.factor (sample) sample.df<-rbind(sample.df,sample.tmp)} dim (sample.df)
```

## 6. Estudio de validación mediante qPCR

La cuantificación bacteriana se llevó a cabo para aquellos taxones bacterianos que mostraron diferencias significativas entre las comparaciones objeto de estudio y además resultaran de interés para dichas comparaciones.

La qPCR se realizó mediante el uso de cebadores genéricos y específicos de género/especie del 16S RNA, con la sonda inespecífica SybrGreen PCR Master Mix (QuantiTec-QUIAGEN), en un volumen final de reacción de 20 µl.

El conjunto de *primers* utilizados para la cuantificación bacteriana en muestras de mucosa normal, tumoral y adenomatoso, corresponden a los siguientes grupos bacterianos: *F. nucleatum*, *Akkermansia muciniphila*, *F. prausnitzii*, *Enterococcus*, *Blautia coccoides*., *Streptococcus* y *Eubacteria* (Tabla 12).

Grupo bacteriano	Nombre	Secuencia	Tmp	Tamaño	Referencia
<i>Total bacteria</i>	Forward	5'-CGT GCC AGC CGC GG-3'	60°C	293 bp	(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 bp	(Mira-Pascual et al., 2014b)
	Reverse	5'-GTT GAC TTT ACA GAA GGA GAT TAT GTA AAA ATC-3'			
<i>F. prausnitzii</i>	Forward	5'-CCA TGA ATT GCC TTC AAA ACT GTT-3'	60°C	141 bp	(Mira-Pascual et al., 2014b)
	Reverse	5'-GAG CCT CAG CGT CAG TTG GT-3'			
<i>A. muciniphila</i>	Forward	5'-CAG CAC GTG AAG GTG GGG AC-3'	60°C	327 bp	(Mira-Pascual et al., 2014b)
	Reverse	5'-CCT TGC GGT TGG CTT CAG AT-3'			
<i>Enterococcus sp.</i>	Forward	5'-CCC TTA TTG TTA GTT GCC ATC ATT-3'	61 °C	144 bp	(Furet et al., 2009)
	Reverse	5'-ACT CGT TGT ACT TCC CAT TGT-3'			
<i>B. coccoides.</i>	Forward	5'-AAA TGA CGG TAC CTG ACT AA-3'	53°C	440 bp	(Mira-Pascual et al., 2014b)
	Reverse	5'-CTT TGA GTT TCA TTC TTG CGA A-3'			
<i>Streptococcus sp.</i>	Forward	5'-CCI TAY ICI TAY GAY GCI YTI GAR CC-3'	60°C	609 bp	(Romero et al., 2011)
	Reverse	5'-ARR TAR TAI GCR TGY TCC CAI ACR TC-3'			

**Tabla 12.** Conjunto de *primers* utilizados en el análisis mediante qPCR

La amplificación se llevó a cabo en el termociclador 7500F (Applied Biosystems), con las siguientes condiciones de reacción: 1 ciclo de 95°C durante 10 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto seguido de un ciclo para la curva de disociación que consistió en 95°C- 15 segundos, 60°C-1 minuto, 95°C-30 segundos y 60° C-15 segundos.

Para la cuantificación de cada uno de los taxones se calculó como delta threshold cycle ( $\Delta Ct$ ) donde  $\Delta Ct = Ct_{TSE} - Ct_{UE}$ , ( $Ct_{TSE}$ : Ct correspondiente a los *primers* específicos de taxón y  $Ct_{UE}$ : Ct correspondiente al set de *primers* universales).

Los resultados obtenidos tras la cuantificación de cada género bacteriano, fueron expresados como: número de copias (taxón específico) /  $10^6$  copias (bacterias totales).

Todas las muestras fueron analizadas por duplicado. Para monotorizar 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 usó 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 DNA y no de otros constituyentes de la mix de PCR.

### 7. Análisis estadístico.

El análisis estadístico realizado para el conjunto de datos derivado del meta-análisis bioinformático, se llevó a cabo en el paquete R-Studio aplicando el test no paramétricos de Wilcoxon.

En cuanto a los datos resultantes del estudio de validación, el análisis estadístico se llevó a cabo mediante el programa SPSS versión 21.0 para Windows (SPSS, Inc., Chicago IL). Para determinar si existen diferencias significativas entre los diferentes grupos de pacientes se usó el test no paramétrico Wilcoxon.

Se consideró estadísticamente significativo un valor de p inferior a 0.05.

## **8. 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. No se realizarán intervenciones médicas que supusieran un cambio de actitud en la práctica clínica. La obtención de muestras de biopsia normal se hizo sólo en el caso de sospechas de poliposis microscópica (Anexo I).

**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 anonimizadas, 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.serna@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:.....		
Etiqueta Identificativa Paciente		
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
<b>Firma</b>	<b>Firma</b>

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:.....  
 Etiqueta Identificativa Paciente  
 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
<b>Firma</b>	<b>Firma</b>

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:.....		
Etiqueta Identificativa Paciente		
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 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.

**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 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 al 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 Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....

**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 al día de hoy.

SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LA MUESTRA.

SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO LOS DATOS PERSONALES.

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

SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....

#### **IV. RESULTADOS**

---



## 1. CAPÍTULO 1

### Análisis diferencial de la composición microbiana en muestras de mucosa normal y tumoral en pacientes con CCR.

#### 1.1. Introducción

Como ya es conocido, ciertos productos bacterianos inducen alteración en la regulación de la respuesta inmune y en el control de los mecanismos de proliferación celular. Por ello, algunos autores sugieren que algunos desequilibrios en la composición habitual de la microbiota intestinal pueden desempeñar un papel importante tanto en el inicio como en la progresión del CCR. Desde esta perspectiva, la caracterización de la disbiosis bacteriana asociada a procesos inflamatorios y neoplásicos del colon, ofrece una oportunidad para poder corregir aquellos desequilibrios en la microbiota normal.

#### 1.2. Pacientes.

Para ello, se seleccionaron un total de 42 pacientes con CCR, donde se analizaron muestras de mucosa normal y tumoral.

El estudio de NGS se llevó a cabo en 29 muestras de mucosa, donde n= 10 correspondían a tejido normal (adyacente a tumor) y n=19 a tejido tumoral, las cuales fueron posteriormente cuantificadas mediante qPCR (tabla 13).

El estudio de validación se llevó a cabo en una serie independiente de pacientes con un total de 30 muestras, donde n=10 fue tejido normal adyacente a tumor y n=20 fue tejido tumoral, siendo todas las muestras cuantificadas mediante qPCR (tabla 14).

Grupo	N	Género	Edad	Tipo de tumor	Estadío	Localización
Normal	10	6 V 4 M	72.8	NA	NA	6 P 4 D
Tumoral	19	13 V 6 M	71.21	10 Convencionales 9 Serrados	5 T1-2 14 T3-4	9 P 10 D

**Tabla 13.** Serie de pacientes donde las muestras de mucosa fueron analizadas mediante NGS y qPCR. NA: no aplicable; P:proximal; D:distal.

Grupo	N	Género	Edad	Tipo de tumor	Estadío	Localización
Normal	10	6 V 4 M	68.2	NA	NA	3 P 7 D
Tumoral	20	12 V 8 M	70.7	10 Convencionales 10 Serrados	3 T1-2 17 T3-4	9 P 11 D

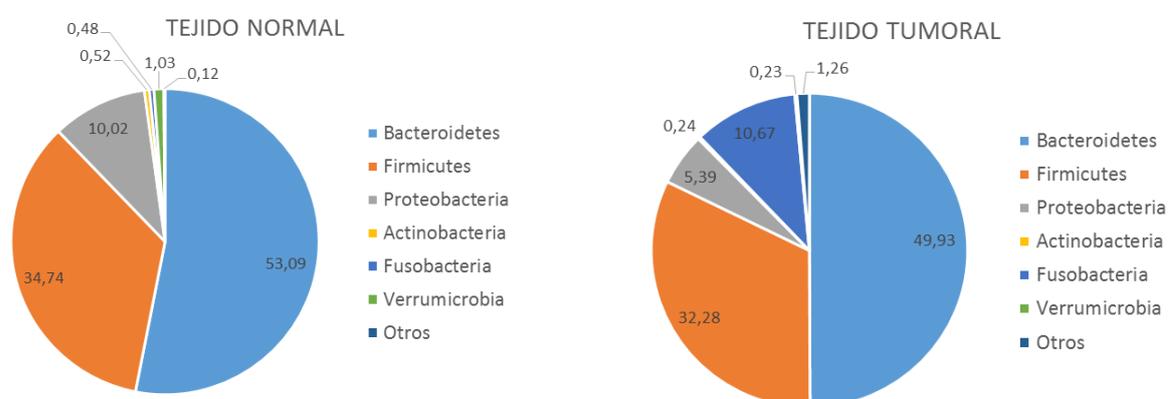
**Tabla 14.** Serie independiente de pacientes, correspondientes al estudio de validación, donde las muestras de mucosa se analizaron mediante qPCR.

NA: no aplicable; P:proximal; D:distal.

### 1.3. Resultados

A la vista de nuestros resultados, los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes* son los más frecuentes entre la microbiota humana, representando de forma conjunta el 87.8 % y 81.8 % del total bacteriano en muestras de tejido normal y tumoral respectivamente (Figura 36). Los siguientes filos más abundantes serían *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrumicrobia* y *Actinobacteria*, los cuales representaron un 12.2 % en tejidos sanos y un 18.2% en tejidos tumorales de pacientes con CCR (Figura 36).

Como cabe esperar, el tejido tumoral en estos pacientes se encontró mucho más enriquecido por el filo *Fusobacteria*, a diferencia del tejido normal que presentó una mayor abundancia de los filos *Verrumicrobia* y *Proteobacteria*.



**Figura 36.** Abundancias relativas de los filos más predominantes de la microbiota intestinal

En cuanto a la distribución de géneros bacterianos según por muestra, encontramos una clara asimetría de representación bacteriana entre ambos tipos de muestra.

En las muestras tumorales observamos un mayor predominio de géneros bacterianos con alto poder inflamatorio que normalmente se asocian a estados consolidados del tumor, destacando principalmente los siguientes géneros bacterianos: *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Enterococcus*, *Campylobacter*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Pseudomonas*, *Peptostreptococcus*, *Leptotrichia*, *Aeromonas* y *Eubacterium* (Tabla 15).

Del mismo modo, las muestras de mucosa normal se encontraron principalmente constituidas por géneros bacterianos relacionados con procesos inflamatorios procarcinogénicos tales como *Escherichia/Shigella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Bacteroides* y *Akkermansia* (Tabla 15)

Además encontramos una alta representación por parte de los géneros bacterianos con alto poder antiinflamatorio, tales como *Faecalibacterium*, *Lachnospiracea*, *Ruminococcus* o *Clostridium IV* que fueron más abundantes en el tejido normal, y otros como *Roseburia* que se encontraron en mayor abundancia en el tejido tumoral (Tabla 15).

En todos ellos pudimos observar importantes diferencias en cuanto a su abundancia relativa según el tipo de muestra, pero no en todos los grupos bacterianos encontramos una asociación significativa, tan solo entre *Fusobacterium* y el tejido tumoral ( $p=0.0327$ ) y *Akkermansia* con el tejido normal ( $p=0.0392$ ) (Tabla 15).

De este modo, procedimos a la validación de estos resultados cuantificando la especie *F. nucleatum* como representante bacteriano en las muestras de tejido tumoral y *A. muciniphila* como especie característica de las muestras de tejido normal asociado a procesos tumorales.

Bacteria	Abundancias relativas (%)		Test Wilcoxon
	NORMAL	TUMORAL	P-value
<i>Fusobacterium</i>	0.48	10.51	0.0327
<i>Porphyromonas</i>	0.07	1.56	>0.05
<i>Escherichia/Shigella</i>	0.121	0.021	>0.05
<i>Citrobacter</i>	0.44	0.14	>0.05
<i>Streptococcus</i>	0.35	1.1	>0.05
<i>Leptotrichia</i>	0.003	0.15	>0.05
<i>Salmonella</i>	0.18	0.05	>0.05
<i>Aeromonas</i>	0	0.08	>0.05
<i>Enterobacter</i>	0.006	0.1	>0.05
<i>Campylobacter</i>	0.001	0.07	>0.05
<i>Enterococcus</i>	0.021	0.121	>0.05
<i>Faecalibacterium</i>	4.04	2.25	>0.05
<i>Roseburia</i>	1.27	1.56	>0.05
<i>Ruminococcus</i>	0.45	0.14	> 0.05
<i>Akkermansia</i>	1	0.23	0.0392
<i>Lachnospiracea</i>	3.97	2.57	>0.05
<i>Clostridium IV</i>	0.33	0.2	>0.05
<i>Bacteroides</i>	35.74	32.77	>0.05
<i>Klebsiella</i>	0.05	0.28	>0.05
<i>Pseudomonas</i>	0.029	0.1	>0.05
<i>Peptostreptococcus</i>	0.066	0.34	>0.05
<i>Eubacterium</i>	0.004	0.07	>0.05

**Tabla 15.** Análisis de la composición microbiana en muestras de mucosa normal y tumoral mediante NGS

Tras el estudio de validación mediante qPCR, observamos como *F. nucleatum* mostró una asociación estadísticamente significativa con la mucosa tumoral, mientras que *A. muciniphila* se asoció significativamente a la mucosa normal de pacientes con CCR (Tabla 16).

Género	Nº de copias /10 <sup>6</sup>		Test Wilcoxon
	NORMAL	TUMORAL	<i>P-value</i>
<i>F. nucleatum</i>	497,18	20724,36	0,048
<i>A. muciniphila</i>	32866,82	887,91	0,0156

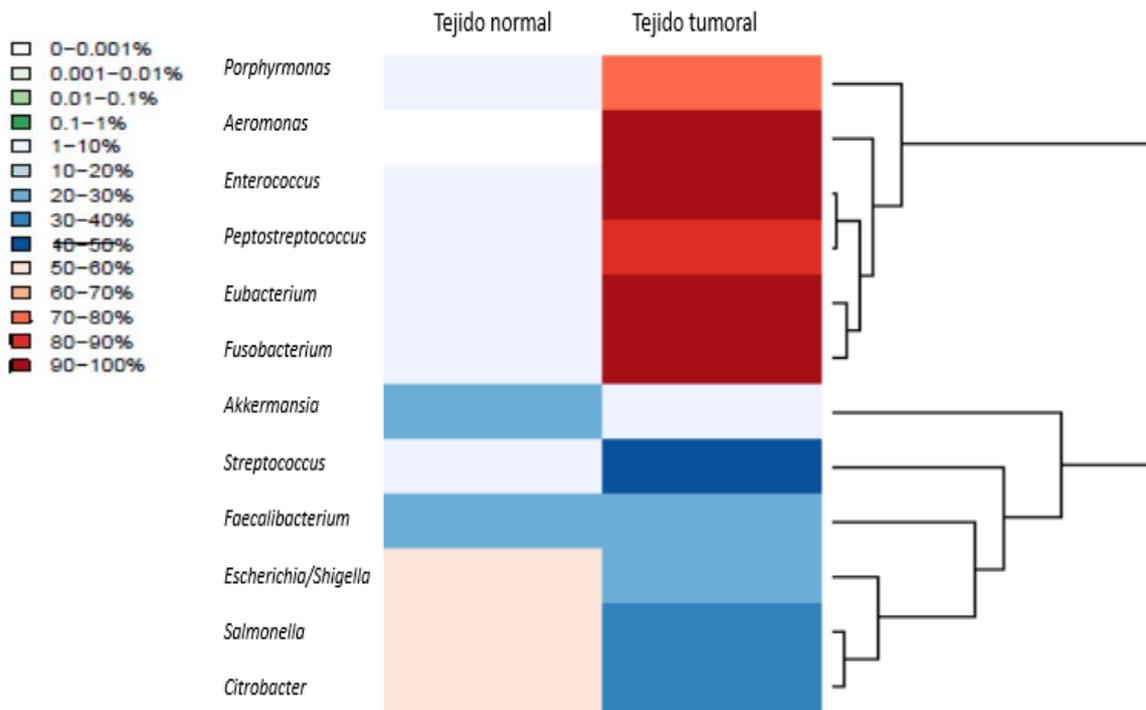
**Tabla 16.** Análisis, mediante qPCR, de los grupos bacterianos que mostraron diferencias significativas para el estudio de NGS

Además, para consolidar nuestra hipótesis de trabajo, realizamos una cuantificación de éstas especies bacterianas en una serie independiente de 30 pacientes, donde observamos la misma tendencia de resultados, basada en un aumento significativo de *F. nucleatum* en muestras de tejido tumoral y *A. muciniphila* en muestras de tejido normal (Tabla 17).

Género	Nº de copias /10 <sup>6</sup>		Test Wilcoxon
	NORMAL	TUMORAL	<i>P-value</i>
<i>F. nucleatum</i>	240.54	47659,90	0.039
<i>A. muciniphila</i>	30238,93	1587.34	0.0078

**Tabla 17.** Análisis, mediante qPCR, de los grupos bacterianos que mostraron diferencias significativas para el estudio de NGS, en una serie independiente de pacientes.

Por otro lado y en base a nuestros resultados, para obtener una visión más general y visual de la estructura de la comunidad microbiana más determinante en el inicio y desarrollo del CCR, se realizó un *Heat Map* basado en las abundancias relativas de las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) objeto de estudio, para cada uno de los grupos de muestras.

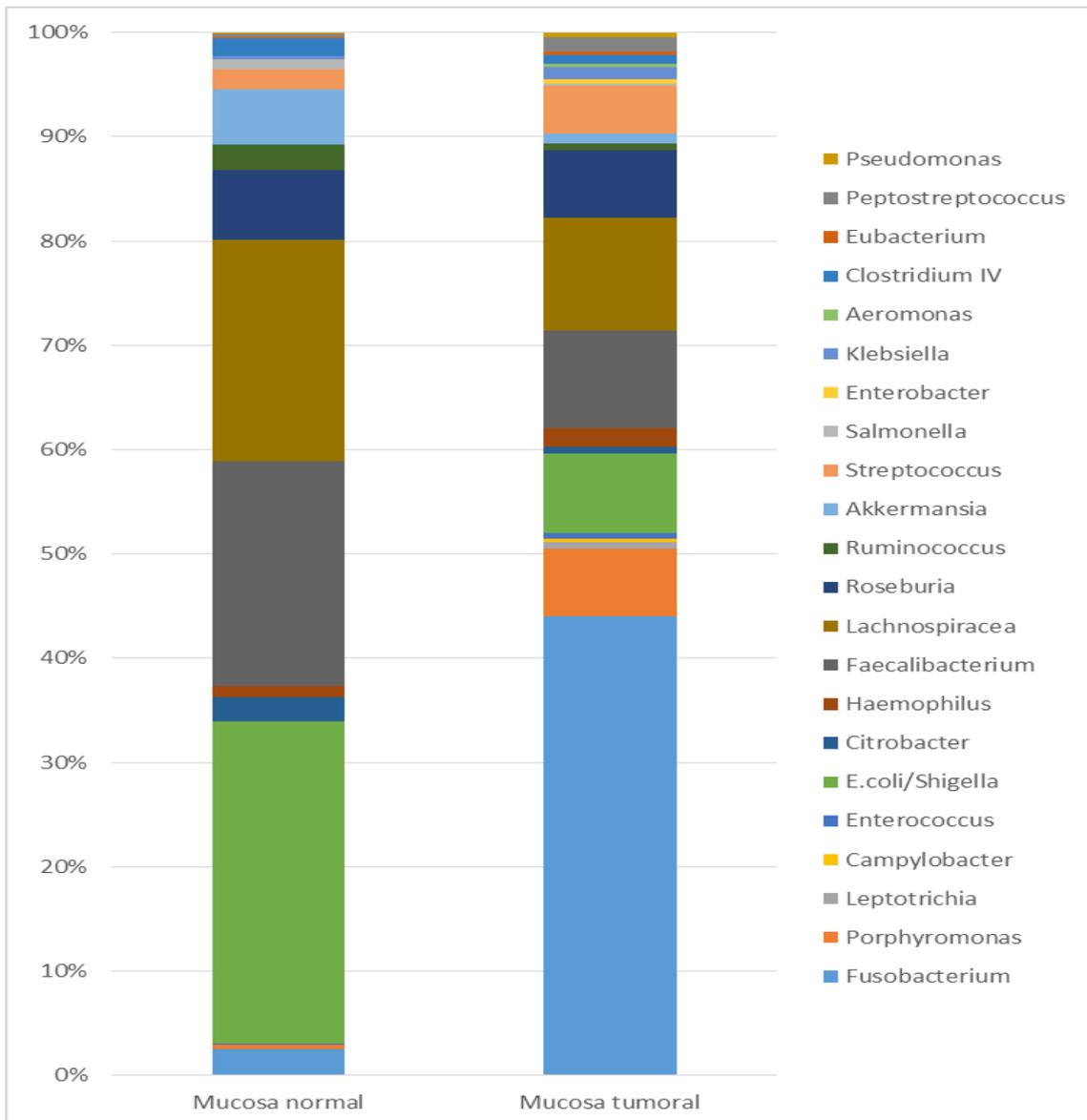


**Figura 37.** Representación gráfica de los distintos OTUs para muestras de tejido normal y tumoral

Según muestra el gráfico de *Heat Map* (Figura 37), las muestras de tejido normal y tumoral mostraron claras diferencias en cuanto a su composición microbiana, por lo que podemos distinguir en función de las abundancias relativas de cada OTUs, dos *clusters* bacterianos según el tipo de muestra. Un primer *cluster* estaría formado por bacterias pertenecientes a los géneros bacterianos: *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Enterococcus*, *Eubacterium*, *Aeromonas* y *Peptostreptococcus*, los cuales están directamente relacionados con procesos tumorales avanzados. Un segundo *cluster* estaría constituido fundamentalmente por los géneros *Akkermansia*, *Escherichia/Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter* y *Streptococcus*, los cuales se relacionan con procesos iniciales inflamatorios.

Esto sugiere que a partir de determinados patrones bacterianos podemos obtener la capacidad de discriminar entre estados procarcinogénicos y carcinogénicos.

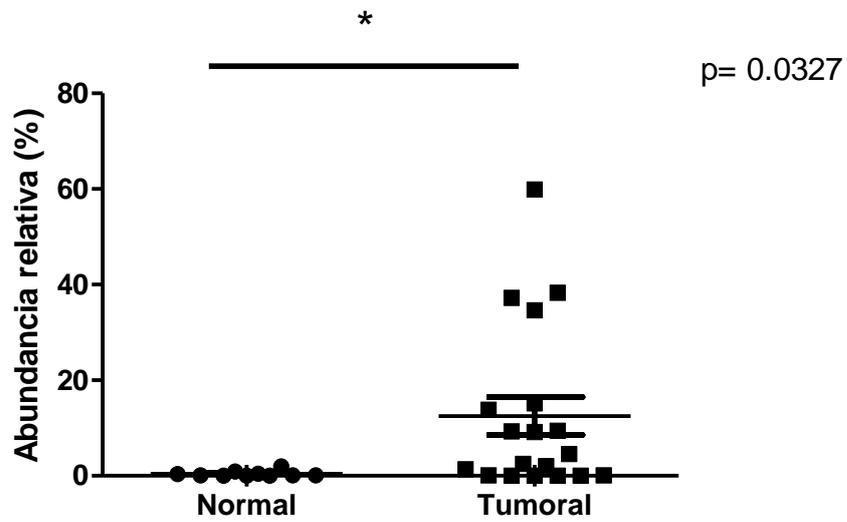
Por lo tanto, se observa como las muestras de mucosa normal y tumoral están conformadas por poblaciones bacterianas diferentes, estando los géneros bacterianos *Fusobacterium* o *Porphyromonas* prácticamente ausentes en el tejido normal (Figura 38).



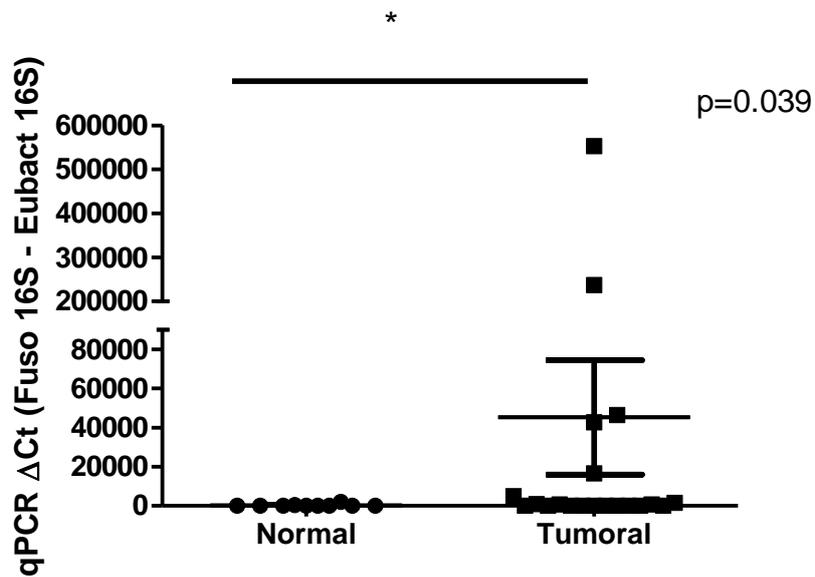
**Figura 38.** Análisis de la composición bacteriana a nivel de género, en muestras de tejido normal y tumoral de pacientes con CCR, mediante NGS.

Por lo tanto, si analizamos de forma gráfica las diferencias en la abundancia de *Fusobacterium* en cada una de las muestras analizadas mediante pirosecuenciación (NGS) (Figura 39-A) y mediante qPCR (Figura 39-B), observamos cómo las muestras tumorales presentan de forma general un mayor porcentaje de ésta especie bacteriana que las muestras no tumorales

A)

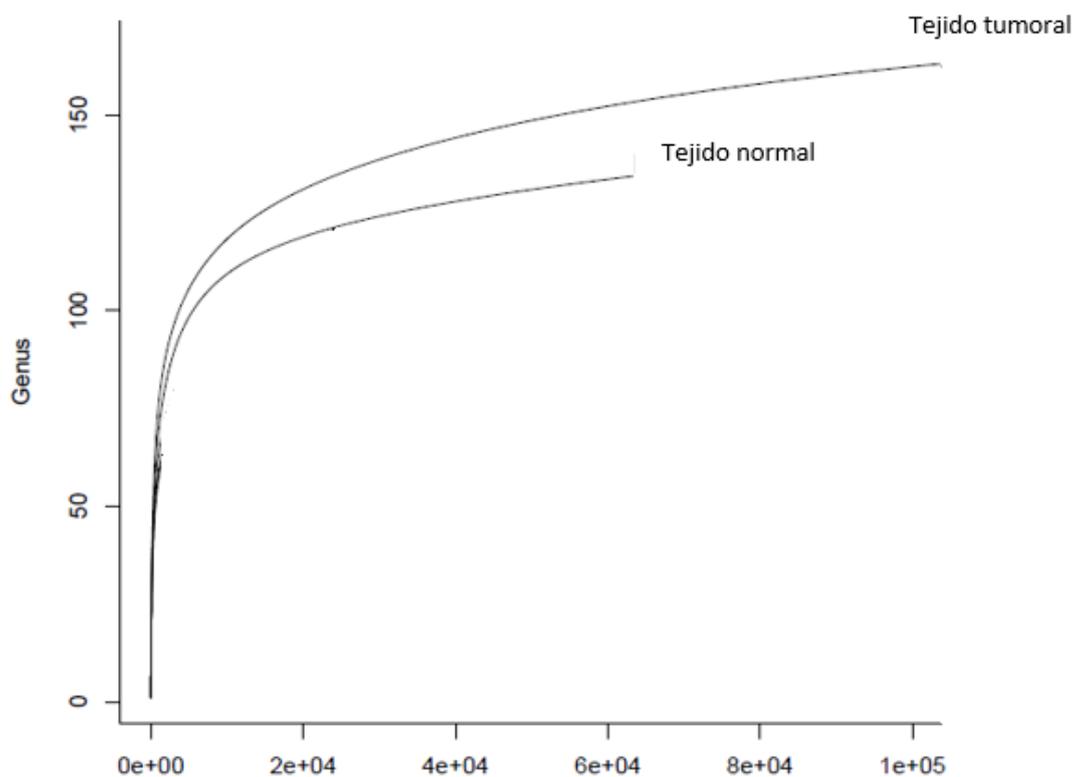


B)



**Figura 39.** Abundancias relativas de *Fusobacterium* en tejido normal y tumoral. (A) En la serie de pacientes mediante NGS. (B) En la serie independiente de pacientes mediante qPCR

Por otro lado, llevamos a cabo un estudio basado en el análisis de biodiversidad microbiana aplicando el índice de *Shanon* ( $H$ ) para los distintos grupos de muestras de tejido. Según nuestros datos, observamos una mayor biodiversidad microbiana en muestras de mucosa tumoral respecto a los tejidos sanos colindantes al tumor ( $H= 3.03$  y  $H= 2.94$ , respectivamente). Además, para visualizar la biodiversidad existente entre los dos grupos de muestras, realizamos una representación gráfica basada en las curvas de rarefacción, las cuales reflejan una mayor biodiversidad en muestras de tejido tumoral (Figura 40)



**Figura 40.** Curvas de rarefacción que muestran la diversidad microbiana a nivel de género en muestras de tejido normal y tumoral

### 2. CAPÍTULO 2.

#### Análisis diferencial de la composición microbiana en muestras de mucosa en pacientes con CCR de tipo serrado y convencional.

##### 2.1 Introducción

Como se ha comentado con anterioridad, el CS posee una evolución menos favorable que el CC, debido a que posee factores histológicos de mal pronóstico, entre los que se incluye un menor infiltrado linfocítico peritumoral. Este hallazgo puede estar relacionado con el estado de activación del sistema inmune que, a su vez, puede ser inducido por las bacterias presentes en la mucosa colónica. De este modo, ciertos microorganismos serían capaces de estimular el sistema inmune y/o producir factores de virulencia que les permiten colonizar e invadir de una forma más favorable la superficie colónica y activar ciertos genes que potencien el desarrollo del tumor y de este patrón histológico tan característico del CS. Por tanto, de este modo ciertos microorganismos podrían contribuir al desarrollo de ésta modalidad de adenocarcinoma de colon.

##### 2.2 Pacientes

Para poder llevar a cabo el estudio de asociación entre determinados microorganismos con el CS, incluimos en éste capítulo un total de 19 muestras de mucosa procedentes de pacientes con CCR. Las muestras fueron analizadas mediante NGS y qPCR, donde n=10 correspondieron al diagnóstico de CC y n=9 al diagnóstico de CS (Tabla 18).

Grupo	N	Género	Edad	Estadío	Localización
Serrado	9	7 V	69,55	3 T1-2	6 P
		2 M		6 T3-4	3 D
Convencional	10	6 V	72,7	2 T1-2	3 P
		4 M		8 T3-4	7 D

**Tabla 18.** Características clínicas de la serie de pacientes cuyas muestras fueron analizadas mediante NGS y qPCR. P:proximal; D:distal.

De forma adicional, para llevar a cabo el estudio de validación, se analizaron otras 20 muestras procedentes de pacientes con CCR, donde n=10 correspondían a CS y n=10 correspondían a CC (Tabla 19).

Grupo	N	Género	Edad	Estadío	Localización
Serrado	10	7 V	71.2	2 T1-2	5 P
		4 V		8 T3-4	5 D
Convencional	10	5 V	70.2	1 T1-2	4 P
		5 M		9 T3-4	6 D

**Tabla 19.** Características clínicas de una serie independiente de pacientes cuyas muestras fueron analizadas mediante qPCR P:proximal; D:distal.

### 2.3 Resultados

Tras el análisis mediante NGS, observamos cómo las muestras tumorales estaban constituidas predominantemente por bacterias de tipo proinflamatorio, aunque mostraron diferencias en cuanto a la composición y abundancia de los microorganismos presentes en ambos tipos de tumores.

En los pacientes diagnosticados de CS, los géneros bacterianos que mostraron una mayor representación en este tipo de tumor fueron *Fusobacterium*, *E. coli/Shigella*, *Citrobacter*, *Streptococcus*, *Salmonella*, *Aeromonas* y *Enterobacter*.

A diferencia de lo anterior, en pacientes diagnosticados de CC predominó fundamentalmente un perfil microbiano constituido por los géneros *Porphyromonas*, *Campylobacter*, *Enterococcus*, *Akkermansia* y *Eubacterium*.

Por otro lado, observamos como los géneros con actividad antiinflamatoria, tales como *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Ruminococcus* se encontraban en una mayor proporción en muestras de CC.

Tal y como muestran nuestros datos, la mayoría de los géneros pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (*Escherichia/Shigella*, *Citrobacter*, *Salmonella* y *Enterobacter*) fueron más prevalentes en el grupo del CS, aunque no de forma significativa ( $p > 0.05$ ) (Tabla 20).

Sin embargo, otros géneros con actividad inflamatoria y procarcinogénica tales como *Fusobacterium* y *Streptococcus*, si fueron significativamente más abundantes en el grupo del CS ( $p=0.04$  y  $p=0.013$ , respectivamente) (Tabla 20). Es de vital importancia remarcar la gran abundancia que presentan las muestras de pacientes con CS del género *Fusobacterium*.

## Resultados

En cuanto al CC, encontramos una fuerte asociación a determinados géneros bacterianos proinflamatorios tales como *Phorphyromonas* y *Klebsiella* pero no de forma estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ). En cambio, el género *Enterococcus* si mostró una asociación significativa con el tejido tumoral de tipo convencional ( $p=0.045$ ) (Tabla 20).

Por tanto, para confirmar nuestros resultados obtenidos mediante NGS, procedimos a cuantificar mediante qPCR la especie *F. nucleatum* como componente significativo en el CS y el género *Enterococcus* para el CC.

Género	Abundancias relativas (%)		Test Wilcoxon
	CS	CC	P-value
<i>Fusobacterium</i>	15.66	4.15	0.0454
<i>Porphyromonas</i>	0.95	2.94	> 0.05
<i>Leptotrichia</i>	0.12	0.19	> 0.05
<i>Escherichia/Shigella</i>	1.95	1.71	> 0.05
<i>Citrobacter</i>	0.21	0.06	> 0.05
<i>Klebsiella</i>	0.035	0.59	> 0.05
<i>Streptococcus</i>	1.45	0.66	0.0133
<i>Salmonella</i>	0.09	0.02	> 0.05
<i>Aeromonas</i>	0.14	0.001	0.0334
<i>Haemophilus</i>	0.4	0.46	> 0.05
<i>Enterobacter</i>	0.19	0.001	0.0099
<i>Peptostreptococcus</i>	0.45	0.21	> 0.05
<i>Campylobacter</i>	0.009	0.15	> 0.05
<i>Enterococcus</i>	0	0.27	0.0452
<i>Faecalibacterium</i>	1.86	2.74	> 0.05
<i>Lachnospiracea</i>	2.18	3.17	> 0.05
<i>Roseburia</i>	1.49	1.64	> 0.05
<i>Ruminococcus</i>	0.7	1.16	> 0.05
<i>Akkermansia</i>	0.21	0.25	> 0.05
<i>Eubacterium</i>	0.01	0.15	> 0.05

**Tabla 20.** Frecuencias relativas para diferentes taxones microbianos en muestras de adenocarcinoma serrado y convencional, analizados mediante NGS.

Tras el análisis cuantitativo mediante qPCR, observamos cómo *F. nucleatum* mostró una asociación significativa a muestras de CS, sin embargo, *Enterococcus* no presentó diferencias significativas entre los dos tipos de cáncer (Tabla 21).

Género	Nº de copias /10 <sup>6</sup>		Test Wilcoxon
	CS	CC	P-value
<i>Fusobacterium</i>	16756,06	2709,42	P=0.0638
<i>Enterococcus</i>	0	15435.33	P=0.25

**Tabla 21.** Cuantificación mediante qPCR de los taxones microbianos que mostraron diferencias significativas entre muestras de adenocarcinoma serrado y convencional.

Respecto al género *F. nucleatum*., fué validado en una serie independiente de pacientes, donde mostró nuevamente una asociación significativa con muestras de CS (Tabla 22).

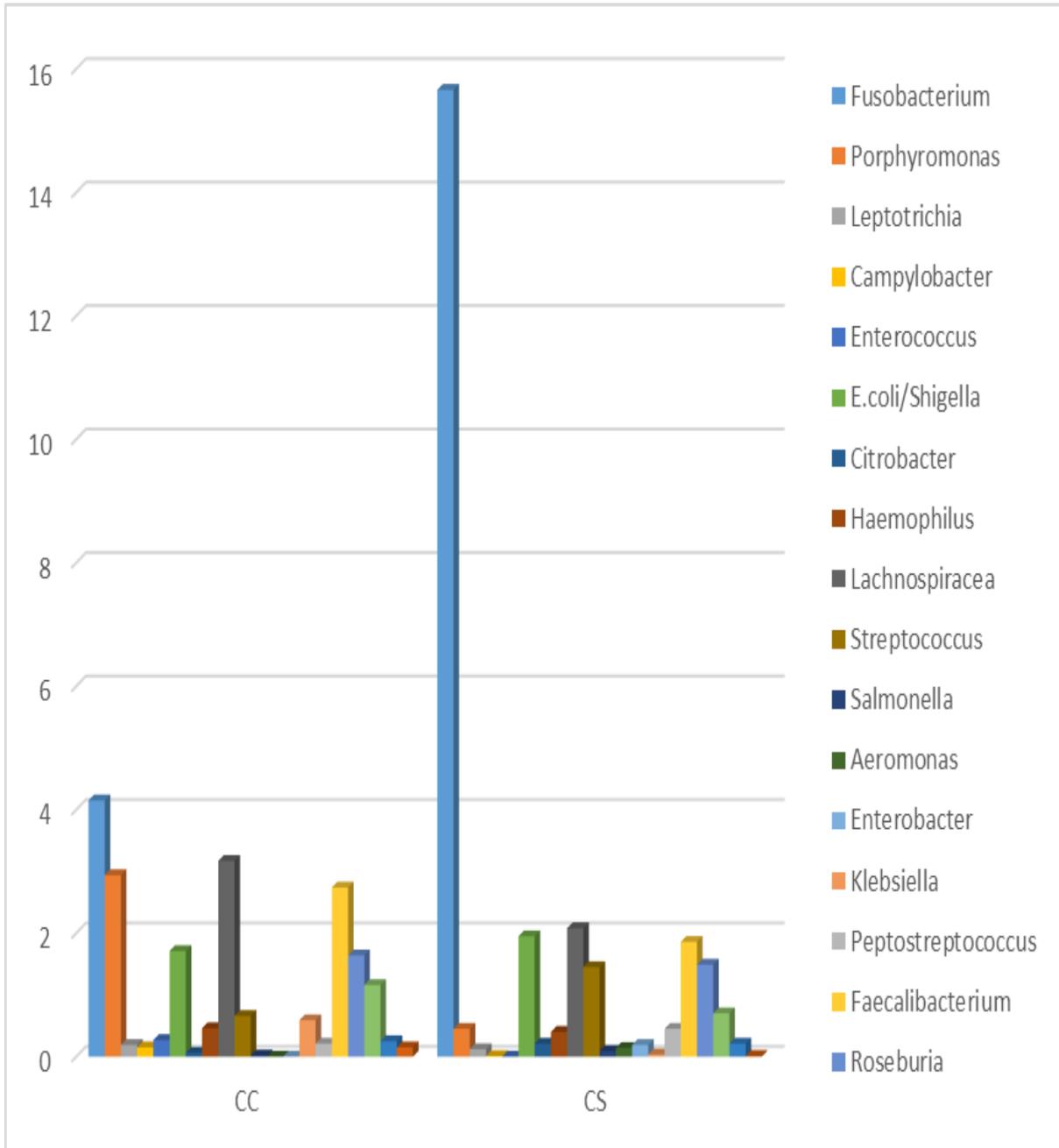
Mientras en el caso de *Enterococcus*, para llevar a cabo la validación aumentamos el tamaño muestral con la serie independiente de pacientes, donde finalmente sí encontramos una asociación significativa al CC (Tabla 22).

Género	Nº de copias /10 <sup>6</sup>		Test Wilcoxon
	CS	CC	P-value
<i>Fusobacterium</i>	54575,01	2281,50	P=0.0273
<i>Enterococcus</i>	35.04	5754.96	P= 0.015

**Tabla 22.** Análisis, mediante qPCR, de los grupos bacterianos que mostraron diferencias significativas para el estudio de NGS, en una serie independiente de pacientes

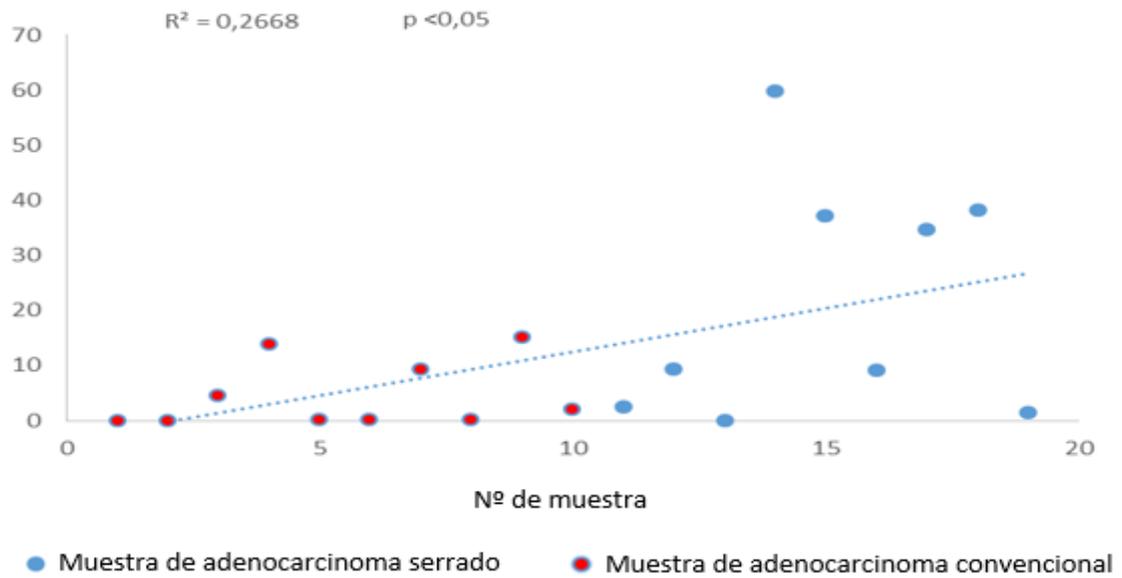
Por tanto, confirmamos nuestra hipótesis encontrando diferentes perfiles microbianos en los dos tipos de adenocarcinoma, estando el CS colonizado principalmente por bacterias con alto poder carcinogénico tal como *Fusobacterium*, y el CC por otras bacterias como *Enterococcus*.

Además, aunque no de forma significativa, otros muchos géneros bacterianos mostraron una distribución diferencial entre los distintos tipos de tumor. (Figura 41).



**Figura 41.** Distribución de los géneros bacterianos (% abundancias relativas), según tipo de adenocarcinoma.

Además, estudiamos la abundancia relativa de *Fusobacterium* para los dos tipos de adenocarcinoma, observando una correlación positiva entre este microorganismo y el adenocarcinoma de tipo serrado (Figura 42).



**Figura 42.** Representación gráfica de la abundancia relativa de *Fusobacterium* en muestras de adenocarcinoma serrado y convencional, mediante análisis por NGS.

### 3. CAPÍTULO 3.

#### Análisis diferencial de la composición microbiana entre muestras tumorales según su estadio TNM.

##### 3.1 Introducción

La estadificación del tumor y su relación con factores que agraven el pronóstico del paciente, resultan primordiales en la toma de decisiones terapéuticas. Por ello, poder explicar la participación bacteriana en el desarrollo del estadio tumoral, resulta imprescindible con el fin de sugerir qué tipo de bacterias podrían estar previsiblemente involucradas en la evolución de los tumores. Desde esta perspectiva, nos basamos en el modelo *driver-passenger* para poder explicar la posible asociación bacteriana en el desarrollo tumoral.

##### 3.2 Pacientes

Para este estudio, se seleccionaron un total de 39 pacientes, donde 8 pacientes fueron diagnosticados de un estadio tumoral bajo (T1-2) y 31 pacientes de un estadio tumoral alto (T3-4).

El estudio de secuenciación de próxima generación (NGS) se llevó a cabo en 19 muestras de mucosa, donde n= 5 correspondieron al estadio T1-2 y n= 14 al estadio T3-4. Todas ellas fueron posteriormente analizadas mediante qPCR (Tabla 23).

Grupo	N	Género	Edad	Tipo de tumor	Localización
Tumor T1-2	5	3 V 2 M	66	3 Serrado 2 Convencional	2 P, 1 D 0 P, 2 D
Tumor T3-4	14	10 V 4 M	73	6 Serrado 8 Convencional	3 P, 3 D 5 P, 3 D

**Tabla 23.** Distribución de pacientes según su estadio tumoral, cuyas muestras fueron analizadas por NGS y qPCR. P:proximal; D:distal.

El estudio de validación se llevó a cabo mediante qPCR en una serie independiente de 20 pacientes, donde n=3 correspondían a un estadio T1-2 y n=17 a un estadio T3-4 (Tabla 24)

Grupo	N	Género	Edad	Tipo de tumor	Localización
Tumor T1-2	3	3 V 0 M	70.66	2 Serrado 1 Convencional	1 P, 1 D 1 P, 0 D
Tumor T3-4	17	9 V 8 M	70.70	8 Serrado 9 Convencional	4 P, 4 D 3 P, 6 D

**Tabla 24.** Distribución de una serie independiente de pacientes según su estadio tumoral, cuyas muestras fueron analizadas por qPCR. P:proximal; D:distal.

### 3.3 Resultados

Entre los géneros bacterianos que más frecuentemente se encuentran asociados a tumores, observamos un aumento progresivo de su abundancia relativa conforme el estadio tumoral aumenta.

Por tanto, los géneros proinflamatorios en los que encontramos esta tendencia fueron *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Eubacterium*, *Akkermansia*, *Campylobacter*, *Bacteroides* y *Streptococcus* (Tabla 25). Del mismo modo, los géneros bacterianos productores de agentes antiinflamatorios *Faecalibacterium* y *Lachnospiracea* fueron más abundantes en estadios tumorales T3-T4 (Tabla 25).

Por el contrario, otras bacterias como *Enterococcus* mostraron un aumento inversamente proporcional al desarrollo del tumor, por lo que fueron más abundantes en tumores de estadio T1-T2 (Tabla 25)

De todos ellos, sólo encontramos diferencias significativas para el género *Faecalibacterium*, el cual mostró una asociación con estadios tumorales T3-4 ( $p=0.0416$ ) (Tabla 25).

Género	Abundancias relativas (%)		Test Wilcoxon
	T1-T2	T3-T4	<i>p-value</i>
<i>Fusobacterium</i>	7.82	11.38	>0.05
<i>Porphyromonas</i>	0.04	2.05	>0.05
<i>Eubacterium</i>	0.003	0.1	> 0.05
<i>Akkermansia</i>	0.04	0.29	> 0.05
<i>Campylobacter</i>	0.003	0.096	>0.05
<i>Bacteroides</i>	27.64	33.89	> 0.05
<i>Streptococcus</i>	0.78	1.2	> 0.05
<i>Faecalibacterium</i>	0.16	2.93	0.0416
<i>Lachnospiracea</i>	1.91	2.78	>0.05
<i>Enterococcus</i>	0.454	0.013	>0.05

**Tabla 25.** Frecuencias relativas para diferentes taxones microbianos según el estadio tumoral del tejido canceroso, analizados mediante NGS.

Tras la cuantificación de *F. prausnitzii*, no logamos confirmar los datos obtenidos mediante NGS, donde este microorganismo es más abundante cuanto mayor es el estadio tumoral (Tabla 26).

Por lo tanto, para llevar a cabo el estudio de validación, aumentamos el tamaño muestral con 20 pacientes pertenecientes a la serie independiente.

Género	N° de copias /10 <sup>6</sup>		Test Wilcoxon
	T1-T2	T3-T4	<i>p-value</i>
<i>F. prausnitzii</i>	20.30	290.49	p= 0.066

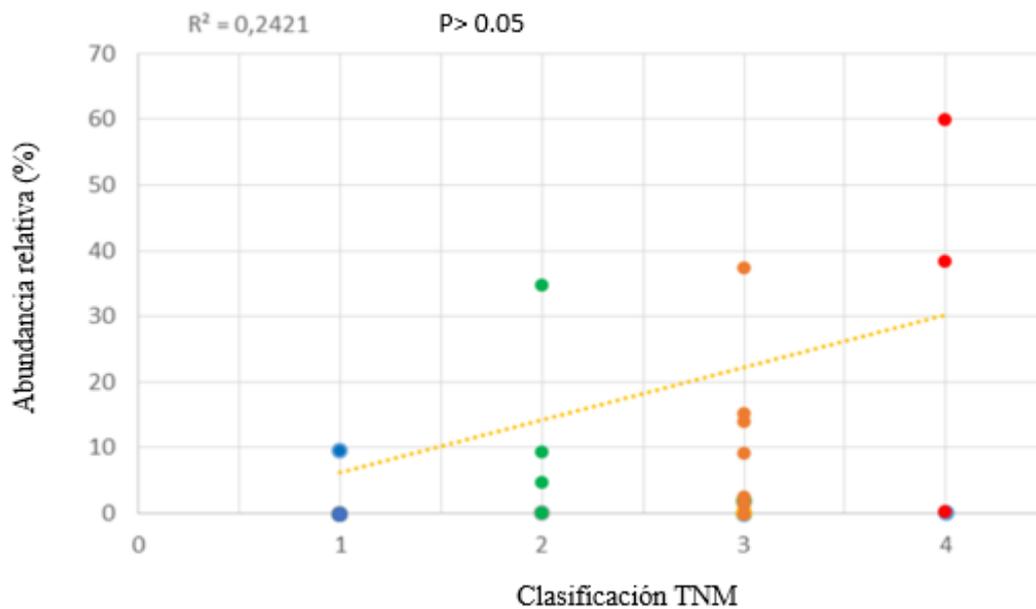
**Tabla 26.** Cuantificación mediante qPCR del taxón microbiano que mostró diferencias significativas entre muestras tumorales de bajo y alto estadio.

De este modo, si observamos diferencias significativas en la abundancia de *F. prausnitzii* respecto al estadio tumoral (Tabla 27).

Género	N° de copias /10 <sup>6</sup>		Test Wilcoxon p-value
	T1-T2	T3-T4	
<i>F. prausnitzii</i>	34.17	307.10	P=0.007

**Tabla 27.** Cuantificación mediante qPCR del taxón microbiano que mostró diferencias significativas en una serie independiente de muestras tumorales de bajo y alto estadio.

Si analizamos la abundancia relativa de *Fusobacterium* frente al estadio tumoral, observamos como existe una tendencia al aumento de éste microorganismo conforme es mayor el estadio tumoral (Figura 43).



**Figura 43.** Correlación entre la clasificación TNM del CCR y la abundancia relativa de *Fusobacterium*.

### 4. SUPUESTO 4.

---

#### Análisis diferencial de la composición microbiana entre muestras de mucosa tumoral en colon proximal y distal de pacientes con CCR.

##### 4.1 Introducción

Recientemente, diferentes estudios epidemiológicos han informado de una migración proximal del CCR, mostrando un aumento en la incidencia del cáncer de colon proximal y una disminución en la incidencia de tumores rectosigmoides, lo que sugiere que deben existir diferentes factores de riesgo asociados con la carcinogénesis en el colon proximal y distal.

Estos datos apoyan el concepto propuesto originalmente por *Bufill* en 1990, donde los cánceres procedentes de dos localizaciones anatómicas diferentes, deben presentar una patogénesis molecular distinta. Además, entre la mucosa epitelial del colon proximal y distal se puede distinguir un patrón diferencial de expresión génica de más de 1000 genes.

De este modo, la composición microbiana podría ejercer un efecto diferencial en la carcinogénesis ya que su representación no es homogénea a lo largo del colon, por lo que el lado derecho podría presentar un perfil microbiano con una mayor capacidad de invasión y activación de rutas implicadas en la carcinogénesis.

##### 4.2 Pacientes

Para el análisis de la composición microbiana en diferentes localizaciones del colon se incluyeron un total de 42 pacientes.

Se estudiaron un total de 39 muestras de mucosa tumoral procedentes de 18 pacientes con CCR en el lado derecho y 21 en el lado izquierdo. Del mismo modo, se analizaron 20 muestras de tejido normal provenientes de 9 pacientes de zona proximal y 11 de zona distal.

En un primer lugar se analizaron mediante NGS y qPCR un total de 19 muestras correspondientes a tejido tumoral, donde n= 10 fueron muestras de hemicolectomía izquierda y n= 9 de hemicolectomía derecha. A continuación, se analizaron del mismo modo 10 muestras de tejido normal, donde 6 correspondieron a la zona proximal y 4 a la zona distal (tablas 28 y 29).

Grupo	N	Género	Edad	Tipo	Estadío
Distal	10	8 V 2 M	66.7	3 Serrados 7 Convencional	3 T1-2 7 T3-4
Proximal	9	5 V 4 M	74.87	6 Serrado 3 Convencional	2 T1-2 7 T3-4

**Tabla 28.** Distribución de pacientes según localización del tejido tumoral, analizados mediante NGS y qPCR

Grupo	N	Género	Edad	Tipo	Estadío
Distal	4	3 V 1 M	68.25	1 Serrados 3 Convencional	1 T1-2 3 T3-4
Proximal	6	3 V 3 M	75.83	4 Serrado 2 Convencional	1 T1-2 5 T3-4

**Tabla 29.** Distribución de pacientes según localización del tejido normal, analizados mediante NGS y qPCR

Para llevar a cabo el estudio de validación, se incluyeron un total de 20 muestras de tejido tumoral, donde n=11 correspondían a una localización distal y n=9 correspondían a una localización proximal. Por otro lado, se adicionaron 10 muestras de tejido normal, siendo n= 7 de zona distal y n=3 de zona proximal. (Tablas 30 y 31).

Grupo	N	Género	Edad	Tipo	Estadío
Distal	11	5 V	70,27	5 Serrados	1 T1-2
		6 M		6 Convencional	10 T3-4
Proximal	9	7 V	71.22	5 Serrado	2 T1-2
		2 M		4 Convencional	7 T3-4

**Tabla 30.** Distribución de pacientes según localización del tumor, analizados mediante qPCR en una serie independiente de pacientes

Grupo	N	Género	Edad	Tipo	Estadío
Distal	7	3 V	67.14	2 Serrados	T1-2
		4 M		5 Convencional	T3-4
Proximal	3	3 V	70.66	1 Serrado	T1-2
		0 M		2 Convencional	T3-4

**Tabla 31.** Distribución de pacientes según localización del tejido normal, analizados mediante qPCR en una serie independiente de pacientes

### 4.3 Resultados

Cuando comparamos el perfil microbiano entre muestras tumorales de diferente localización anatómica, observamos que las muestras tumorales de localización distal mostraron una mayor frecuencia de los géneros *Fusobacterium*, *Phorphyromonas*, *Campylobacter* y *Enterococcus*, mientras en la zona proximal se encontraron un predominio de otros géneros bacterianos tales como *Prevotella*, *Blautia* y *Haemophilus* (Tabla 32).

Por otro lado, si analizamos el tejido normal de pacientes con CCR, observamos como en el lado proximal existió un predominio de los géneros *Escherichia/Shigella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Aeromonas*, *Enterobacter* y *Klebsiella*, lo que sugiere una mayor actividad inflamatoria en esta localización (Tabla 32).

En cuanto a los géneros bacterianos *Faecalibacterium*, *Lachnospiracea* y *Ruminococcus*, se encontraron en un mayor recuento en las muestras de tejido normal correspondientes a la zona proximal del colon (Tabla 32).

Género	Abundancias relativas (%)				Test Wilcoxon	
	Tejido tumoral		Tejido normal		p-value 1	p-value 2
	Proximal	Distal	Proximal	Distal		
<i>Fusobacterium</i>	6.92	15.52	0.57	0.18	>0.05	>0.05
<i>Porphyromonas</i>	0.81	2.93	0.05	0.12	>0.05	>0.05
<i>Enterococcus</i>	0	0.31	0.002	0.081	0.02	>0.05
<i>Campylobacter</i>	0.017	0.16	0.002	0	>0.05	>0.05
<i>Escherichia/Shigella</i>	2.54	1.14	6.98	2.1	>0.05	>0.05
<i>Citrobacter</i>	0.2	0.05	0.58	0.04	>0.05	>0.05
<i>Salmonella</i>	0.08	0.01	0.24	0	>0.05	>0.05
<i>Streptococcus</i>	2.25	0.65	0.43	0.11	>0.05	0.01
<i>Aeromonas</i>	0.026	0.14	0	0	>0.05	> 0.05
<i>Haemophilus</i>	0.86	0.01	0.26	0	0.0292	> 0.05
<i>Klebsiella</i>	0.37	0.03	0.07	0.02	>0.05	> 0.05
<i>Blautia</i>	1.31	0.46	1.73	0.47	0.007	> 0.05
<i>Prevotella</i>	4.03	0.63	4.24	4.39	0.04	>0.05
<i>Faecalibacterium</i>	2.55	1.91	4.5	2.62	>0.05	>0.05
<i>Lachnospiracea</i>	2.33	2.79	4.6	2	>0.05	>0.05
<i>Ruminococcus</i>	1.31	0.82	2.23	0.48	>0.05	>0.05

**Tabla 32.** Frecuencias relativas para diferentes taxones microbianos según la localización anatómica del tejido tumoral, analizados mediante NGS.

*P-value* 1: comparación entre localización proximal y distal en tejido tumoral

*P-value* 2: comparación entre localización proximal y distal en tejido normal

Tras la cuantificación de los géneros *Enterococcus* y *Blautia*, no encontramos diferencias significativas en cuanto a su distribución asimétrica en el colon (Tabla 33).

Género	N° de copias /10 <sup>6</sup>		Test Wilcoxon
	Proximal	Distal	<i>P-value</i>
<i>Enterococcus</i>	8575	0	0.25
<i>Blautia</i>	134.54	140.42	0.57

**Tabla 33.** Cuantificación de los géneros bacterianos que mostraron una asociación significativa a alguna localización anatómica objeto de estudio, tras estudio mediante NGS.

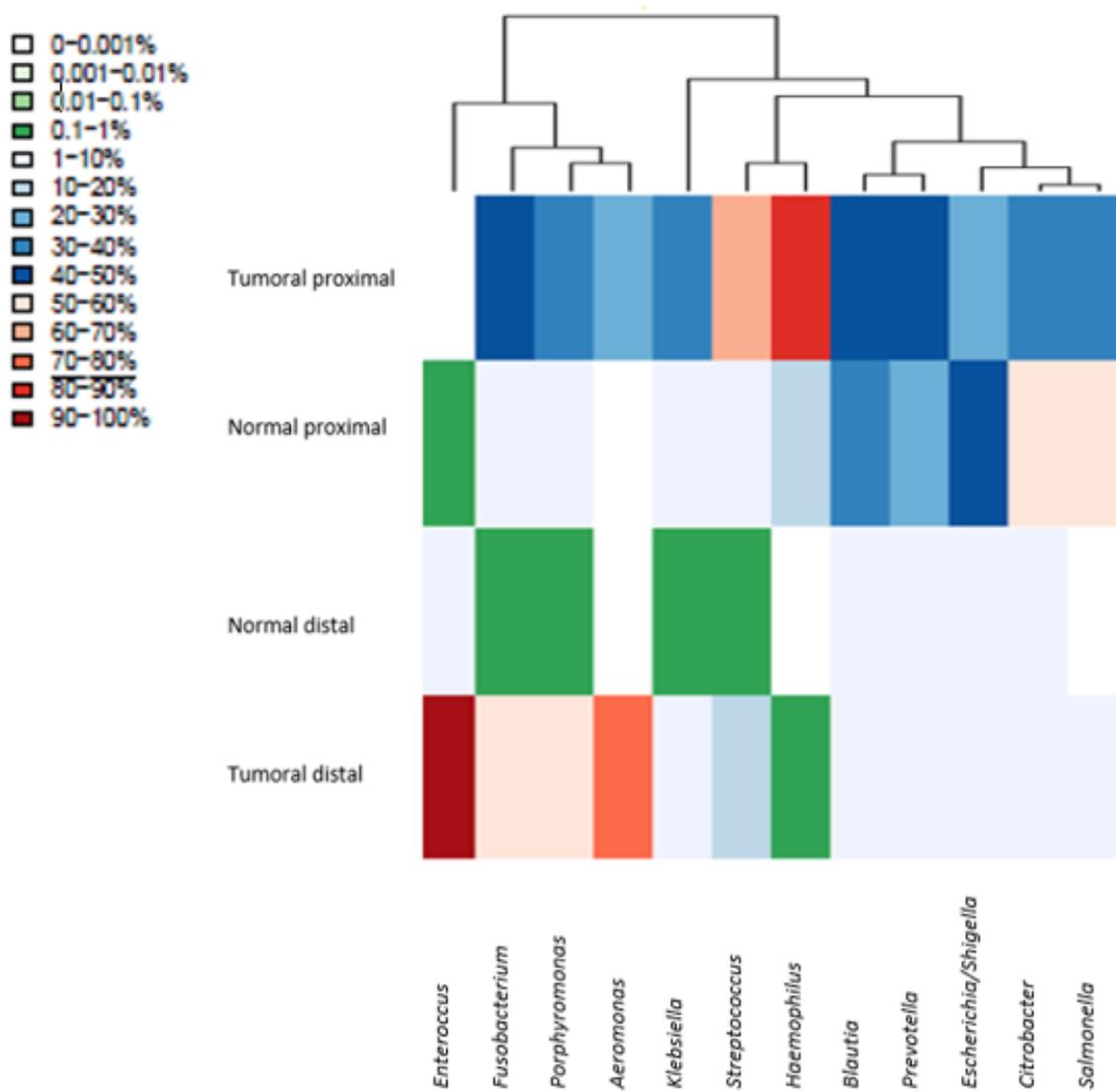
Por tanto, para poder establecer si existen verdaderas diferencias en la distribución de éstos microorganismos en el colon, aumentamos el tamaño muestral con 20 pacientes pertenecientes a la serie independiente.

En base a los resultados obtenidos, observamos cómo *Enterococcus* sí mostró una distribución asimétrica estadísticamente significativa, mientras *Blautia* no mostró ninguna asociación a tumores que localizan en la zona proximal (Tabla 34).

Género	N° de copias /10 <sup>6</sup>		Test Wilcoxon
	Proximal	Distal	<i>P-value</i>
<i>Enterococcus</i>	314.95	4043.30	0.0078
<i>Blautia</i>	107.75	100.45	0.73

**Tabla 34.** Cuantificación de los géneros bacterianos que mostraron una asociación significativa a alguna localización anatómica objeto de estudio, en una serie independiente de pacientes

Mediante el diseño gráfico de un *Heat Map*, basado en las abundancias relativas (analizadas mediante NGS) de los microorganismos objeto de estudio, observamos cómo las bacterias de tipo *passenger* son más frecuentes en la zona distal, mientras las de tipo *driver* son más abundantes en la zona proximal (Figura 44)



**Figura 44.** Representación en *Heat Map* de las abundancias relativas correspondientes a microorganismos proinflamatorios para distintos tipos de muestra.

## 5. SUPUESTO 5.

### Caracterización de la microbiota intestinal según la secuencia: tejido normal-adenoma-adenocarcinoma.

#### 5.1 Introducción

Recientemente, Tjalsma et al. han propuesto un modelo denominado *driver-passenger* para explicar la participación bacteriana en el origen y proliferación de CCR.

Sobre la base de este modelo, hemos intentado identificar cual es el potencial *driver* bacteriano capaz de originar un microambiente proinflamatorio, así como el potencial *passenger* bacteriano con ventajas adaptativas y competitivas en el microambiente tumoral capaz de favorecer la progresión tumoral.

#### 5.2 Pacientes

Para comprender la secuencia de colonización de los microorganismos y su implicación en el inicio y desarrollo del CCR, incluimos un total de 68 muestras provenientes de 50 pacientes con CCR, siendo n= 20 muestras normales, n= 39 muestras tumorales y n=9 muestras de pólipos adenomatosos (Tablas 35 y 36).

En un primer lugar, realizamos el estudio mediante NGS y qPCR en una serie de 20 pacientes con un total de 31 muestras, con la siguiente distribución: muestras normales n= 10, muestras tumorales n=19 y muestras de tejido adenomatoso n=2 (Tablas 35)

Grupo	N	Género	Edad	Tipo	Estadío	Localización
Tejido normal	10	6 V 4 M	72.8	NA	NA	6 P 4 D
Tejido adenomatoso	2	1 V 1 M	81.5	NA	NA	2 P 0 D
Tejido tumoral	19	13 V 6 M	71.2	9 Serrado 10 Convencional	5 T1-2 14 T3-4	9 P 10 D

**Tabla 35.** Distribución de pacientes según el tipo de tejido, donde las muestras fueron analizadas mediante NGS y qPCR.

NA: no aplicable; P:proximal; D:distal.

Posteriormente procedimos a validar estos resultados llevando a cabo un ensayo mediante qPCR en una serie independiente de 30 pacientes, donde se estudiaron los siguientes grupos de muestras: n=10 tejido normal, n=20 tejido tumoral y n= 7 tejido adenomatoso (Tabla 36).

Grupo	N	Género	Edad	Tipo	Estadío	Localización
Tejido normal	10	6 V 4 M	68.2	NA	NA	3 P 7 D
Tejido adenomatoso	7	4 V 3 M	70.85	NA	NA	7 P 0 D
Tejido tumoral	20	12 V 8 M	70.7	10 Serrado 10 Convencional	3 T1-2 17 T3-4	9 P 11 D

**Tabla 36.** Distribución de pacientes según el tipo de tejido, donde las muestras fueron analizadas mediante qPCR en una serie independiente.  
NA: no aplicable; P:proximal; D:distal.

### 5.3 Resultados

Según el modelo *driver-passenger* se identificaron 8 géneros bacterianos potenciales de tipo *driver* y 9 de tipo *passenger*.

Entre las bacterias *driver* encontramos los géneros (*Escherichia/Shigella*, *Citrobacter*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Leptotrichia*, *Treponema*, *Veillonella* y *Haemophilus*), los cuales mostraron una mayor abundancia en adenomas o tejido normal respecto al tejido tumoral (Tabla 37) y (Figura 45).

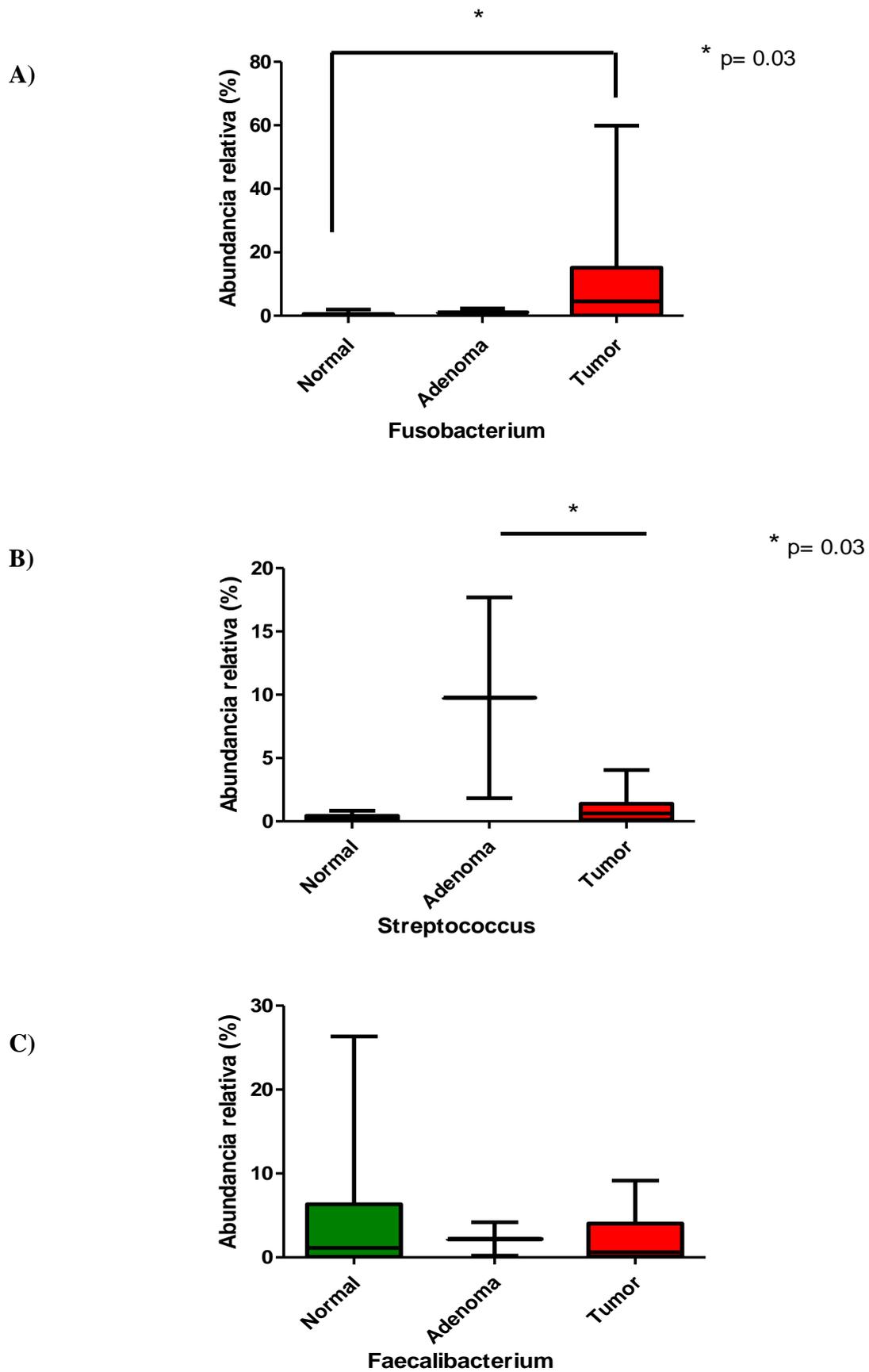
De los 9 grupos bacterianos identificados como *passenger*, cinco (*Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Campylobacter*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium* y *Enterococcus*) mostraron una mayor abundancia en tejido tumoral respecto al resto de tejidos y los tres grupos restantes (*Lachnospiracea*, *Faecalibacterium* y *Ruminococcus*) mostraron una alta abundancia en tejidos normal y tumoral (Tabla 37) y (Figura 45).

Género	Abundancias relativas (%)			Test Wilcoxon	
	Normal	Adenoma	Tumoral	P- value 1	P-value 2
<i>Fusobacterium</i>	0.48	1.65	10.51	>0.05	>0.05
<i>Porphyromonas</i>	0.07	1.53	1.57	>0.05	>0.05
<i>Peptostreptococcus</i>	0.066	0	0.34	>0.05	>0.05
<i>Enterococcus</i>	0.021	0	0.121	>0.05	>0.05
<i>Eubacterium</i>	0.004	0.025	0.7	>0.05	>0.05
<i>Campylobacter</i>	0.001	0.01	0.07	>0.05	>0.05
<i>Escherichia/Shigella</i>	5.78	3.77	1.84	>0.05	>0.05
<i>Citrobacter</i>	0.44	0.19	0.14	>0.05	>0.05
<i>Streptococcus</i>	0.35	6.68	1.1	>0.05	0.03
<i>Haemophilus</i>	0.19	1.66	0.43	>0.05	>0.05
<i>Bacteroides</i>	35.74	38.36	32.37	>0.05	>0.05
<i>Leptotrichia</i>	0.003	0.29	0.15	>0.05	>0.05
<i>Treponema</i>	0	0.4	0.18	>0.05	>0.05
<i>Veillonella</i>	0.07	0.61	0.18	>0.05	>0.05
<i>Faecalibacterium</i>	4.04	2.95	2.25	>0.05	>0.05
<i>Lachnospiracea</i>	3.97	1.84	2.57	>0.05	>0.05
<i>Roseburia</i>	1.27	1.27	1.56	>0.05	>0.05

**Tabla 37.** Frecuencias relativas para diferentes taxones microbianos según los diferentes tipos de tejido, analizados mediante NGS.

*P-value* 1: comparación entre tejido normal y adenomatoso.

*P-value* 2: comparación entre tejido tumoral y adenomatoso.

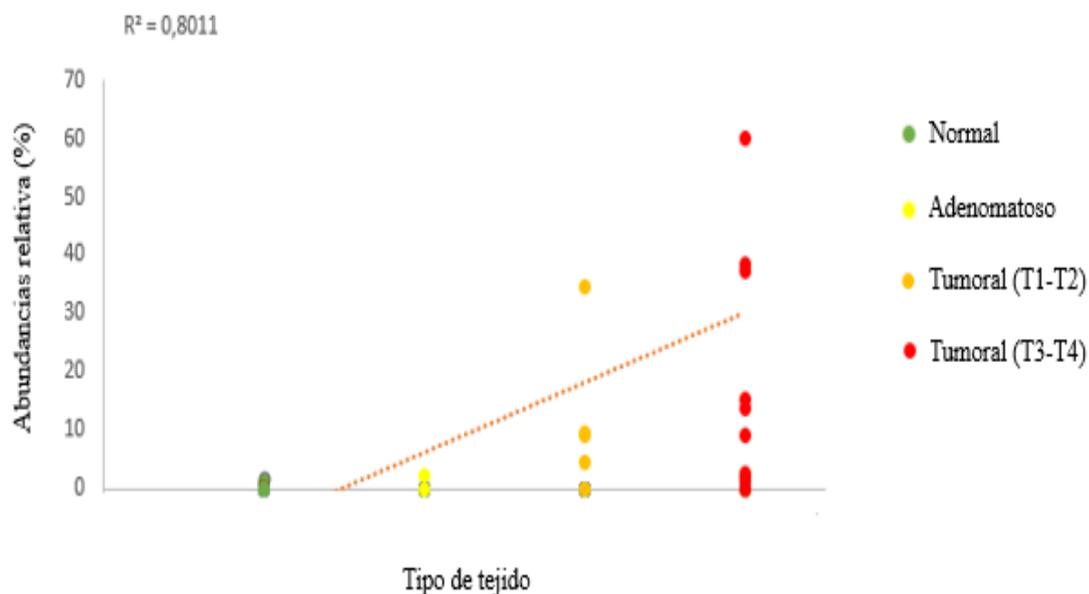


**Figura 45.** Identificación de bacterias con características potenciales para los tipos: A y C) *passenger* y B) *driver*.

## Resultados

Tras numerosos intentos en el desarrollo con éxito de la cuantificación del género *Streptococcus* mediante el empleo de tres pares distintos de oligonucleótidos, no conseguimos validar los resultados obtenidos por NGS. De este modo, las conclusiones resultantes acerca de éste género, procederán únicamente de los datos obtenidos mediante NGS

Por otro lado, podemos observar como el género *Fusobacterium* aumenta de forma directamente proporcional a la secuencia: tejido normal-adenoma-tejido tumoral, siendo en éste último significativamente más abundante que en el tejido sano (Figura 46).

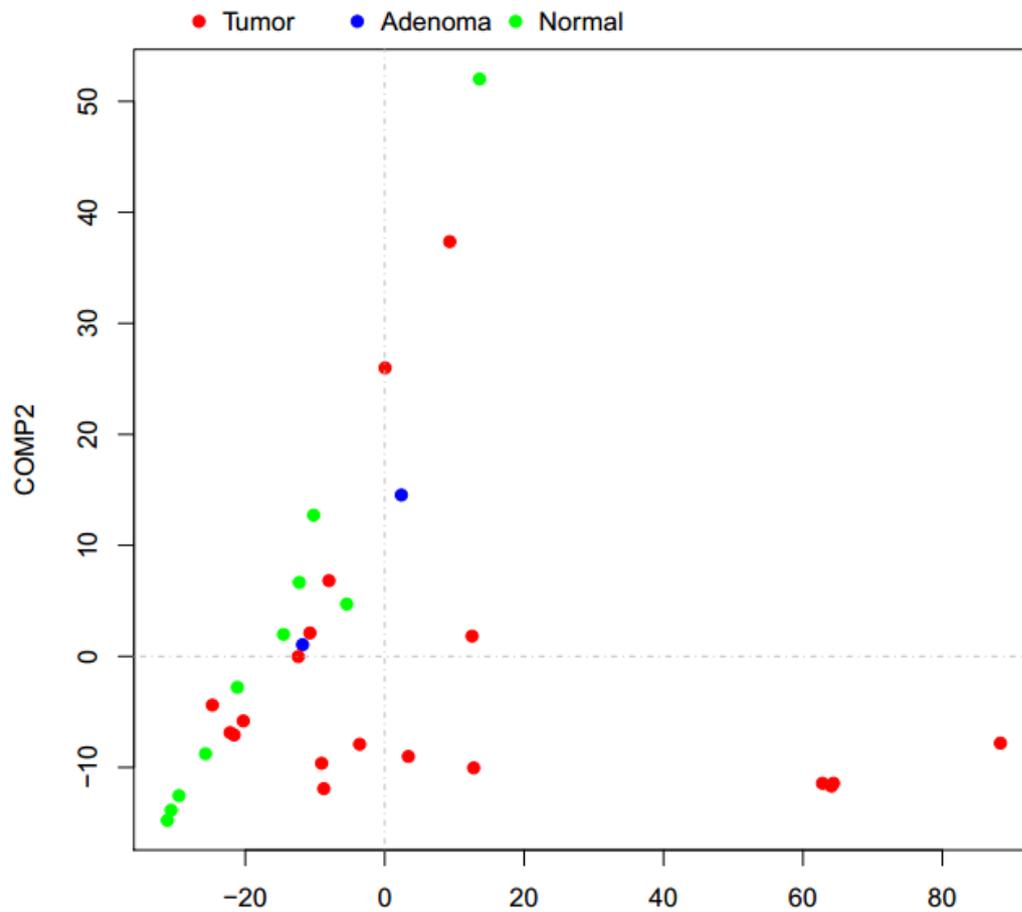


**Figura 46.** Abundancia relativa de *Fusobacterium* en función del tipo de tejido: normal-adenoma-tumoral T1-2-Tumoral T3-4, cuantificado mediante NGS.

Para visualizar las diferencias que existen en cuanto a la distribución de las muestras de tejido normal, adenomatoso y tumoral según su composición microbiana, se realizó un análisis principal de coordenadas (PCoA), el cual calcula una matriz de distancias basado en el uso del algoritmo UniFrac no ponderado.

Tras realizar éste análisis, no logramos observar una clara separación de las muestras de tejido normal, adenomatoso y tumoral respecto a los ejes de componentes principales, los cuales representaron el 14,02% y 10,15% de las variaciones totales (Figura 47.).

De este modo observamos tres poblaciones de muestras de tejido, aunque algunas de las muestras presentaron cierto solapamiento.



**Figura 47.** Análisis principal de coordenadas (PCoA) basado en la composición bacteriana analizadas mediante NGS, para cada una de las muestras objeto de este estudio. Cada símbolo representa una muestra.

### 6. SUPUESTO 6.

#### Análisis diferencial de la composición microbiana entre muestras de heces de pacientes sanos y pacientes con CCR.

##### 6.1. Introducción

Las alteraciones en la composición microbiana intestinal en el desarrollo del CCR, pueden quedar reflejadas en muestras de biopsia de mucosa o heces.

Uno de los inconvenientes que presentan las muestras de heces es que el perfil microbiano que presente no sea tan informativo como el de las muestras de mucosa ya que las heces van pasando a lo largo de todo el tránsito intestinal. Pero no obstante, uno de los principales objetivos es la búsqueda de biomarcadores que revelen el pronóstico de la enfermedad y en este caso las muestras de heces muestran como ventaja su fácil recogida al ser una muestra no invasiva, a diferencia de las muestras de mucosa.

Por ello, resulta de especial interés conocer las diferencias microbianas existentes entre las muestras de heces de pacientes sanos y enfermos.

##### 6.2. Pacientes

Para el estudio de la microbiota en heces mediante NGS, se incluyeron un total de 7 pacientes, donde 4 presentaban CCR y 3 eran casos control (Tabla 38).

Grupo	N	Género	Edad	Tipo	Estadío	Localización	SOH
Control	3	2 V 1 M	72.6	NA	NA	NA	Negativa
Enfermos	4	3 V 1 M	65	0 Serrado 4 Convencional	T1-2 T3-4	1 P 3 D	Positiva

**Tabla 38.** Distribución de pacientes sanos y enfermos para el análisis de heces mediante NGS. NA: no aplicable; P:proximal; D:distal.

### 6.3. Resultados.

Tras el análisis estadístico no obtuvimos diferencias significativas para ningún género bacteriano entre ambos grupos de pacientes pero si observamos importantes diferencias en cuanto a la abundancia de determinados géneros bacterianos entre ambos grupos de estudio.

Género	Abundancias relativas (%)		Test de Wilcoxon <i>P-value</i>
	Sano	Enfermo	
<i>Akkermansia</i>	0.64	7.96	> 0.05
<i>Escherichia/Shigella</i>	0.53	3.49	> 0.05
<i>Porphyromonas</i>	0.067	0.75	> 0.05
<i>Faecalibacterium</i>	14.82	3.26	> 0.05
<i>Roseburia</i>	3.58	0.86	> 0.05
<i>Ruminococcus</i>	3.46	2.39	> 0.05

**Tabla 39.** Frecuencias relativas para diferentes taxones microbianos según los diferentes tipos de muestra, analizadas mediante NGS.

En heces de pacientes con CCR encontramos una mayor abundancia relativa para los géneros *Akkermansia*, *Escherichia/Shigella* y *Phorphyromonas* en comparación con las muestras de heces procedentes de pacientes sanos donde fueron más escasos (Tabla 39).

A diferencia de lo observado en muestras de pacientes con CCR, las muestras de pacientes sanos presentaron una mayor abundancia relativa para bacterias productoras de butirato tales como *Faecalibacterium*, *Ruminococcus* o *Roseburia* (Tabla 39).

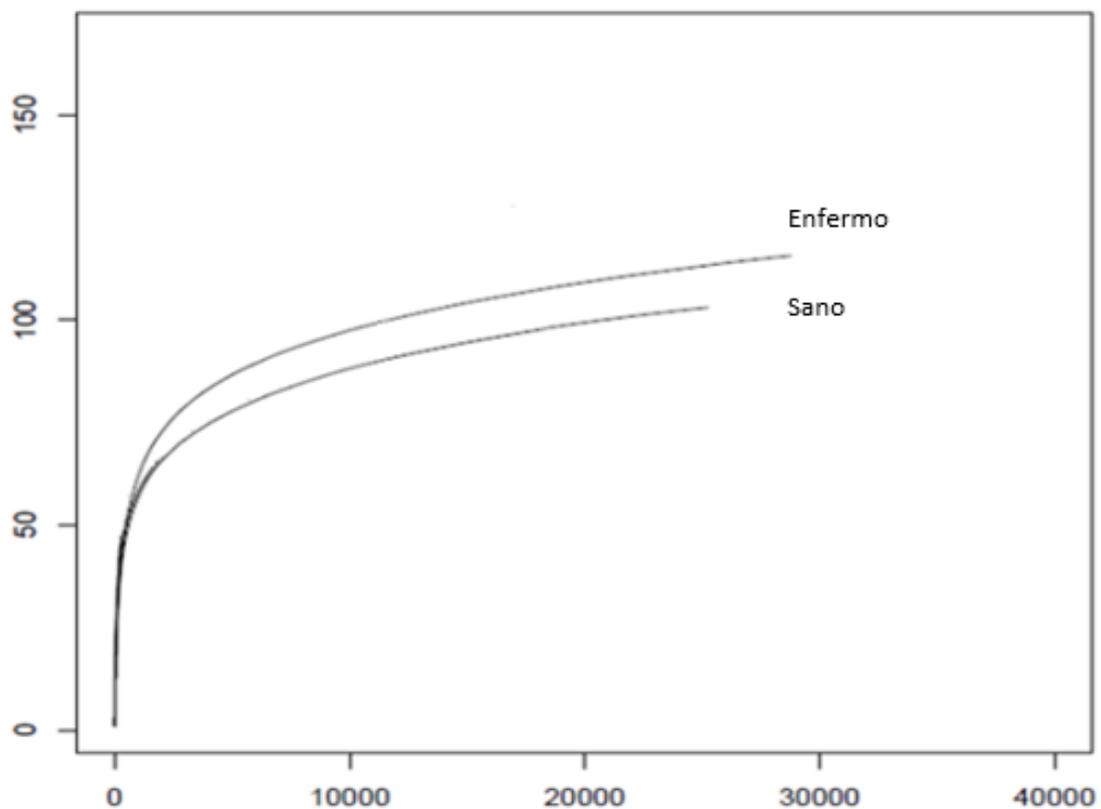
Aunque no encontramos diferencias significativas para ninguno de los géneros bacterianos entre muestras de pacientes sanos y enfermos, sí observamos una correlación positiva entre una mayor abundancia de bacterias proinflamatorias asociadas a cáncer, así como de una mayor abundancia de bacterias productoras de butirato con estados saludables del individuo.

## Resultados

---

De acuerdo a nuestros resultados, observamos como *Akkermansia* constituye un buen biomarcador de procesos cancerosos mientras *Faecalibacterium* de estados saludables.

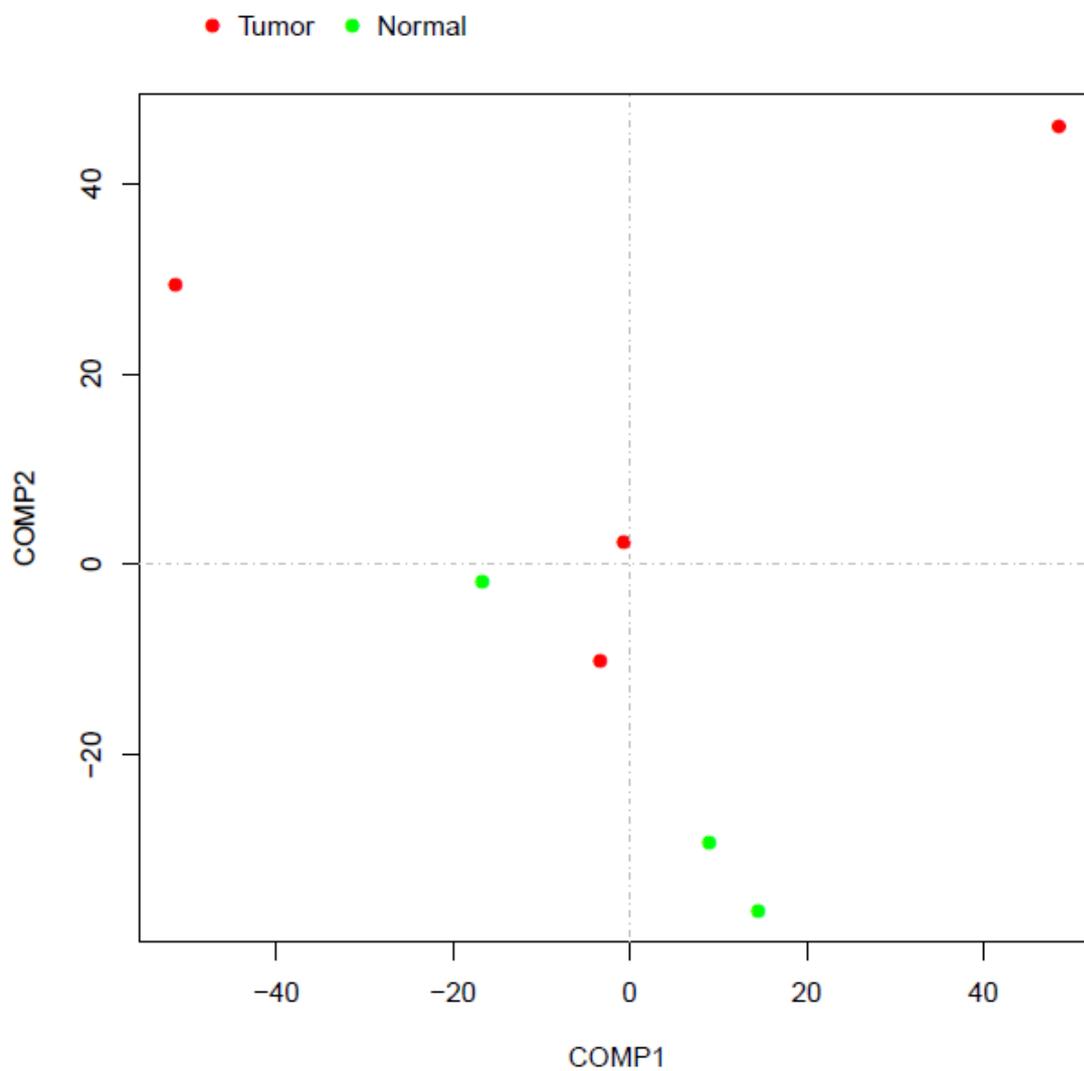
Por otro lado, realizamos un análisis de biodiversidad en muestras de heces aplicando el índice de Shannon, y observamos como las muestras de heces en pacientes con CCR presentaban una mayor biodiversidad bacteriana ( $H= 3.01$ ) que las muestras de heces de pacientes sanos ( $H= 2.83$ ). A continuación, realizamos una representación gráfica con curvas de rarefacción que nos indican cómo son de diversas las dos poblaciones objeto de estudio (Figura 48).



**Figura 48.** Curvas de rarefacción que muestran la diversidad microbiana a nivel de género en muestras de heces de pacientes sanos y enfermos.

Para visualizar las diferencias que existen en cuanto a la distribución de muestras de heces de pacientes sanos y enfermos, basadas en las abundancias relativas para los diferentes taxones microbianos que poseen, se realizó un PCoA.

Tras realizar éste análisis, observamos cómo las muestras de heces normales mostraron una aparente separación respecto a las muestras de heces de pacientes enfermos. Los ejes de componentes principales representaron el 14,02% y 10,15% de las variaciones totales (Figura 49). De este modo observamos dos poblaciones de muestras en función de su composición microbiana.



**Figura 49.** Análisis principal de coordenadas (PCoA) basado en las abundancias relativas para los diferentes OTUs. Cada símbolo representa una muestra.



## V. DISCUSIÓN

---



En los últimos años se ha incrementado notablemente el interés por el estudio del complejo ecosistema microbiano del tracto TGI humano (Tannock, 1999). Esto se debe fundamentalmente a que, según crecientes evidencias, las poblaciones microbianas ejercen una considerable influencia sobre las muchas características bioquímicas, fisiológicas e inmunológicas del hospedador en el que residen (H. Gill, 1998; Parodi, 1999; Salminen et al., 1998), existiendo una relación cada vez más clara entre la microbiota intestinal y la salud (Hart et al., 2002; Noverr & Huffnagle, 2004; Parodi, 1999). Hasta el momento se conocen los géneros microbianos mayoritarios y su abundancia relativa en las distintas posiciones del TGI y a lo largo de la vida (Conway, 1995). El interés por el estudio de la microbiota intestinal se ha visto reforzado en los últimos años con la aparición de diversas técnicas moleculares que facilitan la caracterización y el seguimiento de una enorme variedad de grupos microbianos, incluyendo poblaciones no cultivables.

La mayoría de los estudios sobre microbiota intestinal, y especialmente los más recientes en los que se utilizan novedosas técnicas independientes de cultivo, se han llevado a cabo mayoritariamente en otros países. En nuestro país, los estudios sobre microbiota intestinal humana son escasos y, por tanto, nos vemos en la necesidad de referir los resultados descritos a otros grupos poblacionales. Consideraciones de este tipo son las que nos han movido a realizar este estudio con unos objetivos ya detallados anteriormente. Desafortunadamente, el número de individuos y de muestras analizadas es pequeño y, por tanto, los resultados han de interpretarse con cautela.

El CCR se trata de un proceso complejo y multifactorial, donde existen cada vez más estudios que apoyan la hipótesis de cómo la microbiota intestinal y su metabolismo están directamente implicados en el inicio y desarrollo de esta patología (Kostic, Chun, Robertson, et al., 2013). A pesar de todo, los mecanismos por los cuales los microorganismos contribuyen al proceso de carcinogénesis sigue siendo objeto de estudio.

Como ya sabemos, la población microbiana intestinal se caracteriza por ser heterogénea y compleja, además de desempeñar un importante papel en la regulación de distintos procesos metabólicos en el hombre, por lo que supone un elemento básico en el mantenimiento de las condiciones fisiológicas normales a nivel intestinal (Nicholson, Holmes, & Wilson, 2005).

Entre los principales procesos fisiológicos que median la interacción huésped-microbio se encuentran la estimulación de sistema inmune y la expresión génica (Turner, Ritchie, Bresalier, & Chapkin, 2013). De ahí la importancia de cómo cambios en la estructura microbiana pueden desencadenar el desarrollo y progresión de ciertas enfermedades intestinales.

Tiempo atrás, mediante el empleo de cultivos tradicionales, ya se demostró la asociación entre la presencia de ciertas especies microbianas y el CCR. Hoy en día, gracias al desarrollo de nuevas técnicas de pirosecuenciación del gen 16S rRNA, nos permite caracterizar en profundidad las diferentes comunidades microbianas. Para poder obtener una caracterización representativa de la microbiota intestinal es importante seleccionar adecuadamente la región hipervariable del gen 16S rRNA (Kumar, Brooker, Dowd, & Camerlengo, 2011).

En estudios basados en metagenómica, se recomienda la amplificación de las regiones hipervariables V1-V3 del gen rRNA 16S, cuyos resultados se han visto que son compatibles con los obtenidos anteriormente por otros métodos más clásicos como la secuenciación por Sanger (Huse et al., 2008; Zhang et al., 2009). De igual forma, para nuestro estudio optamos por esta misma región del gen 16S rRNA.

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 (Kostic, Chun, Robertson, et al., 2013; Vippera & O'Keefe, 2012), y cómo ciertas bacterias intestinales están implicadas en la patogénesis del CCR (Sobhani et al., 2013; Sobhani et al., 2011; N. Wu et al., 2013). Es interesante señalar que el intestino delgado, a pesar de tener mucha más superficie epitelial que el intestino grueso, no es una localización frecuente de cáncer y en cambio sí lo es en el colon (Siegel et al., 2014), donde el número de bacterias es aproximadamente diez mayor que en el intestino delgado.

Por otro lado, se ha podido determinar alteraciones en la composición microbiana en pacientes diagnosticados de EII con mayor riesgo de desarrollo de CCR, alteraciones en la composición microbiana (Bibiloni, Mangold, Madsen, Fedorak, & Tannock, 2006).

A pesar de todas estas evidencias, la relación entre el tipo de microbiota y las diferentes localizaciones dentro del TGI, al igual que la posible asociación que puede haber entre la microbiota y el tipo histológico del cáncer colorrectal permanecen desconocidos.

El objetivo fundamental de esta tesis doctoral ha sido analizar la relación que existe entre el CCR y la presencia de diferentes microorganismos que forman parte de nuestra microbiota gastrointestinal. Por ello analizamos la composición bacteriana del lumen intestinal en diferentes supuestos, sirviéndonos de la plataforma de secuenciación 454 Roche. De este modo identificamos diferentes patrones microbianos intestinales entre muestras de tejido normal y tumoral de pacientes con CCR, así como en muestras de heces de pacientes sanos y enfermos.

### **Alteración de la composición microbiana en muestras de mucosa de pacientes con CCR, así como en muestras de heces de pacientes sanos y con CCR.**

En el análisis diferencial de la microbiota, observamos cómo el tejido tumoral de pacientes con CCR presentaba una mayor diversidad microbiana que las muestras adyacentes de tejido normal. Del mismo modo, las muestras de heces de pacientes con CCR fueron más diversas que las provenientes de pacientes sanos. Este hecho es contradictorio con lo que habitualmente sucede en otros tejidos que sufren una alteración a causa de una colonización bacteriana, ya que poseen menos biodiversidad bacteriana que en condiciones normales. Este hecho debe ser interpretado como que los tejidos afectados son colonizados por un número reducido de microorganismos que prosperan en unas condiciones que le son favorables a expensas de que muchas otras especies microbianas no se adapten a estos nuevos cambios.

Este aumento de la diversidad microbiana en muestras tumorales respecto de los tejidos normales ya ha sido descrito anteriormente (Geng, Fan, Tang, Zhai, & Zhang, 2013) y podría ser la consecuencia del estado de inmunotolerancia generado por el tumor o por la intensa irrigación de los tumores, que puede enriquecer el tejido en nutrientes, apoyando una mayor diversidad microbiana.

Varios estudios han logrado observar diferencias significativas en la microbiota intestinal entre pacientes sanos y enfermos (Wei et al., 2010). Una de las limitaciones que muestra nuestro estudio es no incluir muestras de mucosa normal de pacientes sanos, pero si analizamos muestras normales de pacientes con CCR, que nos indican los procesos proinflamatorios que se desarrollan en estos tejidos a consecuencia de un predominio de bacterias de tipo *driver*. De este modo, en nuestro estudio hemos identificado en muestras de tejido tumoral una mayor abundancia de *Fusobacteria* y una disminución de

*Bacteroidetes*, a diferencia de lo observado en muestras de tejido normal donde predominaron *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia*. Estos resultados están de acuerdo con hallazgos encontrados por otros autores (T. Wang et al., 2012). Además, también se ha informado de una reducción significativa del filo *Bacteroidetes* en pacientes que presentan enfermedades inflamatorias del intestino, tales como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa con factores de riesgo para el desarrollo del CCR (Frank et al., 2007; Ott et al., 2004).

Una de las principales consecuencias que conlleva el desequilibrio de la composición microbiana intestinal es el aumento significativo de una variedad de enteropatógenos oportunistas que pueden desencadenar mecanismos carcinogénicos, tales como la producción de toxinas oncogénicas o la inducción de la inflamación (D. Collins, Hogan, & Winter, 2011). Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, son capaces de provocar un estado de inflamación basal de bajo grado o 'endotoxemia metabólica', debido a la producción continua del lipopolisacárido, un glicolípido derivado de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas (Cani, Osto, Geurts, & Everard, 2012). Nuestros datos confirman estos hallazgos ya que los géneros *Escherichia/Shigella*, *Citrobacter*, *Salmonella* y *Akkermansia*, mostraron una mayor abundancia en el tejido normal y de éste modo favorecerán el desarrollo de estados inflamatorios y de hiperproliferación celular, gracias a la producción de genotoxinas que contribuyen a la acumulación de mutaciones.

Varios estudios han informado del papel que desempeñan ciertas bacterias implicadas en la degradación de mucina, tales como *A. muciniphila* (filo *Verrucomicrobia*) en la patogénesis de enfermedades inflamatorias intestinales (Shih & Targan, 2008). Nosotros encontramos una abundancia significativamente mayor de *A. muciniphila* en muestras de tejidos sanos respecto a los tejidos tumorales de pacientes con CCR, (1% vs 0.23%,  $p=0.0392$ ) así como en muestras de heces de pacientes con CCR donde fue predominantemente mayor respecto a las de pacientes sanos (7.96% vs 0.64%). De acuerdo con nuestros resultados, un reciente estudio mostró como *A. muciniphila* se encontraba cuatro veces más representada en pacientes con CCR ( $p<0,01$ ) que en pacientes del grupo control (Weir et al., 2013).

Además otras bacterias enteropatógenas como *E. coli* poseen la capacidad de regular negativamente la producción de proteínas reparadoras del ADN, promoviendo de este modo la tumorigénesis en el colon (Maddocks, Short, Donnenberg, Bader, & Harrison,

2009). De hecho, ciertos autores han encontrado un aumento de la expresión de hemaglutinina por la bacteria *E. coli* en la enfermedad de Crohn y pacientes con CCR en comparación con los controles sanos (Martin et al., 2004). En base a lo anteriormente expuesto, observamos un aumento significativo de *E. coli* y de otras enterobacterias en muestras de tejido normal adyacente, lo que sugiere que pueden participar en el desencadenamiento de procesos proinflamatorios iniciales en pacientes con CCR.

Por otro lado, se ha podido comprobar como *Streptococcus bovis* es capaz de promover en ratas la progresión de lesiones preneoplásicas aumentando la proliferación celular y la producción de interleucina-8 (Ellmerich et al., 2000). Otros autores pudieron demostrar como inyectando los antígenos de *S. bovis* en células Caco-2 (células epiteliales humanas de adenocarcinoma colorrectal) eran capaces de promover la carcinogénesis mediante la sobreexpresión de la ciclooxigenasa-2 (Biaric et al., 2004). En nuestro estudio, pudimos observar cómo el género *Streptococcus* se encontraba en una mayor abundancia en muestras de adenoma respecto a los tejidos normales y tumorales (6.68% vs 0.35% vs 1.1% respectivamente  $p= 0.03$ ), lo que puede ser explicado como que se trata de una bacteria que posee un importante poder en el desarrollo inicial de los tumores, además de seguir participando en la progresión de los mismos. Estos datos nos sugieren que una mayor presencia de este grupo podría ser un buen biomarcador para detectar pólipos y un factor de riesgo en el desarrollo del CCR.

Otros estudios muestran como el género *Bacteroides* presenta mayores tasas de colonización en pacientes con CCR (Sobhani et al., 2011; T. Wang et al., 2012), lo que podría estar relacionado con la producción de fragilisina, una toxina bacteriana oncogénica (N. Wu et al., 2013). La fragilisina estimula a las células epiteliales intestinales a secretar interleucina-8, lo que resulta en una respuesta inflamatoria y un aumento de la secreción de fluido intestinal (Kim, Oh, Kim, Oh, & Cho, 2001; Sanfilippo et al., 2000). Además de los efectos inflamatorios, ésta toxina es capaz de inducir la proliferación de células epiteliales del colon así como la expresión del oncogén c-Myc (S. Wu et al., 2003). Esta cepa enterotoxigénica de *B. fragilis* también ha demostrado inducir tumores de colon en varios experimentos con ratones (S. Wu et al., 2009). En relación a lo anterior, nosotros observamos como este género presentó mayores porcentajes de abundancia relativa en muestras de tejido normal y adenomatoso (35.74%, 38.36%) que en el tejido tumoral (32.37%). Esta mayor representación en este tipo de

muestras nos llevar a pensar su posible participación en las fases más primarias del desarrollo tumoral.

Por tanto, con base en nuestros resultados y en los estudios anteriormente citados sugerimos que los *Akkermansia*, *Streptococcus*, *Escherichia/Shigella* y *Bacteroides* actúan como bacterias drivers o conductoras pues su abundancia en muestras normales de tejido adyacente al tumor se encuentra aumentada en respecto al tejido tumoral. La capacidad toxigénica de estas bacterias resalta su actividad como agentes potencialmente carcinogénicos.

Siguiendo el modelo de *Tjasma et al.*, una vez iniciado el proceso carcinogénico por las bacterias de tipo *driver*, generalmente enterobacterias con actividad proinflamatoria, éstas quedaran desplazadas por bacterias *passenger* las cuales están involucradas en la progresión del CCR (Harold Tjalsma et al., 2012). De acuerdo a lo anteriormente expuesto, encontramos un aumento de bacterias en muestras de tejido tumoral tales como *Fusobacterium*, *Porphyromonas* y *Enterococcus* que contribuyen a la progresión del CCR, a diferencia de lo observado en muestras de tejido normal.

Numerosos estudios muestran la capacidad *E. faecalis* de producir superóxido extracelular en altas cantidades, lo que induce daños en el ADN celular tanto *in vitro* como *in vivo* (Huycke et al., 2002; Huycke & Moore, 2002). Otros autores han mostrado cómo su abundancia es significativamente mayor en pacientes con CCR que en sujetos sanos (Balamurugan, Rajendiran, George, Samuel, & Ramakrishna, 2008). De acuerdo con estos datos, nosotros observamos un mayor aumento de este microorganismo en muestras de tejido tumoral respecto a las muestras de tejidos normales o adenomatosos (0.121% vs 0% vs 0.021%, respectivamente). Por otra parte, en las muestras de tejido tumoral observamos como este microorganismo era más abundante en muestras tumorales con estadíos T1-T2 que en muestras tumorales con estadíos T3-4 (0.45% vs 0.01%), lo que sugiere que puede estar implicado en el desarrollo inicial del tumor

Varios estudios, muestran como el género *Fusobacterium* se encuentra vinculado al CCR (Castellarin et al., 2012; Kostic, Chun, Robertson, et al., 2013; Turner et al., 2013), pero el papel que desempeña en su progresión sigue siendo aún desconocido. Nuestras observaciones confirman esta tendencia, ya que encontramos de forma significativa una mayor presencia de *F. nucleatum* en muestras de mucosa tumoral en comparación con el grupo de muestras de mucosa normal (0.48% vs 10.51%, p=0.032). En línea con nuestros

resultados, otros autores confirmaron un aumento de la frecuencia de *Fusobacterium* en los tejidos tumorales en comparación con los tejidos sanos de sujetos control (Castellarin et al., 2012; Kostic, Chun, Robertson, et al., 2013; Kostic et al., 2012). Otros recientes estudios informan de una mayor presencia de *Fusobacterium* en muestras de adenoma y en muestras de heces de pacientes con adenoma y carcinoma respecto a las muestras de sujetos sanos (Kostic, Chun, Robertson, et al., 2013; Kostic et al., 2012; McCoy et al., 2013). Del mismo modo, observamos como *F. nucleatum* mostró diferencias de abundancia entre muestras de tejidos normales, adenomas y tumorales respecto a los tejidos sanos (0.48%, 1.65%, 10.51%, respectivamente), experimentando un aumento progresivo a lo largo de esta secuencia de tejidos. Sin embargo, a diferencia de lo publicado por otros autores, no encontramos un aumento significativo de *Fusobacterium* en la microbiota fecal de pacientes con CCR en comparación con los controles sanos, aunque sí encontramos una mayor abundancia de *A. muciniphila* en muestras fecales de pacientes con CCR respecto a las heces de pacientes sanos, aunque no de forma significativa. Por lo tanto, el presentar altas cantidades de *Fusobacterium* estaría relacionado con un alto riesgo de padecer CCR, por lo que constituye un importante biomarcador de carcinogénesis.

Por otro lado, encontramos que los altos niveles de *Fusobacterium* eran inversamente proporcionales a los de *Faecalibacterium*. Observamos una mayor presencia de esta bacteria en muestras de mucosa normal respecto a los tejidos adenomatosos y tumorales donde fue menos frecuente (4.04% vs 2.95% vs 2.25%, respectivamente). Del mismo modo, *F. prausnitzii* se encontró en altas cantidades en muestras de heces de pacientes sanos respecto a las provenientes de pacientes con CCR. En consonancia con nuestros datos, otros autores han informado que los niveles de *F. prausnitzii* disminuyeron significativamente en pacientes con CCR en comparación con sujetos sanos (Balamurugan et al., 2008; N. Wu et al., 2013). Curiosamente, encontramos en muestras de tejido tumoral un aumento significativo de *F. prausnitzii* conforme mayor es el estadio tumoral. En base a estos hallazgos, algunos autores comentan que el género *Faecalibacterium* podría experimentar un aumento de su abundancia en tumores puesto ejercen un perfil anticancerígeno, preservando así su nicho intestinal y prevenir la progresión rápida de la enfermedad. (Davis & Milner, 2009; Rusniok et al., 2010). Por lo tanto, las bacterias productoras de butirato ejercen un papel clave en la prevención del

CCR y *F. prausnitzii* constituye un importante biomarcador de estados saludables en el paciente.

### **Agentes microbianos relacionados con el desarrollo de la modalidad serrada en el CCR**

Varios estudios recientes muestran cómo el CS presenta un peor pronóstico que el CC, lo cual queda explicado por la presencia de algunos factores histológicos de pronóstico adverso tales como una mayor incidencia de la gemación tumoral y de pseudofragmentos citoplasmáticos de alto grado, patrón de crecimiento tumoral infiltrante y menor infiltrado linfoide en el frente invasivo que el grupo de CC (García-Solano et al., 2012).

Debido a la gran cantidad de estudios que apoyan el papel de los microorganismos en el desarrollo del CCR, suscitó nuestro interés si la microbiota intestinal pudiera contribuir de algún modo al desarrollo de este tipo de cáncer. En cambio, tras llevar a cabo un proceso de revisión de la literatura, no hemos logrado encontrar ninguna publicación acerca de la implicación bacteriana en el desarrollo del CS, siendo el presente estudio el primero en evaluar si existe asociación entre la microbiota y el tipo histológico de CCR.

Según los datos obtenidos observamos que, como en cualquier tejido tumoral, el CS estaba constituido predominantemente por bacterias de tipo proinflamatorio, aunque sí mostró diferencias en cuanto a la composición y abundancia de algunos de los microorganismos con más implicación carcinogénica. Nos llamó notablemente la atención, la altísima sobrerrepresentación de *F. nucleatum* en muestras tumorales de CS a diferencia de lo observado en las de CC (15.66 % vs 4.15%,  $p=0.045$ ). Del mismo modo, encontramos un aumento significativo del género *Streptococcus* en este tipo de cáncer (1.45% vs 0.66%,  $p=0.013$ ). En base a estas observaciones, donde dos de los microorganismos más importantes en el proceso de la tumorigénesis por su alta capacidad de producir compuestos altamente oncogénicos se encuentran de forma significativa asociados al CS, nos lleva a pensar que podrían desempeñar algún papel en el desarrollo de esta modalidad de cáncer, así como explicar parcialmente el peor pronóstico asociado al CS. En el caso de *F. nucleatum*, produce una toxina llamada FadA que le permitan colonizar e invadir la superficie colónica, además de inducir proliferación celular mediante la activación de ciertos oncogenes (Irrazábal et al., 2014). Del mismo modo, *S. galloliticus* (anteriormente conocido como *S. bovis* biotipo I) es un importante componente del género *Streptococcus* relacionado con procesos carcinogénicos. (Klein et al., 1977). Un reciente meta-análisis mostró como alrededor del 43% de los pacientes

infectados por *S. gallolyticus subsp. gallolyticus* (la mayoría de los cuales tenían endocarditis) habían desarrollado adenomas, mientras el 18% desarrollaron carcinomas, datos que son sustancialmente más altos que los encontrados en la población general (Boleij, van Gelder, Swinkels, & Tjalsma, 2011).

Por lo tanto, la presencia de esta bacteria puede ser una señal de malignidad colónica (que es a menudo asintomática en las primeras etapas) y debe ser considerado como un marcador necesario en el exámen del intestino completo (Boleij et al., 2012; H Tjalsma & Boleij, 2012).

El género *Streptococcus* presenta una baja capacidad de colonización del epitelio intestinal, ya que no posee mecanismos para romper la pared intestinal de colon intacto (Klein et al., 1977). Sin embargo, cuando la pared del epitelio se encuentra distorsionada en el caso de adenomas o carcinomas, *S. gallolyticus subsp. gallolyticus* es capaz de acceder a las fibras de colágeno por las que poseen una alta afinidad (Boleij, Muytjens, et al., 2011). Por otra parte, la cápsula de polisacárido de *S. gallolyticus subsp. gallolyticus* puede ayudar en la evasión de la respuesta inmune innata, lo que le permite entrar y sobrevivir inadvertido en el torrente sanguíneo (Rusniok et al., 2010; Vanrobaeys, De Herdt, Charlier, Ducatelle, & Haesebrouck, 1999). Ésta última observación, se relaciona con el hecho de que una de las características que presenta el CS es su capacidad de desarrollar una menor respuesta inmune frente al tumor, lo que permite la formación de un frente invasor muy activo que favorece la movilidad de las células tumorales a través del tejido conjuntivo. De este modo, tanto *F. nucleatum* como *S. gallolyticus subsp. gallolyticus* podrían contribuir al desarrollo de ésta modalidad de adenocarcinoma de colon de peor comportamiento clínico.

Por otro lado, en base a nuestros resultados observamos como los géneros bacterianos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (*Escherichia/Shigella*, *Citrobacter*, *Salmonella* y *Enterobacter*) fueron más prevalentes en el grupo del CS, aunque no de forma significativa, lo que se puede traducir en que estos tejidos están sometidos a un mayor grado de inflamación, lo cual se correlaciona con procesos carcinogénicos.

### **Representación asimétrica de la microbiota entre colon distal y proximal.**

En cuanto a la localización del tumor, existen estudios recientes que informan de un aumento en la incidencia del número de casos con CCR en localización proximal y de la activación de una serie de rutas moleculares diferentes a las presentes en el CCR de localización distal. En este sentido, los CCR de localización proximal suelen presentar con más frecuencia inestabilidad de microsatélites de alto grado (MSI-H), mutaciones en el oncogén BRAF y fenómenos de metilación aberrante de las islas CpG en la regiones promotoras de los genes (fenotipo CIMP). Por su parte el CCR distal suele ser estable para microsatélites (MSS), presentar las mutaciones en el oncogén KRAS y no presentar fenotipo CIMP (Minoo, Zlobec, Peterson, Terracciano, & Lugli, 2010). Teniendo en cuenta los antecedentes de, que las poblaciones microbianas ejercen un importante efecto en el desarrollo del CCR junto a que son entidades dinámicas en el espacio y tiempo marcadas por las características microambientales de su nicho ecológico, nos planteamos la posibilidad de que exista una asimetría en la distribución bacteriana a lo largo del colon que explique la diferencia de casos de CCR entre ambas localizaciones, ya que, tal vez la microbiota sea uno de los principales factores diferenciales con propiedades carcinogénicas entre colon derecho e izquierdo. Por tanto esta hipótesis estaría apoyada por nuestros resultados donde observamos diferentes patrones microbianos entre colon proximal y distal. De este modo encontramos un aumento de la microbiota inflamatoria de tipo *driver* a nivel proximal del colon, lo cual favorecería estados proinflamatorios que aumentarían el riesgo de desarrollo de CCR a dicho nivel.

Cuando comparamos el perfil microbiano entre muestras tumorales de diferente localización anatómica, observamos que las muestras tumorales de localización distal mostraron una mayor frecuencia de los géneros *Fusobacterium*, *Phorphyromonas*, *Campylobacter* y *Enterococcus* aunque no de forma significativa. En cambio, la zona proximal mostró un predominio significativo de otros géneros bacterianos tales como *Haemophilus*, *Prevotella* y *Blautia*. Algunos autores informan cómo las especies *Clostridium coccoides* y *Clostridium leptum* (reclasificados como *Blautia coccoides*) se han encontrado estrechamente relacionados con la poliposis y el CCR (Scanlan et al., 2008). Otros estudios también han observado una mayor presencia de *B. coccoides* y del género *Prevotella* en muestras de mucosa de pólipos y tejido tumoral respecto a los tejidos sanos (Mira-Pascual et al., 2014a). Por otro lado, si analizamos el tejido normal de

pacientes con CCR, observamos que en el lado proximal existió un predominio de los géneros *Escherichia/Shigella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Aeromonas*, *Enterobacter* y *Klebsiella* así como de los géneros bacterianos con propiedades antiinflamatorias, tales como *Faecalibacterium*, *Lachnospiraceae* y *Ruminococcus*, lo que sugiere una mayor actividad inflamatoria en esta localización.

De este modo podemos concluir que ambas localizaciones presentan configuraciones microbianas diferentes, estando la zona proximal marcada por un predominio de bacterias tipo *driver* que desencadenan un estado de inflamación crónico que mantenido en el tiempo puede explicar de forma parcial un aumento en la incidencia de casos en el lado derecho. Por el contrario la mucosa tumoral distal es rica en microorganismos que claramente se asocian al desarrollo del CCR, lo cual podría explicar el predominio de CCR a nivel distal.

En resumen, hemos encontrado diferentes perfiles de diversidad microbiana entre muestras de tejido sano y tumoral, así como en muestras de heces de pacientes sanos y con CCR. Además, hemos conseguido establecer diferencias en cuanto a la composición microbiana entre los diferentes tipos y localizaciones del CCR. Por otro lado, encontramos una marcada disbiosis microbiana entre las distintas muestras objeto de estudio: tejido normal-adenoma-tejido tumoral, para lo que encontramos géneros o incluso especies bacterianas que muestran una asociación significativa a cada grupo, sugiriendo la posible utilidad de biomarcadores de la enfermedad. Nuestro estudio mostró que los géneros *Fusobacterium* y *Streptococcus*, pueden considerarse como potenciales marcadores para la detección temprana del CCR así como para diseñar estrategias preventivas basadas en la administración de cepas probióticas capaces de corregir esta disbiosis.



## **VI. CONCLUSIONES**

---



A partir de los resultados obtenidos en nuestro estudio, presentamos las siguientes conclusiones:

1. En muestras de pacientes con CCR, encontramos una alta abundancia de bacterias con actividad proinflamatoria, siendo *F. nucleatum* la bacteria más predominante en tejido tumoral mientras que *A. muciniphila* aparece en mayor abundancia en tejido normal.
2. El adenocarcinoma de tipo serrado mostró una composición bacteriana diferente respecto al de tipo convencional, destacando la sobrerrepresentación de *F. nucleatum* y *Streptococcus*. en este tipo de tumor
3. Los tumores con estadios T3-T4, presentaron un perfil microbiano caracterizado fundamentalmente por bacterias de tipo *passengers*, ya sea con actividad proinflamatoria como *F. nucleatum* o de actividad antiinflamatoria como *F. prausnitzii*.
4. En cuanto a la localización anatómica del tejido tumoral, encontramos diferentes perfiles microbianos entre el colon distal y proximal, destacando un aumento considerable de miembros de la familia *Enterobacteriaceae* en el colon proximal y un claro predominio de los géneros *Fusobacterium*, *Enterococcus* y *Porphyromonas* en el colon distal.
5. Según la secuencia tejido normal - adenoma – tejido tumoral, observamos una sucesión bacteriana marcada por un predominio inicial de bacterias *driver* como *Streptococcus* y finalmente por bacterias de tipo *passenger* como *F. nucleatum*.
6. Las muestras de heces de pacientes con CCR presentaron como principal biomarcador *A. muciniphila*, a diferencia de lo observado en muestras de pacientes sanos donde predominó fundamentalmente *F. prausnitzii*.

7. Las diferencias observadas en las poblaciones bacterianas entre distintas localizaciones, variantes histológicas de CCR y estadios de la enfermedad constituyen el fundamento para estudios que establezcan la relación causa-efecto de la microbiota en el proceso de carcinogénesis colorrectal y que evalúen el efecto de medidas correctoras de la disbiosis tales como el tratamiento con probióticos.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

---



- Abreu, M. T., & Peek, R. M. (2014). Gastrointestinal malignancy and the microbiome. *Gastroenterology*, *146*(6), 1534-1546. e1533.
- Ahlquist, D., & Pasha, T. (2003). Clinical aspects of sporadic colorectal cancer. *Gastrointestinal cancers. Philadelphia: Saunders*, 379-405.
- Ahmed, S., Macfarlane, G. T., Fite, A., McBain, A. J., Gilbert, P., & Macfarlane, S. (2007). Mucosa-associated bacterial diversity in relation to human terminal ileum and colonic biopsy samples. *Applied and environmental microbiology*, *73*(22), 7435-7442.
- Alberts, D. S., Martínez, M. E., Roe, D. J., Guillén-Rodríguez, J. M., Marshall, J. R., van Leeuwen, J. B., . . . Bhattacharyya, A. (2000). Lack of effect of a high-fiber cereal supplement on the recurrence of colorectal adenomas. *New England Journal of Medicine*, *342*(16), 1156-1162.
- Allen, I. C., Wilson, J. E., Schneider, M., Lich, J. D., Roberts, R. A., Arthur, J. C., . . . Herfarth, H. H. (2012). NLRP12 suppresses colon inflammation and tumorigenesis through the negative regulation of noncanonical NF- $\kappa$ B signaling. *Immunity*, *36*(5), 742-754.
- Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veeken, J., Liu, H., . . . Rudensky, A. Y. (2013). Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*, *504*(7480), 451-455.
- Arthur, J. C., Perez-Chanona, E., Mühlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J. M., Fan, T.-J., . . . Rogers, A. B. (2012). Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science*, *338*(6103), 120-123.
- Aust, D. E., Baretton, G. B., & Pathology, W. G. G.-P. o. t. G. S. o. (2010). Serrated polyps of the colon and rectum (hyperplastic polyps, sessile serrated adenomas, traditional serrated adenomas, and mixed polyps)—proposal for diagnostic criteria. *Virchows Archiv*, *457*(3), 291-297.
- Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., . . . Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(44), 15718-15723. doi: 10.1073/pnas.0407076101
- Balamurugan, R., Rajendiran, E., George, S., Samuel, G. V., & Ramakrishna, B. S. (2008). Real-time polymerase chain reaction quantification of specific butyrate-producing bacteria, *Desulfovibrio* and *Enterococcus faecalis* in the feces of patients with colorectal cancer. *Journal of gastroenterology and hepatology*, *23*(8pt1), 1298-1303.
- Barnetson, R. A., Devlin, L., Miller, J., Farrington, S., Slater, S., Drake, A., . . . Porteous, M. (2007). Germline mutation prevalence in the base excision repair gene, MYH, in patients with endometrial cancer. *Clinical genetics*, *72*(6), 551-555.
- Bartkova, J., Rezaei, N., Lontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., . . . Zoumpourlis, V. C. (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*, *444*(7119), 633-637.
- Bashir, M., Kingston, D., Carman, R., Van Tassell, R., & Wilkins, T. (1987). Anaerobic metabolism of 2-amino-3-methyl-3H-imidazo [4, 5-f] quinoline (IQ) by human fecal flora. *Mutation Research Letters*, *190*(3), 187-190.
- Bautista, R. (2010). Las tres generaciones de la secuenciación. *Encuentros en la Biología*, *3*(128), 4.
- Benson, A. K., Kelly, S. A., Legge, R., Ma, F., Low, S. J., Kim, J., . . . Pomp, D. (2010). Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(44), 18933-18938. doi: 10.1073/pnas.1007028107

- Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H. P., Smith, G. P., Milton, J., Brown, C. G., . . . Bignell, H. R. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, *456*(7218), 53-59.
- Berrino, F., De Angelis, R., Sant, M., Rosso, S., Lasota, M. B., Coebergh, J. W., . . . Group, E. W. (2007). Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995–99: results of the EUROCARE-4 study. *The lancet oncology*, *8*(9), 773-783.
- Biagi, E., Candela, M., Fairweather-Tait, S., Franceschi, C., & Brigidi, P. (2012). Ageing of the human metaorganism: the microbial counterpart. *Age (Dordr)*, *34*(1), 247-267.
- Biarc, J., Nguyen, I. S., Pini, A., Gossé, F., Richert, S., Thiersé, D., . . . Klein, J.-P. (2004). Carcinogenic properties of proteins with pro-inflammatory activity from *Streptococcus infantarius* (formerly *S. bovis*). *Carcinogenesis*, *25*(8), 1477-1484.
- Bibiloni, R., Mangold, M., Madsen, K. L., Fedorak, R. N., & Tannock, G. W. (2006). The bacteriology of biopsies differs between newly diagnosed, untreated, Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *Journal of medical microbiology*, *55*(8), 1141-1149.
- Bingham, S. (2000). Diet and colorectal cancer prevention. *Biochemical Society Transactions*, *28*(2), 12-16.
- Blaser, M. J., & Falkow, S. (2009). What are the consequences of the disappearing human microbiota? *Nature Reviews Microbiology*, *7*(12), 887-894.
- Bliska, J. B., & van der Velden, A. W. (2012). Salmonella “sops” up a preferred electron receptor in the inflamed intestine. *MBio*, *3*(4), e00226-00212.
- Bokemeyer, C., Bondarenko, I., Makhson, A., Hartmann, J. T., Aparicio, J., de Braud, F., . . . Stroh, C. (2009). Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology*, *27*(5), 663-671.
- Boleij, A., Muytjens, C. M., Bukhari, S. I., Cayet, N., Glaser, P., Hermans, P. W., . . . Tjalsma, H. (2011). Novel clues on the specific association of *Streptococcus gallolyticus* subsp *gallolyticus* with colorectal cancer. *Journal of Infectious Diseases*, *203*(8), 1101-1109.
- Boleij, A., Roelofs, R., Danne, C., Bellais, S., Dramsi, S., Kato, I., & Tjalsma, H. (2012). Selective antibody response to *Streptococcus gallolyticus* pilus proteins in colorectal cancer patients. *Cancer Prevention Research*, *5*(2), 260-265.
- Boleij, A., & Tjalsma, H. (2013). The itinerary of *Streptococcus gallolyticus* infection in patients with colonic malignant disease. *The Lancet Infectious Diseases*, *13*(8), 719-724.
- Boleij, A., van Gelder, M. M., Swinkels, D. W., & Tjalsma, H. (2011). Clinical importance of *Streptococcus gallolyticus* infection among colorectal cancer patients: systematic review and meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*, *53*(9), 870-878.
- Bonithon-Kopp, C., Kronborg, O., Giacosa, A., R ath, U., Faivre, J., & Group, E. C. P. O. S. (2000). Calcium and fibre supplementation in prevention of colorectal adenoma recurrence: a randomised intervention trial. *The Lancet*, *356*(9238), 1300-1306.
- Boring, C. C., Squires, T. S., Tong, T., & Montgomery, S. (1994). Cancer statistics, 1994. *CA: a cancer journal for clinicians*, *44*(1), 7-26.
- Boyer, L., Magoc, L., DeJardin, S., Cappillino, M., Paquette, N., Hinault, C., . . . Hennessy, E. (2011). Pathogen-derived effectors trigger protective immunity via activation of the Rac2 enzyme and the IMD or Rip kinase signaling pathway. *Immunity*, *35*(4), 536-549.

- Buc, E., Dubois, D., Sauvanet, P., Raisch, J., Delmas, J., Darfeuille-Michaud, A., . . . Bonnet, R. (2013). High prevalence of mucosa-associated *E. coli* producing cyclomodulin and genotoxin in colon cancer. *PLoS One*, 8(2), e56964.
- Caderni, G., De Filippo, C., Luceri, C., Salvadori, M., Giannini, A., Biggeri, A., . . . Dolara, P. (2000). Effects of black tea, green tea and wine extracts on intestinal carcinogenesis induced by azoxymethane in F344 rats. *Carcinogenesis*, 21(11), 1965-1969.
- Calle, E. E., & Kaaks, R. (2004). Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nature Reviews Cancer*, 4(8), 579-591.
- Candela, M., Biagi, E., Maccaferri, S., Turrone, S., & Brigidi, P. (2012). Intestinal microbiota is a plastic factor responding to environmental changes. *Trends in microbiology*, 20(8), 385-391.
- Candela, M., Biagi, E., Turrone, S., Maccaferri, S., Figini, P., & Brigidi, P. (2013). Dynamic efficiency of the human intestinal microbiota. *Crit Rev Microbiol*(0), 1-7.
- Candela, M., Biagi, E., Turrone, S., Maccaferri, S., Figini, P., & Brigidi, P. (2013). Dynamic efficiency of the human intestinal microbiota. *Crit Rev Microbiol*, 1-7. doi: 10.3109/1040841X.2013.813900
- Candela, M., Guidotti, M., Fabbri, A., Brigidi, P., Franceschi, C., & Fiorentini, C. (2011). Human intestinal microbiota: cross-talk with the host and its potential role in colorectal cancer. *Crit Rev Microbiol*, 37(1), 1-14.
- Candela, M., Turrone, S., Biagi, E., Carbonero, F., Rampelli, S., Fiorentini, C., & Brigidi, P. (2014). Inflammation and colorectal cancer, when microbiota-host mutualism breaks. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(4), 908.
- Cani, P. D., & Delzenne, N. M. (2009). The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des*, 15(13), 1546-1558.
- Cani, P. D., Osto, M., Geurts, L., & Everard, A. (2012). Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut microbes*, 3(4), 279-288.
- Carballal, S., Moreira, L., & Balaguer, F. (2013). Pólipos serrados y síndrome de poliposis serrada. *Cirugía Española*, 91(3), 141-148.
- Castellarin, M., Warren, R. L., Freeman, J. D., Dreolini, L., Krzywinski, M., Strauss, J., . . . Moore, R. A. (2012). *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome research*, 22(2), 299-306.
- Catalán, V., Honorato, B., García, F., Bandrés, E., Zabalegui, N., Zárata, R., . . . García-Foncillas, D. (2003). Carcinogénesis colónica: proceso de transformación neoplásica. *Rev Med Univ Navarra*, 47(1), 15-19.
- Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*, 148(6), 1258-1270. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.035
- Colella, J. A., Llinás, M. P., & Colella, C. A. (2010). Estadificación del cáncer de recto. *Radiología*, 52(1), 18-29.
- Collins, D., Hogan, A. M., & Winter, D. C. (2011). Microbial and viral pathogens in colorectal cancer. *The lancet oncology*, 12(5), 504-512.
- Collins, S. M., & Bercik, P. (2009). The relationship between intestinal microbiota and the central nervous system in normal gastrointestinal function and disease. *Gastroenterology*, 136(6), 2003-2014. doi: 10.1053/j.gastro.2009.01.075
- Collins, S. M., & Bercik, P. (2013). Gut microbiota: Intestinal bacteria influence brain activity in healthy humans. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 10(6), 326-327. doi: 10.1038/nrgastro.2013.76

- Compton, C. C., & Greene, F. L. (2004). The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond. *CA: a cancer journal for clinicians*, 54(6), 295-308.
- Consortium, H. M. P. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207-214.
- Conway, P. L. (1995). Microbial ecology of the human large intestine. *Human colonic bacteria: role in nutrition, physiology and pathology*, 1-24.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17(10), 1195-1214.
- Corr, S. C., Li, Y., Riedel, C. U., O'Toole, P. W., Hill, C., & Gahan, C. G. (2007). Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(18), 7617-7621.
- Couturier-Maillard, A., Secher, T., Rehman, A., Normand, S., De Arcangelis, A., Haesler, R., . . . Delanoye-Crespin, A. (2013). NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer. *The Journal of clinical investigation*, 123(2), 700.
- Cuevas-Ramos, G., Petit, C. R., Marcq, I., Boury, M., Oswald, E., & Nougayrède, J.-P. (2010). *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(25), 11537-11542.
- Czito, B. G., Bendell, J. C., Willett, C. G., Morse, M. A., Blobe, G. C., Tyler, D. S., . . . Ashton, J. (2007). Bevacizumab, oxaliplatin, and capecitabine with radiation therapy in rectal cancer: Phase I trial results. *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*, 68(2), 472-478.
- Chan, T. L., Zhao, W., Leung, S. Y., & Yuen, S. T. (2003). BRAF and KRAS mutations in colorectal hyperplastic polyps and serrated adenomas. *Cancer research*, 63(16), 4878-4881.
- Chen, G. Y., Liu, M., Wang, F., Bertin, J., & Núñez, G. (2011). A functional role for Nlrp6 in intestinal inflammation and tumorigenesis. *The Journal of Immunology*, 186(12), 7187-7194.
- Chen, W., Liu, F., Ling, Z., Tong, X., & Xiang, C. (2012). Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PLoS One*, 7(6), e39743.
- Cheng, H., Bjercknes, M., & Amar, J. (1984). Methods for the determination of epithelial cell kinetic parameters of human colonic epithelium isolated from surgical and biopsy specimens. *Gastroenterology*, 86(1), 78-85.
- Christl, S. U., Murgatroyd, P. R., Gibson, G. R., & Cummings, J. H. (1992). Production, metabolism, and excretion of hydrogen in the large intestine. *Gastroenterology*, 102(4 Pt 1), 1269-1277.
- Davila, R. E., Rajan, E., & Baron, T. H. (2006). ASGE guideline: colorectal cancer screening and surveillance. *Gastrointestinal endoscopy*, 63(4), 546-557.
- Davis, C. D., & Milner, J. A. (2009). Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. *The Journal of nutritional biochemistry*, 20(10), 743-752.
- De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J. B., Massart, S., . . . Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(33), 14691-14696.

- De Kok, T., Van Maanen, J., Lankelma, J., Ten Hoor, F., & Kleinjans, J. (1992). Electron spin resonance spectroscopy of oxygen radicals generated by synthetic fecapentaene-12 and reduction of fecapentaene mutagenicity to *Salmonella typhimurium* by hydroxyl radical scavenging. *Carcinogenesis*, *13*(7), 1249-1255.
- Degriolamo, C., Modica, S., Palasciano, G., & Moschetta, A. (2011). Bile acids and colon cancer: Solving the puzzle with nuclear receptors. *Trends in molecular medicine*, *17*(10), 564-572.
- Deplancke, B., Finster, K., Graham, W. V., Collier, C. T., Thurmond, J. E., & Gaskins, H. R. (2003). Gastrointestinal and microbial responses to sulfate-supplemented drinking water in mice. *Experimental Biology and Medicine*, *228*(4), 424-433.
- Dethlefsen, L., Eckburg, P. B., Bik, E. M., & Relman, D. A. (2006). Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol Evol*, *21*(9), 517-523. doi: 10.1016/j.tree.2006.06.013
- Dethlefsen, L., & Relman, D. A. (2011). Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(Supplement 1), 4554-4561.
- Donohoe, D. R., Collins, L. B., Wali, A., Bigler, R., Sun, W., & Bultman, S. J. (2012). The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. *Mol Cell*, *48*(4), 612-626.
- Dressman, D., Yan, H., Traverso, G., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (2003). Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(15), 8817-8822.
- Dulal, S., & Keku, T. O. (2014). Gut microbiome and colorectal adenomas. *The Cancer Journal*, *20*(3), 225-231.
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., . . . Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, *308*(5728), 1635-1638.
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., . . . Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, *308*(5728), 1635-1638. doi: 10.1126/science.1110591
- Elinav, E., Strowig, T., Kau, A. L., Henao-Mejia, J., Thaiss, C. A., Booth, C. J., . . . Gordon, J. I. (2011). NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell*, *145*(5), 745-757.
- Ellmerich, S., Schöller, M., Durantou, B., Gossé, F., Galluser, M., Klein, J.-P., & Raul, F. (2000). Promotion of intestinal carcinogenesis by *Streptococcus bovis*. *Carcinogenesis*, *21*(4), 753-756.
- Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Cooke, M. S. (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *567*(1), 1-61.
- Fabbri, A., Travaglione, S., Ballan, G., Loizzo, S., & Fiorentini, C. (2013). The cytotoxic necrotizing factor 1 from *E. coli*: a janus toxin playing with cancer regulators. *Toxins*, *5*(8), 1462-1474.
- Faith, J. J., Guruge, J. L., Charbonneau, M., Subramanian, S., Seedorf, H., Goodman, A. L., . . . Leibel, R. L. (2013). The long-term stability of the human gut microbiota. *Science*, *341*(6141), 1237439.
- Falzano, L., Filippini, P., Travaglione, S., Miraglia, A. G., Fabbri, A., & Fiorentini, C. (2006). *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 blocks cell cycle G2/M transition in uroepithelial cells. *Infection and immunity*, *74*(7), 3765-3772.

- Fanning, S., Hall, L. J., Cronin, M., Zomer, A., MacSharry, J., Goulding, D., . . . Dougan, G. (2012). Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(6), 2108-2113.
- Fardini, Y., Wang, X., Témoïn, S., Nithianantham, S., Lee, D., Shoham, M., & Han, Y. W. (2011). Fusobacterium nucleatum adhesin FadA binds vascular endothelial cadherin and alters endothelial integrity. *Molecular microbiology*, *82*(6), 1468-1480.
- Femia, A. P., Luceri, C., Toti, S., Giannini, A., Dolara, P., & Caderni, G. (2010). Gene expression profile and genomic alterations in colonic tumours induced by 1, 2-dimethylhydrazine (DMH) in rats. *BMC Cancer*, *10*(1), 194.
- Fiorentini, C., Fabbri, A., Flatau, G., Donelli, G., Matarrese, P., Lemichez, E., . . . Boquet, P. (1997). Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1), a toxin that activates the Rho GTPase. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(31), 19532-19537.
- Frank, D. N., Amand, A. L. S., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N., & Pace, N. R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(34), 13780-13785.
- Fukata, M., Chen, A., Vamadevan, A. S., Cohen, J., Breglio, K., Krishnareddy, S., . . . Dannenberg, A. J. (2007). Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology*, *133*(6), 1869-1869. e1814.
- Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., . . . Suzuki, T. (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, *469*(7331), 543-547.
- Furet, J.-P., Firmesse, O., Gourmelon, M., Bridonneau, C., Tap, J., Mondot, S., . . . Corthier, G. (2009). Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS microbiology ecology*, *68*(3), 351-362.
- Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T. A., Nakato, G., Takahashi, D., . . . Kato, T. (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, *504*(7480), 446-450.
- García-Solano, J., Conesa-Zamora, P., Trujillo-Santos, J., Torres-Moreno, D., Mäkinen, M. J., & Pérez-Guillermo, M. (2012). Immunohistochemical expression profile of  $\beta$ -catenin, E-cadherin, P-cadherin, laminin-5 $\gamma$ 2 chain, and SMAD4 in colorectal serrated adenocarcinoma. *Hum Pathol*, *43*(7), 1094-1102.
- García-Solano, J., Pérez-Guillermo, M., Conesa-Zamora, P., Acosta-Ortega, J., Trujillo-Santos, J., Cerezuela-Fuentes, P., & Mäkinen, M. J. (2010). Clinicopathologic study of 85 colorectal serrated adenocarcinomas: further insights into the full recognition of a new subset of colorectal carcinoma. *Hum Pathol*, *41*(10), 1359-1368.
- García-Solano, J., Conesa-Zamora, P., Trujillo-Santos, J., Mäkinen, M. J., & Pérez-Guillermo, M. (2011). Tumour budding and other prognostic pathological features at invasive margins in serrated colorectal adenocarcinoma: a comparative study with conventional carcinoma. *Histopathology*, *59*(6), 1046-1056.
- Ge, Z., Rogers, A. B., Feng, Y., Lee, A., Xu, S., Taylor, N. S., & Fox, J. G. (2007). Bacterial cytolethal distending toxin promotes the development of dysplasia in a model of microbially induced hepatocarcinogenesis. *Cellular microbiology*, *9*(8), 2070-2080.

- Geng, J., Fan, H., Tang, X., Zhai, H., & Zhang, Z. (2013). Diversified pattern of the human colorectal cancer microbiome. *Gut Pathog*, 5(2).
- Gibson, G. (1990). Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 69(6), 769-797.
- Gill, C., & Rowland, I. (2002). Diet and cancer: assessing the risk. *British journal of nutrition*, 88(S1), s73-s87.
- Gill, H. (1998). Stimulation of the immune system by lactic cultures. *International Dairy Journal*, 8(5-6), 535-544.
- Greten, F. R., Eckmann, L., Greten, T. F., Park, J. M., Li, Z.-W., Egan, L. J., . . . Karin, M. (2004). IKK $\beta$  links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*, 118(3), 285-296.
- Grivennikov, S. I., Wang, K., Mucida, D., Stewart, C. A., Schnabl, B., Jauch, D., . . . Hung, K. E. (2012). Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature*, 491(7423), 254-258.
- Guarner, F., & Malagelada, J.-R. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet*, 361(9356), 512-519.
- Gupta, R. B., Harpaz, N., Itzkowitz, S., Hossain, S., Matula, S., Kornbluth, A., . . . Ullman, T. (2007). Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study. *Gastroenterology*, 133(4), 1099-1105.
- Hamilton, S., Vogelstein, B., Kudo, S., Riboli, E., Nakamura, S., Hainaut, P., . . . Winawer, S. (2000). Carcinoma of the colon and rectum. *Hamilton SR, Aaltonen LA. World Health Organization Classification of Tumours-Pathology and Genetics-Tumours of the Digestive System. 3rd ed. Lyon: IARC Press*, 105-143.
- Han, Y. W., Ikegami, A., Rajanna, C., Kawsar, H. I., Zhou, Y., Li, M., . . . Deng, C. X. (2005). Identification and characterization of a novel adhesin unique to oral fusobacteria. *Journal of bacteriology*, 187(15), 5330-5340.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- Hart, A., Stagg, A., Frame, M., Graffner, H., Glise, H., Falk, P., & Kamm, M. (2002). The role of the gut flora in health and disease, and its modification as therapy. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 16(8), 1383-1393.
- Haseman, J. H., Lemmel, G. T., Rahmani, E. Y., & Rex, D. K. (1997). Failure of colonoscopy to detect colorectal cancer: evaluation of 47 cases in 20 hospitals. *Gastrointestinal endoscopy*, 45(6), 451-455.
- Hatch, F. T., Knize, M. G., & Colvin, M. E. (2001). Extended quantitative structure-activity relationships for 80 aromatic and heterocyclic amines: structural, electronic, and hydrophobic factors affecting mutagenic potency. *Environmental and molecular mutagenesis*, 38(4), 268-291.
- Hayashi, H., Sakamoto, M., Kitahara, M., & Benno, Y. (2003). Molecular analysis of fecal microbiota in elderly individuals using 16S rDNA library and T-RFLP. *Microbiology and immunology*, 47(8), 557-570.
- Heald, R., & Moran, B. (1998). *Embryology and anatomy of the rectum*. Paper presented at the Seminars in surgical oncology.
- Heerdt, B. G., Houston, M. A., & Augenlicht, L. H. (1994). Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines. *Cancer research*, 54(12), 3288-3294.
- Hernández-Losa, J., Sanz, J., Landolfi, S., López-Ríos, F., Palacios, J., Bautista, M. D., . . . Ramón, S. (2012). Recomendaciones para la determinación de mutaciones de K-RAS en cáncer de colon. *Revista Española de Patología*, 45(2), 76-85.

- Hofheinz, R.-D., Horisberger, K., Woernle, C., Wenz, F., Kraus-Tiefenbacher, U., Kähler, G., . . . Post, S. (2006). Phase I trial of cetuximab in combination with capecitabine, weekly irinotecan, and radiotherapy as neoadjuvant therapy for rectal cancer. *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*, 66(5), 1384-1390.
- Holmes, E., Li, J. V., Athanasiou, T., Ashrafian, H., & Nicholson, J. K. (2011). Understanding the role of gut microbiome–host metabolic signal disruption in health and disease. *Trends in microbiology*, 19(7), 349-359.
- Hope, M. E., Hold, G. L., Kain, R., & El-Omar, E. M. (2005). Sporadic colorectal cancer—role of the commensal microbiota. *FEMS microbiology letters*, 244(1), 1-7.
- Horner, M., Ries, L., Krapcho, M., Neyman, N., Aminou, R., Howlader, N., . . . Mariotto, A. (2009). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006, National Cancer Institute. Bethesda, MD.
- Horst, D., Reu, S., Kriegl, L., Engel, J., Kirchner, T., & Jung, A. (2009). The intratumoral distribution of nuclear  $\beta$ -catenin is a prognostic marker in colon cancer. *Cancer*, 115(10), 2063-2070.
- Housseau, F., & Sears, C. L. (2010). Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF)-mediated colitis in Min (*Apc*<sup>+/-</sup>) mice: a human commensal-based murine model of colon carcinogenesis. *Cell Cycle*, 9(1), 3-5.
- Hu, B., Elinav, E., Huber, S., Booth, C. J., Strowig, T., Jin, C., . . . Flavell, R. A. (2010). Inflammation-induced tumorigenesis in the colon is regulated by caspase-1 and NLRC4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(50), 21635-21640.
- Hu, B., Elinav, E., Huber, S., Strowig, T., Hao, L., Hafemann, A., . . . Eisenbarth, S. C. (2013). Microbiota-induced activation of epithelial IL-6 signaling links inflammasome-driven inflammation with transmissible cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(24), 9862-9867.
- Huang, C. S., Farraye, F. A., Yang, S., & O'Brien, M. J. (2011). The clinical significance of serrated polyps. *The American journal of gastroenterology*, 106(2), 229-240.
- Hughes, R., Cross, A., Pollock, J., & Bingham, S. (2001). Dose-dependent effect of dietary meat on endogenous colonic N-nitrosation. *Carcinogenesis*, 22(1), 199-202.
- Huse, S. M., Dethlefsen, L., Huber, J. A., Welch, D. M., Relman, D. A., & Sogin, M. L. (2008). Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS Genet*, 4(11), e1000255.
- Huycke, M. M., Abrams, V., & Moore, D. R. (2002). *Enterococcus faecalis* produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis*, 23(3), 529-536.
- Huycke, M. M., & Gaskins, H. R. (2004). Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models. *Experimental Biology and Medicine*, 229(7), 586-597.
- Huycke, M. M., Joyce, W., & Wack, M. F. (1996). Augmented production of extracellular superoxide by blood isolates of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Infectious Diseases*, 173(3), 743-745.
- Huycke, M. M., Moore, D., Joyce, W., Wise, P., Shepard, L., Kotake, Y., & Gilmore, M. S. (2001). Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* requires demethylmenaquinone and is attenuated by functional terminal quinol oxidases. *Molecular microbiology*, 42(3), 729-740.

- Huycke, M. M., & Moore, D. R. (2002). In vivo production of hydroxyl radical by *Enterococcus faecalis* colonizing the intestinal tract using aromatic hydroxylation. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(6), 818-826.
- Ikegami, A., Chung, P., & Han, Y. W. (2009). Complementation of the *fadA* mutation in *Fusobacterium nucleatum* demonstrates that the surface-exposed adhesin promotes cellular invasion and placental colonization. *Infection and immunity*, 77(7), 3075-3079.
- Ilyas, M., Straub, J., Tomlinson, I., & Bodmer, W. (1999). Genetic pathways in colorectal and other cancers. *European Journal of Cancer*, 35(14), 1986-2002.
- Imperiale, T. F., Wagner, D. R., Lin, C. Y., Larkin, G. N., Rogge, J. D., & Ransohoff, D. F. (2000). Risk of advanced proximal neoplasms in asymptomatic adults according to the distal colorectal findings. *New England Journal of Medicine*, 343(3), 169-174.
- Irrazábal, T., Belcheva, A., Girardin, S. E., Martin, A., & Philpott, D. J. (2014). The multifaceted role of the intestinal microbiota in colon cancer. *Mol Cell*, 54(2), 309-320.
- Irving, M., & Catchpole, B. (1992). ABC of colorectal diseases. Anatomy and physiology of the colon, rectum, and anus. *Bmj*, 304(6834), 1106-1108.
- Jackman, R., & Mayo, C. W. (1951). The adenoma-carcinoma sequence in cancer of the colon. *Surgery, gynecology & obstetrics*, 93(3), 327-330.
- Jalanka-Tuovinen, J., Salonen, A., Nikkilä, J., Immonen, O., Kekkonen, R., Lahti, L., . . . de Vos, W. M. (2011). Intestinal microbiota in healthy adults: temporal analysis reveals individual and common core and relation to intestinal symptoms. *PLoS One*, 6(7), e23035.
- Jemal, A., & Siegel, R. (2011). Cancer Facts and Figures 2011. Atlanta, Georgia, USA: American Cancer Society, Inc.
- Jernberg, C., Löfmark, S., Edlund, C., & Jansson, J. K. (2007). Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J*, 1(1), 56-66.
- Kamada, N., & Núñez, G. (2014). Regulation of the immune system by the resident intestinal bacteria. *Gastroenterology*, 146(6), 1477-1488.
- Kassie, F., Rabot, S., Kundi, M., Chabicovsky, M., Qin, H.-M., & Knasmüller, S. (2001). Intestinal microflora plays a crucial role in the genotoxicity of the cooked food mutagen 2-amino-3-methylimidazo [4, 5-f] quinoline (IQ). *Carcinogenesis*, 22(10), 1721-1725.
- Keeney, K. M., & Finlay, B. B. (2011). Enteric pathogen exploitation of the microbiota-generated nutrient environment of the gut. *Curr Opin Microbiol*, 14(1), 92-98. doi: 10.1016/j.mib.2010.12.012
- Kim, J., Oh, Y., Kim, Y., Oh, H., & Cho, Y. (2001). Polarized secretion of CXC chemokines by human intestinal epithelial cells in response to *Bacteroides fragilis* enterotoxin: NF- $\kappa$ B plays a major role in the regulation of IL-8 expression. *Clinical & Experimental Immunology*, 123(3), 421-427.
- Klein, R. S., Recco, R. A., Catalano, M. T., Edberg, S. C., Casey, J. I., & Steigbigel, N. H. (1977). Association of *Streptococcus bovis* with carcinoma of the colon. *New England Journal of Medicine*, 297(15), 800-802.
- Koren, O., Goodrich, J. K., Cullender, T. C., Spor, A., Laitinen, K., Bäckhed, H. K., . . . Knight, R. (2012). Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell*, 150(3), 470-480.

- Koropatkin, N. M., Cameron, E. A., & Martens, E. C. (2012). How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol*, *10*(5), 323-335. doi: 10.1038/nrmicro2746
- Kostic, A. D., Chun, E., Meyerson, M., & Garrett, W. S. (2013). Microbes and inflammation in colorectal cancer. *Cancer immunology research*, *1*(3), 150-157.
- Kostic, A. D., Chun, E., Robertson, L., Glickman, J. N., Gallini, C. A., Michaud, M., . . . Hold, G. L. (2013). *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell host & microbe*, *14*(2), 207-215.
- Kostic, A. D., Gevers, D., Pedamallu, C. S., Michaud, M., Duke, F., Earl, A. M., . . . Taberero, J. (2012). Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome research*, *22*(2), 292-298.
- Kraus, S., & Arber, N. (2009). Inflammation and colorectal cancer. *Current opinion in pharmacology*, *9*(4), 405-410.
- Kumar, P. S., Brooker, M. R., Dowd, S. E., & Camerlengo, T. (2011). Target region selection is a critical determinant of community fingerprints generated by 16S pyrosequencing. *PLoS One*, *6*(6), e20956.
- Laiho, P., Kokko, A., Vanharanta, S., Salovaara, R., Sammalkorpi, H., Järvinen, H., . . . Davalos, V. (2007). Serrated carcinomas form a subclass of colorectal cancer with distinct molecular basis. *Oncogene*, *26*(2), 312-320.
- Lakatos, P. L., & Lakatos, L. (2008). Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: changes, causes and management strategies. *World journal of gastroenterology: WJG*, *14*(25), 3937.
- Lamas Díaz, M. J. (2012). Estudio farmacogenético del cáncer colorrectal.
- Lara-Tejero, M. a., & Galán, J. E. (2002). Cytolethal distending toxin: limited damage as a strategy to modulate cellular functions. *Trends in microbiology*, *10*(3), 147-152.
- Lares-Asseff, I., & Trujillo-Jiménez, F. (2001). La farmacogenética y su importancia en la clínica. *Gac Med Mex*, *137*(3), 227-236.
- Lax, A. J. (2005). Bacterial toxins and cancer—a case to answer? *Nature Reviews Microbiology*, *3*(4), 343-349.
- Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., . . . Kennedy, S. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, *500*(7464), 541-546.
- Lee, S. H., Hu, L.-L., Gonzalez-Navajas, J., Seo, G. S., Shen, C., Brick, J., . . . Lee, J. (2010). ERK activation drives intestinal tumorigenesis in *Apc<sup>min</sup>/+* mice. *Nature medicine*, *16*(6), 665-670.
- Leggett, B., & Whitehall, V. (2010). Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*, *138*(6), 2088-2100.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, *396*(6712), 643-649.
- Li, C., Guo, B., Bernabeu, C., & Kumar, S. (2001). Angiogenesis in breast cancer: the role of transforming growth factor  $\beta$  and CD105. *Microscopy research and technique*, *52*(4), 437-449.
- Lichtenstein, P., Holm, N. V., Verkasalo, P. K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., . . . Hemminki, K. (2000). Environmental and heritable factors in the causation of cancer—analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *New England Journal of Medicine*, *343*(2), 78-85.
- Lieberman, D. A., Weiss, D. G., Bond, J. H., Ahnen, D. J., Garewal, H., Harford, W. V., . . . Durbin, T. E. (2000). Use of colonoscopy to screen asymptomatic adults for colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, *343*(3), 162-168.

- Lin, P. H., & Chaikof, E. L. (2000). Embryology, anatomy, and surgical exposure of the great abdominal vessels. *Surgical Clinics of North America*, 80(1), 417-433.
- López-Abente, G., Pollán, M., Aragonés, N., Gómez, B. P., Barrera, V. H., Lope, V., & Suárez, B. (2004). Situación del cáncer en España: incidencia State of cancer in Spain: incidence. *An Sist Sanit Navar*, 27, 165-173.
- Louis, P., & Flint, H. J. (2009). Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS microbiology letters*, 294(1), 1-8.
- Lowe, E. L., Crother, T. R., Rabizadeh, S., Hu, B., Wang, H., Chen, S., . . . Arditi, M. (2010). Toll-like receptor 2 signaling protects mice from tumor development in a mouse model of colitis-induced cancer. *PLoS One*, 5(9), e13027.
- Lumeng, C. N., & Saltiel, A. R. (2011). Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *The Journal of clinical investigation*, 121(6), 2111.
- Lundberg, J. O., Weitzberg, E., Cole, J. A., & Benjamin, N. (2004). Nitrate, bacteria and human health. *Nature Reviews Microbiology*, 2(7), 593-602.
- Lupp, C., Robertson, M. L., Wickham, M. E., Sekirov, I., Champion, O. L., Gaynor, E. C., & Finlay, B. B. (2007). Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell host & microbe*, 2(2), 119-129.
- Macfarlane, S., Steed, H., & Macfarlane, G. T. (2009). Intestinal bacteria and inflammatory bowel disease. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 46(1), 25-54.
- Maddocks, O., Short, A. J., Donnenberg, M. S., Bader, S., & Harrison, D. J. (2009). Attaching and effacing Escherichia coli downregulate DNA mismatch repair protein in vitro and are associated with colorectal adenocarcinomas in humans. *PLoS One*, 4(5), e5517.
- Mäkinen, M., George, S., Jernvall, P., Mäkelä, J., Vihko, P., & Karttunen, T. (2001). Colorectal carcinoma associated with serrated adenoma—prevalence, histological features, and prognosis. *J Pathol*, 193(3), 286-294.
- Mäkivuokko, H., Tiihonen, K., Tynkkynen, S., Paulin, L., & Rautonen, N. (2010). The effect of age and non-steroidal anti-inflammatory drugs on human intestinal microbiota composition. *British journal of nutrition*, 103(2), 227.
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), 459-465.
- Mandel, J. S., Bond, J. H., Church, T. R., Snover, D. C., Bradley, G. M., Schuman, L. M., & Ederer, F. (1993). Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood. *New England Journal of Medicine*, 328(19), 1365-1371.
- Mandel, J. S., Church, T. R., Bond, J. H., Ederer, F., Geisser, M. S., Mongin, S. J., . . . Schuman, L. M. (2000). The effect of fecal occult-blood screening on the incidence of colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 343(22), 1603-1607.
- Mandel, J. S., Church, T. R., Ederer, F., & Bond, J. H. (1999). Colorectal cancer mortality: effectiveness of biennial screening for fecal occult blood. *J Natl Cancer Inst*, 91(5), 434-437.
- Mandir, N., Englyst, H., & Goodlad, R. A. Resistant carbohydrates stimulate cell proliferation and crypt fission in wild-type mice and in the Apc Min/mouse model of intestinal cancer, association with enhanced polyp development.
- Marcuello, E., Altés, A., del Rio, E., César, A., Menoyo, A., & Baiget, M. (2004). Single nucleotide polymorphism in the 5' tandem repeat sequences of thymidylate synthase gene predicts for response to fluorouracil-based chemotherapy in

- advanced colorectal cancer patients. *International Journal of Cancer*, 112(5), 733-737.
- Marchesi, J. R., Dutilh, B. E., Hall, N., Peters, W. H., Roelofs, R., Boleij, A., & Tjalsma, H. (2011). Towards the human colorectal cancer microbiome. *PLoS One*, 6(5), e20447.
- Mardis, E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 9, 387-402.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., . . . Chen, Z. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437(7057), 376-380.
- Mariat, D., Firmesse, O., Levenez, F., Guimarães, V., Sokol, H., Dore, J., . . . Furet, J. (2009). The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC microbiology*, 9(1), 123.
- Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., . . . Vogelstein, B. (1995). Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*, 268(5215), 1336-1338.
- Martin, H. M., Campbell, B. J., Hart, C. A., Mpofo, C., Nayar, M., Singh, R., . . . Rhodes, J. M. (2004). Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology*, 127(1), 80-93.
- Martínez, I., Wallace, G., Zhang, C., Legge, R., Benson, A. K., Carr, T. P., . . . Walter, J. (2009). Diet-induced metabolic improvements in a hamster model of hypercholesterolemia are strongly linked to alterations of the gut microbiota. *Applied and environmental microbiology*, 75(12), 4175-4184.
- Mas de Xaxars Rivero, T. (2012). Descripció i quantificació de la microbiota intestinal associada al càncer colorectal.
- Maslowski, K. M., & Mackay, C. R. (2011). Diet, gut microbiota and immune responses. *Nature immunology*, 12(1), 5-9.
- Maynard, C. L., Elson, C. O., Hatton, R. D., & Weaver, C. T. (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, 489(7415), 231-241. doi: 10.1038/nature11551
- McCoy, A. N., Araujo-Perez, F., Azcarate-Peril, A., Yeh, J. J., Sandler, R. S., & Keku, T. O. (2013). *Fusobacterium* is associated with colorectal adenomas. *PLoS One*, 8(1), e53653.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428-435.
- Mensink, P., Kolkman, J., Van Baarlen, J., & Kleibeuker, J. (2002). Change in anatomic distribution and incidence of colorectal carcinoma over a period of 15 years. *Diseases of the colon & rectum*, 45(10), 1393-1396.
- Metzker, M. L. (2005). Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome research*, 15(12), 1767-1776.
- Minoo, P., Zlobec, I., Peterson, M., Terracciano, L., & Lugli, A. (2010). Characterization of rectal, proximal and distal colon cancers based on clinicopathological, molecular and protein profiles. *International journal of oncology*, 37(3), 707-718.
- Miquel, S., Martin, R., Rossi, O., Bermudez-Humaran, L., Chatel, J., Sokol, H., . . . Langella, P. (2013). *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Curr Opin Microbiol*, 16(3), 255-261.
- Mira-Pascual, L., Cabrera-Rubio, R., Ocon, S., Costales, P., Parra, A., Suarez, A., . . . Collado, M. (2014a). Microbial mucosal colonic shifts associated with the development of colorectal cancer reveal the presence of different bacterial and archaeal biomarkers. *J Gastroenterol*, 50(2), 167-179.

- Mira-Pascual, L., Cabrera-Rubio, R., Ocon, S., Costales, P., Parra, A., Suarez, A., . . . Collado, M. (2014b). Microbial mucosal colonic shifts associated with the development of colorectal cancer reveal the presence of different bacterial and archaeal biomarkers. *J Gastroenterol*, 1-13.
- Montgomery, E. A. (2006). *Biopsy interpretation of the gastrointestinal tract mucosa*: Lippincott Williams & Wilkins.
- Moreira, L. (2011). [Serrated polyps: detection, risk of colorectal cancer and treatment and surveillance strategies]. *Gastroenterol Hepatol*, 34, 73-77.
- Mulcahy, M., & Benson, A. (2002). Post treatment surveillance of colon and rectal cancers. *J Clin Oncol*, 646-651.
- Müller, A. D., & Sonnenberg, A. (1995). Protection by endoscopy against death from colorectal cancer: a case-control study among veterans. *Archives of internal medicine*, 155(16), 1741-1748.
- Muñoz, A. (1997). *Cáncer: genes y nuevas terapias* (Vol. 2): Editorial Hélice.
- Murphy, G., Devesa, S. S., Cross, A. J., Inskip, P. D., McGlynn, K. A., & Cook, M. B. (2011). Sex disparities in colorectal cancer incidence by anatomic subsite, race and age. *International Journal of Cancer*, 128(7), 1668-1675.
- Neish, A. S. (2009). Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*, 136(1), 65-80.
- Nešić, D., Hsu, Y., & Stebbins, C. E. (2004). Assembly and function of a bacterial genotoxin. *Nature*, 429(6990), 429-433.
- Network, N. C. C. (2010). NCCN clinical practice guidelines in oncology. 2010. *Fort Washington, PA: NCCN Inc.*
- Newcomb, P. A., Norfleet, R. G., Storer, B. E., Surawicz, T. S., & Marcus, P. M. (1992). Screening sigmoidoscopy and colorectal cancer mortality. *J Natl Cancer Inst*, 84(20), 1572-1575.
- Nicholson, J. K., Holmes, E., & Wilson, I. D. (2005). Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nature Reviews Microbiology*, 3(5), 431-438.
- Noffsinger, A. E. (2009). Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy. *Annual Review of Pathological Mechanical Disease*, 4, 343-364.
- Norat, T., & Riboli, E. (2001). Meat consumption and colorectal cancer: a review of epidemiologic evidence. *Nutrition reviews*, 59(2), 37-47.
- Nougayrède, J.-P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., . . . Oswald, E. (2006). Escherichia coli induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science*, 313(5788), 848-851.
- Noverr, M. C., & Huffnagle, G. B. (2004). Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? *Trends in microbiology*, 12(12), 562-568.
- O'Brien, M. J. (2007). Hyperplastic and serrated polyps of the colorectum. *Gastroenterology clinics of North America*, 36(4), 947-968.
- O'Hara, A. M., & Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep*, 7(7), 688-693. doi: 10.1038/sj.embor.7400731
- Ohnmacht, C., Marques, R., Presley, L., Sawa, S., Lochner, M., & Eberl, G. (2011). Intestinal microbiota, evolution of the immune system and the bad reputation of pro-inflammatory immunity. *Cellular microbiology*, 13(5), 653-659.
- Ott, S., Musfeldt, M., Wenderoth, D., Hampe, J., Brant, O., Fölsch, U., . . . Schreiber, S. (2004). Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut*, 53(5), 685-693.

- Pajari, A. M., Rajakangas, J., Päivärinta, E., Kosma, V. M., Rafter, J., & Mutanen, M. (2003). Promotion of intestinal tumor formation by inulin is associated with an accumulation of cytosolic  $\beta$ -catenin in Min mice. *International Journal of Cancer*, *106*(5), 653-660.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA: a cancer journal for clinicians*, *55*(2), 74-108.
- Parodi, P. W. (1999). The role of intestinal bacteria in the causation and prevention of cancer: modulation by diet and probiotics. *Australian journal of dairy technology*, *54*(2), 103.
- Perdue, D. G., Perkins, C., Jackson-Thompson, J., Coughlin, S. S., Ahmed, F., Haverkamp, D. S., & Jim, M. A. (2008). Regional differences in colorectal cancer incidence, stage, and subsite among American Indians and Alaska Natives, 1999–2004. *Cancer*, *113*(S5), 1179-1190.
- Pickhardt, P. J., Choi, J. R., Hwang, I., Butler, J. A., Puckett, M. L., Hildebrandt, H. A., . . . Schindler, W. R. (2003). Computed tomographic virtual colonoscopy to screen for colorectal neoplasia in asymptomatic adults. *New England Journal of Medicine*, *349*(23), 2191-2200.
- Pignone, M., Rich, M., Teutsch, S. M., Berg, A. O., & Lohr, K. N. (2002). Screening for colorectal cancer in adults at average risk: a summary of the evidence for the US Preventive Services Task Force. *Annals of internal medicine*, *137*(2), 132-141.
- Pignone, M., Saha, S., Hoerger, T., & Mandelblatt, J. (2002). Cost-effectiveness analyses of colorectal cancer screening: a systematic review for the US Preventive Services Task Force. *Annals of internal medicine*, *137*(2), 96-104.
- Piñol, V., Andreu, M., Castells, A., Payá, A., Bessa, X., Jover, R., & Association, G. O. G. o. t. S. G. (2004). Frequency of hereditary non-polyposis colorectal cancer and other colorectal cancer familial forms in Spain: a multicentre, prospective, nationwide study. *European journal of gastroenterology & hepatology*, *16*(1), 39-45.
- Platten, M., Wick, W., & Weller, M. (2001). Malignant glioma biology: Role for TGF- $\beta$  in growth, motility, angiogenesis, and immune escape. *Microscopy research and technique*, *52*(4), 401-410.
- Plottel, C. S., & Blaser, M. J. (2011). Microbiome and malignancy. *Cell host & microbe*, *10*(4), 324-335.
- Powell, S. M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T. M., Hamilton, S. R., Thibodeau, S. N., . . . Kinzler, K. W. (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*, *359*(6392), 235-237.
- Pruitt, K., & Der, C. J. (2001). Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis. *Cancer letters*, *171*(1), 1-10.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., . . . Yamada, T. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, *464*(7285), 59-65.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., . . . Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, *464*(7285), 59-65. doi: 10.1038/nature08821
- Rajilić-Stojanović, M., Heilig, H. G., Molenaar, D., Kajander, K., Surakka, A., Smidt, H., & De Vos, W. M. (2009). Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environ Microbiol*, *11*(7), 1736-1751.

- Rakoff-Nahoum, S., & Medzhitov, R. (2007). Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88. *Science*, 317(5834), 124-127.
- Rembacken, B., Fujii, T., Cairns, A., Dixon, M., Yoshida, S., Chalmers, D., & Axon, A. (2000). Flat and depressed colonic neoplasms: a prospective study of 1000 colonoscopies in the UK. *The Lancet*, 355(9211), 1211-1214.
- Riethmüller, G., Holz, E., Schlimok, G., Schmiegel, W., Raab, R., Höffken, K., . . . Hirche, H. (1998). Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *Journal of clinical oncology*, 16(5), 1788-1794.
- Robertson, S. J., Zhou, J. Y., Geddes, K., Rubino, S. J., Cho, J. H., Girardin, S. E., & Philpott, D. J. (2013). Nod1 and Nod2 signaling does not alter the composition of intestinal bacterial communities at homeostasis. *Gut microbes*, 4(3), 222-231.
- Rödel, C., Arnold, D., Hipp, M., Liersch, T., Dellas, K., Iesalnieks, I., . . . Hohenberger, W. (2008). Phase I-II trial of cetuximab, capecitabine, oxaliplatin, and radiotherapy as preoperative treatment in rectal cancer. *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*, 70(4), 1081-1086.
- Romero, B., Morosini, M.-I., Loza, E., Rodríguez-Baños, M., Navas, E., Cantón, R., & del Campo, R. (2011). Reidentification of *Streptococcus bovis* isolates causing bacteremia.
- Round, J. L., Lee, S. M., Li, J., Tran, G., Jabri, B., Chatila, T. A., & Mazmanian, S. K. (2011). The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science*, 332(6032), 974-977.
- Round, J. L., & Mazmanian, S. K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol*, 9(5), 313-323. doi: 10.1038/nri2515
- Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Fiol, C., Munemitsu, S., & Polakis, P. (1996). Binding of GSK3 $\beta$  to the APC- $\beta$ -catenin complex and regulation of complex assembly. *Science*, 272(5264), 1023-1026.
- Rubinstein, M. R., Wang, X., Liu, W., Hao, Y., Cai, G., & Han, Y. W. (2013). *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ $\beta$ -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell host & microbe*, 14(2), 195-206.
- Rusniok, C., Couvé, E., Da Cunha, V., El Gana, R., Zidane, N., Bouchier, C., . . . Glaser, P. (2010). Genome sequence of *Streptococcus gallolyticus*: insights into its adaptation to the bovine rumen and its ability to cause endocarditis. *Journal of bacteriology*, 192(8), 2266-2276.
- Rutter, M., Saunders, B., Wilkinson, K., Rumbles, S., Schofield, G., Kamm, M., . . . Forbes, A. (2004). Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 126(2), 451-459.
- Sagar, P., & Pemberton, J. (1997). Topographic anatomy. *Surgery of the colon and rectum*. New York: Churchill Livingstone, 1-18.
- Sakorafas, G. H., Zouros, E., & Peros, G. (2006). Applied vascular anatomy of the colon and rectum: clinical implications for the surgical oncologist. *Surgical oncology*, 15(4), 243-255.
- Salaspuro, M. (1996). Bacteriocolonial pathway for ethanol oxidation: characteristics and implications. *Annals of medicine*, 28(3), 195-200.
- Salcedo, R., Worschech, A., Cardone, M., Jones, Y., Gyulai, Z., Dai, R.-M., . . . O'hUigin, C. (2010). MyD88-mediated signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon: role of interleukin 18. *The Journal of experimental medicine*, 207(8), 1625-1636.

- Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W. M., . . . Mogensen, G. (1998). Demonstration of safety of probiotics—a review. *International journal of food microbiology*, *44*(1), 93-106.
- Saltz, L. B., Clarke, S., Díaz-Rubio, E., Scheithauer, W., Figer, A., Wong, R., . . . Rivera, F. (2008). Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *Journal of clinical oncology*, *26*(12), 2013-2019.
- Sancho, E., Batlle, E., & Clevers, H. (2004). Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, *20*, 695-723.
- Sanfilippo, L., Li, C., Seth, R., Balwin, T., Menozzi, M., & Mahida, Y. (2000). *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces the expression of IL-8 and transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) by human colonic epithelial cells. *Clinical & Experimental Immunology*, *119*(3), 456-463.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *74*(12), 5463-5467.
- Sasapu, K. K., Sebag-Montefiore, D., Chalmers, A. G., Sagar, P. M., Burke, D., & Finan, P. J. (2006). Evaluation of a protocol-based management of rectal cancer. *Diseases of the colon & rectum*, *49*(11), 1703-1709.
- Scanlan, P. D., Shanahan, F., Clune, Y., Collins, J. K., O'Sullivan, G. C., O'Riordan, M., . . . Marchesi, J. R. (2008). Culture-independent analysis of the gut microbiota in colorectal cancer and polyposis. *Environ Microbiol*, *10*(3), 789-798.
- Schatzkin, A., Lanza, E., Corle, D., Lance, P., Iber, F., Caan, B., . . . Cooper, M. R. (2000). Lack of effect of a low-fat, high-fiber diet on the recurrence of colorectal adenomas. *New England Journal of Medicine*, *342*(16), 1149-1155.
- Schloissnig, S., Arumugam, M., Sunagawa, S., Mitreva, M., Tap, J., Zhu, A., . . . Bork, P. (2013). Genomic variation landscape of the human gut microbiome. *Nature*, *493*(7430), 45-50. doi: 10.1038/nature11711
- Schnupf, P., Gaboriau-Routhiau, V., & Cerf-Bensussan, N. (2013). *Host interactions with Segmented Filamentous Bacteria: An unusual trade-off that drives the post-natal maturation of the gut immune system*. Paper presented at the Seminars in immunology.
- Scholefield, J., Moss, S., Sufi, F., Mangham, C., & Hardcastle, J. (2002). Effect of faecal occult blood screening on mortality from colorectal cancer: results from a randomised controlled trial. *Gut*, *50*(6), 840-844.
- Schut, H. A., & Snyderwine, E. G. (1999). DNA adducts of heterocyclic amine food mutagens: implications for mutagenesis and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, *20*(3), 353-368.
- Schwabe, R. F., & Wang, T. C. (2012). Bacteria deliver a genotoxic hit. *Science*, *338*(6103), 52-53.
- Schwitalla, S., Fingerle, A. A., Cammareri, P., Nebelsiek, T., Göktuna, S. I., Ziegler, P. K., . . . Moreaux, G. (2013). Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell*, *152*(1), 25-38.
- Sears, C. L. (2009). Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a rogue among symbiotes. *Clinical microbiology reviews*, *22*(2), 349-369.
- Sears, C. L., & Pardoll, D. M. (2011). Perspective: alpha-bugs, their microbial partners, and the link to colon cancer. *Journal of Infectious Diseases*, *203*(3), 306-311.
- Seitz, H. K., Simanowski, U. A., Garzon, F. T., Rideout, J. M., Peters, T. J., Koch, A., . . . Maiwald, M. (1990). Possible role of acetaldehyde in ethanol-related rectal cocarcinogenesis in the rat. *Gastroenterology*, *98*(2), 406-413.

- Selby, J. V., Friedman, G. D., Quesenberry Jr, C. P., & Weiss, N. S. (1992). A case-control study of screening sigmoidoscopy and mortality from colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, *326*(10), 653-657.
- Shanahan, M. T., Carroll, I. M., Grossniklaus, E., White, A., von Furstenberg, R. J., Barner, R., . . . Gulati, A. S. (2013). Mouse Paneth cell antimicrobial function is independent of Nod2. *Gut*, *gutjnl-2012-304190*.
- Shen, X. J., Rawls, J. F., Randall, T. A., Burcall, L., Mpande, C., Jenkins, N., . . . Keku, T. O. (2010). Molecular characterization of mucosal adherent bacteria and associations with colorectal adenomas. *Gut microbes*, *1*(3), 138-147.
- Shendure, J., Porreca, G. J., Reppas, N. B., Lin, X., McCutcheon, J. P., Rosenbaum, A. M., . . . Church, G. M. (2005). Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science*, *309*(5741), 1728-1732.
- Sheng, H., Shao, J., Williams, C. S., Pereira, M. A., Taketo, M. M., Oshima, M., . . . Beauchamp, R. D. (1998). Nuclear translocation of beta-catenin in hereditary and carcinogen-induced intestinal adenomas. *Carcinogenesis*, *19*(4), 543-549.
- Shih, D. Q., & Targan, S. R. (2008). Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology: WJG*, *14*(3), 390.
- Shioya, M., Wakabayashi, K., Yamashita, K., Nagao, M., & Sugimura, T. (1989). Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA treated with fecapentaene-12 and-14. *Mutation Research Letters*, *225*(3), 91-94.
- Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., & Jemal, A. (2014). Cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*, *64*(1), 9-29.
- Singh, N., Gurav, A., Sivaprakasam, S., Brady, E., Padia, R., Shi, H., . . . Munn, D. H. (2014). Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity*, *40*(1), 128-139.
- Singletary, S. E., Allred, C., Ashley, P., Bassett, L. W., Berry, D., Bland, K. I., . . . Hayes, D. F. (2002). Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *Journal of clinical oncology*, *20*(17), 3628-3636.
- Snover, D. C., Jass, J. R., Fenoglio-Preiser, C., & Batts, K. P. (2005). Serrated Polyps of the Large Intestine A Morphologic and Molecular Review of an Evolving Concept. *Am J Clin Pathol*, *124*(3), 380-391.
- Sobhani, I., Amiot, A., Le Baleur, Y., Levy, M., Auriault, M.-L., Van Nhieu, J. T., & Delchier, J. C. (2013). Microbial dysbiosis and colon carcinogenesis: could colon cancer be considered a bacteria-related disease? *Therapeutic advances in gastroenterology*, *6*(3), 215-229.
- Sobhani, I., Tap, J., Roudot-Thoraval, F., Roperch, J. P., Letulle, S., Langella, P., . . . Furet, J. P. (2011). Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS One*, *6*(1), e16393.
- Sobko, T., Huang, L., Midtvedt, T., Norin, E., Gustafsson, L. E., Norman, M., . . . Lundberg, J. O. (2006). Generation of NO by probiotic bacteria in the gastrointestinal tract. *Free Radical Biology and Medicine*, *41*(6), 985-991.
- Spring, K. J., Zhao, Z. Z., Karamatic, R., Walsh, M. D., Whitehall, V. L., Pike, T., . . . Montgomery, G. W. (2006). High prevalence of sessile serrated adenomas with BRAF mutations: a prospective study of patients undergoing colonoscopy. *Gastroenterology*, *131*(5), 1400-1407.
- Stecher, B., & Hardt, W.-D. (2008). The role of microbiota in infectious disease. *Trends in microbiology*, *16*(3), 107-114.
- Stein, L. D. (2010). The case for cloud computing in genome informatics. *Genome Biol*, *11*(5), 207.

- Strocchi, A., Furne, J., Ellis, C., & Levitt, M. (1994). Methanogens outcompete sulphate reducing bacteria for H<sub>2</sub> in the human colon. *Gut*, 35(8), 1098-1101.
- Stryker, S. J., Wolff, B. G., Culp, C. E., Libbe, S. D., Ilstrup, D. M., & MacCarty, R. L. (1987). Natural history of untreated colonic polyps. *Gastroenterology*, 93(5), 1009-1013.
- Sugimura, T., & Sato, S. (1983). Mutagens-carcinogens in foods. *Cancer research*, 43(5 Suppl), 2415s.
- Tannock, G. W. (1999). Analysis of the intestinal microflora: a renaissance. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76(1-4), 265-278.
- Tap, J., Mondot, S., Levenez, F., Pelletier, E., Caron, C., Furet, J. P., . . . Leclerc, M. (2009). Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ Microbiol*, 11(10), 2574-2584. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01982.x
- Tenesa, A., & Dunlop, M. G. (2009). New insights into the aetiology of colorectal cancer from genome-wide association studies. *Nature Reviews Genetics*, 10(6), 353-358.
- Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., & Karin, M. (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2101-2114. e2105.
- Tinat, J., Baert-Desurmont, S., Latouche, J., Vasseur, S., Martin, C., Bouvignies, E., & Frébourg, T. (2008). The three nucleotide deletion within the 3' untranslated region of MLH1 resulting in gene expression reduction is not a causal alteration in Lynch syndrome. *Familial cancer*, 7(4), 339-340.
- Tjalsma, H., & Boleij, A. (2012). Subtyping of Streptococcus bovis group bacteria is needed to fully understand the clinical value of Streptococcus gallolyticus (S. bovis biotype I) infection as early sign of colonic malignancy. *International journal of clinical practice*, 66(3), 326-326.
- Tjalsma, H., Boleij, A., Marchesi, J. R., & Dutilh, B. E. (2012). A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nature Reviews Microbiology*, 10(8), 575-582.
- Towler, B., Irwig, L., Glasziou, P., Weller, D., & Kewenter, J. (1998). Screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, hemoccult. *The Cochrane Library*.
- Tucker, T., Marra, M., & Friedman, J. M. (2009). Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine. *The American Journal of Human Genetics*, 85(2), 142-154.
- Tuppurainen, K., Mäkinen, J. M., Junttila, O., Liakka, A., Kyllönen, A. P., Tuominen, H., . . . Mäkinen, M. J. (2005). Morphology and microsatellite instability in sporadic serrated and non-serrated colorectal cancer. *J Pathol*, 207(3), 285-294.
- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., . . . Gordon, J. I. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457(7228), 480-484. doi: 10.1038/nature07540
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2007). The human microbiome project. *Nature*, 449(7164), 804-810. doi: 10.1038/nature06244
- Turnbaugh, P. J., Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Knight, R., & Gordon, J. I. (2009). The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Science translational medicine*, 1(6), 6ra14-16ra14.
- Turner, N., Ritchie, L., Bresalier, R., & Chapkin, R. (2013). The microbiome and colorectal neoplasia: environmental modifiers of dysbiosis. *Current gastroenterology reports*, 15(9), 1-10.
- Ulger Toprak, N., Yagci, A., Gulluoglu, B., Akin, M., Demirkalem, P., Celenk, T., & Soyletir, G. (2006). A possible role of Bacteroides fragilis enterotoxin in the

- aetiology of colorectal cancer. *Clinical microbiology and infection*, 12(8), 782-786.
- Uronis, J. M., Mühlbauer, M., Herfarth, H. H., Rubinas, T. C., Jones, G. S., & Jobin, C. (2009a). Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility. *PLoS One*, 4(6), e6026.
- Uronis, J. M., Mühlbauer, M., Herfarth, H. H., Rubinas, T. C., Jones, G. S., & Jobin, C. (2009b). Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility.
- Van Cutsem, E., Dicato, M., Haustermans, K., Arber, N., Bosset, J.-F., Cunningham, D., . . . Goldberg, R. (2008). The diagnosis and management of rectal cancer: expert discussion and recommendations derived from the 9th World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, 2007. *Annals of Oncology*, 19(suppl 6), vi1-vi8.
- Vanrobaeys, M., De Herdt, P., Charlier, G., Ducatelle, R., & Haesebrouck, F. (1999). Ultrastructure of surface components of *Streptococcus gallolyticus* (*S. bovis*) strains of differing virulence isolated from pigeons. *Microbiology*, 145(2), 335-342.
- Verfaillie, C. M., Pera, M. F., & Lansdorp, P. M. (2002). Stem cells: hype and reality. *ASH Education Program Book*, 2002(1), 369-391.
- Vipperla, K., & O'Keefe, S. J. (2012). The microbiota and its metabolites in colonic mucosal health and cancer risk. *Nutrition in Clinical Practice*, 27(5), 624-635.
- Viswanathan, V. (2013). The meddling microbes midst our medicines. *Gut microbes*, 4(5), 359-360.
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Kern, S. E., Preisinger, A., Nakamura, Y., & White, R. (1989). Allelotype of colorectal carcinomas. *Science*, 244(4901), 207-211.
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1998). *The genetic basis of human cancer*: McGraw-Hill, Health Professions Division.
- Walker, A. W., Ince, J., Duncan, S. H., Webster, L. M., Holtrop, G., Ze, X., . . . Bergerat, A. (2011). Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J*, 5(2), 220-230.
- Walker, J., & Quirke, P. (2002). Prognosis and response to therapy in colorectal cancer. *European Journal of Cancer*, 38(7), 880-886.
- Walsh, J. M., & Terdiman, J. P. (2003). Colorectal cancer screening: scientific review. *JAMA*, 289(10), 1288-1296.
- Wang, D., Kreutzer, D. A., & Essigmann, J. M. (1998). Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 400(1), 99-115.
- Wang, T., Cai, G., Qiu, Y., Fei, N., Zhang, M., Pang, X., . . . Zhao, L. (2012). Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J*, 6(2), 320-329.
- Wei, H., Dong, L., Wang, T., Zhang, M., Hua, W., Zhang, C., . . . Qiu, Y. (2010). Structural shifts of gut microbiota as surrogate endpoints for monitoring host health changes induced by carcinogen exposure. *FEMS microbiology ecology*, 73(3), 577-586.
- Weir, T. L., Manter, D. K., Sheflin, A. M., Barnett, B. A., Heuberger, A. L., & Ryan, E. P. (2013). Stool microbiome and metabolome differences between colorectal cancer patients and healthy adults. *PLoS One*, 8(8), e70803.
- Wentling, G. K., Metzger, P. P., Dozois, E. J., Chua, H. K., & Krishna, M. (2006). Unusual bacterial infections and colorectal carcinoma—*Streptococcus bovis* and

- Clostridium septicum*: report of three cases. *Diseases of the colon & rectum*, 49(8), 1223-1227.
- Wild, D., Kaiser, G., King, M., & Harnasch, D. (1986). Genotoxic activity of IQ (2-amino-3-methylimidazo [4, 5-f] quinoline) and structural analogs.
- Willett, C. G., Duda, D. G., Czito, B. G., Bendell, J. C., Clark, J. W., & Jain, R. K. (2007). Targeted therapy in rectal cancer. *Oncology (Williston Park, NY)*, 21(9), 1055.
- Willett, C. G., Fung, C. Y., Kaufman, D. S., Efird, J., & Shellito, P. C. (1993). Postoperative radiation therapy for high-risk colon carcinoma. *Journal of clinical oncology*, 11(6), 1112-1117.
- Winawer, S., Fletcher, R., Rex, D., Bond, J., Burt, R., Ferrucci, J., . . . Johnson, D. (2003). Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale—update based on new evidence. *Gastroenterology*, 124(2), 544-560.
- Winawer, S., Zauber, A., Church, T., Mandelson, M., Feld, A., Bond, J., . . . Bushey, M. (2002). *National Colonoscopy Study (NCS) preliminary results: a randomized controlled trial of general population screening colonoscopy*. Paper presented at the Gastroenterology.
- Winawer, S. J., Fletcher, R. H., Miller, L., Godlee, F., Stolar, M. H., Mulrow, C. D., . . . Bond, J. H. (1997). Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. *Gastroenterology*, 112(2), 594-642.
- Winawer, S. J., Zauber, A. G., Ho, M. N., O'Brien, M. J., Gottlieb, L. S., Sternberg, S. S., . . . Panish, J. F. (1993). Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. *New England Journal of Medicine*, 329(27), 1977-1981.
- Winter, S. E., Lopez, C. A., & Bäumlner, A. J. (2013). The dynamics of gut-associated microbial communities during inflammation. *EMBO Rep*, 14(4), 319-327.
- Winters, M. D., Schlinke, T. L., Joyce, W. A., Glore, S. R., & Huycke, M. M. (1998). Prospective case-cohort study of intestinal colonization with enterococci that produce extracellular superoxide and the risk for colorectal adenomas or cancer. *The American journal of gastroenterology*, 93(12), 2491-2500.
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.-Y., Keilbaugh, S. A., . . . Knight, R. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, 334(6052), 105-108.
- Wu, N., Yang, X., Zhang, R., Li, J., Xiao, X., Hu, Y., . . . Wang, Z. (2013). Dysbiosis signature of fecal microbiota in colorectal cancer patients. *Microb Ecol*, 66(2), 462-470.
- Wu, S., Morin, P. J., Maouyo, D., & Sears, C. L. (2003). *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces c-Myc expression and cellular proliferation. *Gastroenterology*, 124(2), 392-400.
- Wu, S., Rhee, K.-J., Albesiano, E., Rabizadeh, S., Wu, X., Yen, H.-R., . . . McAllister, F. (2009). A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nature medicine*, 15(9), 1016-1022.
- Zaki, M. H., Vogel, P., Body-Malapel, M., Lamkanfi, M., & Kanneganti, T.-D. (2010). IL-18 production downstream of the Nlrp3 inflammasome confers protection against colorectal tumor formation. *The Journal of Immunology*, 185(8), 4912-4920.
- Zarkovic, M., Qin, X., Nakatsuru, Y., Oda, H., Nakamura, T., Shamsuddin, A. M., & Ishikawa, T. (1993). Tumor promotion by fecapentaene-12 in a rat colon carcinogenesis model. *Carcinogenesis*, 14(7), 1261-1264.
- Zhang, H., DiBaise, J. K., Zuccolo, A., Kudrna, D., Braidotti, M., Yu, Y., . . . Rittmann, B. E. (2009). Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(7), 2365-2370.

- Zheng, J., Meng, J., Zhao, S., Singh, R., & Song, W. (2008). Campylobacter-induced interleukin-8 secretion in polarized human intestinal epithelial cells requires Campylobacter-secreted cytolethal distending toxin-and Toll-like receptor-mediated activation of NF- $\kappa$ B. *Infection and immunity*, 76(10), 4498-4508.
- Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D., & De Vos, W. M. (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 64(10), 3854-3859.



## VIII. RESÚMEN. SUMMARY

---



**Objetivos:** Nuestro objetivo consistió en caracterizar, mediante secuenciación de próxima generación (NGS), la microbiota colónica en muestras de mucosa normal y tumoral de pacientes con cáncer colorrectal (CCR), así como en muestras de heces de pacientes sanos y enfermos, además de estudiar las diferencias en la composición microbiana según el tipo, estadio y localización tumoral, con el fin de sugerir qué tipo de bacterias podrían estar previsiblemente involucradas en la localización, desarrollo y evolución del CCR.

**Material y métodos:** En este estudio se analizaron 59 muestras de tejido de pacientes con CCR, donde n=39 correspondían a tejido tumoral (TT) y n= 20 a tejido normal (TN), 9 muestras de tejido adenomatoso (TA) y 7 muestras de heces, donde n=3 procedían de pacientes sanos y n=3 de pacientes con CCR. El estudio de NGS se llevó a cabo en 38 muestras, donde n= 10 correspondían a TN, n=19 a TT, n=2 a TA y n=7 a heces. Posteriormente, escogimos aquellos grupos bacterianos que resultaran de interés y mostraran diferencias significativas entre las comparaciones objeto de estudio para cuantificarlos y validarlos por qPCR, tanto en esta serie de pacientes como en otra serie independiente de pacientes con 37 muestras, donde n=10 correspondía a TN, n=20 a TT y n=7 a TA. Las muestras de tejido tumoral se clasificaron según el tipo (convencional o serrado), localización (distal o proximal) y el estadio mediante el sistema TNM. Tras la extracción del DNA, la amplificación por PCR se llevó a cabo empleando cebadores 27F y 533R que amplifican la región V1-V3 del gen rRNA 16S con los adaptadores A y B de la química Titanium correspondientes a los kits tipo “*shot-gun*” Lib-L, empleando el equipo 454-Junior de Roche. La qPCR se realizó mediante el uso de cebadores genéricos y específicos de especie/género del gen 16S RNA, con la sonda inespecífica *SybrGreen* (QuantiTec-Qiagen). El estudio bioinformático para el análisis de calidad, filtrado de secuencias, búsqueda de quimeras y clasificación taxonómica se realizó mediante los programas “FAST QC”, “prinseq-lite.pl script”, “USEARCH” y “RDP classifier” respectivamente. El análisis estadístico relativo a los resultados obtenidos mediante NGS y qPCR se llevó a cabo mediante el empleo del test de Wilcoxon (R-Studio y SPSS 21.0).

**Resultados:** El tejido tumoral se encontraba representado fundamentalmente por el género *Fusobacterium* (p=0.033) además de otros géneros bacterianos estrechamente relacionados al tejido tumoral, tales como *Porphyromonas*, *Streptococcus* y

*Enterococcus*. En el tejido normal observamos un predominio del género *Akkermansia* ( $p=0.039$ ). Según el tipo de carcinoma, encontramos que los géneros *Fusobacterium*, *Aeromonas*, *Streptococcus* y *Enterobacter* fueron más frecuentes en adenocarcinoma serrado (CS) ( $p=0.045$ ,  $p=0.033$ ,  $p=0.013$  y  $p=0.009$ , respectivamente), a diferencia del género *Enterococcus* el cual fué más frecuente en adenocarcinoma convencional (CC) ( $p=0.045$ ). En cuanto al estadio del tumor, solamente encontramos diferencias significativas para el género *Faecalibacterium*, el cual mostró una asociación con estadios tumorales avanzados (T3-4) ( $p=0.042$ ). Según la localización del tumor, los géneros *Haemophilus*, *Prevotella*, y *Blautia* ( $p=0.029$ ,  $p=0.044$  y  $p=0.008$ ) se asociaron a tumores de localización proximal, mientras que *Enterococcus* ( $p=0.027$ ) mostró una asociación a tumores de zona distal. Del mismo modo, encontramos una mayor presencia de géneros pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* en la zona proximal. Tras el análisis mediante qPCR en ambas series de pacientes, observamos de forma significativa la misma tendencia de resultados para *Fusobacterium nucleatum*, *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii* y *Enterococcus*. En cuanto a las muestras de heces, encontramos un importante predominio de *A. muciniphila* en pacientes con CCR a diferencia de lo observado en muestras de heces de pacientes sanos donde predominó *F. prausnitzii*.

**Conclusiones:** *F. nucleatum* fue una bacteria asociada no sólo con el desarrollo del CCR en general como había sido descrito con anterioridad sino específicamente con el subtipo del adenocarcinoma serrado, siendo la primera vez que se demuestra que la histología del CCR tiene relación con el tipo de microbiota. En tumores con estadios T3-T4 se asoció un perfil microbiano caracterizado fundamentalmente por bacterias de tipo *passengers*, ya sea con actividad proinflamatoria como *F. nucleatum* o de actividad antiinflamatoria como *F. prausnitzii*. Del mismo modo, la localización anatómica se asoció con diferentes perfiles microbianos cuando se comparó el colon distal y proximal. Nuestro estudio demuestra que la caracterización de la microbiota en el desarrollo del CCR es fundamental para conocer la participación de la misma en las distintas localizaciones y rutas patogénicas implicadas en este tumor. Además los perfiles bacterianos pueden constituir interesantes biomarcadores para la detección temprana y el diagnóstico del CCR así como para el diseño de estrategias preventivas basadas en la administración de cepas probióticas capaces de corregir la disbiosis.

**Objectives:** The aim of this work was to characterize, through next-generation sequencing (NGS), the colonic microbiota in samples from normal and tumor mucosa of patients with colorectal cancer (CRC) and also in stool samples of healthy and affected patients, so we could establish the differences in microbial composition according to the type, stage and location of the tumor.

**Material and methods:** In our study, 59 tissue samples from CRC patients were analyzed, n= 39 corresponded to tumor (TT) and n= 20 to normal tissue (TN), 9 adenomatous tissue samples (TA) and 7 stool samples, where n= 3 were from healthy patients and n= 3 from patients with CRC. The study of NGS, was carried out on 38 samples, corresponding to TN (n=10), TT (n=19), TA (n=2) and feces (n=7). Subsequently, those bacterial groups that were found of interest by showing significant differences between the study comparisons, were validated by quantitative PCR (qPCR) in this patient series and in an independent set of patients consisting of 37 samples, where n= 10 corresponded to TN (n=10), TT (n=20) and TA (n=7). The samples of tumor tissue were classified according to the histological type (conventional or serrated), location (distal or proximal) and stage by TNM system. After DNA extraction, PCR amplification was performed using primers 27F and 533R, that amplify the V1-V3 region from the 16S rRNA gene with adapters A and B corresponding to the kits Titanium "shot-gun" chemical type Lib-L, and the 454-Junior pyrosequencer by Roche. The validation by qPCR was performed using 16S RNA gen primers specific for species or genus and the SybrGreen probe chemistry (QuantiTec-Qiagen). The bioinformatic study for quality analysis, filtering sequences, chimeras withdrawal and taxonomic classification was performed using the "FAST QC", "prinseq-lite.pl script", "USEARCH" and "RDP classifier" programs, respectively. The statistical analysis of the NGS and qPCR results was carried out by applying the Wilcoxon test (R -Studio and SPSS 21.0).

**Results:** The genus *Fusobacterium* was significantly more abundant in the tumor tissue ( $p = 0.033$ ) and others bacterial genera closely related, such as *Porphyromonas*, *Streptococcus* and *Enterococcus*. In normal tissue, we observed a predominance of *Akkermansia* ( $p = 0.039$ ) and regarding the histological type of carcinoma, we found that *Fusobacterium*, *Aeromonas*, *Streptococcus* and *Enterobacter* were more common in serrated adenocarcinoma (CS) ( $p= 0.045$ ,  $p= 0.033$ ,  $p= 0.013$  and  $p= 0.009$ , respectively) than conventional (CC), unlike the genus *Enterococcus*, which was more common in CC

( $p= 0.045$ ). Concerning tumor stage, we found significant differences for *Faecalibacterium*, which showed an association with advanced tumor stages (T3-4) ( $p= 0.042$ ). According to tumor location, *Haemophilus*, *Prevotella*, and *Blautia* ( $p= 0.029$ ,  $p= 0.044$ ,  $p= 0.008$ ) were associated with proximal location tumors, while *Enterococcus* ( $p= 0.027$ ) showed a relationship with distal area tumors. Similarly, we observed a higher presence of genera belonging to the family *Enterobacteriaceae* in the proximal area. After qPCR analysis in both sets of patients, we observed significantly the same trend of results for *Fusobacterium nucleatum*, *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii* and *Enterococcus*. As for the stool samples, we found a significant prevalence of *A. muciniphila* in patients with CRC, unlike that observed in stool samples from healthy patients predominated *F. prausnitzii*.

**Conclusions:** *F. nucleatum* was identified as a bacteria associated with not only the CRC development in general, as was previously described, but also specifically with the CRC subtype of serrated adenocarcinoma, being the first study reporting that CRC histology could be related with a microbiota type. In tumors with stages T3-T4, we observed a microbial profile characterized essentially by *passenger* bacteria, either with proinflammatory activity as *F. nucleatum* or antiinflammatory activity as *F. prausnitzii*. Regarding the anatomical location, we found different microbial profiles between the distal and proximal colon. Our study shows that microbiota characterization in CRC development is crucial for knowing the bacteria participation in the different locations and pathogenic pathways implicated in this tumor. Besides, bacteria profiles could be interesting biomarkers for the early detection and diagnose of CRC, as well as important elements for the design of preventive strategies based on probiotic treatments which could restore normal microbiota.

## **IX. ABREVIATURAS**

---



- AJCC:** American Joint Comite on Cancer
- AMI:** arteria mesentérica inferior
- AOM:** azoximetano
- AST:** adenoma serrado tradicional
- BRAF:** v-raf murine sarcoma viral oncogén homologo B1
- CAC:** colitis asociada a cáncer
- CAG:** grupos de coabundancia
- CC:** carcinoma convencional
- CCR:** cáncer colorrectal
- CDT:** toxinas citoletales
- CIMP:** metilación de islas de CpG
- CIMP-high:** fenotipo de metilación de islas CpG de alto grado
- CIMP-low:** fenotipo de metilación de islas CpG de bajo grado
- CIN:** inestabilidad cromosómica
- CnF1:** factor necrotizante citotóxico tipo 1
- CS:** carcinoma serrado
- DSS:** sodio dextrano sulfato
- ECA:** ensayos clínicos aleatorizados
- EI:** enfermedad inflamatoria intestinal
- EGFR:** factor de crecimiento epidérmico
- FAP:** poliposis adenomatosa familiar
- GF:** libre de gérmenes
- GT:** gemación tumoral
- HMPS:** síndrome de poliposis mixta hereditaria

**HNPC**: cáncer colorectal hereditario no polipósico

**HPS**: poliposis hamartomatosa

**IL**: interleucina

**IUAC**: International Union Against Cancer

**KRAS**: oncogenes Kirsten del sarcoma de rata

**LPT**: linfocitos peritumorales

**MAPK**: proteína mitógeno kinasa activada

**MMR**: mismatch repair genes

**MSI**: inestabilidad de microsateclites

**MSI-H**: high microsatellite instability

**MSI-L**: low microsatellite instability

**MYC**: oncogen de la mielocitomatosis

**MyD88**: factor de diferenciación mieloides 88

**NGS**: secuenciación de próxima generación

**NIH**: National Institutes of Health

**OTUs**: unidades taxonómicas operacionales

**PCoA**: Análisis principal de coordenadas

**PCT**: patrón de crecimiento tumoral infiltrante

**PET**: tomografía con emisión de positrones

**PI3K**: fosfatidilinositol 3 kinasa

**PKS**: policétido sintasa

**PsCt**: pseudofragmentos citoplasmáticos

**RDP**: Ribosomal Database Project

**SCFA**: ácidos grasos de cadena corta

**SCs:** stem cells

**SMA:** arteria mesentérica superior

**TC:** tomografía computerizada

**TCF:** factor de células T

**TGI:** tracto gastrointestinal

**Th:** T cooperadores

**TLR:** Toll like receptor

**TREG:** células T reguladoras

**VEGF:** factor de crecimiento endotelial vascular