

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster en Microbiota, Probióticos y Prebióticos

ANÁLISIS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN EL CÁNCER COLORRECTAL: METODOLOGÍA, ANÁLISIS Y CONSIDERACIONES CLAVE DE ESTUDIO

Autora: Adriana Alcaraz Soler

Tutor: José Manuel Martín Villa

Villaviciosa de Odón, *Octubre 2023*

ÍNDICE

1. RESUMEN DEL TRABAJO	3
2. ABSTRACT	5
3. INTRODUCCIÓN	7
4. OBJETIVOS	10
5. METODOLOGIA	11
6. DESARROLLO	13
6.1 DISEÑO DE LOS ESTUDIOS	13
6.1.1 TAMAÑO MUESTRAL	13
6.2 TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE DATOS	14
6.2.1 SECUENCIACIÓN ARNr 16S	14
6.2.2 METAGENÓMICA “ <i>SHOTGUN</i> ”	16
6.2.3 METABOLÓMICA	17
6.2.4 METATRANSCRIPTÓMICA	17
6.2.5 METAPROTEÓMICA	18
6.3 RECOGIDA DE MUESTRAS	19
6.3.1 HECES.....	19
6.3.2 ANÁLISIS DE SANGRE	20
6.3.3 MUESTRAS DE TEJIDO	21
6.4 REDACIÓN DE LOS ARTÍCULOS	21
6.5 PREPECTIVAS DE FUTURO	23
7. DISCUSIÓN	25
8. CONCLUSIONES	26
9. BIBLIOGRAFÍA.....	27

1. RESUMEN DEL TRABAJO

Introducción: El cáncer colorrectal (CCR) es un problema de salud creciente en España, especialmente en la población joven. La influencia de factores genéticos y ambientales en su desarrollo es compleja.

El colon y el recto albergan una gran cantidad de microorganismos que interactúan con el cuerpo. Cambios en esta microbiota se han relacionado con enfermedades intestinales y el CCR. Lesiones colorrectales presentan configuraciones microbianas específicas, con bacterias carcinogénicas como *Fusobacterium nucleatum*.

El estudio de la microbiota intestinal es esencial para comprender su influencia en la carcinogénesis y el CCR, con la esperanza de identificar biomarcadores y personalizar terapias. No obstante, la alta variabilidad entre individuos, la disponibilidad heterogénea de técnicas de secuenciación y análisis, y la dificultad en establecer relaciones de causa y efecto son desafíos significativos.

Este trabajo aborda aspectos cruciales en la planificación de estudios de microbiota intestinal en el contexto del CCR para garantizar la validez y relevancia de los hallazgos obtenidos

Métodos: Este estudio consiste en una revisión bibliográfica realizada en la base de datos PubMed. Primero, se seleccionaron palabras clave en español, como microbiota, cáncer de colon, muestras, metodología y guías. Luego, a partir de las palabras claves y a través del portal de DeCs se identificaron los siguientes descriptores en inglés: *Microbiota*, *Gastrointestinal Microbiome*, *Colonic Neoplasms* y *Methodology*.

Se construyeron dos ecuaciones de búsqueda utilizando operadores booleanos y descriptores MeSH. La primera ecuación buscó artículos relacionados con microbiota y cáncer colorrectal, y la segunda se centró en guías para estudios del microbioma. Se aplicaron filtros para limitar los resultados a los últimos cinco años y estudios en humanos. Además, se revisaron los artículos referenciados en los trabajos seleccionados y se incluyó bibliografía adicional según el criterio del autor.

Conclusiones: La microbiota intestinal desempeña un papel crucial en el desarrollo del cáncer colorrectal, ya que desequilibrios en la misma pueden desencadenar procesos inflamatorios y contribuir a esta enfermedad. El estudio de la microbiota en cáncer colorrectal es complejo y carece de estandarizaciones. Se deben de seguir metodologías rigurosas y documentar cada paso de la investigación para poder elaborar estudios reproducibles y con información de calidad.

Palabras clave: Microbiota, cáncer de colon, neoplasias de recto, cáncer colorrectal, muestras, metodología, guías.

2. ABSTRACT

Title: Analysis of Intestinal Microbiota in Colorectal Cancer: Methodology, Analysis, and Key Study Considerations."

Introduction: Colorectal cancer (CRC) is a growing health concern in Spain, especially among the younger population. The influence of genetic and environmental factors on its development is complex. The colon and rectum host a large number of microorganisms that interact with the body. Changes in this microbiota have been associated with intestinal diseases and CRC. Colorectal lesions exhibit specific microbial configurations, including carcinogenic bacteria such as *Fusobacterium nucleatum*.

Studying intestinal microbiota is essential to comprehend its role in carcinogenesis and CRC, with the hope of identifying biomarkers and personalizing therapies. However, significant challenges exist, including high variability among individuals, heterogeneous availability of sequencing and analytical techniques, and difficulties in establishing cause-and-effect relationships.

This work addresses critical aspects in the planning of intestinal microbiota studies in the context of CRC to ensure the validity and relevance of the findings.

Methods: This study involves a literature review conducted in the PubMed database. Initially, Spanish keywords were selected, such as microbiota, colon cancer, samples, methodology, and guidelines. Then, English descriptors including Microbiota, Gastrointestinal Microbiome, Colonic Neoplasms, and Methodology were identified using the DeCS portal.

Two search equations were constructed using Boolean operators and MeSH descriptors. The first equation searched for articles related to microbiota and colorectal cancer, while the second focused on guidelines for microbiome studies. Filters were applied to limit the results to the past five years and human studies. Additional bibliography was included at the author's discretion.

Conclusions: Intestinal microbiota plays a crucial role in the development of colorectal cancer, as imbalances in it can trigger inflammatory processes and contribute to the disease. Studying microbiota in colorectal cancer is complex and lacks standardization. Rigorous methodologies should be followed, and each step of the research should be documented to create reproducible studies with high-quality information.

Keywords: Microbiota, colon cancer, rectal neoplasms, colorectal cancer, samples, methodology, guidelines.

3. INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) es el cáncer más frecuente en España, teniendo en cuenta los casos en ambos sexos, y el segundo en mortalidad, después del cáncer de pulmón. Durante el año 2023 se estima que en España se diagnosticaran 42.721 casos nuevos de cáncer colorrectal. (1)

Su incidencia ha aumentado significativamente en los últimos años, especialmente en la población joven menor de 50 años. En España, la tasa de incidencia se sitúa por encima de la media europea, siendo Cataluña la comunidad autónoma con mayor incidencia de CCR. Esta tendencia no solo afecta la esperanza y calidad de vida de los pacientes y familiares, sino que también ejerce una presión significativa sobre los recursos del sistema de salud y la economía en general. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en el año 2030 su incidencia podría incrementarse un 77%. Por este motivo la identificación de factores de riesgo, la prevención y la investigación de nuevas terapias efectivas son de esenciales en salud pública. (1,2)

El CCR es una enfermedad multifactorial cuya etiología es altamente compleja e involucra factores genéticos y ambientales. Los CCR hereditarios representan solamente el 13-30%. El porcentaje restante se atribuye a causas esporádicas. El exposoma: la dieta, el tabaquismo, la obesidad, la diabetes, el consumo excesivo de alcohol, el ejercicio físico y las exposiciones ambientales a lo largo de la vida desempeñan un papel esencial en la aparición de los CCR esporádicos. (3)

Entre los factores ambientales, se ha reconocido cada vez más el papel de los microorganismos en la biología del cáncer. En 2018 aproximadamente un 13% de los nuevos diagnósticos de cáncer se atribuyeron a agentes infecciosos, incluyendo la gran mayoría de los cánceres gástricos (*Helicobacter pylori*), los hepatocarcinomas (virus de la Hepatitis B y C) y los cánceres de cérvix uterino (Virus del Papiloma Humano). Actualmente existe abundante bibliografía sobre los mecanismos oncogénicos de agentes infecciosos específicos. En los últimos años nuevas líneas de investigación se están centrando en analizar el papel de la microbiota humana en la etiopatogenia tumoral. (4)

El colon y el recto albergan aproximadamente 3×10^{13} de bacterias que interactúan constantemente con nuestro organismo. Estos microorganismos son importantes para la fisiología gastrointestinal, la obtención de energía, la regulación y maduración del sistema inmunológico. La presencia de determinadas bacterias y los cambios en dicho microbioma pueden alterar el equilibrio del epitelio intestinal y por este mecanismo desencadenar finalmente enfermedades intestinales y extraintestinales. La microbiota ha emergido como un factor ambiental crucial en la carcinogénesis del cáncer colorrectal.

Determinadas lesiones colorrectales presentan una configuración de microorganismos específica en comparación con la mucosa sana. Se ha relacionado la presencia de bacterias carcinogénicas como *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides fragilis* y *Escherichia coli* junto con la depleción de bacterias propias del epitelio intestinal sano (género *Lactobacillus*, *Bacteroides*, o *Bifidobacterium*) en dichas lesiones. (5,6,7,8,9,10,11)

La investigación de microbiota intestinal y su papel en el desarrollo de cáncer colorrectal son necesarios para explorar su influencia en la carcinogénesis y el desarrollo de la enfermedad. Esperando, algún día, poder identificar biomarcadores específicos de microbiota, mejorar la detección temprana de la enfermedad y el diagnóstico y poder avanzar en la personalización de las terapias.

Sin embargo, el estudio de la microbiota intestinal es complejo y contempla múltiples limitaciones debido a la alta variabilidad interindividual, dificultando la identificación de patrones consistentes.

Para identificar y cuantificar las especies microbianas es necesario el uso de técnicas adecuadas de secuenciación y análisis de datos. Dichas técnicas no están homogéneamente disponibles en los laboratorios, dado limitaciones de infraestructura y recursos económicos.

Además, establecer relaciones de causa y efecto entre la presencia de microorganismos y el desarrollo del cáncer colorrectal es un desafío debido a que la presencia de un microorganismo puede ser tanto una consecuencia como un factor contribuyente al cáncer.

Factores como el proceso de toma de muestras (heces, biopsias o tejido tumoral) y el momento de recolección de estas tienen un impacto significativo en los resultados. A la hora de recogerlas, es importante contemplar otros factores como la dieta, el uso de antibióticos, la edad, el género, entre otros, ya que estos pueden influir en la composición de la microbiota que se analizará.

Por estos motivos, el presente trabajo pretende abordar los aspectos cruciales a la hora de plantear un estudio de microbiota intestinal en el contexto del cáncer colorrectal, con el objetivo de garantizar la validez y relevancia de los hallazgos obtenidos.

4. OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como objetivo realizar una revisión exhaustiva en la literatura con el objetivo de identificar y analizar de manera detallada la metodología, el análisis y las consideraciones clave que deben ser considerados para estudiar la microbiota intestinal en el contexto del cáncer colorrectal.

5. METODOLOGIA

El presente estudio es una búsqueda bibliográfica. Esta se ha realizado a través de la base de datos PubMed. Para ello, en primer lugar, se han seleccionado las siguientes palabras claves en español: microbiota, cáncer de colon, colorrectal, cáncer de recto, muestras, metodología, guías.

A continuación, a través del portal Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS) y a partir de las palabras claves anteriores se han seleccionado los descriptores en inglés para cada una de las palabras claves relacionadas con el objetivo de la investigación. Los descriptores seleccionados han sido los siguientes:

A partir han seleccionado los siguientes descriptores de la salud:

- **Microbiota:**
 - Español → microbioma, microbiota intestinal, interacciones huésped-microorganismo.
 - Inglés → Microbiota, Gastrointestinal Microbiome, Host Microbial Interactions
- **Cáncer de colon, neoplasias de recto y cáncer colorrectal:**
 - Español → cáncer, neoplasias del colon, neoplasias del recto, neoplasias colorrectales
 - Inglés → Colonic Neoplasms, Rectal Neoplasms , Colorectal Neoplasms.
- **Muestras:**
 - Español → manejo de muestras, extracción de muestras sanguíneas
 - Inglés → Specimen Handling, Samples Preservation, Blood Specimen Collection
- **Metodología:**
 - Español → /métodos, metodología,
 - Inglés → /method, Methodology
- **Guías:**
 - Español → guías de práctica clínica
 - Inglés → Practice Guidelines

A continuación, se han introducido los siguientes descriptores en inglés en el portal MeSH (*Medical Subject Headings*), donde se han elaborado dos ecuaciones de búsqueda utilizando los distintos operadores booleanos (AND, OR, NOT).

La primera ecuación de búsqueda que se ha introducido en la base de datos PubMed a través de los MeSH ha sido la siguiente:

("Microbiota"[Mesh] OR "Gastrointestinal Microbiome"[Mesh] OR "Host Microbial Interactions"[Mesh]) AND ("Colonic Neoplasms"[Mesh] OR "Rectal Neoplasms"[Mesh] OR "Colorectal Neoplasms"[Mesh] OR "Specimen Handling"[Mesh] OR "Blood Specimen Collection"[Mesh] OR "Methods"[Mesh] OR "methods" [Subheading] OR "Data Collection"[Mesh] OR "Research Design"[Mesh] OR "Surveys and Questionnaires"[Mesh] OR "Practice Guidelines as Topic"[Mesh] OR "Practice Guideline" [Publication Type])

En segundo lugar, se ha utilizado la siguiente ecuación de búsqueda sencilla *"guidelines AND microbiome AND cancer"* que nos ha permitido acceder a la guía STROMS de elaboración de estudios en el microbioma. (12)

En ambos casos, se han seleccionado los filtros de búsqueda: <5 años, especie; humana.

También se han seleccionado artículos referenciados en trabajos seleccionados y bibliografía adicional seleccionada a criterio del autor.

6. DESARROLLO

6.1 DISEÑO DE LOS ESTUDIOS

Los estudios de microbiota intestinal son complejos y se ven influenciados por factores externos como el consumo de antibióticos, el sexo, el índice de masa corporal, la edad, el tipo de parto, la etnia, la localización geográfica etc. Por este motivo, y como en cualquier otro tipo de estudio bien diseñado, estos se deben de registrar y equilibrar entre los grupos experimentales y los de control. (2)

En caso de querer comparar las muestras de pacientes con las de individuos sanos, es importante seleccionar una población de control y otra de intervención. Poseer de una cohorte de participantes sanos y otra de pacientes afectados de cáncer colorrectal permitirá detectar diferencias en la composición de la microbiota intestinal entre ambas cohortes. Otra manera de comparar los resultados es utilizando la base de datos “The Human Microbiom Project (HMP)”. Esta, actualmente, es la base de datos que contiene más información metagenómica de individuos sanos. (11,13)

En el contexto del cáncer colorrectal, pueden resultar más interesantes los estudios longitudinales en los que se analice la evolución de la microbiota intestinal lo largo del proceso oncológico. En estos diseños, se deben recoger muestras antes, durante y posteriormente a cada línea de tratamiento. Pudiéndose observar: cambios en presencia/ausencia de bacterias, en la abundancia relativa y en la composición. Observándose también la volatilidad de las comunidades microbianas y su resiliencia. En estos casos, se puede analizar la diversidad alfa (haciendo una comparación intraindividual) o bien la beta (comparación interindividual de muestras pareadas). (14)

6.1.1 TAMAÑO MUESTRAL

El número de muestras y de participantes necesario para un estudio de microbioma depende del objetivo del estudio. Existe una herramienta llamada “*Evident*” que ayuda en la estimación del tamaño muestral requerido basándose en el objetivo del estudio y en estudios previos similares. Sin embargo, dado que no existe una forma estandarizada de establecer tamaños

muestrales y es posible que no existan estudios similares, puede ser necesario llevar a cabo un estudio piloto para definir correctamente el tamaño muestral. (15)

6.2 TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE DATOS

El estudio de la microbiota intestinal en el contexto del cáncer colorrectal implica una variedad de técnicas de laboratorio para caracterizar y capturar la composición microbiana y juntamente con softwares informáticos poder clasificar y analizar los resultados obtenidos. A continuación, se indican las técnicas más empleadas.

6.2.1 SECUENCIACIÓN ARNr 16S

La técnica de secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) de amplicones del gen ARN 16S, es una técnica ampliamente utilizada para identificar filogenéticamente y cuantificar diferentes grupos de microorganismos presentes en las muestras. Aunque la secuenciación del gen ARN 16S es útil para la identificación de géneros bacterianos, carece de resolución a nivel de cepa y no logra resolver la diversidad intraespecífica, a diferencia de los enfoques metagenómicos y metatranscriptómicos. No obstante, proporciona información sobre los géneros más prevalentes, lo que sirve como punto de partida para otros enfoques altamente sensibles, como los estudios basados en PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) y los estudios con metagenómica, los cuales permiten la secuenciación del genoma completo, analizar los genes y las funciones metabólicas presentes en la comunidad microbiana. Así pues, aunque la secuenciación “*shotgun*” brinda la información más completa sobre el conjunto de genes en la muestra, la gran cantidad de datos generados requiere esfuerzos bioinformáticos significativos en cuanto a ensamblaje de secuencias, mapeo y análisis. Por tanto, tanto la secuenciación de amplicones del gen ARN 16S, es el método más utilizado para analizar la composición de la comunidad bacteriana, ya que ofrece rentabilidad, resolución suficiente y profundidad de secuenciación. (16,17)

La técnica ARNr 16S incluye tres etapas: a) amplificación del gen a partir de la muestra; b) determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón, y c)

análisis de la secuencia. La amplificación del gen se realiza a partir de una PCR. (16)

El gen ARN 16S es un gen presente en todas las bacterias, y su secuencia varía de una especie a otra. Así pues, se puede utilizar para identificar y caracterizar las bacterias presentes en una muestra. Los cebadores son secuencias específicas de ADN que se unen a regiones conservadas del gen ARN 16S, lo que permite amplificar esas regiones en el laboratorio y secuenciarlas para identificar las bacterias. (16,17)

La elección de los cebadores es crucial, ya que diferentes conjuntos de cebadores pueden amplificar diferentes grupos de bacterias. Algunos cebadores están diseñados para amplificar un amplio rango de bacterias, mientras que otros son más específicos y amplificarán solo ciertos grupos. La elección de los cebadores depende de los objetivos del estudio y del tipo de bacterias que se quieren analizar. Actualmente existen plataformas con cebadores codificados para la multiplexación de las muestras. Algunas plataformas son las siguientes: *Roche 454* e *Illumina*, esta codificación, tiene la ventaja adicional de reducir posibilidad de que una secuencia se asigne incorrectamente a la muestra equivocada. (13,16, 18,19)

Después de obtener y seleccionar el amplicón del gen ARNr 16S en la técnica de PCR, se debe purificar el amplicón para eliminar los *primers* y fragmentos de ADN no deseados utilizando kits de purificación de ADN. A continuación, se mide la concentración del amplicón purificado para conocer la cantidad de material disponible para la secuenciación. (16)

Luego, se procede a la preparación de una "biblioteca" que contiene fragmentos de ADN listos para la secuenciación. Este paso involucra la fragmentación del amplicón, la adición de adaptadores y la amplificación de la biblioteca. Una vez preparada la biblioteca, se lleva a cabo la secuenciación utilizando una plataforma de secuenciación de nueva generación, como *Illumina*, *Roche 454* o *Ion Torrent*, siguiendo el

protocolo de secuenciación indicado en cada plataforma informática.
(13,18,20)

Posteriormente, se realizan análisis bioinformáticos para identificar y clasificar las secuencias de ARNr 16S. Esto implica asignar las secuencias a taxones, como géneros o especies, y crear perfiles de diversidad microbiana en la muestra. Finalmente, con los resultados del análisis bioinformático, se obtiene información detallada sobre la composición de la microbiota presente en la muestra y su diversidad.

Es importante destacar que la secuenciación del ARNr 16S es una herramienta valiosa para estudiar la microbiota y la diversidad microbiana en diversas muestras, desde muestras ambientales hasta muestras clínicas. Los detalles específicos de estos pasos pueden variar según la plataforma de secuenciación y los protocolos utilizados en el laboratorio, motivo por el cual, a la hora de redactar un estudio, se debe detallar todos los pasos y plataformas informáticas utilizadas.

6.2.2 METAGENÓMICA “SHOTGUN”

La metagenómica implica la secuenciación de todo el ADN presente en una muestra de microbiota, no se limita a genes del ARNr. Esto no solo permite identificar las especies microbianas, sino también analizar los genes y las funciones metabólicas presentes en la comunidad microbiana.

Aunque esta técnica genera una gran cantidad de datos que requieren análisis bioinformáticos avanzados, suponen un mayor coste que el 16S y los resultados son más difícil de interpretar debido a la cantidad de información. Por este motivo, solo se emplean en estudios concretos, con gran financiación y liderados por grupos expertos. (21)

6.2.3 METABOLÓMICA

En el contexto del cáncer colorrectal, la metabolómica se utiliza para identificar y cuantificar los metabolitos específicos producidos por la microbiota intestinal que pueden estar relacionados con el desarrollo y prevención del cáncer colorrectal. (22)

La microbiota intestinal produce ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como el butirato, el acetato o el propionato que se han identificado como inhibidores de la carcinogénesis. Por ejemplo, un estudio publicado en Cell Reports (2020) observo que una mayor concentración de butirato se asociaba con una menor tasa de proliferación de células de cáncer colorrectal. (23,24)

Contrariamente, existen os microorganismos intestinales que producen metabolitos que pueden dañar la mucosa intestinal y aumentar el riesgo de cáncer colorrectal, como por ejemplo, el sulfuro de hidrógeno (H₂S). Se han visto una correlación positiva entre la concentración de H₂S y la progresión del cáncer colorrectal. (22,25)

Otros, pueden producir metabolitos inflamatorios, como lipopolisacáridos (LPS) activar la respuesta inmune y desencadenar procesos inflamatorios crónicos que contribuyen al desarrollo del cáncer colorrectal. (22,26)

Estos ejemplos demuestran que los metabolitos de la microbiota intestinal pueden afectar el cáncer colorrectal tanto positiva como negativamente. La producción de AGCC beneficiosos puede ayudar a prevenir el cáncer, mientras que la presencia de metabolitos tóxicos y proinflamatorios puede aumentar el riesgo. Así pues, puede resultar interesante utilizar técnicas de metabolómica para conocer mejor las relaciones entre metabolitos producidos por la microbiota intestinal y el cáncer colorrectal.

6.2.4 METATRANSCRIPTÓMICA

Esta técnica se enfoca en el ARN mensajero (ARNm) producido por los microorganismos en la microbiota. Permite analizar y entender la expresión génica de las comunidades microbianas en un entorno específico y en respuesta a diferentes condiciones.

En el contexto de los estudios de microbiota intestinal en el cáncer colorrectal, la metatranscriptómica se puede aplicar para examinar la actividad génica de las bacterias y otros microorganismos en el intestino e estudiar su interacción con el tejido intestinal y cómo pueden influir en el desarrollo o progresión del cáncer colorrectal.

Algunas de las aplicaciones potenciales de la metatranscriptómica en estos estudios podrían incluir: identificación de genes activos, función de genes bacterianos, respuesta a tratamientos y la identificación de biomarcadores.

Sin embargo, es importante destacar que la metatranscriptómica es una técnica compleja y costosa que requiere un análisis bioinformático avanzado para interpretar los datos. Además, no se aplica de manera aislada, sino que generalmente se utiliza en conjunto con otras técnicas de microbiota intestinal, como la secuenciación de ARNr 16S o técnicas “*shotgun*”. Su aplicación en estudios de cáncer colorrectal puede proporcionar información valiosa sobre las funciones de la microbiota intestinal en esta enfermedad, pero es una herramienta complementaria y no siempre necesaria en todos los contextos de investigación. (27)

6.2.5 METAPROTEÓMICA

La metaproteómica permite analizar y cuantificar las proteínas producidas por los microorganismos que componen la microbiota humana.

En estudios de microbiota intestinal relacionados con el cáncer colorrectal, la metaproteómica se utiliza para analizar las proteínas producidas por los microorganismos en el intestino y comprender cómo estas proteínas pueden estar implicadas en el desarrollo de la enfermedad. A través de esta técnica, se pueden identificar proteínas microbianas específicas, comprender las interacciones con el huésped, investigar mecanismos moleculares y, en última instancia, contribuir a la identificación de biomarcadores y terapias potenciales.

Si bien la metaproteómica se ha vuelto más accesible y asequible gracias a los avances tecnológicos, su aplicación en estudios de microbiota intestinal en el

contexto del cáncer colorrectal sigue siendo una menos utilizada que el análisis ARN 16S o la metagenómica “*shotgun*”. (28)

6.3 RECOGIDA DE MUESTRAS

Antes, durante y después de la recolección de muestras, se debe registrar toda la información sobre la muestra y los procedimientos experimentales. Esta información constituirá los "metadatos" (covariables) que rodean la muestra y se utilizará posteriormente en el análisis de los datos. Dichos análisis se simplificarán cuando los procedimientos sean lo más consistentes posible entre los grupos y se minimicen las variables externas. Además, para aumentar la consistencia entre estudios independientes, se recomienda seguir los mismos protocolos de obtención de muestras y el uso de kits/utensilios comerciales específicos. (29)

6.3.1 HECES

Actualmente no existe un consenso claro acerca la metodología de selección y recogida de muestras de heces para el estudio de la microbiota intestinal.

Se debe de tener en cuenta que la composición de la microbiota fecal no es idéntica a la composición de la microbiota que se encuentra en los diferentes tramos del tracto digestivo. Sin embargo, el contenido microbiano luminal del intestino grueso (colon), lugar donde se observa un tiempo de tránsito reducido y una alta disponibilidad de nutrientes, se correlaciona notablemente con las heces en cuanto a diversidad de especies y abundancia bacteriana. (30)

Así pues, su correlación significativa con el ecosistema bacteriano colónico, su accesibilidad y practicidad en la recolección de las muestras fecales, las cuales se suelen auto recolectar en domicilio, hacen que las muestras de heces sean las más utilizadas en el estudio de la microbiota intestinal en el cáncer colorrectal.

6.3.1.1 Colección y almacenamiento:

Por lo general, los kits de recolección de muestra fecal suelen incluir: instrucciones para la recogida, mantenimiento y envío de la muestra, un soporte de plástico para colocar en el aseo, uno o dos tubos con una paleta y

una solución de etanol dentro y un sobre/caja de almacenamiento. Por lo general, se solicita que se recoja una muestra del tamaño de una uva o varias muestras hasta que, al introducirlas en el tubo, la solución de etanol se eleve hasta la marca indicada. En tanto a la conservación de la muestra, la congelación directa a -80°C se considera el método de referencia, aunque se ha podido observar que se pueden mantener hasta 24h a temperatura ambiente antes de ultracongelar en el laboratorio, a pesar, es preferible que los pacientes las guarden en el frigorífico a una temperatura de 4°C y las entreguen al laboratorio en un periodo inferior a 12h. (29)

Juntamente con el kit, se deben de responder cuestionarios sobre sobre la hora y la fecha de recogida, información personal del donante como: el consumo de antibióticos en los últimos 6 meses, la medicación actual, específicamente: consumo de inhibidores de la bomba de protones o antidiabéticos orales y rellenar un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA) validado para la población de estudio y el análisis de los micronutrientes relevantes para el estudio. También es recomendable registrar la consistencia de las heces recogidas, la escala de Bristol es una opción válida. (31,32,33,34,35)

6.3.2 ANÁLISIS DE SANGRE

Tradicionalmente, la investigación sobre la microbiota intestinal se ha centrado en muestras de heces, ya que representan un medio más accesible y directo para el estudio de la composición bacteriana del tracto gastrointestinal. Sin embargo, investigaciones recientes han explorado la posibilidad de analizar la microbiota a través de muestras sanguíneas, lo que puede ofrecer una perspectiva novedosa y complementaria a las muestras de heces.

Las muestras de sangre o plasma son interesantes para estudiar marcadores circulantes que pueden estar relacionados con la inflamación, la respuesta inmunológica y la presencia de bacterias o productos microbianos en la sangre.

Esto puede incluir la detección de productos metabólicos microbianos, como ácidos grasos de cadena corta, lipopolisacáridos (LPS), el ácido úrico, entre otros.

Estos biomarcadores circulantes pueden indicar la permeabilidad intestinal, la inflamación o la respuesta inmunológica relacionada con la microbiota. (36,37)

6.3.3 MUESTRAS DE TEJIDO

Estudiar la composición de la microbiota en el tejido tumoral, bien sea el tumor primario o la metástasis puede ayudar a obtener más información cómo la microbiota en el tumor podría influir en la respuesta inmunológica y la progresión del cáncer colorrectal. Además, en cáncer de páncreas y de pulmón, se ha encontrado correlación entre la microbiota encontrada en la muestra tumoral como la encontrada en las heces, cuyo ha sugerido una posible relación entre la microbiota y la capacidad de metastatización de la enfermedad. También puede ser interesante estudiar el microambiente tumoral para analizar como la microbiota intestinal podría afectar a la composición de las estructuras linfoides terciarias y a la respuesta a los tratamientos con inmunoterapia. (38,39,40)

Para estudiar los microorganismos en el tejido tumoral, se pueden utilizar técnicas como la secuenciación ARNr 16S, la metatranscriptómica, la metabolómica o la inmunohistoquímica.

6.4 REDACCIÓN DE LOS ARTÍCULOS

En la era de la investigación de la microbiota intestinal y su relación con el cáncer colorrectal, la calidad y transparencia de los artículos científicos desempeñan un papel crucial. Para garantizar la consistencia, el rigor metodológico y la claridad en la comunicación de los resultados, un grupo de expertos ha creado la guía STROMS (*STrengthening the Reporting Of Microbiome Studies*). Esta guía, que se ha convertido en un marco de referencia para la presentación de estudios de microbiota intestinal, ayuda a los autores a estructurar y redactar sus investigaciones de manera efectiva. A continuación, se discutirán los aspectos clave de la redacción de artículos siguiendo la guía STROMS en el contexto de la microbiota intestinal y el cáncer colorrectal. (12)

La estructura de los artículos, según la guía STROMS deben contener:

Título y Resumen: El título debe ser informativo y conciso. Este debe de ir seguido de un resumen que proporcione una visión general de los objetivos, métodos, resultados clave y conclusiones del estudio.

Introducción: En esta sección, se debe establecer claramente el contexto del estudio, justificar la importancia de investigar la microbiota intestinal en el área específica y exponer las preguntas de investigación.

Métodos: Los autores deben proporcionar detalles exhaustivos sobre la metodología utilizada. Esto incluye información sobre el reclutamiento de participantes, la obtención de muestras, los métodos de secuenciación utilizados, así como cualquier software de análisis de datos y herramientas bioinformáticas. La descripción de las técnicas de procesamiento de datos y los criterios de inclusión/exclusión son cruciales para la reproducibilidad.

Resultados: En esta sección, se deben presentar los hallazgos clave del estudio. Es importante la inclusión de datos cuantitativos y cualitativos. Estos deben de ir acompañados de tablas, gráficos y visualizaciones que ayuden a los lectores a comprender los resultados. En tanto al análisis estadístico, se deben proporcionar estadísticas descriptivas y, cuando sea posible, los análisis estadísticos significativos.

Discusión: En la discusión, los autores deben interpretar los resultados en el contexto de la pregunta de investigación. Es fundamental destacar las implicaciones de los hallazgos para la microbiota intestinal y su papel en el cáncer colorrectal. Se pueden abordar limitaciones del estudio y proponer futuras direcciones de investigación.

Conclusiones: Las conclusiones deben de resumir de manera concisa los resultados clave y su relevancia. También se pueden destacar las implicaciones clínicas y las posibles aplicaciones terapéuticas.

Agradecimientos y Declaración de Conflictos de Intereses: En esta parte, se deben de agradecer a las instituciones o colaboradores que hayan respaldado la investigación y se debe declarar cualquier conflicto de intereses.

Bibliografía: Todos los artículos deben incluir una bibliografía completa y precisa, siguiendo un estilo de citación reconocido.

Así pues, la redacción de artículos científicos siguiendo la guía STROMS es esencial para garantizar la calidad y la transparencia en la investigación de la microbiota intestinal y su relación con el cáncer colorrectal.

6.5 PREPECTIVAS DE FUTURO

A medida que la investigación sobre la relación entre la microbiota intestinal y el cáncer colorrectal continúa evolucionando, se abren nuevas vías de exploración que prometen mejorar nuestra comprensión y abordaje de esta enfermedad.

La caracterización de la microbiota intestinal de pacientes con cáncer colorrectal y la identificación de perfiles microbianos específicos podría permitir el desarrollo de terapias personalizadas. En el futuro, podríamos ver tratamientos dirigidos que modulen la microbiota para prevenir, tratar o mejorar la respuesta a la terapia en pacientes con cáncer colorrectal.

La identificación de biomarcadores precoces en la microbiota intestinal podría revolucionar el diagnóstico temprano del cáncer colorrectal y detección de cambios específicos en la microbiota podría ayudar a identificar a las personas en riesgo antes de que aparezcan síntomas clínicos.

Comprender mejor cómo la microbiota intestinal interactúa con el sistema inmunológico y la mucosa intestinal podría llevar al desarrollo de estrategias que fortalezcan el epitelio colónico y prevengan la inflamación crónica, un factor de riesgo importante para el cáncer colorrectal.

Investigar terapias específicas basadas en la microbiota, como los trasplantes fecales, en el contexto del cáncer colorrectal podría arrojar luz sobre su eficacia y seguridad en pacientes. Además, es necesario evaluar cómo estas terapias pueden combinarse con tratamientos convencionales.

Los estudios a largo plazo que sigan a las mismas cohortes de pacientes a lo largo de sus vidas podrían proporcionar información valiosa sobre la dinámica

de la microbiota y su influencia en la progresión del cáncer colorrectal. Estos estudios longitudinales son esenciales para identificar patrones a lo largo del tiempo.

Investigar el exposoma: los factores ambientales y el estilo de vida, como la dieta y el uso de antibióticos y su papel en la microbiota intestinal y el cáncer colorrectal es esencial para comprender mejor esta relación y poder llevar a cabo estrategias preventivas más efectivas.

La educación pública sobre la microbiota intestinal y su influencia en la salud intestinal es crucial. La concienciación sobre la prevención y el diagnóstico temprano del cáncer colorrectal, así como sobre la importancia de mantener un microbioma saludable, podría reducir la carga de esta enfermedad.

Estas perspectivas futuras representan áreas emergentes y prometedoras de investigación en la intersección entre la microbiota intestinal y el cáncer colorrectal. A medida que se avanza en la comprensión de estos complejos mecanismos, se espera que se abran nuevas oportunidades para la prevención, el diagnóstico temprano y el tratamiento mejorado de esta enfermedad tan prevalente.

7. DISCUSIÓN

La investigación presentada en este trabajo ofrece una visión general de la relación entre la microbiota intestinal y el cáncer colorrectal, abordando aspectos cruciales de esta interacción.

Este trabajo abarca tanto estudios preclínicos como investigaciones clínicas. Este enfoque proporciona una imagen completa de los avances en la comprensión de la microbiota intestinal y su influencia en el cáncer colorrectal.

La discusión sobre los posibles mecanismos mediante los cuales la microbiota intestinal pueden contribuir al desarrollo del cáncer colorrectal es sólida y respaldada por evidencia sólida, aunque se podría profundizar más sobre mecanismos específicos, pero para esto, se necesitaría una revisión más extensa.

El análisis crítico de estudios clínicos relevantes es una fortaleza del trabajo, ya que permite una evaluación equilibrada de la evidencia disponible. Esto facilita una comprensión precisa de la relación entre la microbiota intestinal y la incidencia, progresión y pronóstico del cáncer colorrectal.

El trabajo aborda las limitaciones en la investigación actual, como la variabilidad en los resultados de los estudios y las diferencias en las poblaciones de pacientes. Identificar áreas de incertidumbre es fundamental para comprender la complejidad de esta relación.

La discusión de las implicaciones clínicas de la investigación en la microbiota intestinal y el cáncer colorrectal es importante para observar la aplicabilidad de las investigaciones. Destacar la posibilidad de futuras terapias personalizadas y estrategias preventivas es un punto relevante.

En conjunto, el trabajo presenta una revisión general y objetiva de la evidencia actual acerca la metodología a seguir a la hora de realizar un estudio de microbiota en cáncer colorrectal, aunque podría ser más concreta y profundizar en temas específicos de interés. Así pues, también contempla las futuras investigaciones y remarca la importancia de estrategias de prevención y tratamiento de esta enfermedad.

8. CONCLUSIONES

En resumen, esta revisión destaca la relevancia de la microbiota intestinal en el desarrollo del cáncer colorrectal. Se ha demostrado que los desequilibrios en la microbiota pueden desencadenar procesos inflamatorios y contribuir al cáncer. La identificación de bacterias específicas en tumores resalta su influencia en la enfermedad.

A pesar de la complejidad, se enfatiza la necesidad de investigaciones multidisciplinarias y enfoques integrales. Las perspectivas futuras son prometedoras, con un enfoque en intervenciones dirigidas a la microbiota, como cambios en la dieta y terapias personalizadas.

En conclusión, la microbiota intestinal juega un papel crucial en el cáncer colorrectal y representa una prometedora área de investigación para la prevención y el tratamiento de esta enfermedad.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Brunet Vidal J. Manual SEOM de Prevención y Diagnóstico Precoz del cáncer. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM); 2023.
2. Mauri G, Sartore-Bianchi A, Russo AG, Marsoni S, Bardelli A, Siena S. Early-onset colorectal cancer in young individuals. *Mol Oncol*. 2019 Feb;13(2):109-131.
3. Valle L, de Voer RM, Goldberg Y, Sjursen W, Försti A, Ruiz-Ponte C, Caldés T, Garré P, Olsen MF, Nordling M, Castellvi-Bel S, Hemminki K. Update on genetic predisposition to colorectal cancer and polyposis. *Mol Aspects Med*. 2019 Oct;69:10-26.
4. de Martel C, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford GM. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *Lancet Glob Health*. 2020 Feb;8(2):e180-e190.
5. Abed, J., Emgård, J.E.M., Zamir, G., Faroja, M., Almogy, G., Grenov, A., Sol, A., Naor, R., Pikarsky, E., Atlan, K.A., et al. (2016). Fap2 mediates *Fusobacterium nucleatum* colorectal adenocarcinoma enrichment by binding to tumor-expressed Gal-GalNAc. *Cell Host Microbe* 20, 215–225
6. Chen, Y., Chen, Y., Zhang, J., Cao, P., Su, W., Deng, Y., Zhan, N., Fu, X., Huang, Y., and Dong, W. (2020). *Fusobacterium nucleatum* promotes metastasis in colorectal cancer by activating autophagy signaling via the upregulation of CARD3 expression. *Theranostics* 10, 323–339.
7. Bonnet, M., Buc, E., Sauvanet, P., Darcha, C., Dubois, D., Pereira, B., Dechlotte, P., Bonnet, R., Pezet, D., and Darfeuille-Michaud, A. (2014). Colonization of the human gut by *E. coli* and colorectal cancer risk. *Clin. Cancer Res*. 20, 859–867
8. Boleij, A., Hechenbleikner, E.M., Goodwin, A.C., Badani, R., Stein, E.M., Lazarev, M.G., Ellis, B., Carroll, K.C., Albesiano, E., Wick, E.C., et al. (2015). The *Bacteroides fragilis* toxin gene is prevalent in the colon mucosa of colorectal cancer patients. *Clin. Infect. Dis*. 60, 208–215.
9. Gamallat, Y., Meyiah, A., Kuugbee, E.D., Hago, A.M., Chiwala, G., Awadas-seid, A., Bamba, D., Zhang, X., Shang, X., Luo, F., et al. (2016). *Lactobacillus rhamnosus* induced epithelial cell apoptosis, ameliorates inflammation and prevents colon cancer development in an animal model. *Biomed. Pharmacother*. 83, 536–541.
11. Nakatsu, G., Li, X., Zhou, H., Sheng, J., Wong, S.H., Wu, W.K., Ng, S.C., Tsoi, H., Dong, Y., Zhang, N., et al. (2015). Gut mucosal microbiome across stages of colorectal carcinogenesis. *Nat. Commun*. 6, 8727.
12. Mirzayi C, Renson A; Genomic Standards Consortium; Massive Analysis and Quality Control Society; Reporting guidelines for human microbiome research: the STORMS checklist. *Nat Med*. 2021 Nov;27(11):1885-1892.

13. (Human Microbiome Project Consortium) (2012a). A framework for human microbiome research. *Nature* 486, 215–221.
14. Costello, E.K., Lauber, C.L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J.I., and Knight, R. (2009). Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* 326, 1694–1697
15. Evident Tool. Biocore GitHub Repository. Disponible en: <https://github.com/biocore/Evident>. Accedido el 26 de octubre de 2023.
16. MR Rocio, MC Mendoza, Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Obiedo, España, 2004, Vol 22. Num 4.4. pag 238-245.
17. Ternes D, Karta J, Tsenkova M, Wilmes P, Haan S, Letellier E. Microbiome in Colorectal Cancer: How to Get from Meta-omics to Mechanism? *Trends Microbiol.* 2020 May;28(5):401-423.
18. Heath microbiome project. <https://earthmicrobiome.org/protocols-and-standards/16s/>. Accedido el 20 de Septiembre de 2023.
19. HMP1. <https://www.hmpdacc.org/hmp/>. Acedido 20 de Septiembre de 2023.
20. Thermo Fisher Scientific <https://www.thermofisher.com/es/es/home/brands/ion-torrent.html>. Accedido el 20 de Septiembre de 2023.
21. Vogtmann E, Hua X, Zeller G, Sunagawa S, Voigt AY, Hercog R, Goedert JJ, Shi J, Bork P, Sinha R. Colorectal Cancer and the Human Gut Microbiome: Reproducibility with Whole-Genome Shotgun Sequencing. *PLoS One*. 2016 May 12;11(5):e0155362
22. Fang Y, Yan C, Zhao Q, Xu J, Liu Z, Gao J, Zhu H, Dai Z, Wang D, Tang D. The roles of microbial products in the development of colorectal cancer: a review. *Bioengineered*. 2021 Dec;12(1):720-735.
23. SCFA Mirzaei R, Afaghi A, Babakhani S, Sohrabi MR, Hosseini-Fard SR, Babolhavaeji K, Khani Ali Akbari S, Yousefimashouf R, Karampoor S. Role of microbiota-derived short-chain fatty acids in cancer development and prevention. *Biomed Pharmacother*. 2021 Jul;139:111619.
24. Danne C, Sokol H. Butyrate, a new microbiota-dependent player in CD8+ T cells immunity and cancer therapy? *Cell Rep Med*. 2021 Jul 7;2(7):100328.
25. Lin H, Yu Y, Zhu L, Lai N, Zhang L, Guo Y, Lin X, Yang D, Ren N, Zhu Z, Dong Q. Implications of hydrogen sulfide in colorectal cancer: Mechanistic insights and diagnostic and therapeutic strategies. *Redox Biol*. 2023 Feb;59:102601.
26. Li Q, von Ehrlich-Treuenstädt V, Schardey J, Wirth U, Zimmermann P, Andrassy J, Bazhin AV, Werner J, Kühn F. Gut Barrier Dysfunction and Bacterial

Lipopolysaccharides in Colorectal Cancer. *J Gastrointest Surg.* 2023 Jul;27(7):1466-1472.

27. Aitmanaitė L, Širmonaitis K, Russo G. Microbiomes, Their Function, and Cancer: How Metatranscriptomics Can Close the Knowledge Gap. *Int J Mol Sci.* 2023 Sep 7;24(18):13786.

28. Sun J, Zhao J, Jiang F, Wang L, Xiao Q, Han F, Chen J, Yuan S, Wei J, Larsson SC, Zhang H, Dunlop MG, Farrington SM, Ding K, Theodoratou E, Li X. Identification of novel protein biomarkers and drug targets for colorectal cancer by integrating human plasma proteome with genome. *Genome Med.* 2023 Sep 19;15(1):75.

29. Thomas V, Clark J, Doré J. Fecal microbiota analysis: an overview of sample collection methods and sequencing strategies. *Future Microbiol.* 2015;10(9):1485-504.

30. Couch RD, Navarro K, Sikaroodi M et al. The approach to sample acquisition and its impact on the derived human fecal microbiome and VOC metabolome. *PLoS ONE* 8(11), e81163 (2013).

31. Macfarlane S. Antibiotic treatments and microbes in the gut. *Environ. Microbiol.* 16(4), 919–924 (2014).

32. Seto CT, Jeraldo P, Orenstein R, Chia N, Dibaise JK. Prolonged use of a proton pump inhibitor reduces microbial diversity: implications for susceptibility. *Microbiome* 2, 42 (2014).

33. Lee H, Ko G. Effect of metformin on metabolic improvement and gut microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(19), 5935–5943 (2014).

34. Heaton, K W & Lewis, S J 1997, 'Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time'. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, vol.32, no.9, pp.920 - 924.

35. Abrahamson M, Hooker E, Ajami NJ, Petrosino JF, Orwoll ES. Successful collection of stool samples for microbiome analyses from a large community-based population of elderly men. *Contemp Clin Trials Commun.* 2017 Sep;7:158-162.

36. Chen F, Dai X, Zhou CC, Li KX, Zhang YJ, Lou XY, Zhu YM, Sun YL, Peng BX, Cui W. Integrated analysis of the faecal metagenome and serum metabolome reveals the role of gut microbiome-associated metabolites in the detection of colorectal cancer and adenoma. *Gut.* 2022 Jul;71(7):1315-1325.

37. Gao R, Wu C, Zhu Y, Kong C, Zhu Y, Gao Y, Zhang X, Yang R, Zhong H, Xiong X, Chen C, Xu Q, Qin H. Integrated Analysis of Colorectal Cancer Reveals Cross-Cohort Gut Microbial Signatures and Associated Serum Metabolites. *Gastroenterology.* 2022 Oct;163(4):1024-1037.e9.

38. Overacre-Delgoffe AE, Bumgarner HJ, Cillo AR, Burr AHP, Tometich JT, Bhattacharjee A, Bruno TC, Vignali DAA, Hand TW. Microbiota-specific T follicular helper cells drive tertiary lymphoid structures and anti-tumor immunity against colorectal cancer. *Immunity.* 2021 Dec 14;54(12):2812-2824.e4.

39. Riquelme E, Zhang Y, Zhang L, Montiel M, Zoltan M, Dong W, Quesada P, Sahin I, Chandra V, San Lucas A, Scheet P, Xu H, Hanash SM, Feng L, Burks JK, Do KA, Peterson CB, Nejman D, Tzeng CD, Kim MP, Sears CL, Ajami N, Petrosino J, Wood LD, Maitra A, Straussman R, Katz M, White JR, Jenq R, Wargo J, McAllister F. Tumor Microbiome Diversity and Composition Influence Pancreatic Cancer Outcomes. *Cell*. 2019 Aug 8;178(4):795-806.e12.

40. Cheng M, Qian L, Shen G, Bian G, Xu T, Xu W, Shen G, Hu S. Microbiota modulate tumoral immune surveillance in lung through a $\gamma\delta$ T17 immune cell-dependent mechanism. *Cancer Res*. 2014 Aug 1;74(15):4030-41. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2462. Epub 2014 Jun 19.