



FACULTADE DE CIENCIAS

GRAO EN BIOQUÍMICA

D. Roberto Cuñas Arias

**EVALUACIÓN DE LA FIRMA BACTERIANA EN MUESTRAS DE ADN
FECAL COMO HERRAMIENTA COMPLEMENTARIA PARA LA
DETECCIÓN TEMPRANA DEL CÁNCER COLORRECTAL**

**AVALIACIÓN DA FIRMA BACTERIANA EN MOSTRAS DE ADN FECAL
COMO FERRAMENTA COMPLEMENTARIA PARA A DETECCIÓN
TEMPERÁ DO CÁNCER COLORRECTAL**

**EVALUATION OF BACTERIAL SIGNATURE IN FECAL DNA SAMPLES
AS A COMPLEMENTARY TOOL FOR EARLY DETECTION OF
COLORECTAL CANCER**

Trabajo Fin de Grao

Junio 2024

ÍNDICE

1	RESUMEN	1
	RESUMO	2
	ABSTRACT	3
2	INTRODUCCIÓN	4
2.1	CÁNCER DE COLON (CCR)	4
2.2	CRIBADO DE CÁNCER DE COLON.....	6
2.3	MICROBIOTA INTESTINAL ASOCIADA A CCR	7
2.3.1	<i>Microbiota intestinal</i>	7
2.3.2	<i>Función de la microbiota intestinal</i>	12
2.3.3	<i>Microbiota relacionada con el CCR</i>	14
2.4	BIOMARCADORES DE CCR	16
2.5	RAID-CRC	17
3	HIPÓTESIS	18
3.1	HIPÓTESIS PRINCIPAL	18
4	OBJETIVOS	18
4.1	OBJETIVO PRIMARIO.....	18
4.2	OBJETIVOS SECUNDARIOS	18
5	MATERIAL Y MÉTODOS	18
5.1	TIPO DE ESTUDIO	18
5.2	DISEÑO EXPERIMENTAL	19
5.2.1	<i>Procedimientos preanalíticos</i>	19
5.2.2	<i>Selección de pacientes</i>	19
5.2.3	<i>Tamaño muestral</i>	20
5.2.4	<i>Clasificación de lesiones</i>	21
5.2.5	<i>Consideraciones éticas</i>	22
5.3	ANÁLISIS DE SANGRE OCULTA EN HECES	22
5.4	EXTRACCIÓN DE ADN FECAL	22
5.5	ANÁLISIS DE MICROBIOTA POR QPCR	23
5.5.1	<i>Descripción del análisis</i>	24
5.5.2	<i>Procedimiento técnico</i>	25
5.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
5.6.1	<i>Estadística descriptiva</i>	28
5.6.2	<i>Evaluación de las pruebas diagnósticas</i>	28
5.6.3	<i>Análisis estadísticos complementarios</i>	29
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
6.1	POBLACIÓN DE ESTUDIOS	30
6.2	RAID-CRC SCREEN	32
6.3	ABUNDANCIA RELATIVA DE LA MICROBIOTA	33
6.4	ESTUDIO DE CORRELACIÓN.....	36
6.5	DISCUSIÓN	37
7	CONCLUSIONES	41
8	BIBLIOGRAFÍA	42

1 RESUMEN

El **cáncer colorrectal (CCR)** es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, subrayando la importancia de la detección temprana para mejorar las tasas de supervivencia de los pacientes. En este contexto, se llevó a cabo un proyecto de investigación utilizando el análisis **RAID-CRC Screen**, una técnica innovadora que combina la extracción de **ADN fecal** con el análisis de la **firma bacteriana** mediante **qPCR** (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real).

El objetivo principal de esta investigación fue evaluar si la incorporación del análisis **RAID-CRC Screen** (qPCR de ADN fecal para la firma bacteriana) podría mejorar las características del **Test Inmunohistoquímico Fecal (FIT)**, reduciendo potencialmente la necesidad de realizar pruebas invasivas. La hipótesis central planteaba que las alteraciones en la firma bacteriana fecal podrían diferenciar entre casos verdaderamente positivos de CRC y falsos positivos inducidos por otros factores, como hemorragias gastrointestinales menores.

Para lograr este objetivo, se obtuvieron muestras de pacientes que consintieron participar en el estudio, seguidas de la extracción de **ADN fecal** y el análisis de la **firma bacteriana** mediante **qPCR**. Esto permitió identificar posibles desequilibrios en la microbiota intestinal asociados con el **CCR**.

Los resultados obtenidos concluyeron que el análisis de la microbiota mejora la sensibilidad, pero sin aportar una mejora significativa sobre la prueba **FIT**. Además, solo se encontró una diferencia significativa entre los diagnósticos entre los cinco grupos de bacterias estudiadas, lo que sugiere la necesidad de modificar las especies de bacterias analizadas para mejorar la prueba.

Palabras clave: Cáncer colorrectal, Cribado de cáncer colorrectal, ADN fecal, Microbiota intestinal, qPCR.

RESUMO

O **cancro colorrectal (CCR)** é unha das principais causas de morbilidade e mortalidade a nivel mundial, subliñando a importancia da detección temperá para mellorar as taxas de supervivencia dos pacientes. Neste contexto, levouse a cabo un proxecto de investigación utilizando a análise **RAID-CRC Screen**, unha técnica innovadora que combina a extracción de **ADN fecal** coa análise da firma bacteriana mediante **qPCR** (reacción en cadea da polimerasa cuantitativa en tempo real).

O obxectivo principal desta investigación foi avaliar se a incorporación da análise **RAID-CRC Screen** (qPCR de ADN fecal para a firma bacteriana) podería mellorar as características do **Test Inmunoquímico Fecal (FIT)**, reducindo potencialmente a necesidade de realizar probas invasivas. A hipótese central plantexaba que as alteracións na firma bacteriana fecal poderían diferenciar entre casos verdadeiramente positivos de CCR e falsos positivos inducidos por outros factores, como hemorraxias gastrointestinais menores.

Para acadar este obxectivo, obtivéronse mostras de pacientes que consentiron participar no estudo, seguidas da extracción de ADN fecal e do análise da **firma bacteriana** mediante **qPCR**. Isto permitiu identificar posibles desequilibrios na microbiota intestinal asociados co **CCR**.

Os resultados obtidos concluíron que a análise da microbiota mellora a sensibilidade, máis non aporta unha mellora significativa sobre a proba **FIT**. Ademais, só se atopou unha diferenza significativa nas diagnoses dos cinco grupos de bacterias estudadas, o que suxire a necesidade de modificar as bacterias analizadas para mellorar a proba.

Palabras chave: Cancro colorrectal, Cribado de cancro colorrectal, ADN fecal, Microbiota intestinal, qPCR.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide, highlighting the importance of early detection to improve patient survival rates. In this context, a research project was conducted using **RAID-CRC Screen** analysis, an innovative technique that combines **fecal DNA** extraction with **bacterial signature** analysis via quantitative real-time polymerase chain reaction (**qPCR**).

The main objective of this research was to evaluate whether the incorporation of **RAID-CRC Screen** analysis (fecal DNA qPCR for bacterial signature) could enhance the performance of the **Fecal Immunochemical Test (FIT)**, potentially reducing the need for invasive tests. The central hypothesis posited that alterations in the fecal bacterial signature could distinguish between true positive **CRC** cases and false positives induced by other factors, such as minor gastrointestinal bleeding.

To achieve this objective, samples were obtained from patients who consented to participate in the study. These samples underwent, fecal DNA extraction and **bacterial signature analysis** via **qPCR**. This allowed for the identification of possible imbalances in the gut microbiota associated with **CRC**.

The results concluded that microbiota analysis improves sensitivity but does not provide a significant improvement over the **FIT**. Additionally, a significant difference in diagnoses was found in only one of the five bacterial groups studied, suggesting the need to modify the bacteria groups analyzed to improve the test.

Keywords: Colorectal cancer, Colorectal cancer screening, Fecal DNA, Gut microbiota, qPCR.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 CÁNCER DE COLON (CCR)

El cáncer colorrectal (CCR) es el tercer tipo de cáncer más prevalente con casi dos millones de nuevos casos por año, y es la segunda causa de muerte con unas cifras de alrededor de 900 000 personas al año.¹

En los últimos años, ha surgido un importante problema relacionado con el aumento del CCR en individuos menores de 50 años, estimándose un crecimiento de más del 140% para el año 2030. Este hecho se atribuye a una serie de factores, que pueden clasificarse en 3 categorías: factores externos generales, factores externos específicos y factores internos (Fig. 1).²

Los factores externos generales incluyen elementos como el clima, factores socioeconómicos, estrés y educación. Estos aspectos están íntimamente ligados a la ubicación geográfica y al estatus social. Los factores externos específicos se refieren a influencias más directas del entorno, como infecciones, contaminación, dieta, ocupación, estilo de vida (alcohol, tabaco...), así como el uso de antibióticos y medicamentos. Por último, los factores internos son aquellos intrínsecos y únicos para cada individuo. Estos incluyen aspectos como el metabolismo, las hormonas endógenas circulantes, la morfología corporal, la inflamación o la microbiota intestinal.^{2,3}

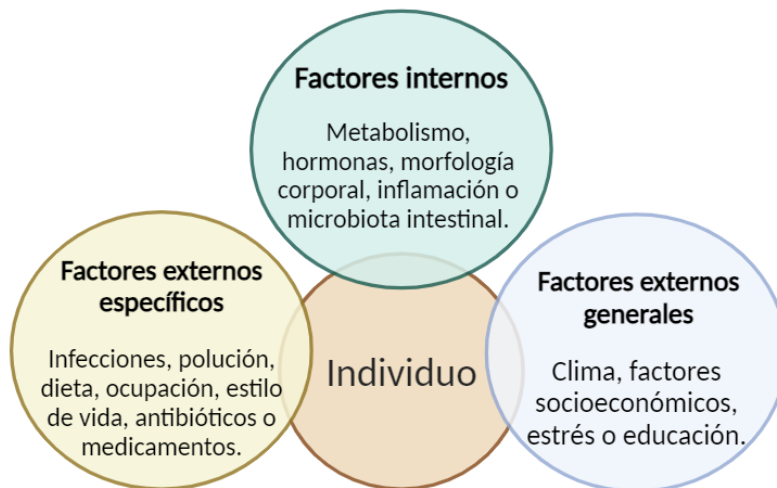


Figura 1. Esquema de los diferentes factores que están implicados la aparición del CCR (adaptada de Rebersek, M. Gut microbiome and its role in colorectal cancer. *BMC Cancer* 21, 1325 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12885-021-09054-2>. Copyright © 2021, The Author(s)).

El cáncer colorrectal puede surgir a través de 3 vías principales; la «secuencia adenoma-carcinoma», la «vía serrada» y la «vía inflamatoria» (Fig. 2).

La secuencia adenoma-carcinoma es la vía clásica que explica la mayoría de los casos, en ella el adenoma actúa como precursor del CCR. En este modelo, una acumulación gradual de alteraciones genéticas y epigenéticas llevan a la transformación de células normales en pequeños adenomas, adenomas largos y, finalmente, en cáncer. La base molecular de esto es la mutación del gen *APC* (supresor tumoral), que desencadena una desregulación de vías de señalización que provocan la proliferación celular desmedida junto con las mutaciones en el oncogén *KRAS* dando lugar al crecimiento de los adenomas mediante la inactivación del gen supresor de tumores *TP53*.^{4,5}

Otra ruta importante en el proceso de carcinogénesis es la vía serrada, en la que el cáncer es producido por la aparición de adenomas serrados. Esta vía se caracteriza por la evolución desde células normales a un pólipo hiperplásico, hasta un adenoma serrado y finalmente el CCR. Los procesos moleculares clave en esta vía incluyen la mutación de oncogén *BRAF*, que induce una proliferación descontrolada por la sobreactivación de *MAPK* y la hipermetilación de las islas *CpG* que estimula la transición de pólipo hiperplásico a CCR.^{4,6}

Por último, se ha sugerido una vía de carcinogénesis provocada por la inflamación crónica, observada en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII). En este caso, la proliferación del tumor progresa desde una displasia indefinida, pasando por una displasia de bajo y alto grado hasta la formación de cáncer. Lo distintivo de esta vía es la presencia de la displasia en la mucosa plana con lesiones multifocales, además de una diferente secuencia mutagénica en los genes *APC* y *TP53*. Esta vía es la menos común en la carcinogénesis del CCR ya que explica menos del 2% de los casos (paciente con EII).⁴

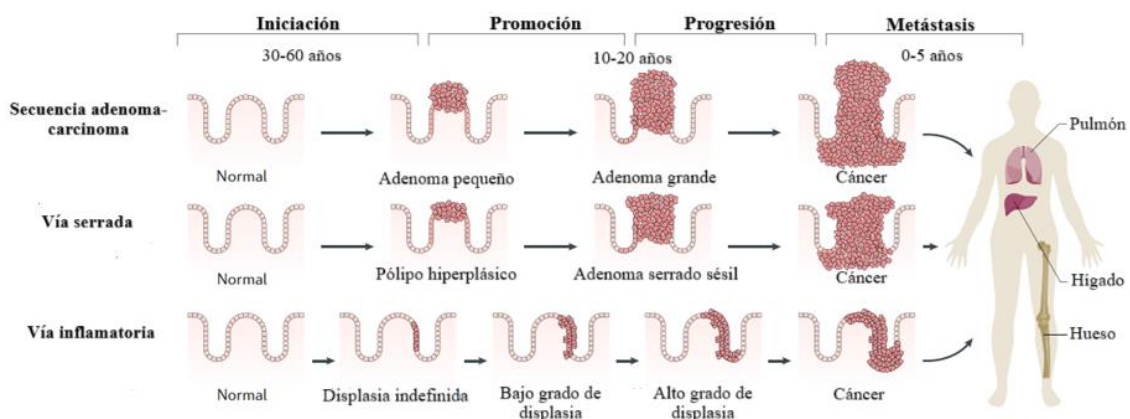


Figura 2. Diferentes fases de desarrollo del cáncer según el tipo de vía por el que se desarrolle (adaptada de Keum, N., Giovannucci, E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16, 713–732 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0189-8>. Copyright © 2019, Springer Nature Limited.).

Aunque el **cáncer colorrectal (CCR)** se desarrolla en un órgano específico, el intestino grueso, es una enfermedad heterogénea con subtipos de diferente etiología. Los subtipos de CCR han sido definidos por la posición anatómica del tumor, que puede encontrarse en 3 diferentes secciones anatómicas: **colon proximal** (ciego, colon ascendente, flexión hepática y colon transverso), **colon distal** (flexión esplénica, colon descendente y colon sigmoideo) y el **recto** (Fig. 3).

También se ha visto que los factores de riesgo son diferentes en función de la localización anatómica del tumor y que, además, la elevada heterogeneidad etiológica del CCR en las diferentes partes del intestino grueso pueden deberse a las variaciones de la **microbiota intestinal** y las **características morfológicas** de cada sección.

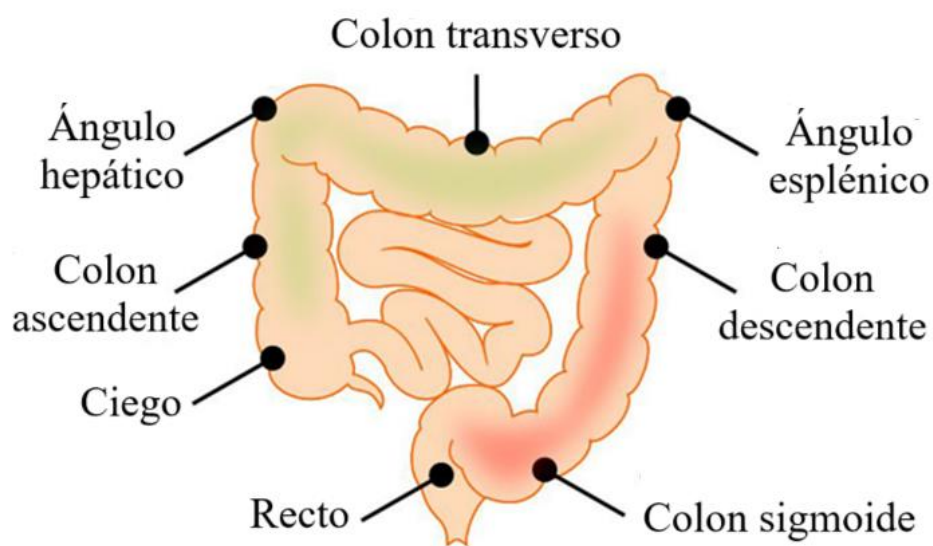


Figura 3. Anatomía del intestino grueso (adaptada de Ternes, D., Karta, J., Tsenkova, M., Wilmes, P., Haan, S., & Letellier, E. (2020). Microbiome in Colorectal Cancer: How to Get from Meta-omics to Mechanism? In *Trends in Microbiology* (Vol. 28, Issue 5, pp. 401–423). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.01.001>. © 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd.).

2.2 CRIBADO DE CÁNCER DE COLON

El cáncer colorrectal representa uno de los mayores desafíos en la salud pública debido a su detección tardía, lo que conduce a tratamientos más agresivos y una menor respuesta, elevando así la tasa de mortalidad. En respuesta a este problema, se han establecido estrategias clave para mejorar la supervivencia y la prevalencia de esta enfermedad, centrándose en la detección temprana.

En España, varios organismos, incluyendo la Sociedad Española de Medicina Familiar y Comunitaria y la Asociación Española de Gastroenterología, proponen una estrategia de cribado basada en el FIT cada dos años, junto con medidas para aumentar la participación de los pacientes.⁷

La prueba FIT detecta sangre oculta en las heces, identificando hemoglobina en concentraciones muy bajas que podrían indicar la presencia de lesiones cancerosas o precancerosas. La evidencia muestra que los niveles de sangre oculta aumentan con la gravedad de la lesión, siendo significativamente elevados en casos avanzados de adenomas y cáncer colorrectal.⁸

Además de su eficacia diagnóstica, la prueba FIT es práctica y conveniente para los pacientes, quienes reciben el kit en casa, lo realizan y lo envían por correo al hospital para su análisis. Este enfoque ha demostrado una sensibilidad del 75% y una especificidad del 94% en la detección del cáncer colorrectal, en comparación con la colonoscopia, considerada el estándar de oro en el diagnóstico de esta enfermedad.^{8,9}

Los programas de cribado para la detección precoz del cáncer colorrectal tienen un impacto directo en la salud pública. Estudios de modelización sugieren una mejora del 59% en la mortalidad y del 15% en la incidencia. Además, estudios observacionales respaldan este impacto positivo en la mortalidad y la incidencia del cáncer colorrectal.⁸

La detección temprana del cáncer colorrectal es fundamental para mejorar los resultados del tratamiento y reducir la mortalidad. Para optimizar la implementación de programas de detección basados en FIT, resulta crucial abordar estrategias para mejorar la participación y considerar las barreras potenciales a nivel nacional y comunitario.

2.3 MICROBIOTA INTESTINAL ASOCIADA A CCR

2.3.1 Microbiota intestinal

2.3.1.1 Introducción

Aunque la microbiología como ciencia data del siglo XVII, no fue hasta principios de los años 90 que comenzaron los primeros estudios sobre la microbiota. El científico ruso Eli Metchnikoff, logró asociar la longevidad de personas que vivían en zonas rurales con el consumo de productos con leche fermentada. Metchnikoff postuló que las bacterias ácido-lácticas presentes en estos productos de leche fermentada que consumían, les proporcionaba un efecto antienvjecimiento. Propuso la hipótesis de que la presencia de bacterias «saludables» mediante el consumo de productos lácteos podría vencer a las bacterias dañinas y prolongar la vida, siendo el primer científico que sugería que es posible modificar la microbiota reemplazando malas bacterias por buenas bacterias.¹⁰

El descubrimiento de la penicilina en 1928 por Alexander Fleming desvió la atención hacia la búsqueda de antibióticos que pudiesen combatir las bacterias. Sin embargo, con el paso de los años, la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos se estancaron, lo que devolvió el foco al estudio de la microbiota.¹⁰

Como demostración del interés global en la microbiota, tenemos el Proyecto del Microbioma Humano (Human Microbiome Project, HMP) que mediante análisis multiómicos de alto rendimiento ha analizado la estructura y función de la microbiota humana en 300 adultos, logrando aislar y secuenciar más de 1300 cepas de referencia. Este proyecto ha generado una enorme base de datos enorme sobre la complejidad de la microbiota humana, ayudando así a comprender su relación con la salud y la enfermedad.¹¹

Este complejo sistema, conocido como microbiota, está compuesto por microorganismos como bacterias, hongos, virus y arqueas, que se distribuyen a lo largo del tracto gastrointestinal (Fig. 4). Antes del HMP, el Proyecto del Microbioma del Intestino Humano ya había aumentado nuestro conocimiento sobre los ecosistemas de microorganismos que habitan en nuestro tracto gastrointestinal.¹¹

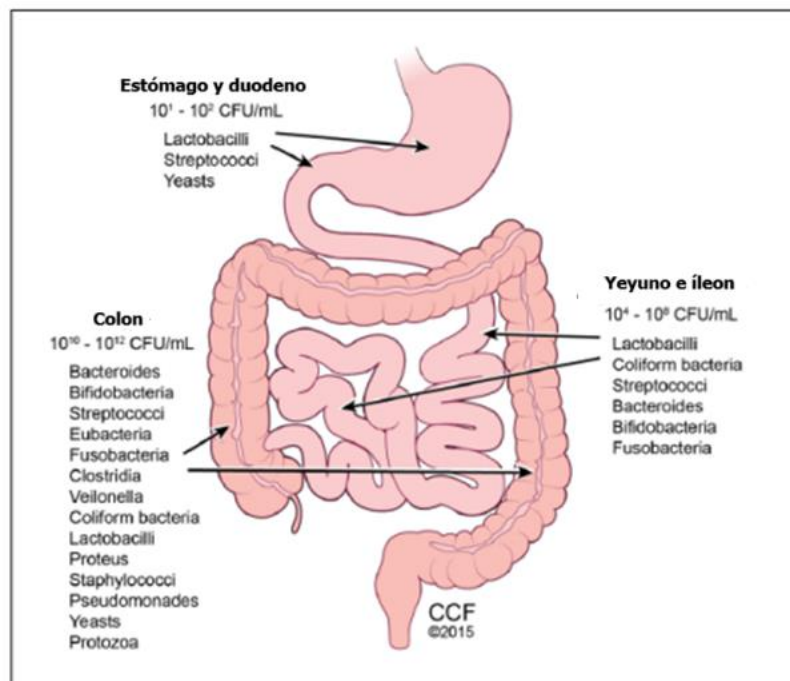


Figura 4: Ilustración de la diferencia en las poblaciones bacterianas a lo largo del aparato digestivo, tanto en concentración como en la presencia de diferentes especies. (adaptada de The human gut microbiota. Illustration by David Schumick, BS, CMI. Reprinted with the permission of the Cleveland Clinic Center for Medical Art & Photography © 2015. All rights reserved. CCF, Cleveland Clinic Foundation; CFU, colony-forming units).

Sabemos que la microbiota intestinal está formada por entre 10^{13} a 10^{14} microorganismos, suponiendo que haya aproximadamente 10 veces más células bacterianas que células humanas y unas 100 veces más genes que en el genoma humano.¹²

En términos generales, la microbiota intestinal está compuesta por dos filos principales: Bacteroidetes y Firmicutes, que representan aproximadamente el 90% de la microbiota intestinal. Dentro del filo Bacteroidetes, los géneros más abundantes e importantes son *Bacteroides* y

Prevotella, mientras que en el filo Firmicutes predominan géneros como *Clostridium*, *Roseburia*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus* y *Ruminococcus*.¹³

2.3.1.2 Factores que influyen en la microbiota

Aunque se ha sugerido la existencia de una «microbiota core», que consistiría en la presencia de los mismos microorganismos más abundantes, la realidad es que hay una enorme variabilidad entre cada individuo. Esta variación se debe a una serie de factores (Fig. 6) que modifican la microbiota y la hacen característica de cada persona. Entre estos factores se incluyen la dieta, los medicamentos, la procedencia, la etapa de la vida, el modo de nacimiento, el tipo de lactancia y el estrés (ya sea por ejercicio, enfermedad o estrés psicológico).^{10,14}

- **Dieta**

La dieta (Fig. 5) se ha convertido en uno de los factores más estudiados en relación con la microbiota. Los cambios más significativos relacionados con la composición de la microbiota intestinal se deben a alteraciones dietéticas, especialmente el consumo de fibra proveniente de frutas, vegetales y otros alimentos de origen vegetal. Estas dietas se asocian con una mejora de la diversidad microbiana, mientras que las dietas altas en grasas, azúcares y proteínas, y bajas en fibra, se relacionan con una menor diversidad microbiana y un mayor riesgo de enfermedades metabólicas o cáncer.¹⁰

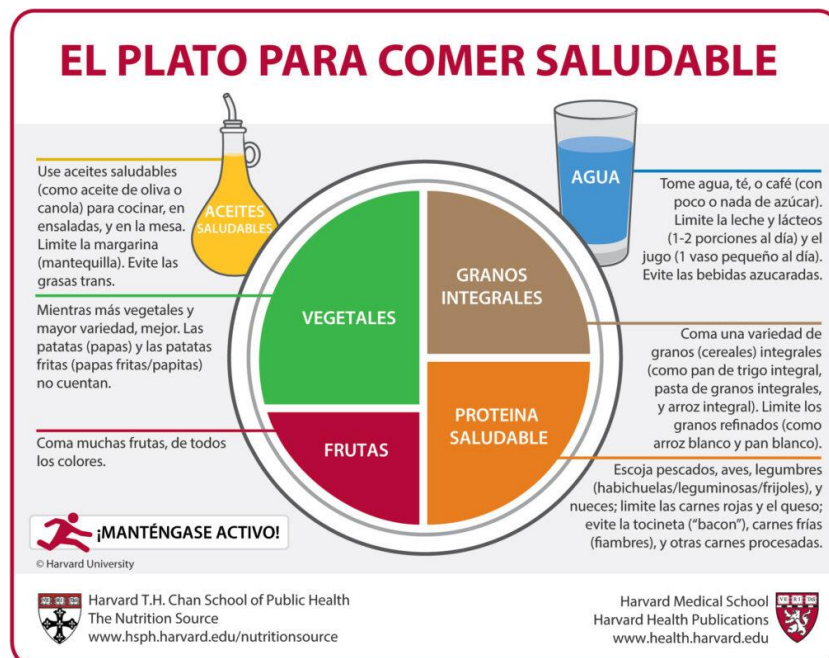


Figura 5. El Plato para Comer Saludable. Fue creado por expertos de la Universidad de Harvard para crear comidas saludables y balanceadas que ayudaría a mantener una adecuada microbiota intestinal (*El Plato para Comer Saludable* (Spanish). (2024, May 9). The Nutrition Source. Harvard University. Copyright © 2024 The President and Fellows of Harvard College).

- **Tratamiento médico**

En cuanto a los tratamientos a los que nos podemos someter, uno de los más agresivos para la microbiota es el tratamiento con antibióticos. Estos fármacos, diseñados para combatir microorganismos patógenos, también afectan a las comunidades microbianas beneficiosas, lo que puede llevar a una disminución de la diversidad microbiana. Además, los antibióticos pueden favorecer el crecimiento de cepas resistentes, actuando como reservorios de genes de resistencia en el microambiente intestinal. Esto puede tener efectos adversos, ya que muchos microorganismos dependen de otros para la obtención de nutrientes, metabolitos secundarios y para la eliminación de productos de desecho.¹⁵

Las alteraciones de la microbiota pueden conducir a disfunciones en el sistema inmunológico y a un aumento de la susceptibilidad a enfermedades. No solo los antibióticos influyen en la microbiota, sino que esta también juega un papel crucial en la activación de medicamentos y compuestos bioactivos a su forma activa. Las variaciones en la absorción de estos medicamentos pueden ser atribuibles a diferencias en la microbiota, destacando la importancia de una microbiota diversa para una respuesta óptima a ciertos tratamientos médicos.^{10,16}

- **Geografía**

Aunque diversos estudios demuestran que en los primeros años de vida hay características compartidas, la ubicación geográfica ejerce una influencia significativa sobre la composición y diversidad de la microbiota intestinal. Las diferencias en la dieta, el entorno, las adaptaciones fisiológicas y las prácticas culturales entre las poblaciones explican muchas de estas variaciones. La diversidad microbiana tiende a ser menor en poblaciones de países desarrollados como Estado Unidos, mientras en regiones menos desarrolladas como ciertos países africanos, la microbiota exhibe una mayor diversidad y se adapta mejor a las dietas locales.^{10,17}

Estos hechos subrayan la importancia de considerar el contexto geográfico a la hora de hacer estudios sobre la microbiota para tener en cuenta la características específicas de cada población.

- **Etapa de la vida**

La composición de la microbiota intestinal cambia significativamente a lo largo de las diferentes etapas de la vida y está fuertemente influenciada por la dieta. Durante los primeros meses de vida, la alimentación se basa en la lactancia materna, lo cual enriquece la microbiota con macroorganismos proporcionados por la leche materna y resulta en una baja diversidad microbiana.

Alrededor de los 3 años de edad, la composición de la microbiota se asemeja a la de un adulto y permanece relativamente estable hasta la vejez. Sin embargo, durante la infancia, la microbiota está predominantemente poblada por *Bifidobacterium*, los cuales van modulando hacia una microbiota dominada por *Bacteroidetes* y *Firmicutes* en la etapa adulta.

En la vejez, las deficiencias asociadas con la edad como el deterioro de la dentición, la función salival o la digestión, pueden influir en la composición de la microbiota. Las personas mayores tienden a tener proporciones más altas de Bacteroidetes y disminuciones de Bifidobacteria y Bacteroides en comparación con los adultos jóvenes. La diversidad microbiana también tiende a disminuir y se observan problemas de salud como la fragilidad, que se relaciona con una menor diversidad dietética.^{10,18}

- **Modo de nacimiento**

En el proceso del parto, los recién nacidos son expuestos a una amplia gama de microorganismos que contribuyen a la colonización de la microbiota intestinal y, como era de esperar, el modo del parto afecta a esta composición de la microbiota.

Durante un parto vaginal, el bebé entra en contacto con la microbiota vaginal, la cual difiere de la microbiota de la piel presente en los nacimientos por cesárea. Los estudios muestran que los bebés nacidos por vía vaginal tienden a tener una mayor población de Bacteroidetes en comparación con Firmicutes, en contraste con los nacidos por cesárea.¹⁰

- **Estrés**

Podemos definir el estrés como una respuesta orgánica a las demandas o presiones ambientales. Tanto la percepción del estrés como la duración de sus consecuencias varía entre las persona, contribuyendo notablemente a la posibilidad de sufrir enfermedades. Tanto los estresores físicos como los psicológicos activan el llamado eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) que provoca una serie de respuestas hormonales como la liberación de la hormona liberadora de corticotropina,

que a su vez estimula la liberación de la corticotropina a nivel sistémico, promoviendo la síntesis de glucocorticoides, especialmente el cortisol, en la glándula adrenal. Además, se liberan noradrenalina y adrenalina (catecolaminas) tras la exposición a estresores físicos y psicológicos.^{19,20}

Se sabe que la microbiota intestinal es muy sensible al estrés y a los mediadores del estrés. En particular, se ha observado que las bacterias entéricas responden a la liberación de mediadores químicos relacionados con el estrés, lo que puede influir en la susceptibilidad a infecciones bacterianas.^{10,20}

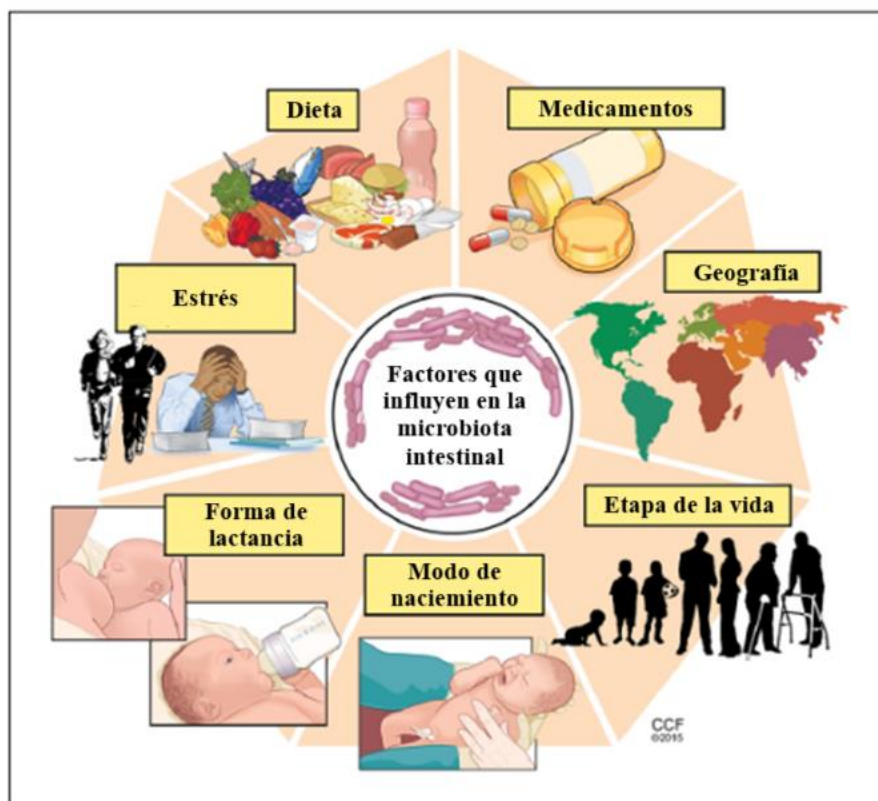


Figura 6. Esquema que representa los factores principales que afectan a la microbiota intestinal (adaptada de David Schumick, BS, CMI. Reprinted with the permission of the Cleveland Clinic Center for Medical Art & Photography © 2015. All rights reserved. CCF, Cleveland Clinic Foundation).

2.3.2 Función de la microbiota intestinal

La microbiota intestinal presenta una relación de simbiosis con la mucosa intestinal, proporcionando importantes funciones metabólicas, inmunológicas y de protección intestinal. Gracias a la obtención de nutrientes a través los componentes dietéticos, podemos considerar la microbiota como un órgano por sí mismo, con una gran capacidad metabólica y de variabilidad.²¹

2.3.2.1 *Metabolismo de nutrientes*

Como se vio anteriormente, la dieta tiene un impacto directo en el desarrollo de la microbiota intestinal. Este impacto tan grande de la dieta es debido al importante papel que tiene la microbiota intestinal en el metabolismo de nutrientes.

Las bacterias intestinales producen enzimas que les dan la capacidad de fermentar carbohidratos complejos, generando metabolitos como los ácidos grasos de cadena corta (AGCCs), siendo los más importantes el propionato, butirato y acetato. Estos AGCCs se absorben rápidamente en el tracto gastrointestinal donde están relacionados con los procesos de regulación celular como la expresión génica, la diferenciación, proliferación y apoptosis. Aunque todos los AGCCs son importantes, se le atribuye una mayor importancia al butirato, ya que es la molécula encargada de proporcionarle energía a los colonocitos. El butirato ejerce efectos duales en los colonocitos normales y tumorales. En los colonocitos normales, funciona como una fuente de energía, siendo metabolizado a acetil-CoA en el ciclo de Krebs, permitiendo la proliferación celular. Alternativamente, en los colonocitos tumorales, debido al efecto Warburg, la glucólisis anaeróbica es la principal fuente de energía, por lo tanto, el butirato no entra en el ciclo de Krebs y está disponible para el núcleo, modulando la expresión génica a través de la inhibición de las HDAC, lo que lleva a la regulación a la baja de p21 y p27 e inhibe la proliferación celular, explicando así el efecto beneficioso asociado en el cáncer (Fig. 7).^{14,21,22}

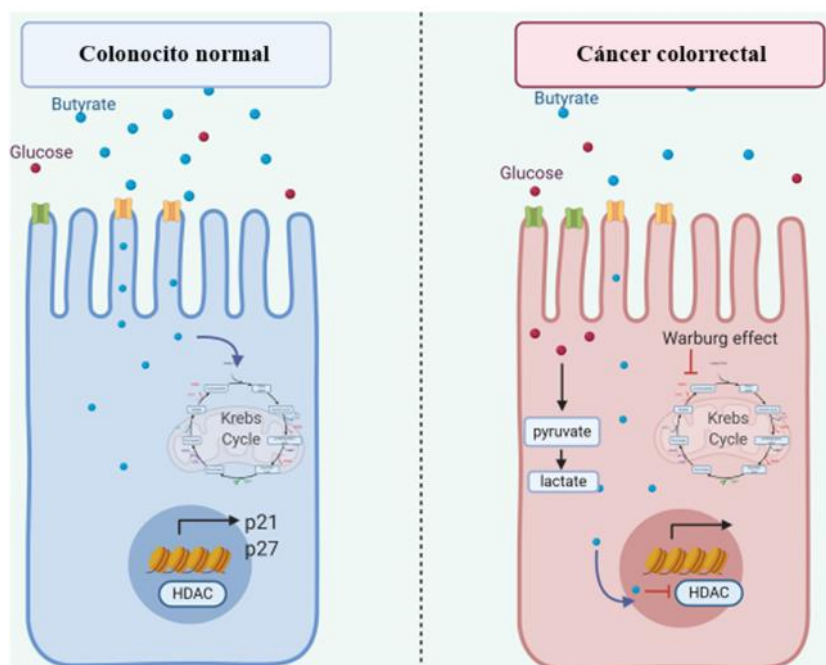


Figura 7. Doble función del butirato en el cáncer colorrectal (adaptada de Hanus M, Parada-Venegas D, Landskron G, Wielandt AM, Hurtado C, Alvarez K, Hermoso MA, López-Köstner F and De la Fuente M (2021) Immune System, Microbiota, and Microbial Metabolites: The Unresolved Triad in Colorectal Cancer Microenvironment. © 2021 Hanus, Parada-Venegas, Landskron, Wielandt, Hurtado, Alvarez, Hermoso, López-Köstner and De la Fuente).

La microbiota también es la encargada de sintetizar la vitamina K y varios componentes de las vitaminas del grupo B, ayuda a metabolizar de manera más efectiva las grasas y utiliza proteasas para la producción de moléculas señalizadores y péptidos antimicrobianos.

2.3.2.2 *Protección antimicrobiana*

La microbiota intestinal tiene un papel indispensable en la protección antimicrobiana. Su mecanismo básico es crear una barrera mucosa de dos capas que mantiene los microorganismos alejados del epitelio. También, diferentes componentes microbianos son capaces de activar moléculas de defensa, como las proteínas antimicrobianas (PAM), y defensinas para así destruir las estructuras de los microorganismos.²¹

2.3.2.3 *Protección de la barrera intestinal*

Se sabe con certeza que la microbiota intestinal tiene un papel importante en la protección de la estructura y función del tracto gastrointestinal. Los microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal son capaces de secretar moléculas encargadas de mantener los desmosomas en las microvellosidades, producir moléculas que previenen la apoptosis de las células epiteliales intestinales y también modular los patrones de glucosilación de la mucosa, facilitando la adherencia microbiana en la superficie celular.²¹

2.3.2.4 *Inmunomodulación*

La microbiota intestinal tiene un papel muy importante en la inmunomodulación del tracto gastrointestinal, ya que interactúa con el sistema inmunitario innato y adaptativo.

Los microorganismos presentes en el intestino contribuyen al desarrollo normal del tejido linfoide asociado al intestino (GALT), influye en las respuestas de los linfocitos T CD4+ y CD8+ y, además, en la producción de IgA en los linfocitos B.

Las células linfoides responden a señales epiteliales y regulan la inmunidad intestinal, ejemplo de ello son los macrófagos, que en la lámina propia expresan la interleucina pro-IL β para una respuesta rápida ante patógenos que es mediada por la microbiota.²¹

2.3.3 *Microbiota relacionada con el CCR*

La microbiota intestinal está compuesta por una gran cantidad de microorganismos que muchas veces son olvidados a la hora de tatar la salud y la enfermedad humana. Con el aumento de los estudios sobre la microbiota intestinal, se ha demostrado la relación entre la disbiosis de la microbiota intestinal con el desarrollo del cáncer colorrectal.

Sabemos que la alteración de la microbiota modifica las funciones fisiológicas dando lugar a varias enfermedades. En concreto, hablando del CCR, se ha demostrado que hay una diferente composición de la microbiota entre pacientes con CCR y personas sanas, presentando una pérdida de diversidad y riqueza en la microbiota intestinal.²³

Este conocimiento sobre la variación de la microbiota ha llevado a la asociación de varias especies de bacterias con la aparición de CCR. Por el momento, no se ha llegado a un consenso sobre la estructura de la microbiota, pero sí se puede decir con certeza algunos de los microorganismos con mayor presencia y efecto sobre el desarrollo del cáncer colorrectal.

Los géneros de bacterias *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Parvimonas*, *Bacteroides*, y *Gemella* aumentan su concentración en el CCR.²⁴ En cambio, los géneros *Rosaburia*, *Clostridium*, *Faecalibacterium* y *Bifidobacterium* decrecen en pacientes con esta condición.²⁵

El desarrollo del cáncer viene provocado por un cambio en la estructura de la microbiota intestinal, con variaciones de una o varias especies. Para entender mejor esto, se han postulado dos hipótesis acerca de cómo ocurre:

- **La hipótesis de Alpha-Bug o Bacteria-Alfa**

Esta hipótesis integra la relación entre una especie y la comunidad bacteriana del intestino en la carcinogénesis. La bacteria alfa no sólo induce a tumores directamente, sino que también remodela la comunidad bacteriana a una que promueva la respuesta inmune de la mucosa intestinal y la alteración de la células epiteliales del intestino hasta provocar cáncer. Además, estas Bacterias-Alfa pueden aumentar la carcinogénesis desplazando a las bacterias que protegen al intestino contra el cáncer.^{12,26}

- **El modelo Conductor-Pasajero**

En este modelo se establecen dos categorías de bacterias: las bacterias conductoras y las bacterias pasajeras. Por un lado, las bacterias conductoras son las bacterias intestinales autóctonas que producen sustancias genotóxicas que dañan el ADN de las células epiteliales, pudiendo iniciar el desarrollo del CCR. Por otro lado, las bacterias pasajeras son oportunistas, pues proliferan en el entorno del tumor y median en la tumorigénesis.

En este modelo, se sugiere que las bacterias conductoras inician el proceso de tumorigénesis para luego perder su ventaja de crecimiento y ser sustituidas por las pasajeras, que terminaran con el desarrollo del tumor.^{12,27}

2.4 BIOMARCADORES DE CCR

Consideramos un biomarcador como una molécula biológica presente en el organismo que se puede medir o evaluar como un indicador de algún proceso normal o anormal, de una afección o de una enfermedad. Estos biomarcadores pueden ser moléculas, genes, enzimas, metabolitos u otro tipo de señales biológicas.

Según la utilidad del biomarcador, lo podemos dividir en 3 categorías:

- **Biomarcador diagnóstico**

Son utilizados para detectar o confirmar la presencia de una enfermedad. Ejemplo: presencia del gen 16S de una bacteria implicada en el cáncer colorrectal.

- **Biomarcador pronóstico**

Ayudan a predecir la progresión de una enfermedad. Ejemplo: análisis de la expresión de ciertos ARNm para pronosticar el deterioro clínico de pacientes con COVID-19.

- **Biomarcadores predictivos**

Ayudan a predecir cómo va a responder un paciente a un tratamiento específico. Ejemplo: presencia de biomarcadores de cáncer para poder prescribir tratamientos más precisos.

El aumento del interés en el estudio de la microbiota intestinal ha permitido seleccionar diversos biomarcadores que facilitan la prevención y tratamiento del cáncer colorrectal. Varias investigaciones han encontrado alteraciones en la microbiota de muestras fecales de pacientes con CCR, también ocurre en pacientes con adenomas avanzados. Por lo tanto, el uso de estos biomarcadores en pacientes con adenomas podría ser una herramienta útil para tratar de prevenir las lesiones cancerosas.²⁸

Además de las técnicas convencionales como la colonoscopia (gold estándar), se ha implementado el uso de pruebas no invasivas como el Test Inmunohistoquímico Fecal (FIT). Sin embargo, este tipo de pruebas tiene una sensibilidad de aproximadamente el 80% para la detección de CCR y sólo el 25% para la detección de adenomas avanzados. Para mejorar la sensibilidad, eficiencia y seguridad de los resultados, varios estudios han demostrado el potencial de combinar el análisis de microbiota fecal con FIT.²⁹

A pesar del esfuerzo de la comunidad científica por encontrar asociaciones entre biomarcadores bacterianos y CCR, hasta la fecha no se ha identificado un marcador universal para la detección del CCR. No obstante, la combinación de biomarcadores indicadores de la presencia de algunas especies asociadas con CCR han demostrado una alta sensibilidad para la detección de cáncer colorrectal.¹²

2.5 RAID-CRC

El proyecto RAID-CRC se basa en realizar un estudio clínico centrado en evaluar y mejorar la precisión diagnóstica para el cáncer colorrectal (CCR) y de los adenomas avanzados gracias a la identificación de alteraciones en la microbiota intestinal mediante la prueba RAID-CRC Screen. Como se ha tratado en puntos anteriores, el desequilibrio en la composición de la microbiota se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollar CCR.

Con este análisis de microbiota, los resultados son analizados a través de la plataforma GoodGut-Test® (<https://goodgut-test.eu/auth/login>) que, con un algoritmo matemático que utiliza “*machine learning*”, integra los resultados aplicando diferentes puntos de corte para cada marcador bacteriano, maximizando la especificidad y precisión del diagnóstico.

En el estudio se compara la capacidad diagnóstica del RAID-CRC Screen (combinación del FIT y análisis bacteriano) con la del FIT solo, esperando reducir la tasa de falsos positivos en un 20% sin perder la sensibilidad para el diagnóstico de CCR.

El proyecto es un estudio observacional y transversal, realizado en un único centro (Complejo Hospitalario Universitario de Ourense), dirigido a participantes del programa de cribado del cáncer colorrectal con resultados positivos en el FIT.

3 HIPÓTESIS

3.1 HIPÓTESIS PRINCIPAL

El uso combinado del análisis de la firma bacteriana con RAID-CRC Screen y la prueba FIT reduce significativamente la tasa de falsos positivos en comparación con el uso exclusivo de la prueba FIT. Las alteraciones en la firma bacteriana fecal detectadas mediante RAID-CRC Screen permiten distinguir entre casos verdaderamente positivos de cáncer colorrectal y falsos positivos, existiendo una relación entre la variación en la concentración de ciertas especies bacterianas y el aumento del valor de FIT.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO PRIMARIO

Evaluar la capacidad diagnóstica de la evaluación de la firma bacteriana de ADN fecal como herramienta complementaria al FIT, para el diagnóstico del cáncer colorrectal. La capacidad diagnóstica obtenida con la combinación de FIT y RAID-CRC Screen (evaluación de la firma bacteria) será comparada con la obtenida solo con el FIT.

4.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Buscar variaciones significativas de abundancia relativa entre las bacterias estudiadas y el diagnósticos de los pacientes.
2. Encontrar una posible relación entre el valor de la prueba FIT y la abundancia relativa de las especies bacteriana estudiadas.

5 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 TIPO DE ESTUDIO

El estudio en el que está incluido este trabajo sobre la evaluación de la firma bacteriana de ADN fecal como herramienta complementaria en la detección temprana de CCR, es un estudio unicéntrico prospectivo de pruebas diagnósticas para el uso del RAID-CRC Screen.

5.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

5.2.1 Procedimientos preanalíticos

Los procedimientos preanalíticos en este estudio se centraron en la selección de participantes y en el almacenamiento de las muestras. El circuito general del estudio clínico, refiriéndonos a los procedimientos preanalíticos, consta de las siguientes fases:

- 1. Almacenaje de las muestras con un resultado positivo del FIT en el laboratorio de análisis del Complejo Hospitalario Universitario de Ourense.**

Aquellas muestras que hayan obtenido un resultado positivo se guardaron de inmediato a -20°C.

- 2. Notificación de los resultados FIT positivos al centro hospitalario.**

Desde el laboratorio clínico se notificó a los investigadores el código de barras de las muestras FIT positivas para que en el momento en que se programase la colonoscopia se le pueda informar también del estudio clínico.

- 3. Recogida de datos de las personas que acepten participar en el estudio.**

Una vez seleccionado, cada paciente completó el cuaderno de recogida de datos y fue incluido en el registro de pacientes, identificado por el código de barras de su muestra FIT del programa de cribado.

- 4. Notificación códigos asociados a las personas que acepten participar en el estudio.**

Los investigadores informaron al laboratorio sobre los códigos de las personas que aceptaron participar y aquellas que no. En los casos de no aceptación, el laboratorio descartó las muestras correspondientes.

5.2.2 Selección de pacientes

Los pacientes incluidos en el estudio debían cumplir con una serie de requisitos para asegurar la validez y significatividad de los resultados. El estudio se llevó a cabo en el Complejo Hospitalario Universitario de Ourense (Ourense, Galicia). Las personas reclutadas en este estudio tienen que cumplir estos 3 requisitos básicos:

1. Participado en el programa gallego de detección precoz del cáncer colorrectal.
2. Obtener un resultado positivo de la prueba del FIT.
3. Aceptar la evaluación de la colonoscopia.

Después de esto, los pacientes reclutados (edad entre 50 y 69 años) debieron firmar el formulario de consentimiento informado, cumplir con todos los criterios de inclusión para garantizar la homogeneidad del grupo de estudio y ninguno de los de exclusión para evitar la inclusión de personas con condiciones o antecedentes que podrían afectar a la validez de los resultados (Tab. 1).

Tabla 1. Criterios de inclusión y exclusión para la selección de pacientes en el estudio.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Personas entre 50 y 69 años, ambos incluidos. ✓ Personas que acepten la realización de una colonoscopia por haber obtenido un resultado positivo del FIT en el marco del programa de cribado del cáncer colorrectal y obtengan un diagnóstico válido. ✓ Consentimiento informado debidamente firmado. 	<ul style="list-style-type: none"> × Embarazo en el momento de la inclusión. × Haber recibido tratamiento con antibiótico el mes anterior a la inclusión en el estudio. × Haber recibido quimioterapia y/o radioterapia los 6 meses anteriores a la inclusión en el estudio. × Presentar efectos gastrointestinales adversos por haber recibido quimioterapia o radioterapia (recibida ≥ 6 meses anteriores a la inclusión en el estudio) que pueda comprometer la función del tracto digestivo. × Presentar comorbilidad severa de acuerdo con criterios clínicos. × Antecedentes personales de CCR, adenomas colorrectales avanzados, poliposis colorrectal o enfermedad inflamatoria intestinal. × Otras enfermedades, trastornos y/o cirugías previas que comprometan el tránsito digestivo.

Con esto, Los pacientes aceptados recibieron un número/código único para preservar su confidencialidad. Todos los datos se recogieron electrónicamente a través de la plataforma web RedCap del Instituto de Investigación Sanitaria Galicia Sur (redcap.tic1-iisgaliciasur.es/).

Es importante señalar que los resultados de la prueba RAID-CRC Screen no fueron comunicados a los participantes y no se utilizaron para la gestión clínica de los mismos.

5.2.3 Tamaño muestral

Se incluirá un mínimo de 1280 participantes al programa de cribado del cáncer colorrectal con un resultado positivo del FIT y con un diagnóstico válido de la colonoscopia. La N ha sido calculada para asegurar una sensibilidad de la prueba en la detección de CCR superior al 95% y para asegurar la reducción del número de colonoscopias un 15%. La fórmula utilizada para el cálculo es la siguiente:

Tamaño de muestra inicial (n):

$$n' = \frac{z_{\alpha/2}^2 p(1-p)}{d^2}$$

Tamaño de muestra ajustado (n'):

$$n = \frac{n'}{0,054554}$$

Donde,

- $z_{\alpha/2}$ es el valor crítico de la distribución normal estándar para un nivel de confianza dado.
- p es la proporción estimada de la característica de interés.
- d es el margen de error deseado.

Cálculo:

$$d=0,05-0,02=0,03 \quad d^2 = 0,0009$$

$$\alpha=0,90 \quad z_{\alpha/2}^2 = 1,645 * 1,645 = 2,706$$

$$p=0,02 \quad p * (1-p) = 0,02*0,98 = 0,0196$$

$$n' = \frac{2,706 * 0,0196}{0,0009} = 58,931$$

$$n = \frac{58,931}{0,054554} = 1080$$

5.2.4 Clasificación de lesiones

Todas las personas que han participado en el estudio se han sometido a una colonoscopia para saber las condiciones en las que se encuentra su colon. Acorde con el examen de la colonoscopia y los resultados del análisis anatomopatológico, el diagnóstico ha sido clasificado en 4 grupos:

- **Colonoscopia normal:** en la colonoscopia no hay ningún hallazgo o pólipos hiperplásicos menores a 10 mm en el colon sigmoideo y/o recto.
- **Adenomas no avanzados (ANA):** presencia de adenomas tubulares menores de 10 mm con bajo grado de displasia y pólipos serrados menores a 10 mm sin displasia.
- **Adenomas avanzados (AA):** presencia de adenomas mayores de 10 mm, con componente vellosa o con alto grado de displasia, pólipos serrados mayores de 10 mm o con displasia, y adenocarcinoma *in situ*.
- **Cáncer colorrectal.**

5.2.5 Consideraciones éticas

El estudio clínico se realizará con la conformidad de las normas internacionales aplicables (ISO 14155:2020) y los requisitos reglamentarios, así como con los principios éticos de la última revisión de la Declaración de Helsinki, aprobada por la Asociación Médica Mundial. El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de ética de la investigación con medicamentos de Galicia (CEIm-G) con código de aprobación 2023/243.

5.3 ANÁLISIS DE SANGRE OCULTA EN HECES

El análisis de prueba de sangre oculta en heces (FIT) se ha hecho en el Complejo Hospitalario Universitario de Ourense utilizando la misma muestra que se usa en el análisis de firma bacteriana. Las muestras utilizadas para determinación de hemoglobina (Hb) en heces se hacen usando el tubo colector del OC-Sensor.

Consideramos test positivos a los que la concentración de hemoglobina en heces sea igual o mayor a 100 ng/ml (20 µg Hb/g de heces; FIT100).

5.4 EXTRACCIÓN DE ADN FECAL

Para comenzar con la extracción, se retiran los contenedores FIT de sus cajas de almacenamiento y se dejan descongelar a temperatura ambiente durante 20-30 minutos para garantizar una homogeneización adecuada de la muestra y asegurar la calidad óptima de la misma.

La extracción del ADN seguirá el guion (Fig. 8) establecido en el protocolo del DNAeasy® PowerSoil® Pro Kit (QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANY) o mediante la Guía rápida proporcionada por GoodGut SLU.

El primer paso implica transferir el contenido del contenedor a un tubo estéril de 1,5 ml, posteriormente centrifugarlo para eliminar la mayor parte del sobrenadante, y luego resuspender el pellet para concentrar la muestra. Después de esto, se agitará en un tubo con bolas de látex y buffer de lisis para romper las células. Durante el proceso, se realizarán varias centrifugaciones y filtraciones para obtener, en última instancia, aproximadamente 100 microlitros de una disolución de ADN.

Por último, todas las muestras serán debidamente rotuladas y etiquetadas para su almacenamiento en el congelador a -20°C hasta su uso para realizar la qPCR.

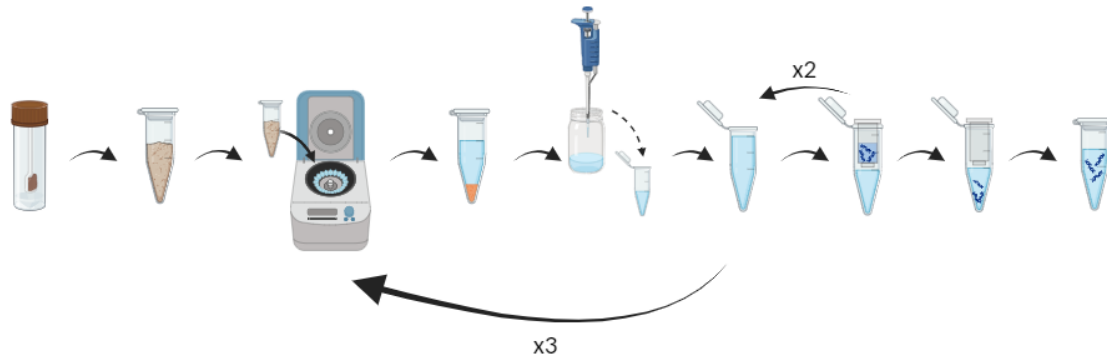


Figura 8. Esquema por pasos del proceso de extracción de ADN (creado con BioRender <https://www.biorender.com/>).

5.5 ANÁLISIS DE MICROBIOTA POR qPCR

La PCR cuantitativa (qPCR) o PCR en tiempo real, es una técnica basada en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que combina la amplificación de una secuencia de ADN con la cuantificación de la concentración de esta. Gracias al uso de fluoróforos en la mezcla de reacción, podemos monitorizar los aumentos de los productos de amplificación durante la reacción (Fig. 9). En esta reacción, los fluoróforos unidos a las sondas emiten fluorescencia después de unirse a la diana durante la síntesis de ADN.

Para este análisis utilizamos el RAID-CRC Screen qPCR kit, optimizado para ensayos multiplex usando cebadores específicos y sondas marcadas con fluorescencia. Este producto se basa en la actividad de la 5' exonucleasa de la ADN polimerasa. La actividad de esta enzima genera un incremento en la señal de fluorescencia que es proporcional a cantidad de la secuencia objetivo. Este kit necesita 3 ensayos qPCR de cada muestra para obtener un diagnóstico; en los screening A y B se realiza un ensayo multiplex y el screening C uno singleplex.

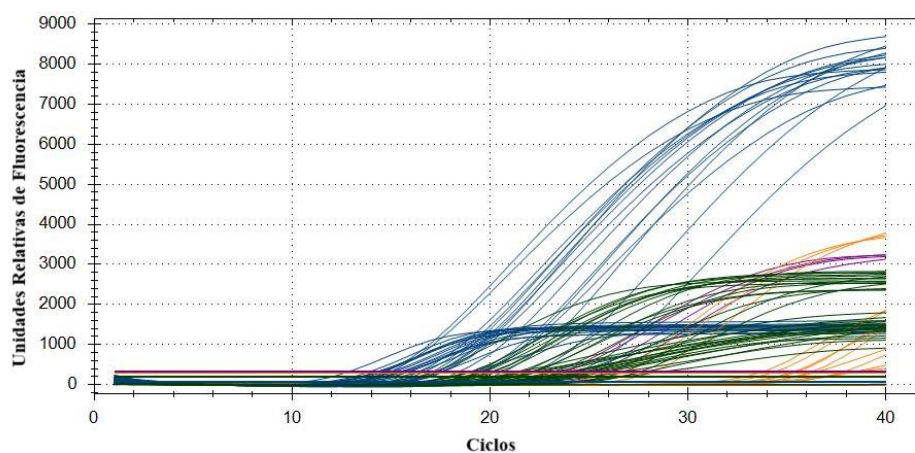


Figura 9. Curvas de fluorescencia obtenidas. En la imagen observamos las curvas de fluorescencia codificadas por colores, cada una correspondiente a una sonda diferente del análisis. Además, se pueden ver líneas rectas en la parte inferior, que representan la línea del umbral.

5.5.1 Descripción del análisis

En esta etapa del proceso, obtenemos los datos necesarios para determinar la concentración de bacterias de cada tipo presentes en cada muestra. Para ello, las secuencias específicas de bacterias se clasificaron en 2 grupos (Tab. 2): Eubacterias como el total de bacterias; B46 (el mejor BLAST de *S. variabile*), B48 (mejor BLAST con *Raminococcus*, *Roseburia*, *Coprococcus*) y *F. Prausnitzii* como biomarcadores de bacterias productoras de butirato, y *B. fragilis* y *G. morbillorum* como patógenos oportunistas.

Tabla 2. Esquema de clasificación de las diferentes especies de Eubacterias según sus características.

Eubacterias	
Bacterias productoras de butirato	Bacterias patógenas oportunistas
B48	<i>B. fragilis</i>
B46	
<i>F. Prausnitzii</i>	<i>G. morbillorum</i>

La cuantificación de los biomarcadores del CCR implica la preparación de una mezcla de reacción que contiene la Master Mix, agua libre de DNAsas, así como cebadores y sondas específicas (Tab. 3) para cada reacción. Se realizaron tres reacciones: en la screening A, se analizaron las sondas FAM (Eubacterias), HEX (*F. prausnitzii*) y ROX (*G. morbillorum*); en la screening B, se analizaron las sondas HEX (B46) y CY5 (*B. Fragilis*); y, en la screening C, FAM (B48).

Tabla 3. Secuencia de los cebadores y marcadores utilizadas en el análisis.

Marcador	Cebadores	Secuencia 5'→3'
Eubacterias	EUB_F	ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT
	EUB_R	GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA C
<i>F. prausnitzii</i>	FBPN_F	CAA CAA GGT AAG TGA CGG C
	FBPN_R	CGC CTA CCT GTG CAC TAC TC
<i>G. morbillorum</i>	GMLL_F	AAG AGT TCC AAG GCG TTC TC
	GMLL_R	CCA TTT CAA GAT CCG CTT TCT ATT T
B46	B46_F	TCC ACG TAA GTC ACA AGC G
	B46_R	CGC CTA CCT GTG CAC TAC TC
<i>B. fragilis</i>	BCTF_F	TGA AAG CGT GCT CTT ACT ATT G

	BCTF_R	TAT TGG CTG TTG TGC TTT GT
B48	B48_F	GTA CGG GGA GCA GCA GTG
	B48_R	GAC ACT CTA GAT GCA CAG TTT CC

5.5.2 Procedimiento técnico

Para realizar este ensayo, se prepara una mezcla de reacción para cada screening. Esta mezcla de reacción contiene la Multiplex Master Mix 4x, los cebadores y las sondas en cantidades específicas que vienen definidas por el guion del kit.

Una vez preparada la mezcla de reacción, se procede a cargar los pocillos de la placa de 96 micropocillos. En cada pocillo se colocan 10 μ L de solución, con 8 μ L correspondientes a la mezcla de reacción y 2 μ L al volumen de la muestra de cada screening para analizar los seis grupos de interés del análisis. Todo este proceso se lleva a cabo utilizando micropocillos blancos en una placa de 96 micropocillos, garantizando la reproducibilidad y la precisión de los resultados obtenidos (Fig. 10).

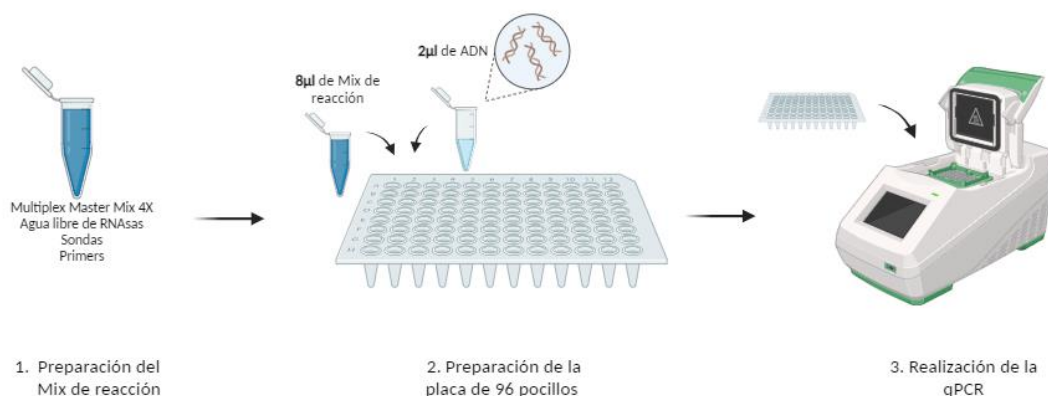


Figura 10. Esquema por pasos de la preparación de las muestras a analizar (creado con BioRender <https://www.biorender.com/>).

Es importante incluir controles positivos (C+) y controles negativos (NTC) en cada run de qPCR (Tab. 4). Para los controles positivos, se pipetea 2 μ L de cada control, uno de cada screening, en un pocillo con la mezcla de reacción. Estos controles se utilizan para verificar el correcto funcionamiento de la qPCR y para establecer un punto de referencia para la detección de los grupos de interés. Por otro lado, el control negativo (NTC) se utiliza para detectar posibles contaminaciones o falsos positivos. En este control, no se añade muestra de ADN, sólo la mezcla de reacción.

Tabla 4: Especificaciones técnicas sobre las sondas del kit de qPCR del RAID-CRC Screen.

Marcador	Sonda	Rango del Control Positivo (Cq)	Control Negativo (Cq)
SCR_A_1	FAM	14.16-17.30	>21.00
SCR_A_2	HEX	21.79-26.64	>30.00
SCR_A_3	ROX	23.56-28.79	>31.00
SCR_B_1	HEX	21.62-26.43	>30.00
SCR_B_2	CY5	19.59-23.94	>32.00
SCR_C_3	FAM	13.39-16.37	>28.00

Una vez cargados los pocillos con la muestra y los controles, se procede a realizar la amplificación en el termociclador CFX OPUS 96 Real Time PCR System de BIO-RAD, el cual permite realizar la amplificación de manera controlada y monitorizarla en tiempo real.

El ciclo de amplificación consiste en una etapa de desnaturalización, una de alineación de cebadores y una de extensión y síntesis de ADN. Durante este proceso, se mide la fluorescencia de las sondas específicas en cada ciclo, lo que permite cuantificar la cantidad de ADN presente en la muestra. El ciclo de PCR que se utiliza viene preestablecido por el protocolo de RAID-CRC Screen qPCR Kit (Fig. 11).

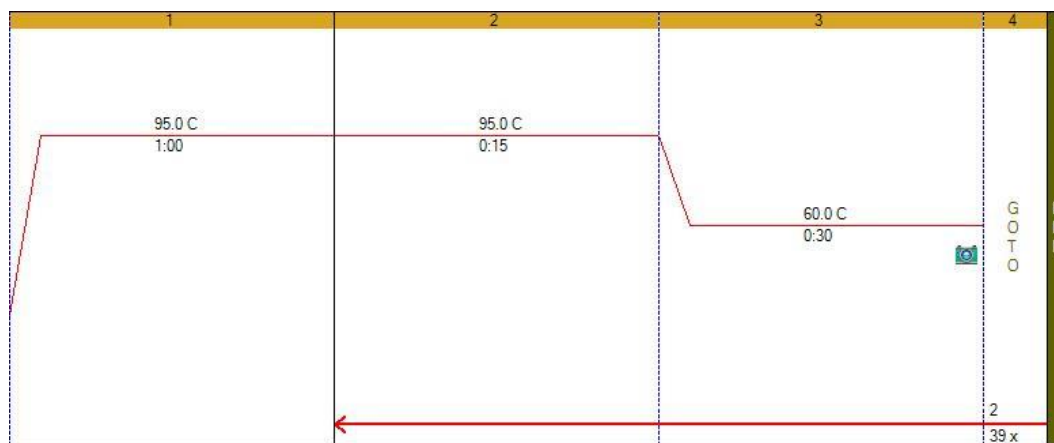


Figura 11. Protocolo de ciclo de qPCR para los ensayos de RAID-CRC Screen (extraída de las especificaciones del RAID-CRC-SCREEN qPCR KIT).

El ciclo de cuantificación (Cq) en una qPCR es un parámetro importante que se refiere al número de ciclos de amplificación que son necesarios para que la fluorescencia del producto de PCR alcance un nivel de umbral predefinido.

Este umbral se establece en una fase en donde la amplificación del ADN es exponencial, pero teniendo en cuenta la probable presencia de “ruido” en los primeros ciclos de la amplificación, asegurando así que las medidas sean precisas y reflejen la cantidad inicial de ADN presente en la muestra (Fig. 12).

La importancia del Cq se debe a una razón principal: su relación con la concentración de la diana genética. El Cq tiene una relación inversamente proporcional con la cantidad inicial de material genético diana que hay en la muestras, así, cuanto menor sea el valor de Cq, mayor será la cantidad inicial de material genético diana. Esto se debe a que, cuantas más copias de ADN hay en la muestras, menos ciclos hacen falta para alcanzar el umbral de detección.

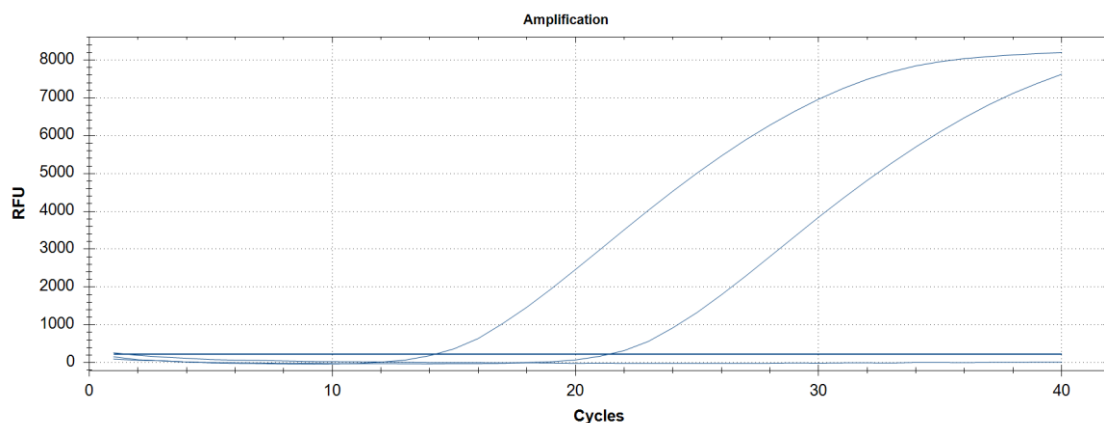


Figura 12. Representación de cómo se establece el umbral en el momento del inicio del incremento de la fluorescencia, donde también se puede observar cómo se ve un control positivo (C+) y un control negativo (NTC).

El umbral, mencionado anteriormente, se establece a mano para cada sonda, ya que no tenemos valores predeterminados para ellos. Como cada ensayo puede tener valores ligeramente diferentes, los corregimos utilizando los valores de referencia descritos anteriormente, consiguiendo una especie de estandarización de los ensayos.

Una vez obtenidos los resultados de la PCR y ajustados los umbrales de cada sonda, los datos procesados se exportan desde el software de la qPCR a un archivo de Microsoft Excel (.xlsx). Estos datos incluyen los valores de Cq y la identificación de la muestra. Luego, se carga este archivo en la plataforma de la promotora del estudio, GoodGut, que analiza los datos y proporciona un informe (Fig. 13) con los resultados cuantitativos (número de copias de ADN por microlitro) y cualitativos. Los resultados cualitativos indican si el análisis es positivo (microbiota compatible con neoplasia avanzada o CCR) o negativo (microbiota no compatible con neoplasia avanzada o CCR).

Dye bacteriano	Valor Cq	N° copias genómicas/ μ L
Eubacterias		
<i>F. prausnitzii</i>		
<i>G. morbillorum</i>		
B46		
<i>B. fragilis</i>		
B48		

*ND = No detectado / *NR = No Relevante

Diagnóstico
Neoplasia avanzada (lesión precancerosa o cáncer colorrectal)

Figura 13. Modelo de informe producido por la plataforma de análisis de GoodGut a partir de los datos importados de la qPCR.

5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

5.6.1 Estadística descriptiva

Por un lado, las variables cuantitativas de los pacientes se presentaron utilizando bien la media y la desviación estándar (DS), o la mediana y el rango intercuartílico (RIQ). Por otro lado, las variables cualitativas se definieron a partir de la frecuencia y los porcentajes (%).

La normalidad de los datos se evaluó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las variables cuantitativas se compararon con la prueba t-Student o U de Mann-Whitney según la distribución de la variable, y para comparar una variable cuantitativa y otra cualitativa la prueba ANOVA o Kluskal-Wallis según la distribución. Para el estudio de la correlación del diagnóstico con los grupos de bacterias, se ha realizado una prueba de Chi-cuadrado.

Estos análisis se realizaron utilizando el programa SPSS 25.0 statistical package (IBM, NYC, USA), estableciendo unos valores de significancia en un p-valor <0.05.

5.6.2 Evaluación de las pruebas diagnósticas

Para evaluar la precisión diagnóstica de la firma bacteriana, se calcularon los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN), así como la precisión.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos positivo}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos}}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos positivos}}$$

$$\text{VPP} = \frac{\text{Verdaderos positivo}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos positivos}}$$

$$VPN = \frac{\textit{Verdaderos negativos}}{\textit{Verdaderos negativos} + \textit{Falsos negativos}}$$

$$\textit{Precisión} = \frac{\textit{Verdaderos positivos} + \textit{Verdaderos negativos}}{\textit{Verdaderos positivos} + \textit{Falsos positivos} + \textit{Falsos negativos} + \textit{Verdaderos negativos}}$$

5.6.3 Análisis estadísticos complementarios

Para el análisis de la abundancia relativa de las bacterias se realizaron gráficos de barras, representando la abundancia relativa media junto con el intervalo de confianza al 95%. También se calculó la significancia de las variaciones entre las medias bacterianas de forma global y comparando entre diagnósticos. Todo esto fue realizado con el programa SPSS 25.0 statistical package (IBM, NYC, USA), estableciendo los valores de significancia en un p-valor < 0.05.

Para el análisis de la correlación entre la abundancia relativa y valores de FIT se ha hecho un mapa de calor representado los valores obtenidos del análisis de correlación de Pearson. Este análisis fue hecho con un script propio en el programa Python 3.12 64bit.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 POBLACIÓN DE ESTUDIOS

La cohorte estudiada consta de 232 pacientes (Fig. 14) seleccionados tras un proceso de reclutamiento general, cuyas condiciones se detallan en la Tabla 1. Además, se ha realizado la extracción de ADN de muestras fecales, seguido de una qPCR válida, y una revisión para asegurar que cada paciente haya pasado por una colonoscopia.

Es importante destacar que todos los pacientes han sido seleccionados dentro del marco del estudio clínico RAID-CRC Screen. Tal como se describe en el apartado 6.2.3, el tamaño muestral total del estudio es de 1080 pacientes. Por lo tanto, los resultados del análisis de esta cohorte representan un 21.4% del total de la población de estudio y corresponden a resultados preliminares de este estudio en curso.

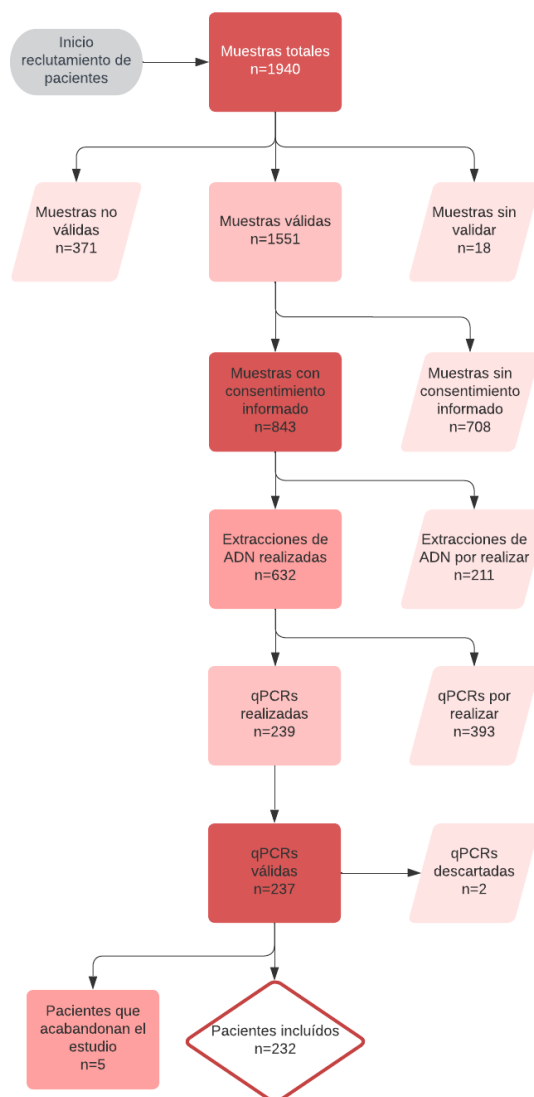


Figura 14. Flujograma que representa la selección de pacientes desde el primer paso hasta obtener el número de pacientes incluidos en el estudio.

6.1.1 Características de la cohorte

Los pacientes seleccionados en el estudio se han clasificado en cuatro grupos según el resultado de la colonoscopia y el análisis anatomopatológico: colonoscopia normal, adenoma no avanzado (ANA), adenoma avanzado (AA) y CCR. Tras analizar los resultados preliminares de nuestra cohorte, la distribución de los pacientes es la siguiente: el 34.9% de los pacientes (81 pacientes) presentaron una colonoscopia normal, el 19.4% (45 pacientes) fueron diagnosticados adenoma no avanzado, el 42.2% (98 pacientes) con adenoma avanzado, siendo este el diagnóstico más prevalente, y el 3.5% (8 pacientes) con CCR (Tab. 5).

Los resultados mostraron que no hay una relación significativa entre la edad y el diagnóstico (p -valor = 0.314). Para comparar los datos, dada su distribución no normal (variable cuantitativa), se analizaron la mediana y el rango intercuartílico (RIQ) de la edad según el diagnóstico. Los resultados muestran que, en los pacientes con colonoscopia normal, la mediana de edad es de 61 años, con un RIQ de entre 53.50 y 64.4 años; en los pacientes con adenoma no avanzado, la mediana es de 62 años, con un RIQ de entre 55 y 66.5 años; en los pacientes con adenoma avanzado, la mediana es de 62 años, con un RIQ de entre 56 y 65 años; y, en los pacientes con cáncer colorrectal, la mediana de edad es de 67 años, con un RIQ de entre 61.25 y 67.75 años (Tab. 5).

Las diferencias entre sexos son significativas según el diagnóstico (Tab. 5). El porcentaje de mujeres con una colonoscopia normal es significativamente mayor, representando el 22% del total (51 pacientes), mientras que los hombres suponen el 12.9% (30 pacientes). Cuando clasificamos a los pacientes con algún tipo de lesión, los porcentajes se invierten. En los pacientes con adenoma no avanzado, el porcentaje de hombres es del 12.9% (30 pacientes), mientras que el de mujeres es del 6.5% (15 pacientes). En el caso de adenoma avanzado, los hombres tienen un porcentaje significativamente superior al de las mujeres, con un 31% (72 pacientes) frente al 11.2% de las mujeres (26 pacientes). Finalmente, en pacientes con cáncer colorrectal (CCR), el número de hombres triplica al de mujeres, con un 2.6% (6 pacientes) frente a un 0.9% (2 pacientes).

Tabla 5. Características de los pacientes incluidos en el estudio clasificados según su diagnóstico.

	Colonoscopia normal	Adenoma No Avanzado	Adenoma Avanzado	CCR	p-valor
n (%)	81 (34.9)	45 (19.4)	98 (42.2)	8 (3.5)	-
Edad (mediana, RIQ)	61 (53.50-64.50)	62 (55.00-66.50)	62 (56.00-65.00)	67 (61.25-67.75)	0.314
Sexo					<0.001
Hombres (n, %)	30 (12.9)	30 (12.9)	72 (31.0)	6 (2.6)	
Mujeres (n, %)	51 (22.0)	15 (6.5)	26 (11.2)	2 (0.9)	

6.2 RAID-CRC SCREEN

Primero, se analizan los resultados de los pacientes comparando los datos de la colonoscopia con los obtenidos mediante la prueba RAID-CRC Screen (Tab. 6). En pacientes con diagnóstico de AA, se obtiene una sensibilidad del 89%, una especificidad del 7%, un valor predictivo positivo del 41%, un valor predictivo negativo del 48% y una precisión diagnóstica del 42%. En pacientes con diagnóstico de CCR, se obtiene una sensibilidad del 100%, una especificidad del 9%, un valor predictivo positivo del 4%, un valor predictivo negativo del 100% y una precisión diagnóstica del 13%. Por último, en pacientes con diagnóstico de Neoplasia Avanzada (AA + CCR), se obtiene una sensibilidad del 90%, una especificidad del 8%, un valor predictivo positivo del 45%, un valor predictivo negativo del 48% y una precisión diagnóstica del 45%.

Finalmente, se analizan los resultados de los pacientes comparando los datos de la colonoscopia con los obtenidos mediante la prueba RAID-CRC Screen en combinación con la prueba FIT (Tab. 6). En pacientes con diagnóstico de AA, se obtiene una sensibilidad del 100%, una especificidad del 4%, un valor predictivo positivo del 43%, un valor predictivo negativo del 100% y una precisión diagnóstica del 44%. En pacientes con diagnóstico de CCR, se obtiene una sensibilidad del 100%, una especificidad del 2%, un valor predictivo positivo del 4%, un valor predictivo negativo del 100% y una precisión diagnóstica del 56%. Por último, en pacientes con diagnóstico de Neoplasia Avanzada, se obtiene una sensibilidad del 100%, una especificidad del 4%, un valor predictivo positivo del 47%, un valor predictivo negativo del 100% y una precisión diagnóstica del 48%.

Tabla 6. Resultados diagnóstico de RAID-CRC y RAID-CRC en combinación con FIT, en la población de estudio.

	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)	Precisión
RAID CRC					
Adenoma Avanzado	89	7	41	48	42
CCR	100	9	4	100	13
Neoplasia Avanzada	90	8	45	48	45
RAID CRC + FIT					
Adenoma Avanzado	100	4	43	100	44
CCR	100	2	4	100	56
Neoplasia Avanzada	100	4	47	100	48

6.3 ABUNDANCIA RELATIVA DE LA MICROBIOTA

Una vez se han recopilado todos los datos y calculado la abundancia relativa de los grupos bacterianos, se procede a comparar las abundancias relativas de las especies en función del diagnóstico. Para ello, se genera una gráfica que representa la abundancia relativa media de las especies según el diagnóstico, incluyendo el intervalo de confianza al 95% en cada barra.

En primer lugar, al representar las abundancias relativas del biomarcador correspondiente a la bacteria *Bacteroides fragilis* (Fig. 15), se observa que la abundancia relativa se mantiene prácticamente constante: 68.88% en pacientes con colonoscopia normal, 65.50% en pacientes con Adenoma No Avanzado, 64.54% en pacientes con Adenoma Avanzado y 72.81% en pacientes con CCR (p-valor = 0.381).

También se han hecho comparaciones entre pacientes con colonoscopia normal y aquellos con Adenoma Avanzado con un p-valor = 0.172 y entre pacientes con colonoscopia normal y aquellos con CCR con un p-valor = 0.439.

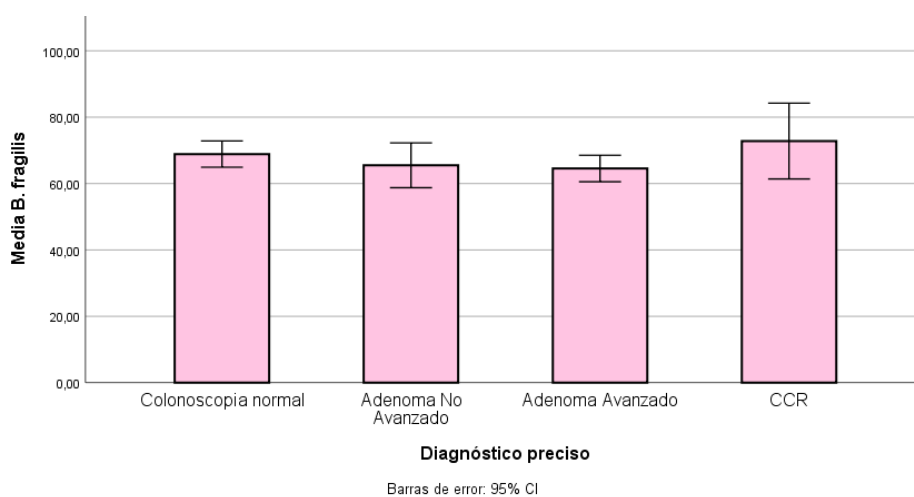


Figura 15. Representación gráfica de la abundancia relativa del biomarcador correspondiente con *Bacteroides fragilis* según los diferentes diagnósticos. n=232, 95% IC, P>0.05.

En segundo lugar, al representar las abundancias relativas del biomarcador correspondiente a la bacteria B46 (*Subdoligranum variable*) (Fig. 16), no se observa una variación considerable en la abundancia relativa en conjunto: 15.38% en pacientes con colonoscopia normal, 17.85% en pacientes con Adenoma No Avanzado, 13.93% en pacientes con Adenoma Avanzado y 7.77% en pacientes con CCR (p-valor =0.109).

También se han hecho comparaciones entre pacientes con colonoscopia normal y aquellos con Adenoma Avanzado con un p-valor = 0.109 y entre pacientes con colonoscopia normal y aquellos con CCR con un p-valor = 0.020.

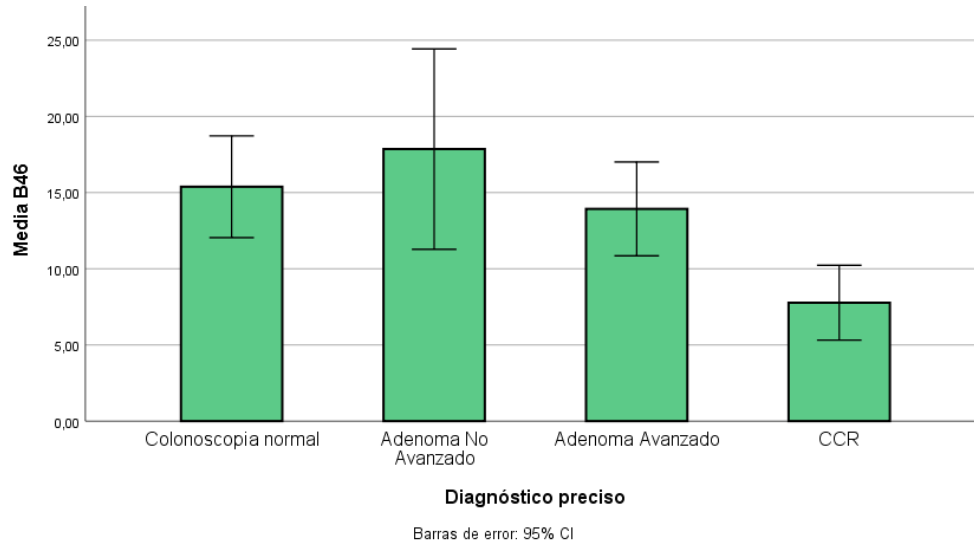


Figura 16. Representación gráfica de la abundancia relativa del biomarcador correspondiente con B46 según los diferentes diagnósticos. n=232, 95% IC, P>0.05.

En tercer lugar, al representar las abundancias relativas del biomarcador correspondiente a la bacteria *Gemella morbillorum* (Fig. 17), se observa que la abundancia relativa se mantiene prácticamente constante: 59.67% en pacientes con colonoscopia normal, 62.46% en pacientes con Adenoma No Avanzado, 62.91% en pacientes con Adenoma Avanzado y 65.94% en pacientes con CCR (p-valor = 0.228).

También se han hecho comparaciones entre pacientes con colonoscopia normal y aquellos con Adenoma Avanzado con un p-valor = 0.187, y entre pacientes con colonoscopia normal y aquellos con CCR con un p-valor = 0.081.

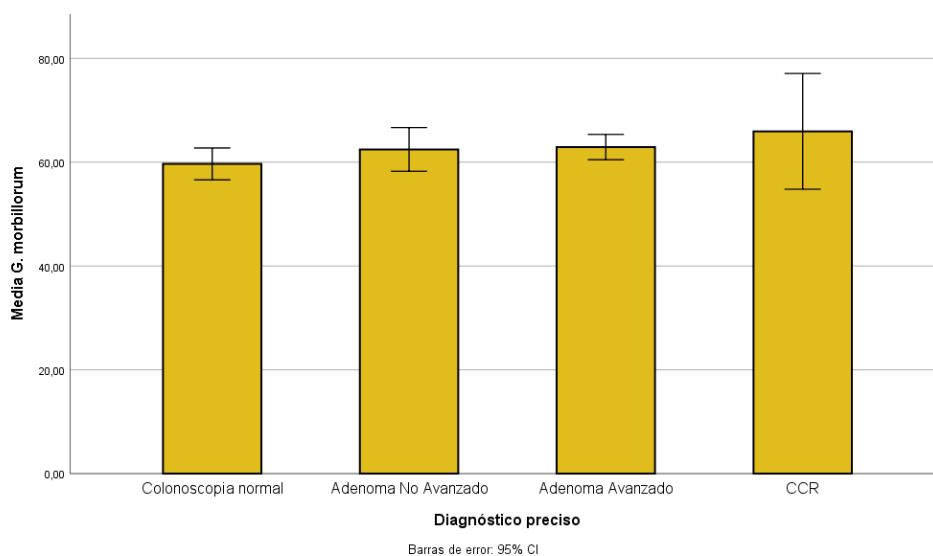


Figura 17. Representación gráfica de la abundancia relativa del biomarcador correspondiente con *Gemella morbillorum* según los diferentes diagnósticos. n=232, 95% IC, P>0.05.

En cuarto lugar, al representar las abundancias relativas del biomarcador correspondiente a la bacteria B48 (Fig. 18), se observa que la abundancia relativa se mantiene prácticamente constante: 19.62% en pacientes con colonoscopia normal, 22.27% en pacientes con Adenoma No Avanzado, 20.26% en pacientes con Adenoma Avanzado y 20.74% en pacientes con CCR (p-valor = 0.730).

También se han hecho comparaciones entre pacientes con colonoscopia normal y aquellos con Adenoma Avanzado con un p-valor = 0.355, y entre pacientes con colonoscopia normal y aquellos con CCR con un p-valor = 0.651.

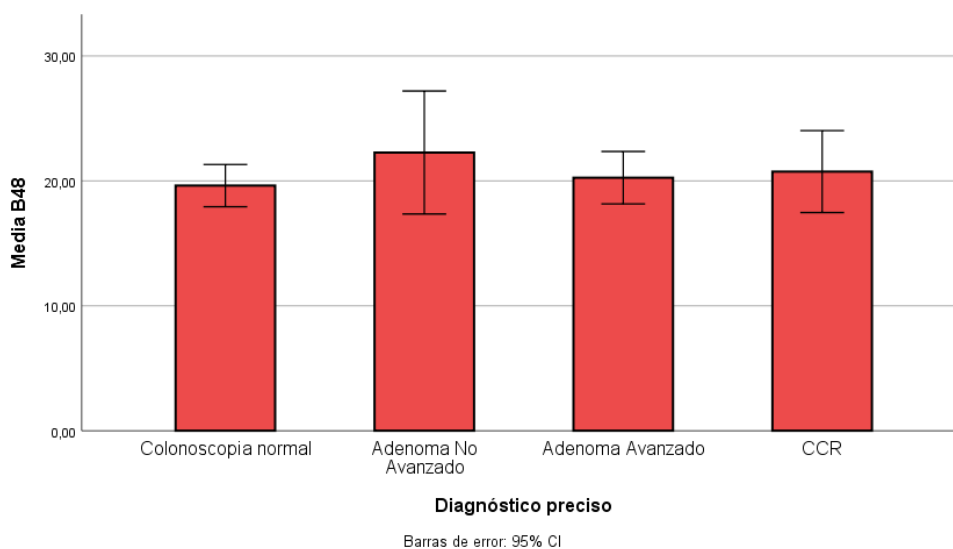


Figura 18. Representación gráfica de la abundancia relativa del biomarcador correspondiente con B48 según los diferentes diagnósticos. n=232, 95% IC, P>0.05.

Por último, al representar las abundancias relativas del biomarcador correspondiente a la bacteria *Faecalibacterium prausnitzii* (Fig. 19), se observa que la abundancia relativa se mantiene prácticamente constante: 25.97% en pacientes con colonoscopia normal, 28.04% en pacientes con Adenoma No Avanzado, 26.20% en pacientes con Adenoma Avanzado y 21.33% en pacientes con CCR (p-valor = 0.882).

También se han hecho comparaciones entre pacientes con colonoscopia normal y aquellos con Adenoma Avanzado con un p-valor = 0.374, y entre pacientes con colonoscopia normal y aquellos con CCR con un p-valor = 0.795.

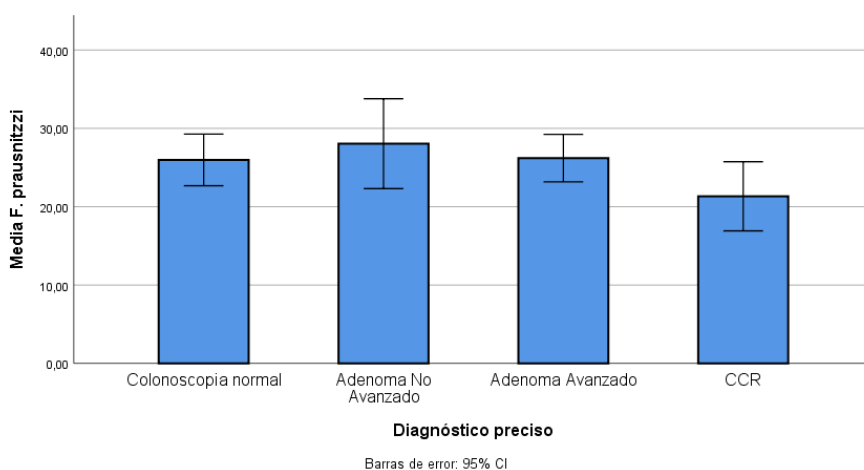


Figura 19. Representación gráfica de la abundancia relativa del biomarcador correspondiente con *Faecalibacterium prausnitzii* según los diferentes diagnósticos. n=232, 95% IC, P>0.05.

6.4 ESTUDIO DE CORRELACIÓN

Para encontrar un posible correlación entre las concentraciones de las especies bacterianas implicadas en el CCR y la concentración de hemoglobina en el FIT, se ha hecho un mapa de calor (Fig.20) con los valores obtenidos de realizar la correlación de Pearson comparando las variables por pares.

Es de destacar el alto valor entre *F. prausnitzii* y B46 con un valor de 0.87, y también los valores prácticamente de 0.00 encontrados entre el valor de FIT y las distintas especies bacterianas analizadas.

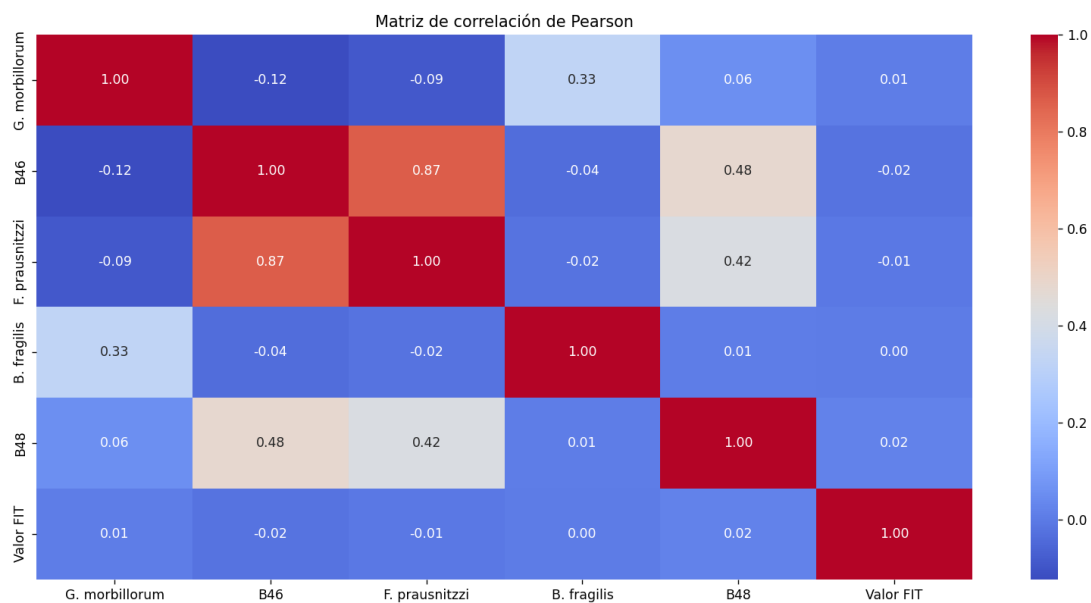


Figura 20. Mapa de calor que representa la correlación (valores entre 0 y 1) entre las diferentes especies bacteriana y el valor de FIT.

6.5 DISCUSIÓN

La detección temprana de adenoma avanzado y cáncer colorrectal mediante la implementación del uso de pruebas sencillas, rápidas y de bajo coste es un paso crítico para aumentar la supervivencia de los pacientes y reducir la mortalidad del cáncer colorrectal.³⁰

Para ello, la técnica ideal sería no invasiva, barata, reproducible y capaz de detectar lesiones premalignas con alta sensibilidad y especificidad. En este estudio se ha intentado demostrar la capacidad del análisis de microbiota fecal como herramienta complementaria a la prueba FIT, para intentar reducir el número de falsos positivos y mejorar los resultados de dicha prueba.

En primer lugar, se ha analizado una cohorte de 232 pacientes con la que se han obtenido resultados preliminares sobre el uso complementario de la prueba RAID-CRC en personas FIT positivas, lo cual es una característica importante a la hora de explicar los resultados de este estudio.

Se ha buscado una posible implicación de la edad de los pacientes con respecto a los diferentes diagnósticos, pero se ha encontrado que las diferencias no son significativas (p -valor=0.314), concluyendo que la edad no está relacionada con el diagnóstico (Tab. 5).

También se ha analizado una posible relación entre el sexo y el diagnóstico, encontrando que los hombres son más propensos a tener cualquier tipo de lesión neoplásica (p -valor <0.001), siendo significativamente mayor el número de pacientes masculinos con diagnósticos de “Adenoma No Avanzado”, “Adenoma Avanzado” y “CCR”, mientras que los pacientes con colonoscopia normal son mayoritariamente mujeres (Fig. 21).

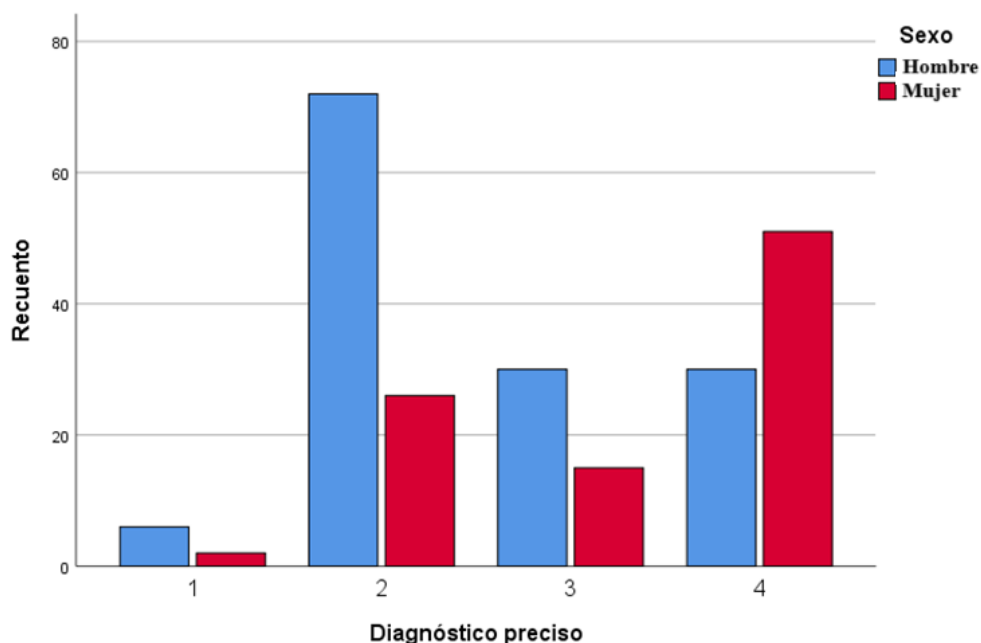


Figura 21. Representación gráfica del número de pacientes dividido en función del sexo y del diagnóstico.

La mejor estrategia de cribado de CCR aún no ha sido definida, pero la más utilizada entre los países occidentales es el uso de la prueba FIT, que muestra una sensibilidad de un 79.0% y un valor predictivo negativo del 99.0% para la detección de CCR.³¹

Cuando hablamos de FIT, la limitación más común son los falsos positivos, lo que provocan la realización de pruebas invasivas sin necesidad y costos adicionales.^{30,32} En este estudio, hemos utilizado el análisis de microbiota a partir de ADN fecal para complementar el uso de FIT y conseguir una reducción de falsos positivos.^{33,34}

Los cinco microorganismos que se han seleccionado como biomarcadores son especies que se les relaciona con el proceso de carcinogénesis, tanto por estudios independientes como por estudios desarrollados por la propia promotora de este estudio.^{34,35,36} Es notable que el uso de la carga bacteriana total para la normalización de datos es crucial para controlar las variables asociadas con la qPCR, diferenciando así los cambios biológicos verdaderos de las variaciones inducidas experimentalmente.³⁶

En este estudio se ha encontrado que, aunque mejora la sensibilidad en un 21% con respecto a FIT, la especificidad obtenida al combinar la prueba FIT con RAID-CRC Screen es sólo de entre un 2-4% (Tab. 6), lo que resulta en una capacidad prácticamente nula para identificar falsos negativos.

En base a estos resultados, y en contraste con estudios previos, no se puede concluir que RAID-CRC tenga una aplicación clínica definitiva según los datos actuales. Sin embargo, dado que el estudio aún está en curso, este resultado no puede considerarse concluyente.^{34,33,37}

Después de analizar la abundancia relativa de la microbiota, se puede concluir que sólo una de las especies estudiadas muestra una diferencia significativa en sus concentraciones según el diagnóstico de los pacientes.

En primer lugar, *B. fragilis* (p-valor=0.381), *G. morbillorum* (p-valor=0.228), B48 (p-valor=0.730) y *F. prausnitzii* (p-valor=0.882) no presentan diferencias significativas en su abundancia relativa. Según nuestros análisis, estas especies no serían marcadores bacterianos efectivos para el diagnóstico de lesiones malignas y premalignas. Asimismo, al analizar las diferencias en las abundancias relativas entre los diagnósticos "Colonoscopia normal-Adenoma Avanzado" y "Colonoscopia normal-CCR", no se encontraron valores significativos.

En segundo lugar, aunque B46 no presenta variaciones significativas en conjunto (p-valor=0.109), sí muestra una diferencia significativa en la variación de la abundancia relativa entre los grupos "Colonoscopia normal-CCR", lo que sugiere que B46 podría ser un marcador bacteriano adecuado para la detección de CCR.

Sería interesante pensar en el cambio de los biomarcadores en futuros estudios, ya que muchos de ellos están relacionados con el cáncer colorrectal hereditario, el cual es mucho menos prevalente que el cáncer colorrectal esporádico. Por este motivo, cambiar los biomarcadores de *Bacteroides fragilis* o *Faecalibacterium prausnitzii* por *Fusobacterium nucleatum* o *Pseudomonas veronii* podría mejorar los resultados de la prueba RAID-CRC Screen.^{22,38,39,40}

Al investigar una posible correlación entre la concentración de hemoglobina en la prueba FIT y las abundancias relativas de las especies, con la hipótesis de que algunas bacterias podrían tener un papel proinflamatorio y otras antiinflamatorio, encontramos que los valores de FIT no se correlacionan con la concentración relativa de bacterias. Sin embargo, observamos una fuerte correlación entre *F. prausnitzii* y B46. Dado que B46 es un buen biomarcador, esto indica que *F. prausnitzii* también podría serlo debido a su correlación casi perfecta en abundancia relativa (Fig. 20).^{41,42}

Por último, una importante limitación de este estudio es la distribución de los diagnósticos entre los pacientes incluidos, ya que la mayoría de ellos (98 pacientes) fueron diagnosticados con adenomas avanzados, mientras que sólo 8 se corresponde con pacientes diagnosticados con CCR. Esta desproporción puede afectar la generalización de los resultados. Al incluir únicamente pacientes positivos en la prueba FIT, debido al alto porcentaje de falsos positivos asociados con esta prueba, se incrementa significativamente la probabilidad de encontrar resultados falsamente positivos. También hay que decir que debido a que el estudio aún sigue en marcha, los resultados de este estudio son preliminares.

De cara al futuro, la irrupción de las tecnologías ómicas podría impulsar un desarrollo exponencial en el conocimiento de la microbiota intestinal, permitiendo el uso de un mayor número de biomarcadores bacterianos precisos. La combinación de la metabolómica, que estudia los metabolitos, junto con técnicas avanzadas de secuenciación, podría facilitar una identificación temprana del cáncer colorrectal, mejorando así las posibilidades de detección y tratamiento efectivos.

7 CONCLUSIONES

- Pese a la mejora en la sensibilidad, la combinación de la evaluación de la firma bacteriana con la prueba FIT no puede concluirse como una mejora significativa en la detección de CCR.
- No se encontró una correlación significativa entre la concentración de hemoglobina en la prueba FIT y la abundancia relativa de las especies bacterianas. Sin embargo, se observó una fuerte correlación entre *F. prausnitzii* y B46.
- Resulta de gran importancia considerar la implementación de diferentes biomarcadores en futuros estudios para mejorar la eficacia de la evaluación bacteriana.
- Los hombres son significativamente más propensos a tener lesiones neoplásicas en comparación con las mujeres, siendo predominantes en diagnósticos de adenoma no avanzado, adenoma avanzado y CCR. Las mujeres, en cambio, son mayoría en los casos de colonoscopia normal.

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Rebersek M. Gut microbiome and its role in colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2021;21.
2. Hofseth LJ, Hebert JR, Chanda A, Chen H, Love BL, Pena MM, et al. Early-onset colorectal cancer: initial clues and current views. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020;17(6):352-64.
3. Wild CP, Scalbert A, Herceg Z. Measuring the exposome: A powerful basis for evaluating environmental exposures and cancer risk. *Environ Mol Mutagen*. 2013; 54:480-99.
4. Keum NN, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019; 16:713-32.
5. Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic Alterations in Colorectal Cancer. *Gastrointest Cancer Res*. 2012;5.
6. Leggett B, Whitehall V. Role of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2088–100.
7. Cubiella J, Marzo-Castillejo M, Mascort-Roca JJ, Amador-Romero FJ, Bellas-Beceiro B, Clofent-Vilaplana J, et al. Gastroenterología y Hepatología Clinical practice guideline. Diagnosis and prevention of colorectal cancer. 2018 Update. *Gastroenterol Hepatol*. 2018;41.
8. Robertson DJ, Selby K. Fecal Immunochemical Test: The World's Colorectal Cancer Screening Test. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 2020;30:511-26.
9. Selby K, Levine EH, Doan C, Gies A, Brenner H, Quesenberry C, et al. Effect of Sex, Age, and Positivity Threshold on Fecal Immunochemical Test Accuracy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology*. 2019;157(6):1494–505.
10. Cresci GA, Bawden E. Gut microbiome: What we do and don't know. *Nutr Clin Pract*. 2015;30(6):734-46.
11. Methé BA, Nelson KE, Pop M, Creasy HH, Giglio MG, Huttenhower C, et al. A framework for human microbiome research. *Nature*. 2012;486(7402):215–21.
12. Cheng Y, Ling Z, Li L. The Intestinal Microbiota and Colorectal Cancer. *Front Immunol*. 2020;11.
13. Karpiński TM, Ożarowski M, Stasiewicz M. Carcinogenic microbiota and its role in colorectal cancer development. *Semin Cancer Biol*. 2022; 86:420-30.

14. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J.* 2017; 474:1823-36.
15. Nel Van Zyl K, Matukane SR, Hamman BL, Whitelaw AC, Newton-Foot M. Effect of antibiotics on the human microbiome: a systematic review. *Int J Antimicrob Agents.* 2022;59.
16. Sousa T, Paterson R, Moore V, Carlsson A, Abrahamsson B, Basit AW. The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs. *Int J Pharm.* 2008;363(1-2):1-25.
17. Prideaux L, Kang S, Wagner J, Buckley M, Mahar JE, De Cruz P, et al. Impact of ethnicity, geography, and disease on the microbiota in health and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19(13):2906-18.
18. Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'connor EM, Cusack S, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature.* 2012;488(7410):178-84.
19. Lyte M, Vulchanova L, Brown DR. Stress at the intestinal surface: Catecholamines and mucosa-bacteria interactions. *Cell Tissue Res.* 2011; 343:23-32.
20. De Palma G, Collins SM, Bercik P, Verdu EF. The microbiota-gut-brain axis in gastrointestinal disorders: Stressed bugs, stressed brain or both? *Journal of Physiology.* 2014;592(14):2989-97.
21. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol.* 2015;21(29):8836-47.
22. Hanus M, Parada-Venegas D, Landskron G, Wielandt AM, Hurtado C, Alvarez K, et al. Immune System, Microbiota, and Microbial Metabolites: The Unresolved Triad in Colorectal Cancer Microenvironment. *Front Immunol.* 2021;12.
23. Chen W, Liu F, Ling Z, Tong X, Xiang C. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PLoS One.* 2012;7(6).
24. 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; 28:401-23.
25. Saus E, Iraola-Guzmán S, Willis JR, Brunet-Vega A, Gabaldón T. Microbiome and colorectal cancer: Roles in carcinogenesis and clinical potential. *Mol Aspects Med.* 2019; 69:93-106.

26. Wu S, Rhee KJ, Albesiano E, Rabizadeh S, Wu X, Yen HR, et al. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med.* 2009;15(9):1016–22.
27. Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR, Dutilh BE. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: Beyond the usual suspects. *Nat Rev Microbiol.* 2012; 10:575-82.
28. Fong W, Li Q, Yu J. Gut microbiota modulation: a novel strategy for prevention and treatment of colorectal cancer. *Oncogene.* 2020; 39:4925-43.
29. Baxter NT, Ruffin MT, Rogers MAM, Schloss PD. Microbiota-based model improves the sensitivity of fecal immunochemical test for detecting colonic lesions. *Genome Med.* 2016;8(1).
30. Bobridge A, Bampton P, Cole S, Lewis H, Young G. The psychological impact of participating in colorectal cancer screening by faecal immuno-chemical testing - The Australian experience. *Br J Cancer.* 2014;111(5):970–5.
31. Chiu HM, Lee YC, Tu CH, Chen CC, Tseng PH, Liang JT, et al. Association between early stage colon neoplasms and false-negative results from the fecal immunochemical test. *Clinical Gastroenterology and Hepatology.* 2013;11(7):832-838.e2.
32. Lafata JE, Simpkins J, Lamerato L, Poisson L, Divine G, Johnson CC. The Economic Impact of False-Positive Cancer Screens. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13.
33. Malagón M, Ramió-Pujol S, Serrano M, Amoedo J, Oliver L, Bahí A, et al. New fecal bacterial signature for colorectal cancer screening reduces the fecal immunochemical test false-positive rate in a screening population. *PLoS One.* 2020;15.
34. Malagón M, Ramió-Pujol S, Serrano M, Serra-Pagès M, Amoedo J, Oliver L, et al. Reduction of faecal immunochemical test false-positive results using a signature based on faecal bacterial markers. *Aliment Pharmacol Ther.* 2019;49(11):1410–20.
35. Sobhani I, Tap J, Roudot-Thoraval F, Roperch JP, Letulle S, Langella P, et al. Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS One.* 2011;6(1).
36. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn ilip, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002.
37. Ulger Toprak N, Yagci A, Gulluoglu BM, Akin ML, Demirkalem P, Celenk T, et al. A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. *Clinical Microbiology and Infection.* 2006;12(8):782–6.

38. Dejea CM, Fathi P, Craig JM, Boleij A, Taddese R, Geis AL, et al. Patients with familial adenomatous polyposis harbor colonic biofilms containing tumorigenic bacteria. *Science*. 2018;359(6375):592-597.
39. Liang S, Mao Y, Liao M, Xu Y, Chen Y, Huang X, et al. Gut microbiome associated with APC gene mutation in patients with intestinal adenomatous polyps. *Int J Biol Sci*. 2020;16(1):135–46.
40. Mori G, Orena BS, Cultrera I, Barbieri G, Albertini AM, Ranzani GN, et al. Gut microbiota analysis in postoperative lynch syndrome patients. *Front Microbiol*. 2019;10.
41. Meng R, Zeng M, Ji Y, Huang X, Xu M. The potential role of gut microbiota outer membrane vesicles in colorectal cancer. *Frontiers in Microbiology*. *Frontiers Media*. 2023;14.
42. Qu R, Zhang Y, Ma Y, Zhou X, Sun L, Jiang C, et al. Role of the Gut Microbiota and Its Metabolites in Tumorigenesis or Development of Colorectal Cancer. *Advanced Science*. *John Wiley and Sons Inc*. 2023;10.