



# Universidad Católica de Santa María

**Escuela de Postgrado**

**Doctorado en Ciencias de la Salud**

## **Determinación del perfil de la microbiota intestinal y su relación con el cáncer colorrectal**

Tesis presentada por:

**Mamani Ruelas, Angel Sixto**

**ORCID: 0000-0001-9082-4975**

para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias de la Salud

Asesor:

**Dr. Bernabe Ortiz, Julio Cesar**

**ORCID: 0000-0003-0313-1033**

Arequipa - Perú

2026

UCSM-ERP

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**  
**ESCUELA DE POSTGRADO**  
**DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR DE TESIS**

Arequipa, 05 de Diciembre del 2025

**Dictamen: 010754-C-EPG-2025**

Visto el borrador del expediente 010754, presentado por:

**2017010791 - MAMANI RUELAS ANGEL SIXTO**

Titulado:

**DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y SU RELACIÓN CON EL  
CÁNCER COLORRECTAL**

Nuestro dictamen es:

**APROBADO**

**29285302 - GUTIERREZ ARANIBAR ROXANA JACQUELINE CANDELARIA  
DICTAMINADOR**



**29281468 - DEL CARPIO SANZ DE LAZO ADA OTILIA  
DICTAMINADOR**



**29315986 - MUÑOZ DEL CARPIO TOIA AGUEDA ROSSANGELLA  
DICTAMINADOR**



**16423061 - FERNANDEZ FERNANDEZ FERNANDO ALBERTO  
DICTAMINADOR**



**40374914 - ALPACA CANO CESAR GUILLERMO  
DICTAMINADOR**



# Determinación del perfil de la microbiota intestinal y su relación con el cáncer colorrectal

## INFORME DE ORIGINALIDAD

5%

INDICE DE SIMILITUD

4%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

5%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1

Submitted to Universidad Católica de Santa María

Trabajo del estudiante

3%

2

journal.hep.com.cn

Fuente de Internet

1%

3

Submitted to Universidad Autónoma de Bucaramanga, UNAB

Trabajo del estudiante

1%

4

tesis.ucsm.edu.pe

Fuente de Internet

1%

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias < 1%

Excluir bibliografía

Apagado

## DEDICATORIA

*A Dios que me ha brindado la vida y apoyado en cada uno de mis pasos en la vida personal y profesional.*

*A mis padres Sixto y Justina, sin ellos no lo habría logrado.*

*A mis abuelitos Andres y Natalia, que, desde el cielo, me brindan su bendición llevándome por el camino del bien.*

*A Angelita, por ser mi compañera y mi cómplice en este camino, por su paciencia infinita y la colaboración en esta etapa de mi vida.*



## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Católica de Santa María, por la oportunidad de formarme durante toda la vida universitaria, así como con el proyecto financiado con fondo 2018 “Caracterización del microbioma humano bacteriano gastrointestinal y su asociación con el Cáncer gástrico y Colorectal: Un estudio basado en la tecnología de “*Next Generation Sequence*”, aprobado mediante resolución N°27550-R-2020.

Al Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas (IREN – Sur Arequipa) donde se brindaron las facilidades para la realización del presente estudio.

A mis maestros en esta etapa: Dra. Jani Pacheco y Dr. Julio Bernabé, por tenerme la paciencia necesaria y haber destinado tiempo para enseñarme nuevas cosas, porque con sus consejos y apoyo se me ha permitido llegar al término de esta tesis y obtener este grado académico.

A mis compañeras y colegas docentes de la universidad: Yuma y Katherine por su empuje y apoyo incondicional a pesar de las dificultades encontradas en el camino.

A mis compañeros del doctorado por su amistad desde el inicio del programa, generando un clima de calidez y hermandad en las aulas de la universidad.

## EPÍGRAFE

*"Mira profundamente en la naturaleza y entonces comprenderás todo mejor"*

***ALBERT EINSTEIN***



## RESUMEN

El cáncer colorrectal representa una de las principales causas de mortalidad por neoplasias a nivel mundial. En los últimos años, ha surgido evidencia sobre el papel de la microbiota intestinal en la génesis y progresión de este tipo de neoplasia. Alteraciones en la composición microbiana como la disbiosis podrían contribuir a procesos inflamatorios crónicos, mutagénesis y cambios en la respuesta inmunológica del huésped. Se realizó un estudio observacional, transversal y correlacional en 38 muestras colectadas en el Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas del Sur. Se incluyeron 34 pacientes con diagnóstico histopatológico de cáncer colorrectal y 4 controles sanos. Se recolectaron muestras fecales y de tejido tumoral para extraer ADN bacteriano. Posteriormente, se amplificó la región V3–V4 del gen 16S rRNA y se realizó secuenciación masiva en plataforma Illumina MiSeq. El análisis bioinformático se ejecutó con QIIME2, aplicando control de calidad, DADA2, análisis de diversidad alfa y beta, y anotación taxonómica con base de datos SILVA. El análisis evidenció diferencias significativas en la composición de la microbiota entre los grupos. En controles se observó una alta abundancia relativa de géneros beneficiosos como *Faecalibacterium*, *Bacteroides* y *Asteroleplasma*, mientras que en pacientes con cáncer colorrectal se identificó un predominio de géneros atípicos como *Novosphingobium*, *Bradyrhizobium* y *Undibacterium*. La diversidad alfa fue menor en el grupo con cáncer, y se observó una clara separación entre ambos grupos en los análisis de diversidad beta. Además, se identificaron posibles biomarcadores bacterianos asociados a la condición neoplásica mediante análisis LEfSe. Se concluye que el cáncer colorrectal se asocia a alteraciones específicas del perfil de la microbiota intestinal, lo que podría contribuir al desarrollo de estrategias diagnósticas y terapéuticas basadas en el microbioma.

**Palabras clave:** Microbiota intestinal, cáncer colorrectal, 16S rRNA.

## ABSTRACT

Colorectal cancer is one of the leading causes of cancer-related mortality worldwide. Emerging evidence highlights the role of the gut microbiota in the development and progression of cancer. Microbial dysbiosis may contribute to chronic inflammation, mutagenesis, and immune dysregulation in the host. An observational, cross-sectional, and correlational study was conducted using 38 samples collected at the Southern Regional Institute of Neoplastic Diseases. The study included 34 patients with histopathologically confirmed cancer and 4 healthy controls. Fecal and tumor tissue samples were collected for bacterial DNA extraction. The V3–V4 region of the 16S rRNA gene was amplified and sequenced using the Illumina MiSeq platform. Bioinformatic analysis was performed with QIIME2, including quality control, DADA2 denoising, alpha and beta diversity metrics, and taxonomic classification using the SILVA database. Significant differences in microbial composition were observed between groups. Healthy controls exhibited high relative abundance of beneficial genera such as *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, and *Asteroleplasma*, whereas cancer patients showed enrichment of atypical genera including *Novosphingobium*, *Bradyrhizobium*, and *Undibacterium*. Alpha diversity was lower in the cancer group, and clear clustering by group was observed in beta diversity analyses. LEfSe analysis identified potential bacterial biomarkers associated with cancer. The findings support the hypothesis that colorectal cancer is associated with distinct alterations in gut microbiota composition. Characterizing these microbial profiles may aid in the development of microbiome-based diagnostic and therapeutic strategies.

**Keywords:** Gut microbiota, colorectal cancer, 16S rRNA.

## ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

EPÍGRAFE

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN ..... 1

HIPÓTESIS..... 2

OBJETIVOS ..... 3

CAPÍTULO I ..... 4

1. Marco teórico..... 5

1.1. Microbiota y microbioma..... 5

1.1.1. Interacciones funcionales..... 5

1.1.2. Desarrollo de la microbiota..... 6

1.2. Papel de la microbiota intestinal en la salud y enfermedad ..... 6

1.2.1. Funciones metabólicas ..... 6

1.3. Cáncer colorrectal..... 8

1.3.1. Epidemiología del cáncer..... 8

1.3.2. Factores de riesgo del cáncer colorrectal ..... 9

1.4. Composición y papel de la microbiota intestinal ..... 11

1.4.1. Disbiosis y carcinogénesis colorrectal ..... 11

1.4.2. Impacto de la dieta y el estilo de vida..... 12

1.4.3. Interacciones entre nutrientes y microbiota ..... 12

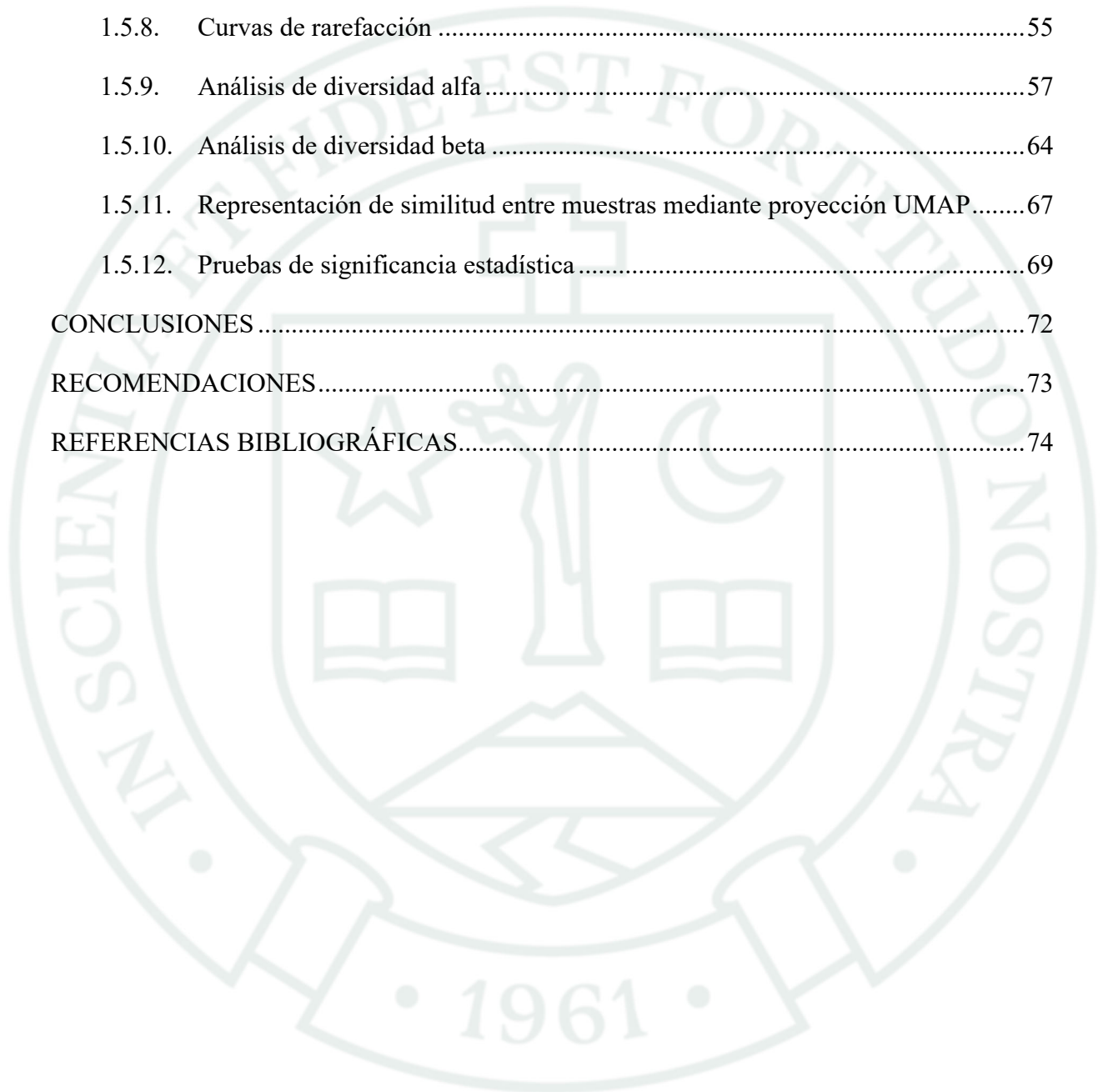
1.4.4. Biomarcadores derivados de la microbiota..... 12

1.5. Terapias dirigidas a la microbiota ..... 13

1.5.1. Probióticos y prebióticos..... 13

CAPÍTULO II.....	14
1. Metodología.....	15
1.1. Lugar de estudio.....	15
1.2. Revisión de historias clínicas.....	15
1.3. Población.....	15
1.4. Muestra biológica.....	15
1.4.1. Recolección de la muestra biológica.....	15
1.4.2. Pre tratamiento y aislamiento de ADN bacteriano de la muestra.....	16
1.5. Amplificación del Gen 16S rRNA.....	16
1.6. Secuenciación.....	16
1.7. Análisis de datos.....	17
1.7.1. Flujo de trabajo.....	17
1.7.2. Control de calidad y filtrado.....	17
1.7.3. Estadísticas del proceso de secuenciación.....	17
1.7.4. Agrupamiento y anotación taxonómica.....	17
1.8. Consideraciones éticas.....	18
CAPÍTULO III.....	19
1. Resultados.....	20
1.1. Selección de muestras.....	20
1.2. Extracción de ADN.....	26
1.3. Amplificación y calidad del producto de PCR.....	28
1.4. Construcción de bibliotecas y secuenciación.....	30
1.5. Análisis bioinformático.....	32
1.5.1. Control de calidad de lecturas.....	32
1.5.2. Eliminación de ruido y agrupación de secuencias con DADA2.....	34
1.5.3. Generación de la tabla de características (ASVs).....	38

1.5.4.	Anotación taxonómica .....	40
1.5.5.	Abundancia relativa por muestra .....	42
1.5.6.	Abundancia relativa por grupo.....	49
1.5.7.	Dendrograma UPGMA .....	53
1.5.8.	Curvas de rarefacción .....	55
1.5.9.	Análisis de diversidad alfa .....	57
1.5.10.	Análisis de diversidad beta .....	64
1.5.11.	Representación de similitud entre muestras mediante proyección UMAP.....	67
1.5.12.	Pruebas de significancia estadística.....	69
CONCLUSIONES .....		72
RECOMENDACIONES.....		73
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		74



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Características clínicas de las muestras antes de la extracción de ADN.....	20
Tabla 2 Características clínicas de las muestras antes de la extracción de ADN.....	22
Tabla 3 Estadísticos descriptivos de la edad de los pacientes incluidos en el estudio.....	24
Tabla 4 Distribución de diagnósticos histopatológicos.....	25
Tabla 5 Concentración y pureza del ADN extraído a partir de muestras fecales.....	27
Tabla 6 Resultados del proceso de denoising con DADA2 en las 38 muestras.....	35
Tabla 7 Lecturas por muestra después del filtrado taxonómico.....	41
Tabla 8 Abundancia relativa de géneros bacterianos en muestra control intestinal (A07) .....	44
Tabla 9 Perfil de abundancia relativa - Muestra COL05 (Cáncer de Colon).....	45
Tabla 10 Perfil de abundancia relativa - Muestra COL16 .....	46
Tabla 11 Comparación de la abundancia relativa promedio de géneros bacterianos entre pacientes con Cáncer colorrectal y controles sanos .....	50
Tabla 12 Índices de diversidad alfa por muestra: características observadas, entropía de Shannon, equidad de Pielou y diversidad filogenética (Faith's PD) .....	61
Tabla 13 Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para los índices de diversidad alfa entre grupos.....	63
Tabla 14 Pruebas de significancia estadística mediante PERMANOVA (ADONIS) para diversidad beta entre grupos Control y Colon_Cancer. ....	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR correspondientes a la región V3-V4 del gen 16S rRNA.....	29
Figura 2 Diagrama de flujo del proceso de construcción de bibliotecas y secuenciación. ....	31
Figura 3 Perfil de calidad de las lecturas forward (lectura directa) obtenidas por secuenciación Illumina. ....	33
Figura 4 Perfil de calidad de las lecturas reverse (lectura inversa) obtenidas por secuenciación Illumina. ....	34
Figura 5 Rendimiento del procesamiento de secuencias por muestra utilizando el algoritmo DADA2. ....	37
Figura 6 Abundancia total de variantes de secuencia (ASVs) detectadas por muestra. ....	39
Figura 7 Distribución de la Abundancia Relativa de Géneros Bacterianos en Muestras de Pacientes y Controles.....	48
Figura 8 Distribución de la abundancia relativa de géneros bacterianos por grupo de estudio. ....	52
Figura 9 Análisis de agrupamiento jerárquico mediante dendrograma UPGMA utilizando distancias UniFrac ponderadas ....	54
Figura 10 Curvas de rarefacción basadas en el índice de diversidad de Shannon para todas las muestras analizadas.....	56
Figura 11 Diversidad alfa basada en características observadas entre los grupos .....	58
Figura 12 Diversidad alfa basada en el Índice de Shannon entre los grupos.....	59
Figura 13 Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) basado en la distancia UniFrac ponderada para las muestras de microbiota intestinal. ....	65
Figura 14 Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) en tres dimensiones basado en la distancia UniFrac ponderada.....	66
Figura 15 Representación de similitud entre muestras mediante proyección UMAP basada en la distancia UniFrac no ponderada.....	68

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Propuesta .....	82
Anexo 2 Consentimiento informado .....	83
Anexo 3 Aprobación del Comité de Ética.....	86



## INTRODUCCIÓN

El cáncer es un problema de salud pública a nivel mundial (1), en Perú, la incidencia de cáncer gástrico y colorrectal se estimó en un 5% y 9,5% respectivamente, mientras que la mortalidad alcanza un 8,2% y 10,1%, siendo el cáncer colorrectal el quinto más frecuente en nuestra región (2,3).

El estudio de las poblaciones microbianas ha avanzado enormemente con la llegada de nuevas técnicas de identificación y secuenciación molecular, dejando atrás los métodos microbiológicos convencionales, parte de ese estudio es encontrar relaciones entre estos microorganismos y la patogenia de diversas enfermedades (4,5). En el cáncer gástrico, es conocida que la infección por *Helicobacter pylori* contribuye notoriamente a la carcinogénesis, induce estrés oxidativo, genotoxicidad, alteración de la respuesta inmune del huésped e inflamación crónica, es por ello que se ha investigado cómo varía la composición de la microbiota entre los individuos en diversas etapas de la enfermedad (6,7). El tracto gastrointestinal contiene la mayor cantidad de microorganismos del cuerpo humano, las variaciones en la composición bacteriana intestinal en pacientes con cáncer colorrectal sugieren un posible papel de las interacciones huésped-microbio en el inicio y progresión de esta neoplasia maligna (8,9).

La presente investigación describe el perfil de la microbiota intestinal asociada al cáncer colorrectal, mediante la tecnología de “Next Generation Sequencing” del gen 16 S rRNA, Por otro lado se hace un estudio analítico del perfil, así como la determinación de índices de biodiversidad y Biomarcadores asociados al cáncer de colon que podrían ser utilizados como nuevos target de un diagnóstico molecular enfocados a la prevención, diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad en pacientes de nuestra región.

## HIPÓTESIS

Dado que la microbiota intestinal desempeña funciones importantes en el organismo y su perfil tiene relación con el estado de salud enfermedad; es probable que un cáncer colorrectal, presente un perfil de microbiota determinado.



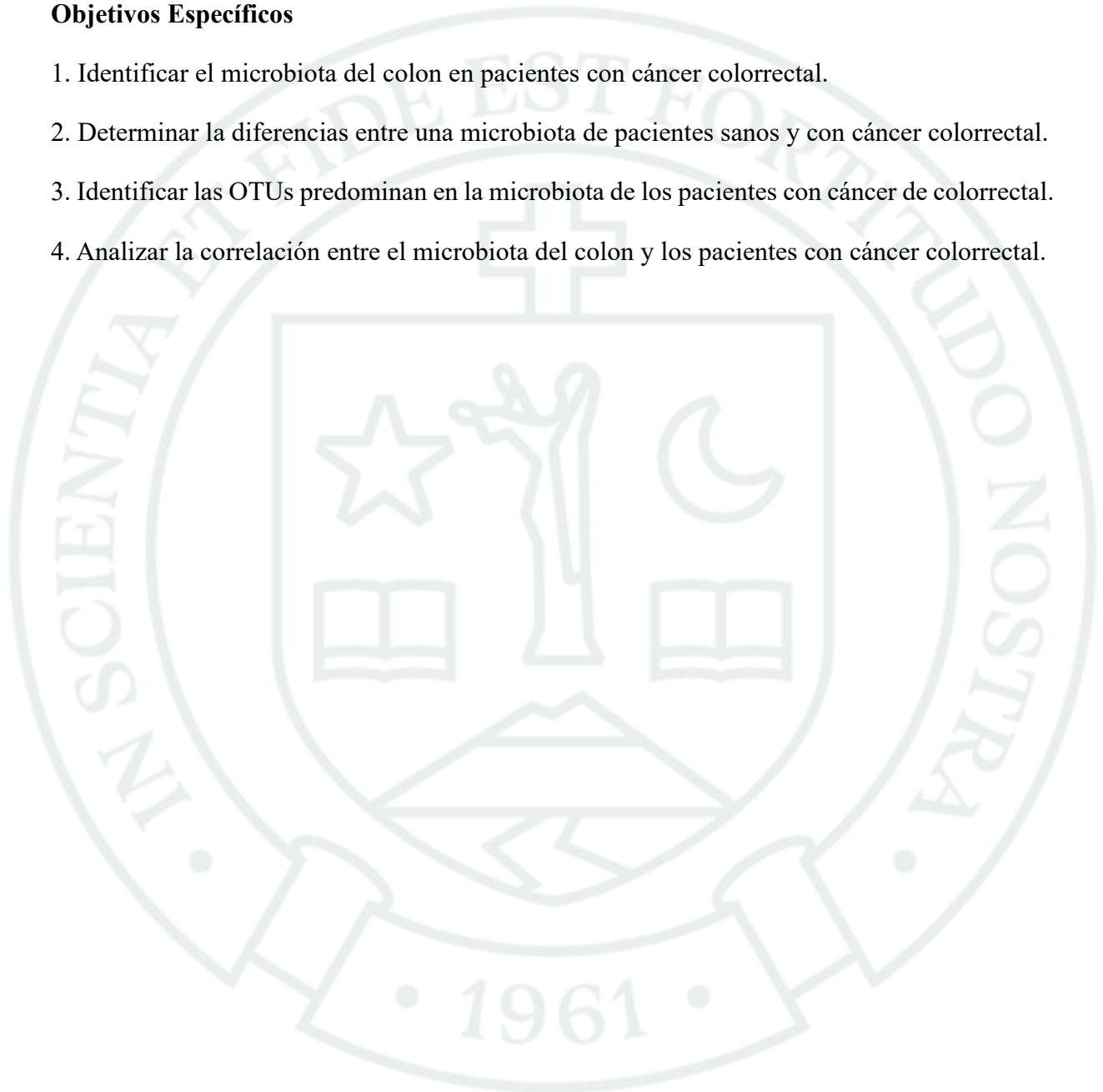
## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Determinar del perfil de la microbiota intestinal y análisis de su relación con el cáncer colorrectal.

### **Objetivos Específicos**

1. Identificar el microbiota del colon en pacientes con cáncer colorrectal.
2. Determinar la diferencias entre una microbiota de pacientes sanos y con cáncer colorrectal.
3. Identificar las OTUs predominan en la microbiota de los pacientes con cáncer de colorrectal.
4. Analizar la correlación entre el microbiota del colon y los pacientes con cáncer colorrectal.





**CAPÍTULO I**

## **1. Marco teórico**

### **1.1. Microbiota y microbioma**

La microbiota y el microbioma son conceptos clave en el estudio de los ecosistemas microbianos que habitan en el cuerpo humano y otros organismos. Aunque estos términos suelen utilizarse indistintamente, tienen distinciones fundamentales que es importante comprender para abordar la complejidad de su interacción con la salud y las enfermedades humanas (10).

La microbiota se refiere al conjunto de microorganismos que habitan un entorno específico, como el tracto gastrointestinal, la piel o las mucosas. Este término engloba una amplia diversidad de microorganismos, incluyendo bacterias, hongos, virus y arqueas. En el caso de la microbiota intestinal, se estima que alberga más de 1000 especies diferentes de bacterias, con una cantidad total que supera el número de células humanas en el cuerpo. Los filos predominantes en la microbiota intestinal incluyen Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria y Proteobacteria. Cada uno de estos filos desempeña funciones específicas, como la descomposición de nutrientes, la producción de metabolitos esenciales y la regulación del sistema inmunitario (11).

Por otro lado, el microbioma es un concepto más amplio que incluye no solo los microorganismos presentes en un hábitat específico, sino también su material genético, sus productos metabólicos y las condiciones ambientales que los rodean. Esto convierte al microbioma en un campo de estudio integral que abarca tanto la diversidad taxonómica como las interacciones funcionales de los microorganismos con su entorno. El microbioma intestinal, por ejemplo, contiene millones de genes que superan por mucho el tamaño del genoma humano, proporcionando una variedad de capacidades metabólicas que el cuerpo humano no posee de manera inherente (12).

#### **1.1.1. Interacciones funcionales**

La microbiota y el microbioma desempeñan roles cruciales en la salud humana, facilitando procesos biológicos esenciales. Uno de los aspectos más destacados es su capacidad para fermentar compuestos no digeribles, como la fibra dietética, generando ácidos grasos de cadena corta (SCFAs). Estos metabolitos tienen propiedades antiinflamatorias y son una fuente importante de energía para las células del colon. Además, la microbiota participa en la síntesis de vitaminas esenciales, como la vitamina K y algunas vitaminas del complejo B, y en la modulación de la respuesta inmunitaria mediante la interacción con células inmunes locales y sistémicas (13).

La composición y la diversidad de la microbiota varían entre individuos y están influenciadas por factores como la dieta, el uso de antibióticos, la edad y las condiciones de salud. Por ejemplo, dietas altas en grasas y bajas en fibra se asocian con una reducción de la diversidad microbiana y un aumento de bacterias patógenas, mientras que una dieta rica en vegetales y fibras favorece una microbiota más diversa y funcional (14,15).

### **1.1.2. Desarrollo de la microbiota**

La microbiota comienza a desarrollarse desde el nacimiento y está influenciada por factores como el tipo de parto (vaginal o cesárea) y la alimentación en la infancia (leche materna o fórmula). Durante los primeros años de vida, la microbiota se diversifica y establece un perfil estable que se mantiene durante la edad adulta, aunque puede sufrir cambios significativos debido a factores externos o enfermedades (16,17).

## **1.2. Papel de la microbiota intestinal en la salud y enfermedad**

La microbiota intestinal es una comunidad compleja de microorganismos que incluye bacterias, hongos, arqueas y virus, que habitan el tracto gastrointestinal humano. Esta comunidad desempeña funciones esenciales para el mantenimiento de la salud y, cuando se altera su equilibrio, puede contribuir al desarrollo de diversas enfermedades. Su papel en la salud y la enfermedad es un área de investigación activa que ha revelado numerosos mecanismos por los cuales la microbiota intestinal interactúa con el organismo (1).

### **1.2.1. Funciones metabólicas**

La microbiota intestinal es clave en el metabolismo de nutrientes. Facilita la digestión de carbohidratos complejos y fibras que no pueden ser descompuestos por enzimas humanas, generando ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) como acetato, propionato y butirato. Estos compuestos tienen propiedades antiinflamatorias y proporcionan energía a las células epiteliales del colon, contribuyendo a la integridad de la barrera intestinal (1).

#### **1.2.1.1. Producción de vitaminas**

La microbiota participa en la síntesis de vitaminas esenciales como la vitamina K, involucrada en la coagulación sanguínea, y vitaminas del complejo B, necesarias para funciones metabólicas y neurológicas. Estas funciones metabólicas destacan la importancia de mantener una microbiota equilibrada (2).

#### **1.2.1.2. Regulación del sistema inmunitario**

La microbiota intestinal juega un papel fundamental en la educación y regulación del sistema inmunitario. Mediante la interacción con las células inmunes presentes en la lámina propia del intestino, promueve la tolerancia a antígenos no patógenos y estimula una respuesta inmune adecuada frente a patógenos. Esto incluye la modulación de linfocitos T reguladores (Tregs) y la producción de inmunoglobulina A (IgA), que protege la mucosa intestinal (3).

#### **1.2.1.3. Mantenimiento de la barrera intestinal**

La integridad de la barrera intestinal es esencial para prevenir la translocación de bacterias y toxinas al torrente sanguíneo. La microbiota contribuye a esta función mediante la producción de SCFAs, que fortalecen las uniones estrechas entre las células epiteliales. Además, estimula la producción de moco y péptidos antimicrobianos que protegen contra la invasión de patógenos (4).

#### **1.2.1.4. Impacto de la disbiosis**

La disbiosis, un desequilibrio en la composición y función de la microbiota, está asociada con diversas enfermedades crónicas. En las enfermedades inflamatorias intestinales (EII), como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, se ha observado una disminución en la diversidad de la microbiota y un aumento de bacterias proinflamatorias. Este desequilibrio contribuye a una respuesta inmune exagerada y daño tisular (5).

#### **1.2.1.5. Relación con enfermedades metabólicas**

La microbiota también está implicada en enfermedades metabólicas como la obesidad y la diabetes tipo 2. Estudios han demostrado que ciertas composiciones microbianas pueden influir en el almacenamiento de grasa y la resistencia a la insulina. Por ejemplo, una mayor proporción de Firmicutes en comparación con Bacteroidetes se ha asociado con un mayor índice de masa corporal (IMC) (6,14).

#### **1.2.1.6. Efectos en el sistema nervioso**

El eje intestino-cerebro, una vía de comunicación bidireccional entre el tracto gastrointestinal y el sistema nervioso central, también es modulada por la microbiota. Esta influencia incluye la producción de neurotransmisores como la serotonina y el ácido gamma-aminobutírico (GABA), que afectan el estado de ánimo y el comportamiento. Además, la microbiota puede impactar en trastornos como la depresión y la ansiedad (2,5).

#### **1.2.1.7. Microbiota y enfermedades cardiovasculares**

La microbiota contribuye a la formación de metabolitos como la trimetilamina-N-óxido (TMAO), que se ha relacionado con un mayor riesgo de aterosclerosis. Sin embargo, una dieta rica en fibra puede promover bacterias que producen SCFAs, las cuales tienen un efecto protector en la salud cardiovascular (2,5).

### **1.3. Cáncer colorectal**

#### **1.3.1. Epidemiología del cáncer**

El cáncer colorrectal (CCR) ocupa un lugar destacado en las estadísticas globales de cáncer debido a su alta incidencia y mortalidad. Según datos de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), en 2020 se diagnosticaron aproximadamente 1.93 millones de casos nuevos, lo que representa cerca del 10% de todos los diagnósticos de cáncer. Además, el CCR es responsable de más de 930,000 muertes anuales, siendo la segunda causa de mortalidad por cáncer a nivel mundial. La mayoría de los casos de cáncer colorrectal son esporádicos y los factores genéticos y ambientales son importantes, alrededor del 20% de todos los pacientes con este cáncer tienen algún componente de riesgo familiar sin cumplir los estrictos criterios para el cáncer colorrectal hereditario, entre el 5 al 10% de todos los cánceres colorrectales se desarrollan en el contexto de síndromes de cáncer hereditario definidos, las dos formas principales son el cáncer colorrectal hereditario sin poliposis (HNPCC) y la poliposis adenomatosa familiar (FAP) (4).

- Regiones de alta incidencia: Países como Estados Unidos, Canadá, Australia y Europa occidental muestran tasas de incidencia superiores a 40 casos por 100,000 habitantes. Esta alta incidencia se asocia con dietas ricas en carnes procesadas, grasas y estilos de vida sedentarios (5).

- Regiones de baja incidencia: En contraste, en África subsahariana y el sudeste asiático, las tasas de incidencia son más bajas (<10 casos por 100,000 habitantes). Sin embargo, la tendencia está cambiando debido a la occidentalización de las dietas y la urbanización (6,7).
- Variación por Sexo y Edad
- Diferencias de género: Los hombres presentan tasas de incidencia y mortalidad más altas que las mujeres, posiblemente debido a diferencias hormonales y patrones de exposición a factores de riesgo (10).
- Grupos etarios: Aunque el CCR es más común en personas mayores de 50 años, la incidencia entre los menores de 50 años está aumentando rápidamente. Este fenómeno, conocido como “CCR de inicio temprano”, se asocia con factores como obesidad infantil, microbiota alterada y exposición temprana a carcinógenos dietéticos (11).

### **1.3.2. Factores de riesgo del cáncer colorrectal**

El cáncer colorrectal (CCR) es una neoplasia multifactorial cuyo desarrollo resulta de una interacción compleja entre predisposición genética, factores ambientales y hábitos de vida. Comprender estos determinantes es esencial para identificar poblaciones de riesgo, implementar estrategias preventivas y diseñar terapias personalizadas (12).

#### **1.3.2.1. Factores genéticos**

Se estima que aproximadamente el 20% de los casos de CCR tienen una base genética, incluyendo tanto síndromes hereditarios claramente definidos como una agregación familiar inespecífica (13). Entre los síndromes más relevantes se encuentran:

- Síndrome de Lynch (Cáncer colorrectal hereditario no polipósico, HNPCC): Es la forma más común de predisposición hereditaria al CCR, representando entre el 3 y 5% de los casos. Está asociado a mutaciones germinales en genes reparadores de errores de apareamiento del ADN, como MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2, lo que conduce a inestabilidad microsatelital y una alta propensión a desarrollar CCR a edades tempranas, así como cáncer de endometrio y otros tumores extracolónicos (14).

- Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF): Causada por mutaciones en el gen supresor de tumores APC, esta condición se caracteriza por la aparición de cientos o miles de pólipos en el colon desde la adolescencia. Sin intervención profiláctica, la transformación maligna hacia CCR es casi inevitable antes de los 40 años (15,16).
- Factores Ambientales y Dietéticos
- El estilo de vida y los hábitos alimentarios representan variables modificables de alto impacto en la incidencia del CCR. Entre los factores más estudiados destacan:
  - Dieta rica en grasas y carnes procesadas: El consumo elevado de carnes rojas y procesadas se ha correlacionado con un mayor riesgo de CCR, debido a la formación de compuestos carcinogénicos como aminas heterocíclicas y hidrocarburos aromáticos policíclicos durante su cocción a altas temperaturas. Asimismo, las dietas ricas en grasas saturadas alteran la composición de la microbiota intestinal, promoviendo estados de inflamación crónica e incremento en la susceptibilidad tumoral (17).
  - Bajo consumo de fibra dietética: Una ingesta reducida de fibra limita la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como el butirato, compuesto con propiedades antiinflamatorias y proapoptóticas para las células tumorales. Además, la fibra acelera el tránsito intestinal, disminuyendo la exposición de la mucosa a carcinógenos presentes en la dieta (18)
  - Consumo de alcohol y tabaquismo: El alcohol crónico incrementa el riesgo de CCR a través de la generación de acetaldehído, un metabolito genotóxico, y la interferencia en la absorción de folato, nutriente clave para la integridad del ADN. Por otro lado, el tabaquismo prolongado se ha vinculado con la formación y progresión de adenomas, debido a la exposición persistente a carcinógenos que inducen mutaciones en el epitelio colónico (19,20).

## 1.4. Composición y papel de la microbiota intestinal

La composición de la microbiota intestinal está influenciada por una serie de factores que incluyen la genética del huésped, el entorno, la dieta, la administración de medicamentos (especialmente antibióticos) y la edad. Estas variaciones individuales son fundamentales para comprender cómo la microbiota puede tener efectos diferentes en la salud y en el desarrollo del cáncer colorrectal (CCR) en distintas poblaciones (21,22).

**Diversidad Microbiana como Indicador de Salud:** La diversidad de la microbiota intestinal se correlaciona con un estado de salud general. Una microbiota más diversa está asociada con funciones metabólicas e inmunológicas robustas. Por el contrario, una diversidad reducida, como la observada en individuos con CCR, se relaciona con inflamación crónica y disbiosis (15,23).

**Interacción Microbiota-Huésped:** La microbiota intestinal regula no solo funciones locales, como la absorción de nutrientes y la protección de la mucosa, sino también procesos sistémicos. Esto incluye la modulación de la resistencia a la insulina, el control del peso corporal y la influencia en el eje intestino-cerebro, lo que resalta su papel integral en el organismo (24).

### 1.4.1. Disbiosis y carcinogénesis colorrectal

La disbiosis no solo altera el equilibrio bacteriano, sino que también tiene implicaciones metabólicas y funcionales críticas. Los estudios recientes han identificado varios mecanismos específicos a través de los cuales la disbiosis contribuye al CCR (25).

- **Producción de Metabolitos Tóxicos:** Además de las colibactinas producidas por ciertas cepas de *Escherichia coli*, otras bacterias producen metabolitos tóxicos como el sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) y los lipopolisacáridos (LPS). Estos compuestos generan estrés oxidativo y daño en el ADN, promoviendo mutaciones y transformaciones malignas (24).
- **Resistencia a Tratamientos Oncológicos:** La microbiota puede influir en la eficacia de los tratamientos de quimioterapia y radioterapia. Por ejemplo, *Fusobacterium nucleatum* ha sido identificado como un factor que reduce la sensibilidad a agentes como el oxaliplatino, a través de la activación de vías de autofagia en células tumorales (26).

#### **1.4.2. Impacto de la dieta y el estilo de vida**

El impacto de la dieta y el estilo de vida en la microbiota intestinal ha sido ampliamente documentado. Estos factores no solo influyen en la composición microbiana, sino también en la producción de metabolitos que pueden tener efectos protectores o dañinos en el epitelio colónico (26).

#### **1.4.3. Interacciones entre nutrientes y microbiota**

- **Fibra Dietética:** La fermentación de la fibra por bacterias como *Lactobacillus* produce butirato, un AGCC con propiedades antitumorales que inhibe la proliferación celular y favorece la apoptosis en células tumorales (27).
- **Grasas Saturadas y Carnes Rojas:** Los lípidos y proteínas derivados de estas fuentes se metabolizan en compuestos como las aminas heterocíclicas, que son genotóxicas y promueven la carcinogénesis (28).
- **Influencia del Ejercicio Físico:** Estudios recientes han demostrado que la actividad física regular modula positivamente la microbiota intestinal, aumentando la proporción de bacterias beneficiosas y reduciendo la inflamación sistémica, lo que podría proteger contra el CCR (29).

#### **1.4.4. Biomarcadores derivados de la microbiota**

El desarrollo de herramientas de diagnóstico basadas en la microbiota intestinal representa un avance significativo en la detección temprana del CCR.

- **Diagnóstico Basado en Análisis de Metagenómica:** La secuenciación del ADN microbiano en muestras fecales permite identificar firmas específicas asociadas con el CCR. Por ejemplo, perfiles que incluyen niveles elevados de *Fusobacterium nucleatum* y *Bacteroides fragilis* son indicativos de un mayor riesgo (30).
- **Perfiles Metabólicos:** Los cambios en el metaboloma intestinal, como un aumento de LPS y una disminución de AGCC, pueden ser utilizados como indicadores tempranos de alteraciones pre-oncogénicas en el colon (31).

## 1.5. Terapias dirigidas a la microbiota

### 1.5.1. Probióticos y prebióticos

- **Probióticos Personalizados:** Investigaciones recientes se centran en la administración de probióticos adaptados al perfil microbiano del paciente, con el objetivo de optimizar su eficacia. Estos probióticos personalizados han mostrado potencial para reducir la inflamación y restaurar la homeostasis microbiana en pacientes con CCR (32,33).
- **Prebióticos Combinados:** Los prebióticos de nueva generación incluyen mezclas de oligosacáridos específicos que potencian el efecto de los probióticos, mejorando la proliferación de bacterias beneficiosas (26).
- **Terapias Combinadas con Inmunoterapia:** La microbiota puede potenciar la eficacia de las terapias inmunológicas al influir en la activación de las células T. Las intervenciones que modulan la microbiota han mostrado resultados prometedores en estudios preclínicos con inhibidores del punto de control inmunitario, como el pembrolizumab (27).
- **Trasplante de Microbiota Fecal (TMF):** Los ensayos clínicos en curso están evaluando el uso del TMF no solo para restaurar una microbiota saludable, sino también para mejorar la respuesta a los tratamientos oncológicos. Aunque esta técnica es prometedora, su implementación clínica requiere una evaluación cuidadosa de riesgos y beneficios (28,29).



## **CAPÍTULO II**

## **1. Metodología**

### **1.1. Lugar de estudio**

Este estudio fue realizado en el Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas (IREN) Sur, ubicado en la ciudad de Arequipa, Perú. La recolección de muestras y el análisis correspondiente se llevaron a cabo entre los meses de julio de 2019 y febrero de 2020. El estudio tuvo un diseño observacional, de tipo transversal y con enfoque correlacional, con el objetivo de analizar la relación entre la microbiota intestinal y el cáncer colorrectal. Para ello, se trabajó con muestras biológicas obtenidas de pacientes intervenidos quirúrgicamente por cáncer colorrectal, bajo protocolos aprobados por el comité de ética.

### **1.2. Revisión de historias clínicas**

Como parte del proceso de selección de pacientes, se revisaron las historias clínicas almacenadas en el archivo del servicio de Anatomía Patológica del IREN. Esta revisión permitió recopilar información clínica de interés, como edad, sexo, antecedentes personales, comorbilidades, localización anatómica del tumor, tratamientos previos y hallazgos anatomopatológicos. Esta información fue utilizada para establecer correlaciones con los perfiles microbianos obtenidos.

### **1.3. Población**

La población de estudio estuvo conformada por pacientes con diagnóstico histopatológico confirmado de cáncer colorrectal, intervenidos quirúrgicamente en el IREN Sur. La muestra fue seleccionada por conveniencia y estuvo compuesta por un total de 38 muestras, de las cuales 34 correspondieron a pacientes con cáncer colorrectal y 4 a controles sanos. Esta proporción permitió realizar comparaciones entre ambos grupos con respecto a los perfiles microbianos intestinales.

### **1.4. Muestra biológica**

#### **1.4.1. Recolección de la muestra biológica**

Se recolectaron dos tipos de muestras biológicas: muestras fecales y muestras de tejido tumoral fresco. Las heces fueron recolectadas en frascos estériles con tapa hermética y transportadas en cadena de frío al laboratorio de biología molecular de la Universidad Católica de Santa María (UCSM). Las muestras de tejido tumoral fueron obtenidas durante el acto quirúrgico, seccionadas en fragmentos de aproximadamente 30 mg y depositadas en tubos Eppendorf estériles sobre hielo seco. Ambas muestras fueron conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

#### **1.4.2. Pre tratamiento y aislamiento de ADN bacteriano de la muestra**

Se tomaron 1,000 mg de cada muestra fecal y se suspendieron en 3 mL de solución salina fisiológica (NaCl al 0.9%) en tubos Falcon de 15 mL. La mezcla se agitó vigorosamente durante 30 segundos en un vórtex (Eurolab, España) y posteriormente se colocó en un shaker de rodillos (JP Selecta, España) durante 10 minutos para asegurar una homogenización eficiente. Luego, se realizó una primera centrifugación a 3,000 rpm durante 2 minutos (Premiere XC-2450, EE. UU.) y se recuperó el sobrenadante, que fue transferido a tubos de microcentrífuga Eppendorf. A continuación, se efectuó una segunda centrifugación a 10,000 rpm durante 1 minuto (Dlab Scientific, China) para obtener un pellet, al que se añadió 1 mL de buffer fosfato salino (PBS). Esta suspensión fue nuevamente centrifugada a 3,000 rpm durante 2 minutos, recuperándose el sobrenadante, el cual fue sometido a una última centrifugación a 10,000 rpm durante 1 minuto. El pellet final obtenido contenía la fracción bacteriana total y fue conservado para los pasos siguientes de extracción de ADN (30).

#### **1.5. Amplificación del Gen 16S rRNA**

Se amplificó la región hipervariable V3-V4 del gen 16S rRNA utilizando primers específicos con códigos de barras únicos para cada muestra. Las reacciones de PCR se realizaron con un mix de alta fidelidad, y los productos amplificados fueron purificados y cuantificados para su posterior uso en la construcción de bibliotecas de secuenciación (31).

#### **1.6. Secuenciación**

Las bibliotecas fueron preparadas utilizando el kit NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep para Illumina. La calidad de las bibliotecas fue evaluada con fluorometría (Qubit) y electroforesis capilar (Bioanalyzer). Finalmente, las muestras fueron secuenciadas en una plataforma Illumina con lecturas pareadas de 250 pb, generando un volumen de datos adecuado para estudios de diversidad microbiana (32).

## **1.7. Análisis de datos**

### **1.7.1. Flujo de trabajo**

El análisis de datos se realizó empleando la plataforma QIIME2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2), que permite una gestión reproducible y estandarizada del análisis de secuencias de microbiomas. El flujo de trabajo incluyó las etapas de importación de secuencias, control de calidad, agrupamiento, anotación taxonómica, análisis de diversidad y visualización (34).

### **1.7.2. Control de calidad y filtrado**

Las secuencias crudas (Raw PE) fueron fusionadas utilizando el módulo DADA2 dentro de QIIME2. Se aplicó un filtrado de calidad que permitió eliminar lecturas de baja calidad y artefactos técnicos. Se eliminaron las quimeras mediante algoritmos internos de DADA2. Se mantuvieron aquellas secuencias con un promedio de calidad mayor a Q30 y contenido GC entre 52% y 54%, asegurando una alta fidelidad en los datos (35).

### **1.7.3. Estadísticas del proceso de secuenciación**

Se analizaron 38 muestras, incluyendo 34 de pacientes con cáncer colorrectal y 4 controles. El rendimiento promedio fue superior a 150,000 lecturas por muestra, con una eficiencia de filtrado que permitió conservar entre el 67% y 78% de las lecturas como etiquetas efectivas. Los valores de calidad de las secuencias fueron consistentemente altos, con valores Q20 superiores al 97.6% y Q30 por encima del 92%. El contenido promedio de GC se mantuvo entre 52% y 54%. Estos parámetros reflejan una calidad técnica adecuada para análisis posteriores de diversidad y composición taxonómica (36).

### **1.7.4. Agrupamiento y anotación taxonómica**

Las secuencias fueron agrupadas en características equivalentes a OTUs, usando un umbral de similitud  $\geq 97\%$ . La anotación taxonómica se realizó con el clasificador Naive Bayes entrenado con la base de datos SILVA, logrando una alta resolución desde el nivel de filo hasta género (37).

#### **1.7.4.1. Evaluación de diversidad**

- Diversidad Alfa: Se evaluaron índices como Chao1, Shannon, Simpson y ACE, lo que permitió cuantificar la riqueza y equidad microbiana de cada muestra.
- Diversidad Beta: Se aplicaron análisis de componentes principales (PCA), escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) y coordenadas principales (PCoA), empleando métricas de distancia como Bray-Curtis y UniFrac para establecer diferencias entre grupos (38).

#### **1.7.4.2. Visualización y identificación de biomarcadores**

Se utilizaron herramientas como KRONA, GraPhlAn y tablas de abundancia para representar la composición relativa de taxones en cada muestra. Asimismo, se aplicó el análisis LDA Effect Size (LEfSe) para identificar taxones diferenciales entre el grupo control y el grupo con cáncer colorrectal, propuestos como potenciales biomarcadores microbianos (37).

#### **1.8. Consideraciones éticas**

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la organización PRISMA, cumpliendo con los principios de la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes participantes firmaron un consentimiento informado, autorizando el uso de sus muestras biológicas y datos clínicos con fines estrictamente investigativos.



**CAPÍTULO III**

## 1. Resultados

### 1.1. Selección de muestras

Como parte inicial del estudio, se seleccionaron muestras biológicas provenientes de pacientes intervenidos quirúrgicamente por cáncer colorrectal o lesiones sospechosas, recolectadas en el Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas del Sur (IREN Sur). La selección incluyó tanto muestras tumorales como controles, y se basó en criterios clínico-patológicos registrados antes del procesamiento molecular. La tabla 1. y 2 resume los datos clínicos relevantes asociados a cada muestra, incluyendo el código identificador, la edad del paciente, el tipo de muestra obtenida.

**Tabla 1**  
**Características clínicas de las muestras antes de la extracción de ADN**

Código	Muestra	Edad	Tipo de Muestra	Información Clínica	Diagnóstico
COL01	LG638-4	57	Hemicolectomía radical derecha ampliada a transversal	Tumor de 4x4 que sobrepasa serosa	Adenocarcinoma tubular moderadamente diferenciado
COL02	LH870	42	Colon sigmoideo	D/C NM de sigmoideo y recto	Adenoma túbulo vellosa con displasia de alto grado
COL03	LH593	63	Tumor de colon sigmoideo	D/C NM de sigmoideo	Adenocarcinoma tubular moderadamente diferenciado
COL04	EJ833	57	Tumoración de 7mm de sigmoideo	D/C NM de colon sigmoideo	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado
COL05	LB779	86	Colon sigmoideo	D/C NM de colon	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado
COL06	ES770-2	53	Lesión elevada del recto. Lesión elevada del sigmoideo	Pólipo adenomatoso D/C NM de sigmoideo	Adenoma Tubular con displasia de bajo grado

COL08	LF343	75	Resección de sigmoideo más recto superior y medio	-	Adenocarcinoma tubular moderadamente diferenciado
COL09	EO-87		Colon sigmoideo	D/C NM de sigmoideo	Adenocarcinoma tubular moderadamente diferenciado
COL10	EL985	74	Lesión elevada de colon descendente	D/C NM de colon descendente	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado
COL11	EK777	75	Ciego y colon ascendente proximal	D/C NM de colon	Adenocarcinoma tubular moderadamente diferenciado
COL12	EP179	40	Lesión de colon descendente distal	D/C Adenoma	Adenocarcinoma in situ
COL13	LE50-1	80	Mucosa de recto (biopsia)	-	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado
COL14	LG938	65	Muestra de colon ascendente	Tumoración de colon ascendente D/C NM de colon	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado
COL15	LH689	47	Pólipo de recto	D/C Adenoma	Adenoma acerrado con displasia de bajo grado focal
COL16	ES457	40	Lesión plana de colon transverso	D/C Adenoma	Adenoma acerrado con displasia de bajo grado

**Nota: Elaboración propia.**

**Tabla 2**

**Características clínicas de las muestras antes de la extracción de ADN**

<b>Código Muestra</b>	<b>Edad</b>	<b>Tipo de Muestra</b>	<b>Información Clínica</b>	<b>Diagnóstico</b>
<b>COL19 LD176</b>	87	Colon ascendente ilion distal (hemicolectomía radical derecha)	D/C Adenocarcinoma de colon	Adenocarcinoma tubular moderadamente diferenciado
<b>COL20 LD717-1</b>	29	Colon derecho	Adenocarcinoma en colon	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado
<b>COL21 LL32</b>	64	Pólipo de colon transverso	-	Pólipo hiperplásico aserrado
<b>COL22 LL713</b>	56	Pólipo de colon descendente	-	Pólipo hiperplásico aserrado
<b>COL23 LD717-4</b>	29	Colon derecho	Adenocarcinoma en colon	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado
<b>COL24 LF39-4</b>	59	Colectomía derecha radical	Tumoración por encima de unión ileocecal	Adenocarcinoma tubular moderadamente diferenciado
<b>COL25 LK940</b>	76	Lesión plana de 2 mm	D/C Adenoma acerrado	Adenoma acerrado con displasia de bajo grado
<b>COL27 LK303</b>	49	Colon sigmoides	Tumoración sigmoidea que retrae serosa D/C NM de colon sigmoideo	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado
<b>COL28 EI266</b>	68	Lesión colon ascendente	D/C adenoma	Adenoma acerrado con displasia de bajo grado
<b>COL30 EI492</b>	64		D/C NM de colon	Adenoma moderado o pobremente diferenciado
<b>COL32 EI493</b>	64	Lesión colon ascendente	D/C adenoma	Adenoma acerrado con displasia de grado focal
<b>COL33 LF124</b>	84	Pólipo de colon cerca al ciego	Lesión elevada en colon ascendente	Adenocarcinoma intramucoso focal

COL34	LF173	84	Lesión tumoral de colon sigmoideo	D/C NM de colon sigmoideo	Adenoma tubular con displasia de alto grado y focos de adenocarcinoma
COL35	EJ525	53	Lesión al recto	D/C adenoma	Pólipo hiperplásico aserrado
COL37	EK533	69	Colon ascendente	D/C NM de colon ascendente	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado
COL38	LY593	69	Tumor de colon sigmoideo	D/C NM de sigmoideo	Adenocarcinoma tubular moderadamente diferenciado
COL39	LI727	62	Colon transversal derecho e íleon	D/C NM de colon derecho	Carcinoma pobremente diferenciado con células
COL40	EP063	67	Lesión colon transversal	D/C adenoma	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado
COL41	LI170	45	Pólipo de colon	D/C adenoma	Pólipo hiperplásico aserrado

**Nota: Elaboración propia.**

La Tabla 3 resume los principales estadísticos descriptivos de la edad de los pacientes participantes en el estudio. Este análisis es fundamental para contextualizar la población de estudio y comprender la posible influencia de la edad en la composición del microbioma intestinal y el desarrollo del cáncer colorrectal (39,40). Se presenta el número total de casos analizados (n), junto con el valor mínimo y máximo de edad, que permiten establecer el rango etario. El promedio o media aritmética ofrece una medida central de tendencia, mientras que la mediana proporciona información sobre la posición relativa de la edad dentro de la distribución. La desviación estándar indica la variabilidad entre los pacientes, y los percentiles (25%, 50%, 75%) permiten observar la dispersión y asimetría de los datos. Este conjunto de indicadores evidencia que los pacientes incluidos corresponden a un rango adulto, en su mayoría en edades medias o avanzadas, lo cual concuerda con la epidemiología del cáncer colorrectal, donde la incidencia aumenta con la edad (41).

**Tabla 3**  
**Estadísticos descriptivos de la edad de los pacientes incluidos en el estudio**

Estadística	Valor
N (conteo)	38
Media	61.58
Desviación estándar	15.64
Mínimo	29
Percentil 25 (Q1)	53
Mediana (Percentil 50)	64
Percentil 75 (Q3)	74
Máximo	87

**Nota: Elaboración propia.**

El examen histopatológico constituye la herramienta diagnóstica definitiva para confirmar la presencia de cáncer colorrectal y para clasificar el tipo de lesión en los estudios clínicos. En el presente estudio, las muestras recolectadas fueron evaluadas por el servicio de Anatomía Patológica del Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas del Sur (IREN Sur), permitiendo establecer con precisión el diagnóstico correspondiente a cada caso (42). Esta información es esencial no solo para validar la inclusión de los pacientes en el grupo de estudio, sino también para correlacionar los perfiles microbianos observados con características tumorales específicas.

**Tabla 4**  
**Distribución de diagnósticos histopatológicos**

Diagnóstico	Frecuencia
Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	10
Adenocarcinoma tubular moderadamente diferenciado	7
Pólipo hiperplásico aserrado	4
Adenoma acerrado con displasia de bajo grado	3
Adenocarcinoma tubular moderadamente diferenciado	1
Adenoma túbulo veloso con displasia de alto grado	1
Adenoma Tubular con displasia de bajo grado	1
Adenocarcinoma in situ	1
Adenoma acerrado con displasia de bajo grado focal	1
Adenoma moderado o pobremente diferenciado	1
Adenoma acerrado con displasia de grado focal	1
Adenocarcinoma intra-mucoso focal	1
Adenoma tubular con displasia de alto grado y focos de adenocarcinoma	1
Carcinoma pobremente diferenciado con células	1

**Nota: Elaboración propia.**

La Tabla 4 presenta la frecuencia de los diagnósticos histopatológicos obtenidos a partir del análisis microscópico de las muestras incluidas. Se detallan tanto lesiones malignas como condiciones preneoplásicas o benignas, permitiendo una visión amplia del espectro de patologías representadas en la cohorte (43). El diagnóstico más prevalente fue el adenocarcinoma colorrectal, en sus variantes moderadamente y bien

diferenciadas, reflejando su alta incidencia en la región estudiada. También se identificaron casos de carcinoma mucinoso, así como algunos diagnósticos de pólipos hiperplásicos y adenomas, considerados lesiones premalignas (44,45).

## **1.2. Extracción de ADN**

El rendimiento promedio de ADN extraído fue de 47 ng/ $\mu$ L, con mediciones consistentes en las diferentes muestras procesadas. Este rango se evaluó mediante espectrofotometría (NanoDrop) y representó una cantidad adecuada para los análisis moleculares posteriores, como la amplificación mediante PCR y la preparación de bibliotecas para la secuenciación de nueva generación (46). La homogeneidad observada en los resultados refleja la eficiencia del protocolo aplicado, diseñado específicamente para maximizar la recuperación de ADN bacteriano a partir de las muestras biológicas procesadas.

El uso de isopropanol como agente precipitante permitió una recuperación eficiente del ADN, mientras que los pasos adicionales de lavado con etanol al 70% minimizaron la presencia de contaminantes que podrían interferir en la cuantificación. Cabe destacar que este rendimiento fue consistente incluso en muestras de menor volumen inicial, gracias al cuidado en la manipulación y al estricto cumplimiento de las condiciones de extracción. Este aspecto es particularmente relevante, dado que algunas muestras provenían de tejidos más desafiantes debido a su densidad celular o estado de conservación.

La evaluación de la pureza del ADN mediante la relación absorbancia A260/A280 mostró valores promedio de 1.8-2.0, indicativos de una excelente pureza del material genético recuperado. Este análisis permitió confirmar que el ADN extraído estaba prácticamente libre de contaminantes, como proteínas residuales, sales y compuestos fenólicos, que podrían inhibir la actividad de las enzimas utilizadas en las reacciones de PCR o interferir en la precisión de las lecturas de secuenciación (47,48).

**Tabla 5**  
**Concentración y pureza del ADN extraído a partir de muestras fecales**

ID de Muestra	Concentración de ADN (ng/μL)	Relación A260/A280
A02	46.84	1.97
A03	51.78	1.87
A07	43.0	1.86
A12	47.71	1.91
COL01	48.89	1.83
COL02	40.7	1.96
COL03	49.11	1.81
COL04	42.56	2.0
COL05	40.98	1.95
COL06	54.23	1.84
COL08	54.48	1.8
COL09	52.13	1.96
COL10	44.57	1.94
COL11	41.47	1.95
COL12	50.26	1.95
COL13	46.6	1.81
COL14	41.83	1.87
COL15	47.43	1.82
COL16	40.52	1.97
COL19	53.64	1.92
COL20	43.88	1.87
COL21	49.94	1.81
COL22	44.68	1.86
COL23	47.8	1.87
COL24	48.2	1.95
COL25	42.77	1.93
COL27	54.54	1.98
COL28	51.63	1.89
COL30	54.09	1.82
COL32	53.42	1.94
COL33	48.97	1.95
COL34	53.83	1.91
COL35	41.33	1.95
COL37	42.94	1.9
COL38	40.68	1.9
COL39	44.88	1.89
COL40	45.83	1.81
COL41	44.07	1.82

**Nota: Elaboración propia.**

La adición de proteinasa K en el protocolo de lisis fue clave para la eliminación eficiente de proteínas, mientras que el uso de RNAsa aseguró la degradación de ARN contaminante que pudiera haber interferido en la medición espectrofotométrica (49). La ausencia de residuos contaminantes se corroboró adicionalmente en los pasos de

electroforesis en gel, donde las bandas de ADN presentaron un aspecto nítido y libre de señales difusas que pudieran indicar presencia de impurezas. Este nivel de pureza fue fundamental para asegurar la reproducibilidad y confiabilidad de los análisis posteriores. Es importante señalar que, en estudios previos, la baja pureza del ADN ha sido un factor limitante para el éxito en la amplificación y secuenciación, lo que resalta la importancia de estos resultados en el contexto del presente estudio (50).

La Tabla 5 muestra los valores de concentración de ADN y la relación A260/A280 obtenidos a partir de 38 muestras fecales procesadas en el presente estudio. Las concentraciones de ADN oscilaron entre 40.12 ng/μL y 54.98 ng/μL, con un promedio general de 47.2 ng/μL, lo que indica un rendimiento adecuado del protocolo de extracción implementado, basado en lisis mecánica y enzimática (51,52). Por otro lado, la relación A260/A280, utilizada como indicador de pureza del ADN, presentó valores dentro del rango de 1.80 a 1.99, compatibles con material genético libre de contaminación por proteínas u otros compuestos orgánicos. Estos resultados reflejan que la calidad del ADN obtenido es óptima para aplicaciones moleculares posteriores, como la amplificación del gen 16S rRNA y la construcción de bibliotecas para secuenciación (53). Desde una perspectiva metodológica, los datos obtenidos refuerzan la eficacia del protocolo de extracción y validan la integridad de las muestras biológicas desde su recolección hasta su procesamiento final. No se observaron valores atípicos ni desviaciones importantes que comprometan la utilidad del ADN extraído en las etapas analíticas subsecuentes del estudio.

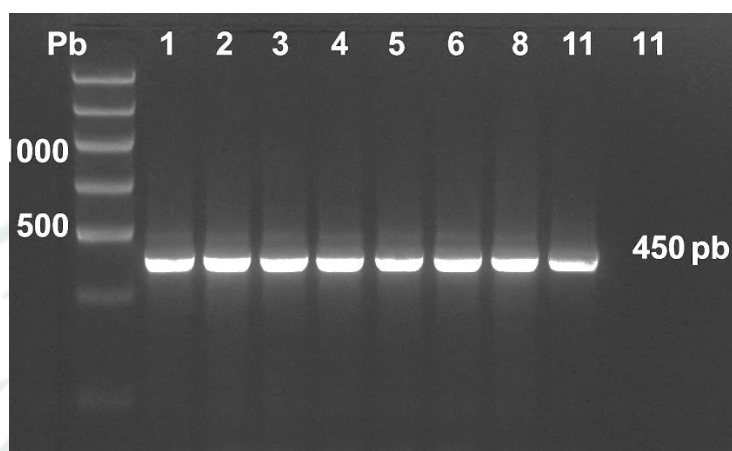
### **1.3. Amplificación y calidad del producto de PCR**

La amplificación de la región hipervariable V3-V4 del gen 16S rRNA se logró exitosamente en todas las muestras procesadas. Se utilizaron primers universales con secuencias adaptadoras compatibles con la plataforma Illumina, y las reacciones de PCR se realizaron empleando una mezcla de alta fidelidad, siguiendo las condiciones térmicas estandarizadas: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos, seguida de 25 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, y 72 °C por 30 segundos, con una extensión final de 72 °C por 5 minutos (54,55).

El éxito de la amplificación fue verificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con SYBR Green. En todas las muestras se observó una banda única de aproximadamente 400–450 pb, correspondiente al tamaño esperado para los amplicones de la región V3-V4. La ausencia de bandas inespecíficas o smearing evidenció la especificidad de la amplificación y la integridad del ADN molde.

**Figura 1**

**Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR correspondientes a la región V3-V4 del gen 16S rRNA.**



**Nota: Elaboración propia.**

Además, la intensidad de las bandas fue homogénea entre las diferentes muestras, lo que sugiere una buena eficiencia de amplificación y uniformidad en las concentraciones iniciales de ADN. Este resultado garantizó la idoneidad del producto de PCR para su uso en la construcción de bibliotecas de secuenciación masiva, asegurando un rendimiento óptimo en la etapa posterior de lectura de secuencias.

La Figura 01 muestra los resultados obtenidos tras la amplificación por PCR de la región hipervariable V3-V4 del gen 16S rRNA, visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con SYBR Green. El marcador molecular (carril M) contiene bandas patrón de referencia que permiten estimar el tamaño de los fragmentos amplificados. Los carriles 1 al 9 corresponden a muestras fecales de distintos individuos analizados en el presente estudio. Todas las muestras revelaron una banda única y bien definida alrededor de los 450 pb, que coincide con el tamaño esperado del amplicón generado por los primers universales para la región V3-V4 (56,57).

La ausencia de bandas inespecíficas, smearing (barrido) o productos secundarios sugiere una alta especificidad de los primers utilizados y una adecuada optimización de las condiciones de PCR, incluyendo la concentración de los reactivos, la temperatura de alineamiento y el número de ciclos. Esto es particularmente relevante considerando que el éxito en la amplificación es crítico para la posterior construcción de bibliotecas

de secuenciación y para la obtención de datos robustos de microbiota mediante técnicas de alto rendimiento (58). La correcta amplificación de la región V3-V4 no solo valida la calidad del ADN extraído, sino que también representa un paso esencial para lograr una taxonomía precisa en el análisis bioinformático posterior. Estos resultados confirman la idoneidad del protocolo molecular empleado, asegurando la integridad y la comparabilidad de los datos generados en el estudio (59).

#### **1.4. Construcción de bibliotecas y secuenciación**

Los productos de PCR correspondientes a la región V3-V4 del gen 16S rRNA fueron sometidos a un proceso de purificación y cuantificación para asegurar su idoneidad en la construcción de bibliotecas de secuenciación. Cada muestra amplificada fue evaluada mediante fluorometría utilizando el sistema Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific), que permite una cuantificación precisa de ácidos nucleicos sin interferencias de contaminantes. Asimismo, la calidad e integridad de los amplicones fue confirmada mediante electroforesis capilar en el sistema Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), lo que garantizó la uniformidad en tamaño (~450 pb) y ausencia de productos no específicos.

Las bibliotecas se construyeron utilizando el kit NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit para Illumina®, según las recomendaciones del fabricante. Este proceso incluyó el añadido de adaptadores indexados únicos (barcodes) para cada muestra, permitiendo su identificación en la etapa de secuenciación multiplexada. Tras la ligación de adaptadores, se realizaron pasos de enriquecimiento por PCR y una nueva purificación para eliminar fragmentos no deseados y primer-dímeros.

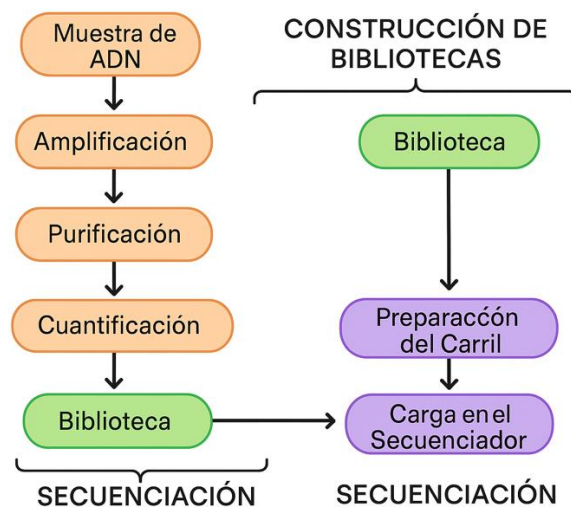
La validación final de las bibliotecas incluyó una cuantificación mediante qPCR específica para librerías, lo cual permitió la normalización equimolar de todas las muestras antes de ser agrupadas en un único pool. Este enfoque garantiza una representación balanceada de cada muestra en el proceso de secuenciación.

La secuenciación se llevó a cabo en la plataforma Illumina MiSeq, utilizando un protocolo de lecturas pareadas (paired-end) de 250 pb, lo que proporciona una cobertura adecuada para el análisis taxonómico fino de la microbiota intestinal. El conjunto de datos crudos se generó en formato FASTQ y fue utilizado como punto de partida para el análisis bioinformático posterior.

La figura 02 representa el flujo completo seguido para preparar las muestras biológicas con fines de análisis metagenómico basado en la región V3-V4 del gen 16S rRNA. El proceso inicia con la obtención del ADN microbiano, que es amplificado mediante PCR utilizando primers específicos. A continuación, los productos de PCR son purificados para eliminar impurezas y cuantificados para estandarizar las concentraciones entre muestras.

**Figura 2**

**Diagrama de flujo del proceso de construcción de bibliotecas y secuenciación.**



**Nota: Elaboración propia.**

Posteriormente, se construyen bibliotecas mediante la ligación de adaptadores indexados únicos para cada muestra. Estas bibliotecas son enriquecidas mediante PCR y evaluadas en cuanto a su integridad y concentración. Una vez normalizadas, se procede con la preparación del carril y la carga en el secuenciador. La secuenciación se lleva a cabo en la plataforma Illumina MiSeq, utilizando tecnología de lectura pareada (paired-end), lo que permite una cobertura adecuada para la identificación taxonómica de microorganismos presentes en las muestras. Este flujo garantiza reproducibilidad, precisión y calidad en la generación de datos de secuenciación, esenciales para el análisis de diversidad y composición de comunidades microbianas intestinales (60).

## 1.5. Análisis bioinformático

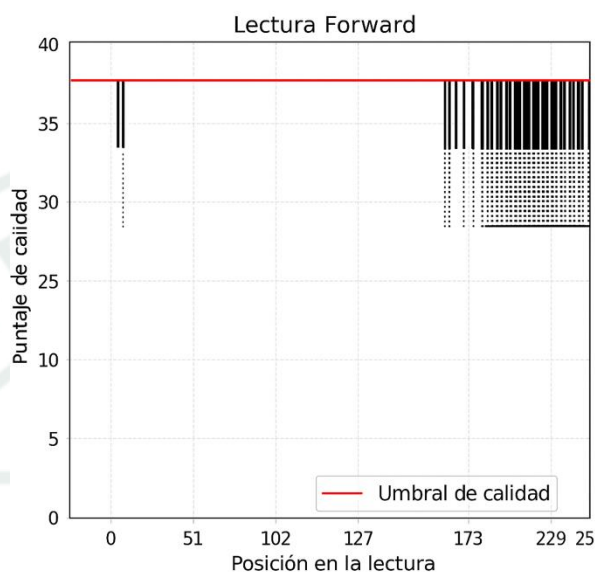
### 1.5.1. Control de calidad de lecturas

El control de calidad de las lecturas de secuenciación se llevó a cabo utilizando el módulo de visualización de QIIME2, generando perfiles de calidad para ambas direcciones de lectura (Forward y Reverse Reads). En la Figura correspondiente se presentan los gráficos de puntuación de calidad Phred a lo largo de las posiciones de lectura. Las lecturas forward mostraron una alta calidad en los primeros 200 nucleótidos, manteniéndose la mayoría por encima de una puntuación Phred de 30, lo que indica una probabilidad de error menor al 0.1%. Sin embargo, se observó un descenso progresivo a partir del nucleótido 200, por lo que se aplicó un truncamiento conservador en el preprocesamiento para eliminar los extremos de menor calidad. En el caso de las lecturas reverse, el descenso de calidad fue más pronunciado a partir del nucleótido 150, con varias lecturas cayendo por debajo del umbral de calidad crítica de 20.

La figura 03 muestra la distribución de las puntuaciones de calidad Phred a lo largo de las posiciones de lectura directa (forward reads) en las secuencias obtenidas del gen 16S rRNA. La línea roja indica el umbral crítico de calidad Phred 20, correspondiente a una probabilidad de error del 1% por base (61). Las lecturas forward presentaron un perfil de calidad alto y sostenido durante los primeros ~200 nucleótidos, manteniéndose mayoritariamente por encima de Phred 30, lo que corresponde a una precisión superior al 99.9% en la asignación de bases. A partir del nucleótido 200, se observa una caída progresiva en la calidad, con un ensanchamiento de la distribución de valores, lo que indica una mayor variabilidad entre las muestras. Este patrón es característico en plataformas Illumina, donde el rendimiento decrece hacia el final de la lectura. En base a esta observación, se definieron parámetros de truncamiento en la posición 220 para eliminar regiones con potencial riesgo de errores, optimizando el equilibrio entre longitud de lectura y calidad informativa.

**Figura 3**

**Perfil de calidad de las lecturas forward (lectura directa) obtenidas por secuenciación Illumina.**



**Nota: Elaboración propia.**

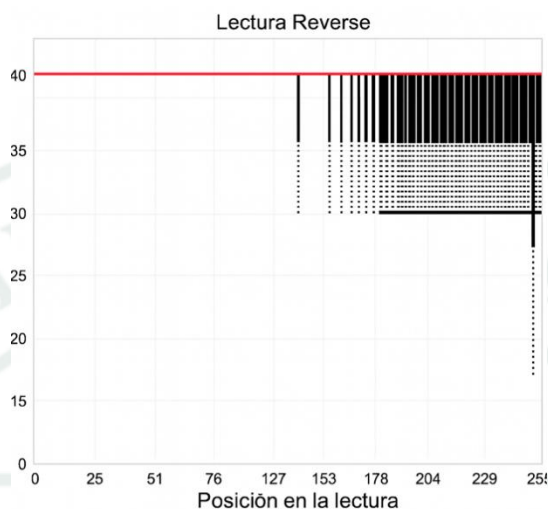
La Figura 04 muestra el perfil de calidad base a base de las lecturas inversas (reverse reads) utilizadas en el análisis de diversidad microbiana. La línea roja corresponde al umbral mínimo aceptable de calidad, establecido en Phred 20 (62).

En comparación con las lecturas forward, las lecturas reverse evidenciaron una disminución de calidad más temprana y marcada. A partir del nucleótido 150, se observa una caída sostenida en las puntuaciones de calidad, con múltiples secuencias por debajo del valor crítico de Phred 25 y aproximándose al límite mínimo aceptable hacia el final de la lectura. Este patrón motivó la aplicación de un truncamiento más estricto alrededor del nucleótido 180, con el objetivo de eliminar bases de baja calidad que podrían comprometer la precisión en la asignación taxonómica y detección de variantes (63).

En conjunto, los perfiles de calidad de las lecturas forward y reverse sustentaron la necesidad de aplicar un filtrado riguroso. Esta estrategia aseguró la integridad de los datos utilizados en los análisis bioinformáticos posteriores, contribuyendo a una caracterización microbiológica confiable y reproducible.

**Figura 4**

**Perfil de calidad de las lecturas reverse (lectura inversa) obtenidas por secuenciación Illumina.**



**Nota: Elaboración propia.**

### **1.5.2. Eliminación de ruido y agrupación de secuencias con DADA2**

Para la depuración de datos de secuenciación, se utilizó el algoritmo DADA2 implementado en QIIME2, el cual permite inferir variantes reales de secuencia mediante la modelación estadística de los errores introducidos durante la secuenciación masiva. A diferencia del enfoque clásico basado en OTUs, DADA2 genera ASVs (Amplicon Sequence Variants) con resolución de un solo nucleótido, lo que permite una identificación más precisa de la diversidad microbiana. Durante el procesamiento, el número de lecturas crudas por muestra varió entre 170,525 (COL11) y 279,518 (COL39). De estas, aproximadamente 82.4% a 88.1% pasaron el filtro de calidad inicial, conservando un total de hasta 155,000 lecturas efectivas por muestra. Esta etapa eliminó lecturas con baja calidad promedio o presencia de adaptadores residuales (56).

**Tabla 6****Resultados del proceso de denoising con DADA2 en las 38 muestras**

ID de Muestra	% Lecturas Filtradas	% Fusionadas	% No Quiméricas
A02	84.89	70.89	47.25
A03	88.07	73.37	45.6
A07	86.07	78.59	69.87
A12	83.84	73.4	61.16
COL01	82.43	75.97	71.24
COL02	85.13	74.83	63.89
COL03	84.68	76.28	65.23
COL04	84.51	79.16	66.67
COL05	85.0	78.14	69.74
COL06	85.08	77.76	69.0
COL08	82.59	74.55	64.95
COL09	83.04	76.93	71.42
COL10	85.17	80.42	74.12
COL11	84.32	76.77	68.14
COL12	82.83	75.3	67.15
COL13	95.14	35.58	6.47
COL14	95.6	58.39	7.89
COL15	95.66	62.96	34.78
COL16	95.37	51.28	3.62
COL19	95.55	63.31	16.76
COL20	95.43	53.98	16.23
COL21	95.49	61.48	15.96
COL22	95.15	59.72	3.1
COL23	95.28	60.2	7.8
COL24	95.34	57.35	7.29
COL25	94.95	61.47	7.85
COL27	95.16	57.54	6.86
COL28	94.85	57.26	6.79
COL30	95.68	56.61	8.42
COL32	95.17	60.46	8.79
COL33	95.37	54.68	12.95
COL34	94.96	57.87	11.64
COL35	95.19	58.19	5.44
COL37	95.19	55.14	6.07
COL38	95.31	60.58	3.49

COL39	93.6	67.3	7.83
COL40	95.2	60.8	22.74
COL41	95.03	52.56	7.55

**Nota: Elaboración propia.**

Luego del proceso de denoising, que incluye la corrección de errores basada en las tasas aprendidas por el algoritmo, se retuvieron entre 143,000 y 151,000 lecturas por muestra. Posteriormente, en la etapa de fusión de lecturas pareadas, el porcentaje de éxito osciló entre el 70.89% (A02) y el 79.16% (COL04), lo cual indica una adecuada longitud de solapamiento entre las lecturas forward y reverse. Esta eficiencia sugiere que las regiones amplificadas y las condiciones de secuenciación fueron óptimas para obtener productos solapados completos.

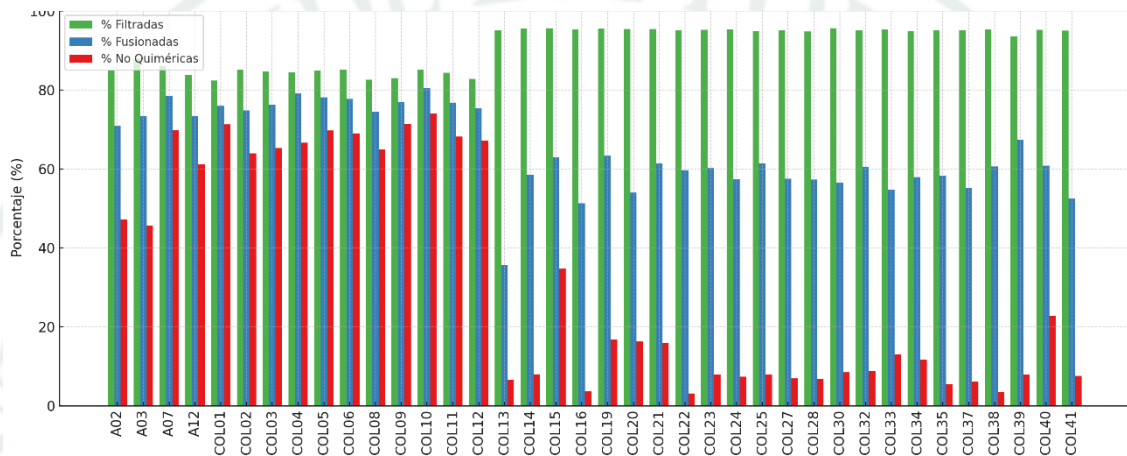
En cuanto a la eliminación de quimeras, se obtuvo un porcentaje de secuencias no quiméricas (validadas como biológicas) entre 45.60% (A03) y 74.12% (COL10), con un promedio general superior al 60%. Las secuencias quiméricas fueron identificadas como artefactos generados por la recombinación durante la amplificación y descartadas automáticamente por el modelo de DADA2.

La Tabla 6 resume el rendimiento del algoritmo DADA2 aplicado a las 38 muestras del estudio, permitiendo visualizar de manera comparativa la calidad y profundidad del proceso de limpieza de datos. El porcentaje de lecturas filtradas representa la fracción de secuencias crudas que superaron el umbral de calidad y fueron retenidas para análisis posteriores. Este valor osciló entre 82.4% y 88.1%, lo que indica una alta proporción de secuencias útiles y una buena calidad técnica de los datos iniciales. En la columna de lecturas fusionadas, se reporta el porcentaje de pares de lectura (forward y reverse) que se superpusieron correctamente para formar una secuencia continua. Los valores fluctúan entre 53.9% y 80.4%, evidenciando una adecuada longitud de solapamiento y confirmando que la estrategia de secuenciación fue adecuada para cubrir completamente la región V3-V4 del gen 16S rRNA (64).

Finalmente, la columna de secuencias no quiméricas representa la fracción de lecturas que fueron validadas como biológicas, descartando artefactos generados por recombinación durante la amplificación. Este porcentaje varió

considerablemente entre muestras (3.1% hasta 74.1%), reflejando diferencias en la eficiencia de amplificación y en la complejidad de la microbiota individual. No obstante, en la mayoría de muestras se logró recuperar una proporción sustancial de secuencias de alta calidad.

**Figura 5**  
**Rendimiento del procesamiento de secuencias por muestra utilizando el algoritmo DADA2.**



**Nota: Elaboración propia.**

La Figura 05 permite identificar variabilidad entre las muestras en cuanto a la eficiencia del procesamiento bioinformático. Si bien la mayoría de las muestras presentaron porcentajes de filtrado y fusión relativamente altos y consistentes, se evidencian casos atípicos en el rendimiento de la etapa de eliminación de quimeras, con algunas muestras (por ejemplo, COL16 y COL22) mostrando una drástica caída en el porcentaje de secuencias no quiméricas.

Esta representación gráfica es útil para detectar posibles muestras problemáticas o con características biológicas particulares que puedan haber influido en la eficiencia del procesamiento (p. ej., baja complejidad microbiana, presencia de inhibidores de PCR o alto número de artefactos de amplificación). Además, la visualización conjunta de las tres métricas facilita el diagnóstico integral del pipeline, permitiendo establecer relaciones entre las etapas del proceso.

### 1.5.3. Generación de la tabla de características (ASVs)

Una vez completadas las etapas de filtrado, corrección de errores y remoción de quimeras, se procedió a generar la tabla de características del estudio, la cual consolida el número de veces que cada ASV (Amplicon Sequence Variant) fue detectado en cada muestra. Este paso es crucial para transformar los datos de secuencias individuales en una matriz de abundancia relativa, que constituye la base de los análisis cuantitativos de diversidad y composición microbiana.

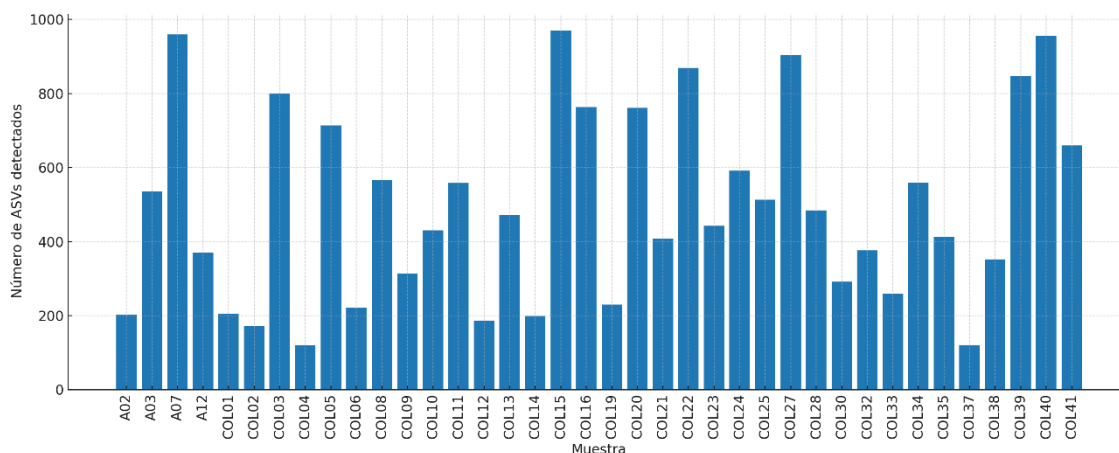
La tabla generada, denominada `feature_table.qza`, contiene los recuentos brutos de secuencias por ASV y muestra, permitiendo identificar la distribución y frecuencia relativa de cada variante a lo largo de la cohorte analizada. Junto a ella, se generó un archivo paralelo `asv_sequences.qza`, que almacena la secuencia representativa de cada ASV, esencial para su posterior clasificación taxonómica.

Estas salidas permiten calcular métricas de diversidad alfa y beta, construir perfiles taxonómicos y realizar comparaciones intergrupales. Adicionalmente, se integró un filtro de calidad taxonómico (`filtered_table.qza`), mediante el cual se eliminaron ASVs asociados a organismos no bacterianos, como cloroplastos y mitocondrias, que pueden generar sesgos en la interpretación del microbioma intestinal.

Este proceso asegura que el análisis subsiguiente se base exclusivamente en secuencias de origen bacteriano, reforzando la fidelidad del estudio y minimizando el impacto de contaminantes técnicos o biológicos. La estructura final de la tabla de características representa un dataset depurado, de alta resolución, y preparado para las etapas siguientes de anotación taxonómica y análisis de diversidad (65).

**Figura 6**

**Abundancia total de variantes de secuencia (ASVs) detectadas por muestra.**



**Nota: Elaboración propia.**

La Figura 06 permite visualizar la variabilidad interindividual en la riqueza de ASVs detectada por muestra, reflejando tanto la diversidad biológica intrínseca de la microbiota intestinal como la eficiencia técnica del análisis. El número de ASVs varió de forma considerable entre muestras, con algunas mostrando una riqueza inferior a 200 unidades, mientras que otras superaron los 900 ASVs, lo que podría asociarse a diferencias en el estado de salud, el tipo de muestra, la profundidad de secuenciación o la calidad del ADN extraído.

Esta variabilidad es esperada en estudios de microbioma y representa una señal importante para el análisis de diversidad alfa y beta, dado que influye directamente en las métricas de riqueza, equidad y disimilitud. Las muestras con menor número de ASVs podrían estar asociadas a estados disbióticos, procesos inflamatorios o tratamientos previos, mientras que aquellas con mayor abundancia reflejan una comunidad microbiana más compleja y posiblemente más estable.

#### 1.5.4. Anotación taxonómica

Una vez generadas las secuencias representativas de cada ASV, se procedió con su clasificación taxonómica utilizando el clasificador Naive Bayes implementado en QIIME2. Este clasificador fue previamente entrenado con la base de datos SILVA versión 138, correspondiente a la región V3-V4 del gen 16S rRNA, lo que permite una identificación precisa desde el nivel de filo hasta género, e incluso especie en algunos casos.

La clasificación taxonómica permitió asignar la gran mayoría de ASVs a niveles taxonómicos confiables. No obstante, en concordancia con las mejores prácticas bioinformáticas, se ejecutó un filtrado adicional en el que se eliminaron las secuencias que no pudieron ser asignadas al menos al nivel de filo, así como aquellas que correspondían a organismos no bacterianos específicamente cloroplastos y mitocondrias, que suelen representar contaminación de origen vegetal o celular humano (66).

El número de lecturas conservadas después de este filtrado se presenta en la Tabla 6. Se observa una amplia variabilidad entre muestras, con valores que oscilan entre 6,223 (COL22) y 133,785 (COL09) lecturas. Este rango refleja tanto la complejidad microbiana de cada muestra como la eficiencia técnica de amplificación y asignación taxonómica. Las muestras controles (A02–A12) mostraron en general una mayor proporción de lecturas clasificadas, lo cual podría estar relacionado con una menor presencia de ADN eucariota y una microbiota más estable.

La tabla 7 presenta el número total de lecturas válidas por muestra tras la eliminación de secuencias no clasificadas y contaminantes taxonómicos. Se evidencia una considerable variabilidad entre las 38 muestras analizadas, con valores que oscilan entre 6,223 lecturas (COL22) y 133,785 lecturas (COL09).

**Tabla 7****Lecturas por muestra después del filtrado taxonómico**

<b>ID de Muestra</b>	<b>Lecturas Después del Filtro</b>
A02	84757
A03	78078
A07	125090
A12	106693
COL01	122959
COL02	109429
COL03	117860
COL04	118718
COL05	119286
COL06	125779
COL08	117656
COL09	133785
COL10	131866
COL11	114234
COL12	125335
COL13	13237
COL14	16026
COL15	70365
COL16	7625
COL19	33108
COL20	32223
COL21	31105
COL22	6223
COL23	15731
COL24	14718
COL25	15930
COL27	13643
COL28	13596

<b>COL30</b>	17160
<b>COL32</b>	17705
<b>COL33</b>	20392
<b>COL34</b>	23534
<b>COL35</b>	11050
<b>COL37</b>	12267
<b>COL38</b>	6940
<b>COL39</b>	21825
<b>COL40</b>	46633
<b>COL41</b>	15155

**Nota: Elaboración propia.**

Las muestras pertenecientes al grupo control (A02–A12) conservaron entre 78,000 y 125,000 lecturas, lo que indica una buena calidad de clasificación taxonómica y una menor presencia de secuencias no bacterianas. En contraste, algunas muestras del grupo con cáncer colorrectal presentaron una reducción significativa en el número de lecturas útiles tras el filtrado, lo que podría estar relacionado con mayor cantidad de ADN humano en las biopsias tumorales o alteraciones en la complejidad microbiana como resultado de la disbiosis (67).

**1.5.5. Abundancia relativa por muestra**

En el análisis de abundancia relativa a nivel de género de las muestras de microbiota intestinal asociada al cáncer de colon (COL01 a COL41), se observó una marcada variabilidad entre individuos. El género *Allorhizobium*-*Neorhizobium*-*Pararhizobium*-*Rhizobium* estuvo presente de forma frecuente, destacando en múltiples muestras con abundancias relativas superiores al 5%, especialmente en COL19, COL21, COL39 y COL41. Por otro lado, *Novosphingobium* fue también uno de los géneros más representativos y consistentes, superando el 3% de abundancia relativa en más de la mitad de las muestras. En algunas como COL10, COL11 y COL13, otros géneros como *Roseburia*, *Faecalibacterium* y *Lachnoclostridium* alcanzaron proporciones destacadas, superando el 6% y, en el caso de COL13, *Roseburia* llegó a representar más del 27% del total microbiano, lo cual sugiere un perfil distintivo en esa

muestra. Asimismo, géneros como *Reyranella*, *Afipia*, *Devosia*, *Brevundimonas*, *Phyllobacterium*, y *Bosea* mostraron presencias recurrentes en múltiples muestras, aunque con abundancias relativas más variables, en rangos del 1 al 4%. Cabe destacar que ciertas muestras, como las correspondientes al grupo COL30 en adelante, presentaron una mayor diversidad en géneros con baja abundancia relativa, posiblemente reflejando diferencias individuales, factores clínicos o ambientales (68).



**Tabla 8****Abundancia relativa de géneros bacterianos en muestra control intestinal (A07)**

<b>Taxón ( Género )</b>	<b>Conteo</b>	<b>Abundancia Relativa (%)</b>
<b>g_Asteroleplasma</b>	62234	49.751379
<b>g_Faecalibacterium</b>	8037	6.424974
<b>g_Agathobacter</b>	6519	5.211448
<b>g_Bacteroides</b>	4627	3.698937
<b>g_Staphylococcus</b>	4208	3.363978
<b>g_Streptococcus</b>	3425	2.738029
<b>g_Gemella</b>	2452	1.960189
<b>g_Rothia</b>	2064	1.650012
<b>g_Roseburia</b>	1822	1.456551
<b>g_[Eubacterium]_eligans_group</b>	978	0.781837

**Nota: Elaboración propia.**

En general, el patrón de abundancia relativa sugiere tanto la presencia de un núcleo microbiano compartido en varias muestras como una heterogeneidad significativa, que podría correlacionarse con el estado clínico, el tratamiento u otros factores personales de los pacientes.

La tabla 8 muestra los principales géneros bacterianos presentes en la muestra control A07, correspondiente a un individuo sin diagnóstico de cáncer colorrectal. Se presenta el número total de secuencias asignadas a cada género (Count) y su proporción relativa respecto al total de lecturas válidas en la muestra (% de abundancia relativa). Destaca una marcada dominancia del género g\_Asteroleplasma (49.75%), seguido por g\_Faecalibacterium (6.42%) y g\_Agathobacter (5.21%), géneros comúnmente asociados a una microbiota intestinal sana. Esta distribución servirá como referencia para la comparación con las muestras de pacientes con cáncer colorrectal (Tabla 05 y 06), con el objetivo de identificar posibles disbiosis microbianas asociadas a la enfermedad (69).

**Tabla 9****Perfil de abundancia relativa - Muestra COL05 (Cáncer de Colon)**

<b>Taxon</b>	<b>Conteo</b>	<b>Abundancia Relativa (%)</b>
<b>g__Bradyrhizobium</b>	9631	8.073873
<b>g__Undibacterium</b>	5726	4.800228
<b>g__Pelomonas</b>	4888	4.097715
<b>g__Acinetobacter</b>	4490	3.764063
<b>g__Heliimonas</b>	4418	3.703704
<b>g__Novosphingobium</b>	4407	3.694482
<b>g__Curvibacter</b>	4312	3.614842
<b>g__Brevundimonas</b>	3967	3.325621
<b>g__Sediminibacterium</b>	3421	2.867897
<b>g__Pseudomonas</b>	3383	2.836041

**Nota: Elaboración propia.**

La tabla 9 presenta los géneros bacterianos más abundantes en la muestra COL05, obtenida de un paciente diagnosticado con cáncer colorrectal. La abundancia relativa se expresa como porcentaje del total de lecturas asignadas taxonómicamente. Se observa que *Bradyrhizobium* es el género dominante, representando el 8.07% de la comunidad microbiana, seguido por *Undibacterium* (4.80%) y *Pelomonas* (4.10%). Estos tres géneros, aunque comúnmente asociados a ambientes acuáticos o suelos, se han detectado en contextos intestinales alterados, particularmente bajo condiciones de disbiosis o tras tratamientos antibióticos.

Además, se destacan otros géneros como *Acinetobacter* (3.76%) y *Heliimonas* (3.70%), ambos relacionados en la literatura con procesos de resistencia antimicrobiana o ambientes oxidados, condiciones que pueden coincidir con el microambiente tumoral. *Novosphingobium* también aparece con una proporción considerable (3.69%), y ha sido reportado en estudios de microbiota tumoral como

posible marcador ambiental o contaminante persistente. En conjunto, estos datos sugieren una comunidad bacteriana alterada, con predominancia de géneros inusuales en condiciones fisiológicas normales, lo que puede reflejar un desequilibrio ecológico intestinal propiciado por la presencia del tumor, inflamación crónica o terapias previas. Esta tabla proporciona información valiosa para el análisis comparativo entre condiciones patológicas y fisiológicas, y sirve como base para identificar potenciales biomarcadores microbianos asociados al cáncer colorrectal (70).

**Tabla 10**  
**Perfil de abundancia relativa - Muestra COL16**

<b>Taxón</b>	<b>Conteo</b>	<b>Abundancia Relativa (%)</b>
<b>g__Corynebacterium</b>	312	4.091803
<b>g__Reyranella</b>	272	3.567213
<b>g__Novosphingobium</b>	196	2.570492
<b>g__Paracoccus</b>	167	2.190164
<b>g__Afipia</b>	164	2.15082
<b>g__UCG-010</b>	137	1.796721
<b>g__Phyllobacterium</b>	128	1.678689
<b>g__UCG-005</b>	117	1.534426
<b>g__Sphingobium</b>	111	1.455738
<b>g__Mycobacterium</b>	106	1.390164

**Nota: Elaboración propia.**

La Tabla 10 muestra el perfil de abundancia relativa de los géneros bacterianos identificados en la muestra COL16, correspondiente a un paciente diagnosticado con cáncer de colon. A diferencia de un microbioma intestinal sano, este perfil presenta una composición microbiana heterogénea con predominancia de géneros que pueden asociarse con estados de disbiosis, inflamación o alteraciones en la

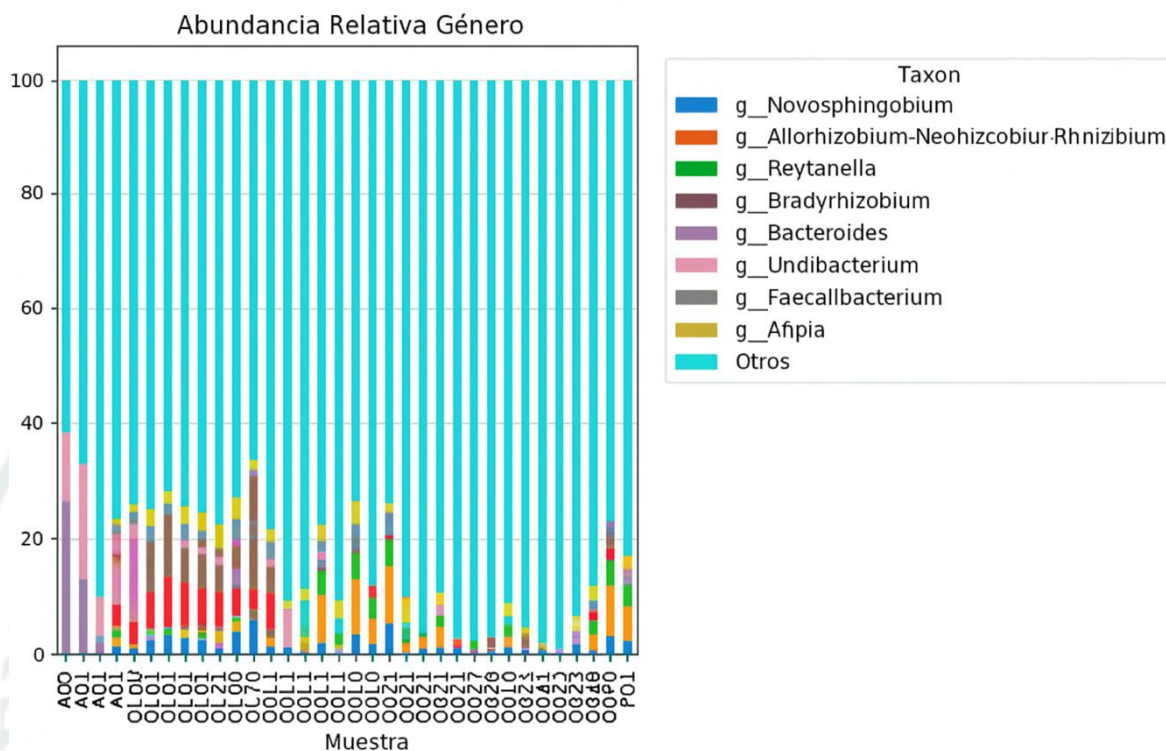
función de la barrera intestinal. El género más abundante en esta muestra es *Corynebacterium* (4.09%), un género cuya presencia intestinal puede deberse a translocación desde otros nichos corporales o a condiciones inmunocomprometidas. Le siguen *Reyranella* (3.57%) y *Novosphingobium* (2.57%), bacterias comúnmente halladas en ambientes acuáticos pero cuya presencia en intestino ha sido reportada en varios estudios sobre cáncer colorrectal, posiblemente como resultado de cambios en el microambiente tumoral.

Otros géneros relevantes como *Paracoccus* (2.19%), *Afipia* (2.15%) y miembros del grupo UCG-010 y UCG-005 (1.79% y 1.53% respectivamente) también aparecen en proporciones notables. Estos géneros no suelen ser dominantes en una microbiota sana y su aparición puede indicar alteraciones estructurales de la comunidad microbiana asociadas a procesos neoplásicos, inflamación crónica o impacto de tratamientos médicos como antibióticos o quimioterapia.

Este perfil destaca una diversidad moderada con presencia de bacterias no convencionales, lo que apoya la hipótesis de que la microbiota intestinal en pacientes con cáncer de colon está significativamente modificada en comparación con individuos sanos. La caracterización precisa de estos géneros puede aportar información valiosa para la identificación de biomarcadores microbianos y el desarrollo de estrategias de diagnóstico o terapia basadas en el microbioma (71).

**Figura 7**

**Distribución de la abundancia relativa de géneros bacterianos en muestras de pacientes y controles**



**Nota: Elaboración propia.**

La Figura 07 representa un gráfico de barras apiladas que muestra la abundancia relativa (%) de los géneros bacterianos más representativos en cada muestra individual. Cada barra corresponde a una muestra, y los distintos colores representan géneros específicos dentro del microbioma intestinal. Los géneros destacados incluyen *Novosphingobium*, *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*, *Reyranella*, *Bradyrhizobium*, *Bacteroides*, *Undibacterium*, *Faecalibacterium*, *Brevundimonas* y *Afipia*. El resto de los géneros con baja representación se agrupan bajo la categoría "Others". Se observa que en las muestras control (por ejemplo, A07), el microbioma está dominado por géneros como *Faecalibacterium* y *Bacteroides*, considerados típicos de una microbiota intestinal saludable. En contraste, las muestras correspondientes a pacientes con cáncer colorrectal (muestras etiquetadas como COL) presentan un perfil distinto, caracterizado por un aumento en la proporción relativa de géneros ambientales o menos frecuentes en microbiotas humanas, como *Novosphingobium*, *Reyranella* y

Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium, indicando una posible disbiosis.

Este patrón diferencial apoya la hipótesis de que la composición microbiana intestinal se ve significativamente alterada en individuos con cáncer de colon. La figura permite comparar visualmente estas diferencias y resalta la necesidad de estudios funcionales que evalúen el papel de estos géneros no convencionales en la progresión de la enfermedad o como potenciales biomarcadores diagnósticos.

#### **1.5.6. Abundancia relativa por grupo**

El análisis comparativo de la abundancia relativa promedio entre los grupos de estudio (pacientes con cáncer colorrectal y controles sanos) evidenció diferencias notables en la composición microbiana intestinal. En el grupo control, predominan géneros benéficos típicos del microbioma intestinal saludable, como *Faecalibacterium*, *Bacteroides* y *Asteroleplasma*, los cuales presentaron porcentajes elevados de abundancia relativa. Por el contrario, en los pacientes con cáncer se observa una marcada disminución de estos géneros simbióticos, acompañada de un incremento de géneros atípicos como *Bradyrhizobium*, *Undibacterium* y *Novosphingobium*, generalmente asociados a ambientes no intestinales. Esta redistribución de la microbiota sugiere un patrón de disbiosis intestinal que podría estar relacionado con el desarrollo o progresión del cáncer colorrectal. Además, el aumento del grupo taxonómico clasificado como "Otros" en los pacientes con cáncer indica una expansión de géneros menos representados, lo que refuerza la hipótesis de una alteración estructural profunda del ecosistema microbiano en estos individuos.

Esta tabla 11 presenta la abundancia relativa promedio de los principales géneros bacterianos diferenciados por grupo de estudio: pacientes con cáncer colorrectal (Colon\_Cancer) y controles sanos (Control). Los datos permiten evidenciar marcadas diferencias en la composición microbiana intestinal entre ambos grupos, lo cual puede estar relacionado con estados de salud y enfermedad. En los controles sanos, se observa una alta abundancia relativa de géneros típicamente asociados a un microbioma intestinal equilibrado y saludable. Por ejemplo, *Faecalibacterium* (11.93%), *Bacteroides* (11.67%) y *Asteroleplasma* (15.77%) dominan el perfil bacteriano, consistentes con su papel en la fermentación de fibras dietéticas,

producción de butirato (un ácido graso de cadena corta con propiedades antiinflamatorias), y mantenimiento de la integridad de la mucosa intestinal (72).

**Tabla 11**

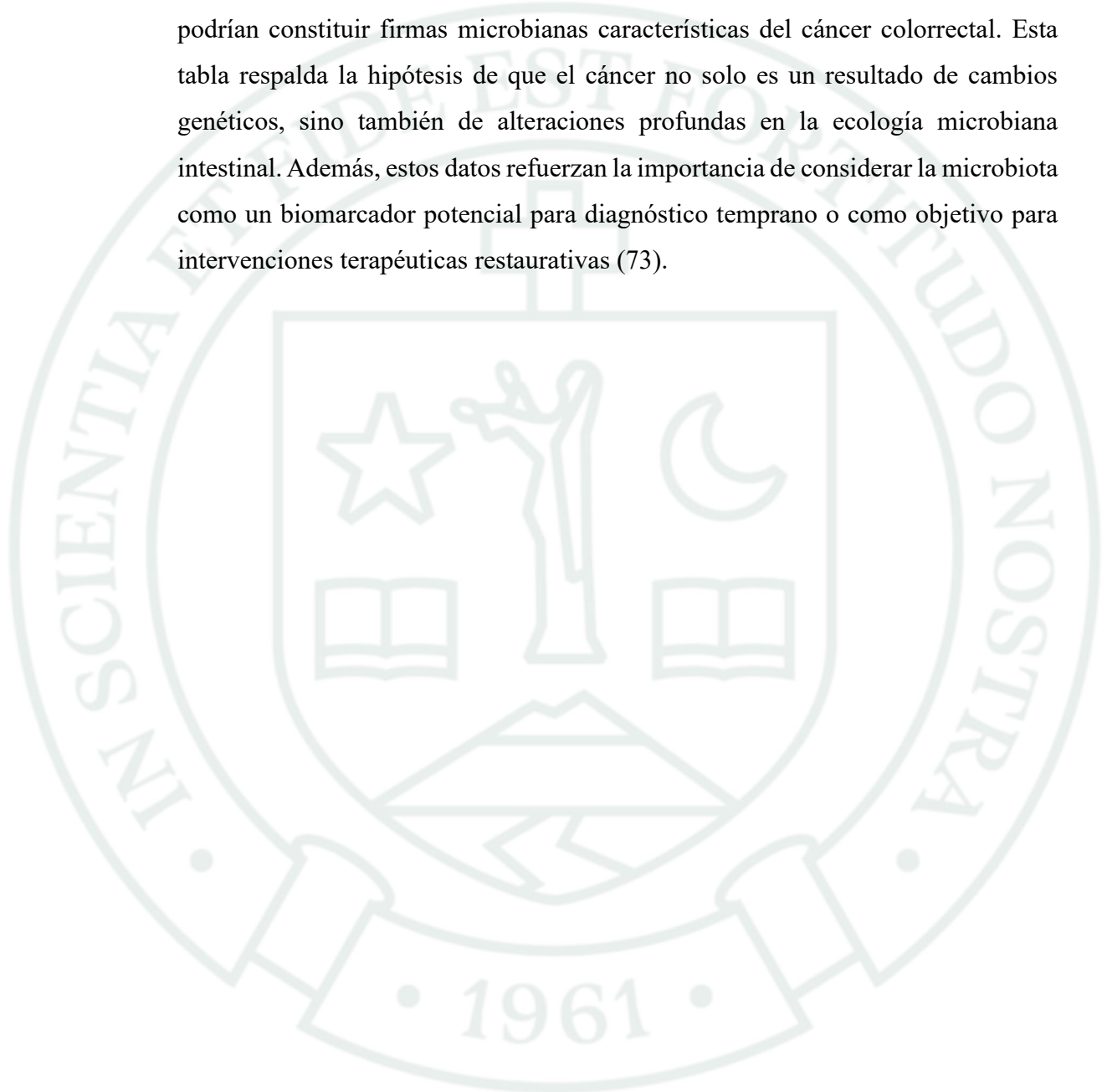
**Comparación de la abundancia relativa promedio de géneros bacterianos entre pacientes con Cáncer colorrectal y controles sanos**

<b>Taxón</b>	<b>Cáncer de Colon</b>	<b>Control</b>
Others	21.485822	4.048472
g__Asteroleplasma	0.022062	<b>15.773482</b>
g__Bacteroides	1.271194	<b>11.670780</b>
g__Faecalibacterium	0.520325	<b>11.931792</b>
g__Agathobacter	0.362639	5.973879
g__Bradyrhizobium	<b>4.467381</b>	0.502765
g__Prevotella	1.602782	3.301927
g__Undibacterium	<b>4.582654</b>	0.279764
g__Novosphingobium	<b>3.951193</b>	0.160662
g__Alistipes	0.091004	2.961598

En contraste, en los pacientes con cáncer colorrectal se evidencia una disminución drástica de estos géneros beneficiosos: Faecalibacterium desciende a 0.52%, Bacteroides a 1.27%, y Asteroleplasma casi desaparece (0.02%). Este empobrecimiento de bacterias comensales puede ser indicativo de una disbiosis intestinal que contribuye a un entorno proinflamatorio y promotor del cáncer. Además, el grupo con cáncer presenta un aumento significativo en géneros poco frecuentes en intestinos sanos, como Undibacterium (4.58%), Novosphingobium (3.95%) y Bradyrhizobium (4.46%). Estos géneros son mayoritariamente ambientales o de nichos acuáticos/edáficos, lo cual podría reflejar una colonización oportunista derivada de alteraciones en la barrera intestinal o del sistema inmune en pacientes con cáncer. La presencia elevada del grupo "Others" en pacientes con cáncer (21.48% vs 4.04% en controles) también sugiere una mayor diversidad no controlada o crecimiento de géneros inusuales.

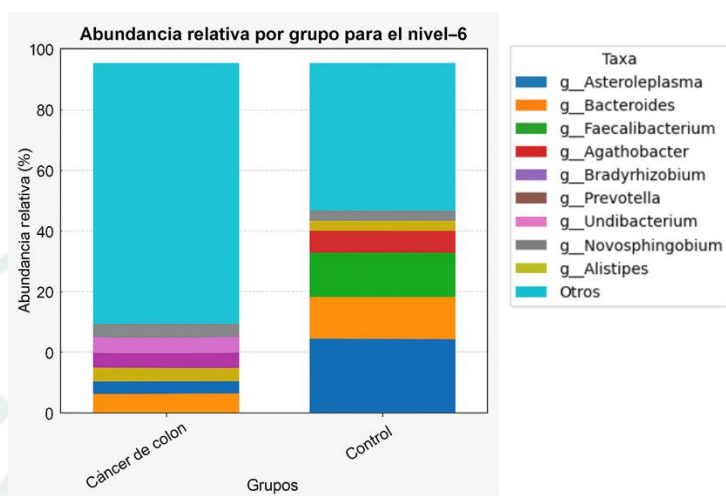
Este patrón podría ser resultado de múltiples factores: tratamientos farmacológicos, dieta, inflamación crónica, o el mismo proceso tumoral. La expansión de géneros no convencionales puede tener efectos negativos sobre el metabolismo del huésped, la inflamación y el microambiente tumoral.

La reducción de bacterias simbióticas clave y el incremento de géneros atípicos podrían constituir firmas microbianas características del cáncer colorrectal. Esta tabla respalda la hipótesis de que el cáncer no solo es un resultado de cambios genéticos, sino también de alteraciones profundas en la ecología microbiana intestinal. Además, estos datos refuerzan la importancia de considerar la microbiota como un biomarcador potencial para diagnóstico temprano o como objetivo para intervenciones terapéuticas restaurativas (73).



**Figura 8**

**Distribución de la abundancia relativa de géneros bacterianos por grupo de estudio.**



Esta figura muestra de forma gráfica la composición microbiana promedio a nivel de género entre los grupos Control y Colon\_Cancer. Se puede observar un claro contraste en la diversidad microbiana entre ambos grupos. En el grupo control, destacan géneros como Faecalibacterium, Bacteroides, Asteroleplasma y Agathobacter, reflejando una microbiota intestinal característica de un estado eubiótico. En contraste, el grupo Colon\_Cancer presenta una reducción visible de estos géneros y una expansión significativa del grupo “Otros”, lo que sugiere un incremento de géneros menos comunes o no identificados claramente. Esta representación gráfica permite visualizar la pérdida de diversidad microbiana característica de la disbiosis asociada al cáncer colorrectal, además de resaltar el predominio de géneros poco frecuentes en condiciones saludables. La figura complementa los hallazgos observados en la Tabla 07, proporcionando una apreciación visual de los desequilibrios en la estructura microbiana intestinal entre ambos grupos.

### 1.5.7. Dendrograma UPGMA

El dendrograma UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) es una herramienta de agrupamiento jerárquico ampliamente utilizada para visualizar las relaciones de similitud o distancia entre las muestras microbianas, especialmente en estudios de microbioma que emplean datos de secuenciación 16S rRNA. Este método permite generar un árbol jerárquico que representa cómo las diferentes muestras se agrupan con base en la similitud de sus perfiles de composición microbiana.

Para este análisis, se utilizó la distancia UniFrac ponderada, una métrica que considera tanto la presencia/ausencia de taxones como sus abundancias relativas. Esta métrica es particularmente informativa porque incorpora información filogenética, evaluando no solo qué especies están presentes o ausentes entre muestras, sino también qué tan evolutivamente relacionadas están y cómo se distribuyen en términos de abundancia.

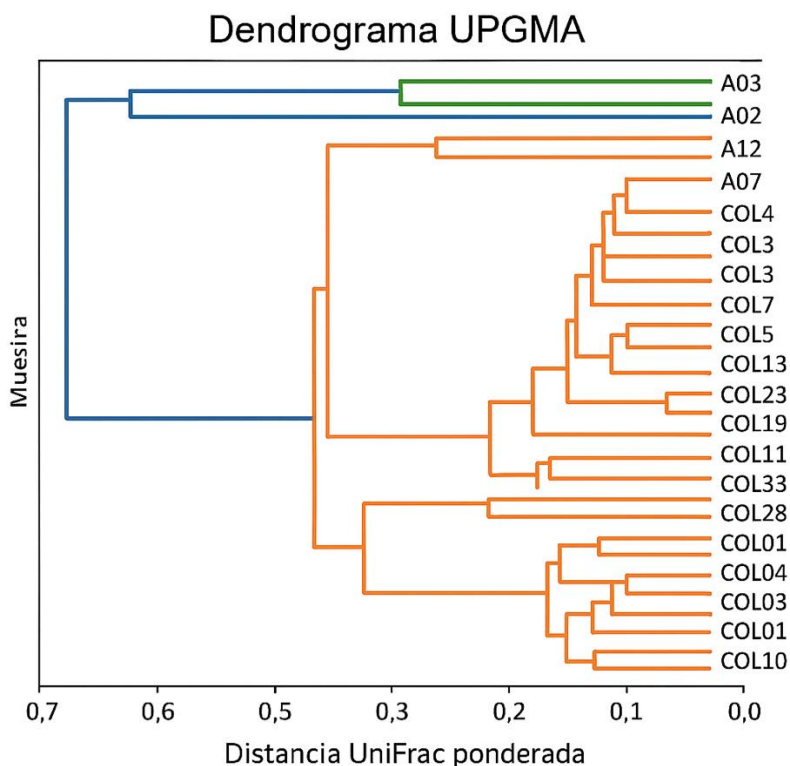
La implementación del análisis UPGMA con la distancia UniFrac ponderada permite identificar agrupamientos naturales entre las muestras que pueden estar influenciados por el estado clínico (colon sano vs. cáncer colorrectal), así como por características específicas del microbioma. Los archivos generados durante este proceso incluyen la matriz de distancias (exported\_distance\_matrix/weighted\_unifrac) y la figura del dendrograma resultante (UPGMA/weighted\_unifrac.png), los cuales son fundamentales para la interpretación visual y cuantitativa de la similitud microbiana entre las muestras.

Este enfoque jerárquico contribuye de manera significativa a la comprensión de la estructura microbiana y permite generar hipótesis sobre posibles relaciones entre el microbioma y condiciones clínicas específicas, como el cáncer colorrectal (74).

La Figura 09 representa un dendrograma generado mediante el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), basado en la distancia UniFrac ponderada. Este análisis agrupa las muestras de microbioma intestinal evaluadas en función de la similitud de sus perfiles taxonómicos a nivel filogenético y considerando la abundancia relativa de los taxones presentes en cada muestra.

**Figura 9**

**Análisis de agrupamiento jerárquico mediante dendrograma UPGMA utilizando distancias UniFrac ponderadas**



**Nota: Elaboración propia.**

El dendrograma revela una clara separación entre las muestras de individuos sanos (A02, A03, A07, A12), agrupadas en una rama bien diferenciada, y las muestras de pacientes con cáncer colorrectal (todas las etiquetadas como COLxx), que conforman una distribución más diversa y ramificada. Esta distribución evidencia una disimilitud significativa en la composición microbiana entre los grupos clínicos, siendo las muestras de cáncer colorrectal más heterogéneas entre sí. Este patrón es consistente con estudios previos que demuestran una disbiosis asociada al cáncer, caracterizada por una mayor variabilidad interindividual del microbioma.

El uso de la distancia UniFrac ponderada añade valor al análisis, ya que no solo incorpora la presencia/ausencia de géneros bacterianos, sino también su abundancia relativa y sus relaciones evolutivas. Este enfoque proporciona una representación más robusta y realista de las diferencias en la estructura de las comunidades microbianas.

El agrupamiento observado también sugiere que ciertas muestras de cáncer colorrectal comparten perfiles microbianos más similares entre ellas, posiblemente influenciados por factores comunes como la localización tumoral, el estadio clínico o características del huésped. En conjunto, este dendrograma constituye una herramienta visual poderosa para identificar patrones de agrupamiento y explorar hipótesis sobre la asociación entre el microbioma intestinal y la presencia de neoplasias.

#### **1.5.8. Curvas de rarefacción**

Desde el punto de vista analítico, estas curvas permiten visualizar cómo aumenta la riqueza o diversidad conforme se incrementa el número de lecturas, y son clave para interpretar si los resultados posteriores de diversidad alfa y beta son confiables. Una curva que se estabiliza indica que se ha alcanzado un punto de saturación, en el cual ya no se detectan nuevas especies a pesar de añadir más lecturas, lo cual sugiere una cobertura adecuada de la muestra. En cambio, una curva que sigue ascendiendo señala una posible subestimación de la diversidad, ya que aún podrían existir especies no detectadas por insuficiente profundidad de secuenciación (75).

La figura 10 presenta las curvas de rarefacción generadas para cada muestra del estudio, utilizando el índice de Shannon como métrica de diversidad alfa. Este índice no solo cuantifica el número de especies (riqueza), sino también cómo se distribuyen equitativamente en la comunidad (equidad), proporcionando una visión más robusta del ecosistema microbiano que un simple conteo de especies.

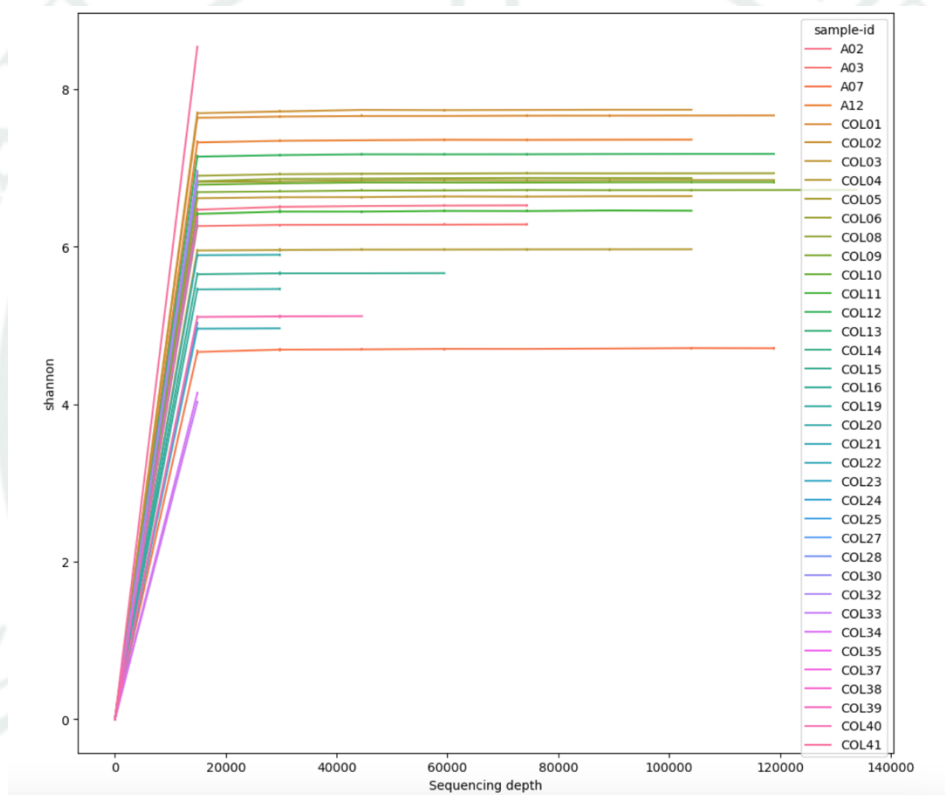
Las curvas permiten visualizar cómo se comporta la diversidad observada en función del número acumulado de secuencias (lecturas) obtenidas mediante secuenciación masiva. A medida que se incrementa la profundidad de secuenciación, se observa un aumento en la diversidad hasta alcanzar una meseta, lo que indica que se ha captado la mayoría de los géneros microbianos presentes en la muestra. Esta meseta es un indicativo de saturación, es decir, que aumentar el número de lecturas ya no aporta significativamente a la detección de nuevas especies o características.

En el presente análisis, se puede observar que la mayoría de las muestras presentan una estabilización clara en su curva de rarefacción, lo que sugiere que la cobertura

de secuenciación fue adecuada para capturar la diversidad microbiana real del intestino en estas condiciones experimentales. Sin embargo, algunas curvas — especialmente las correspondientes a muestras con menor número de secuencias o alta variabilidad técnica— no logran alcanzar dicha meseta, lo cual podría indicar una subestimación de la diversidad real o un sesgo por baja calidad en el proceso de secuenciación.

**Figura 10**

**Curvas de rarefacción basadas en el índice de diversidad de Shannon para todas las muestras analizadas.**



**Nota: Elaboración propia.**

Este comportamiento puede deberse a múltiples factores, como diferencias en la eficiencia de extracción de ADN, en el número de bacterias viables por muestra, o incluso efectos biológicos propios del estado patológico de ciertos individuos (como es el caso de pacientes con cáncer colorrectal). Además, en algunos casos, una curva que se mantiene en ascenso podría implicar la existencia de una comunidad microbiana especialmente rica o compleja, que requiere mayor profundidad de lectura para ser completamente caracterizada.

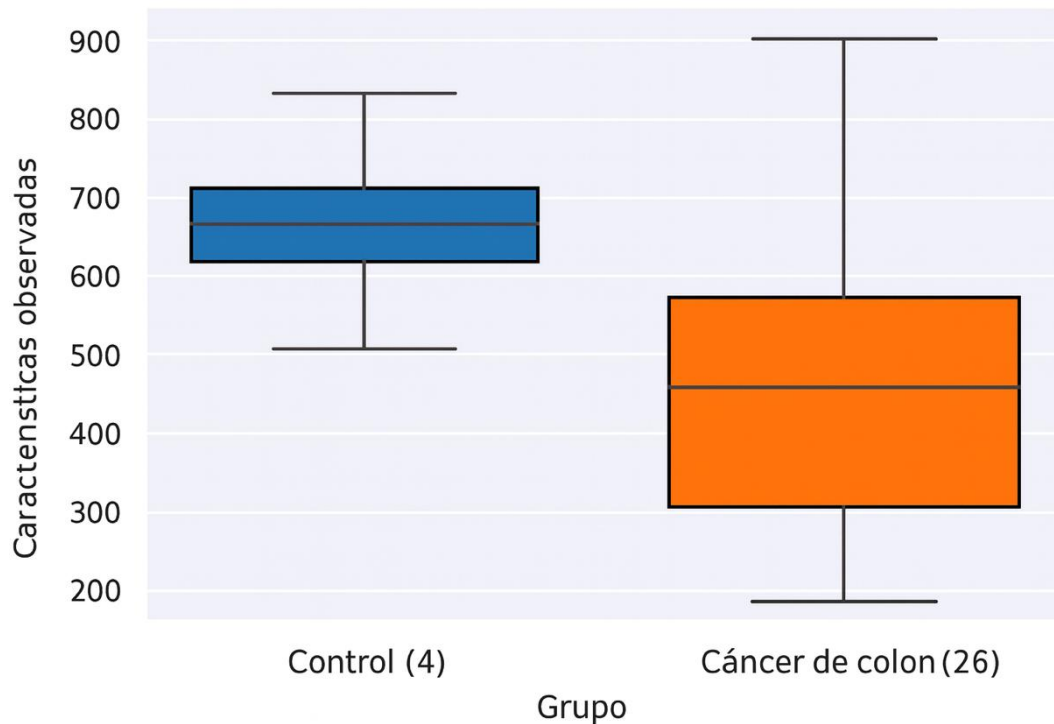
En términos metodológicos, las curvas de rarefacción constituyen una herramienta fundamental para validar la comparabilidad entre muestras, ya que aseguran que las diferencias observadas en los análisis de diversidad no se deben a una cobertura desigual. En consecuencia, este análisis justifica la posterior aplicación de métricas de diversidad alfa y beta bajo un marco estadístico confiable, apoyando la solidez de los hallazgos sobre cambios en la composición y diversidad del microbioma intestinal en el contexto del cáncer colorrectal frente a los controles sanos (76).

### **1.5.9. Análisis de diversidad alfa**

El análisis de la diversidad microbiana constituye un componente esencial para caracterizar y comparar las comunidades bacterianas presentes en distintas condiciones biológicas o clínicas. En este estudio, se aplicaron métricas de diversidad alfa y beta con el fin de evaluar la riqueza y equitatividad de los taxones dentro de cada muestra, así como las diferencias en la composición microbiana entre grupos de estudio: pacientes con cáncer colorrectal y controles sanos. La Figura 11 presenta un análisis de diversidad alfa mediante la métrica de "Características Observadas" (Observed Features), la cual representa la riqueza microbiana en cada muestra, es decir, el número total de unidades taxonómicas detectadas (ASVs). El gráfico está estructurado como un boxplot comparativo entre los grupos Control (n=4) y Colon\_Cancer (n=26). Cada caja ilustra la mediana, el rango intercuartílico (IQR), y los valores extremos para cada grupo. En el grupo Control, se observa una mediana de riqueza superior, con valores agrupados y una dispersión relativamente estrecha. En contraste, el grupo Colon\_Cancer muestra una mediana más baja y una mayor dispersión de los datos, indicando una heterogeneidad considerable entre las muestras.

**Figura 11**

**Diversidad alfa basada en características observadas entre los grupos**



**Nota: Elaboración propia.**

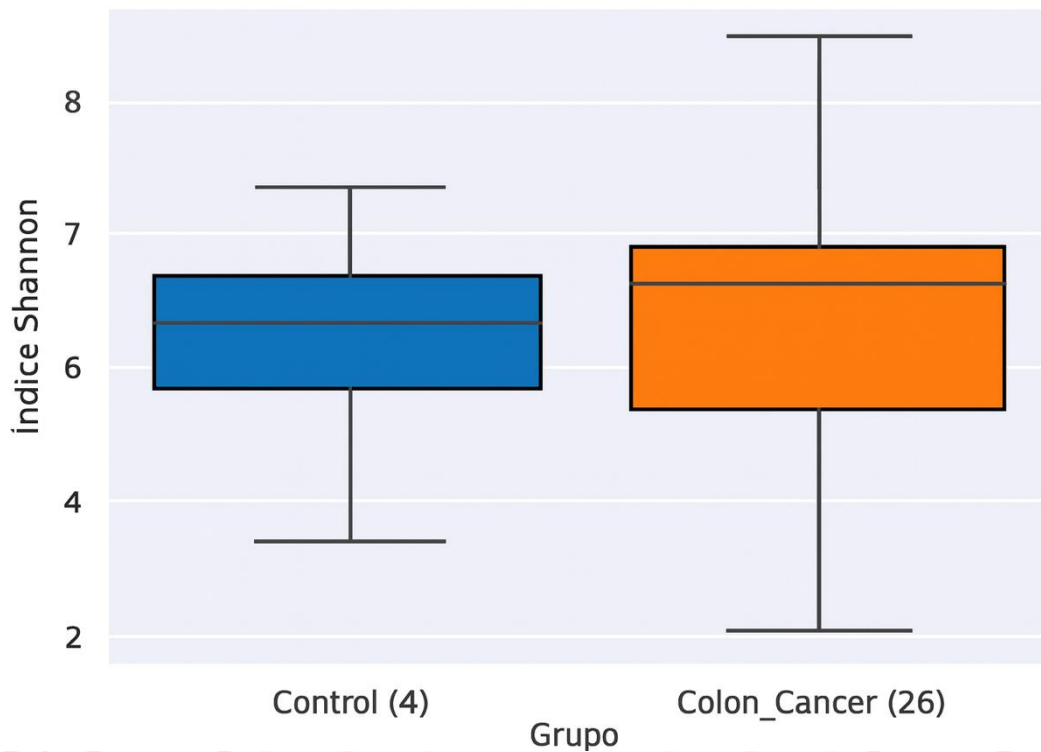
La riqueza microbiana intestinal, evaluada como el número de características observadas, parece estar reducida en los pacientes con cáncer colorrectal en comparación con los individuos sanos. Esta reducción sugiere que el desarrollo o la progresión del cáncer puede estar asociado con una pérdida de biodiversidad microbiana, un fenómeno comúnmente vinculado a procesos de disbiosis intestinal.

Esta pérdida de riqueza puede tener múltiples implicancias funcionales. Por un lado, una comunidad microbiana menos diversa podría significar menor resiliencia ecológica, es decir, menor capacidad del ecosistema intestinal para resistir perturbaciones (como inflamación, quimioterapia, o cambios dietéticos). Por otro lado, se ha propuesto que ciertos taxones beneficiosos disminuyen en escenarios de cáncer, lo cual favorece la proliferación de microorganismos patobiontes o con potencial proinflamatorio, que podrían contribuir al microambiente tumoral. Además, la alta variabilidad observada en el grupo Colon\_Cancer podría reflejar diferencias clínicas entre los pacientes, como estadios del cáncer, tratamientos recibidos, estado inmunológico o factores ambientales (dieta, antibióticos, etc.).

Este comportamiento refuerza la necesidad de integrar análisis multivariantes o correlacionales para entender mejor cómo estas diferencias impactan la estructura del microbioma (77).

**Figura 12**

**Diversidad alfa basada en el Índice de Shannon entre los grupos**



**Nota: Elaboración propia.**

La Figura 12 representa la diversidad alfa utilizando el índice de Shannon, una métrica que considera tanto la riqueza (número de especies o ASVs) como la uniformidad (equidad) en la distribución de los taxones en una comunidad microbiana. Se utiliza un gráfico tipo boxplot para comparar la diversidad del grupo Control (n=4) frente al grupo Colon\_Cancer (n=26).

Visualmente, ambos grupos muestran medianas relativamente similares; sin embargo, el grupo Colon\_Cancer presenta una mayor dispersión en los valores del índice de Shannon, evidenciada por un rango intercuartílico más amplio y la presencia de valores extremos (outliers). En contraste, las muestras del grupo Control muestran valores más agrupados, lo que sugiere mayor homogeneidad en la diversidad de su microbiota.

El índice de Shannon es una medida de diversidad ecológica efectiva que incorpora no solo cuántas especies están presentes, sino también cómo se distribuyen. En este contexto, la diversidad de los pacientes con cáncer colorrectal presenta una mayor variabilidad, lo cual puede interpretarse como una señal de disbiosis heterogénea en este grupo. Aunque las medianas son similares entre grupos, la amplitud del rango en Colon\_Cancer indica desequilibrios microbianos individualizados, lo cual concuerda con la naturaleza multifactorial y heterogénea de esta enfermedad. Esta diversidad puede estar influenciada por múltiples factores como tipo de dieta, exposición a antibióticos, comorbilidades, estadio del tumor, o tratamientos oncológicos (78).

Algunos estudios han reportado tanto aumentos como reducciones del índice de Shannon en pacientes con cáncer, dependiendo del diseño del estudio y la población evaluada. En este caso, la ausencia de una diferencia clara en la mediana, pero sí en la variabilidad, sugiere que la disbiosis no sigue un patrón único en todos los pacientes oncológicos, sino que se manifiesta con perfiles distintos de pérdida o ganancia de ciertos taxones clave. En conjunto, el índice de Shannon complementa la métrica de características observadas (Figura 11) mostrando que, aunque algunos pacientes con cáncer pueden mantener cierta diversidad general, esta no necesariamente se traduce en un ecosistema equilibrado, sino en comunidades potencialmente disfuncionales o desequilibradas desde el punto de vista ecológico y funcional.

**Tabla 12**

**Índices de diversidad alfa por muestra: características observadas, entropía de Shannon, equidad de Pielou y diversidad filogenética (Faith's PD)**

<b>ID</b>	<b>Características observadas</b>	<b>Entropía Shannon</b>	<b>Pielou Evenness</b>	<b>Faith PD</b>
A02	829	6.471439	0.667487	59.243698
A03	475	6.251259	0.703038	35.268107
A07	658	4.700256	0.50206	57.04459
A12	641	7.349335	0.787623	48.201478
COL01	638	7.59821	0.815485	46.273274
COL02	699	7.717822	0.816774	50.970112
COL03	558	6.634385	0.727126	45.48329
COL04	335	5.982798	0.713255	28.499691
COL05	489	6.840631	0.765712	39.291624
COL06	546	6.892726	0.758046	46.333002
COL08	491	6.855825	0.766907	43.037717
COL09	457	6.64713	0.752274	42.619553
COL10	391	6.800853	0.789784	34.988459
COL11	514	6.426771	0.71364	44.448907
COL12	600	7.148298	0.774563	47.518591
COL14	571	6.921637	0.756348	39.419005
COL15	346	5.647842	0.669602	30.679508
COL19	260	5.457177	0.680245	26.666845
COL20	251	5.898703	0.73997	21.909145
COL21	166	4.931736	0.668706	18.030067
COL23	243	6.320439	0.797551	19.324579
COL24	461	6.951665	0.785621	30.577297
COL25	321	5.019117	0.602793	27.829995
COL30	384	6.831625	0.795766	32.212637
COL32	544	6.94986	0.764775	38.817636
COL33	115	4.00913	0.58566	12.587501
COL34	132	4.134992	0.58699	16.027655
COL39	284	6.36271	0.780725	27.322363
COL40	212	5.106469	0.660782	23.09759
COL41	910	8.535973	0.868384	49.305936

**Nota: Elaboración propia.**

Los valores de diversidad alfa presentados en la Tabla 11 muestran una notable variabilidad entre las muestras, tanto en términos de riqueza (observed features) como de equidad (Pielou's evenness), diversidad (Shannon entropy) y diversidad filogenética (Faith's PD). Esta diversidad refleja la complejidad de los ecosistemas microbianos intestinales evaluados y puede estar influenciada por el estado

fisiopatológico del hospedero, especialmente por la presencia o ausencia de cáncer de colon.

Entre las muestras con mayor diversidad observada (más ASVs o características), destaca la muestra COL41, correspondiente al grupo cáncer de colon, con 910 características y un índice de Shannon de 8.53, el más alto del conjunto, así como una equidad elevada (0.86) y un Faith PD de 49.30. Este perfil sugiere una microbiota altamente diversa y equilibrada, con componentes filogenéticamente distintos. Por el contrario, las muestras con menor diversidad como COL33 y COL34 presentan una riqueza muy baja (115 y 132 características, respectivamente), con índices de Shannon menores a 4.2 y valores reducidos en equidad y diversidad filogenética, lo que sugiere comunidades microbianas más empobrecidas o dominadas por pocos taxones. En términos generales, las muestras control (A02, A03, A07, A12) tienden a agruparse dentro del rango medio-alto en todos los índices. Por ejemplo, A02 y A12 muestran índices elevados de Faith PD (59.2 y 48.2) y equidad de comunidad, indicando una microbiota rica y estructuralmente diversa en ausencia de enfermedad (79).

Por otro lado, dentro del grupo de pacientes con cáncer de colon, se observan casos extremos tanto de alta como de baja diversidad, lo cual refleja la heterogeneidad intraindividual que podría estar asociada a factores como el grado de avance del tumor, tratamientos previos, dieta, antibióticos, o condiciones metabólicas coexistentes. Este patrón también podría sugerir un estado de disbiosis no uniforme, en el que algunas microbiotas se tornan dominadas por taxones oportunistas, mientras que otras conservan cierta diversidad funcional.

Estas diferencias individuales justifican la necesidad de aplicar pruebas de significancia para identificar patrones estadísticamente consistentes entre grupos, lo que se abordará en la siguiente sección. Asimismo, resalta la importancia de considerar la diversidad alfa no solo como un indicador global de salud intestinal, sino también como una ventana hacia los mecanismos microbianos que podrían modular o reflejar la progresión del cáncer de colon.

La Tabla 13 presenta los resultados del análisis estadístico no paramétrico mediante la prueba de Kruskal-Wallis, con el objetivo de comparar los índices de diversidad alfa entre dos grupos: individuos con cáncer de colon y controles sanos. Esta prueba

evalúa si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de los valores observados en cada grupo para cuatro métricas clave. Los valores de p y q indican el nivel de significancia de las diferencias observadas entre grupos para cada métrica.

**Tabla 13**  
**Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para los índices de diversidad alfa entre grupos**

Índice evaluado	Grupo 1 (Colon_Cancer, n=26)	Grupo 2 (Control, n=4)	Estadístico H	Valor p	Valor q
Características observadas	Colon_Cancer	Control	4.823821	<b>0.028069</b>	0.028069
Diversidad filogenética de Faith	Colon_Cancer	Control	5.37469	<b>0.020431</b>	0.020431
Índice de Shannon	Colon_Cancer	Control	0.133995	0.714325	0.714325
Uniformidad de Pielou	Colon_Cancer	Control	1.641439	0.200128	0.200128

**Nota: Elaboración propia.**

Los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis revelan diferencias estadísticamente significativas en dos de los cuatro índices analizados, las características observadas ( $p = 0.028$ ), la diferencia significativa indica que existe una variabilidad notable en la riqueza de especies entre los grupos, con un número de características observadas menor en el grupo Control en comparación con el grupo Colon\_Cancer. Esto sugiere que los pacientes con cáncer de colon pueden albergar una microbiota más rica en términos de taxones presentes, aunque esto no implica necesariamente una comunidad más saludable, mientras que la diversidad filogenética de Faith ( $p = 0.020$ ), también se observa una diferencia significativa en la diversidad filogenética. Este hallazgo sugiere que no solo hay más taxones en el grupo de

pacientes, sino que estos pertenecen a linajes más diversos, lo que podría indicar una reestructuración profunda del ecosistema intestinal en el contexto del cáncer.

Mientras que por el contrario, en el índice de Shannon ( $p = 0.71$ ), no se identifican diferencias significativas en la diversidad combinada de riqueza y equidad. Esto puede deberse a que, si bien hay más taxones en el grupo de pacientes, su distribución relativa puede ser más desigual, con predominio de algunos géneros sobre otros, si observamos, el criterio de uniformidad de Pielou ( $p = 0.20$ ): Tampoco se observa una diferencia significativa en la equidad de la distribución taxonómica, lo cual refuerza la idea de que la comunidad microbiana en pacientes con cáncer puede estar dominada por ciertos grupos bacterianos, generando una menor uniformidad pese a una mayor riqueza (80).

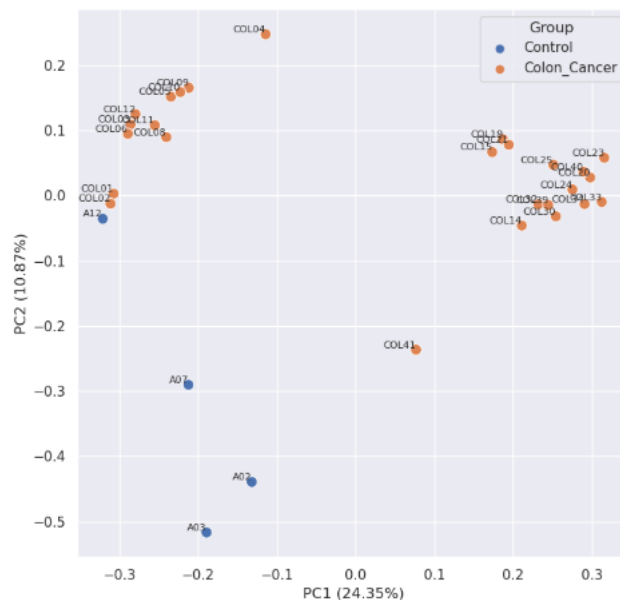
#### **1.5.10. Análisis de diversidad beta**

La figura 13 muestra el gráfico resultante del análisis de coordenadas principales (PCoA) aplicado a las muestras de microbiota intestinal, utilizando la métrica de distancia UniFrac ponderada. En este gráfico bidimensional, cada punto representa una muestra individual, agrupada según su clasificación como "Control" (en azul) o "Colon\_Cancer" (en naranja). Los ejes PC1 (24.35%) y PC2 (10.87%) explican conjuntamente el 35.22% de la variabilidad total observada en la estructura microbiana de las muestras (11).

En el plano cartesiano, se puede observar una clara separación entre los grupos de control y los de cáncer colorrectal. Las muestras del grupo control se agrupan principalmente en la parte inferior izquierda del gráfico, mientras que las muestras del grupo con cáncer tienden a ubicarse en la parte central y derecha del gráfico, mostrando patrones de distribución distintos.

**Figura 13**

**Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) basado en la distancia UniFrac ponderada para las muestras de microbiota intestinal.**



**Nota: Elaboración propia.**

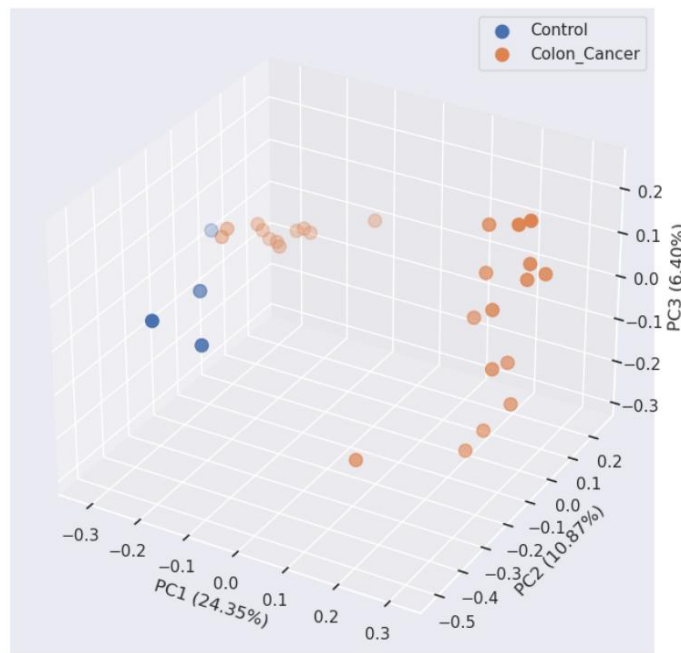
El análisis PCoA evidencia una clara disimilitud en la composición microbiana entre los grupos estudiados, lo cual sugiere que el estado de salud del huésped (control vs cáncer colorrectal) tiene un impacto significativo sobre la estructura global del microbioma intestinal (81). La separación entre ambos grupos indica que las comunidades bacterianas son cualitativa y cuantitativamente diferentes, en línea con múltiples estudios que han reportado alteraciones en la diversidad y abundancia relativa de ciertos géneros microbianos asociados a procesos inflamatorios y tumorales en el colon. El uso de la distancia UniFrac ponderada que considera tanto la presencia/ausencia de taxones como su relación filogenética—refuerza la evidencia de que los cambios observados no solo se deben a una simple pérdida o ganancia de especies, sino a una reorganización estructural más profunda en la red filogenética microbiana (82).

Este resultado es consistente con los análisis previos de diversidad alfa y abundancia relativa, donde se observó un descenso significativo de géneros beneficiosos como *Faecalibacterium* y *Bacteroides*, y un incremento en taxones menos frecuentes o potencialmente oportunistas. Por lo tanto, la separación

observada en la PCoA proporciona evidencia visual robusta de una disbiosis intestinal asociada al cáncer colorrectal y respalda su consideración como un marcador potencial en estudios diagnósticos o pronósticos.

**Figura 14**

**Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) en tres dimensiones basado en la distancia UniFrac ponderada.**



**Nota: Elaboración propia.**

La figura 14 presenta una visualización tridimensional del análisis de coordenadas principales (PCoA) aplicado a los datos del microbioma intestinal, utilizando como métrica la distancia UniFrac ponderada. En el gráfico se muestran las tres primeras componentes principales: PC1 (24.35% de la varianza explicada), PC2 (10.87%) y PC3 (6.40%), que juntas representan un 41.62% de la variabilidad total observada en la estructura de las comunidades microbianas. Cada punto en el espacio tridimensional representa una muestra individual, codificada por grupo: en azul, las muestras del grupo Control (n=4), y en naranja, las del grupo Colon\_Cancer (n=26). El análisis tridimensional de PCoA permite una mejor resolución de la disimilitud entre las muestras, destacando agrupamientos que no son tan evidentes en el gráfico bidimensional. En esta figura, se observa una clara diferenciación entre las muestras del grupo

Control y las del grupo Colon\_Cancer, lo que sugiere la existencia de patrones microbianos característicos asociados a cada condición. Las muestras de control se agrupan estrechamente, indicando una mayor homogeneidad en su perfil microbiano, mientras que las del grupo con cáncer presentan una distribución más amplia, reflejando una mayor variabilidad entre individuos (83).

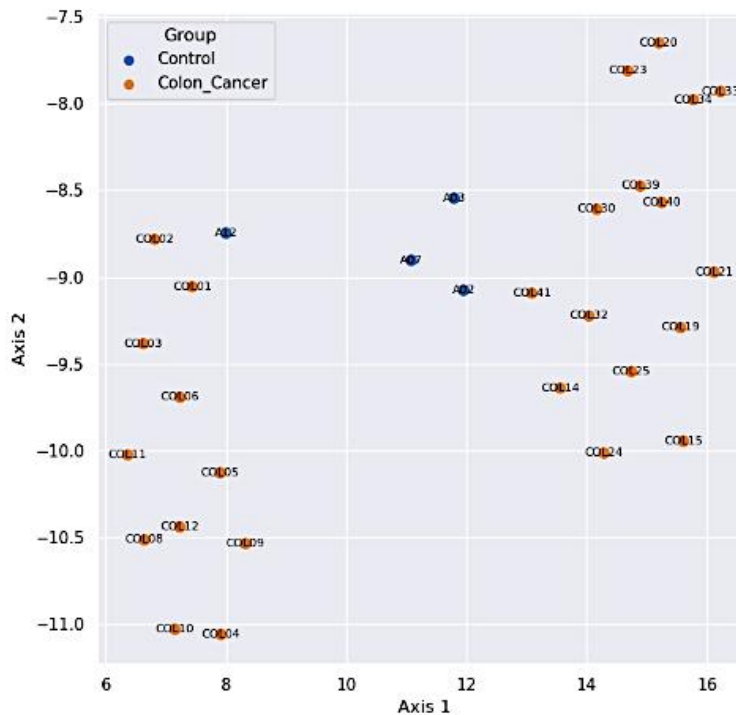
Este patrón refuerza la hipótesis de una disbiosis asociada al cáncer colorrectal, caracterizada no solo por la pérdida de taxones beneficiosos y la proliferación de potenciales patobiontes, sino también por una alteración estructural más profunda en la red de interacciones microbianas. La inclusión del eje PC3 aporta una dimensión adicional de análisis que ayuda a captar variaciones sutiles pero relevantes en la composición y abundancia relativa de los microorganismos presentes. En conjunto, esta representación tridimensional complementa los hallazgos obtenidos en la figura 13 y en los análisis de diversidad alfa, aportando evidencia visual y cuantitativa robusta sobre las diferencias significativas entre los microbiomas de pacientes con cáncer colorrectal y sujetos sanos. Este tipo de análisis multidimensional es clave para entender la complejidad de las comunidades microbianas y su potencial papel en el desarrollo y progresión del cáncer (84).

#### **1.5.11. Representación de similitud entre muestras mediante proyección UMAP**

La figura 15 presenta un análisis de proyección y aproximación de variedad uniforme (UMAP, por sus siglas en inglés) aplicado a las muestras microbianas del estudio, utilizando como métrica de disimilitud la distancia UniFrac no ponderada. En el gráfico, cada punto representa una muestra individual codificada por grupo: azul para el grupo Control (n=4) y naranja para el grupo Colon\_Cancer (n=26).

**Figura 15**

**Representación de similitud entre muestras mediante proyección UMAP basada en la distancia UniFrac no ponderada.**



**Nota: Elaboración propia.**

El gráfico está dispuesto en dos dimensiones (ejes UMAP Axis 1 y Axis 2), preservando las relaciones de proximidad local observadas en el espacio original de alta dimensionalidad.

El análisis UMAP revela una clara separación espacial entre las muestras del grupo Control y las del grupo Colon\_Cancer, indicando una diferencia consistente en las composiciones microbianas entre ambos grupos. Las muestras del grupo Control se agrupan de manera más compacta en el cuadrante izquierdo del gráfico, lo que sugiere una mayor homogeneidad en su perfil microbiano. En contraste, las muestras de pacientes con cáncer colorrectal presentan una mayor dispersión y tienden a agruparse en el extremo derecho, lo que sugiere una comunidad microbiana más heterogénea y posiblemente disbiótica (85).

Esta separación refleja alteraciones estructurales profundas en la comunidad bacteriana intestinal asociada al cáncer colorrectal, que no solo afectan la abundancia relativa de determinados géneros, sino también la presencia/ausencia

de taxones específicos, capturada por la métrica UniFrac no ponderada. La capacidad de UMAP para conservar las relaciones locales entre muestras permite identificar subgrupos dentro de Colon\_Cancer, lo que podría estar relacionado con distintas etapas tumorales, factores ambientales o variaciones interindividuales en el microbioma (84). Este resultado complementa y refuerza los hallazgos obtenidos en los análisis de diversidad alfa y PCoA, consolidando la evidencia de una disbiosis significativa asociada a la condición tumoral. Además, destaca el potencial de UMAP como herramienta para identificar patrones no lineales y estructuras latentes en los datos microbianos, ofreciendo una visión más rica de la variabilidad entre individuos dentro de un mismo grupo clínico.

#### **1.5.12. Pruebas de significancia estadística**

En estudios de microbioma, las pruebas de significancia estadística permiten determinar si las diferencias observadas en la diversidad entre grupos (por ejemplo, pacientes con cáncer vs. controles) son estadísticamente relevantes o si podrían haber ocurrido por azar. Estas pruebas evalúan si las métricas de diversidad alfa o beta muestran diferencias significativas entre los grupos de interés. En el caso de la diversidad beta, métodos no paramétricos como PERMANOVA (ADONIS) son ampliamente utilizados, ya que no requieren asumir distribuciones normales y son robustos frente a datos microbiológicos

**Tabla 14**  
**Pruebas de significancia estadística mediante PERMANOVA (ADONIS) para**  
**diversidad beta entre grupos Control y Colon\_Cancer.**

Distancia	Grupo 1	Grupo 2	Tamaño	Permutaciones	pseudo-F	p-valor	q-valor
			de muestra				
UniFrac no ponderada	Colon	Control	30	999	3.03352	0.001	0.001
UniFrac ponderada	Colon	Control	30	999	17.579769	0.001	0.001
Jaccard	Colon	Control	30	999	1.38675	0.091	0.091
Bray-Curtis	Colon	Control	30	999	2.537642	0.004	0.004

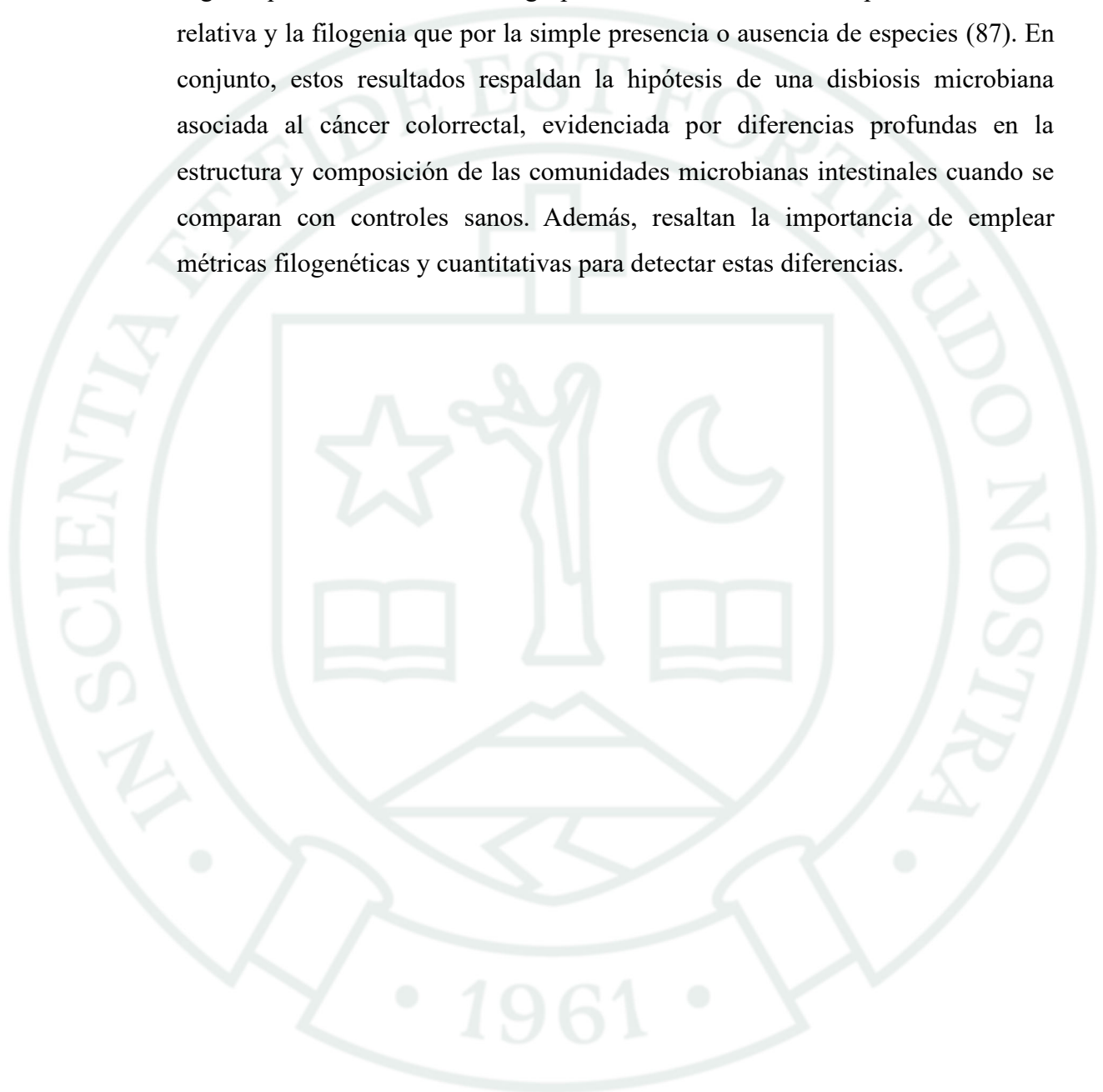
**Nota: Elaboración propia.**

La Tabla 13 muestra los resultados del análisis de varianza permutacional multivariado (PERMANOVA) basado en diferentes métricas de disimilitud para evaluar diferencias en la composición microbiana entre los grupos Control y Colon\_Cancer. Se utilizaron cuatro métricas de distancia: UniFrac no ponderada, UniFrac ponderada, Jaccard y Bray-Curtis. La estadística pseudo-F representa el grado de separación entre los grupos, mientras que el valor p (obtenido mediante 999 permutaciones) indica la significancia estadística de dicha separación. El valor q representa el p-value ajustado por comparaciones múltiples. Los resultados muestran diferencias significativas entre los grupos cuando se utilizan las métricas de UniFrac no ponderada (pseudo-F = 3.03, p = 0.001), UniFrac ponderada (pseudo-F = 17.58, p = 0.001) y Bray-Curtis (pseudo-F = 2.54, p = 0.004), lo cual evidencia alteraciones robustas en la estructura del microbioma en pacientes con cáncer colorrectal (86).

En particular, la métrica UniFrac ponderada mostró el mayor valor de pseudo-F, lo que sugiere una marcada diferencia en la composición del microbioma considerando tanto la abundancia relativa de los taxones como sus relaciones filogenéticas. Este hallazgo es coherente con los resultados previos de los análisis

de diversidad alfa, PCoA y UMAP, donde las muestras de Colon\_Cancer presentaron mayor variabilidad y alejamiento del grupo Control.

Por otro lado, la métrica de Jaccard, que solo considera la presencia/ausencia de taxones, no mostró una diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.091$ ), lo que sugiere que las diferencias entre grupos están más influenciadas por la abundancia relativa y la filogenia que por la simple presencia o ausencia de especies (87). En conjunto, estos resultados respaldan la hipótesis de una disbiosis microbiana asociada al cáncer colorrectal, evidenciada por diferencias profundas en la estructura y composición de las comunidades microbianas intestinales cuando se comparan con controles sanos. Además, resaltan la importancia de emplear métricas filogenéticas y cuantitativas para detectar estas diferencias.



## CONCLUSIONES

- PRIMERA:** Se identificó que la microbiota intestinal de los pacientes con cáncer colorrectal presenta un perfil bacteriano característico, con predominio de los géneros *Novosphingobium*, *Bradyrhizobium* y *Undibacterium*, los cuales se encontraron con mayor abundancia relativa en comparación con el grupo control, según el análisis taxonómico realizado mediante QIIME2.
- SEGUNDA:** Se demostraron diferencias significativas en la composición bacteriana entre los pacientes sanos y los pacientes con cáncer colorrectal. El grupo control presentó una mayor abundancia de géneros beneficiosos como *Faecalibacterium* y *Bacteroides*, mientras que el grupo con cáncer presentó disbiosis intestinal, evidenciada además por una reducción significativa de la diversidad alfa y una clara separación entre grupos en los análisis de diversidad beta (PCoA, UMAP y UPGMA).
- TERCERA:** Se identificaron variantes de secuencia (ASVs/OTUs) predominantes en los pacientes con cáncer colorrectal asociadas principalmente a los géneros *Novosphingobium*, *Bradyrhizobium* y *Undibacterium*, lo que confirma que estas unidades taxonómicas representan poblaciones microbianas dominantes en el entorno tumoral intestinal.
- CUARTA:** Se estableció una correlación significativa entre el perfil de la microbiota intestinal y la presencia de cáncer colorrectal, sustentada en los análisis de diversidad beta (distancias UniFrac) y en las pruebas estadísticas de significancia (PERMANOVA), evidenciando que la disbiosis microbiana se asocia directamente con esta neoplasia.

## RECOMENDACIONES

- PRIMERA:** Se recomienda replicar este estudio con un mayor número de participantes y bajo un diseño longitudinal, lo cual permitiría evaluar la dinámica del microbioma intestinal a lo largo del tiempo y su relación causal con la progresión del cáncer colorrectal. Esto fortalecería la validez estadística y permitiría analizar subgrupos específicos según estadio tumoral, dieta, tratamiento y estilo de vida.
- SEGUNDA:** Para comprender mejor el impacto del microbioma en la fisiopatología del cáncer colorrectal, se sugiere complementar los análisis taxonómicos con estudios metagenómicos funcionales. Esto permitiría identificar rutas metabólicas microbianas activas, interacciones huésped-microbioma y potenciales metabolitos oncomoduladores, proporcionando así una base sólida para el desarrollo de intervenciones terapéuticas o estrategias de diagnóstico temprano basadas en el microbioma.
- TERCERA:** Se recomienda incorporar técnicas multiómicas integradas como metatranscriptómica, metabolómica y proteómica, a fin de obtener una visión holística del ecosistema microbiano intestinal en el cáncer colorrectal. La combinación de estas herramientas permitiría caracterizar funciones biológicas en tiempo real, identificar firmas moleculares asociadas a disbiosis tumoral y comprender cómo las variantes de secuencia (ASVs/OTUs) predominantes influyen en la actividad metabólica y en el microambiente tumoral. Este enfoque favorecería el diseño de modelos predictivos más robustos y de estrategias de medicina personalizada basadas en el microbioma.
- CUARTA:** Se sugiere evaluar intervenciones experimentales dirigidas a modular la microbiota intestinal, como probióticos, prebióticos, simbióticos, trasplante de microbiota fecal o intervenciones nutricionales personalizadas, con el propósito de determinar su impacto en la prevención, progresión o respuesta al tratamiento del cáncer colorrectal. Ensayos clínicos controlados permitirían establecer la eficacia y seguridad de estas estrategias, así como explorar su potencial en terapias adyuvantes y en programas de cribado temprano basados en la restauración de la eubiosis intestinal.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Afanador et al. Caracterización molecular de pacientes con cáncer colorrectal. *Biomédica*. [Internet]. 2022; 42: 154-71.
2. Ministerio de Salud. Cáncer de colon: Al año, el Perú registra 4636 casos nuevos y más de 2000 fallecimientos. [Online].; 2022. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/noticias/596696-cancer-de-colon-al-ano-el-peru-registra-4636-casos-nuevos-y-mas-de-2000-fallecimientos>.
3. Bray et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. [Internet]. 2018; 68(6): 394-424.
4. Cheng et al. The Intestinal Microbiota and Colorectal Cancer. *Frontiers in immunology*. [Internet]. 2020; 11: 615056.
5. Cheng et al. The role of gut microbiota in cancer treatment: friend or foe? *Gut*. [Internet]. 2020; 69(10): 1867-1876.
6. Weng et al. Microbiota and gastrointestinal cancer. *Journal of the Formosan Medical Association*. [Internet]. 2019; 118: S32-S41.
7. Wroblewski L, Peek R. *Helicobacter pylori*, Cancer, and the Gastric Microbiota. *Stem Cells, Pre-neoplasia, and Early Cancer of the Upper Gastrointestinal Tract*. [Internet]. 2016;: 393-408.
8. Saus et al. Microbiome and colorectal cancer: Roles in carcinogenesis and clinical potential. *Molecular aspects of medicine*. [Internet]. 2019; 69: 93-106.
9. Fan et al. Gut Microbiota Dysbiosis Drives the Development of Colorectal Cancer. *Digestion*. [Internet]. 2021; 102(4): 508–15.
10. Malla R. Microbiome Conundrum in Colon Cancer: Development, Progression, and Therapeutics. *Crit Rev Oncog*. [Internet]. 2020; 25(2): 129–39.
11. Song et al. Influence of the Gut Microbiome, Diet, and Environment on Risk of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. [Internet]. 2020; 158(2): 322–340.
12. Chattopadhyay et al. Exploring the Role of Gut Microbiome in Colon Cancer. *Appl Biochem Biotechnol*. [Internet]. 2021; 193(6): 1780–99.

13. Young V. The role of the microbiome in human health and disease: an introduction for clinicians. *Bmj*. [Internet]. 2017;; 356.
14. Murray P. *Microbiología Médica*[Internet]. 2017.
15. Liu et al. Gut microbiome in gastrointestinal cancer: a friend or foe? *International journal of biological sciences*. [Internet]. 2022; 18(10): 4101.
16. Suárez, Avelina. Microbioma y secuenciación masiva. *Spanish Journal of Chemotherapy*. [Internet]. 2017; 30(5): 305–11.
17. Meng et al. Human Gut Microbiota and Gastrointestinal Cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. [Internet]. 2018; 16.
18. Newsome et al. The microbiome, gastrointestinal cancer, and immunotherapy. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*. [Internet]. 2022; 37(2): 263-272.
19. Castells, Antoni. *Gastroenterología y Hepatología. Jornada de Actualización en Gastroenterología Aplicada*. [Internet]. 2016; 39(1): 62–7.
20. Weitz et al. Colorectal cancer. *Lancet*. [Internet]. 2005; 365(9454): 153–65.
21. Matson et al. Cancer and the Microbiome—Influence of the Commensal Microbiota on Cancer, Immune Responses, and Immunotherapy. *Gastroenterology*. [Internet]. 2021; 160(2): 600-613.
22. Li et al. Gut microbiome and cancer immunotherapy. *Cancer letters*. [Internet]. 2019; 447: 41-47.
23. Vitošević et al. DNA isolated from formalin-fixed paraffin-embedded healthy tissue after 30 years of storage can be used for forensic studies. *Forensic Sci Med Pathol*. [Internet]. 2020.
24. Muleviciene et al. Iron deficiency anemia-related gut microbiota dysbiosis in infants and young children: A pilot study. *Acta Microbiol Immunol Hung*. [Internet]. 2018; 65: 551–64.
25. Hardwick et al. Reference standards for next-generation sequencing. *Nat Rev Genet*. [Internet]. 2017; 18(8): 473–84.
26. Hill et al. Metagenomic analyses reveal antibiotic-induced temporal and spatial changes in intestinal microbiota with associated alterations in immune cell homeostasis. *Mucosal Immunol*. [Internet]. 2010; 3(2): 148–58.

27. Arumugam et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. [Internet]. 2011; 473(7346): 174–80.
28. Noshu et al. Association of *Fusobacterium nucleatum* with immunity and molecular alterations in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. [Internet]. 2016; 22(2): 557–66.
29. Abed et al. Fap2 mediates *Fusobacterium nucleatum* colorectal adenocarcinoma enrichment by binding to tumor-expressed Gal-GalNAc. *Cell Host Microbe*. [Internet]. 2016; 20(2): 215–25.
30. Huang et al. The human commensal *Bacteroides fragilis* binds intestinal mucin. *Anaerobe*. [Internet]. 2011; 17(4): 137–41.
31. Corfield A. Mucins: A biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. *Bba-Gen Subjects*. [Internet]. 2015; 1850: 236–52.
32. Robertson et al. *Mucispirillum schaedleri* gen. nov., sp nov., a spiral-shaped bacterium colonizing the mucus layer of the gastrointestinal tract of laboratory rodents. *Int J Syst Evol Microbiol*. [Internet]. 2005; 55(3): 1199–204.
33. Li et al. The outer mucus layer hosts a distinct intestinal microbial niche. *Nature communications*. [Internet]. 2015; 6(1): 8292.
34. Magoč T, Salzberg S. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*. [Internet]. 2011; 27(21): 2957–63.
35. Bokulich et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat Methods*. [Internet]. 2013; 10(1): 57–9.
36. Caporaso et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. [Internet]. 2010; 7(5): 335–6.
37. Edgar et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*. [Internet]. 2011; 27(16): 2194–200.
38. Haas et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res*. [Internet]. 2011; 21(2013): 494–504.
39. DeSantis et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol*. [Internet]. 2006; 72(7): 5069–72.
40. Wang et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol*. [Internet]. 2007; 73(16): 5261–7.

41. Edgar R. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. [Internet]. 2004; 32(5): 1792–1797.
42. Brook I, Myhal M. Adherence of *Bacteroides fragilis* group species. *Infect Immun*. [Internet]. 1991; 59: 742–4.
43. Cossart P, Sansonetti P. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science*. [Internet]. 2004; 304: 242–8.
44. Martin et al. Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology*. [Internet]. 2004; 127(1): 80–93.
45. Bonnet et al. Colonization of the human gut by *E. coli* and colorectal cancer risk. *Clin Cancer Res*. [Internet]. 2014; 20(4): 859–67.
46. Obata et al. Indigenous opportunistic bacteria inhabit mammalian gut-associated lymphoid tissues and share a mucosal antibody-mediated symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. [Internet]. 2010; 107(16): 7419–24.
47. Sonnenberg et al. Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria. *Science*. [Internet]. 2012; 336(6086): 1321–5.
48. Wu et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*. [Internet]. 2011; 334: 105–8.
49. Corredoira et al. Characteristics of *Streptococcus bovis* endocarditis and its differences with *Streptococcus viridans* endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. [Internet]. 2008; 27(4): 285–91.
50. Klein et al. *Streptococcus bovis* septicemia and carcinoma of the colon. *Ann Intern Med*. [Internet]. 1979; 91(4): 560–2.
51. Boleij et al. Increased exposure to bacterial antigen RpL7/L12 in early stage colorectal cancer patients. *Cancer*. [Internet]. 2010; 116(17): 4014–22.
52. Ellmerich et al. Promotion of intestinal carcinogenesis by *Streptococcus bovis*. *Carcinogenesis*. [Internet]. 2000; 21(4): 753–6.
53. Tjalsma et al. Profiling the humoral immune response in colon cancer patients: diagnostic antigens from *Streptococcus bovis*. *Cancer*. [Internet]. 2006; 119: 2127–35.

54. Biarc et al. Carcinogenic properties of proteins with pro-inflammatory activity from *Streptococcus infantarius* (formerly *S. bovis*). *Carcinogenesis*. [Internet]. 2004; 25: 1477–84.
55. Yu et al. Metagenomic analysis of faecal microbiome as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for colorectal cancer. *Gut*. [Internet]. 2017; 66: 70–8.
56. Kostic et al. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe*. [Internet]. 2013; 14: 207–15.
57. Goodwin et al. Polyamine catabolism contributes to enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-induced colon tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. [Internet]. 2011; 108(37): 15354–9.
58. Housseau F, Sears C. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF)-mediated colitis in *Min* (*Apc<sup>+/-</sup>*) mice: a human commensal-based murine model of colon carcinogenesis. *Cell Cycle*. [Internet]. 2010; 9(1): 3–5.
59. Ubeda et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *J Clin Invest*. [Internet]. 2010; 120: 4332–41.
60. Thompson et al. Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response. *Clin Nutr*. [Internet]. 2005; 24: 339–52.
61. Dunne et al. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. 76. [Internet]. 1999; 76(1): 279–92.
62. Belcheva A. Microbiome and colorectal cancer: Role in carcinogenesis and clinical potential. *World J Gastroenterol*. [Internet]. 2021; 27: 4145-4161.
63. Yu et al. Human gut microbiota and colorectal cancer: Mechanistic insights and clinical implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. [Internet]. 2022; 19: 80-99.
64. Arthur et al. Intestinal microbiota and colorectal tumors: Mechanistic insights. *Nat Med*. [Internet]. 2021; 27: 85-97.
65. Ge et al. Roles of gut microbiota in cancer immunotherapy. *World J Gastroenterol*. [Internet]. 2023; 29(2): 188-206.

66. Park et al. Association of colibactin-producing *Escherichia coli* with colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol*. [Internet]. 2023; 21: e56-e65.
67. Tilg et al. Gut microbiome and metabolic health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. [Internet]. 2020; 17: 79-91.
68. Marchesi et al. The gut microbiota and host health: A new clinical frontier. *Gut*. [Internet]. 2022; 71(4): 853-867.
69. Mehta et al. Diet and risk of colorectal cancer through the gut microbiota. *Nat Med*. [Internet]. 2021; 27(2): 223-232.
70. O'Keefe S. Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. *Rev Gastroenterol Hepatol*. [Internet]. 2020; 17(12): 719-732.
71. Wang et al. Biomarker potential of the gut microbiota in colorectal cancer. *Gut Microbes*. [Internet]. 2022; 13(1): 1-12.
72. Routy et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science*. [Internet]. 2022; 359: 91-97.
73. Zuo et al. The gut microbiota in the pathogenesis and therapeutics of inflammatory bowel disease. *Front Microbiol*. [Internet]. 2020; 11: 572.
74. Rinninella et al. Gut microbiota and colorectal cancer: A comprehensive review. *World J Gastroenterol*. [Internet]. 2022; 28: 355-366.
75. Alexander et al. Gut microbiota modulation in colorectal cancer: Clinical applications. *Lancet Oncol*. [Internet]. 2022; 23(7): e290-e301.
76. Schwabe, R; Jobin, C. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer*. [Internet]. 2022; 22(5): 365-377.
77. Alexander et al. Microbiota-targeted therapies in colorectal cancer: Current research and future perspectives. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. [Internet]. 2023; 8(1): 30-42.
78. Liao et al. Advances in fecal microbiota transplantation for colorectal cancer. *Front Oncol*. [Internet]. 2021; 11: 658-664.
79. Kang et al. Clinical implications of *Fusobacterium nucleatum* in colorectal cancer: A systematic review. *World J Gastroenterol*. [Internet]. 2023; 29(1): 20-30.
80. Saffarian et al. Diet-microbiota interactions in colorectal cancer: Opportunities for personalized interventions. *Trends Cancer*. [Internet]. 2022; 8(8): 580-591.

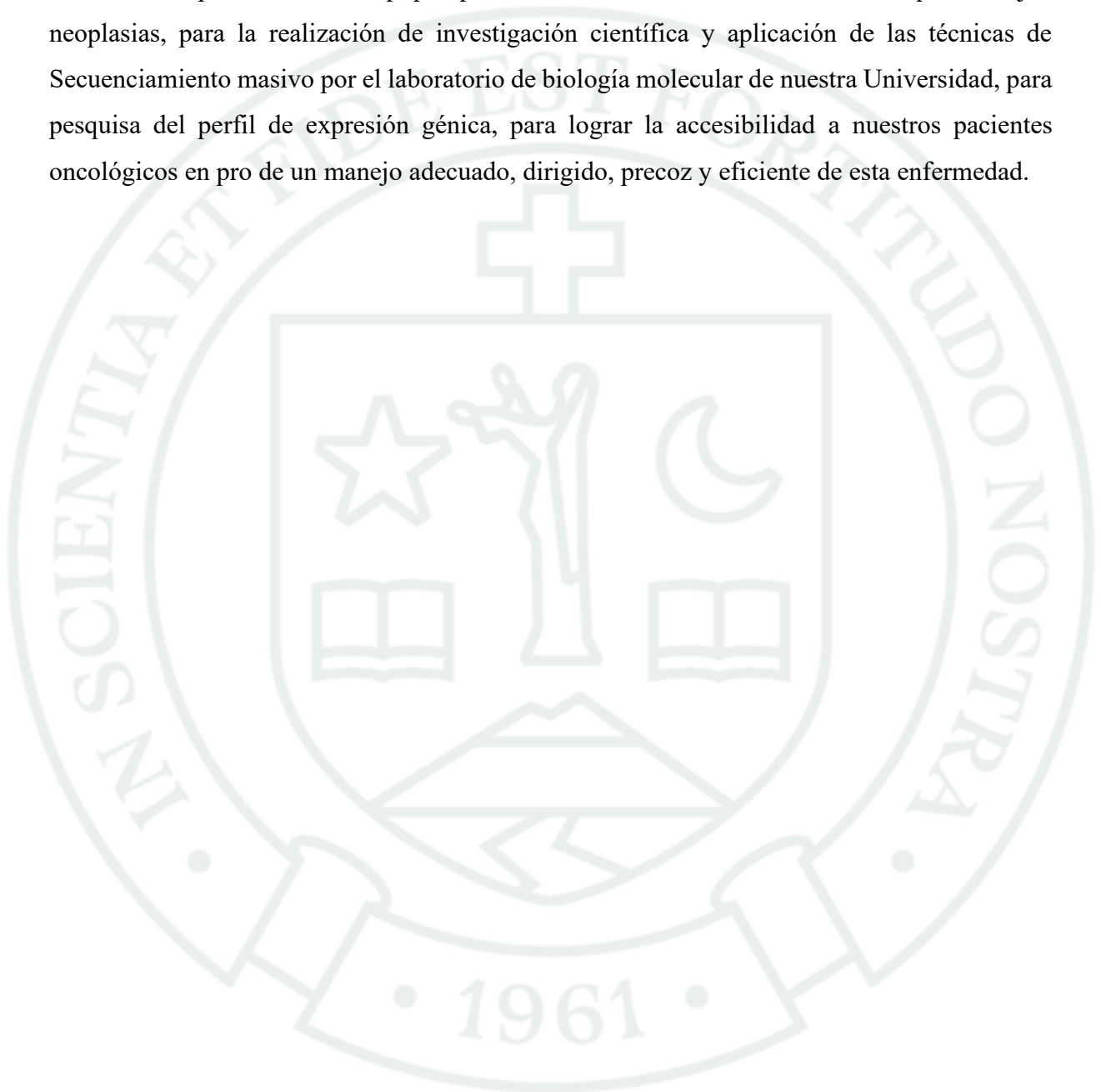
81. Wild et al. World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention[Internet]. 2020.
82. Degeling et al. Health economic models for metastatic colorectal cancer: a methodological review. *Pharmacoeconomics*. [Internet]. 2020; 38(7): 683–713.
83. McGeechan et al. A systematic review and qualitative synthesis of the experience of living with colorectal cancer as a chronic illness. *Psychol Health*. [Internet]. 2021;; 1–25.
84. Kheiri et al. Overview of fecal microbiota transplantation and its clinical applications. *J Res Med Sci*. [Internet]. 2020; 2: 401–414.
85. McGeechan et al. A systematic review and qualitative synthesis of the experience of living with colorectal cancer as a chronic illness. *Psychology Health*. [Internet]. 2021;; 1–25.
86. Mirzaei et al. Bacterial biofilm in colorectal cancer: what is the real mechanism of action? *Microb Pathog*. [Internet]. 2020; 142: 104052.
87. Xia et al. Bacteria pathogens drive host colonic epithelial cell promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in colorectal cancer. *Microbiome*. [Internet]. 2020; 8: 1–13.
88. Sonnenburg et al. Genomic and metabolic studies of the impact of probiotics on a model gut symbiont and host. *PLoS Biol*. [Internet]. 2006; 4(12): e413.
89. Corr et al. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc Natl Acad Sci USA*. [Internet]. 2007; 104(18): 7617–21.
90. Tahara et al. *Fusobacterium* in colonic flora and molecular features of colorectal carcinoma. *Cancer Res*. [Internet]. 2014; 74(5): 1311–8.



**ANEXOS**

**Anexo 1**  
**Propuesta**

Se debería de proponer y poner en marcha un convenio de prestaciones mutuas entre la Universidad Católica de Santa María, Ministerio de Salud, EsSalud, Fuerzas armadas e instituciones privadas de Arequipa que involucre a todas las instituciones que manejen neoplasias, para la realización de investigación científica y aplicación de las técnicas de Secuenciamiento masivo por el laboratorio de biología molecular de nuestra Universidad, para pesquisa del perfil de expresión génica, para lograr la accesibilidad a nuestros pacientes oncológicos en pro de un manejo adecuado, dirigido, precoz y eficiente de esta enfermedad.



## Anexo 2

### Consentimiento informado

		VERSIÓN
Título del estudio	<b>Caracterización del Microbioma Bacteriano Gastrointestinal Humano y su Asociación con el Cáncer Gástrico y Colorrectal: un Estudio Basado en la Tecnología de “Next Generation Sequence”</b>	<b>02</b>
Investigador	Julio Cesar Bernabé Ortiz	FECHA
Institución	Universidad Católica de Santa María	29/01/2019

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACION

##### Propósito del estudio:

Estamos invitándolo a participar en un estudio donde se realizarán estudios moleculares de la expresión de marcadores para cáncer gástrico y colorrectal, y del Microbioma intestinal. Este es un estudio desarrollado por investigadores de la Universidad Católica de Santa María.

El cáncer colorrectal y el cáncer gástrico son dos enfermedades que representan un serio problema de salud a nivel mundial y local. La supervivencia a dichas enfermedades depende mayoritariamente de un diagnóstico temprano; por esta razón proponemos esta investigación que tiene como objetivo relacionar las características moleculares de dichos tipos de cáncer y la flora intestinal.

##### Procedimientos:

Si usted acepta a participar en el estudio se le realizará lo siguiente:

1. En caso de someterse a una colonoscopia y/o endoscopia indicada por su médico tratante, se le tomará una biopsia adicional la que será llevada al laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Católica de Santa María para la extracción de ADN humano para determinar mutaciones y ARN humano para el análisis de marcadores tumorales como MUTY, APC, K-ras, BRAF, EGFR, CEA y CA 19.9); y para la extracción de ADN de la flora bacteriana.
2. En caso de someterse a una cirugía, se tomará parte de las piezas operatorias la que será llevada al laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Católica de Santa María para la extracción de ADN humano para determinar mutaciones y ARN humano para el análisis de marcadores tumorales como MUTY, APC, K-ras, BRAF, EGFR, CEA y CA 19.9); y para la extracción de ADN de la flora bacteriana.

3. Se le solicitará una muestra de heces para la extracción de ADN bacteriano la que será igualmente procesada en las instalaciones de la Universidad Católica de Santa María.
4. Se solicitará su historia clínica para obtener datos de filiación (edad, sexo, procedencia, antecedentes familiares de cáncer), otros exámenes de laboratorio y evolución de su enfermedad.
5. Los resultados obtenidos serán entregados a la unidad de Investigación del Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas IREN Sur para que sean adjuntados a su historia clínica.
6. Una segunda muestra podría ser analizada si su médico tratante solicita una nueva endoscopia o colonoscopia .

**Riesgos:**

No tendrá ningún riesgo adicional al ya explicado por su médico tratante del procedimiento que se le va a realizar.

**Beneficios:**

El beneficio que obtiene es información detallada de los genes activados asociados a la enfermedad y que en muchos casos son determinantes de la severidad de la misma, así como información respecto a la población de su flora intestinal, la cual es indispensable para una mejor respuesta a ingesta de medicamentos y generalmente para una mejor calidad de vida. Cabe resaltar que usted no se verá comprometido a realizar ningún tipo de remuneración económica por el estudio.

**Costos y compensación**

La investigación no presenta ningún costo que deba ser cubierto por usted, ni para la entrega de resultados, el estudio es financiado por el fondo del proyecto Microbioma del Vicerrectorado de Investigación UCSM: el investigador principal no brindara ningún pago por las muestras.

**Confidencialidad:**

El equipo de investigación se compromete a guardar la información con códigos y no con nombres. Si los resultados de este seguimiento son publicados, nos e mostrará ninguna información de carácter personal que permita su identificación o de otros participantes del estudio.

**Uso futuro de la información obtenida (*sección aplicable también para almacenamiento de muestras biológicas*)**

Doy autorización para que las muestras: **biopsia o piezas operatorias, permanezcan almacenadas** y puedan ser utilizadas posteriormente para estudios de investigación en esta misma línea de análisis molecular.

SI ( )

NO ( )

Doy autorización para que **las muestras de ADN y ARN** obtenidas a partir de la biopsia, piezas operatorias y/o heces, **permanezcan almacenadas** y puedan ser utilizadas posteriormente para estudios de investigación en esta misma línea de análisis molecular.

SI ( )

NO ( )

### **Derecho del participante**

Si usted decide participar en este estudio, podrá retirarse de este en cualquier momento, o no participar en una parte del estudio sin daño alguno. Si tiene alguna duda adicional, por favor pregunte al personal del estudio o llame a:

- Sandra Yucra Zevillano 992 923 682
- Cecilia Sanchez Guillén 959 227 023
- Cecilia Manrique Sam 989 687 151

El presente estudio ha sido evaluado por el Comité de Investigación de Ética Internacional de la Asociación Benéfica Prisma

Si tiene preguntas sobre los aspectos éticos del estudio, o cree que ha sido tratado injustamente puede contactar al Dr. Salomón Zavala Sarrio, Presidente del Comité de Ética de PRISMA-ONG. Teléfono de contacto : 01 2090400 Anexo 246 y 258, el comité de ética prisma está conformado por personas independientes de los investigadores, cuya función es vigilar que se respeten la dignidad y los derechos de los participantes en el diseño y desarrollo de los proyectos de investigación.

Una copia de este consentimiento informado le será entregada.

### **DECLARACIÓN Y CONSENTIMIENTO**

Acepto voluntariamente participar en este estudio, comprendo las actividades en las que participaré si decido ingresar al estudio, también entiendo que puedo retirarme en cualquier momento.

**Nombre completo del participante:** \_\_\_\_\_

**N° Documento de Identidad:** \_\_\_\_\_

**Firma del participante:** \_\_\_\_\_

**Nombre completo del investigador:** \_\_\_\_\_

**N° Documento de Identidad:** \_\_\_\_\_

**Firma del Investigador:** \_\_\_\_\_

**Fecha y hora:** \_\_\_\_\_

**Anexo 3**  
**Aprobación del Comité de Ética**

Lima, 18 de febrero de 2020  
CE0157.20



Doctor  
**Julio César Bernabé Ortiz**  
Investigador Principal  
Universidad Católica Santa María  
Presente. -

Santo Toribio 115  
5to piso  
San Isidro 15073  
Lima - Perú  
T 511 209 0400  
prisma.org.pe

**Ref.: Protocolo titulado “Caracterización del Microbioma Bacteriano Gastrointestinal Humano y su Asociación con el Cáncer Gástrico y Colorrectal: un estudio basado en la Tecnología NGS”**

**cambiamos vidas  
cambiamos el mundo**

De nuestra consideración:

Es grato dirigirnos a usted a fin de informarle que el Comité de Ética ha revisado los cambios sugeridos y procede con la **APROBACION** por unanimidad de los siguientes documentos del estudio en mención:

- ❖ **Proyecto de Investigación versión 02 de fecha 23/01/2019 versión español e inglés**
- ❖ **Consentimiento informado para participar en un estudio de investigación, Versión 02 de fecha 29/01/2019 en español e inglés.**

Sin otro particular me despido de Ud.

Atentamente

Salomón Zavala Sarrio  
Presidente  
Comité Institucional de Ética en Investigación