

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Medicina Humana
Escuela Profesional de Medicina Humana



PRESENCIA DE *FUSOBACTERIUM NUCLEATUM*, *CLOSTRIDIUM SYMBIOSUM* Y *PARVIMONAS MICRA* EN MUESTRAS DE TACOS DE PARAFINA Y HECES DE PACIENTES CON CÁNCER COLORECTAL MEDIANTE SECUENCIACIÓN GENÉTICA

Tesis presentada por el Bachiller:

Velásquez Lazo, Mario César

para optar el Título Profesional de:

Médico Cirujano

Asesor:

Dr. Bernabé Ortiz, Julio César

Arequipa – Perú

2020



Universidad Católica
de Santa María

134

AREQUIPA-PERÚ

(51 54) 382038 <http://www.ucsm.edu.pe> [facebook.com/ucsm.edu.pe/](https://www.facebook.com/ucsm.edu.pe/)

INFORME DICTAMEN BORRADOR DE TESIS
DECRETO N° 042 - FMH-2020

Visto el Borrador de Tesis titulado:

“PRESENCIA DE FUSOBACTERIUM NUCLEATUM, CLOSTRIDIUM SYMBIOSUM Y PARVIMONAS MICRA EN MUESTRAS DE TACOS DE PARAFINA Y HECES DE PACIENTES CON CÁNCER COLORECTAL MEDIANTE SECUENCIACIÓN GENÉTICA”

Presentado por el (la) Sr(ta):

VELASQUEZ LAZO, MARIO CESAR

Nuestro dictamen es:

Aprobado.

OBSERVACIONES:

Arequipa, *12 de Marzo 2020.*


.....
DR. WILFREDO OSWALDO PINO CHAVEZ

Dr. Wilfredo Pino Chávez
CIRUGÍA GENERAL
CMP 20609 . RNE 9812


.....
DR. WALKER JOVE OBLITAS


.....
DRA. LILY MONTESINOS VALENCIA

EPÍGRAFE

*“Si me pidieran que nombrara el evento principal en mi vida, debería decir
la biblioteca de mi padre.”*

Jorge Luis Borges.

*“Tenemos el deber de no ignorar la realidad nacional, pero tenemos
también el deber de no ignorar la realidad mundial. El Perú es el fragmento
de un mundo que sigue una trayectoria solidaria.”*

José Carlos Mariátegui



DEDICATORIA

A Mario y Belia, mis padres, piezas indispensables en cada etapa de mi vida, por su apoyo constante e infinito amor, de quienes pretendo ser su mayor orgullo.

A mi tía Mary, mi segunda madre, quien me brindo su apoyo y amor incondicional, y me enseñó a ser noble con su ejemplo diario.

A Junior, mi hermano menor, por ser mi motivo para superarme cada día más, y hacer mi vida universitaria más amena con sus ocurrencias.

A Mario Luis, Carmen y Maritza, mis hermanos mayores, de quienes aprendí a luchar cada día y a levantarme luego de cada caída con más fuerza.

A Toño, mi primo y hermano, mi mejor amigo, quien me acompañó desde la niñez en mi formación personal.

A Chope, Pato, Lucho y Hugo, mi grupo de la universidad, gracias por ser parte de mi desarrollo profesional y personal.

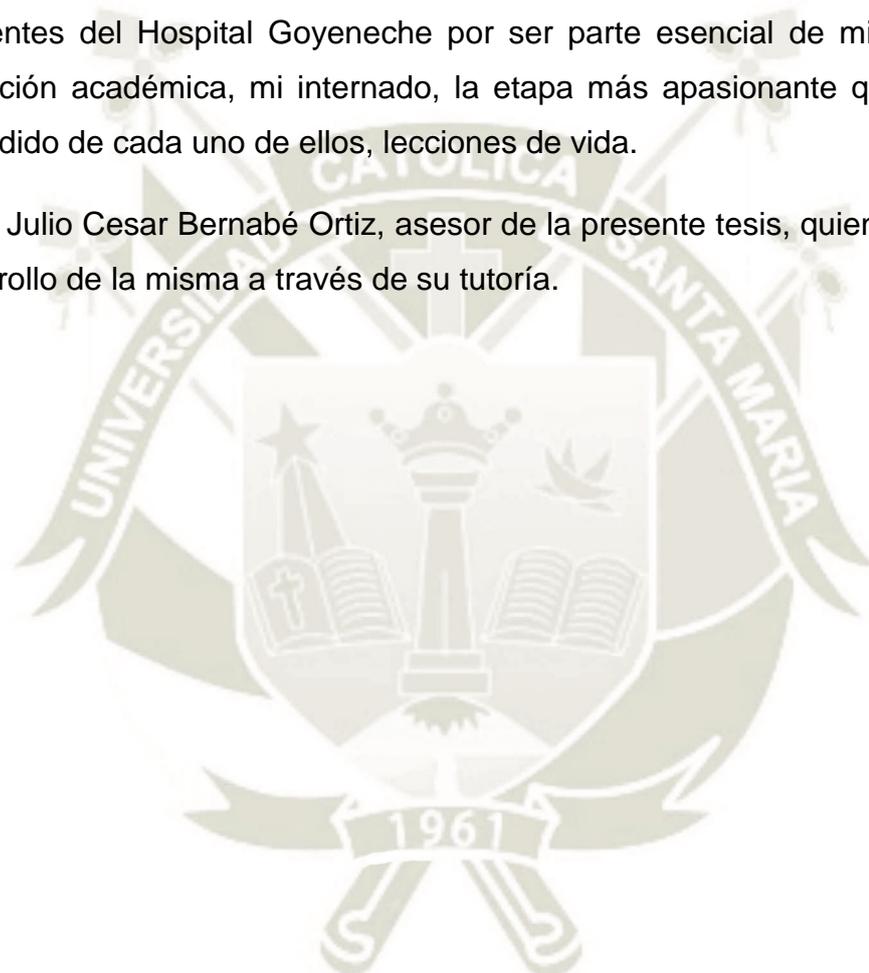
Con mucho cariño, esto es para ustedes...

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Católica de Santa María, mi alma mater, por brindarme los medios y los recursos para poder formarme como Médico Cirujano.

A los médicos asistentes, enfermeras, obstétricas, técnicos de enfermería, médicos residentes del Hospital Goyeneche por ser parte esencial de mi último año de formación académica, mi internado, la etapa más apasionante que viví y haber aprendido de cada uno de ellos, lecciones de vida.

Al Dr. Julio Cesar Bernabé Ortiz, asesor de la presente tesis, quien hizo posible el desarrollo de la misma a través de su tutoría.



RESUMEN

El cáncer de colorectal es la cuarta neoplasia más frecuente en ambos sexos en nuestro medio, posee una etiología multifactorial. Recientemente se ha estudiado y demostrado la relación del cáncer de colon y alteraciones en la microbiota intestinal. Se ha identificado predominancia en las siguientes bacterias: Bacterias productoras de colibactina, *Bacteroides Fragilis enterotoxigénico*, *Fusobacterium Nucleatum*, *Clostridium Symbiosum* *Parvimonas Micra*, entre otras. Los recientes estudios abren un abanico de posibilidades en el estudio del cáncer colorrectal y la microbiota intestinal, incluyendo el estudio de nuevos biomarcadores y su rol en la carcinogénesis.

Evaluar la presencia de *Fusobacterium Nucleatum*, *Clostridium Symbiosum* y *Parvimonas Micra* en muestras de tacos de parafina y heces de paciente diagnosticados con cáncer colorrectal.

Estudio de cohortes de valoración transversal en muestras de tacos de parafina y heces de pacientes diagnosticados con cáncer colorrectal en Arequipa 2020. Se recolectaron 15 tacos de parafina, 5 muestras de heces de pacientes diagnosticados con cáncer de colon y 4 muestras de heces de pacientes sanos (controles). Se evaluó la presencia de *Fusobacterium Nucleatum*, *Clostridium Symbiosum* y *Parvimonas Micra* a través de secuenciación genética.

Las muestras de tacos de parafina, independientemente de si la zona contenía o no cáncer colorrectal, no contenían ADN, extracción que se realizó de forma manual con el método fenol – cloroformo. Se evidenció la presencia de *Fusobacterium Nucleatum* en el 100%, de *Clostridium Symbiosum* en el 50%, y de *Parvimonas Micra* en el 75% de las muestras de heces de pacientes con cáncer colorrectal. Se encontró la presencia de *Clostridium symbiosum* en uno de los controles. Se identificaron dos nuevas especies de *Parvimonas Micra* a través de la secuenciación genética y su comparación en la base de datos del GenBank.

La bacteria predominante de las muestras estudiadas fue el *Fusobacterium Nucleatum*, seguida por *Clostridium Symbiosum* y *Parvimonas Micra* en las muestras de heces de pacientes con el diagnóstico de cáncer colorrectal. La extracción de ADN fue nula en las muestras de tacos de parafina. Se descubrió la

presencia de dos nuevas especies de *Parvomonas micra* en las muestras de heces de pacientes con cáncer colorectal.

Palabras clave: *Fusobacterium Nucleatum*, *Clostridium Symbiosum* and *Parvimonas Micra*, Cáncer colorectal, microbiota, secuenciación genética



ABSTRACT

Colorectal cancer is the fourth most common neoplasm in both sexes in our country, it has a multifactorial etiology. Recently the relationship of colon cancer and alterations in the intestinal microbiota has been studied and demonstrated. Abundance has been identified in the following bacteria: Colibactin-producing bacteria, *Enterotoxigenic Fragilis Bacteroides*, *Fusobacterium Nucleatum*, *Clostridium Symbiosum* *Parvimonas Micra*, among others. Recent studies open a range of possibilities in the study of colorectal cancer and gut microbiota, including the study of new biomarkers and their role in carcinogenesis.

To evaluate the presence of *Fusobacterium Nucleatum*, *Clostridium Symbiosum* and *Parvimonas Micra* in paraffin blocks and stool from patients diagnosed with colorectal cancer.

Method: Cross-sectional assessment cohort study in FFPE samples and stool samples from patients diagnosed with colorectal cancer in Arequipa 2020. 15 FFPE, 5 stool samples were collected from patients diagnosed with colon cancer and 4 stool samples from healthy patients (controls). The presence of *Fusobacterium Nucleatum*, *Clostridium Symbiosum* and *Parvimonas Micra* was evaluated through genetic sequencing.

The samples of FFPE, regardless of whether the area contained colorectal cancer or not, did not contain DNA, extraction that was carried out manually with the phenol-chloroform method. The presence of *Fusobacterium Nucleatum* in 100%, *Clostridium Symbiosum* in 50%, and *Parvimonas Micra* in 75% of stool samples from patients with colorectal cancer were evidenced. The presence of *Clostridium symbiosum* was found in one of the controls. Two new *Parvimonas Micra* species were identified through genetic sequencing and their comparison in the GenBank database.

The predominant bacteria in the samples studied was *Fusobacterium Nucleatum*, followed by *Clostridium Symbiosum* and *Parvimonas Micra* in stool samples from patients diagnosed with colorectal cancer. DNA extraction was absent in the FFPE samples.

The presence of two new species of *Parvomonas micra* was discovered in stool samples from patients with colorectal cancer.

Keywords: *Fusobacterium Nucleatum*, *Clostridium Symbiosum* and *Parvimonas Micra*, Colorectal cancer, microbiota and genetic sequencing



INTRODUCCIÓN

El cáncer colorectal es la tercera neoplasia más común en el mundo, la cuarta en nuestro medio y la segunda en mortalidad a nivel mundial (1). Como muchas enfermedades, la etiología es multifactorial, así como su patogénesis, en la cual se incluyen factores genéticos y del entorno. Ha sido descrita la predisposición genética para el cáncer colorectal, por ejemplo, el síndrome de Lynch, la poliposis adenomatosa familiar y síndrome de Peutz–Jeghers, sin embargo, estos son solo una minoría. La heredabilidad del cáncer colorectal representa un porcentaje muy pequeño. Dentro de los factores del entorno, se incluye la dieta, estilo de vida, consumo de sustancias cancerígenas y recientemente la microbiota intestinal.

La presencia de sintomatología en el cáncer colorectal resulta poco sensible e inespecífica, se incluyen síntomas como dolor abdominal, pérdida de peso y signos como la presencia de sangre en heces, pujo y tenesmo. Siendo la clínica mencionada propia de estadios avanzados en su mayoría.

El diagnóstico del cáncer colorectal, al igual que toda neoplasia es a través del estudio anatómico – patológico, cuenta como principal método de screening a la colonoscopia, siendo un procedimiento invasivo de riesgo leve a moderado y con un costo significativo para nuestra población.

El tratamiento del cáncer colorectal depende del estadio del tumor, y se describen como opciones terapéuticas a la cirugía, quimioterapia y radioterapia.

El colon es la sección del tracto digestivo con la mayor población de la microbiota intestinal (2).

La microbiota intestinal alberga una gran comunidad de microorganismos (archaea, fungi, protozoos, virus) y como mayor componente a las bacterias; trillones de células bacterianas, cientos de especies y un genoma que englobaría 3 millones de genes (3). Este ecosistema interactúa de forma constante con el intestino humano, en determinados procesos, tales como la absorción de nutrientes, metabolismo, desarrollo de tejidos, y la carcinogénesis (4).

La disbiosis, alteración en la composición de la microbiota, ha sido asociada específicamente con algunas enfermedades y en la fisiopatología del cáncer. Se estima que más del 20% de los cánceres a nivel mundial son atribuidos a agentes infecciosos intestinales que pertenecen a la flora habitual de la microbiota intestinal.

La microbiota intestinal es modulada y regulada por el estilo de vida y la dieta, siendo estos, factores de riesgo conocidos para el cáncer colorectal.

La evidencia más antigua en la que se estudió la probable relación de cáncer colorectal y la microbiota intestinal fue realizada en los años 60's en modelos animales. Los siguientes trabajos indicaron que la microbiota intestinal, incluyendo especies específicas de *Escherichia*, *Enterococcus*, *Bacteroides* y *Clostridium*, podía promover la carcinogénesis aumentando focos de criptas aberrantes inducidas por 1,2-dimetilhidrazina, esto en el año 1997 (5).

Los estudios en humanos generalmente fueron metagenómicos. Estos estudios mostraron que la microbiota intestinal en pacientes con cáncer colorectal era diferente comparada con la microbiota intestinal de pacientes sanos (controles), con aumento de taxas procarcinogénicas (como, *Bacteroides*, *Escherichia*, *Fusobacterium* y *Porphyromonas*), ó baja abundancia en taxas protectoras (como, *Roseburia*), este fue el punto de partida para estudiar la carcinogénesis del cáncer colorectal con la comunidad microbiana (6).

Actualmente los estudios metagenómicos están siendo comúnmente usados en uno de los dos principales enfoques para la composición del microbioma: "secuenciación de genoma completo" (WGS) y la secuenciación 16S rRNA. En ambos casos ambos son leídos por la tecnología de la secuencia de siguiente generación (NGS) y son comparadas con bases de datos para determinar la presencia y abundancia de una taxa en particular.

Existen dos consorcios internacionales que conducen los dos estudios más importantes a nivel mundial sobre el microbioma intestinal: MetaHIT (La metagenómica del tracto intestinal humano) y HMP (Proyecto de microbioma intestinal) (7,8).

Gracias a los métodos descritos se han logrado identificar a bacterias con cepas específicas, tales como *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus gallolyticus* estando relacionados de forma individual al cáncer colorectal y a través de estudios metagenómicos se identificó la abundancia de bacterias como *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas* y *Prevotella* en muestras de heces y tumoraciones (9).

El presente estudio busca identificar la presencia de las bacterias *Fusobacterium Nucleatum*, *Clostridium Symbiosum* y *Parvimonas Micra* en muestras frescas, tacos de parafina y heces de pacientes con cáncer colorectal, siendo este el primer estudio realizado en el país, sobre microbiota intestinal y su relación con el cáncer colorectal.



ÍNDICE

RESUMEN.....	vi
ABSTRACT	viii
INTRODUCCIÓN.....	x
CAPITULO I MATERIALES Y MÉTODOS	1
CAPITULO II RESULTADOS.....	7
CAPITULO III DISCUSIÓN.....	23
CONCLUSIONES.....	30
RECOMENDACIONES.....	31
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
ANEXOS.....	35
ANEXO 1. Matriz de datos para muestras de tacos de parafina de pacientes con cáncer colorectal.....	36
ANEXO 2. Matriz de datos para muestras de heces de pacientes con cáncer colorectal.....	37
ANEXO 3 SECUENCIACIONES GENÉTICAS.....	38
ANEXO 4. PROYECTO DE TESIS.....	40

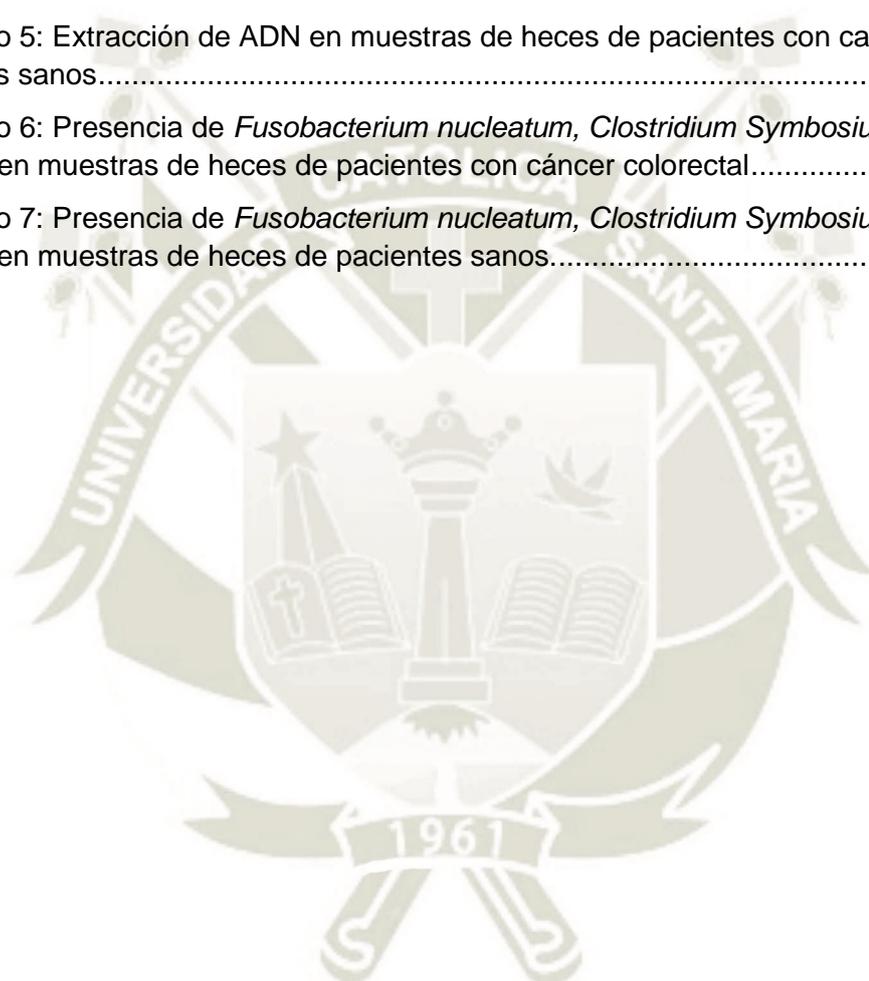
ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Casos de cáncer colorectal, según edad.....	8
Tabla 2. Casos de cáncer colorectal, según el sexo.	10
Tabla 3. Casos de cáncer colorectal, según procedencia.	11
Tabla 4. Extracción de ADN en muestras de tacos de parafina patológicas (PP) y normales (PN) en pacientes con cáncer colorectal.	12
Tabla 5. Extracción de ADN en muestras de heces de paciente con cáncer colorectal (HP) y de pacientes sanos (controles) (HS).	14
Tabla 6. Presencia de <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Clostridium Symbiosum</i> , y <i>Parvimonas micra</i> en muestras de heces de pacientes con cáncer colorectal (casos), según PCR. ...	16
Tabla 7. Presencia de <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Clostridium Symbiosum</i> , y <i>Parvimonas micra</i> en muestras de heces de sanos (controles), según PCR.	18



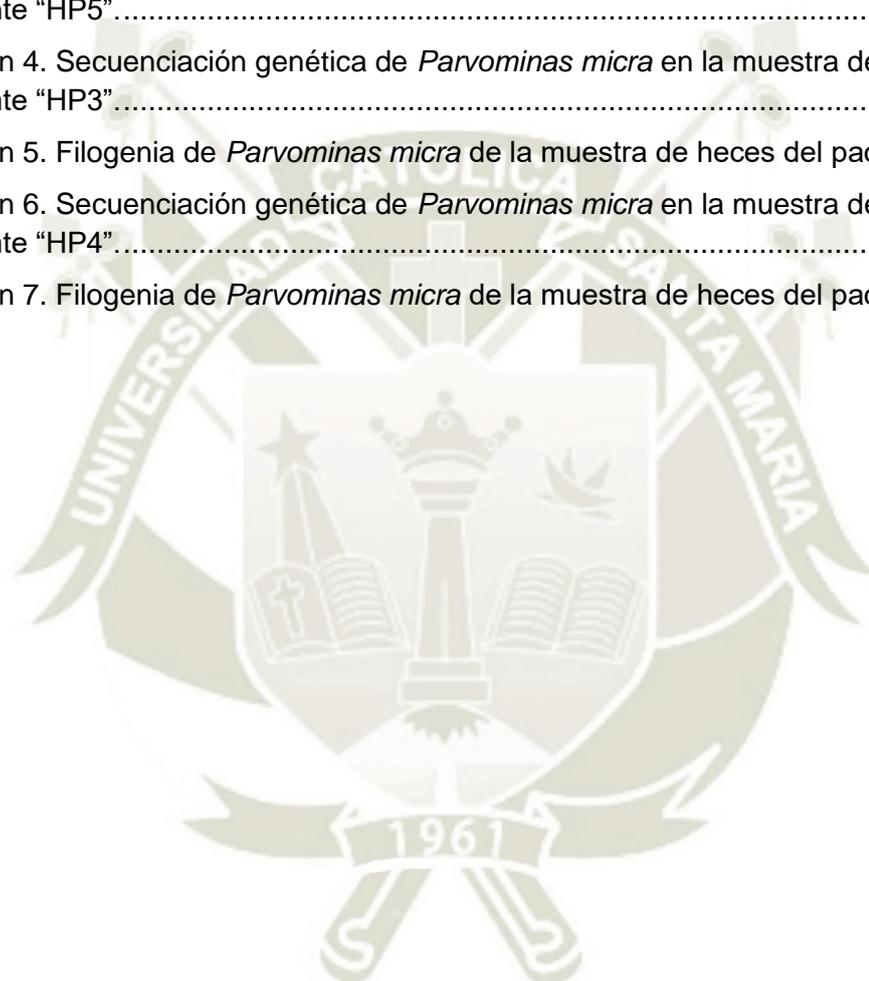
ÍNDICE DE GRÁFICOS

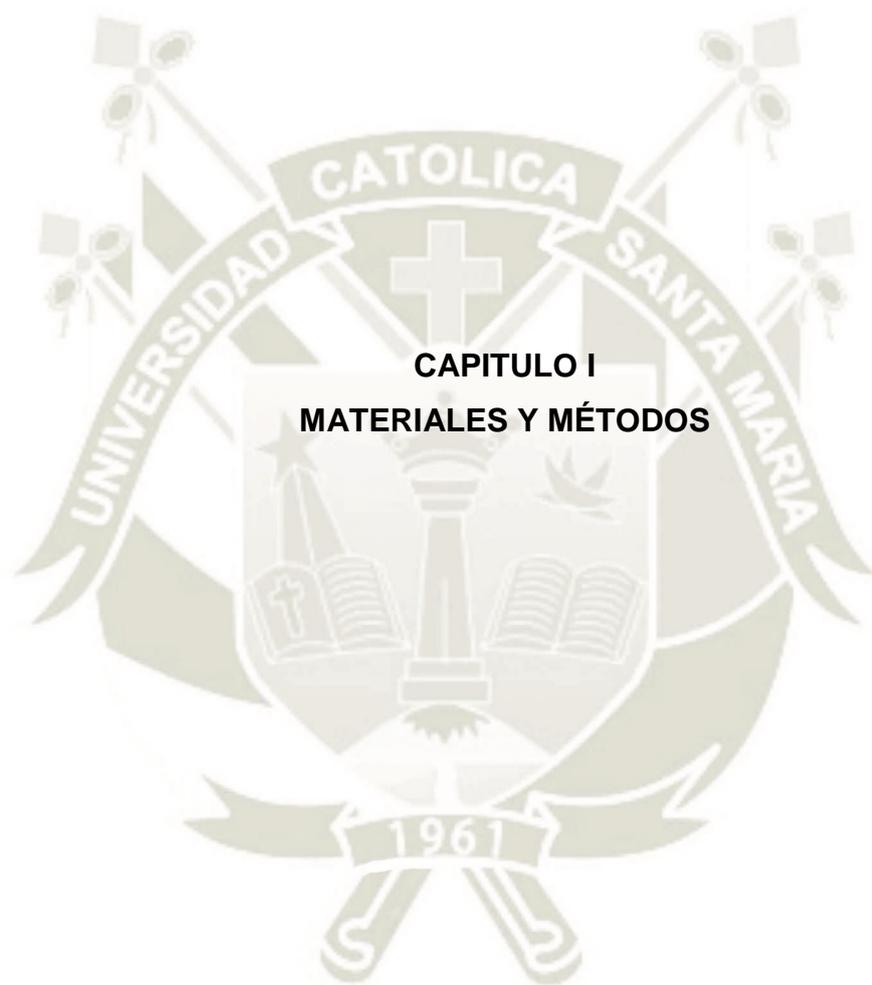
Gráfico 1: Casos de cáncer colorectal, según edad.	9
Grafico 2: Casos de cáncer colorectal, según el sexo.....	10
Gráfico 3: Casos de cáncer colorectal, según procedencia.....	11
Gráfico 4: Extracción de ADN en muestras de tacos de parafina de pacientes con cáncer colorectal.	13
Gráfico 5: Extracción de ADN en muestras de heces de pacientes con cancer colorectal y sujetos sanos.....	15
Gráfico 6: Presencia de <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Clostridium Symbosium</i> , y <i>Parvimonas micra</i> en muestras de heces de pacientes con cáncer colorectal.....	17
Gráfico 7: Presencia de <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Clostridium Symbosium</i> , y <i>Parvimonas micra</i> en muestras de heces de pacientes sanos.....	18



ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Secuenciación genética de <i>Clostridium Symbiosum</i> en la muestra de heces del paciente "HP1".....	19
Imagen 2. Secuenciación genética de <i>Clostridium Symbiosum</i> en la muestra de heces del paciente "HP5".....	20
Imagen 3. Secuenciación genética de <i>Parvominas micra</i> en la muestra de heces del paciente "HP5".....	20
Imagen 4. Secuenciación genética de <i>Parvominas micra</i> en la muestra de heces del paciente "HP3".....	21
Imagen 5. Filogenia de <i>Parvominas micra</i> de la muestra de heces del paciente "HP3". ..	21
Imagen 6. Secuenciación genética de <i>Parvominas micra</i> en la muestra de heces del paciente "HP4".....	22
Imagen 7. Filogenia de <i>Parvominas micra</i> de la muestra de heces del paciente "HP4". ..	22





1 Técnicas, instrumentos y materiales:

1.1 Técnicas.

Observación de Laboratorio

1.2 Instrumento

Ficha de Observación

1.3 Modelo de laboratorio

1.3.1 Extracción de ADN

Se utilizó el método fenol-cloroformo.

- i. Se colocaron las muestras en un tubo Eppendorff, Con una pipeta se tomó 500 ul de buffer TE. Se le agregó micro perlas, fue llevado a vórtex por 5 minutos.
- ii. El sobrenadante se pasó a un nuevo Eppendorf y se agregó 600 ul de Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Se agitó por inversión unos segundos. Se centrifugó por 5 minutos a 13 000 rpm, se obtuvieron 3 fases. Se retiró la fase superior a un nuevo tubo, se agregó 800 ul de isopropanol frio y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 13 000 rpm por 10 minutos. Se eliminó el isopropanol por decantación
- iii. Se agregó 500 ul de Etanol 75° y se centrifugó nuevamente a 13 000 rpm de 1 – 2 minutos. Se eliminó el Etanol y se dejó secar los tubos en un termoblock a 65° por unos minutos (tubos abiertos)
- iv. Se re suspendió el ADN en 100 ul de Agua ultra pura y se incubó en calor de 3 – 4 minutos y se congeló hasta su uso.
- v. Se rotuló cada tubo con la fecha y el código del paciente.

1.3.2 Secuenciación Molecular

Las muestras fueron amplificadas, purificadas y enviadas para la secuenciación automática al Laboratorio Functional Biosciences, Inc. En Wisconsin USA. Con los siguientes primers para la detección de *Fusobacterium Nucleatum*:

forward	5'-
CAACCATTACTTTAACTCTACCATGTTCA-3',	
reverse	5'-

GTTGACTTTACAGAAGGAGATTATGTAAAAATC-3', *Clostridium*
Symbiosum: forward 5'-GTGAGATGATGTGCCAGGC-3', reverse 5'-
TACCGGTTGCTTCGTTCGATT-3' y *Parvimonas Micra*: forward 5'-
GTCACTACGGAAGAATTTGTC-3', reverse:
5'GGCTTGAGCGATAATAACTTC-3'.

1.3.3 Análisis de secuencias:

Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron comparadas con las secuencias de la base de datos GenBank.

2 Campo de verificación.

- Ubicación espacial: La presente investigación se realizó en el laboratorio de biología molecular de la UCSM, a partir de muestras de material biológico excedente (heces) recolectadas del Hospital Goyeneche y muestras de tacos de parafina del laboratorio de anatomía patológica "Ortiz y Postigo".
- Ubicación temporal: El estudio se realizó entre los periodos comprendidos entre diciembre del 2019 a febrero del 2020.
- Unidades de estudio:
 - Universo: Muestras de material biológico excedente (heces) de pacientes con diagnóstico de cáncer colorectal y muestras de tacos de parafina de pacientes con diagnóstico de cáncer colorectal.
 - Población y muestras:
 - a) 15 muestras patológicas de tacos de parafina de pacientes diagnosticados con cáncer colorectal.
 - b) 15 muestras normales de tacos de parafina de pacientes diagnosticados con cáncer colorectal.
 - c) 5 muestras de heces de pacientes con diagnóstico de cáncer de colorectal
 - d) 4 muestras de heces de pacientes sanos.

3 Criterios de selección:

3.1 Criterios de exclusión

- o Consumo de antibióticos en los últimos 3 meses
- o Almacenamiento de tacos de parafina por más de 2 años
- o Muestra insuficiente
- o Tipo Histológico asociado a heredabilidad como síndrome de Lynch, síndrome de poliposis adenomatosa familiar.
- o Antecedente de cáncer de otra localización y carcinomatosis.

4 Estrategia de recolección de datos:

4.1 Organización

Se realizó las coordinaciones con la Dirección del Hospital Goyeneche, y el laboratorio de anatomía patológica "Ortiz y Postigo" para la realización del estudio.

Para las muestras de tacos de parafina: Se buscó en el registro digital del laboratorio de anatomía patológica "Ortiz y Postigo" con los siguientes *keywords:* "cáncer de colon" "adenocarcinoma" "colon" "cáncer de recto" "recto", se tomaron los datos de interés en una ficha de recolección de datos (Anexo 1), se verificó el cumplimiento de los criterios de selección, y se realizó una revisión microscópica de las láminas procedentes de los tacos de parafina, se marcaron las zonas patológicas (con cáncer) y las zonas normales (sin cáncer), se procesaron de forma inmediata en el laboratorio de biología molecular de la Universidad Católica Santa María.

Para las muestras de heces: Se buscó en el registro de altas del servicio a todos los casos con diagnóstico de cáncer colorectal. Se tomaron datos de nombre o número de historia clínica, se solicitó el permiso para la revisión de las historias clínicas con el fin de recoger las variables de interés en una ficha de recolección de datos (Anexo 1) entre los casos que cumplieron los criterios de selección, se contactó a los pacientes, se les informó sobre el presente proyecto y posteriormente se les solicitó la firma del consentimiento informado (Anexo 2) para su participación en el mismo.

Se procedió a la toma de muestra de excedente biológico (heces) y se procesó de forma inmediata en los laboratorios de biología molecular de la Universidad Católica Santa María.

4.2 Recursos:

4.2.1 Humanos:

Investigador, asesor.

4.2.2 Materiales:

- Material e infraestructura del laboratorio de Biología Molecular UCSM:
 - Micropipetas (4 Juegos de 3 c/u)
 - Vortex
 - Medios de Cultivo
 - Factores de crecimiento
 - Análisis de secuencias
- Fichas de recolección de datos.
- Material de escritorio
- Computadora personal
- Programa estadístico.
- Impresora.

4.2.3 Financieros:

El estudio fue financiado por la Universidad Católica de Santa María, a través del fondo para la investigación del Vicerrectorado de investigación

- Proyecto: CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA HUMANO BACTERIANO GASTROINTESTINAL Y SU ASOCIACION CON EL CANCER GASTRICO Y COLORECTAL: UN ESTUDIO BASADO EN LA TECNOLOGIA DE “NEXT GENERATION SEQUENCE”

4.3 Criterios para manejo de resultados:

a) Plan de Procesamiento

Los datos registrados en el Anexo 1 fueron codificados y tabulados para su análisis e interpretación.

b) Plan de Clasificación:

Se empleó una matriz de sistematización de datos donde se transcribió los datos recolectados. La matriz fue diseñada en una hoja de cálculo de Excel.

c) Plan de análisis

Los datos que se obtuvieron fueron analizados estadísticamente, para determinar la frecuencia en porcentaje de los casos recolectados.





**CAPITULO II
RESULTADOS**

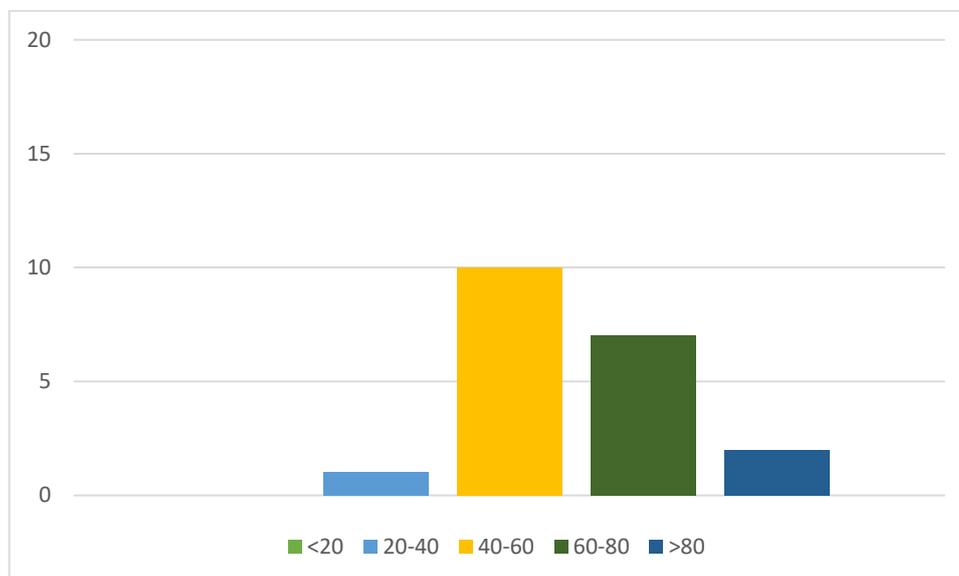
Tabla 1.
Casos de cáncer colorectal, según edad.

EDAD (AÑOS)	N	%
< 20	0	0%
20-40	1	5%
40-60	10	50%
60-80	7	35%
> 80	2	10%
TOTAL	20	100%

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 1 se observa el número de casos confirmados de cáncer colorectal por anatomía patológica, según la edad. El mayor número de casos se evidenció en el rango de edad de 40 a 60 años, mientras que el menor número de casos se muestra en los menores de 40 años.

Gráfico 1:
Casos de cáncer colorectal, según edad.



Fuente: Elaboración propia

En el gráfico 1 se evidencia el número de casos de cáncer colorectal, según la edad. El grupo etario predominante corresponde al rango de 40 a 80 años, con 17 casos en total.

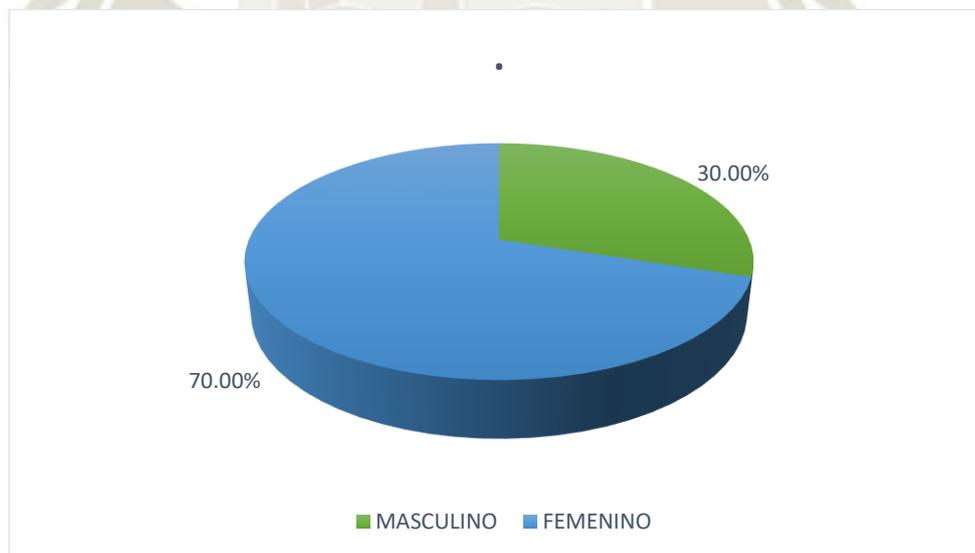
Tabla 2.
Casos de cáncer colorectal, según el sexo.

SEXO	N	%
MASCULINO	6	30.00%
FEMENINO	14	70.00%
TOTAL	20	100.00%

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 2 se observa los casos de cáncer colorectal, según el sexo. Se evidencia un mayor número de casos en pacientes de sexo femenino.

Gráfico 2:
Casos de cáncer colorectal, según el sexo



Fuente: Elaboración propia

El Gráfico 2 muestra el menor porcentaje (30%) que representan los pacientes de sexo masculino con el diagnóstico de cáncer colorectal.

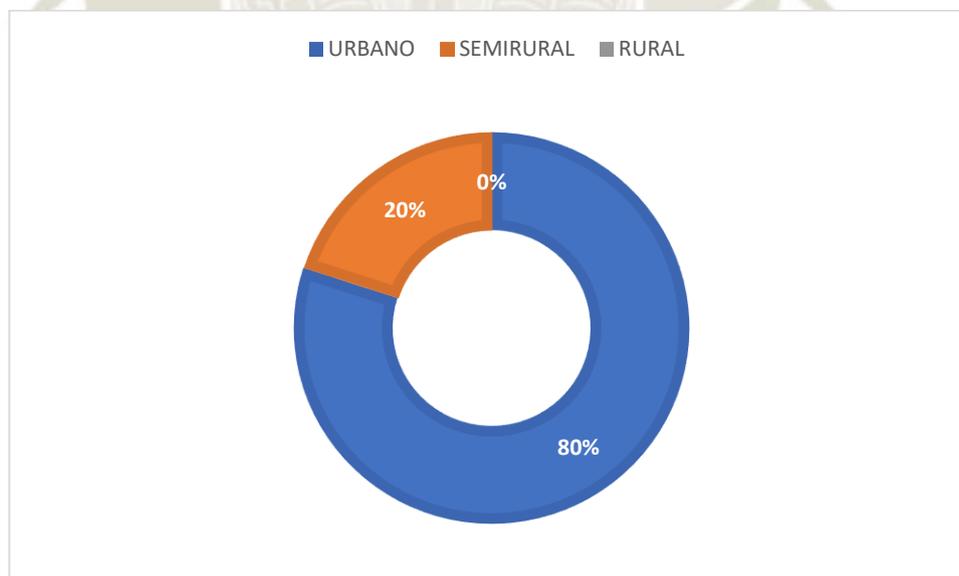
Tabla 3.
Casos de cáncer colorectal, según procedencia.

PROCEDENCIA	N	%
URBANO	16	80%
SEMIRURAL	4	20%
RURAL	0	0%
TOTAL	20	100%

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 3 se evidencia que el mayor número de casos de cáncer colorectal, tienen como procedencia una zona urbana, y ninguno de una zona rural.

Gráfico 3:
Casos de cáncer colorectal, según procedencia.



Fuente: Elaboración propia

El Gráfico 3 muestra los casos de cáncer colorectal, según la procedencia, donde el mayor porcentaje (80%) proceden de una zona urbana, un 20% de una zona semirural, y ninguno de una zona rural.

Tabla 4.

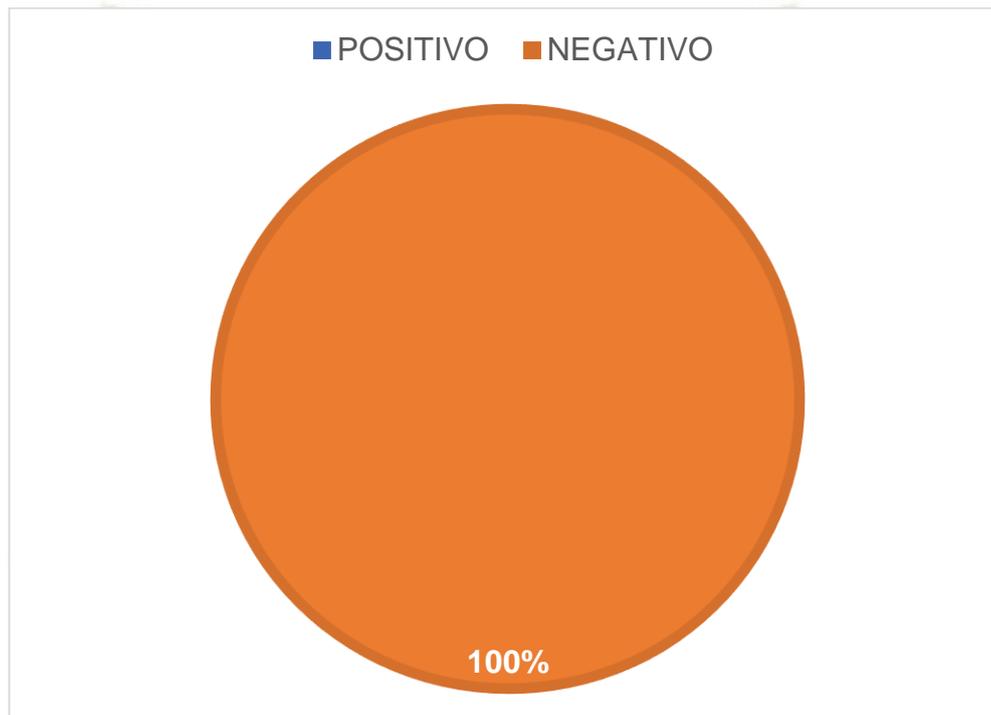
Extracción de ADN en muestras de tacos de parafina patológicas (PP) y normales (PN) en pacientes con cáncer colorectal.

CODIGO	TIPO DE MUESTRA	EXTRACCIÓN DE ADN
PP1	Taco de parafina	Negativo
PP2	Taco de parafina	Negativo
PP3	Taco de parafina	Negativo
PP4	Taco de parafina	Negativo
PP5	Taco de parafina	Negativo
PP6	Taco de parafina	Negativo
PP7	Taco de parafina	Negativo
PP8	Taco de parafina	Negativo
PP9	Taco de parafina	Negativo
PP10	Taco de parafina	Negativo
PP11	Taco de parafina	Negativo
PP12	Taco de parafina	Negativo
PP13	Taco de parafina	Negativo
PP14	Taco de parafina	Negativo
PP15	Taco de parafina	Negativo
PN1	Taco de parafina	Negativo
PN2	Taco de parafina	Negativo
PN3	Taco de parafina	Negativo
PN4	Taco de parafina	Negativo
PN5	Taco de parafina	Negativo
PN6	Taco de parafina	Negativo
PN7	Taco de parafina	Negativo
PN8	Taco de parafina	Negativo
PN9	Taco de parafina	Negativo
PN10	Taco de parafina	Negativo
PN11	Taco de parafina	Negativo
PN12	Taco de parafina	Negativo
PN13	Taco de parafina	Negativo
PN14	Taco de parafina	Negativo
PN15	Taco de parafina	Negativo

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 4 se muestra los resultados de la extracción de ADN en muestras las muestras de tacos de parafina, donde se evidencia que independientemente de si la zona contenía o no cáncer colorectal, la totalidad de las muestras no contenían ADN.

Gráfico 4:
**Extracción de ADN en muestras de tacos de parafina de pacientes con
cáncer colorectal.**



Fuente: Elaboración propia

En el gráfico 4 se evidencia que el 100% de las muestras de parafina, no contenían ADN, al momento de realizar la extracción de la misma.

Tabla 5.

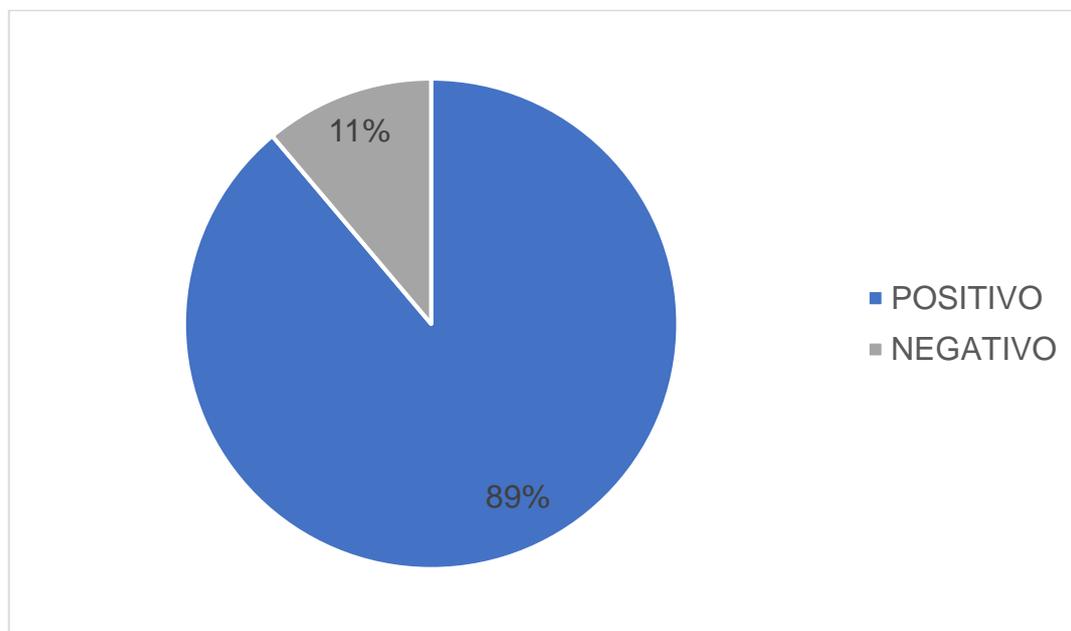
Extracción de ADN en muestras de heces de paciente con cáncer colorectal (HP) y de pacientes sanos (controles) (HS).

CODIGO	TIPO DE MUESTRA	EXTRACCIÓN DE ADN
HP1	Heces	Positivo
HP2	Heces	Negativo
HP3	Heces	Positivo
HP4	Heces	Positivo
HP5	Heces	Positivo
HS1	Heces	Positivo
HS2	Heces	Positivo
HS3	Heces	Positivo
HS4	Heces	Positivo

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 5 se evidencia la extracción de ADN en muestras de heces donde solo una de ellas no contenía material genético al momento de la extracción.

Gráfico 5:
**Extracción de ADN en muestras de heces de pacientes con cancer
colorectal y sujetos sanos**



Fuente: Elaboración propia

En el gráfico 5 se evidencia que el 89% de las muestras de heces contaron con ADN al momento de la extracción, mientras que el 11% de las mismas, no.

Tabla 6.

Presencia de *Fusobacterium nucleatum*, *Clostridium Symbiosum*, y *Parvimonas micra* en muestras de heces de pacientes con cáncer colorectal (casos), según PCR.

MUESTRA	FUSOBACATERIUM NUCLEATUM	CLOSTRIDIUM SYMBIOSUM	PARVOMINAS MICRA
HP1	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
HP3	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
HP4	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
HP5	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 6 se muestran los resultados de la presencia de *Fusobacterium nucleatum*, *Clostridium Symbiosum*, y *Parvimonas micra* en muestras de heces de pacientes con cáncer colorectal (casos), por PCR; donde se evidencia que *Fusobacterium Nucleatum* fue positivo en las 4 muestras analizadas, *Clostridium Symbiosum* en dos de las muestras, y *Parvimonas Micra* en tres de las cuatro muestras.

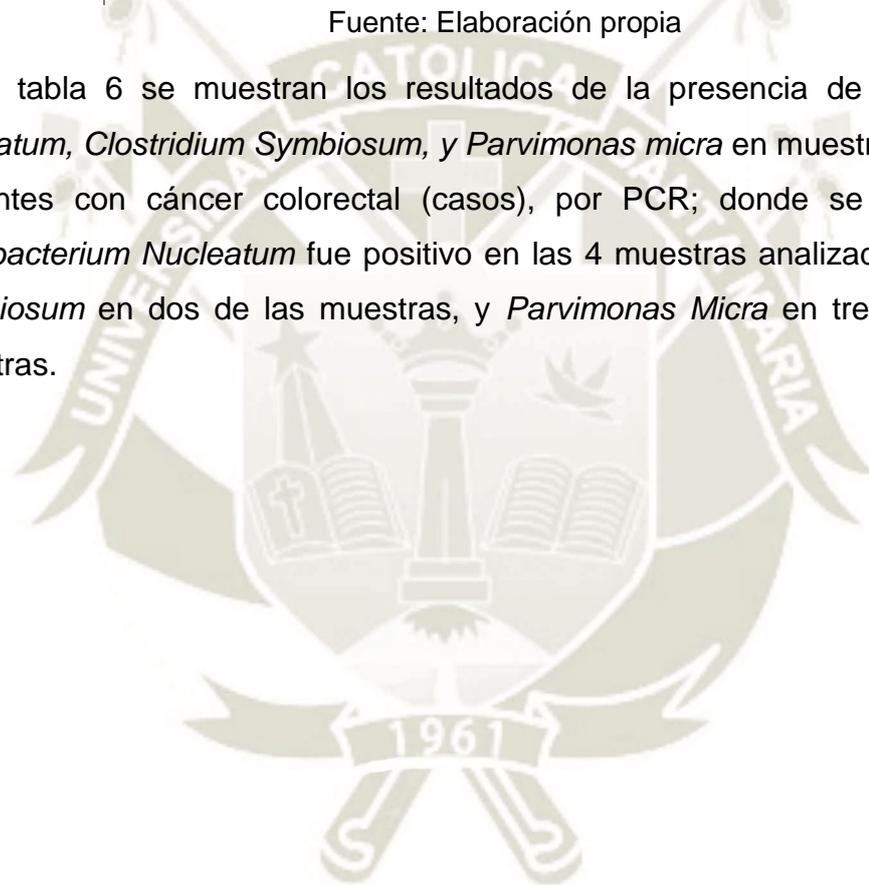
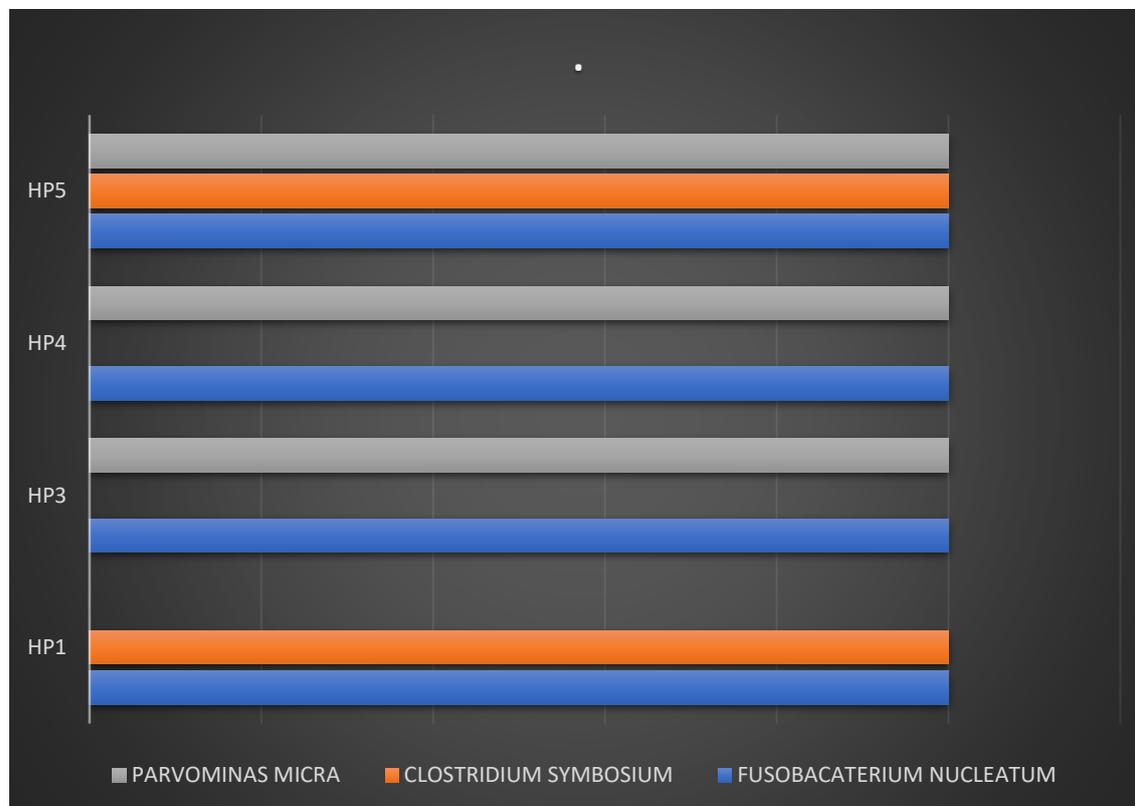


Gráfico 6:
Presencia de *Fusobacterium nucleatum*, *Clostridium Symbosium*, y *Parvimonas micra* en muestras de heces de pacientes con cáncer colorectal



Fuente: Elaboración propia

En el gráfico 6 se evidencia la presencia de las bacterias estudiadas *Fusobacterium nucleatum*, *Clostridium Symbosium*, y *Parvimonas micra*, en cada una de las muestras de pacientes con cáncer colorectal, se evidencia que el paciente “HP5” dio positivo para las tres bacterias estudiadas, el paciente “HP3” y “HP4” para *Fusobacterium Nucleatum* y *Parvimonas micra*, el paciente “HP1” dio positivo para *Clostridium Symbosium*, y *Parvimonas micra*.

Tabla 7.

Presencia de *Fusobacterium nucleatum*, *Clostridium Symbiosum*, y *Parvimonas micra* en muestras de heces de sanos (controles), según PCR.

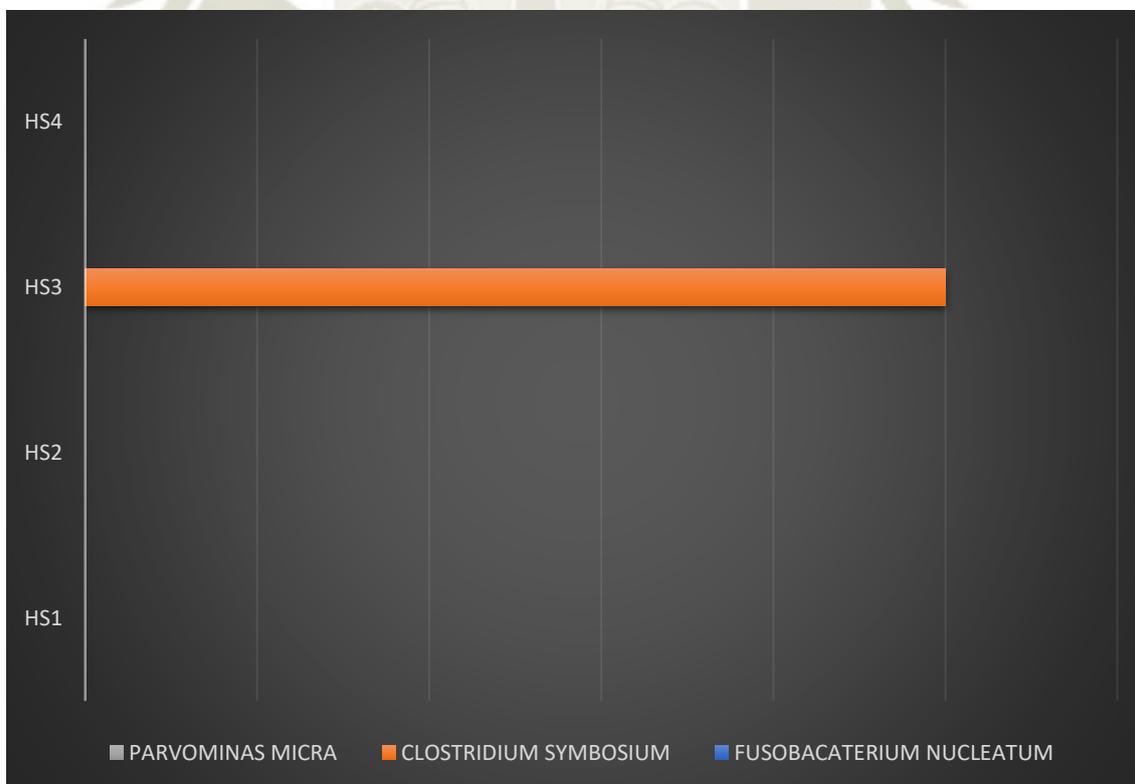
MUESTRA	FUSOBACATERIUM NUCLEATUM	CLOSTRIDIUM SYMBOSIUM	PARVOMINAS MICRA
HS1	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
HS2	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
HS3	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
HS4	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 7 se evidencia la presencia de *Fusobacterium nucleatum*, *Clostridium Symbiosum*, y *Parvimonas micra* en muestras de heces de pacientes sanos (controles), por PCR, donde solo hubo un resultado positivo en la muestra del paciente "HS3" para *Clostridium Symbiosum*.

Gráfico 7:

Presencia de *Fusobacterium nucleatum*, *Clostridium Symbiosum*, y *Parvimonas micra* en muestras de heces de pacientes sanos.



Fuente: Elaboración propia

En el gráfico 7 se muestran los resultados de la presencia de *Fusobacterium nucleatum*, *Clostridium Symbiosum*, y *Parvimonas micra* en muestras de heces de pacientes sanos (controles), por PCR, el paciente “HS3” dio positivo para *Clostridium Symbiosum*, únicamente, el resto de pacientes sanos obtuvieron resultados negativos.

Imagen 1.

Secuenciación genética de *Clostridium Symbiosum* en la muestra de heces del paciente “HP1”.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
265 bits(143)	4e-67()	143/143(100%)	0/143(0%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 1	CCCCGTATCAGTCTGGCTTATGCAGCCGGTGTGCGTGTATCACGCAAATATGATGCTGAAA				60
Sbjct 1503	CCCCGTATCAGTCTGGCTTATGCAGCCGGTGTGCGTGTATCACGCAAATATGATGCTGAAA				1562
Query 61	CCGGTGAATACATCATCGATCCTGCTACAGGCAAACCGTTAAAAGACGCAGAAGGCAATG				120
Sbjct 1563	CCGGTGAATACATCATCGATCCTGCTACAGGCAAACCGTTAAAAGACGCAGAAGGCAATG				1622
Query 121	TGGTAATCGACGAAGCAACCGGT				143
Sbjct 1623	TGGTAATCGACGAAGCAACCGGT				1645

Fuente: Elaboración propia

En la imagen 1 se muestra la secuenciación genética de *Clostridium Symbiosum* de la muestra de heces del paciente “HP1”, donde se evidencia un 100% de identidad. Se anexa la secuenciación completa (Anexo 3.1.)

Imagen 2.

Secuenciación genética de *Clostridium Symbiosum* en la muestra de heces del paciente “HP5”.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
274 bits(148)	8e-70()	152/154(99%)	0/154(0%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 1	TCTGCGGATATGCCCGTATCAGCCTGGCTTATGCAGCCGGTGTGCGTGTATCACGTAAAT				60
Sbjct 1491	TCTGCGGATATGCCCGTATCAGTCTGGCTTATGCAGCCGGTGTGCGTGTATCACGCAAAAT				1550
Query 61	ATGATGCTGAAACCGGTGAATACATCATCGATCCTGCTACAGGCAAACCGTTAAAAGACG				120
Sbjct 1551	ATGATGCTGAAACCGGTGAATACATCATCGATCCTGCTACAGGCAAACCGTTAAAAGACG				1610
Query 121	CAGAAGGCAATGTGGTAATCGACGAAGCAACCGG		154		
Sbjct 1611	CAGAAGGCAATGTGGTAATCGACGAAGCAACCGG		1644		

Fuente: Elaboración propia

En la imagen 2 se muestra la secuenciación genética de *Clostridium Symbiosum* de la muestra de heces del paciente “HP5”, donde se evidencia un 99% de identidad. Se anexa la secuenciación completa (Anexo 3.2.)

Imagen 3.

Secuenciación genética de *Parvominas micra* en la muestra de heces del paciente “HP5”.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
267 bits(144)	1e-67()	147/148(99%)	1/148(0%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 1	GGTCTTATTACTTCTCTTAC-ACCTTATGCAAGAGTTGATCAATATGGATTTATTGAAACA				59
Sbjct 1116817	GGTCTTATTACTTCTCTTACAACCTTATGCAAGAGTTGATCAATATGGATTTATTGAAACA				1116876
Query 60	CCATATCGTGTGTAAATAATGGAAATGCTACAAAGGACATTGTTTATTTAACTGCTGAT				119
Sbjct 1116877	CCATATCGTGTGTAAATAATGGAAATGCTACAAAGGACATTGTTTATTTAACTGCTGAT				1116936
Query 120	GAAGAAGATGAAGTTATTATCGCTCAAG		147		
Sbjct 1116937	GAAGAAGATGAAGTTATTATCGCTCAAG		1116964		

Fuente: Elaboración propia

En la imagen 3 se muestra la secuenciación genética de *Parvominas micra* de la muestra de heces del paciente “HP5”, donde se evidencia un 99% de identidad. Se anexa la secuenciación completa (Anexo 3.3.)

Imagen 4.

Secuenciación genética de *Parvominas micra* en la muestra de heces del paciente “HP3”.

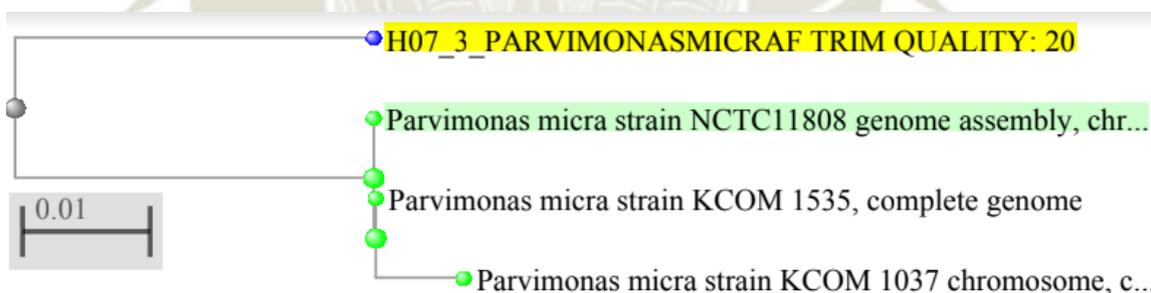
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
224 bits(121)	8e-55()	140/149(94%)	1/149(0%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 1		CGGTC TTATTACTTCTCTTAC -ACTTATGCAAGAGTTGACGAATATGGATTTATAGAAAC			59
Sbjct 1116816		CGGTC TTATTACTTCTCTTACAAC TTATGCAAGAGTTGATCAATATGGATTTATTGAAAC			1116875
Query 60		TCCATATCGTGTGTA AATGACGGAA TTGCTACAAAGGATTTGTTTATTTAACTGCAGA			119
Sbjct 1116876		ACCATATCGTGTGTA AATAATGGAA TTGCTACAAAGGACATTGTTTATTTAACTGCTGA			1116935
Query 120		TGAAGAAGATGAAGTTATTATCGCTCAAG	148		
Sbjct 1116936		TGAAGAAGATGAAGTTATTATCGCTCAAG	1116964		

Fuente: Elaboración propia

En la imagen 4 se muestra la secuenciación genética de *Parvominas micra* de la muestra de heces del paciente “HP3”, donde se evidencia un 94% de identidad. Se anexa la secuenciación completa (Anexo 3.4.)

Imagen 5.

Filogenia de *Parvominas micra* de la muestra de heces del paciente “HP3”.



Fuente: Elaboración propia

En la imagen 5 se muestra la filogenia de *Parvominas micra* de la muestra de heces del paciente “HP3”, donde se evidencia que difiere en más de 1 % de las especies registradas en Genbank, por lo que sería una nueva especie.

Imagen 6.

Secuenciación genética de *Parvominas micra* en la muestra de heces del paciente “HP4”.

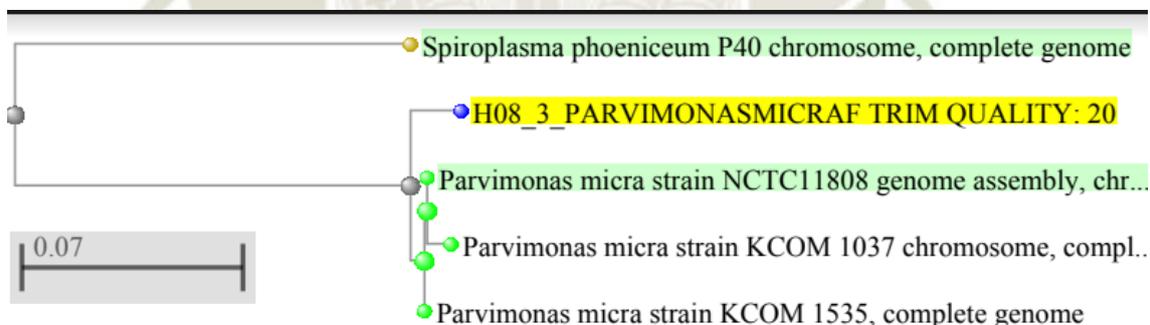
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
259 bits(140)	2e-65()	146/149(98%)	0/149(0%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 1	CGGTCTAATTACTTCTCTAACAACTTATGCAAGAGTTGATCAATATGGATTATTGAAAC				60
Sbjct 1116816	CGGTCTTATTACTTCTCTTACAAC TTATGCAAGAGTTGATCAATATGGATTATTGAAAC				1116875
Query 61	ACCATATCGTGTGTAATAATGGAATTGCTACAAAGAACATTGTTTATTTAACTGCTGA				120
Sbjct 1116876	ACCATATCGTGTGTAATAATGGAATTGCTACAAAGGACATTGTTTATTTAACTGCTGA				1116935
Query 121	TGAAGAAGATGAAGTTATTATCGCTCAAG		149		
Sbjct 1116936	TGAAGAAGATGAAGTTATTATCGCTCAAG		1116964		

Fuente: Elaboración propia

En la imagen 6 se muestra la secuenciación genética de *Parvominas micra* de la muestra de heces del paciente “HP4”, donde se evidencia un 98% de identidad. Se anexa la secuenciación completa (Anexo 3.5.)

Imagen 7.

Filogenia de *Parvominas micra* de la muestra de heces del paciente “HP4”.



Fuente: Elaboración propia

En la imagen 5 se muestra la filogenia de *Parvominas micra* de la muestra de heces del paciente “HP4”, donde se evidencia que difiere en más de 1 % de las especies registradas en Genbank, por lo que sería una nueva especie.



**CAPITULO III
DISCUSIÓN**

El presente estudio de investigación se realizó debido al incremento en la incidencia y prevalencia de cáncer colorectal a nivel mundial, además del creciente número de publicaciones respecto a la relación de la microbiota y distintas enfermedades, en su etiología, fisiopatología, diagnóstico, e incluso el pronóstico de la enfermedad.

El principal objetivo de la investigación fue demostrar la presencia de bacterias que han sido relacionadas con la carcinogénesis del cáncer colorectal (10), y recientemente propuestas como biomarcadores tempranos de la enfermedad: *Fusobacterium Nucleatum*, *Clostridium Symbiosum* *Parvimonas Micra* (11).

En la tabla y gráfico 1 se evidencia el número de casos confirmados de cáncer colorectal por anatomía patológica, según la edad. El grupo etario con mayor número de casos comprendió desde los 40 a 80 años, representando el 85% del total de casos del presente estudio, y el grupo etario menos representativo fueron los pacientes menores de 20 años, no encontrándose ninguno. En la tabla y gráfico 2, se muestra la relación del cáncer colorectal y el sexo, siendo el sexo femenino el de mayor porcentaje, 70%, y el masculino, el restante. La GLOBALCAN (El observatorio global del cáncer) se encuentra desarrollada por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC), que forma parte de la Organización Mundial de la salud (OMS), reporta al 2018 que el cáncer colorectal es el tercer cáncer en términos de incidencia a nivel mundial, superado por mama (segundo) y pulmón; en Perú, el quinto, siendo superado por el cáncer de cérvix (cuarto) estómago, mama y próstata (1). Los datos publicados por esta institución no proporcionan información con respecto al cáncer colorectal por grupo etario. La epidemiología de nuestro medio es proporcionada oficialmente por el Ministerio de Salud (MINSA) a través del Análisis de la situación del cáncer en el Perú (ASIS), la OMS reportó en diciembre del 2019, la presentación de los documentos técnicos "ASIS, 2017" al centro nacional de epidemiología, prevención y control de enfermedades (CDC), sin embargo estos datos aún no fueron publicados (12). La última versión del ASIS es la del 2013, donde se describe que el cáncer de colon es el octavo cáncer durante el periodo 2006 a 2011, en incidencia, sin contar tampoco con datos de incidencia específica por grupo etario (13).

Los datos de Resultados finales, de epidemiología, y supervivencia (SEER) de los Estados Unidos, sugieren que la incidencia en el grupo menor de 50 años está en aumento, en un ratio de 2% por año desde 1992 al 2013 (14). Aunque esta

permanece siendo mucho menor el grupo de mayores de 50 años (15). Dato que coincide con los resultados de nuestro estudio.

El gráfico y tabla 3, muestra la procedencia de los pacientes diagnosticados con cáncer colorectal, habiéndose formado subgrupos, tales como zona urbana, zona semirural y zona rural; según la definición censal del INEI. El 80% de pacientes provino de una zona urbana, el 20% de una zona semirural y ninguno de alguna zona rural. No existen bases de datos donde se correlacione la procedencia y el cáncer colorectal, tampoco es considerado un factor de riesgo; sin embargo, existen factores de riesgo tales como el sedentarismo, la obesidad y el estilo de vida, así como el consumo de tabaco y alcohol; siendo estos no específicos de la zona urbana, pero si característicos de ese estilo de vida (1,2).

El gráfico y tabla 4 evidencia los resultados de la extracción de ADN en muestras de tacos de parafina, donde en el 100% de muestras no se pudo extraer ADN. Las muestras de tacos de parafina, constituirían un importante banco de muestras para el análisis molecular genético, ya sean de mutaciones o en este caso, identificación de bacterias. El procesamiento de los tacos de parafina en este estudio se realizó según el protocolo propio del laboratorio particular, que sería el mismo utilizado en los laboratorios de patología de los distintos hospitales de nuestra ciudad, durante años; que involucra de manera general, una vez recibida la muestra, se comprueba el aspecto macroscópico y el envase y el método de preservación usado, se realiza la fijación con formalina neutra al 10% y posteriormente a la inclusión con parafina para la formación del taco de parafina. Es de vital importancia considerar que además del procesamiento per se de los tacos de parafina, el reclutamiento de las muestras y su almacenamiento hasta el procesamiento, carece de cualquier tipo de protocolo, siendo el método más usado, la conservación con formol, alcohol, o suero salino a concentraciones indiscriminadas, pudiendo esta afectar y dañar la calidad del ADN de la muestra, según Douglas en 1998 (16).

Lamentablemente para este estudio, no se contó con el registro del método de conservación en el que fueron trasladadas las muestras desde el centro quirúrgico al laboratorio de patología, la recomendación actual de la sociedad de anatomía patológica de España, desde el año 2011, indica que el método de preservación debe ser idealmente formol buffer o neutro al 10% dentro de la primera hora de la extracción de la muestra quirúrgica, y en caso de que no se cuente con ello,

mantener la muestra a una temperatura de 4°C por un tiempo menor de una hora, y coordinar con el laboratorio de anatomía patológica (17).

Minho Cho et al. argumenta que resulta necesario establecer recomendaciones o guías para el manejo de muestras de tejidos para el posterior análisis de secuenciación genética, resalta la importancia de la calidad del ADN que afectaría la calidad de la secuenciación y el resultado final; se menciona que para los estudios de secuenciación serían mejor las muestras en fresco que los tacos de parafina (FFPE), sin embargo, estas últimas resultan más accesibles (18).

Mc Donough en abril del 2019, realiza una revisión de los métodos de extracción de ADN en la secuenciación de ADN derivado de muestras de tacos de parafina (FFPE), donde se evaluaron nueve métodos distintos de extracción de ADN a partir de FFPE en veinte muestras, incluyendo protocolos manuales y automáticos, donde el método King Fisher FFPE fue el aportó mayor cobertura molecular. Los cinco protocolos automatizados ofrecieron mayor facilidad de uso, con TKM-A es el protocolo más completamente automatizado con la menor cantidad de pasos iniciales de preparación de muestras manuales, mientras que los protocolos “mecánicos” tuvieron pobres resultados en cuanto a calidad de ADN. En el presente estudio, la extracción de ADN fue de forma manual, y esto debido a la disponibilidad y costo alto de los kits de extracción automática y manual de ADN.

En la tabla y grafico 5 se evidencia que el 89% de muestras de heces, pudo extraer ADN de forma adecuada, mientras que el 11%, representado por una muestra, no se obtuvo material genético. Uno de los estudios mas grandes publicados fue el de Shina. et al en el 2016 donde se estudió la microbiota fecal, el metaboloma fecal y su interrelación con el cáncer colorectal; se utilizaron 69 muestras de heces de pacientes con cáncer colorectal recientemente diagnostico o en tratamiento, sólo 48 muestras de heces fueron viables en los casos y 102 en los controles en la extracción de ADN, a partir de e PowerSoil-htp 96 Well Soil DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories) usando el EPMotion 5075 pipetting system; y de estos sólo 42 casos y 89 controles podían ser analizados para información metabolómica y de la microbiota (19).

Eklöf et al. en el 2017, publicaron un estudio de casos y controles, titulado: “Marcadores microbianos fecales asociados al cáncer en la detección del cáncer

colorectal” donde invitaron a 2660 sujetos de estudio, quienes iban a ser sometidos a una colonoscopia para el descarte del cáncer colorectal, pidiéndoles recolectar una muestra de heces, antes del proceso de limpieza y preparación para dicho procedimiento, excluyendo a aquellos que no cumplieron con los criterios de selección e inclusión; cabe resaltar que se tomó en cuenta los diagnósticos anatómicos posteriores, incluyéndose solo a aquellos con diagnóstico de cáncer colorectal y displasia, siendo 39 casos de cáncer colorectal y 135 de displasia, los controles fueron 66; donde la totalidad de ellos pudieron extraer ADN, a partir de kits de extracción automáticos (QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen)) (20).

La tabla y gráfico 6 muestran los resultados de la presencia de *Fusobacterium nucleatum*, *Clostridium Symbiosum*, y *Parvimonas micra* en muestras de heces de pacientes con cáncer colorectal (casos), según PCR; donde el paciente “HP1” dio positivo para *Fusobacterium nucleatum* y *Clostridium Symbiosum*, los pacientes “HP3” y “HP4” dieron positivo para *Fusobacterium nucleatum* y *Parvomonas micra*, el paciente “HP5”, positivo para *Fusobacterium nucleatum*, *Clostridium Symbiosum*, y *Parvomonas micra*. Esto demostraría la presencia del *Fusobacterium Nucleatum* en el 100% de pacientes diagnosticados con cancer colorectal, de *Clostridium Symbiosum* en el 50% de pacientes diagnosticados con cancer colroectal, y de *Parvomonas Micra* en el 75% de pacientes diagnosticados con cáncer colorectal. Estos resultados corresponden a una muestra de 4 pacientes (casos), la mayoría de estudios publicados son de entre 50 a 100 participantes; sin embargo, Wong et al. en el 2019 demostró la presencia de *Fusobacterium Nucleatum* y *Parvimonas Micra* en 127 casos y 195 controles, proponiéndolo como biomarcador para el diagnóstico temprano de cáncer colorectal, con una sensibilidad de 95%, superior a la técnica de inmunofluorescencia y siendo más económico (7). Liang et al. en el 2017 estudió a 203 casos y 236 controles, la presencia de 4 posibles biomarcadores (*F. nucleatum*, *Clostridium hathewayi*, *Bacteroides clarus* and an undefined species m7) obteniendo una sensibilidad de 89% (21). El estudio en esta línea de investigación con la menor muestra publicado al día de hoy fue el de Zackular en el 2014, donde estudió a 30 casos y 30 controles, a través de secuenciación 16S, a *Fusobacterium*, *Lachnospiraceae*, *Porphyromonas*, *Porphyromonadaceae*, *Bacteroides* and *Enterobacteriaceae* como biomarcadores con una sensibilidad de

80%, y plantear dicha batería como screening para el descarte de cáncer coloproctal en pacientes con adenomas (22).

La tabla y gráfico 7 muestran la presencia de *Fusobacterium nucleatum*, *Clostridium Symbiosum*, y *Parvimonas micra* en muestras de heces de sanos (controles), según PCR; donde el paciente “HS3” dio positivo para *Clostridium Symbiosum*, Xie et al. en el 2017 realizó un estudio de cohortes entre 327 casos y 242 controles, usando qPCR, demostró que el *Clostridium Symbiosum* podía predecir el diagnóstico temprano de cáncer colorectal, sin embargo, el uso de este conjuntamente con el antígeno carcino-embriionario (CEA) aumentaba la sensibilidad de la prueba en un 15% más, siendo esta la conclusión del estudio (23).

Las imágenes 1, 2, 3, 4 y 6 son los resultados de las secuenciaciones que se obtuvieron de la mayor calidad de ADN, siendo estas procesadas por Laboratorio Functional Biosciences, Inc. En Wisconsin USA.

Las imágenes 5 y 7 describen la filogenia obtenida, cuando se ingresó a la base de datos de GENBANK, donde podemos evidenciar la posibilidad del descubrimiento de nuevas especies de *Parvomonas Micra*, si bien es cierto, esto es en base a que la diferencia fue mayor del 1% en comparación a los datos de las especies del GENBANK, llamaría la atención ya que en la actualidad no se encuentra una base de datos metabólica de nuestro entorno.

Las principales limitaciones del presente trabajo recaen en el bajo número de muestras de sujetos de estudio, y esto debido a que en nuestro medio aun no se encuentran familiarizados con ser parte de proyectos de investigación, así mismo encontramos dificultades en la aceptación de este proyecto por parte de los hospitales estatales, siendo trabas netamente burocráticas. La escasez de protocolos de traslado, y conservación de muestras de piezas quirúrgicas, nos impidió trabajar con un número mayor de muestras, compuestas básicamente por los tacos de parafina, siendo estos un banco de oro de material genético a nivel mundial (24).

Otra de las limitaciones fue la disponibilidad de recursos, las muestras de ADN del presente estudio tuvieron que ser enviadas a Estados Unidos para su procesamiento, dado que en nuestra Facultad de Medicina no contamos con secuenciador.

Y, por último, la ausencia de proyectos de investigación y antecedentes investigativos de los temas relacionados con microbiota intestinal y secuenciación molecular en nuestro país, limitaron nuestros recursos bibliográficos y potenciales comparaciones de resultados.



CONCLUSIONES

- Primera:** Se demostró la presencia de *Fusobacterium Nucleatum* en el 100% de muestras de heces de pacientes con cáncer colorectal. Se demostró la presencia de *Clostridium Symbiosum* en el 50% de muestras de heces de pacientes con cáncer colorectal. Se evidenció la presencia de *Parvimonas Micra* en el 75% de muestras de heces de pacientes con cáncer colorectal.
- Segunda:** Se identificó la predominancia de *Fusobacterium Nucleatum* en todas las muestras de heces de pacientes con cáncer colorectal.
- Tercera:** La extracción de ADN fue nula en las muestras de tacos de parafina, por lo cual no se pudo identificar diferencias poblacionales en zonas de tejido con y sin cáncer colorectal.



RECOMENDACIONES

- Primera:** Se recomienda a la facultad de Medicina Humana de la Universidad Católica Santa María, a persistir en el desarrollo de trabajos de investigación de tipo experimental que fomenten el deseo de nuevos conocimientos y el desarrollo de nuevas teorías con utilidad clínica.
- Segunda:** Se recomienda a los laboratorios de patología privados y estatales, a protocolizar y capacitar a los miembros del equipo de trabajo, el procesamiento y mantenimiento de las muestras quirúrgicas o de biopsias, para su adecuada conservación tisular y de material genético.
- Tercera:** Se recomienda a los alumnos de facultad de Medicina Humana de la Universidad Católica Santa María, quienes estén interesados en la presente línea de investigación a tomar en cuenta el número de participantes del estudio, para que sus resultados puedan ser extrapolados a la práctica clínica.
- Cuarta:** Se recomienda continuar y ampliar el estudio de la microbiota y su relación con el cáncer colorectal, al ser una línea de investigación actual y con promisorias aplicaciones en la práctica clínica.

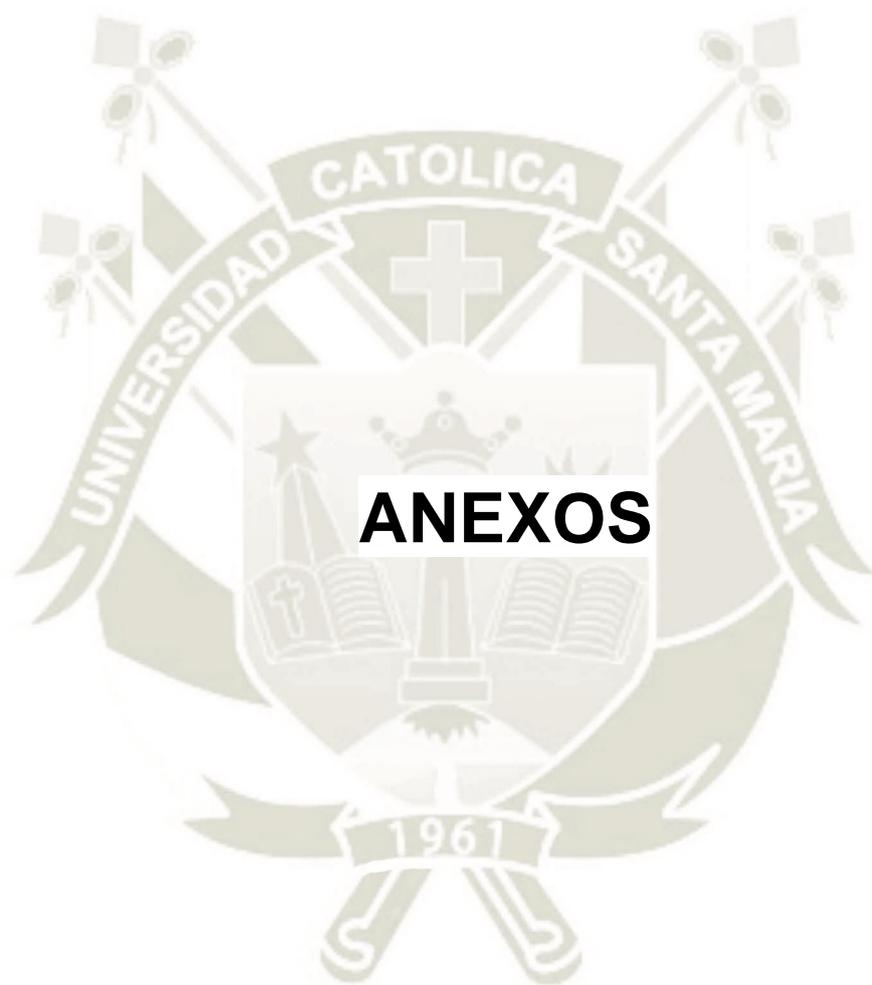
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sender, R., Fuchs, S., Milo, R., Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. 2016. PLoS Biol. 14
2. Bosch, T.C.G., McFall-Ngai, M.J., Metaorganisms as the new frontier. 2016 Zoology (Jena) 114, 185–190.
3. Onoue, M., Kado, S., Sakaitani, Y., Uchida, K. & Morotomi, M. Specific species of intestinal bacteria influence the induction of aberrant crypt foci by 1,2-dimethylhydrazine in rats. 1997. Cancer Lett. 113, 179–186.
4. Castellarin, M. et al. Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma. 2012. Genome Res. 22, 299–306.
5. Carethers, J.M., Jung, B.H., Genetics and genetic biomarkers in sporadic colorectal cancer. 2015. Gastroenterology 149, 1177–1190.
6. Zhujiang Dai, Jingqiu Zhang, Qi Wu , Juan Chen , Jun Liu, Lu Wang , Chaowu Chen , Jiaming Xu , Hongpeng Zhang , Chunfeng Shi , Zhen Li , Huiwen Fang , Chaobiao Lin , Dong Tang and Daorong Wang. The role of microbiota in the development of colorectal cancer 2019. Int. J. Cancer: 145, 2032–2041
7. Li, J., Jia, H., Cai, X., Zhong, H., Feng, Q., Sunagawa, S., Arumugam, M., Kultima, J.R., Prifti, E., Nielsen, T., Juncker, A.S., Manichanh, C., Chen, B., Zhang, W., Levenez, F., Wang, Juan, Xu, X., Xiao, L., Liang, S., Zhang, D., Zhang, Z., Chen, W., Zhao, H., Al-Aama, J.Y., Edris, S., Yang, H., Wang, Jian, Hansen, T., Nielsen, H.B., Brunak, S., Kristiansen, K., Guarner, F., Pedersen, O., Doré, J., Ehrlich, S.D., MetaHIT Consortium, Bork, P., Wang, Jun, MetaHIT Consortium, 2014. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. Nat. Biotechnol. 32, 834–841.
8. Human Microbiome Project Consortium, 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature 486, 207–214.
9. Wong, S. H. et al. Quantitation of faecal Fusobacterium improves faecal immunochemical test in detecting advanced colorectal neoplasia. 2017. Gut 66,1441–1448.
10. Análisis de la situación de la salud en el país mejorará la toma de decisiones en salud pública. 2019. OPS.

11. Perú, Ministerio de Salud. Análisis de la situación del cáncer en el Perú, 2013. Lima: Dirección General de Epidemiología, MINSA; 2013.
12. Meester RGS, Mannalithara A, Lansdorp-Vogelaar I, Ladabaum. Trends in Incidence and Stage at Diagnosis of Colorectal Cancer in Adults Aged 40 Through 49 Years, 1975-2015. U JAMA 2019. 321(19):1933.
13. Siegel RL, Fedewa SA, Anderson WF, Miller KD, Ma J, Rosenberg PS, Jemal A J Natl Colorectal Cancer Incidence Patterns in the United States, 1974-2013. 2017. Cancer Inst.;109(8)
14. Nguyen LH, Liu PH, Zheng X, Keum N, Zong X, Li X, Wu K, Fuchs CS, Ogino S, Ng K, Willett WC, Chan AT, Giovannucci EL, Cao Y Sedentary Behaviors, TV Viewing Time, and Risk of Young-Onset Colorectal Cancer. 2018. JNCI Cancer Spectr.;2(4): pky073. Epub 2019 Jan 25.
15. Moskal, A., et al. Main nutrient patterns and colorectal cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study. 2016. Br. J. Canc. 115, 1430–1440.
16. Douglas MP, Rogers SO. DNA damage caused by common cytological fixatives. 1998. Mutat Res; 401: 77-88.
17. “Reglas y consejos” sobre buenas prácticas profesionales en anatomía patológica sociedad española de anatomía patológica (seap), 2011.
18. Minho Cho Tissue recommendations for precision cancer therapy using next generation sequencing: a comprehensive single cancer center’s experiences. 2018. Oncotarget, 8 (26), 42478-42486
19. Sinha R, Ahn J, Sampson JN, Shi J, Yu G, Xiong X, et al. Fecal Microbiota, Fecal Metabolome, and Colorectal Cancer Interrelations. 2016. PLoS ONE 11(3): e0152126.
20. Eklöf, V., Löfgren-Burström, A., Zingmark, C., Edin, S., Larsson, P., Karling, P. Palmqvist, R. Cancer-associated fecal microbial markers in colorectal cancer detection. 2017. International Journal of Cancer, 141(12), 2528–2536.
21. Liang, Q. et al. Fecal bacteria act as novel biomarkers for noninvasive diagnosis of colorectal cancer. 2017. Clin Cancer Res. 23, 2061–2070.

22. Zackular, J. P., Rogers, M. A., Ruffin, M. Tt & Schloss, P. D. The human gut microbiome as a screening tool for colorectal cancer. 2014. *Cancer Prev. Res. (Phila)* 7, 1112–1121.
23. Xie, Y. H. et al. Fecal clostridium symbiosum for noninvasive detection of early and advanced colorectal cancer: test and validation studies. 2017. *EBioMedicine* 25, 32–40.
24. Do H, Dobrovic A. Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. 2015. *Clin Chem.*; 61(1):64–71.





ANEXO 1.

Matriz de datos para muestras de tacos de parafina de pacientes con cáncer colorectal.

Código	Nombre	Edad	Fecha	Muestra	Información clínica	Diagnóstico	Límite	Selección de tacos
1-ES70	Irigoy Arietiqui Salcedo	53	16/01/2020	Lesión elevada del recto (1) Lesión elevada de sigmoides (2)	Pólipo adenomatoso, D/C MM de sigmoides	1. Adenoma Tubular con displasia de bajo grado 2. Pólipo hipoplásico serrado	1,2	2
2-LIT3	Camello Chacabana Félix	56	3/01/2020	Pólipo de colon descendente		Pólipo hipoplásico serrado	1	1
3-LF09	Jana Cayunta de Calle	59	14/01/2019	Colectomía derecha radical		Adenocarcinoma tubular moderadamente diferenciado	1,2,3,4,5 (6)	4
4-LU02	Milton Talavera Soto	64	3/12/2019	Pólipo de colon transverso		Pólipo hipoplásico serrado	1	1
5-ES47	Carlos Tapia Chávez	40	4/01/2020	Lesión plana de colon transverso		Adenoma serrado con displasia de bajo grado	1	1
6-LK03	Patricia Rodríguez Ortiz	49	25/11/2019	Colon sigmoides	Tumoración que retrase serras, D/C MM de colon sigmoides	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	1	1
7-LK40	Edith Romero Yezarra	78	28/11/2019	Lesión plana de 2 mm	D/C Adenoma serrado	Adenoma serrado con displasia de bajo grado	1	1
8-ES66	Edgardo Aguilar Delgado	68	14/12/2018	Lesión colon ascendente	D/C Adenoma	Adenoma serrado con displasia de bajo grado	1	1
9-ES63	Lorena Peña Lavreano	57	6/02/2019	Tumoración de 1 mm en sigmoides	D/C MM de colon sigmoides	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	1	1
10-EL32	Rosa Delgado Valdina	64	22/12/2018		D/C MM de sigmoides	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	1	1
11-EL39	Grogorita Aquino Aime	64	22/12/2018	Lesión o.l.f. colon ascendente	D/C Adenoma	Adenoma serrado con displasia de bajo grado focal	1	1
12-LF24	Silvestra Ponce Ponce	84	14/01/2019	Pólipo de colon serras al ciego	Lesión elevada en colon ascendente	1. Adenocarcinoma intramucoso focal 2. Adenoma	1	1
13-LF73	Paul Morcotez Mariquez	84	14/01/2019	Lesión tumoral de colon sigmoides	D/C MM de colon sigmoides	Adenoma tubular con displasia de alto grado y focos de adenocarcinoma	1	1
14-EL25	Milena Gordillo Marinova	53	26/01/2019	Lesión o.l.f. recto	D/C Adenoma	Pólipo hipoplásico serrado	1	1
15-LF343	Maria Contreras Cepilo	75	23/01/2019	Protección de sigmoides más recto, sigmoides y medio		Adenocarcinoma tubular moderadamente diferenciado	4,7	7
16-EX33	Luz Mielasa Chipana	69	2/03/2019	Colon ascendente	D/C MM de colon ascendente	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	1	1
17-EX77	Cristina Olguín Condori	75	12/03/2019	Ciego y colon ascendente proximal	D/C MM de colon	Adenocarcinoma tubular moderadamente diferenciado	1	1
18-EL35	Felicitas Guisao Rodríguez	74	30/04/2019	Lesión elevada de colon descendente	D/C MM de colon descendente	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	1	1
19-LG58	Juan Lima Parader	57	15/04/2019	Hemicolectomía radical derecha ampliada a transversos	Tumor de 4,4 que sobrepasa la serras	Adenocarcinoma tubular moderadamente diferenciado	3,4,5,7	1
20-LG38	Bonifacio Flores Quijpe	85	8/05/2019	Mucosa de colon ascendente	Tumoración de colon ascendente D/C MM de colon	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	1	1
21-LH59	Paul Marique, Oviedo	69	24/06/2019	Tumor de colon sigmoides	D/C MM de sigmoides	Adenocarcinoma tubular moderadamente diferenciado	1	1
22-LH70	Luz Alcázar Valdina	42	12/01/2019	Colon sigmoides (biopsia)	D/C MM de sigmoides y recto	Adenoma tubulo vellosos con displasia de alto grado	1	1
23-LH69	Silva Mamani Mirazo	47	25/06/2019	Pólipo de recto	D/C Adenoma	Adenoma serrado con displasia de bajo grado focal	1	1
24-EO087	Albino Talavera Oros	63	1/08/2019	Colon sigmoides (biopsia)	D/C MM de sigmoides	Adenocarcinoma tubular moderadamente diferenciado	1	1
25-LIT27	Leandra Mamani de Chay	62	14/09/2019	Colon transversos, derecho e ilion	D/C MM de colon derecho	Carcinoma pobremente diferenciado con células en	3,4,5,6	4
26-EP063	Lucía Páez, Cruz	57	16/09/2019	Lesión o.l.f. transversos	D/C Adenoma	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	1	1
27-LIT0	Juan Carlos Parader Milsa Melgar	45	05/10/2019	Pólipo de colon	D/C Adenoma	Pólipo hipoplásico serrado	1,2	1
28-LF50	Enrique Huiza de Pari	80	23/10/2018	Mucosa de recto (biopsia)		Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	1	1
29-LF79	Felipa Casallo Figueroa	86	4/05/2018	Colon	D/C MM de colon	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	1	1
30-LD76	Norma Monsón de González	87	22/08/2018	Colon ascendente ilion distal (hemicolectomía radical derecha)	D/C Adenocarcinoma de colon	Adenocarcinoma tubular moderadamente diferenciado	3,4,7,8	7
31-LD77	Reymar Cheque Chacava	24	27/01/2018	Colon derecho	Adenocarcinoma en colon	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	2,4,5	1,4
32-LD83	Dionisia Prado Gilmoz	63	12/10/2018	Colectomía subtotal		Carcinoma de patrón de mixto de células anillo de sello y tubular mucoso sector	1	1
33-EP79	Deniz Bauds Flores	40	20/09/2019	Lesión o.l.f. colon descendente distal	D/C Adenoma	Adenocarcinoma un sitio	1	1

ANEXO 2.

Matriz de datos para muestras de heces de pacientes con cáncer colorectal.

Código	Edad	Sexo	Muestra	Diagnostico	Tratamiento	Dieta	Antibióticos	Consentimiento Inf.
HP1	60	F	Heces	Ca de Colon - Adenocarcinoma	QX + QT	<CH <G	NO	SI
HP2	57	M	Heces: Colos	Ca de Colon y Ciego - Adenocarcinoma	QT	<CH	NO	SI
HP3	56	F	Heces: Colos	Ca de Colon - Adenocarcinoma	QX + QT	<CH	NO	SI
HP4	50	M	Heces: Colos	Ca de Colon - Adenocarcinoma	QX + QT	>CH	NO	SI
HP5	59	M	Heces	Ca de Sigmoides - Adenocarcinoma	QX + QT	<CH	NO	SI
HS1	24	M	Heces	Sano	Ninguno	>CH	NO	SI
HS2	18	M	Heces	Sano	Ninguno	>CH	NO	SI
HS3	56	F	Heces	Sano	Ninguno	>CH	NO	SI
HS4	26	M	Heces	Sano	Ninguno	>CH	NO	SI

ANEXO 3

SECUENCIACIONES GENÉTICAS

ANEXO 3.1. Secuenciación genética para *Clostridium Symbiosum* en la muestra del paciente “HP1”

>H01_2_Clostridium symbiosumR TRIM QUALITY: 20

GATGATGTATTCACCGGTTTCAGCATCATATTTGCGTGATACACG
CACAC

CGGCTGCATAAGCCAGACTGATACGGGCATATCCGCAGATATCG
TTGTCA

TAGCCAAGATCCTCAGCGGCCTGGCACATCATCTC

ANEXO 3.2. Secuenciación genética para *Clostridium Symbiosum* en la muestra del paciente “HP5”

>H03_2_Clostridium symbiosumR TRIM QUALITY: 20

GATGATGTATTCACCGGTTTCAGCATCATATTTACGTGATACACG
CACAC

CGGCTGCATAAGCCAGGCTGATACGGGCATATCCGCAGATATCG
TTGTCA

TAGCCAAGATCCTCAGCGGCCTGGCACATCATCTC

ANEXO 3.3. Secuenciación genética para *Parvimonas Micra* en la muestra del paciente “HP5”

>H03_3_PARVIMONAS MICRAF TRIM QUALITY: 20

GGTCTTACTTCTCTTacaCTTATGCAAGAGTTGATCAATATGGA
TTT

ATTGAAACACCATATCGTGTTGTAAATAATGGAATTGCTACAAAGG
ACAT

TGTTTATTTAACTGCTGATGAAGAAGATGAAGTTATTATCGCTCAA
G

ANEXO 3.4. Secuenciación genética para *Parvimonas Micra* en la muestra del paciente “HP3”

>H07_3_PARVIMONASMICRAF TRIM QUALITY: 20

CGGTCTTATTACTTCTCTTacaCTTATGCAAGAGTTGACGAATATG
GATT

TATAGAAACTCCATATCGTGTTGTAAATGACGGAATTGCTACAAAG
GATA

TTGTTTATTTAACTGCAGATGAAGAAGATGAAGTTATtatCGCTCAA
G

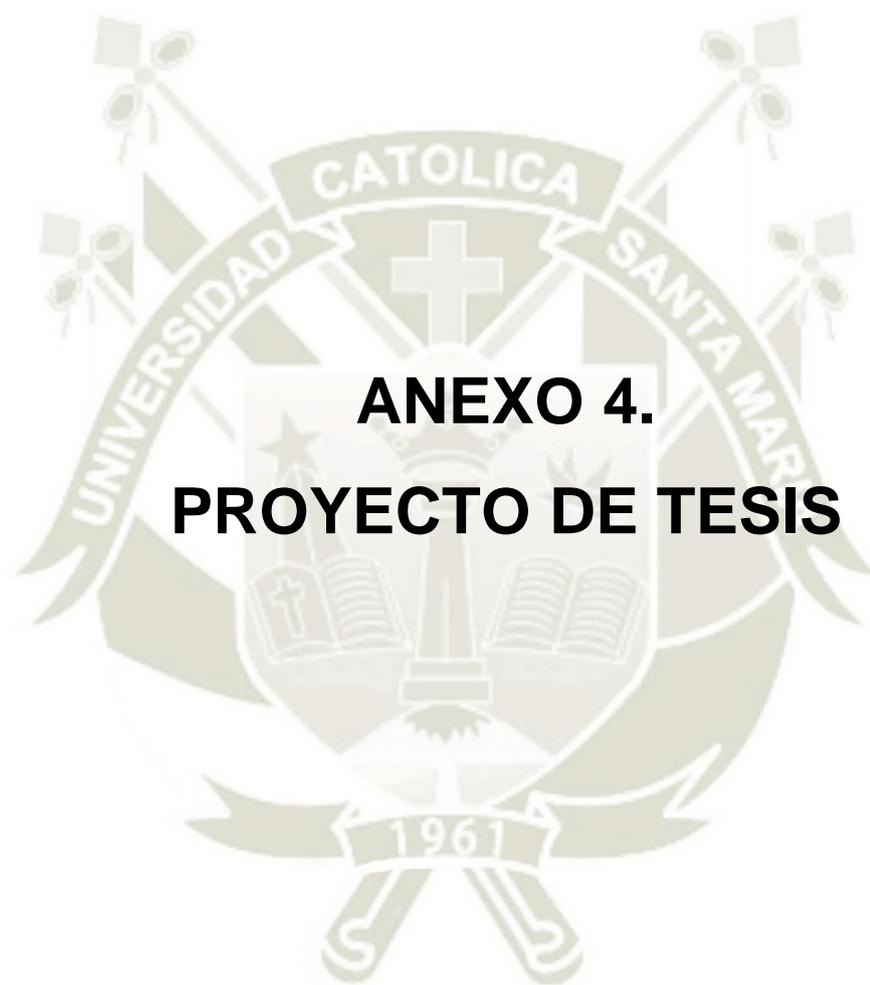
**ANEXO 3.5. Secuenciación genética para *Parvimonas Micra* en la muestra
del paciente “HP4”**

>H08_3_PARVIMONASMICRAF TRIM QUALITY: 20

CGGTCTAATTACTTCTCTAACA ACTTATGCAAGAGTTGATCAATAT
GGAT

TTATTGAAACACCATATCGTGTTGTAAATAATGGAATTGCTACAAA
GAAC

ATTGTTTATTTAACTGCTGATGAAGAAGATGAAGTTATTATCGCTC
AAG



ANEXO 4.
PROYECTO DE TESIS

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Medicina Humana
Escuela Profesional de Medicina Humana



PRESENCIA DE *FUSOBACTERIUM NUCLEATUM*, *CLOSTRIDIUM SYMBIOSUM* Y *PARVIMONAS MICRA* EN MUESTRAS DE TACOS DE PARAFINA Y HECES DE PACIENTES CON CÁNCER COLORECTAL MEDIANTE SECUENCIACIÓN GENÉTICA

Proyecto de Tesis presentado por el
Bachiller:

Velásquez Lazo, Mario César

para optar el Título Profesional de:

Médico Cirujano

Asesor:

Dr. Bernabé Ortiz, Julio César

Arequipa – Perú

2020

I. PREÁMBULO

El cáncer colorectal es una neoplasia maligna frecuente, fuertemente asociada al estilo de vida y la herencia, con un incremento de prevalencia en nuestro país. Actualmente se encuentran métodos de screening para su diagnóstico temprano y tratamiento oportuno, a pesar del desarrollo de los mismos, cada vez se encuentran más casos nuevos en personas jóvenes, y sin antecedentes familiares.

Se trata de una de las neoplasias malignas con mejor sobrevida y pronóstico si el diagnóstico es temprano, a partir de métodos de screening tales como la colonoscopia, pudiendo optarse por tratamientos eficaces como la cirugía y la quimioterapia adyuvante.

En los últimos años se viene desarrollando e investigando el microbioma intestinal, sus distintas funciones y relaciones con la fisiología del cuerpo humano, demostrándose injerencia sobre distintos sistemas tales como el sistema inmunológico, músculo esquelético y una relación directa y estrecha con el sistema digestivo específicamente sobre su epitelio y su metabolismo.

Existen bacterias del microbioma intestinal altamente relacionadas con la oncogénesis del cáncer colorectal, siendo las más estudiadas: *Fusobacterium Nucleatum*, *E. Coli productora de colibactina* y *Bacteroides Fragilis Enterotoxigenico*, *Clostridium Symbiosum* y *Parvimonas Micra*

La importancia de este trabajo radica en determinar la presencia de *Fusobacterium Nucleatum*, *Clostridium Symbiosum* y *Parvimonas Micra* en pacientes diagnosticados con cáncer de colorectal; identificación que se realizará a través de secuenciación genética.

II. PLANTEAMIENTO TEORICO

1 Problema de investigación

1.1 Enunciado del Problema

¿Las bacterias *Fusobacterium Nucleatum*, *Clostridium Symbiosum* y *Parvimonas Micra* se encuentran presentes en la muestras de tacos de parafina y heces de pacientes con cáncer colorectal?

1.2 Descripción del Problema

a) Área del conocimiento

- **Área general:** Ciencias de la Salud
- **Área específica:** Medicina Humana
- **Especialidad:** Oncología, Genética y Microbiología
- **Línea:** Microbioma intestinal Humano

b) Operalización de Variables

Variable dependiente

Variable	Indicador	Valor o categoría	Tipo o escala
<i>Fusobacterium Nucleatum</i>	Secuenciación Genética	Presente / Ausente	Categórica nominal
<i>Clostridium Symbiosum</i>	Secuenciación Genética	Presente / Ausente	Categórica nominal
<i>Parvimonas Micra</i>	Secuenciación Genética	Presente / Ausente	Categórica nominal

VARIABLES INDEPENDIENTE

Variable	Indicador	Valor o categoría	Tipo o escala
Diagnostico			
Diagnostico	Anatomo Patológico	Cáncer de Colon Sano	Categórica nominal
Factores sociodemográficos del paciente			
Edad	Fecha de nacimiento	Años	Numérica continua
Sexo	Caracteres sexuales	Varón / Mujer	Categórica nominal
Procedencia	Lugar de residencia	Rural, Semirrural, Urbana	Categórica nominal
Dieta	Predominancia de macronutrientes	1. Carbohidratos 2. Proteínas 3. Lípidos	Categórica nominal

c) Interrogantes Básicas

1. ¿Se encuentran presentes: *Fusobacterium Nucleatum*, *Clostridium Symbiosum* y *Parvimonas Micra* en la muestras de tacos de parafina y heces de pacientes con cáncer colorectal?
2. ¿Existe alguna predominancia bacteriana entre *Fusobacterium Nucleatum*, *Clostridium Symbiosum* y *Parvimonas Micra* en las muestras de tacos de parafina y heces de pacientes con cáncer de colon?
3. ¿Existen diferencias en la presencia de *Fusobacterium Nucleatum*, *Clostridium Symbiosum* y *Parvimonas Micra* en zonas de tejido sin cáncer y el microbioma en zonas de tejido conservado en tacos de parafina de pacientes con cáncer colorectal?

d) Tipo de Investigación

Aplicada

e) Diseño de Investigación

Se trata de un estudio de cohortes de valoración transversal para evaluar la asociación entre distintas poblaciones bacterianas en pacientes con cáncer colorectal.

f) Nivel de Investigación

Experimental

1.3 Justificación del problema

El presente trabajo de investigación evaluará el microbioma intestinal, específicamente la presencia de *Fusobacterium Nucleatum*, *Clostridium Symbiosum* y *Parvimonas Micra* en muestras de tacos de parafina y heces de pacientes con cáncer colorectal, brindando nuevos conocimientos acerca de la oncogénesis del cáncer colorectal.

Permitirá el desarrollo de nuevas opciones de screening para el diagnóstico temprano de la enfermedad, así como opciones terapéuticas específicas para el manejo de la misma, influyendo sobre el costo económico y social de la población que lo padece en el país y la región.

Al ser el primer estudio de investigación de este tipo en la región y en el país incentivará a futuras generaciones el deseo de la investigación e innovación para la mejora de la salud de la población peruana.

2 Marco Conceptual**2.1 Cáncer de colon****2.1.1 Definición**

El cáncer es el sobrecrecimiento celular no controlado y con capacidad de invasión causando daño a tejidos y órganos. El cáncer de colon desarrolla un crecimiento exagerado de las células en cualquier zona anatómica desde la válvula ileocecal hasta el recto. Entre las lesiones que pueden originarse están: pequeños tumores benignos (pólipos

adenomatosos) y cánceres malignos (carcinomas). El cáncer de colon se desarrolla durante varios años (1).

2.1.2 Epidemiología

El cáncer de colon y recto es la cuarta de las neoplasias más frecuentes en ambos sexos en nuestro medio, representando un problema de salud pública. Representa la tercera causa de muerte por cáncer, tras el cáncer de pulmón y próstata en varones, así como de pulmón y mama en mujeres (1). En los países occidentales supone el segundo tumor con más incidencia después del tumor de mama en mujeres y de próstata en hombres, y la segunda causa de muerte oncológica después del cáncer de pulmón en los hombres y el de mama en las mujeres.

En el Perú el cáncer de colon ocupa el octavo lugar en incidencia. Su incidencia anual es de 3671 casos, representando 3,3%. Constituye 1616 casos de defunción por cáncer al año (2).

2.1.3 Etiología y factores de riesgo

Multifactorial siendo influenciado por factores medioambientales tales como un consumo de carnes roja y grasas, además de la ausencia de actividad física. Se acepta que el riesgo de padecer cáncer de colon y recto en la población general es de un 5% y en la población con enfermedad inflamatoria intestinal (EEI) este riesgo se encuentra aumentado de 2 a 5 veces. Por tanto, el riesgo que tienen los pacientes con EEI de padecer cáncer de colon y recto es de un 15% aproximadamente.

Una historia personal de poliposis supone un gran factor de riesgo. Los pólipos son protuberancias visibles macroscópicamente que se proyecta en la superficie de una mucosa. Pueden ser pediculados o sésiles según su forma de implantación.

Según su histología, los pólipos colónicos pueden ser: Adenomatosos en su mayoría, serrados y otros, como inflamatorios, hamartomatosos, mucosos (2).

2.1.4 Tipos Histológicos

El cáncer de colon presenta diversas características al estudio anatómico patológico. El adenocarcinoma es el tipo histológico más frecuente (90-95%), seguido del adenocarcinoma coloidal o mucinoso (10%). Otros tipos histológicos, como el carcinoma epidermoide, los tumores carcinoides, los sarcomas, los melanomas o los linfomas, son menos frecuentes (2).

2.1.5 Diagnóstico

El cáncer de colon debe sospecharse en pacientes que consulten por un cambio reciente del ritmo deposicional y/o hemorragia digestiva baja. Las características clínicas no son específicas de cáncer de colon, motivo por el cual, el diagnóstico resulta de un hallazgo descubierto por colonoscopia, y el estudio definitivo, anatómico patológico, a través de una biopsia del tejido en sospecha (2).

2.2 Microbioma intestinal

El intestino comprende a una gran cantidad de organismos, tales como fungi, protozoos, bacterias, y virus; formando lo que se denomina microbioma intestinal. El mismo comprende trillones de microorganismos y cerca de trillones de genes. El microbioma, no resulta ser un conjunto de organismos solamente, por el contrario, se desarrolla una especie de ecosistema con el hospedero, y se mantiene en constante dinamismo. El colon es la sección más colonizada del tracto digestivo, ha sido estimado que este órgano contiene aproximadamente el 70% del microbioma humano. Además de ser la sección con mayor incidencia de cáncer. Se conoce que son factores de riesgo potenciales del cáncer de colon, la dieta y el estilo de vida, así como que los mismo son moduladores del microbioma intestinal (3).

2.2.1 Identificación del Microbioma Intestinal

Los estudios metagenómicos son los más usados para la identificación del microbioma intestinal, el WGS (secuenciación entera del genoma) y la secuenciación de RNA ribosomal 16S, son los dos enfoques más usados.

La técnica más utilizada en los estudios metagenómicos en estos días es la secuenciación del 16S rRNA, que está presente en todos los genomas bacterianos y archaea. Los enfoques 16S y WGS se han utilizado ampliamente para estudiar el microbioma intestinal humano, quizás el microbioma más estudiado hasta ahora, con dos grandes consorcios internacionales importantes que juegan un papel importante en el campo: la Metagenómica del Tracto Intestinal Humano (MetaHIT) (4), y el Human Microbiome Project (HMP) (5).

2.2.2 Relación del microbioma intestinal y cáncer de colon.

El microbioma intestinal cumple funciones en el mantenimiento de la mucosa, la homeostasis y barrera epitelial. La barrera intestinal está compartimentando eficientemente las bacterias a la luz, si esta se daña, aumentara "Permeabilidad intestinal", estando asociada con enfermedades gastrointestinales, incluida la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), el síndrome del intestino irritable, entre otras.

El microbioma y sus metabolitos, los ácidos grasos de cadena corta, pueden inducir disfunción en la barrera epitelial intestinal, activando así mediadores proinflamatorios tales como citoquinas, interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), que daña las células epiteliales y sus uniones (6).

Algunas especies bacterianas específicas pueden desencadenar respuestas inflamatorias o producen toxinas que dañan directamente el intestino. *Bacteroides fragilis* y *Enterococcus faecalis* producen enterotoxinas y especies reactivas de oxígeno que causan daño oxidativo del ADN, induce inflamación y daña la barrera epitelial (7). Además, *B. fragilis* activa la señalización nuclear de β -catenina e induce la proliferación celular (8). De manera similar, *Fusobacterium nucleatum* puede inducir cambios inflamatorios al adherirse e invadir directamente las células epiteliales del colon a través de la proteína de superficie FadA, que interactúa con E-cadherina para mediar cambios en β -catenina y señalización Wnt (9).

Existen diferentes hipótesis para determinar el porqué de la disbiosis en la carcinogénesis. Se propone que algunos tipos de microbioma intestinal disbiótico produzca respuestas proinflamatorias y mutación de células epiteliales que conduciría al cáncer.

Según este modelo, las bacterias intestinales impulsoras desencadenan el daño del ADN en las células epiteliales, que a su vez contribuye a la iniciación del cáncer. En un segundo paso, la tumorigénesis en curso altera el microambiente circundante, favoreciendo la proliferación de bacterias oportunistas. Así, este modelo propone que la progresión de la enfermedad provoca cambios en el microambiente como resultado del crecimiento del tumor, y las bacterias son reemplazadas por otras que muestran una ventaja competitiva en el tumor microambiente y son capaces de nutrir la progresión tumoral.

Este escenario sugiere que los conductores y pasajeros bacterianos tienen asociaciones temporales distintas con CRC y pueden tener roles separados en la patogénesis (10).

3 Análisis de Antecedentes Investigativos

3.1 A nivel local

Autor: Tatiana Shessira Chávez arias

Título: Identificación molecular de bacterias asociadas a cuadros clínicos de tuberculosis - Arequipa

Resumen: identificar las bacterias presentes en las muestras se realizó la secuenciación de alto rendimiento (secuenciamiento metagenómico) del gen 16S RNAr y un análisis bioinformático, en el cual se tomó las muestras diagnosticadas de muestras de biopsia de mama con diagnostico positivo y negativo para tuberculosis y muestras de esputo con diagnostico positivo y negativo para tuberculosis, Se identificó a bacterias de las cuales en las muestras de biopsia de mama con diagnóstico de tuberculosis positivo a los Phylum más dominantes que fueron Firmicutes y Proteobacteria y dentro de ellos a los generos Psychrobacillus seguido de Pseudomonas y en las muestras con diagnostico negativo para tuberculosis de encontró a los

Phylum Proteobacteria, Firmicutes y bacteroides con el género Pseudomonas (11).

3.2 A nivel nacional

Autor: Luna-Abanto Jorge

Título: Cáncer colon en adultos jóvenes: características clínico epidemiológicas en la población peruana

Resumen: Objetivos: Determinar las características clínico epidemiológicas de pacientes adultos jóvenes con cáncer colon. Materiales y métodos: Se solicitó la información recolectada por la Dirección General de Epidemiología mediante la estrategia de vigilancia en enfermedades no transmisibles durante el periodo 2006-2014. Se calculó la tasa de incidencia ajustada para la edad y un análisis estadístico descriptivo de las variables estudiadas. Se reportaron 1261 casos de CCR en pacientes entre 20 a 49 años de edad. El cambio porcentual anual (CPA) en la muestra estudiada para la incidencia presentó un descenso para este periodo de -0,09% ($p=0,004$). El CPA para los casos de CCR fue de -3,9% en hombres ($p=0,009$) y -5,22% en mujeres ($p=0,014$). Se reportaron 640 mujeres y 621 varones. La mayor cantidad de casos de CCR en la población estudiada corresponde al grupo de 40-49 años con el 60,3% de casos. Lima constituyó la región con mayor número de casos reportados (42,6%). El 63,7% de casos de CCR estuvo representado por tumores de colon. Conclusiones: En base al reporte de casos proporcionada por la DGE, existe una disminución en la tendencia de la incidencia de los casos de CCR en adultos jóvenes peruanos en los últimos 10 años (12).

3.3 A nivel internacional

Autor: Vincy Eklöf

Título: Cancer-associated fecal microbial markers in colorectal cancer detection

Resumen: El valor potencial del uso de marcadores de alteraciones microbianas en las heces para la detección de cáncer de colon no ha sido explorado. Observamos que los marcadores microbianos para la bacteria

clbA + y *Fusobacterium nucleatum* en las heces se puede usar para predecir colorrectal cáncer. La combinación de los dos marcadores aumentó la sensibilidad de las pruebas. Nuestros resultados sugieren que los marcadores combinados de alteraciones microbianas en las heces pueden ser parte de un futuro importante estrategia de detección de CCR (13).

Autor: Sunny H. Wong

Título: Gut microbiota in colorectal cancer: mechanisms of action and clinical applications

Resumen: El cáncer colorrectal (CCR) representa aproximadamente el 10% de todos los casos nuevos de cáncer a nivel mundial. El microbioma intestinal comprende una gran población de microorganismos que interactúan con las células huésped para regular muchos procesos, como la recolección de energía, el metabolismo y la respuesta inmune. Los estudios en modelos animales han señalado el papel de varias bacterias en la carcinogénesis colorrectal incluyendo *Fusobacterium nucleatum* y ciertas cepas de *Escherichia coli* y *Bacteroides fragilis*.

Estos hallazgos brindan nuevas oportunidades para aprovechar nuestro conocimiento sobre el microbioma intestinal para aplicaciones clínicas, como el análisis de microbiota intestinal como detección, pronóstico o biomarcadores o microorganismos moduladores para prevenir el cáncer, aumentar las terapias y reducir efectos adversos del tratamiento. Esta revisión tiene como objetivo proporcionar una visión general y discusión del microbioma intestinal en la neoplasia colorrectal, incluidos los mecanismos relevantes en el microbioma relacionada con la carcinogénesis, el potencial de utilizar el microbioma como biomarcadores de CCR, y la perspectiva para modular la microbiota para la prevención o el tratamiento del CCR (14).

4 Objetivos.

4.1 General

Determinar la presencia de *Fusobacterium Nucleatum*, *Clostridium Symbiosum* y *Parvimonas Micra* en muestras de tacos de parafina y heces de pacientes con cáncer colorectal.

4.2 Específicos

Identificar la presencia de *Fusobacterium Nucleatum*, *Clostridium Symbiosum* y *Parvimonas Micra* en la muestras de tacos de parafina y heces de pacientes con cáncer colorectal

Establecer si existe alguna predominancia bacteriana de *Fusobacterium Nucleatum*, *Clostridium Symbiosum* y *Parvimonas Micra* en las muestras de tacos de parafina y heces de pacientes con cáncer de colon

Establecer diferencias poblacionales de *Fusobacterium Nucleatum*, *Clostridium Symbiosum* y *Parvimonas Micra* en zonas de tejido sin cáncer y el microbioma en zonas de tejido conservado en tacos de parafina de pacientes con cáncer colorectal

5 Hipótesis

Nula: No hay presencia de *Fusobacterium Nucleatum*, *Clostridium Symbiosum* y *Parvimonas Micra* en muestras de tacos de parafina y heces de pacientes con cáncer colorectal.

Alternativa: Si hay presencia de *Fusobacterium Nucleatum*, *Clostridium Symbiosum* y *Parvimonas Micra* en muestras de tacos de parafina y heces de pacientes con cáncer colorectal.

6 Técnica e instrumento

6.1 Técnica

- En la presente investigación se aplicará la toma de muestras de forma indirecta, y se procesará mediante la técnica de secuenciación genética

6.2 Instrumentos

- Infraestructura y materiales del laboratorio de Biología Molecular de la UCSM

- Material de escritorio
- Computadora personal para procesamiento de textos, bases de datos y estadísticos

7 Campo de verificación

7.1 Ubicación espacial

El estudio se realizará en Arequipa, Perú.

7.2 Ubicación temporal

El estudio se desarrollará en el periodo comprendido entre diciembre del 2019 Y Enero del 2020

7.3 Unidades de estudio

El universo está conformado por pacientes que cuentan con el diagnostico anatomo patológico de Cáncer de Colon.

8 Población

8.1 Pacientes y muestras.

Se tomarán un total de 15 muestras de tacos de parafina de piezas quirúrgicas y/o biopsias y 8 muestras de heces para el descarte de cáncer de colon, en los hospitales: Goyeneche, Honorio Delgado Espinoza, IREN SUR y Essalud (HNCASE) se dividirán en cuatro grupos:

- A) 15 muestras patológicas de tacos de parafina de pacientes con cáncer de colon.
- B) 15 muestras normales de tacos de parafina de pacientes sin cáncer de colon
- C) 4 muestras de heces de pacientes con cáncer de colon
- D) 4 muestras de heces de pacientes sin cáncer de colon

8.2 Criterios de exclusión

- Consumo de antibióticos en los últimos 3 meses
- Almacenamiento de tacos de parafina por más de 6 meses
- Muestra insuficiente

- Tipo Histológico asociado a heredabilidad de cáncer de colon
- Antecedente de cáncer de otra localización y carcinomatosis

9 Estrategia de recolección de datos

9.1 Organización

Se realizarán las coordinaciones con la Dirección del Hospital y la Jefatura del Servicio de Oncología y Patología del Hospital Goyeneche, IREN, Honorio Delgado y Essalud (HNCASE) para la realización del estudio.

Se buscará en el registro de altas del servicio a todos los casos con diagnóstico de cáncer de colon. Se tomarán datos de nombre o número de historia clínica, se solicitará el permiso para la revisión de las historias clínicas con el fin de recoger las variables de interés en una ficha de recolección de datos (Anexo 1) entre los casos que cumplan los criterios de selección, se contactará a los pacientes, se les informará sobre el presente proyecto y posteriormente firmar el consentimiento informado (Anexo 3) para su participación en el mismo.

Se procederá a búsqueda en la base datos de laboratorios de patología, donde se obtendrán códigos de muestra, nombre e información clínica relevante (Anexo 3) Se procederá a la solicitud del permiso para el uso de tacos de parafina, recolectándose en un frasco de muestra estéril, procesándose de forma inmediata en los laboratorios de biología molecular de la Universidad Católica Santa María.

9.2 Recursos

Para realizar el estudio se necesitará lo siguiente:

9.2.1 Humanos

- Investigador
- Asesor

9.2.2 Materiales

- Material e infraestructura del laboratorio de Biología Molecular UCSM:
 - Micropipetas (4 Juegos de 3 c/u)

- Vortex
- Medios de Cultivo
- Factores de crecimiento
- Análisis de secuencias
- Fichas de recolección de datos.
- Material de escritorio
- Computadora personal
- Programa estadístico.
- Impresora.

9.2.3 Financieros

El estudio será financiado por la Universidad Católica de Santa María, a través del fondo para la investigación del Vicerrectorado de investigación

- Proyecto: CARACTERIZACION DEL MICROBIOMA HUMANO BACTERIANO GASTROINTESTINAL Y SU ASOCIACION CON EL CANCER GASTRICO Y COLORECTAL: UN ESTUDIO BASADO EN LA TECNOLOGIA DE “NEXT GENERATION SEQUENCE”

9.3 Validación del instrumento

El instrumento se encuentra validado a nivel internacional

9.4 Criterio para manejo de resultados

9.4.1 Plan de Procesamiento

1. Toma de muestras

Las muestras de tacos de parafina y heces serán tomadas previo consentimiento informado en pacientes con cáncer de colon probable y/o diagnosticado y se procesarán en el laboratorio de biología molecular de la UCSM, para la extracción y purificación de DNA y posterior preparación de muestras para la técnica de secuenciación genética.

2. Modelo de laboratorio

2.1. Extracción de ADN

- Se utilizará el método fenol-cloroformo.

3. Secuenciación Molecular

Las muestras serán amplificadas, purificadas y enviadas para la secuenciación automática al Laboratorio Functional Biosciences, Inc. En Wisconsin USA. Con los siguientes primers para la detección de *Fusobacterium Nucleatum*: forward 5'-CAACCATTACTTTAACTCTACCATGTTCA-3', reverse 5'-GTTGACTTTACAGAAGGAGATTATGTAAAAATC-3', *Clostridium Symbiosum*: forward 5'-GTGAGATGATGTGCCAGGC-3', reverse 5'-TACCGGTTGCTTCGTCGATT-3' y *Parvimonas Micra*: forward 5'-GTCACTACGGAAGAATTTGTC-3', reverse: 5'GGCTTGAGCGATAATAACTTC-3'.

4. Análisis de secuencias:

Las secuencias de nucleótidos obtenidas serán comparadas con las secuencias de la base de datos GenBank.

5. Análisis bioinformático

La composición microbiana y diversidad de las muestras será analizada utilizando QIIME v1.9.1 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology). El agrupamiento en Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) será realizado mediante los algoritmos UCLUST and USEARCH.

6. Datos de pacientes con cáncer de colon.

Los datos registrados de la historia clínica se registrarán en una ficha de recolección de datos serán luego codificados y tabulados para su análisis e interpretación.

Actividades	Diciembre 2019				Enero 2020				Febrero 2020			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1. Elección del tema												
2. Revisión bibliográfica												
3. Aprobación del proyecto												
4. Ejecución												
5. Análisis e interpretación												
6. Informe final												

10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Siegel, R., Ma, J., Zou, Z. and Jemal, A. Cancer Statistics, 2014. CA A Cancer Journal for Clinicians, 64, 9-29.
2. American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2016. Atlanta, Ga: American Cancer Society.
3. Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C.M., Finlay, B.B., 2010. Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.* 90, 859–904.
4. Li, J., Jia, H., Cai, X., Zhong, H., Feng, Q., Sunagawa, S., Arumugam, M., Kultima, J.R., Prifti, E., Nielsen, T., Juncker, A.S., Manichanh, C., Chen, B., Zhang, W., Levenez, F., Wang, Juan, Xu, X., Xiao, L., Liang, S., Zhang, D., Zhang, Z., Chen, W., Zhao, H., Al- Aama, J.Y., Edris, S., Yang, H., Wang, Jian, Hansen, T., Nielsen, H.B., Brunak, S., Kristiansen, K., Guarner, F., Pedersen, O., Doré, J., Ehrlich, S.D., MetaHIT Consortium, Bork, P., Wang, Jun, MetaHIT Consortium, 2014. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat. Biotechnol.* 32, 834–841.
5. Human Microbiome Project Consortium, 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486, 207–214.
6. Wu, S., Rhee, K.-J., Albesiano, E., Rabizadeh, S., Wu, X., Yen, H.-R., Huso, D.L., Brancati, F.L., Wick, E., McAllister, F., Housseau, F., Pardoll, D.M., Sears, C.L., 2009. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat. Med.* 15, 1016–1022
7. Goodwin, A.C., Destefano Shields, C.E., Wu, S., Huso, D.L., Wu, X., Murray-Stewart, T.R., Hacker-Prietz, A., Rabizadeh, S., Woster, P.M., Sears, C.L., Casero, R.A., 2011. Polyamine catabolism contributes to enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-induced colon tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 15354–15359
8. Wu, S., Morin, P.J., Maouyo, D., Sears, C.L., 2003. *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces c-Myc expression and cellular proliferation. *Gastroenterology* 124, 392–400 Eklof, V. et al. Cancer-associated fecal

- microbial markers in colorectal cancer detection. *Int. J. Cancer* 141, 2528–2536 (2017).
9. Kostic, A.D., Gevers, D., Pedamallu, C.S., Michaud, M., Duke, F., Earl, A.M., Ojesina, A.I., Jung, J., Bass, A.J., Tabernero, J., Baselga, J., Liu, C., Shivdasani, R.A., Ogino, S., Birren, B.W., Huttenhower, C., Garrett, W.S., Meyerson, M., 2012. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res.* 22, 292–298.
 10. E. Saus., Iraola-Guzmána, Susana, R. Willisa, Jeesse, Brunet-Vegac, Anna, Gabaldón Toni. Microbiome and colorectal cancer: Roles in carcinogenesis and clinical potential *Molecular Aspects of Medicine* 69 (2019) 93–106
 11. Tatiana Shessira Chávez Arias. Identificación molecular de bacterias asociadas a cuadros clínicos de tuberculosis – Arequipa. UNSA. Arequipa 2018.
 12. Luna-Abanto Jorge, Rafael-Horna Eliana, Gil-Olivares Fradis. Cáncer colon en adultos jóvenes: características clínico epidemiológicas en la población peruana. *Rev. gastroenterol. Perú* 2017 Abr; 37(2): 137-141.
 13. Eklof, V. et al. Cancer-associated fecal microbial markers in colorectal cancer detection. *Int. J. Cancer* 141, 2528–2536 (2017).
 14. Wong, S.H., Yu, J. Gut microbiota in colorectal cancer: mechanisms of action and clinical applications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16, 690–704 (2019)



ANEXO 1

Codigo	Edad	Sexo	Muestra	Diagnostico	Tratamiento	Dieta	Antibióticos



ANEXO 2

CONSENTIMIENTO INFORMADO

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

El firmante autoriza a la Universidad Católica Santa María a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte de su actual proceso asistencial sean incorporadas y cedidas con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.

Confirmando que:

1. **Autoriza** a la **Universidad Católica Santa María** a que el **material biológico** sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial **sean incorporadas y cedidas con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica**, siempre que éstos cuenten con la obligada **aprobación del Comité de Ética de Investigación competente**. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.

SI

NO

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

SI NO Teléfono o E-mail de contacto.....

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

SI NO Teléfono o E-mail de contacto:

DONANTE	PERSONA QUE INFORMA
Firma	Firma

ANEXO 3

Código	Nombre	Edad	Fecha	Muestra	Información clínica	Diagnóstico	Lámina	Selección de tacos

