



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES PARA  
LA DETECCIÓN DE ENFERMEDADES  
GASTROINTESTINALES

Miren Alustiza Fernández



Tesis **Doctorales**

UNIVERSIDAD de ALICANTE

Unitat de Digitalització UA  
Unidad de Digitalización UA



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES PARA  
LA DETECCIÓN DE ENFERMEDADES  
GASTROINTESTINALES**



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante  
**MIREN ALUSTIZA FERNANDEZ**

**TESIS DOCTORAL**

**2020**





**Universitat d'Alacant**  
**Universidad de Alicante**

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, GENÉTICA Y MICROBIOLOGÍA-  
FACULTAD DE CIENCIAS

**BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES PARA  
LA DETECCIÓN DE ENFERMEDADES  
GASTROINTESTINALES**

**MIREN ALUSTIZA FERNANDEZ**

Tesis presentada para aspirar al grado de:

DOCTORA POR LA UNIVERSIDAD DE ALICANTE

en

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL Y APLICADA

**Dirigida por:**

**Dr. Rodrigo Jover Martínez**

**Dr. Lorena Vidal Martínez**



## FINANCIACIÓN

El presente trabajo de tesis doctoral ha sido posible gracias a la financiación de los proyectos:

Asociación Investigación Gastroenterológica de Alicante (AIGPA)  
Fondo para proyectos de investigación.  
IP: Rodrigo Jover Martínez.

Ayudas para la utilización de los Servicios Técnicos de Investigación 2018 y 2019 (UAUSTI 18-04 y UAUSTI 19-05).  
Vicerrectorado de Investigación y de Transferencia de Conocimiento (Universidad de Alicante)  
IP: Antonio Canals  
2018-2020

Materiales nanoestructurados en análisis químico: nuevas estrategias de preparación de la muestra basadas en (micro)extracción en fase sólida y desarrollo de nuevos sensores electroquímicos y espectro electroquímicos.  
(PROMETEO/2018/087)  
Conselleria d' Educació, Investigació, Cultura i Esport (Generalitat Valenciana)  
IP: Emilia Morallón  
2018-2021

Caracterización fenotípica y molecular de las poliposis colónicas atenuadas. Papel de la actividad inflamatoria, resistencia insulínica y factores ambientales (PI08/0726).  
Instituto de Salud Carlos III  
IP: Rodrigo Jover Martínez  
2009-2011

III Convocatoria de Ayudas para el Apoyo a la Investigación del Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (UGP-16-138/2016/45)  
ISABIAL-FUNDACIÓN FISABIO  
IP: Rodrigo Jover Martínez  
2016-2018

Análisis de compuestos orgánicos volátiles en orina y heces de pacientes con Cáncer Colorrectal (CCR)  
Beca Navarro Tripodi (PI-18-19)  
2018-2020





A mi familia y amigos,  
el mayor regalo que puedo tener

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante





## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría empezar dando las gracias a Rodrigo por darme la oportunidad de realizar mi tesis doctoral en un grupo tan maravilloso, tanto por la gente con la que he tenido el lujo de trabajar como por el nivel científico del mismo. Siempre con una sonrisa y sacando el lado bueno de las cosas, has hecho que el camino fuera más fácil. He aprendido mucho de ti a nivel científico y profesional y además me llevo muchísimos buenos recuerdos; en congresos, comidas, en la boda de Miri! Tendrás que esperar unos años para ver al aita bailando el auresku, pero la espera merecerá la pena. He sido muy feliz durante estos cuatro años, gracias.

A mi co-directora de tesis Lorena. Gracias por haberme dado la oportunidad de trabajar contigo, he aprendido mucho de un ámbito totalmente distinto al que estoy acostumbrada. Juntas, hemos sacado adelante un estudio muy interesante y no habría sido posible sin tu ayuda. También me gustaría darle las gracias a Antonio, por darme un empujón cuando los experimentos no salían y hacerme ver que no era el fin del mundo. A los compañeros del café de media mañana: Youssef, Montse, Miriam, Laura, Paola y Miguel Angel. Por hacerme sentir como una más del grupo.

A Mar, por ser la persona que me empujó a darle una segunda oportunidad a la ciencia. Sé que no estaría donde estoy si no fuera por ti. Llevamos un largo camino recorrido, desde el primer año de carrera hasta el doctorado y sé que tendrás un gran futuro en la ciencia (o en repostería).

A Oscar y Alejandro, mis compañeros de laboratorio y oficina. Ha sido un placer trabajar con vosotros, tener un buen ambiente laboral no tiene precio y nosotros lo hemos tenido. Echaré de menos nuestros almuerzos en el susu. A la nueva

incorporación Anabel, que aunque hayamos coincidido poco sé que se convertirá en un pilar del grupo colon.

Por otro lado, quisiera agradecerles también a todas las personas que forman o han formado parte del equipo de investigadores de la Unidad de Investigación. A Marta, Araceli, Mari Paz, Yoel por todos los buenos momentos vividos y a las chicas de Biobanco: Ana, Sandra y Jessi por vuestra constante disposición a ayudar y cariño.

A los compañeros del Ciber: Paula, Bea, José Manuel, Rubén y especialmente a Pedro Zapater por estar siempre dispuesto a ayudar y solucionar cualquier problema. A los trabajadores de la Fundación, por ayudar siempre que los necesitara.

Gracias al equipo de Anatomía Patológica del Hospital General de Alicante. A Fany y en especial a Cristina Alenda, por vuestra ayuda y amabilidad.

Finalmente, a mi familia y amigos. Los responsables de que haya podido terminar este trabajo de tesis doctoral. A mi padre, por creer siempre en mí y ser el pilar de mi vida y a mi hermana, a mi hermano y a mi cuñada por estar siempre que los necesito. A mi sobrino, por que ha traído luz a nuestras vidas y me ha dado fuerza en los días más grises. Especial agradecimiento a las que no están, a mi abuela Carmen, mi tía Mari y en especial a mi madre, por que he sentido su fuerza y apoyo aunque no esté conmigo. A mi ODI, mi segunda familia, por permanecer juntas todos estos años y apoyarme siempre. Y por último, pero no menos importante a Álex por su confianza, apoyo incondicional y por comprenderme en mis buenos y malos momentos. Gracias por todo.

## **ABREVIATURAS**

AA: Adenoma avanzado

AECC: Asociación Española Contra el Cáncer

ANOVA: Análisis de varianza

APC: Adenomatous Polyposis Coli

AT: Adenoma tubular

ATV: Adenoma tubulovelloso

AUC: Área bajo la curva

AV: Adenoma veloso

CAC: Cáncer asociado a colitis

CAF: Fibroblastos asociados al cáncer

CCR: Cáncer Colorrectal

COD: Cáncer Odor Database

COVs: Compuestos Orgánicos Volátiles

DE: Desviación estándar

DM: Diabetes Mellitus

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

ETBF: Enterotix Bacteroides Fragilis

FIT: Fecal immunochemical test

FOBT: Fecal occult blood test

FOXP3: Forkhead box P3

GC: Cromatografía de gases

GC-MS: Cromatografía de gases-Espectrometría de masas

GO: Óxido de grafeno

HGUA: Hospital General Universitario de Alicante

HOMA-IR: Homeostatic model assessment

HP: Pólipo hiperplásico

IBD: Enfermedad inflamatoria intestinal

IC: Intervalo de confianza

IL: Interleucina

IMC: Índice de masa corporal

INF $\gamma$ : Interferon gamma

IQR: Rango intercuartílico

MAP: MUTYH-associated polyposis (Poliposis asociada a MUTYH)

MGO: Óxido de grafeno magnético

MO: Macrófago

MP: Pólipo mixto

MS: Espectrometría de masas

NK: Natural Killer

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: Odds Ratios

PAF: Poliposis adenomatosa familiar

PCR: Proteína C reactiva

Ppb:  $\mu\text{g/L}$

ROR $\gamma$ T: RAR-related orphan receptor gamma

SIFT-MS: Tubo de selección de iones con flujo y detección por espectrometría de masas

SIM: Monitorización selectiva de iones

SL: Síndrome de Lynch

SPME: Extracción magnética de fase sólida

SPS: Síndrome de poliposis serrada

SSA: Adenoma serrado sésil

TD: Desorción térmica

TGF $\beta$ : Factor de crecimiento tumoral beta

Th: T helper

Treg: T reguladoras

TSA: Traditional serrated adenoma (Adenoma serrado tradicional)

UA: Universidad de Alicante

VEGF: Vascular endothelial growth factor



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

# ÍNDICE

---



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante





# **ÍNDICE**

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>21</b>
<b>1.1. CÁNCER COLORRECTAL.....</b>	<b>23</b>
1.1.1. Epidemiología del cáncer colorrectal.....	23
1.1.2. Etiología y factores de riesgo para el desarrollo del CCR .....	26
1.1.3. Inflamación y CCR.....	35
1.1.4. Disbiosis microbiana y el desarrollo del adenocarcinoma .....	40
1.1.5. Técnicas de detección del CCR .....	43
1.1.5.1. Técnicas novedosas en estudio .....	43
<b>1.2. POLIPOSIS COLÓNICAS.....</b>	<b>50</b>
1.2.1. Pólipos: definición y clasificación.....	50
1.2.2. Pólipos neoplásicos.....	50
1.2.2.1. Pólipos adenomatosos .....	50
1.2.2.2. Pólipos serrados.....	51
1.2.3. Pólipos no neoplásicos.....	52
1.2.3.1. Pólipos hiperplásicos.....	52
1.2.3.2. Pólipos inflamatorios .....	52
1.2.3.3. Pólipos hamartomatosos .....	52
1.2.4. Tipos de poliposis.....	53
1.2.4.1. Poliposis adenomatosa familiar (PAF) .....	53
1.2.4.2. Poliposis asociada a MUTYH .....	53
1.2.4.3. Síndrome de poliposis serrada (SPS) .....	54
1.2.4.4. Poliposis de origen desconocido .....	54

<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	<b>59</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>63</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>67</b>
<b>4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>67</b>
4.1.1. ESTUDIO 1: Análisis de compuestos orgánicos volátiles en heces de pacientes con cáncer colorrectal, adenomas y controles sanos. ....	69
4.1.1. ESTUDIO 2: Aumento de los niveles séricos de citoquinas relacionadas con las Th17 en pacientes con múltiples pólipos colónicos de origen desconocido .....	70
4.1.2.1 Sujetos y recogida de datos .....	70
4.1.2.2 Muestras de estudio .....	72
4.1.2.3 Variables de estudio .....	73
4.1.2.3.1 Variables clínicas .....	73
4.1.2.3.2 Variables anatomo-patológicas .....	73
4.1.2.3.3 Variables inflamatorias .....	74
4.1.2.4 Plan de trabajo .....	74
<b>4.2. METODOLOGÍA</b> .....	<b>76</b>
4.2.1. ESTUDIO 2 .....	76
4.2.1.1. Procesamiento de las muestras .....	76
4.2.1.2. Estudio de marcadores inflamatorios .....	76
4.2.1.2.1. Análisis de marcadores inflamatorios en suero mediante el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) .....	76
<b>4.3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS</b> .....	<b>78</b>

4.3.1. Análisis estadístico .....	78
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>81</b>
5.1. ESTUDIO 1: Análisis de compuestos orgánicos volátiles en heces de pacientes con cáncer colorrectal, adenomas y controles sanos.....	83
5.2 ESTUDIO 2: Aumento de los niveles séricos de citoquinas relacionadas con las Th17 en pacientes con múltiples pólipos colónicos de origen desconocido .....	84
5.2.1. Características descriptivas de los pacientes con múltiples pólipos colónicos de origen desconocido y controles sanos .....	84
5.2.2. Marcadores inflamatorios .....	85
5.2.3. Clasificación y características de los pólipos y su relación con los marcadores de inflamación.....	89
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>91</b>
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>99</b>
<b>8. REFERENCIAS .....</b>	<b>103</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>123</b>
<b>ANEXO I: Participantes en el estudio: Miembros del consorcio EPIPOLIP. (Grupo de Oncología Gastrointestinal de la Asociación Española de Gastroenterología) .....</b>	<b>125</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>127</b>

<b>II.1. Artículos publicados .....</b>	<b>127</b>
<b>II.2. Artículos en revisión .....</b>	<b>127</b>
<b>II.3. Revisiones bibliográficas .....</b>	<b>128</b>
<b>II.4. Comunicaciones en congresos.....</b>	<b>128</b>



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

# 1. INTRODUCCIÓN

---



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



## 1.1. CÁNCER COLORRECTAL

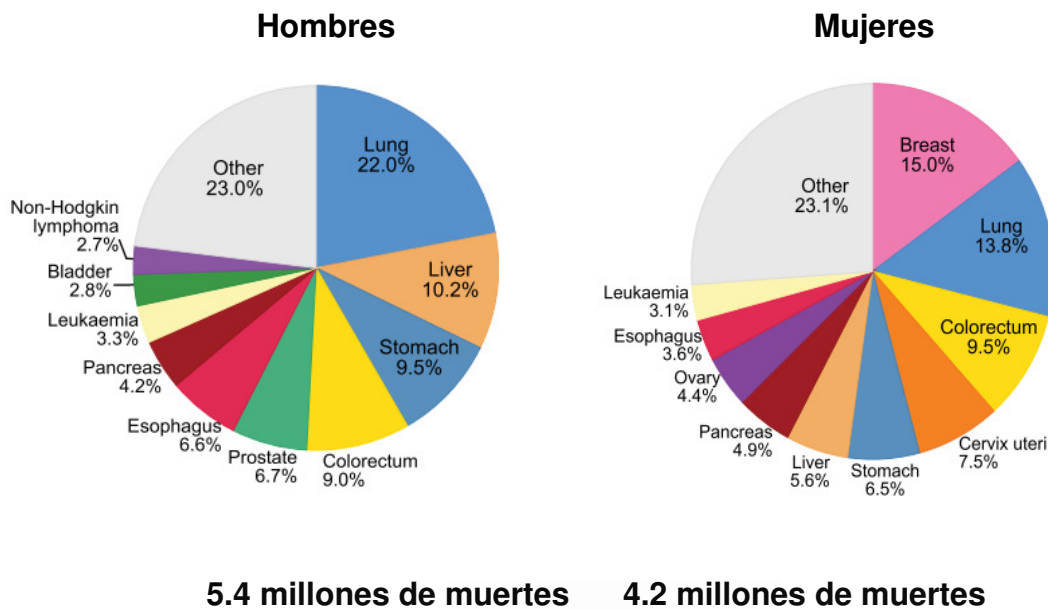
### 1.1.1. Epidemiología del cáncer colorrectal

El cáncer constituye un importante problema de salud siendo la principal causa de muerte junto con las enfermedades cardiovasculares en los países desarrollados. Datos proporcionados por la OMS (Organización Mundial de la Salud) sitúan al cáncer como una de las primeras causas de muerte a nivel mundial; atribuyendo 9,6 millones de muertes en el año 2018 (1) casi un millón de muertes más que en el año 2015 (2).

El cáncer colorrectal (CCR) continúa siendo una de las neoplasias más frecuentes. Según los datos obtenidos en GLOBOCAN 2018, el CCR es el tercer cáncer más mortal y el cuarto cáncer diagnosticado con más frecuencia en el mundo. En 2018 se estima que se diagnosticaron cerca de 2 millones de casos nuevos (teniendo en cuenta ambos sexos) en todo el mundo, representando el 10.2% de todos los cánceres y que hubo cerca de 1 millón de muertes. Los avances terapéuticos han disminuido la mortalidad asociada en ambos sexos siendo en hombres el cuarto cáncer con mayor número de muertes y en mujeres el tercero (**Figura 1**).



## MORTALIDAD

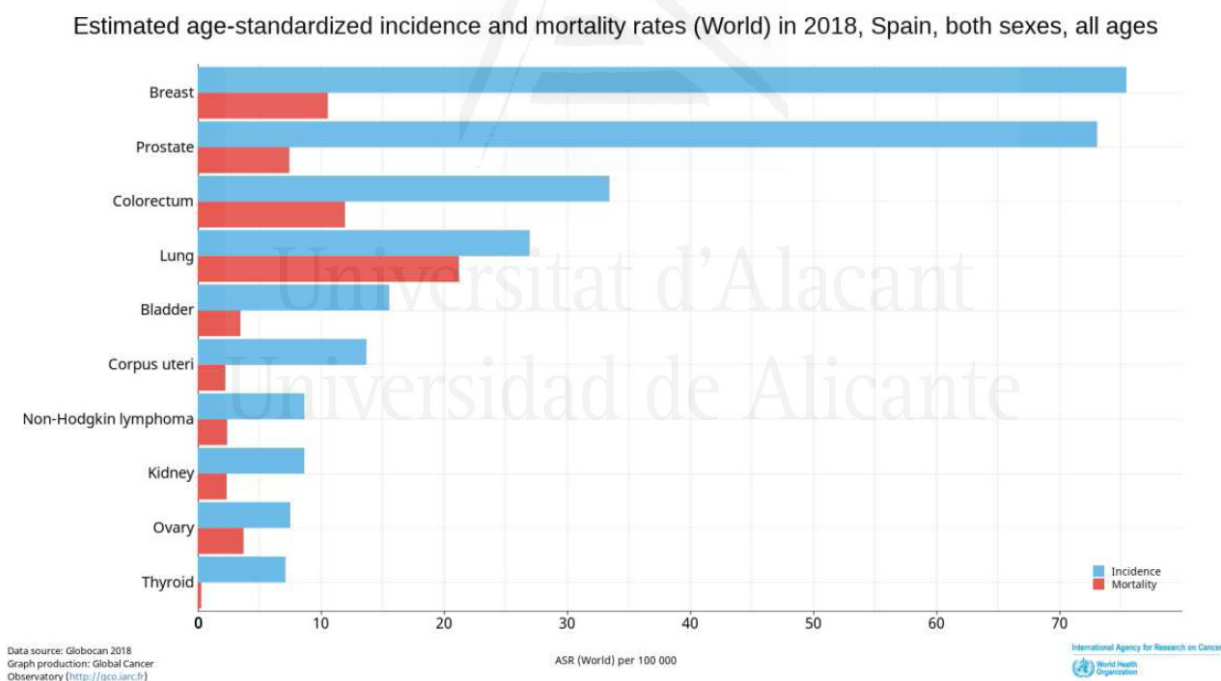


**Figura 1. Gráficos circulares mostrando la distribución de muertes para los 10 cánceres más comunes del 2018 para hombres y mujeres.**

Gráficas importadas de "CA CANCER J CLIN 2018; 0:7-31"

Casi el 55% de los casos de CCR tienen lugar en países desarrollados; siendo Nueva Zelanda, Europa, Australia y América del Norte las regiones del planeta con un mayor ratio estimado de incidencia. No obstante, la incidencia de CCR se está viendo incrementada en zonas previamente consideradas de bajo riesgo como consecuencia de cambios en la dieta, un aumento en el consumo de tabaco y una mayor tasa de obesidad. Por otro lado, avances recientes en programas de detección precoz como la prueba de sangre oculta en heces (siglas en inglés FOBT), colonoscopias de cribado y mejoras en los tratamientos han disminuido la mortalidad del CCR en naciones desarrolladas, a pesar de que la incidencia siga en alza tanto en hombres como en mujeres (3).

En España el CCR es la segunda causa de fallecimiento con 12 casos por cada 100.000 habitantes, considerando ambos sexos (**Figura 2**). La máxima incidencia se observa en el grupo de edad de 50-70 años, principalmente en varones. Además, la incidencia de CCR estandarizada por edad sigue siendo la tercera más alta, con más de 21.000 nuevos casos diagnosticados en 2018 (GLOBOCAN 2018), considerando ambos sexos. La Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) estima que 1 de cada 30 mujeres y 1 de cada 20 hombres padecerá CCR a lo largo de su vida. A largo plazo se estima un coste de 37.000€ por paciente afecto de CCR. El uso de terapias biológicas dirigidas está aumentando los costes asociados al tratamiento del CCR (4).



**Figura 2. Riesgo de incidencia y mortalidad en España en 2018 para ambos sexos, estandarizada por edad.**

Gráfica extraída de “GLOBOCAN, 2018”

### 1.1.2. Etiología y factores de riesgo para el desarrollo del CCR

La etiología del CCR es multifactorial y variada, influyendo en su desarrollo factores de riesgo no modificables y factores de riesgo modificables.

El envejecimiento es el factor de riesgo no modificable más importante. Estudios demuestran que las personas entre 60 y 79 años presentan un riesgo a desarrollar CCR 50 veces mayor que las personas menores de 40 años (5). El sexo se trata de otro factor de riesgo no modificable, aunque la tasa de incidencia de CCR en ambos sexos es similar, ésta es ligeramente mayor en hombres para cáncer de recto (6–8).

El proceso carcinogénico del CCR, tarda unos 7-8 años, donde las células epiteliales sanas se transforman en neoplásicas a través de un cúmulo de alteraciones genéticas (9) (Figura 3).

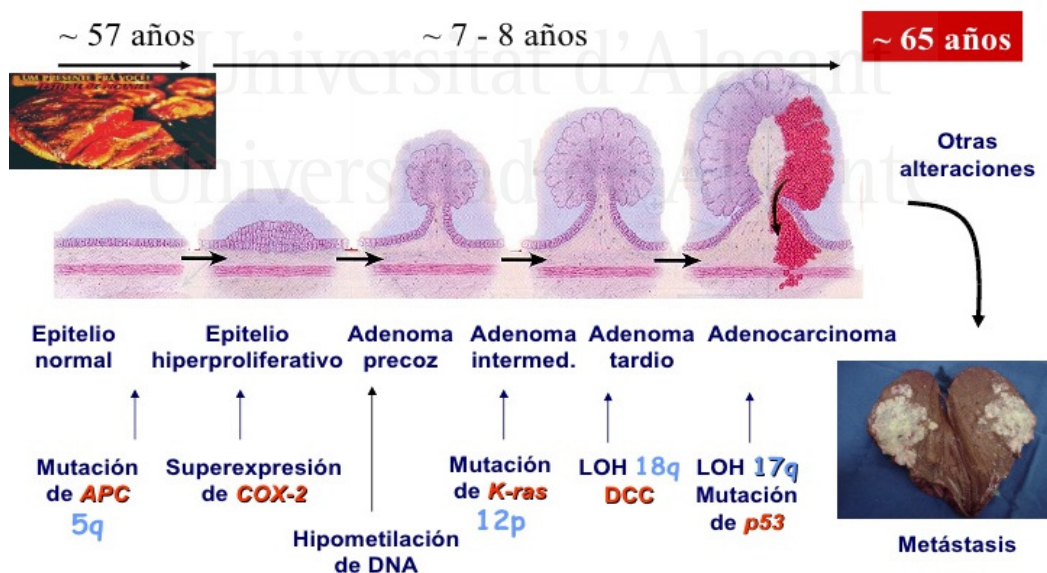


Figura 3. Proceso carcinogénico del CCR.

Imagen adaptada de "N Engl J Med 2000; 342:1960-1968"

Estas alteraciones genéticas pueden darse por diversos motivos; a) por mutaciones somáticas no heredadas, los denominados CCR esporádicos o b) por mutaciones a nivel germinal heredadas de los progenitores, los denominados CCR hereditarios. La mayor parte de los CCR son esporádicos (65%). Sin embargo, hasta un 30% de los casos de CCR presentan agregación familiar de causa desconocida mientras que <5% son hereditarios, con mutaciones germinales identificadas (10) y caracterizados por una edad más temprana de aparición. Hay que destacar dentro de este grupo, la poliposis adenomatosa familiar (PAF) y el síndrome de Lynch (SL) dada su incidencia y características especiales (11,12).

Los factores de riesgo modificables, juegan un papel muy importante en el desarrollo de CCR esporádico. Mientras que algunos de ellos facilitan el proceso carcinogénico, otros actúan como factores protectores:

a) Estilo de vida

La obesidad es un factor de riesgo conocido para el CCR (13). Un reciente metaanálisis demostró que una ganancia de peso de 5kg aumenta un 3% el riesgo de padecer CCR, siendo la asociación ligeramente mayor para hombres (14). También existe una asociación del síndrome metabólico y sus componentes con una mayor incidencia y mortalidad del CCR (15). En esta misma línea la evidencia sugiere que la diabetes mellitus (DM) está asociada con un riesgo elevado de desarrollar CCR (16,17). También se ha asociado un consumo moderado ( $\leq 50$ g/día) o elevado ( $> 50$ g/día) de alcohol con un incremento en el riesgo de desarrollar CCR (18), al igual que se ha demostrado que existe una asociación entre el consumo de cigarrillos y el riesgo de desarrollar CCR (19).

## b) Dieta

La asociación entre dieta y CCR se descubrió gracias a que estudios observacionales mostraran importantes diferencias en la incidencia de esta neoplasia entre distintas áreas geográficas (mayor incidencia en países con mayor desarrollo económico y en países occidentales). No obstante, los estudios presentan limitaciones puesto que es difícil aislar el efecto que un único alimento pueda producir y además se desconoce si el tipo de alimento contribuye de forma independiente al riesgo de CCR o si este guarda relación con una ingesta excesiva de los alimentos (20). A pesar de este inconveniente, diversos trabajos de alta potencia estadística demuestran que existe una asociación entre el consumo de carne roja y carne procesada con el CCR. Además, el hecho de cocinar a altas temperaturas puede contribuir a dicho riesgo, tal vez por la producción de compuestos carcinógenos que se generan a partir de proteínas en el proceso de carbonización (21). Por otro lado, existe cierto beneficio en el consumo de fruta y verdura en una dieta equilibrada en la incidencia tanto de adenomas como de CCR (22,23). También se ha visto que una dieta rica en pescado, productos lácteos y fibra se asocian con una disminución del riesgo de CCR (24).

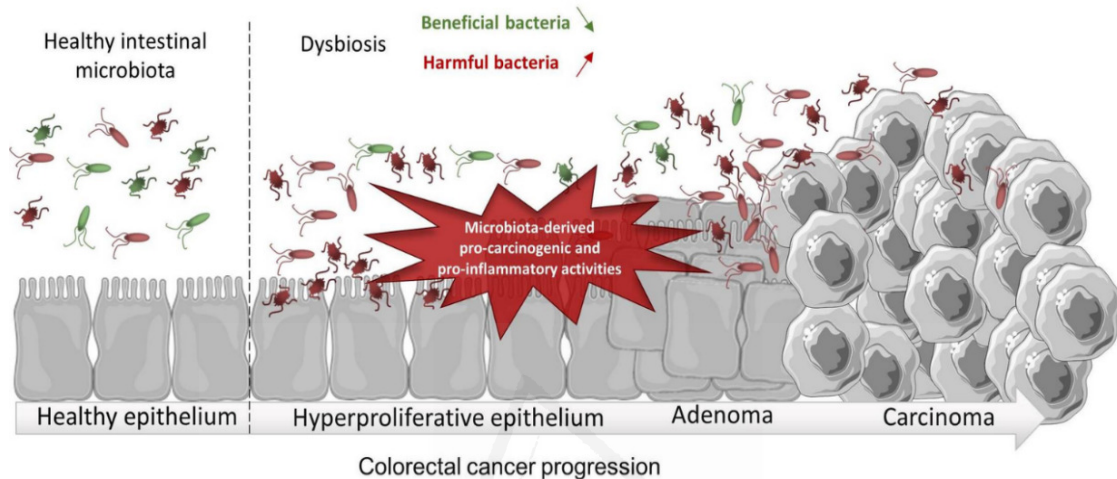
### o Microbiota

La composición de la microbiota intestinal está fuertemente influenciada por diversos factores entre los cuales se incluye la dieta (25–27). La dieta, puede tener un impacto muy marcado en el ambiente del intestino y un cambio en la ingesta de los 3 macro-nutrientes principales (carbohidratos, proteínas y grasas) puede afectar significativamente a la composición del microbiota (28). Bacterias específicas del tracto intestinal han sido asociadas con la patogénesis del CCR,

al igual que se ha detectado un aumento significativo de células inmunoreactivas IL-17 en mucosa de pacientes con CCR comparado con la mucosa de controles con colonoscopia normal (29). Cambios en la población bacteriana y a consecuencia en los productos del metabolismo pueden contribuir a enfermedad (29). Hasta un 20% de los cánceres humanos son producidos por microorganismos (30).

Se ha detectado que subgrupos de *Clostridium leptum* y *Clostridium coccoides* son específicos del CCR y poliposis (31). También se ha detectado un incremento en especies de *Fusobacterium* en tejido tumoral de CCR comparado con tejido de controles sanos (32,33). Además, estudios en modelos experimentales han demostrado que el *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) puede causar la carcinogénesis y progresión del CCR (34,35). A pesar de ser una bacteria comúnmente encontrada en la boca y vías respiratorias, un metaanálisis reciente publicado por Nature (36) ha observado que los niveles de esta bacteria se encuentran significativamente incrementados en las heces de pacientes con CCR comparado con las heces de controles sanos. La asociación de esta bacteria con el CCR ha sido reportada en múltiples estudios (37–39). Otro estudio demuestra que los pacientes con CCR presentan niveles elevados de *Bacteroides/Prevotella* (29). Además, se conoce que el enterotoxigénico *Bacteroides fragilis* (ETBF) genera una metaloproteasa llamada *fragilisin* que induce la transcripción de *c-myc* en las células epiteliales del intestino induciendo una proliferación celular persistente (40). Estos datos sugieren que el ETBF puede tener el potencial de contribuir en la transformación oncogénica del colon. Además la elevada concentración de ETBF encontrada en pacientes con CCR comparado con controles sanos respalda esta teoría (41,42).

La condición conocida como disbiosis, en la cual se interrumpe la relación natural entre el huésped y la microbiota intestinal, es considerada como una de las causas más probables de enfermedad inflamatoria intestinal (43–46) o CCR (44), (46–49) (**Figura 4**).

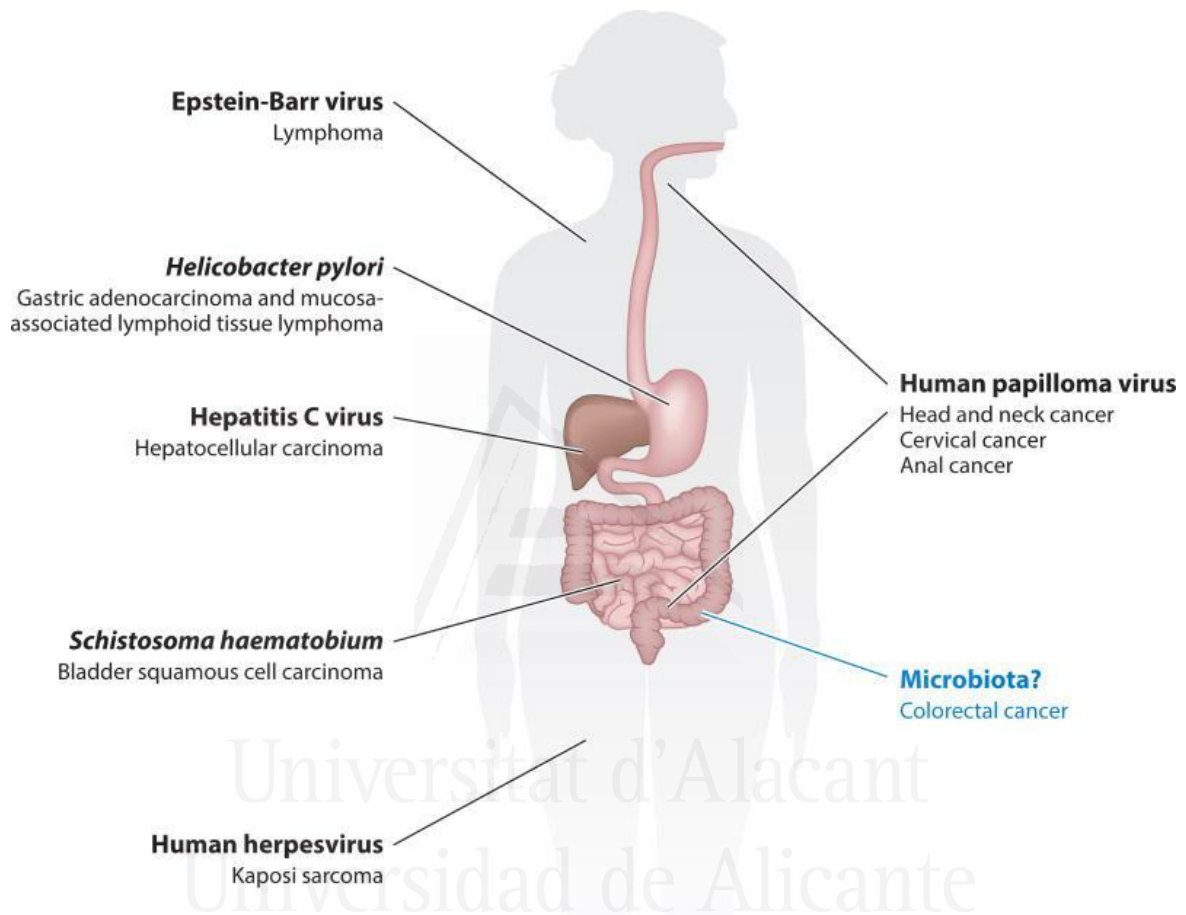


**Figura 4. Disbiosis microbiana en el intestino y su asociación con el desarrollo del CCR.**

Imagen importada de *"Int J Mol Sci 2017; 18:1310"*.

El concepto de cáncer mediado por microbios es antiguo, dados los papeles bien descritos de *Helicobacter pylori* en el cáncer gástrico (50), el virus del papiloma humano en el cáncer cervical (51), el virus de la Hepatitis C en el cáncer de hígado (52), el virus del Epstein Barr en el linfoma (53), el herpes virus en el sarcoma de Kaposi (54) y el *Schistosoma haematobium* en el cáncer de vejiga (55) (**Figura 5**). La microbiota intestinal, ya sea como microbios individuales (56) o como una comunidad microbiana que ejerce un efecto colectivo, puede potenciar o mitigar el riesgo de CCR. La alta densidad bacteriana en el colon y el descubrimiento que las bacteriemias con ciertos microbios como *Streptococcus gallolyticus* pueden ser indicadores clínicos de adenomas de colon ocultos (tumores precancerosos) y CCR subrayan la importancia de estudiar el papel de

los microbios intestinales en CCR (57). Los mecanismos por los cuales los microbios influyen en la tumorigénesis del intestino, un ambiente particularmente rico en microbios e inmunológicamente complejo, aún no se han aclarado por completo.



**Figura 5. Microbios con roles bien caracterizados en el desarrollo de cánceres específicos.**

Imagen tomada de "Annu Rev Microbiol 2016; 70: 395–411".



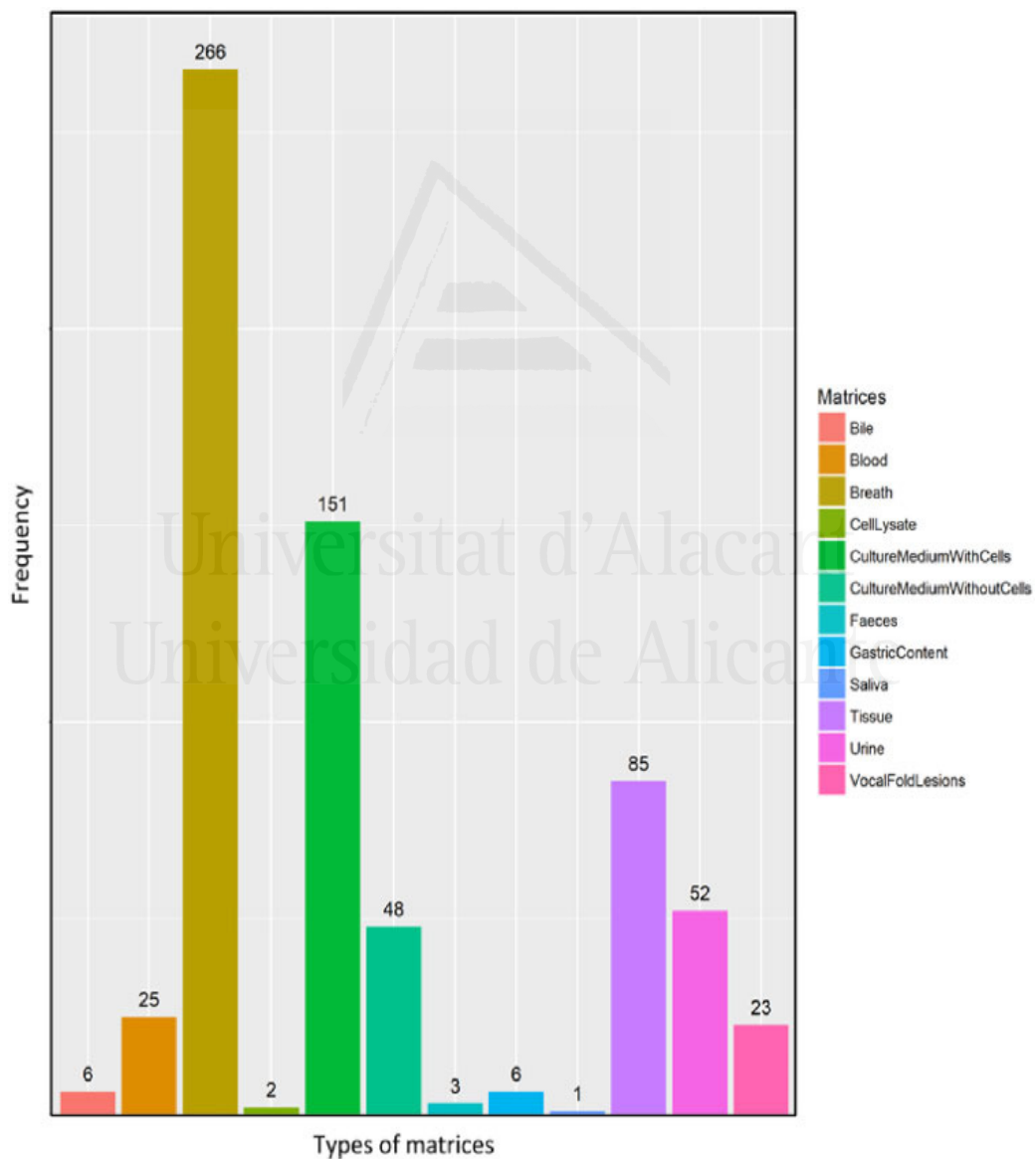
- Compuestos orgánicos volátiles

Distintas muestras biológicas humanas que muestran cualquier tipo de cambio metabólico que se produce durante procesos endógenos como inflamación, cambio de la flora bacteriana, necrosis, cáncer y ante factores externos como contaminación, medicación y dieta emiten compuestos orgánicos volátiles (COVs) (58). Un cambio en el aroma puede ser indicador de enfermedad. Por lo tanto, los COVs pueden ser biomarcadores útiles para el diagnóstico de enfermedades.

La búsqueda de COVs específicos para la detección de cáncer se ha incrementado recientemente, y un estudio publicado en 2019 (59) ha recopilado toda la información publicada hasta el momento sobre los COVs detectados en pacientes con distintos tipos de cáncer comparado con controles sanos, y han creado una base de datos “Cáncer Odor Database” (COD) (60). En el COD se pueden buscar COVs específicos para ver con qué cánceres se han asociado, también se puede hacer la búsqueda por tipo de cáncer, matrices analizadas (aliento, orina, heces, sangre) y hasta por el método de extracción de COVs utilizado.

La evaluación de la base de datos COD indica que la búsqueda más extensiva de COVs relacionados con el cáncer se ha realizado en aliento (**Figura 6**), mayormente para la detección del cáncer de pulmón. Esto se debe a la facilidad de muestreo, al bajo coste y debido a que el aliento se puede analizar a tiempo real (61). Hasta la fecha no se han publicado muchos estudios de análisis de COVs en heces, dada la complejidad de la matriz. Por otro lado, la interacción directa hez-cáncer (en el caso de CCR) hace pensar que las heces pueden ser la matriz ideal para la búsqueda de biomarcadores específicos, aunque hasta la fecha no haya contribuido a la detección de muchos COVs relacionados con

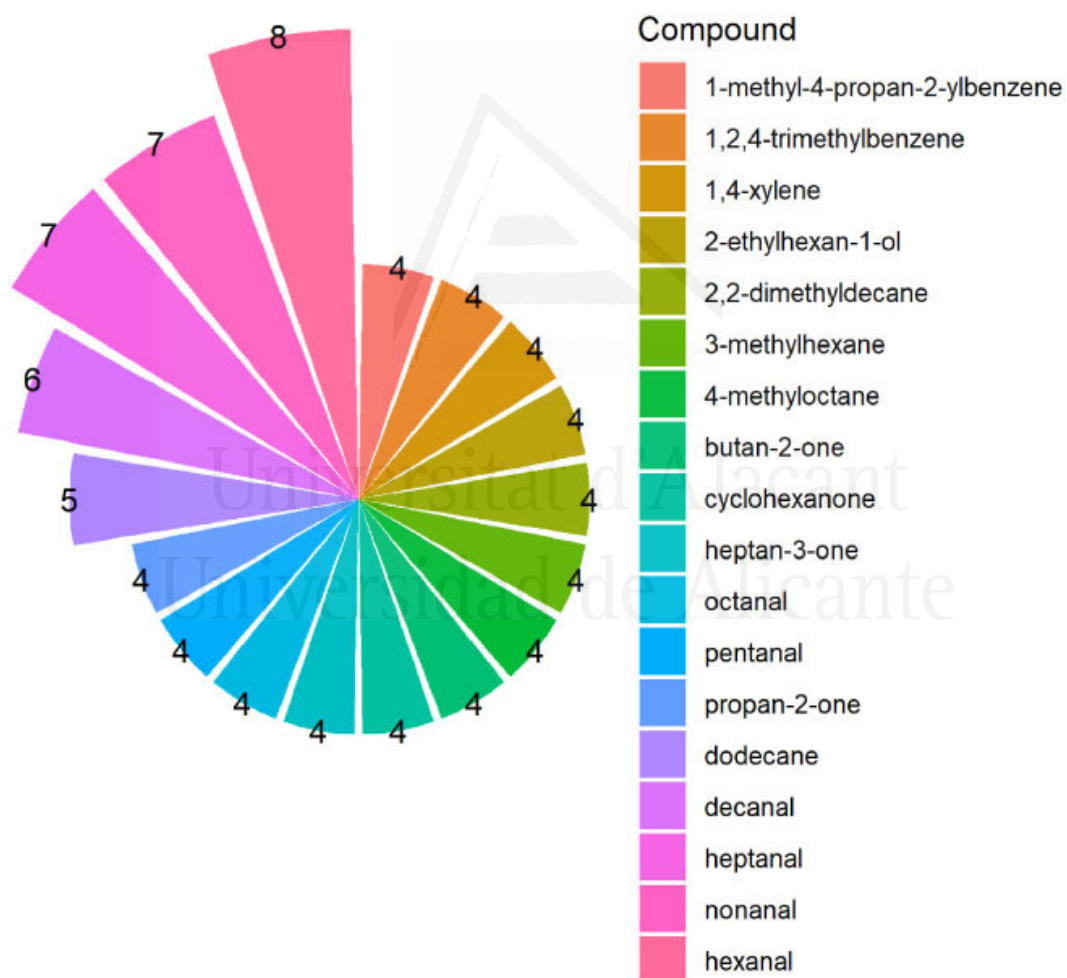
cáncer. Hoy en día, queda por determinar si estos volátiles son el resultado de cambios en el microbioma en el contexto de adenoma avanzado (AA) o CCR, o si son un subproducto metabólico directo. Diferentes estudios demuestran cambios en el microbioma de pacientes con CCR (31,62), y otros estudios encuentran una asociación entre factores ambientales como la edad, sexo, índice de masa corporal (IMC) y medicación con un cambio de la composición fecal de COVs (63).



**Figura 6. Frecuencia de detección de COVs en distintas matrices biológicas.**

Ilustración importada de "Biol Methods Protoc 2019; 4: bpz014"

Mediante el COD, se han encontrado COVs generales asociados a más de 4 cánceres y algunos COVs específicos de algunos tipos de cáncer. Los COVs generales, se pueden clasificar en 5 grupos principales *aldehídos* (heptanal, hexanal, decanal, nonanal, pentanal, y octanal), *cetonas* (acetona, 3-heptanona, 2-butanona, y ciclohexanona), *alcoholes* (2-etilhexanol), *hidrocarburos* (dodecano, 3-metilhexano, 4-metiloctano, y 2,2- dimetildecano), y *compuestos aromáticos* (1,2,4-trimetilbenzeno, 1-metil-4-propan-2-ilbenzeno, y p-xileno) (Figura 7).

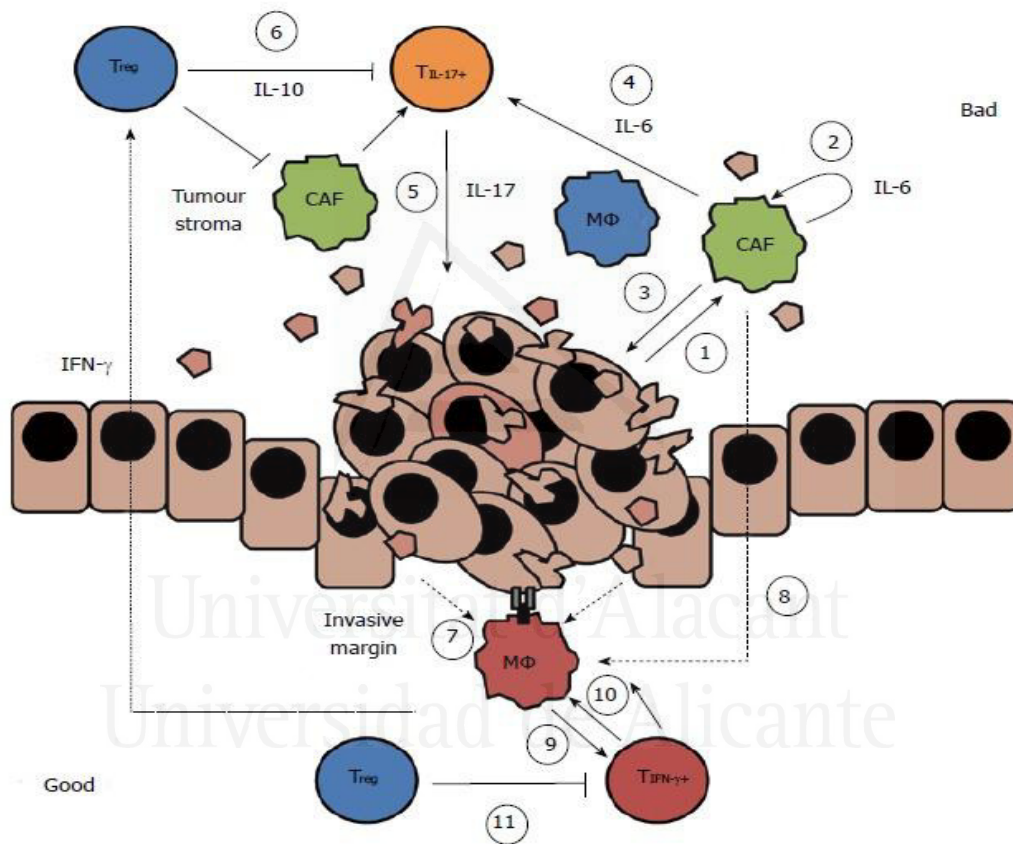


**Figura 7. COVs relacionados con cuatro o más de cuatro tipos de cánceres. Se indica la cantidad de diferentes tipos de cáncer en los que se asocian los COVs.**

*Ilustración importada de "Biol Methods Protoc 2019; 4: bpz014"*

### 1.1.3. Inflamación y CCR

El CCR es una enfermedad altamente heterogénea (64) y la respuesta inmune en el cáncer es igual de compleja. El microambiente tumoral induce cambios en el fenotipo de múltiples tipos de células del sistema inmune (Th1 - Th2 - Th17) para favorecer su supervivencia en respuesta a señales inflamatorias o supresoras enviadas por el tumor o células asociadas al tumor (65,66) (**Figura 8**).



**Figura 8. Interacción celular en el CCR**

Los fibroblastos asociados a tumor (CAF) y los macrófagos (MO) juegan un papel importante promoviendo la progresión tumoral en el estroma mediante la IL-6. Por el contrario, la respuesta inmune en el margen invasivo inhibe el crecimiento tumoral mediante MO y células T. 1) Factores desconocidos del tumor promueven la producción de la IL-6 a partir de los CAF; 2) la IL-6 promueve la producción de la IL-6 y la producción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF); 3) IL-6, IL-17 y VEGF producidos mediante los CAF promueven el crecimiento celular, angiogenesis y invasión del CCR; 4) IL-6 producida por CAF o MO promueven la diferenciación de los linfocitos T hacia un fenotipo inflamatorio (Th17) productores de IL-17; 5) Los linfocitos T productores de IL-17 promueven la progresión del CCR y están asociados a un peor pronóstico para los pacientes; 6) los Treg inhiben la respuesta inflamatoria IL-17; 7,8,9,10,11) los MO del margen invasivo inducen células T-IFN $\gamma$ + que favorecen la prognosis del CCR.

Ilustración importada de "World J Gastrointest Oncol 2015; 7: 221–232".

La inflamación contribuye a la proliferación, migración y supervivencia de las células cancerosas, lo que puede conducir a la invasión tumoral y a metástasis (67–70). Además, la inflamación en el microambiente tumoral es un componente importante de la respuesta inmune asociada al tumor. Las células y moléculas inflamatorias pueden actuar para iniciar y mantener la inmunidad tumoral (71,72).

Las células T helper (Th) del grupo de diferenciación CD 4+, son una población celular que presentan una gran plasticidad y heterogeneidad y exhiben una función crítica en las respuestas inmunológicas tumorales (73). Las células Th CD4 + se clasifican en 4 subtipos, Th1, Th2, Th17 y células T reguladoras (T reg), cada uno con su repertorio de citoquinas que gobierna la respuesta inmune global a través de una red compleja (74).

Las células Th1 producen interferón gamma (IFN $\gamma$ ), interleucina (IL)-2, IL-12 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), que están involucradas en la respuesta proinflamatoria. Las citoquinas asociadas a Th1 exhiben potentes efectos anti tumorales al activar los linfocitos T citotóxicos CD8 + y la citotoxicidad mediada por las células natural killer (NK). Por el contrario, las células Th2 secretan citoquinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, que median la respuesta humoral anti-inflamatoria y la supresión inmune mediante la inhibición de la producción de citoquinas Th1 (75).

Las células Th17 y las T reg se caracterizan por ser células T CD4+ productoras de IL-17 y citoquinas de la familia del factor de crecimiento tumoral (TGF $\beta$ ) (76). Una alteración en esta red, puede derivar en la disfunción del sistema inmune, crecimiento celular descontrolado, inflamación crónica y por último carcinogénesis (77). Parece que una respuesta mediada por las células Th1 y CD8+ citotóxicos

predicen una señal pronóstica positiva del CCR, mientras que se ha demostrado que una respuesta mediada por las células Th17 y T reg (productoras de IL-17) pueden promover la tumorigénesis y se asocian a una drástica disminución de la tasa de supervivencia libre de enfermedad en los estadios iniciales del CCR (I/II) (78).

- Papel de la IL-23, IL-17A y IL-6 en el desarrollo de adenomas y CCR

La IL-23, es una citoquina inflamatoria perteneciente a la familia de citoquinas IL-12 y es secretada por diversos tipos celulares como células dendríticas y macrófagos (79,80). La IL-23 induce la expansión de células Th productoras de IL-17A (células Th17) (81,82). La IL-17A, es una citoquina inflamatoria secretada por diversos tipos celulares; Th17 (83,84), T reg (85), NK y neutrófilos (86,87) entre otros, que induce que el estroma produzca factores que sostengan la proliferación tumoral, supervivencia y angiogénesis (88). Los niveles de la IL-17A están incrementados en el estroma de pacientes con CCR y en el epitelio intestinal de pacientes con adenomas de colon (89). Estudios experimentales indican que la IL-17A promueve la tumorigénesis intestinal (90–92) ya sea induciendo la proliferación de células epiteliales aberrantes (92) o por la secreción de la IL-6 mediante el estroma tumoral (88). Además, la IL-17A promueve la angiogenesis mediante la producción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (88,91). La IL-6, es una citoquina inflamatoria con efecto pleiotrópico en inflamación, respuesta inmune y hematopoesis. Induce la secreción de la proteína C reactiva (PCR) desde el hígado. Además, se ha demostrado que en combinación con el TGF $\beta$ , la IL-6 es indispensable para la diferenciación de las células T CD4 + vírgenes a Th17 (84).

Estudios recientes, vinculan la vía Th17 con el desarrollo y promoción del CCR. Se ha demostrado que los adenomas colónicos tienen una sobre-expresión de la IL-23 y IL-17 comparado con tejido no tumoral adyacente (93,94). Otros estudios demuestran que la IL-23 y IL-17A contribuyen a la tumorigénesis del CCR y al cáncer relacionado a inflamación (95). Se ha observado que los niveles de IL-17A en suero de pacientes con CCR están elevados comparado con los niveles en suero de pacientes sanos (96). La IL-6 se ha visto asociada con el desarrollo esporádico del CCR (97) y cáncer asociado a colitis (CAC) (98). Es importante destacar que una expresión elevada de IL-23, IL-17 e IL-6 en el CCR (I-IV) se ha relacionado con un pronóstico adverso y una enfermedad más agresiva (99).

- Papel de la IL-4 y IL-2 en el desarrollo de adenomas y CCR

La IL-4, es una citoquina inflamatoria de la vía Th2 que se ha visto sobreexpresada en las etapas iniciales del desarrollo del CCR, incluyendo en pólipos hiperplásicos, adenoma y adenomas serrados (100). Además, diversos estudios experimentales indican el efecto protumoral de esta citoquina en el CCR (101–103). La IL-2, es una citoquina inflamatoria secretada por los linfocitos Th1. Se ha observado que el receptor de la IL-2 (IL-2R) se encuentra incrementado en el suero de pacientes con CCR comparado con el suero de controles sanos. Parece ser, que un incremento de la IL-2R, puede estar involucrado en causar la desregulación de la función de Th1 y Th2 en la respuesta inmune, hacia un estado de inmunosupresión (104).

- Papel de la PCR

La PCR es una proteína de fase aguda que se sintetiza en el hígado en respuesta a la señalización mediada por citoquinas proinflamatorias, principalmente a través de la IL-6 y TNF $\alpha$  (105). Es un marcador sensible, no específico de la inflamación sistémica. Varios estudios han detectado concentraciones elevadas de PCR circulante en pacientes con CCR comparado con controles sanos (106,107). Además, una revisión sistemática de estudios prospectivos mostró un mayor riesgo de CCR asociado con la elevación de la PCR (108). Sin embargo, los datos publicados son menos concluyentes con respecto a la asociación entre la PCR sérica y los adenomas colorrectales. Si bien algunos estudios han observado que la PCR está asociada con un mayor riesgo de adenomas colorrectales (109,110), otros han encontrado asociaciones nulas (111–113) o incluso inversas (114). Un estudio prospectivo de quimioprevención de adenomas colorrectales no encontró ninguna asociación significativa entre los niveles de PCR y la ocurrencia de adenomas, pólipos serrados o neoplasias avanzadas (115).

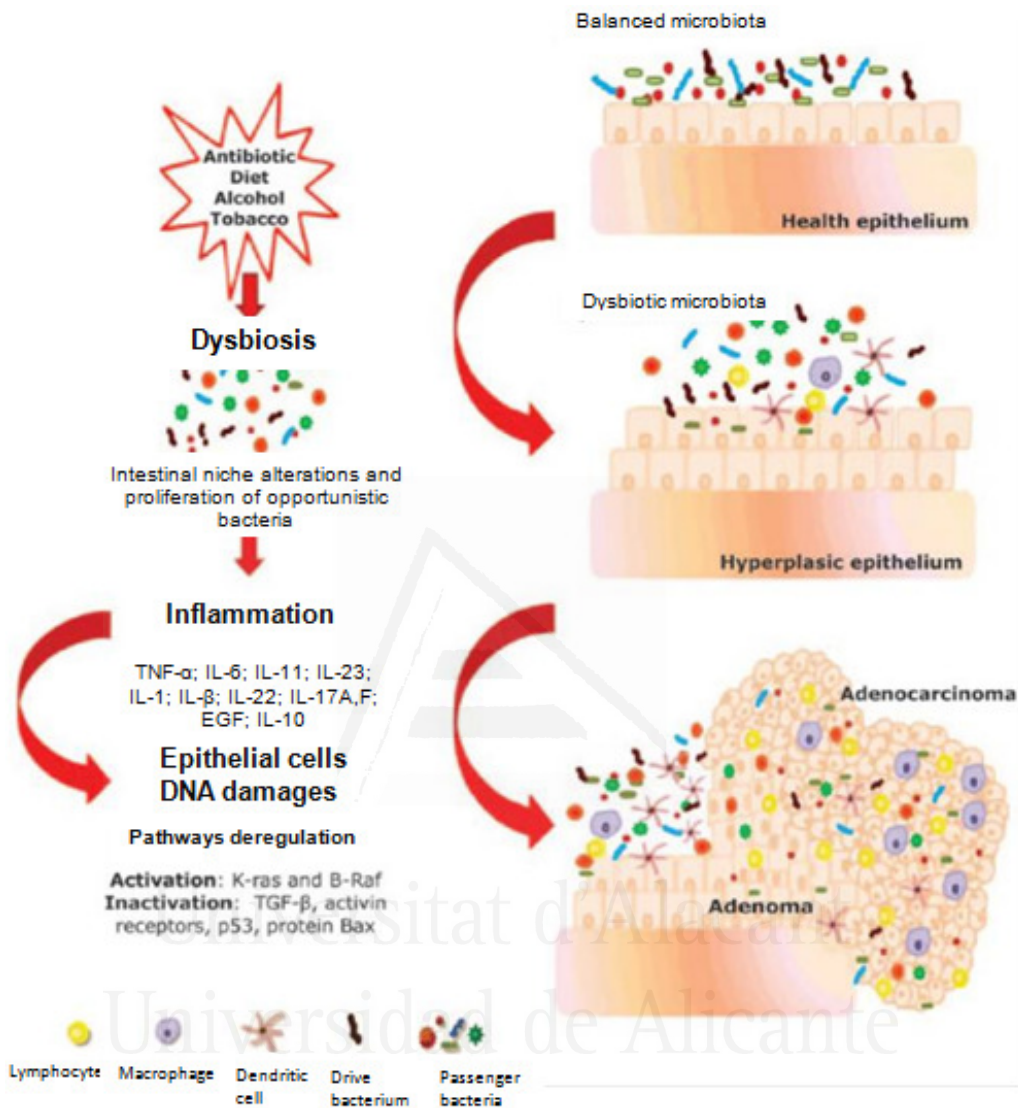


#### 1.1.4. Disbiosis microbiana y el desarrollo del adenocarcinoma

Existen distintas teorías sobre cómo la microbiota influye en el desarrollo del CCR. Grivennikov et al. en 2013 (93) propusieron que el crecimiento tumoral en el colon se produce por una pérdida de la función de la barrera intestinal que permite la entrada de productos microbianos al microambiente tumoral activando así la respuesta mediada por las células Th17. El desarrollo de células Th17 se promueve por diversas citoquinas como la IL-6, IL-1 y IL-21 y todas ellas pueden ser inducidas por componentes microbianos (116). En tumores con una barrera intestinal deficiente otras especies microbianas pueden invadir el tumor e inducir la firma 'IL-23/T<sub>H</sub>17'.

Tjalsma et al. en 2012 (117) propusieron el modelo de bacterias “conductoras-pasajeras” (**Figura 9**). Cogieron la idea de una hipótesis propuesta por Sears y Pardoll (118) sobre “alpha-bugs”, donde expusieron que los “alpha-bugs” como el ETBF son bacterias directamente pro-oncogénicas capaces de remodelar la respuesta inmune y la comunidad bacteriana del colon para promover el CCR. De acuerdo al modelo de bacterias “conductoras-pasajeras”, distintas bacterias intestinales son capaces de dañar el ADN de las células epiteliales colónicas (CEC) produciendo una inestabilidad del genoma y dando lugar a la primera fase de la progresión del cáncer. También pueden inducir alteraciones en la permeabilidad de la mucosa, lo que favorece la translocación de bacterias y toxinas bacterianas, provocando una respuesta inflamatoria intestinal que contribuye al desarrollo y la progresión del cáncer. El microambiente tumoral podría afectar a la regulación microbiana, alterar la composición de la microbiota por presión selectiva y, por lo tanto, podría apoyar el crecimiento de bacterias

oportunistas específicas (bacterias pasajeras) que potencialmente tienen efectos cancerígenos (119,120).



**Figura 9. Descripción de cómo la disbiosis bacteriana puede dar lugar al desarrollo del adenocarcinoma.**

Ilustración importada de "Therap Adv Gastroenterol 2018; 11: 1756284818783606"

Siguiendo la idea de bacterias con capacidad pro-oncogénica Garrett WS en 2015 (56) sugirió que los microbios son capaces de alterar la señalización de la vía B-catenina induciendo una proliferación celular permanente de las células epiteliales y finalmente cáncer. Actualmente, se conoce que varios microbios

poseen la capacidad de activar vías de señalización involucradas en la carcinogénesis. La vía de señalización Wnt/B-catenina que regula la polaridad y crecimiento celular (121) se encuentra alterada en distintos tumores. Diversas bacterias asociadas a cáncer pueden influenciar la señalización de B-catenina. Por ejemplo se conoce que el *Helicobacter pylori* expresa una proteína llamada CagA, que se inyecta directamente dentro del citoplasma de las células del huésped y modula la señalización aberrante de B-catenina (122). La activación de la B-catenina mediante CagA induce la sobreexpresión de genes relacionados con la proliferación celular, supervivencia y migración al igual que angiogénesis. Por otro lado, el *F.nucleatum* se ha visto asociado a adenomas colorrectales y adenocarcinoma humano y a un aumento de tumorigenesis intestinal en ratones (34,123). *F. nucleatum* expresa la proteína FadA, que es un componente de adhesión que se encuentra en la superficie bacteriana y se une con la E-cadherina presente en las células intestinales del huésped, induciendo la activación de B-catenina (35). Por otro lado, el *ETBF* que se encuentra incrementado en CCR (124) estimula la excisión de la E-cadherina mediante Btf, dando lugar a la activación de la B-catenina (125). *Salmonella typhi* secreta la proteína AvrA, que puede activar la señalización mediante B-catenina epitelial (126) y está asociado a cánceres hepatobiliares (127). Puesto que algunas de estas bacterias son constituyentes normales del microbiota intestinal, parece ser que la pérdida de la apropiada función de la barrera intestinal es un paso crítico para el desarrollo de algunos tumores.

### **1.1.5. Técnicas de detección del CCR**

La clave para la disminución de la mortalidad por CCR se encuentra en el diagnóstico temprano de la misma, por lo que se han desarrollado programas de cribado.

Los métodos de cribado del CCR que se utilizan actualmente son el test inmunológico fecal (FIT) y la colonoscopia. Aunque estos programas de cribado hayan disminuido la mortalidad, su rendimiento no es óptimo. El FIT presenta una sensibilidad y especificidad para el CCR de 79% y 94%, respectivamente (128). Esto resulta en muchos falsos negativos y a consecuencia diagnósticos perdidos del CCR en 11-44% de los casos. Además, un 3-6% de los participantes sanos sometidos a cribado poblacional reciben un resultado de falso positivo, lo que conlleva un uso innecesario de colonoscopias. Las colonoscopias son una técnica invasiva, con un riesgo de complicaciones (sangrado o perforación), así como un elevado coste. Debido a estas limitaciones, existe una verdadera necesidad de descubrir una técnica no invasiva precisa para la detección del CCR.

#### **1.1.5.1. Técnicas novedosas en estudio**

Se están desarrollando nuevos métodos de detección no invasivos del CCR como pruebas de ADN fecal (129) y microRNA (130). El método más reciente para el diagnóstico no invasivo del CCR, es el análisis del volatoloma fecal.

Desde los tiempos de la medicina clásica se ha utilizado el sentido del olfato para caracterizar algunas enfermedades. Hipócrates, padre de la medicina, unos 400 años antes de Cristo instruyó a sus alumnos a que olieran el aliento de sus pacientes para intentar detectar un aroma indicador de enfermedad (131). En el

siglo XI, Avicena (físico y filósofo Árabe) utilizó su sentido del olfato para diagnosticar enfermedades basándose en cambios en el olor de la orina de sus pacientes (132). La medicina tradicional China también utilizó el olfato como método de diagnóstico de la diabetes, cuando la orina de los pacientes olía a manzanas podridas (133). En la primera mitad del año 1980, se aplicó un test de aliento en gastroenterología para medir la concentración de urea para el diagnóstico de gastritis asociada a *Helicobacter pylori* (134) y en el año 1989, Williams y Pembroke (135) demostraron que los perros rastreadores podían ser entrenados para detectar el melanoma, sugiriendo que puede existir una “huella olfativa” para cualquier enfermedad.

En esta nueva era de desarrollo tecnológico se están desarrollando dispositivos que permitan «cuantificar» y «diferenciar» este olor de una forma más precisa. Para ello se están utilizando equipos altamente sofisticados como la cromatografía de gases (GC) unida a espectrometría de masas (MS), tubo de selección de iones con flujo y detección por espectrometría de masas (SIFT-MS) y narices electrónicas para su determinación. Lo que se mide mediante estos equipos son los COVs. Los COVs, reflejan cualquier cambio metabólico que pueda producirse por procesos como la inflamación, cáncer, necrosis y frente a cualquier factor externo como la contaminación, medicación y dieta (58). Los equipos comúnmente utilizados para la detección de COVs son: la nariz electrónica, GC-MS y SIFT-MS. Estos equipos cuentan con ciertas ventajas y desventajas resumidas en la **Tabla 1**.

**Tabla 1. Resumen de las ventajas y desventajas de las distintas técnicas analíticas.**

<b>Técnica analítica</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
Nariz electrónica	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Mediciones a tiempo real.</li> <li>- Fácil de usar.</li> <li>- Portable y pequeño.</li> <li>- Sensibilidad en un rango ppb.</li> <li>- Análisis de alto rendimiento.</li> <li>- Coste de compra y mediciones barata.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-No se pueden identificar COVs específicos.</li> <li>- No se pueden comparar los resultados entre distintos dispositivos.</li> <li>- Ruptura del sensor con el tiempo.</li> </ul>
GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Identificación de COVs específicos.</li> <li>- Reproducible.</li> <li>- Sensibilidad en rango ppb/ppt.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Caro y requiere mucho tiempo y personal preparado.</li> <li>- Sistema fijo inmóvil.</li> <li>- No se pueden hacer mediciones a tiempo real.</li> </ul>
SIFT-MS	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Mediciones a tiempo real.</li> <li>- Rápido.</li> <li>- Sistema móvil.</li> <li>- Sensibilidad en rango ppb.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-No se pueden identificar COVs específicos.</li> </ul>

Abreviaciones: ppb; µg/L.

- La *nariz electrónica*, es un instrumento que comprende una matriz de sensores, que pueden ser sensores electroquímicos, sensores de óxido metálico, etc. Los sensores experimentan cambios específicos en su resistencia eléctrica al ser expuestos a COVs y gracias a un sistema de reconocimiento de patrones capaz de integrar la señal de cada uno de los sensores se crea una “huella olfativa” (136). Estos dispositivos funcionan como el sistema olfativo humano, son capaces de detectar conjuntos de compuestos volátiles pero no COVs específicos ni su concentración.

- La *GC-MS* es el método de análisis de COVs más habitual para el diagnóstico del CCR. Este método analiza con éxito la composición de COVs de heces, orina, sangre y otras muestras biológicas y aporta información detallada de COVs individuales junto a su concentración. Se considera que es el mejor método para el análisis de volatolomas puesto que permite la separación e identificación de mezclas complejas.
- *El SIFT-MS* fue creada por Smith y Spanel (137) en el año 2005 y utilizada por primera vez por el grupo de Batty y otros (138) para el análisis del metaboloma fecal y búsqueda de biomarcadores para el diagnóstico del CCR. Esta técnica permite mediciones a tiempo real y por tanto es más rápida que la *GC-MS*, pero proporciona información menos detallada de la composición de los COVs. La espectrometría de masas está acoplada a un tubo de selección de iones donde los COVs se ionizan por iones precursores ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ,  $\text{NO}^+$  y  $\text{O}_2^+$ ). Los iones precursores se introducen en el tubo mediante helio ( $\text{He}$ ) donde interaccionan con los COVs y entran en un segundo espectrómetro de masas cuadrupolar donde se separan.

Existen diversas publicaciones de estudios donde los COVs se analizan en distintas muestras biológicas mediante técnicas analíticas avanzadas (*GC-MS*, nariz electrónica y *SIFT-MS*) para diagnosticar enfermedades como entre otras el cáncer (138–140).

En cuanto a las muestras el aliento o heces son las más analizadas.

- Aliento

En la actualidad, en la clínica diaria el óxido nítrico exhalado se mide para el diagnóstico del asma (141). Además, las narices electrónicas se están utilizando como herramientas para identificar pacientes con cáncer de pulmón (142–145), EPOC (145–147) y asma (146,147). Otros estudios demuestran que algunos de los COVs emitidos por células de cáncer de pulmón en cultivo, también se encuentran en el aliento de personas con cáncer de pulmón. Este descubrimiento demuestra que existen COVs específicos para el cáncer de pulmón (148). También hay estudios que miden COVs en aliento para el diagnóstico de cáncer de mama pero la significancia clínica y biológica de los resultados encontrados no está clara (149,150).

Actualmente existen diversos estudios en la bibliografía que analizan COVs en aliento para el diagnóstico del CCR. Peng et al. (58) fue el primero en publicar un estudio del análisis metabólico en aliento de pacientes con CCR e identificó COVs capaces de discriminar pacientes con CCR de controles sanos. Otros estudios le siguieron, como el de Wang et al. (151), quien detectó un incremento significativo de 9 COVs en el aliento de pacientes con CCR y la disminución de un COV comparado con el grupo control. En 2015, el grupo de Amal et al. (152) publicó los resultados de un estudio donde se comparaban los COVs del aliento de pacientes con CCR y controles sanos y encontraron que 4 COVs se encontraban a concentraciones significativamente diferentes entre ambos grupos.



## - Heces

Para el estudio de enfermedades gastrointestinales, parece que las muestras fecales tienen el mayor potencial puesto que las heces están en contacto directo con el intestino y por tanto con la enfermedad.

El volatoloma fecal puede reflejar alteraciones en el microbiota intestinal mediante cambios en los COVs creados por la interacción intestino-microbiota (153). En los últimos 20 años, muchos estudios se han centrado en el potencial del análisis de COVs fecales para la detección del CCR con resultados prometedores (154–156).

Bond et al. (139) analizaron COVs fecales de pacientes con CCR y controles sanos mediante la microextracción de fase sólida (SPME) seguido de GC-MS y observaron que los pacientes con CCR presentaban concentraciones significativamente mayores de propan-2-ol. Otro estudio patentado en 2018, demostró la asociación entre altas concentraciones de 1,3-di-terc-butilbenceno, octadecano, 2-pentadecanona y pentadecano y el CCR (157). Batty et al., analizaron COVs fecales mediante la técnica SIFT-MS y observaron que en particular el sulfuro de hidrógeno puede ser un marcador significativo útil para la detección o diagnóstico del CCR (138). El pequeño número de sujetos y el uso de distintas plataformas y técnicas analíticas utilizadas en cada estudio impiden la comparabilidad entre ellos, pero todos demuestran un alto valor diagnóstico para la detección del CCR.

Actualmente, existen narices electrónicas patentadas como el *SCENT A1* (158) que está siendo validado para la identificación de biomarcadores específicos en pacientes con CCR comparado con controles sanos, y el *Cyranose 320* (140) demostró ser capaz de discriminar pacientes con CCR de controles sanos con

una sensibilidad del 85% y una especificidad del 87%. También parece que puede diferenciar pacientes con CCR y AA con una sensibilidad y especificidad del 75% y 73%, respectivamente. Estas técnicas no son capaces de identificar COVs individuales ni su concentración, y la búsqueda de COVs que sirvan como buenos biomarcadores de enfermedad (CCR y AA) sigue activa.

- Otras muestras biológicas

Algunos estudios han relacionado COVs de orina con distintos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de próstata (159), cáncer renal (160) y cáncer de vejiga (161). Los patrones de COVs en pacientes con cáncer a menudo difieren de los patrones de COVs de muestras de orina de controles sanos. Matsaruma et al. (162) demostró que la orina de ratones con cáncer de pulmón presentaba concentraciones significativamente distintas de COVs comparado con controles sanos. Estudios han demostrado que COVs específicos en sangre pueden ser útiles para predecir y diagnosticar enfermedades, como cáncer de ovario (163), CCR (164) y cáncer de pulmón (165).

## **1.2. POLIPOSIS COLÓNICAS**

### **1.2.1. Pólipos: definición y clasificación**

Un pólipo es una lesión de estructura diversa que se forma y crece en las membranas mucosas de diferentes cavidades, como la nariz, el colon y, en la mujer, la vagina y la matriz (166). Los pólipos colorrectales pueden clasificarse en función de su histología y en función de su forma de crecimiento. Según su forma de crecimiento se puede hablar de pólipo pediculado, los cuales tienen un tallo de implantación de unos 1,5 cm o de pólipo sésil si tienen una base de implantación amplia (sin tallo) (167).

Los pólipos colorrectales se clasifican según sus características histológicas en adenomatosos (60-70%), serrados (10-30%) y un grupo variado (10-20%) que incluye pólipos inflamatorios, juveniles, hamartomatosos y otras lesiones no mucosas (168).

### **1.2.2. Pólipos neoplásicos**

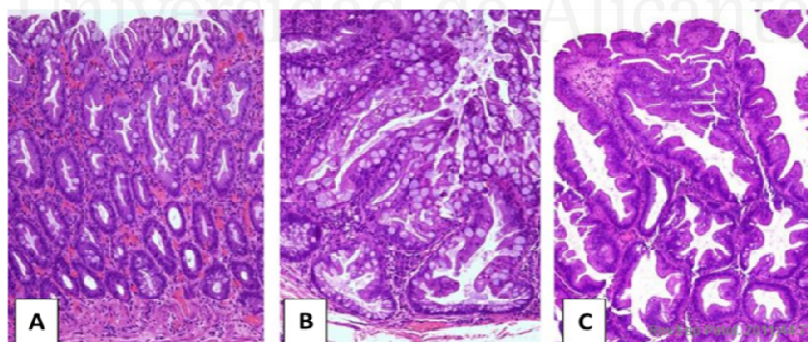
#### **1.2.2.1. Pólipos adenomatosos**

Los adenomas se clasifican histológicamente como tubulares, vellosos o tubulovellosos. El subtipo más habitual es el adenoma tubular (AT), que constituye aproximadamente el 65-80% de los pólipos y presentan menor atipia celular que los adenomas vellosos (AV). Sólo un 5-10% de los pólipos neoplásicos son AV y tienden a presentar displasia o atipia celular severa. Los adenomas tubulovellosos (ATV) presentan características de ambos grupos, siendo un 10-25% de los pólipos. La incidencia a carcinoma invasivo depende de su tamaño y tipo histológico. El riesgo de que un AT menor a 1 cm se convierta en CCR es menor a 5% y puede llegar al 50% de probabilidad en un adenoma

velloso >2cm. Los ATV presentan un riesgo intermedio (22%) (167). Por definición, todos los tipos de adenomas presentan un nivel de displasia, dando lugar a una arquitectura glandular anormal y estructuras intracelulares dañadas. El grado de displasia es diverso y mientras se convierte en más severa (alto grado), el riesgo a malignidad aumenta. De hecho, el término “displasia de alto grado” es sinónimo a carcinoma *in situ*. El grado de displasia normalmente se correlaciona con la histología y tamaño del pólipo.

#### 1.2.2.2. Pólipos serrados

Los pólipos serrados son lesiones epiteliales con una característica en común: histológicamente, su arquitectura recuerda los dientes de una sierra. Dentro de este grupo se incluían los pólipos hiperplásicos (HP), adenomas serrados sésiles (SSA), pólipos mixtos (MP) y adenomas serrados tradicionales (TSA) (169–172). Sin embargo, actualmente la OMS sólo considera pólipos serrados los HPs, SSAs y TSAs (173) (**Figura 10**).



**Figura 10.** Pólipos serrados: **A:** HP; **B:** SSA; **C:** TSA

### **1.2.3. Pólipos no neoplásicos**

#### **1.2.3.1. Pólipos hiperplásicos**

Son los pólipos más frecuentes del colon y recto. Actualmente se considera que pertenecen al grupo de pólipos serrados pero sin potencial maligno como los adenomas serrados sésiles o adenomas serrados tradicionales (174). Normalmente presentan un diámetro <5mm y muestran características histológicas de hiperplasia sin displasia; por este motivo no se consideran lesiones premalignas. En las endoscopias desgraciadamente, no es fácil distinguir un pólipo hiperplásico de uno adenomatoso, por lo que muchos se retiran.

#### **1.2.3.2. Pólipos inflamatorios**

Estos pólipos se encuentran mayormente en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), y en muchas colitis ulcerosas. Estas lesiones, no son pólipos reales sino acumulaciones de infiltraciones inflamatorias que distorsionan la anatomía de la mucosa.

#### **1.2.3.3. Pólipos hamartomatosos**

Estos pólipos principalmente consisten en tejido conectivo (músculo liso, lámina propia e infiltrados inflamatorios) cubiertos por un epitelio hipertrófico. Macroscópicamente, son pólipos pedunculados, rojizos, lisos y, a veces, son indistinguibles de los pólipos adenomatosos pedunculados. Múltiples pólipos hamartomatosos aparecen con síndromes de poliposis genética.

#### **1.2.4. Tipos de poliposis**

##### **1.2.4.1. Poliposis adenomatosa familiar (PAF)**

Es una enfermedad genética autosómica dominante, responsable de causar el 1-2% de los CCR, causada por una mutación en el gen APC. Se han descrito varias mutaciones en este gen: la presentación clínica varía según la mutación específica. En general, la presentación clínica de la PAF es el desarrollo de múltiples pólipos adenomatosos en todo el colon y el recto. Además, pueden ocurrir algunas manifestaciones extracolónicas y extra intestinales. Se inicia en edades tempranas durante la infancia o la adolescencia, y la cantidad y el tamaño de los pólipos aumentan con la edad. En la forma grave de PAF, el paciente desarrolla miles de adenomas de colon en la edad adulta y la edad media de desarrollo del CCR es de 35 años si el paciente no recibe tratamiento (175).

##### **1.2.4.2. Poliposis asociada a MUTYH**

La poliposis asociada a MUTYH (MAP) es un síndrome de poliposis autosómico recesivo que se identificó por primera vez en 2002. Está causada por mutaciones bi-alélicas en el gen MUTYH (176,177). Las personas que tienen dos copias de la mutación presentan un riesgo significativamente mayor de poliposis y CCR. Los pólipos observados en MAP son típicamente AT o ATV pequeños o HP. En pacientes no tratados, el riesgo acumulado de CCR se estima en un 80% a los 70 años. En el fenotipo característico, el paciente desarrolla decenas a cientos de pólipos colorrectales, que se detectan en la edad adulta; a diferencia de los miles de pólipos que se desarrollan durante la infancia en pacientes con PAF.

#### **1.2.4.3. Síndrome de poliposis serrada (SPS)**

Se trata de un síndrome caracterizado por la presencia de numerosos pólipos serrados, que pueden ser de gran tamaño (178–180) con historia familiar y un riesgo excepcionalmente alto de CCR (181,182). Dado a que la base genética no está bien definida, la definición sigue siendo fenotípica y presenta un número muy heterogéneo de pacientes. La OMS ha consensuado los criterios clínicos para el diagnóstico clínico de SPS (183) y se considera que debe cumplir uno de los siguientes criterios: 5 o más pólipos serrados proximales al colon sigmoide, 2 de ellos > 10mm; cualquier número de pólipos serrados proximales al sigma en un familiar de primer grado con SPS; o más de 20 pólipos serrados repartidos a lo largo de todo el colon. Se estima que el riesgo de CCR es de 70%, aunque no está establecido (184). Se han descrito familias con un perfil genético de herencia autosómico dominante, autosómico recesivo o sin antecedentes, sugiriendo que dentro del grupo de SPS se engloba un grupo heterogéneo de pacientes que probablemente presenten enfermedades con una base genética diferente.

#### **1.2.4.4. Poliposis de origen desconocido**

Sólo un 20-30% de los casos de múltiples pólipos colónicos presentan una causa genética conocida (mutaciones en los genes APC o MUTYH) (185–188). Por lo tanto, existe un gran número de casos en los cuales no se encuentra una causa genética, y estos pólipos colónicos múltiples son de origen desconocido. En estos casos, la poliposis podría deberse a la participación de otros genes desconocidos de alta predisposición, o a factores ambientales (189,190). Varios factores de riesgo no genéticos se han asociado con un mayor riesgo a desarrollar múltiples

pólipos intestinales, como una edad avanzada, el tabaquismo y el alto IMC (191,192).

El papel de la inflamación en la promoción de la carcinogénesis está bien establecido (193–196). Por lo contrario, se conoce poco sobre el papel de la inflamación en la promoción de pólipos colónicos. La respuesta inflamatoria mediada por los linfocitos Th17, la cual se estabiliza y regula por la presencia de la IL-6, IL-23 y su producto mayoritario la IL-17A, está ganando mucho interés al respecto.

Otra posible causa para la aparición de múltiples pólipos de colon puede ser la radioterapia abdominal (197). Se conoce que la radioterapia acelera la carcinogénesis gastrointestinal en ratones y aumenta el riesgo de cáncer gastrointestinal en humanos, parece probable que la radioterapia tenga un papel causal en el desarrollo de poliposis adenomatosa intestinal (198–201) en aquellos pacientes previamente tratados.

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante





## 2. HIPÓTESIS

---



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



## **Estudio 1**

La identificación de distintos perfiles de COVs fecales entre pacientes con CCR, adenomas y controles sanos podría utilizarse como un método de detección no-invasivo y preciso del CCR.

## **Estudio 2**

Una respuesta inflamatoria incrementada mediada por las células Th17, puede promover la aparición de múltiples pólipos de colon.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



### **3. OBJETIVOS**

---



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



## Estudio 1

Desarrollar un método simple, rápido, económico y sensible en el que se empleen (nano)materiales como sorbentes para retener los COVs y determinarlos mediante TD-GC-MS, y emplearlo como test de cribado no-invasivo para la detección de CCR.

Los objetivos específicos son:

- Desarrollo de (nano)materiales magnéticos (*e.g.*, óxido de grafeno).
- Desarrollo del método de extracción en fase sólida empleando los (nano)materiales magnéticos para la determinación de COVs en muestras sintéticas (*e.g.*, patrones acuosos...).
- Analizar, mediante el método desarrollado, muestras de heces de pacientes con CCR, adenomas y controles sanos para determinar el perfil de COVs en cada grupo de estudio.
- Realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos para estudiar la capacidad del método desarrollado en diferenciar pacientes enfermos (CCR y lesiones premalignas) y sanos.

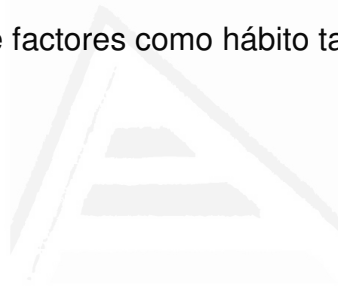


## **Estudio 2**

Determinar qué factores pueden estar causando la aparición de múltiples pólipos en el colon.

Los objetivos específicos de este estudio son:

- Analizar la presencia de citoquinas inflamatorias y niveles de glucosa, insulina y PCR en suero de pacientes con pólipos colónicos múltiples de origen desconocido y compararlo con suero de controles sanos.
- Analizar la relación entre niveles de citoquinas y número de pólipos.
- Analizar si existe una asociación entre los pacientes con múltiples pólipos de colon y presencia de factores como hábito tabáquico, IMC y DM.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

---



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



## 4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El presente trabajo de tesis doctoral se divide en dos partes estructuradas como dos estudios.

Para el desarrollo de los objetivos planteados en cada uno de los estudios se ha dispuesto de distintas cohortes de pacientes independientes.

Cada cohorte de pacientes procede de distintos proyectos de investigación. El primer estudio se ha realizado íntegramente en la Universidad de Alicante (UA), financiado por una ayuda concedida por el Vicerrectorado de Investigación y de Transferencia de Conocimiento (Universidad de Alicante) (UAUSTI 18-04 y UAUSTI 19-05) y por un proyecto concedido por la Conselleria d' Educació, Investigació, Cultura i Esport (Generalitat Valenciana) (PROMETEO/2018/087) al grupo de Espectroscopía atómica-masas y Química Analítica en Condiciones Extremas del departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, y al grupo de Electrocatálisis y Electroquímica de Polímeros del departamento de Química Física. Las muestras se han recogido en la unidad de endoscopias del Hospital General Universitario de Alicante (HGUA).

Para el segundo estudio se han utilizado muestras del proyecto multicéntrico nacional EPIPOLIP, financiado por el Instituto de Salud Carlos III (PI08/0726). A su vez, se han utilizado muestras recogidas en la unidad de endoscopias del HGUA.

Ambos proyectos han sido dirigidos y coordinados por nuestro grupo de investigación.

Con relación al primer estudio de la presente tesis doctoral, se solicitó el informe Previo de Patentabilidad (ITP) ante la Oficina Española de Patentes y Marcas (OEPM). La OEPM trasladó el ITP favorable correspondiente a la memoria en fecha 02.03.2020, en el que se concluye que ninguno de los documentos reseñados en el Listado de Referencias reúne todas las características técnicas reivindicadas. Por ello, se procedió a mandar la solicitud de patente en fecha 26.05.2020. Por otro lado, los resultados del segundo estudio han sido publicados recientemente (Clin. Transl. Gastroenterol. 2020) (202).



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**4.1.1. ESTUDIO 1: Análisis de compuestos orgánicos volátiles en heces de pacientes con cáncer colorrectal, adenomas y controles sanos.**

Sujeto a privacidad.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

### **4.1.1. ESTUDIO 2: Aumento de los niveles séricos de citoquinas relacionadas con las Th17 en pacientes con múltiples pólipos colónicos de origen desconocido**

#### **4.1.2.1 Sujetos y recogida de datos**

Los pacientes incluidos en el segundo estudio que conforma esta Tesis Doctoral provienen de dos cohortes diferentes; los casos proceden del proyecto EPIPOLIP (PI08/0726) y los controles sanos se obtuvieron en la unidad de endoscopias del HGUA de pacientes que se realizaban colonoscopias por síntomas o por un FIT positivo que mostraron una colonoscopia normal.

El objetivo principal del proyecto EPIPOLIP es la caracterización de las poliposis colónicas atenuadas. El proyecto EPIPOLIP es un proyecto multicéntrico en que participan 24 hospitales españoles (ANEXO 1). Para este sub-estudio los casos fueron reclutados de forma prospectiva cuando cumplían los criterios de inclusión y se obtenía una muestra de sangre y suero en el momento de la inclusión. Los casos con 10 o más pólipos de cualquier histología (pólipos adenomatosos o serrados), encontrados en una o en diferentes exploraciones endoscópicas fueron añadidos y aquellos casos que presentaron como único hallazgo menos de 20 pólipos rectales hiperplásicos fueron excluidos del estudio. Pacientes ya diagnosticados de PAF, SL, enfermedad inflamatoria intestinal y los pacientes con mutaciones patológicas germinales en MUTYH también fueron excluidos.

Las colonoscopias fueron realizadas cuando había indicación para ello, en base a los síntomas, el cribado de CCR, o historia familiar de CCR o de pólipos. Los pacientes fueron reclutados prospectivamente durante los años 2008 y 2009.

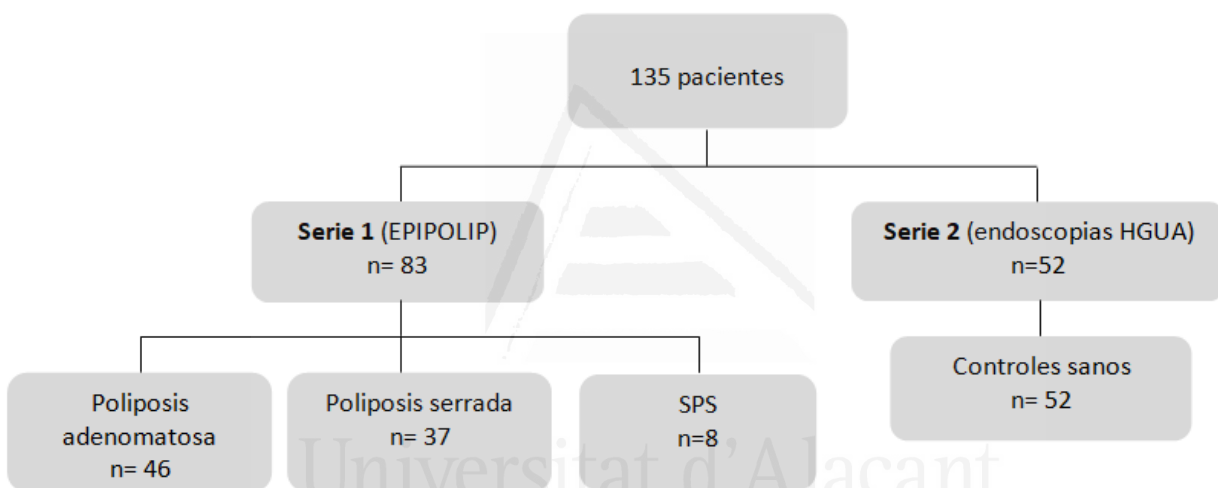
Fueron recogidos datos demográficos relativos a la edad, sexo, IMC, tabaquismo, presencia de DM, resistencia insulínica (HOMA-IR), PCR y niveles de interleucinas inflamatorias (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-17A, IL-23, INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) de un total de 135 individuos. También se recogió información sobre el número, el tamaño, la morfología, la distribución y la histología de los pólipos de colon de los pacientes del proyecto EPIPOLIP.

El estudio fue aprobado por los Comités de Ética de los hospitales participantes, y todos los datos fueron anonimizados por el centro de origen antes de ser registrados en una base de datos centralizada. Los pacientes incluidos en el estudio fueron debidamente informados y de todos ellos se obtuvo el consentimiento por escrito para participar en el mismo.



#### 4.1.2.2 Muestras de estudio

En la Serie 1 se incluyeron un total de 83 muestras de suero y sangre de pacientes del estudio EPIPOLIP de los cuales se analizaron factores de riesgo como interleucinas inflamatorias, PCR y HOMA-IR (glucosa\*insulina/405). En la Serie 2 se recogió suero y sangre de 52 individuos con colonoscopia normal de la unidad de endoscopias del HGUA de pacientes que se realizaban una colonoscopia por sintomatología y obtenían un resultado negativo (**Figura 12**).



**Figura 12. Casos de poliposis y controles estudiados.**

Abreviación: SPS, síndrome de poliposis serrada

Para la clasificación de los pacientes con pólipos, los sujetos fueron clasificados en función de su histología en:

- Poliposis adenomatosas: si más de 50% de los pólipos hallados son adenomatosos.
- Poliposis serradas: si más de 50% de los pólipos hallados son serrados.
- SPS: si cumple criterios clínicos de la OMS de síndrome de poliposis serrada.

La localización de los pólipos se estableció considerando como localización proximal aquellos pólipos extirpados en ciego, colon ascendente o colon transversal; y localización distal cuando estaban presentes en colon descendente (incluyendo ángulo esplénico), sigma o recto.

#### **4.1.2.3 Variables de estudio**

##### **4.1.2.3.1 Variables clínicas**

Las variables clínicas se obtuvieron de las historias clínicas de los pacientes procedentes del HGUA y de los hospitales de origen de los pacientes incluidos en la cohorte del proyecto EPIPOLIP.

Se recogieron las siguientes variables:

- Edad al diagnóstico (años) de múltiples pólipos (la edad de la primera colonoscopia con diagnóstico de pólipos).
- Sexo.
- Variables relacionadas con el estilo de vida: hábito tabáquico, IMC, presencia de DM.

##### **4.1.2.3.2 Variables anatómo-patológicas**

Las variables anatómo-patológicas se obtuvieron de los informes de anatomía patológica y de endoscopias. Se registraron las características histológicas de los pólipos hallados en las colonoscopias, así como la localización, la morfología, el número y el tamaño.

#### **4.1.2.3.3 Variables inflamatorias**

Las variables inflamatorias analizadas fueron:

- Niveles de PCR.
- Niveles de distintas interleucinas inflamatorias (pro y anti-inflamatorias) como: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-17A, IL-23, INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  presentes en el suero de los participantes.

#### **4.1.2.4 Plan de trabajo**

De los pacientes de la cohorte EPIPOLIP se establecieron tres grupos de pacientes. Por un lado pacientes con diagnóstico de poliposis adenomatosa, por otro lado pacientes con diagnóstico de poliposis serradas y por último pacientes con SPS.

Primero se realizó un estudio comparativo de los factores ambientales (hábito tabáquico, DM, HOMA-IR e IMC) entre el grupo de pacientes con poliposis y controles sanos. Tras este análisis se comparó la concentración de interleucinas inflamatorias y de la PCR entre ambos grupos para estudiar la implicación de la respuesta inflamatoria en la génesis de los pólipos.

El plan de trabajo general es el siguiente:

- 1) Selección de pacientes y solicitud de las muestras biológicas: sangre y suero.
- 2) Estudio comparativo de los factores ambientales.
- 3) Análisis de la concentración de las distintas interleucinas y PCR
- 4) Análisis estadístico.

El plan de trabajo detallado es el siguiente:

1) Manejo y mantenimiento de muestras.

a) Las muestras de suero se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

b) Las muestras de sangre se analizaron directamente tras su extracción para obtener los valores de glucosa e insulina en sangre.

2) Estudio comparativo de los factores ambientales (hábito tabáquico, DM, HOMA-IR e IMC) entre el grupo de pacientes con poliposis y controles sanos.

3) Análisis de la concentración de las IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-17A, IL-23, INF- $\gamma$  y TNF $\alpha$  en suero de los pacientes con poliposis múltiple de origen desconocido y controles sanos mediante el ensayo ELISA de alta sensibilidad y de la PCR mediante el método inmunturbidimétrico (Roche /Hitachi), Cobas 800.

4) Análisis estadístico de los resultados obtenidos en las dos cohortes y búsqueda de diferencias significativas de las interleucinas entre los dos grupos.

## **4.2. METODOLOGÍA**

### **4.2.1. ESTUDIO 2**

#### **4.2.1.1. Procesamiento de las muestras**

Las muestras de suero para el análisis de citoquinas inflamatorias de ambos grupos de estudio se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Por otro lado, se obtuvo una muestra de sangre en condiciones basales en ayunas, para analizar la glucosa y los niveles de insulina.

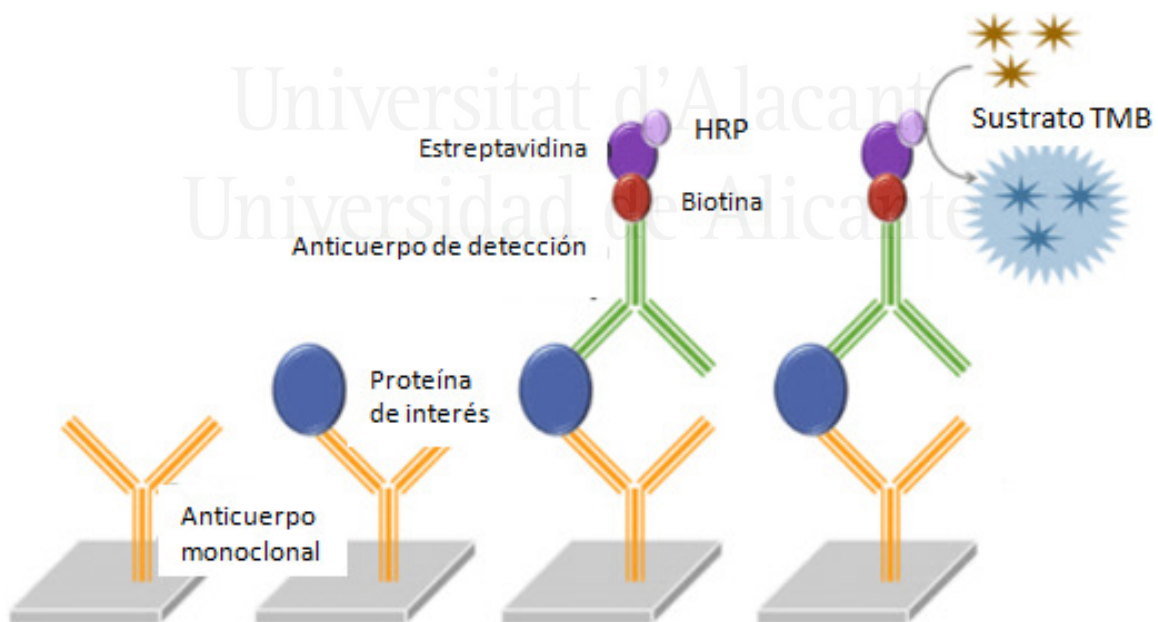
Las muestras de sangre obtenidas, se llevaron al servicio de análisis clínicos del HGUA, donde los analizaron mediante un método enzimático empleando hexoquinasa (Roche / Hitachi), Cobas 800. Los niveles de insulina en suero, se determinaron siguiendo el método de detección de insulina del hospital (Elecsys® E170, Roche).

#### **4.2.1.2. Estudio de marcadores inflamatorios**

##### **4.2.1.2.1. Análisis de marcadores inflamatorios en suero mediante el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)**

Las interleucinas (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-17A, IL-23, INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  fueron determinadas utilizando kits comercialmente disponibles de ELISA (**Figura 17**). Los niveles de las IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-23 y IFN-g fueron determinados mediante kits de alta sensibilidad de ELISA, siguiendo los protocolos del fabricante (Abcam, Cambridge, United Kingdom). Los niveles en suero de la IL-17A se detectaron utilizando un kit ELISA de alta sensibilidad (#BMS2017HS, eBioscience, Vienna, Austria) y para el TNF- $\alpha$  se utilizó otro kit de alta sensibilidad

(BMS223HS, Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria). Cada pocillo venía recubierto por un anticuerpo monoclonal específico para cada interleucina. Las muestras de estudio y los estándares con conocida concentración fueron pipeteados en los pocillos donde se unieron a los anticuerpos monoclonales. Después se añadió un anticuerpo biotinilado que se unió a la interleucina previamente retenida al anticuerpo monoclonal. El siguiente paso fue añadir el enzima Estreptavidina-HRP, que se unió al anticuerpo biotinilado, se incubó y se lavó. Tras la incubación y pasos de lavado se realizaron dos pasos de amplificación para conseguir una alta sensibilidad en el ensayo. Finalmente, se añadió el sustrato TMB que actúa sobre el enzima HRP e induce una reacción a color. La intensidad del color será directamente proporcional a la concentración de la interleucina presente en cada muestra que se medirá en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450nm.



**Figura 17. Representación esquemática del funcionamiento del ensayo ELISA**

Ilustración importada de "J Vis Exp2016; 107: e53508"

## 4.3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

### 4.3.1. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados generados en el estudio, se llevó a cabo mediante el paquete estadístico *Statistical Package for the Social Sciences for Windows*, SPSS versión 19.0 (*SPSS® Statistical software*, an IBM Company, Chicago, IL, USA).

- **Estudios descriptivos**

En primer lugar se realizó un análisis descriptivo de los casos incluidos. Para describir las variables categóricas cualitativas se utilizaron las frecuencias relativas en porcentajes. Las variables cuantitativas se representaron en función del resultado obtenido en el análisis de su distribución normal mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. De este modo, las variables numéricas con una distribución normal (paramétricas) se presentaron como media  $\pm$  desviación estándar (DE), y en forma de mediana y percentiles 25 y 75 las variables que no seguían una distribución normal (no paramétricas).

- **Estudio de asociación entre variables**

Para analizar la asociación entre las distintas variables cualitativas (categóricas) se realizó un análisis univariante considerando todas las variables analizadas. Para ello, se utilizaron tablas de contingencia cuyo valor estadístico se estimó mediante el test chi cuadrado de Pearson, seguido por la corrección de Yates cuando correspondía, o el test exacto de Fisher en el caso de que la frecuencia mínima esperada fuera menor de 5. Para el análisis de las variables cuantitativas

con distribución normal o paramétrica se utilizó el test T-Student, y la prueba U de Mann-Whitney para las variables no paramétricas.

En el **Estudio 2**, el análisis univariante se realizó para ver la asociación entre distintas interleucinas inflamatorias con la presencia de múltiples pólipos de colon.

Se realizó un análisis multivariante en el que se empleó el método de regresión logística. En el **Estudio 2**, se realizó el análisis multivariante por regresión logística para analizar el riesgo de presentar múltiples pólipos colónicos y su relación con citoquinas inflamatorias. Las citoquinas inflamatorias incluidas en el análisis multivariante fueron las que previamente salían significativas en el análisis univariante. El análisis se realizó ajustado por sexo, DM y hábito tabáquico.

Los resultados del análisis se expresaron como Odds Ratios (OR) con su respectivo intervalo de confianza (IC 95%).

Para el contraste de las hipótesis planteadas se consideraron como estadísticamente significativos aquellos valores de  $p < 0,05$ .





Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## 5. RESULTADOS

---



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



**5.1. ESTUDIO 1: Análisis de compuestos orgánicos volátiles en heces de pacientes con cáncer colorrectal, adenomas y controles sanos.**

Sujeto a privacidad.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## 5.2 ESTUDIO 2: Aumento de los niveles séricos de citoquinas relacionadas con las Th17 en pacientes con múltiples pólipos colónicos de origen desconocido

### 5.2.1. Características descriptivas de los pacientes con múltiples pólipos colónicos de origen desconocido y controles sanos

El grupo de estudio incluye 83 pacientes con diagnóstico endoscópico de poliposis atenuada y 52 controles con colonoscopia normal. Las características descriptivas de los casos y controles están resumidas en la **Tabla 13**. Incluimos 71 hombres (86%) y 12 mujeres (14%) en el grupo de poliposis y 42 (82%) hombres y 10 (19%) mujeres en el grupo de controles ( $p=0.481$ ). Un total de 55 (66%) individuos con poliposis eran fumadores, comparado con 14 (27%) controles ( $p=0.001$ ). Además, 9 casos (11%) tenían DM y sólo 1 control (2%) presentaba esta condición ( $p=0.048$ ). No se encontraron diferencias en la media del HOMA-IR entre casos y controles ( $4.3 \pm 5.2$  vs.  $3.2 \pm 1.8$ ;  $p=0.083$ ). No se encontraron diferencias en la media del IMC entre casos y controles ( $27.6 \pm 4.8$  vs.  $28.7 \pm 3.7$ ;  $p=0.255$ ).

**Tabla 13. Características descriptivas de los pacientes con múltiples pólipos y controles**

	Casos (n=83)	Controles (n=52)	P-valor
Media edad $\pm$ DE, años	59.98 $\pm$ 13.6	61.24 $\pm$ 6.67	0.443
Sexo, % (n)			
Hombre	85.5% (71)	81% (42)	0.481
Mujer	14.5% (12)	19% (10)	
Fumadores, % (n)	66% (55)	26.5% (14)	0.001*
DM, % (n)	11% (9)	2% (1)	0.048*
Media HOMA-IR $\pm$ DE	4.3 $\pm$ 5.2	3.2 $\pm$ 1.8	0.083
Media IMC $\pm$ DE, kg/m <sup>2</sup>	27.6 $\pm$ 4.8	28.7 $\pm$ 3.7	0.255

\* Resultados eran estadísticamente significativos.

Abreviaciones: IMC, índice de masa corporal; HOMA-IR, resistencia a insulina; DE, desviación estándar.

### 5.2.2. Marcadores inflamatorios

En el análisis univariante, varios marcadores inflamatorios estaban asociados a la presencia de múltiples pólipos de colon. Concentraciones en suero de IL-2 (2.5 pg/mL vs. 0.2 pg/mL; p=0.001), IL-4 (4.2 pg/mL vs. 0.07 pg/mL; p=0.001), IL-6 (3.5 pg/mL vs. 0.5 pg/mL; p=0.001), IL-17A (1.5 pg/mL vs. 0.3 pg/mL; p=0.001), IL-23 (6.4 pg/mL vs. 2.0 pg/mL; p=0.014), y PCR (4.5 mg/L vs. 0.2 mg/L; p=0.001) se encontraban significativamente incrementadas en pacientes con poliposis comparado con controles. Ninguno de los otros factores (IL-10, IL-11, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) se encontraba relacionado con el desarrollo de pólipos de colon en el estudio (**Tabla 14**).

**Tabla 14. Citoquinas y valores de marcadores inflamatorios en casos y controles**

	<b>Casos (n=83)</b>	<b>Controles (n=52)</b>	<b>P-valor</b>
IL-17A	1.5 ± 1.4 (0-2)	0.3 ± 0.9 (0-0)	< 0.001*
IL-23	6.4 ± 4.9 (2.4-9.4)	2.0 ± 5.9 (0-2.6)	< 0.001*
IL-11	8.3 ± 15.0 (0-7.7)	12.6 ± 24.4 (0-17.4)	0.441
IL-10	4.3 ± 5.9 (0-7)	4.3 ± 7.7 (1.5-3.0)	0.409
IL-2	2.5 ± 3.9 (0-4.1)	0.2 ± 0.9 (0-0)	< 0.001*
IL-4	4.2 ± 6.4 (0-7.8)	0.07 ± 0.3 (0-0)	< 0.001*
IL-6	3.5 ± 5.1 (0-5.4)	0.5 ± 1.0 (0-0)	< 0.001*
PCR	4.5 ± 8.3 (0-8.4)	0.2 ± 0.2 (0-0)	< 0.001*
TNF-α	0.9 ± 3.3 (0-0)	1 ± 4.6 (0-0)	0.509
IFN-γ	1.3 ± 3.6 (0-0)	1.3 ± 5.6 (0.0)	0.792

\* Resultados eran estadísticamente significativos. Usando el test de U-Mann-Whitney. Todas las citoquinas y niveles de marcadores inflamatorios están presentados como media ± desviación estándar. Los rangos intercuartiles están expresados entre paréntesis. Abreviaciones: PCR, proteína C reactiva; IFN, interferón; IL, interleucina; TNF, factor de necrosis tumoral

El análisis multivariante definió una mayor concentración de los marcadores inflamatorios (IL-17A, IL-23, IL-6, IL-2, IL-4 y PCR) sólo en los pacientes con poliposis múltiple tras ajustar por sexo, hábito tabáquico e historia de DM (**Tabla 15**). Todos los factores previamente asociados al desarrollo de pólipos en el análisis univariante se identificaron como predictores independientes en la regresión lineal: IL-2 ( $p < 0.001$ ), IL-4 ( $p < 0.001$ ), IL-17A ( $p < 0.001$ ), IL-6 ( $p < 0.001$ ), IL-23 ( $p = 0.001$ ) y PCR ( $p = 0.003$ ).

**Tabla 15. Análisis de regresión lineal de marcadores inflamatorios (IL-2, IL-4, IL-6, IL-17A, IL-23, y PCR) y su asociación con el grupo caso/control ajustado por sexo, hábito tabáquico y presencia de DM.**

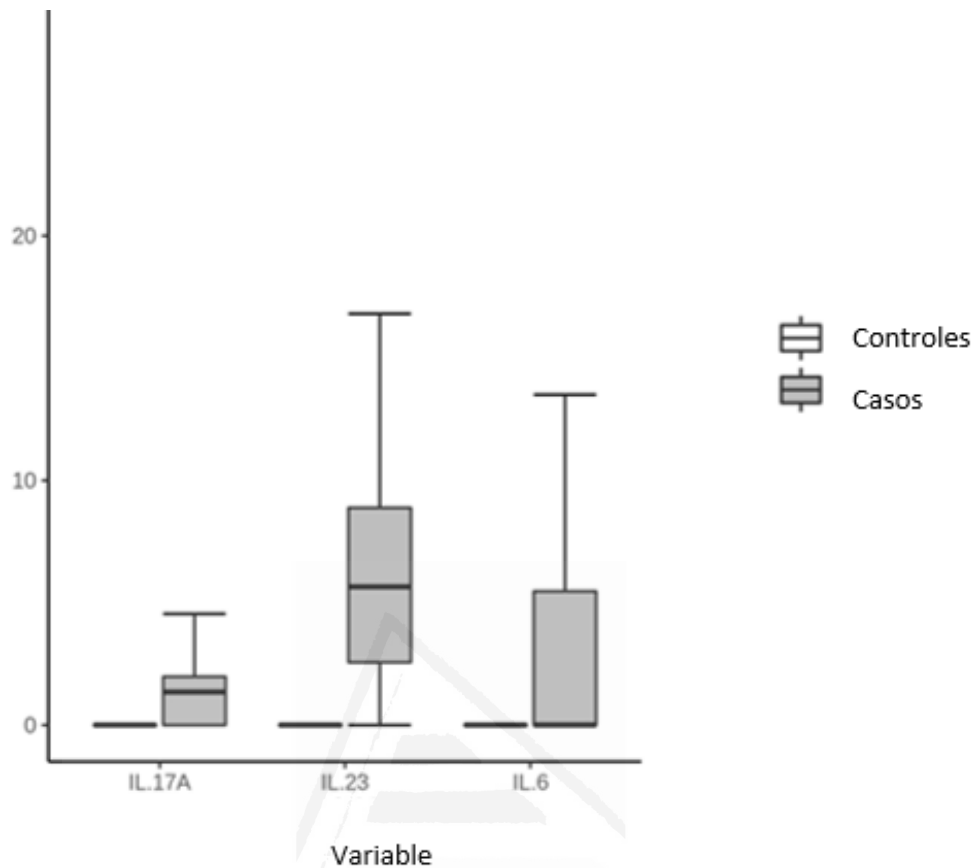
	<b>Variablen en el análisis multivariante</b>	<b>P-valor</b>	<b>Coefficiente Beta</b>	<b>Intervalo de confianza 95%</b>
<b>IL-17A</b>	Poliposis atenuada	< 0.001	1.213	0.693–1.733
	Sexo	0.616	0.168	-0.494 a 0.830
	Fumar	0.400	-0.214	-0.715 a 0.288
	DM	0.471	0.315	-0.548 a 1.179
<b>IL-23</b>	Poliposis atenuada	0.001	3.666	1.569–5.764
	Sexo	0.850	0.254	-2.410 a 2.919
	Fumar	0.066	-1.916	-3.957 a 0.125
	DM	0.517	1.167	-2.393 a 4.727
<b>IL-2</b>	Poliposis atenuada	< 0.001	2.529	1.242–3.815
	Sexo	0.418	0.668	-0.960 a 2.295
	Fumar	0.969	0.025	-1.224 a 1.273
	DM	0.511	0.723	-1.446 a 2.892
<b>IL-4</b>	Poliposis atenuada	< 0.001	4.254	2.260–6.249
	Sexo	0.141	1.887	-0.636 a 4.411
	Fumar	0.493	0.673	-1.262 a 2.608
	DM	0.992	0.017	-3.346 a 3.380
<b>IL-6</b>	Poliposis atenuada	< 0.001	3.542	1.877–5.208
	Sexo	0.760	-0.333	-2.481 a 1.816
	Fumar	0.236	0.970	-0.642 a 2.582
	DM	0.532	0.888	-1.917 a 3.694
<b>PCR</b>	Poliposis atenuada	0.003	4.042	1.358–6.725
	Sexo	0.803	-0.429	-3.838 a 3.979
	Fumar	0.268	-1.468	-4.079 a 1.144
	DM	0.489	1.597	-2.957 a 6.151

Abreviaciones: PCR, proteína C reactiva; IL, interleucina; DM, diabetes mellitus.

La relación entre el fenotipo de múltiples pólipos de colon y citoquinas relacionadas con-Th17 puede verse en la **Figura 30**. Los pacientes con poliposis presentan un incremento significativo de la concentración de las tres interleucinas (IL-17A, IL-23 e IL-6) de la vía Th17, comparado con la concentración detectada en controles sanos.



Concentración  
(pg/ml)



**Figura 30. Diferencias en la concentración de suero de interleucinas de la vía Th17 entre casos y controles: IL-17A (1.6 pg/ml vs. 0.3 pg/ml), IL-23 (22.1 pg/ml vs. 17.7 pg/ml) y IL-6 (3.5 pg/ml vs. 0.5 pg/ml).**

Universidad de Alicante

No se encontró ninguna correlación de la IL-17A con la IL-2 o de la IL-4 y IL-23 con la IL-2. Por lo contrario, la IL-17A y IL-23 mostraron una correlación ( $Rho=0.419$ ;  $p<0.001$ ).

### 5.2.3. Clasificación y características de los pólipos y su relación con los marcadores de inflamación

La poliposis adenomatosa se diagnosticó en 46 (55%) casos y la poliposis serrada en 37 (45%). Ocho pacientes cumplían el criterio para el SPS. Encontramos una media de 23 (DE 13) pólipos por persona y la media de ambos pólipos adenomatosos y serrados por persona fue 9 (DE 12). Un total de 25 pacientes (30%) mostraron >10 adenomas. Las características de los pólipos se pueden ver en la **Tabla 16**.

**Tabla 16. Características de los pólipos**

<b>Características de los pólipos</b>	
Media de pólipos/paciente	23
Media de pólipos $\pm$ DE	
Colon proximal	7.7 $\pm$ 8.2
Colon distal	11.7 $\pm$ 10.5
Localización, %	
Colon proximal	40%
Colon distal	60%
<b>Pólipos adenomatosos</b>	
Tipo predominante de pólipos, % (n)	55% (46)
Media de pólipos adenomatosos	9
Pólipos adenomatosos, %	
Recto-sigma	29.6%
Próximo a recto-sigma	70.4%
Pacientes con >10 adenomas, % (n)	30.1% (25)
<b>Pólipos serrados</b>	
Tipo predominante de pólipos, % (n)	45% (37)
Media de pólipos serrados	9
Pólipos serrados, %	
Recto-sigma	50.5%
Proximal a recto-sigma	49.5%
Síndrome de Poliposis Serrada	21.6% (8)

No se encontraron diferencias en la concentración de las citoquinas entre la poliposis adenomatosa y serrada excepto el TNF- $\alpha$  cuya concentración era cinco veces mayor en el grupo de poliposis serrada (0.5 vs. 2.7, p=0.010) (**Tabla 17**).

**Tabla 17. Asociación entre el tipo de poliposis (adenomatoso o serrado) y la concentración de citoquinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-17A, IL-23, IL-11, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , CRP).**

TIPO DE POLIPOSIS	Adenomatosa	Serrada	P-valor
IL-17A	1.5 $\pm$ 1.5	1.5 $\pm$ 0.9	0.879
IL-23	6.1 $\pm$ 4.6	7.3 $\pm$ 6.1	0.466
IL-6	3.4 $\pm$ 4.6	4 $\pm$ 6.7	0.741
IL-11	8.8 $\pm$ 16	6.5 $\pm$ 11.1	0.502
IL-10	3.8 $\pm$ 4.4	6 $\pm$ 10	0.409
IL-2	2.2 $\pm$ 3.2	4 $\pm$ 5.8	0.237
IL-4	3.7 $\pm$ 5.4	6.2 $\pm$ 9.1	0.299
TNF- $\alpha$	0.5 $\pm$ 1.3	2.3 $\pm$ 4.5	0.010*
IFN- $\gamma$	1.3 $\pm$ 3.7	1.3 $\pm$ 3.7	0.954
PCR	4.3 $\pm$ 8	5.1 $\pm$ 9.6	0.768

\* Resultados estadísticamente significativos

Todas las citoquinas y marcadores de inflamación están presentadas como media  $\pm$  desviación estándar. Abreviaciones: PCR, proteína C reactiva; IFN, interferón; IL, interleucina; TNF, tumor necrosis factor.

## 6. DISCUSIÓN

---



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



Un programa de cribado poblacional apropiado es la clave para reducir la incidencia y mortalidad del CCR (203). Estudios demuestran que los programas de cribado actuales como el FIT, sigmoidoscopia y colonoscopia han disminuido la mortalidad del CCR (204,205). Sin embargo, el FIT presenta muchos falsos positivos y negativos, dando lugar a la realización de colonoscopias innecesarias que suponen un gran gasto para la sociedad. Por lo tanto, existe una necesidad de crear un método de detección precoz del CCR no-invasivo y preciso que maximice la correcta identificación de pacientes que tengan que hacerse una colonoscopia y minimice la realización de pruebas innecesarias. Por otro lado, los pacientes con poliposis múltiple de origen desconocido siguen siendo "huérfanos genéticos" (206) hoy en día porque no presentan una mutación constitucional conocida. Por lo tanto la detección de biomarcadores para esta condición también es necesaria.

Los biomarcadores son sustancias que indican un estado biológico. Ambos estudios de esta tesis doctoral persiguen la búsqueda de biomarcadores con un valor pronóstico apropiado para la detección de distintas afecciones gastrointestinales. El primer estudio ha demostrado la utilidad de los COVs fecales como biomarcadores para neoplasia colónica, en particular adenocarcinoma. El segundo estudio ha demostrado la asociación de interleucinas como la IL-17A, IL-23 y IL-6 con la poliposis múltiple de origen desconocido.

En el segundo estudio, se describe por primera vez el incremento de citoquinas inflamatorias asociadas a Th17 (IL-17A, IL-23, IL-6) en suero de pacientes con pólipos colónicos múltiples (202). La asociación se mantiene tras ajustar el análisis por sexo, hábito tabáquico y presencia de DM. En concreto, el resultado

principal del segundo estudio es que una respuesta inmune mediada por las Th17 y niveles de PCR se encuentran significativamente aumentadas en pacientes con pólipos colónicos múltiples.

En el segundo estudio de esta tesis doctoral se detecta por primera vez una asociación entre interleucinas de las Th17 y la PCR con la presencia de poliposis múltiple. Las poliposis colónicas múltiples de origen desconocido son poco comunes en las colonoscopias de detección primaria, pero se encuentran cada vez más en individuos con CCR detectado mediante FIT. La relación entre inflamación y neoplasia ha sido conocida durante mucho tiempo y la evidencia epidemiológica, farmacológica y genética proporciona un sólido respaldo de que la inflamación puede aumentar el riesgo de cáncer y promover la progresión tumoral (207). Además, diversos estudios han demostrado que las personas con enfermedad inflamatoria intestinal crónica tienen un mayor riesgo de CCR que las personas sin dicha afección (208,209). Los modelos animales con afecciones inflamatorias continuas están predispuestos al desarrollo de CCR (210). Hoy en día, generalmente se acepta que hasta el 25% de los tumores malignos humanos están relacionados con la inflamación crónica, incluidas las infecciones virales y bacterianas (211).

Existen estudios que respaldan la relación de la PCR con el CCR (109,212,213) y se ha encontrado una asociación positiva entre la PCR y la prevalencia de adenomas grandes. La PCR es un marcador inflamatorio de fase aguda y su utilidad para identificar las vías inflamatorias es muy limitada. Por el contrario, diferentes citoquinas asociadas con respuestas inflamatorias específicas pueden ser de ayuda a este respecto. Varios estudios han demostrado que los adenomas de colon exhiben una sobreexpresión de IL-23 e IL-17 comparado con el tejido

adyacente no tumoral (93,94). Además, los niveles séricos de IL-17A están elevados en pacientes con CCR en comparación con individuos sanos (96), y el aumento de IL-6 se ha visto asociado al desarrollo de CCR esporádico y cáncer asociado a colitis (98), y a un mayor riesgo de CCR (97).

En el presente estudio, aunque la PCR también está elevada, los niveles de citoquinas IL-6, IL-23 e IL-17 asociados a Th17 se relacionan independientemente con la existencia de una poliposis atenuada de origen desconocido. Estos resultados apuntan a la diferenciación y proliferación de una respuesta adaptativa de células Th17 en este fenotipo. De hecho, los niveles incrementados de IL-2, evaluados como un marcador de activación de células T, apoyan esta suposición. Sin embargo, y a pesar de los sólidos datos sobre tres citoquinas diferentes de la vía Th17, el diseño del estudio no nos permite evaluar prospectivamente las células presentadoras de antígeno de los pacientes en cocultivo con células “T naive” para la caracterización funcional y la inmunofenotipificación. Esta limitación, junto con el incremento en los niveles séricos de IL-4, un marcador indirecto de un perfil Th2, nos impide descartar la diferenciación de otras vías inflamatorias y su coexistencia con la cascada Th17. Para respaldar esto, la IL-4 se sobreexpresa en eventos tempranos de desarrollo de CCR, incluidos en pólipos hiperplásicos, adenoma y adenomas serrados (95), y varios estudios experimentales indican un efecto pro-tumorigénico de IL-4 en CCR (101–103).

Por otro lado, varios factores ambientales que podrían conducir a un estado proinflamatorio se han asociado con adenomas colorrectales o cáncer. En pacientes con diabetes tipo 2, los estudios epidemiológicos muestran un mayor riesgo de CCR (214). Otro estudio sugiere que el hábito tabáquico promueve el desarrollo de pólipos en el colon, especialmente pólipos serrados (215). En un



metaanálisis de 42 estudios, los investigadores encontraron que los fumadores activos presentan el doble de probabilidades que los no fumadores de desarrollar pólipos en el colon (216). La obesidad también es un factor de riesgo establecido para la neoplasia colorrectal y se ha postulado que puede promover el desarrollo del cáncer a través de mecanismos relacionados con la inflamación (217,218). Los estudios muestran que los pacientes con DM (219) y los fumadores (220,221) tienen niveles elevados de PCR, y estos factores pueden conjuntamente contribuir al aumento del riesgo de adenoma. Además, datos recientes también sugieren que la mayoría de estos factores de riesgo ambientales son compartidos por adenomas y pólipos serrados (215). En nuestro estudio, encontramos que el aumento de las citoquinas proinflamatorias es independiente de la mayor proporción de DM y fumadores que se encuentran en nuestra cohorte. Este hallazgo no descarta una relación causal entre estos factores ambientales y el aumento de las citoquinas inflamatorias, pero sugiere que la frecuencia más alta de estos factores ambientales no es la única explicación para estos hallazgos. Nuestros resultados resaltan la necesidad de investigar más para comprender la interrelación entre los factores ambientales, la inflamación y el desarrollo de pólipos de colon y CCR. También debemos destacar la alta proporción de hombres que se encuentran en nuestro grupo de casos con pólipos colónicos múltiples, que pueden estar relacionados con la mayor prevalencia de CCR y pólipos colónicos en los hombres, pero también es posible que los hombres se vean más afectados por esta desregulación de citoquinas encontrada en nuestro estudio. Además, nuestros hallazgos pueden generar hipótesis para futuros estudios destinados a vincular vías inflamatorias sostenidas con el desarrollo de

pólipos colónicos múltiples y abrir la posibilidad de investigar posibles tratamientos inmunomoduladores para esta afección.

En resumen, aparte del papel genético conocido de alrededor del 20% al 30% de los casos de poliposis atenuada, los factores ambientales pueden desempeñar un papel en este fenotipo, lo que conduce a respuestas inmunológicas e inflamación intestinal. Un aumento de la respuesta inmune relacionada con Th17 asociada al tabaquismo, la DM o el síndrome metabólico podría contribuir conjuntamente al aumento del riesgo de desarrollar pólipos colónicos múltiples. Se deben desarrollar nuevos estudios que tengan como objetivo validar estos resultados en diferentes cohortes, así como para definir mejor el papel de la inflamación y el efecto de la modulación de la respuesta inmune en el desarrollo de este fenotipo.

Este estudio también presenta algunas limitaciones. Es importante establecer la heterogeneidad de los pólipos colónicos múltiples, con pacientes con pólipos adenomatosos y serrados incluidos indistintamente. Este estudio no pudo definir si existen diferencias fenotípicas en la activación de interleucinas. Además, no hemos realizado ningún análisis longitudinal en nuestros pacientes con el objetivo de apoyar los estímulos continuos de activación de citoquinas en la génesis del fenotipo de poliposis atenuada. Sin embargo, nuestros resultados son plausibles y robustos, con casos que fueron reclutados prospectivamente y controles con colonoscopia normal confirmada. Además, no podemos descartar el papel potencial de factores genéticos desconocidos en la génesis de este fenotipo, con posibles mutaciones de la línea germinal aún no encontradas o una posible predisposición genética a producir células T que elaboran diferentes patrones de citoquinas.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## 7. CONCLUSIONES

---



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



## **ESTUDIO 1**

Sujeto a privacidad.

## **ESTUDIO 2**

- Citoquinas proinflamatorias relacionadas con las Th17 se encuentran significativamente incrementados en suero de individuos con múltiples pólipos de colon de origen desconocido comparado con controles sanos.
- Nuestros hallazgos pueden generar hipótesis para futuros estudios que tengan como objetivo vincular la diferenciación de esta respuesta inmune adaptativa proinflamatoria al desarrollo de pólipos colónicos múltiples y abrir la posibilidad de investigar posibles tratamientos inmunomoduladores para esta afección.

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



## 8. REFERENCIAS

---



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante





1. World Health Organization (WHO). Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. *Int Agency Res Cancer*. 2018;1.
2. Fitzmaurice C, Allen C, Barber R, Barregard L, Bhutta Z, Brenner H. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability- Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015. *JAMA Oncol*. 2018;3:524–48.
3. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol*. 2019;14:89–103.
4. Kriza C, Emmert M, Wahlster P, Niederländer C, Kolominsky-Rabas P. Cost of illness in colorectal cancer: An international review. *Pharmacoeconomics*. 2013;31:577–88.
5. American Cancer Society. Colorectal cancer facts & figures special edition 2005. Oklahoma City: Am Cancer Soc. 2005;
6. Thygesen LC, Grønbæk M, Johansen C. Colorectal cancer in Denmark 1943-1997. *Dis Colon Rectum*. 2004;47:1232–41.
7. Hagggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: Incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg*. 2009;22:191–7.
8. Cannon G, Martin G. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. *World Cancer Res Inst Cancer Res*. 2007;45:5024–45.
9. Ahnen DJ. The American College of gastroenterology emily couric lecture the adenoma-carcinoma sequence revisited: Has the era of genetic tailoring finally arrived. *Am J Gastroenterol*. 2011;106:190–8.
10. Giglia MD, Chu DI. Familial Colorectal Cancer: Understanding the Alphabet Soup. *Clin Colon Rectal Surg*. 2016;29:185–95.
11. Burt RW, Bishop DT, Lynch HT, Rozen P, Winawer SJ. Risk and surveillance of individuals with heritable factors for colorectal cancer. WHO Collaborating Centre for the Prevention of Colorectal Cancer. *Bull World Health Organ*. 1990;68:655–65.
12. Jarvinen HJ. Epidemiology of familial adenomatous polyposis in Finland: Impact of family screening on the colorectal cancer rate and survival. *Gut*. 1992;33:357–60.
13. Martinez-Useros J, Garcia-Foncillas J. Obesity and colorectal cancer: Molecular features of adipose tissue. *J Transl Med. BioMed Central*; 2016;14:1–12.
14. Karahalios A, English DR, Simpson JA. Weight change and risk of colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2015;181:832–45.

15. Esposito K, Chiodini P, Colao A, Lenzi A, Giugliano D. Metabolic syndrome and risk of cancer: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*. 2012;35:2402–11.
16. Yuhara H, Steinmaus C, Cohen SE, Corley DA, Tei Y, Buffler PA. Is diabetes mellitus an independent risk factor for colon cancer and rectal cancer. *Am J Gastroenterol*. 2011;106:1911–21.
17. Luo S, Li JY, Zhao LN, Yu T, Zhong W, Xia ZS, et al. Diabetes mellitus increases the risk of colorectal neoplasia: An updated meta-analysis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2016;40:110–23.
18. Bagnardi V, Rota M, Botteri E, Tramacere I, Islami F, Fedirko V, et al. Alcohol consumption and site-specific cancer risk: A comprehensive dose-response meta-analysis. *Br J Cancer*. 2015;112:580–93.
19. Ordóñez-Mena JM, Schöttker B, Mons U, Jenab M, Freisling H, Bueno-de-Mesquita B, et al. Quantification of the smoking-associated cancer risk with rate advancement periods: Meta-analysis of individual participant data from cohorts of the CHANCES consortium. *BMC Med*. 2016;14:62.
20. Giovannucci E. Modifiable risk factors for colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am*. 2002;31:925–43.
21. Bouvard V, Loomis D, Guyton KZ, Grosse Y, Ghissassi F El, Benbrahim-Tallaa L, et al. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol*. 2015;2045:1599–600.
22. Leenders M, Siersema PD, Overvad K, Tjønneland A, Olsen A, Boutron-Ruault MC, et al. Subtypes of fruit and vegetables, variety in consumption and risk of colon and rectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer*. 2015;137:2705–14.
23. Ben Q, Zhong J, Liu J, Wang L, Sun Y, Yv L, et al. Association between consumption of fruits and vegetables and risk of colorectal adenoma a prisma-compliant meta-Analysis of observational studies. *Med (United States)*. 2015;94:e1599.
24. Vieira AR, Abar L, Chan DSM, Vingeliene S, Polemiti E, Stevens C, et al. Foods and beverages and colorectal cancer risk: A systematic review and meta-analysis of cohort studies, an update of the evidence of the WCRF-AICR Continuous Update Project. *Ann Oncol*. 2017;28:1788–802.
25. Walker AW, Ince J, Duncan SH, Webster LM, Holtrop G, Ze X, et al. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J*. 2011;5:220–30.
26. Duncan SH, Belenguer A, Holtrop G, Johnstone AM, Flint HJ, Lobley GE. Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73:1073–8.
27. Russell WR, Gratz SW, Duncan SH, Holtrop G, Ince J, Scobbie L, et al. High-protein, Reduced-Carbohydrate Weight-Loss Diets Promote Metabolite

- Profiles Likely to Be Detrimental to Colonic Health. *Am J Clin Nutr.* 2011;93:1062–72.
28. Scott KP, Gratz SW, Sheridan PO, Flint HJ, Duncan SH. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacol Res.* 2013;69:52–60.
  29. Sobhani I, Tap J, Roudot-Thoraval F, Roperch JP, Letulle S, Langella P, et al. Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS One.* 2011;6:e16393.
  30. De Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: A review and synthetic analysis. *Lancet Oncol.* 2012;13:607–15.
  31. Scanlan PD, Shanahan F, Clune Y, Collins JK, O'Sullivan GC, O'Riordan M, et al. Culture-independent analysis of the gut microbiota in colorectal cancer and polyposis. *Environ Microbiol.* 2008;10:789–98.
  32. Castellarin M, Warren R, Freeman J, Dreolini L, Krzywinski M, Strauss J. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res.* 2012;22:299–306.
  33. Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, Michaud M, Duke F, Earl AM, et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res.* 2012;22:292–8.
  34. Kostic AD, Chun E, Robertson L, Glickman JN, Gallini CA, Michaud M, et al. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe.* 2013;14:207–15.
  35. Rubinstein M, Wang X, Liu W, Hao Y, Cai G, Han Y. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/  $\beta$ -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe.* 2013;14:195–206.
  36. Thomas AM, Manghi P, Asnicar F, Pasolli E, Armanini F, Zolfo M, et al. Metagenomic analysis of colorectal cancer datasets identifies cross-cohort microbial diagnostic signatures and a link with choline degradation. *Nat Med.* 2019;25:667–78.
  37. Yu J, Feng Q, Wong SH, Zhang D, Yi Liang Q, Qin Y, et al. Metagenomic analysis of faecal microbiome as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for colorectal cancer. *Gut.* 2017;66:70–8.
  38. Feng Q, Liang S, Jia H, Stadlmayr A, Tang L, Lan Z, et al. Gut microbiome development along the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Nat Commun.* 2015;6:6528.
  39. Zeller G, Tap J, Voigt AY, Sunagawa S, Kultima JR, Costea PI, et al. Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer. *Mol Syst Biol.* 2014;10:766.
  40. Wu S, Morin PJ, Maouyo D, Sears CL. *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces c-Myc expression and cellular proliferation. *Gastroenterology.*

2003;124:392–400.

41. Haghi F, Goli E, Mirzaei B, Zeighami H. The association between fecal enterotoxigenic *B. fragilis* with colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2019;19:879.
42. Ulger Toprak N, Yagci A, Gulluoglu BM, Akin ML, Demirkalem P, Celenk T, et al. A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12:782–6.
43. Schippa S, Conte MP. Dysbiotic events in gut microbiota: Impact on human health. *Nutrients*. 2014;6:5786–805.
44. Nagao-Kitamoto H, Kitamoto S, Kuffa P, Kamada N. Pathogenic role of the gut microbiota in gastrointestinal diseases. *Intest Res*. 2016;14:127–38.
45. Peloquin J, Nguyen D. The Microbiota and Inflammatory Bowel Disease: Insights from Animal Models. *Anaerobe*. 2013;24:102–6.
46. Tomasello G, Tralongo P, Damiani P, Sinagra E, Di Trapani B, Zeenny MN, et al. Dismicrobism in inflammatory bowel disease and colorectal cancer: Changes in response of colocytes. *World J Gastroenterol*. 2014;20:18121–30.
47. Wu N, Yang X, Zhang R, Li J, Xiao X, Hu Y, et al. Dysbiosis Signature of Fecal Microbiota in Colorectal Cancer Patients. *Microb Ecol*. 2013;66:462–70.
48. Sheflin AM, Whitney AK, Weir TL. Cancer-Promoting Effects of Microbial Dysbiosis. *Curr Oncol Rep*. 2014;16:1–9.
49. Wang T, Cai G, Qiu Y, Fei N, Zhang M, Pang X, et al. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J*. 2012;6:320–9.
50. Polk DB, Peek RM. *Helicobacter Pylori*: Gastric Cancer and beyond. 2010;10:403–14.
51. Burd E. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16:1–17.
52. de Oliveria Andrade L, D'Oliveira Junior A, Rosangela Carvalho M, De Souza E, Costa Silva C, Paraná R. Association between hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *J Glob Infect Dis*. 2009;1:33.
53. Shannon-lowie C, Rickinson AB, Bell AI, Ai B, Barr E, Soc TR, et al. Epstein – Barr virus-associated lymphomas. *Phil Trans R Soc*. 2017;372:20160271.
54. Boshoff C, Weiss R. Kaposi ' s Sarcoma Associated Herpesvirus. *Adv Cancer Res*. 1998;75:57–86.
55. Mostafa MH, Sheweita SA, O'Connor PJ. Relationship between schistosomiasis and bladder cancer. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12:97–111.
56. Garrett W. Cancer and the microbiota. *Science*. 2015;348:80–86.

57. Boleij A, Van Gelder MMHJ, Swinkels DW, Tjalsma H. Clinical importance of streptococcus gallolyticus infection among colorectal cancer patients: Systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2011;53:870–8.
58. Peng G, Hakim M, Broza YY, Billan S, Abdah-Bortnyak R, Kuten A, et al. Detection of lung, breast, colorectal, and prostate cancers from exhaled breath using a single array of nanosensors. *Br J Cancer*. 2010;103:542–51.
59. Janfaza S, Khorsand B, Nikkhah M, Zahiri J. Digging deeper into volatile organic compounds associated with cancer. *Biol Methods Protoc*. 2019;4:1–11.
60. Janfaza S, Banan Nojavani M, Khorsand B, Nikkhah M, Zahiri J. Cancer Odor Database (COD): a critical databank for cancer diagnosis research. *Database (Oxford)*. 2017;2017:1–6.
61. Zhang R, Huang W, Li G, Hu Y. Noninvasive Strategy Based on Real-Time in Vivo Cataluminescence Monitoring for Clinical Breath Analysis. *Anal Chem*. 2017;89:3353–61.
62. McFarlane M, Millard A, Hall H, Savage R, Constantinidou C, Arasaradnam R, et al. Urinary volatile organic compounds and faecal microbiome profiles in colorectal cancer. *Color Dis*. 2019;21:1259–69.
63. Bosch S, Lemmen JPM, Menezes R, Van Der Hulst R, Kuijvenhoven J, Stokkers PCF, et al. The influence of lifestyle factors on fecal volatile organic compound composition as measured by an electronic nose. *J Breath Res*. 2019;13:046001.
64. Jass JR. Molecular heterogeneity of colorectal cancer: Implications for cancer control. *Surg Oncol*. 2007;16:7–9.
65. Blatner NR, Mulcahy MF, Dennis KL, Scholtens D, David J, Phillips JD, et al. Expression of ROR $\gamma$ t marks a pathogenic regulatory T cell subset in human colon cancer. *Sci Transl Med*. 2012;4:1–21.
66. Hölzel M, Bovier A, Tüting T. Plasticity of tumour and immune cells: a source of heterogeneity and a cause for therapy resistance? *Nat Rev Cancer*. 2013;13:365–376.
67. Rajput S, Wilber A. Roles of inflammation in cancer initiation, progression, and metastasis. *Front Biosci - Sch*. 2010;2 S:176–83.
68. Li W, Chen C, Saud SM, Geng L, Zhang G, Liu R, et al. Fei-Liu-Ping ointment inhibits lung cancer growth and invasion by suppressing tumor inflammatory microenvironment. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14:1–12.
69. Bierie B, Moses HL. Transforming growth factor beta (TGF-beta) and inflammation in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21:49–59.
70. Deng S, Hu B, Shen K-P, Xu L. Inflammation, macrophage in cancer progression and chinese herbal treatment. *J Basic Clin Pharm*. 2012;3:269–272.

71. Su Z, Sun Y, Zhu H, Liu Y, Lin X, Shen H, et al. Th17 cell expansion in gastric cancer may contribute to cancer development and metastasis. *Immunol Res.* 2014;58:118–24.
72. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008;454:436–44.
73. Zhu J, Paul WE. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res.* 2010;20:4–12.
74. Hirahara K, Ghoreschi K, Laurence A, Yang X, Kanno Y, O’Shea J. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in Th17 cell differentiation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010;21:425–434.
75. Wei H, Sun R, Xiao W, Feng J, Zhen C, Xu X, et al. Type two cytokines predominance of human lung cancer and its reverse by traditional Chinese medicine TTMP. *Cell Mol Immunol.* 2004;1:63–70.
76. Murugaiyan G, Saha B. Protumor vs Antitumor Functions of IL-17. *J Immunol.* 2009;183:4169–75.
77. Gaur P, Singh AK, Shukla NK, Das SN. Inter-relation of Th1, Th2, Th17 and Treg cytokines in oral cancer patients and their clinical significance. *Hum Immunol. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics;* 2014;75:330–7.
78. Ferrone C, Dranoff G. Dual roles for immunity in gastrointestinal cancers. *J Clin Oncol.* 2010;28:4045–51.
79. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity.* 2000;13:715–25.
80. Dennehy KM, Willment JA, Williams DL, Brown GD. Reciprocal regulation of IL-23 and IL-12 following co-activation of dectin-1 and TLR signaling pathways. *Eur J Immunol.* 2009;39:1379–86.
81. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005;201:233–40.
82. Park H, Li Z, Yang X, Chang S, Nurieva R, Wang Y. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 2005;6:1133–41.
83. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 Family Cytokines and the Expanding Diversity of Effector T Cell Lineages. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:821–52.
84. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:485–517.
85. Beriou G, Costantino CM, Ashley CW, Yang L, Kuchroo VK, Baecher-Allan C, et al. IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain

- suppressive function. *Blood*. 2009;113:4240–9.
86. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: The sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:479–89.
  87. Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate lymphoid cells—a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:145–9.
  88. Chung AS, Wu X, Zhuang G, Ngu H, Kasman I, Zhang J, et al. An interleukin-17-mediated paracrine network promotes tumor resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Med*. 2013;19:1114–23.
  89. Cui G, Yuan A, Goll R, Florholmen J. IL-17A in the tumor microenvironment of the human colorectal adenocarcinoma sequence. *Scand J Gastroenterol*. 2012;47:1304–12.
  90. Chae WJ, Gibson TF, Zeltermann D, Hao L, Henegariu O, Bothwell ALM. Ablation of IL-17A abrogates progression of spontaneous intestinal tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:5540–4.
  91. Numasaki M, Fukushi JI, Ono M, Narula SK, Zavodny PJ, Kudo T, et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood*. 2003;101:2620–7.
  92. Wang K, Kim MK, DiCaro G, Wong J, Shalapour S, Wan J, et al. Interleukin-17 receptor signaling in transformed enterocytes promotes early colorectal tumorigenesis. *Immunity*. 2014;41:1052–63.
  93. Grivnennikov SI, Wang K, Mucida D, Stewart CA, Schnabl B, Jauch D, et al. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature*. 2013;491:254–8.
  94. Richter C, San Juan MH, Weigmann B, Bergis D, Dauber K, Muders MH, et al. Defective IL-23/IL-17 axis protects p47phox<sup>-/-</sup> mice from colon cancer. *Front Immunol*. 2017;8:1–10.
  95. Wang K, Karin M, Karin M. The IL-23 to IL-17 cascade in inflammation-related cancers. *Clin Exp Rheumatol*. 2015;33:87–90.
  96. Nemati K, Golmoghaddam H, Hosseini SV, Ghaderi A, Doroudchi M. Interleukin-17FT7488 allele is associated with a decreased risk of colorectal cancer and tumor progression. *Gene*. 2015;561:88–94.
  97. Kakourou A, Koutsoumpa C, Lopez DS, Hoffman-Bolton J, Bradwin G, Rifai N, et al. Interleukin-6 and risk of colorectal cancer: results from the CLUE II cohort and a meta-analysis of prospective studies. *Cancer Causes Control*. 2015;26:1449–60.
  98. Waldner MJ, Foersch S, Neurath MF. Interleukin-6 - A key regulator of colorectal cancer development. *Int J Biol Sci*. 2012;8:1248–53.
  99. Schetter AJ, Giang HN, Bowman ED, Mathé EA, Siu TY, Hawkes JE, et al. Association of inflammation-related and microRNA gene expression with



- cancer-specific mortality of colon adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009;15:5878–87.
100. Marszałek A, Szyłberg Ł, Wiśniewska E, Marlena J. Impact of COX-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 and IL-10 on the process of carcinogenesis in the large bowel. *Polish J Pathol.* 2012;63:221–7.
  101. Osawa E, Nakajima A, Fujisawa T, Kawamura YI, Toyama-Sorimachi N, Nakagama H, et al. Predominant T helper type 2-inflammatory responses promote murine colon cancers. *Int J Cancer.* 2006;118:2232–6.
  102. Koller FL, Hwang DG, Dozier EA, Fingleton B. Epithelial interleukin-4 receptor expression promotes colon tumor growth. *Carcinogenesis.* 2010;31:1010–7.
  103. Ingram N, Northwood EL, Perry SL, Marston G, Snowden H, Taylor JC, et al. Reduced type II interleukin-4 receptor signalling drives initiation, but not progression, of colorectal carcinogenesis: Evidence from transgenic mouse models and human case-control epidemiological observations. *Carcinogenesis.* 2013;34:2341–9.
  104. Berghella A, Pellegrini P, Del Beato T, Marini M, Tomei E, Adorno D, et al. The significance of an increase in soluble interleukin-2 receptor level in colorectal cancer and its biological regulating role in the physiological switching of the immune response cytokine network from TH1 to TH2 and back. *Cancer Immunol Immunother.* 1998;45:241–9.
  105. Volanakis JE. Human C-reactive protein: Expression, structure, and function. *Mol Immunol.* 2001;38:189–97.
  106. Dymicka-Piekarska V, Matowicka-Karna J, Gryko M, Kemoná-Chetnik I, Kemoná H. Relationship between soluble P-selectin and inflammatory factors (interleukin-6 and C-reactive protein) in colorectal cancer. *Thromb Res.* 2007;120:585–90.
  107. Zaloudik J, Lauerová L, Janáková L, Talac R, Simická M, Nekulová M. Significance of pre-treatment immunological parameters in colorectal cancer patients with unresectable metastases to the liver. *Hepatogastroenterology.* 1999;46:220–7.
  108. Tsilidis KK, Branchini C, Guallar E, Helzlsouer KJ, Erlinger TP, Platz EA. C-reactive protein and colorectal cancer risk: A systematic review of prospective studies. *Int J Cancer.* 2008;123:1133–40.
  109. Otake T, Uezono K, Takahashi R, Fukumoto J, Tabata S, Abe H, et al. C-reactive protein and colorectal adenomas: Self Defense Forces Health Study. *Cancer Sci.* 2009;100:709–14.
  110. Chiu HM, Lin JT, Chen THH, Lee YC, Chiu YH, Liang JT, et al. Elevation of C-reactive protein level is associated with synchronous and advanced colorectal neoplasm in men. *Am J Gastroenterol.* 2008;103:2317–25.
  111. Chan AT, Sima CS, Zauber AG, Ridker PM, Hawk ET, Bertagnolli MM. C-reactive protein and risk of colorectal adenoma according to celecoxib

- treatment. *Cancer Prev Res.* 2011;4:1172–80.
112. Tsilidis KK, Erlinger TP, Rifai N, Hoffman S, Hoffman-Bolton J, Helzlsouer KJ, et al. C-reactive protein and colorectal adenoma in the CLUE II cohort. *Cancer Causes Control.* 2008;19:559–67.
  113. Ognjanovic S, Yamamoto J, Saltzman B, Franke A, Ognjanovic M, Yokochi L, et al. Serum CRP and IL-6, genetic variants and risk of colorectal adenoma in a multiethnic population. *Cancer Causes Control.* 2010;21:1131–8.
  114. Gunter MJ, Cross AJ, Huang WY, Stanczyk FZ, Purdue M, Xue X, et al. A prospective evaluation of C-reactive protein levels and colorectal adenoma development. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20:537–44.
  115. Crockett SD, Mott LA, Barry EL, Figueiredo JC, Burke CA, Baxter GJ, et al. C-reactive protein and risk of colorectal adenomas or serrated polyps: a prospective study. *Cancer Prev Res.* 2014;7:1122–7.
  116. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, et al. IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol.* 2007;8:967–74.
  117. Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR, Dutilh BE. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: Beyond the usual suspects. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10:575–82.
  118. Sears CL, Pardoll DM. Perspective: alpha-bugs, their microbial partners, and the link to colon cancer. *J Infect Dis.* 2011;203:306–311.
  119. Kostic AD, Chun E, Meyerson M, Garrett WS. Microbes and inflammation in colorectal cancer. *Cancer Immunol Res.* 2013;1:150–7.
  120. Schwabe R, Jobin C. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013;13:800–12.
  121. Clevers H, Nusse R. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease. *Cell.* 2012;149:1192–205.
  122. Abreu M, Peek RJ. Gastrointestinal malignancy and the microbiome. *Gastroenterology.* 2014;146:1534–46.
  123. McCoy AN, Araújo-Pérez F, Azcárate-Peril A, Yeh JJ, Sandler RS, Keku TO. *Fusobacterium* Is Associated with Colorectal Adenomas. *PLoS One.* 2013;8:e53653.
  124. Boleij A, Hechenbleikner EM, Goodwin AC, Badani R, Stein EM, Lazarev MG, et al. The bacteroides fragilis toxin gene is prevalent in the colon mucosa of colorectal cancer patients. *Clin Infect Dis.* 2015;60:208–15.
  125. Sears CL. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: A rogue among symbiotes. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:349–69.
  126. Lu R, Wu S, Zhang YG, Xia Y, Liu X, Zheng Y, et al. Enteric bacterial protein

- AvrA promotes colonic tumorigenesis and activates colonic beta-catenin signaling pathway. *Oncogenesis*. 2014;3:1–10.
127. Dutta U, Garg PK, Kumar R, Tandon RK. Typhoid carriers among patients with gallstones are at increased risk for carcinoma of the gallbladder. *Am J Gastroenterol*. 2000;95:784–7.
  128. Lee J, Liles E, Bent S, Levin T, Corley D. Accuracy of fecal immunochemical tests for colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Ann InternMed*. 2014;160–71.
  129. Ahlquist D, Zou H, Domanico M, Mahoney D, Yab T, Taylor W. Next-generation stool DNA test accurately detects colorectal cancer and large adenomas. *Gastroenterology*. 2012;142:248–256.
  130. Link A, Balaguer F, Shen Y, Nagasaka T, Lozano JJ, Boland CR, et al. Fecal microRNAs as novel biomarkers for colon cancer screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19:1766–74.
  131. Adams F. Hippocratic Writings: Aphorism 4, 5. Web At. 1994;
  132. Faridi P, Roozbeh J, Mohagheghzadeh A. Ibn-Sina's life and contributions to medicinal therapies of kidney calculi. *Iran J Kidney Dis*. 2012;6:339–45.
  133. Porter R. In *The Greatest Benefit to Mankind: A Medical History of Humanity from Antiquity to the Present*. Harper Collins: London. 1977;147.
  134. Buljubasic F, Buchbauer G. The scent of human diseases: A review on specific volatile organic compounds as diagnostic biomarkers. *Flavour Fragr J*. 2015;30:5–25.
  135. Williams H, Pembroke A. Sniffer dogs in the melanoma clinic? *Lancet*. 1989;333:734.
  136. Gardner JW, Bartlett PN. A Brief History of electronic noses. *Sensors Actuators B Chem*. 1994;18:210-211.
  137. Smith D, Španěl P. Selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS) for on-line trace gas analysis. *Mass Spectrom Rev*. 2005;24:661–700.
  138. Batty CA, Cauchi M, Lourenço C, Hunter JO, Turner C. Use of the analysis of the volatile faecal metabolome in screening for colorectal cancer. *PLoS One*. 2015;10:1–14.
  139. Bond A, Greenwood R, Lewis S, Corfe B, Sarkar S, O'Toole P, et al. Volatile organic compounds emitted from faeces as a biomarker for colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther*. 2019;49:1005–12.
  140. De Meij TG, Larbi I Ben, Van Der Schee MP, Lentferink YE, Paff T, Terhaar Sive Droste JS, et al. Electronic nose can discriminate colorectal carcinoma and advanced adenomas by fecal volatile biomarker analysis: Proof of principle study. *Int J Cancer*. 2014;134:1132–8.
  141. Valera JL, Togores B, Cosio BG. Utilidad de la nariz electrónica para el

- diagnóstico de enfermedades de la vía respiratoria. Arch Bronconeumol. 2012;48:187–8.
142. Phillips M, Gleeson K, Hughes JMB, Greenberg J, Cataneo RN, Baker L, et al. Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: A cross-sectional study. Lancet. 1999;353:1930–3.
  143. Phillips M, Cataneo RN, Cummin ARC, Gagliardi AJ, Gleeson K, Greenberg J, et al. Detection of lung cancer with volatile markers in the breath. Chest. The American College of Chest Physicians; 2003;123:2115–23.
  144. Dragonieri S, Annema JT, Schot R, van der Schee MPC, Spanevello A, Carratú P, et al. An electronic nose in the discrimination of patients with non-small cell lung cancer and COPD. Lung Cancer. 2009;64:166–70.
  145. Machado RF, Laskowski D, Deffenderfer O, Burch T, Zheng S, Mazzone PJ, et al. Detection of lung cancer by sensor array analyses of exhaled breath. Am J Respir Crit Care Med. 2005;171:1286–91.
  146. Dragonieri S, Schot R, Mertens BJA, Le Cessie S, Gauw SA, Spanevello A, et al. An electronic nose in the discrimination of patients with asthma and controls. J Allergy Clin Immunol. 2007;120:856–62.
  147. Fens N, Zwinderman AH, Van Der Schee MP, De Nijs SB, Dijkers E, Roldaan AC, et al. Exhaled breath profiling enables discrimination of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. Am J Respir Crit Care Med. 2009;180:1076–82.
  148. Gendron KB, Hockstein NG, Thaler ER, Vachani A, Hanson CW. In vitro discrimination of tumor cell lines with an electronic nose. Otolaryngol - Head Neck Surg. 2007;137:269–73.
  149. Phillips M, Cataneo RN, Ditkoff BA, Fisher P, Greenberg J, Gunawardena R, et al. Volatile markers of breast cancer in the breath. Breast J. 2003;9:184–91.
  150. Phillips M, Cataneo RN, Ditkoff BA, Fisher P, Greenberg J, Gunawardena R, et al. Prediction of breast cancer using volatile biomarkers in the breath. Breast Cancer Res Treat. 2006;99:19–21.
  151. Wang C, Ke C, Wang X, Chi C, Guo L, Luo S, et al. Noninvasive detection of colorectal cancer by analysis of exhaled breath. Anal Bioanal Chem. 2014;406:4757–63.
  152. Amal H, Leja M, Funka K, Lasina I, Skapars R, Sivins A, et al. Breath testing as potential colorectal cancer screening tool. Int J Cancer. 2016;138:229–36.
  153. Boots AW, Smolinska A, Van Berkel JJBN, Fijten RRR, Stobberingh EE, Boumans MLL, et al. Identification of microorganisms based on headspace analysis of volatile organic compounds by gas chromatography-mass spectrometry. J Breath Res. 2014;8:027106.
  154. Weir TL, Manter DK, Sheflin AM, Barnett BA, Heuberger AL, Ryan EP. Stool

- Microbiome and Metabolome Differences between Colorectal Cancer Patients and Healthy Adults. *PLoS One*. 2013;8:e70803.
155. Wang X, Wang J, Rao B, Deng LI. Gut flora profiling and fecal metabolite composition of colorectal cancer patients and healthy individuals. *Exp Ther Med*. 2017;13:2848–54.
  156. Song EM, Byeon JS, Lee SM, Yoo HJ, Kim SJ, Lee SH, et al. Fecal Fatty Acid Profiling as a Potential New Screening Biomarker in Patients with Colorectal Cancer. *Dig Dis Sci*. 2018;63:1229–36.
  157. Won K, Kyu L, Euiyeon N. Compositions for Diagnosing of cancer using Volatile Organic Compounds. KR101956346 (B1). 2019;
  158. Zonta G, Fabbri B, Gaiardo A, Gherardi A, Giberti A, Landini N, et al. Preventive screening of colorectal cancer with a device based on chemoresistive sensors. *Sensors Actuators B*. 2017;238:1098–1101.
  159. Khalid T, Aggio R, White P, De Lacy Costello B, Persad R, Al-Kateb H, et al. Urinary volatile organic compounds for the detection of prostate cancer. *PLoS One*. 2015;10:1–15.
  160. Monteiro M, Carvalho M, Henrique R, Jerónimo C, Moreira N, De Lourdes Bastos M, et al. Analysis of volatile human urinary metabolome by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry for biomarker discovery: Application in a pilot study to discriminate patients with renal cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 2014;50:1993–2002.
  161. Weber C, Cauchi M, Patel M, Bessant C, Turner C, Britton L. Evaluation of a gas sensor array and pattern recognition for the identification of bladder cancer from urine headspace. *Analyst*. 2011;136:359–364.
  162. Matsumura K, Opiekun M, Oka H, Vachani A, Albelda SM, Yamazaki K, et al. Urinary volatile compounds as biomarkers for lung cancer: A proof of principle study using odor signatures in mouse models of lung cancer. *PLoS One*. 2010;5:e8819.
  163. Horvath G, Andersson H, Paulsson G. Characteristic odour in the blood reveals ovarian carcinoma. *BMC Cancer*. 2010;10:643.
  164. Wang C, Li P, Lian A, Sun B, Wang X, Guo L, et al. Blood volatile compounds as biomarkers for colorectal cancer. *Cancer Biol Ther*. 2014;15:200–6.
  165. Deng C, Zhang X, Li N. Investigation of volatile biomarkers in lung cancer blood using solid-phase microextraction and capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2004;808:269–77.
  166. Real Academia Española [RAE] [Internet]. Pólipo. 2020. Available from: [rae.es](http://rae.es)
  167. Shussman N, Wexner SD. Colorectal polyps and polyposis syndromes.

Gastroenterol Rep. 2014;2:1–15.

168. Guía de práctica clínica de prevención del cáncer colorrectal. Guía de práctica clínica de prevención del cáncer colorrectal. Asoc Española Gastroenterol Soc Española Med Fam y Comunitaria, y Cent Cochrane Iberoam. 2009;
169. Liang JJ, Alrawi S, Tan D. Nomenclature, molecular genetics and clinical significance of the precursor lesions in the serrated polyp pathway of colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2008;1:317–24.
170. East JE, Saunders BP, Jass JR. Sporadic and Syndromic Hyperplastic Polyps and Serrated Adenomas of the Colon: Classification, Molecular Genetics, Natural History, and Clinical Management. *Gastroenterol Clin North Am*. 2008;37:25–46.
171. Sandmeier D, Benhattar J, Martin P, Bouzourene H. Serrated polyps of the large intestine: A molecular study comparing sessile serrated adenomas and hyperplastic polyps. *Histopathology*. 2009;55:206–13.
172. Leggett B, Whitehall V. Role of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology*. 2010;138:2088–100.
173. Snover DC. Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. *Hum Pathol*. 2011;42:1–10.
174. Sweetser S, Smyrk T, Sinicrope F. Serrated colon polyps as precursors to colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013;11:760–67.
175. Laurent S, Franchimont D, Coppens JP, Leunen K, Macken L, Peeters M, et al. Familial adenomatous polyposis: Clinical presentation, detection and surveillance. *Acta Gastroenterol Belg*. 2011;74:415–20.
176. Goodenberger M, Lindor N. Lynch syndrome and MYH-associated polyposis: review and testing strategy. *J Clin Gastroenterol*. 2011;45:488–500.
177. Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, Heinimann K, Fidalgo P, Phillips RKS, et al. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germline mutations in MYH. *N Engl J Med*. 2003;348:791–9.
178. Bengoechea O, Martinez-Penuela J, Larrinaga B, Valerdi J, Borda F. Hyperplastic polyposis of the colorectum and adenocarcinoma in a 24-year-old man. *Am J Surg Pathol*. 1987;11:323–7.
179. McCANN BG. A case of metaplastic polyposis of the colon associated with focal adenomatous change and metachronous adenocarcinomas. *Histopathology*. 1988;13:700–2.
180. Leggett BA, Devereaux B, Biden K, Searle J, Young J, Jass J. Hyperplastic polyposis: Association with colorectal cancer. *Am J Surg Pathol*. 2001;25:177–84.
181. Jeevaratnam P, Cottier DS, Browett PJ, Van De Water NS, Pokos V, Jass

- JR. Familial giant hyperplastic polyposis predisposing to colorectal cancer: A new hereditary bowel cancer syndrome. *J Pathol.* 1996;179:20–5.
182. Ferrández A, Samowitz W, DiSario JA, Burt RW. Phenotypic characteristics and risk of cancer development in hyperplastic polyposis: Case series and literature review. *Am J Gastroenterol.* 2004;99:2012–8.
  183. Snover D, Ahnen D, Burt R. Serrated polyps of the colon and rectum and serrated (“hyperplastic”) polyposis. In: Bozman F, Carneiro F, Hruban R, editors. *WHO Classif tumours Pathol Genet Tumours Dig Syst 4* Springer-Verlag. Berlin; 2010.
  184. Rosty C, Parry S, Young JP. Serrated Polyposis: An Enigmatic Model of Colorectal Cancer Predisposition. *Patholog Res Int.* 2011;2011:1–13.
  185. Nielsen M, Hes FJ, Nagengast FM, Weiss MM, Mathus-Vliegen EM, Morreau H, et al. Germline mutations in APC and MUTYH are responsible for the majority of families with attenuated familial adenomatous polyposis. *Clin Genet.* 2007;71:427–33.
  186. Filipe B, Baltazar C, Albuquerque C, Fragoso S, Lage P, Vitoriano I, et al. APC or MUTYH mutations account for the majority of clinically well-characterized families with FAP and AFAP phenotype and patients with more than 30 adenomas. *Clin Genet.* 2009;76:242–55.
  187. Wang L, Baudhuin L, Boardman L, Steenblock K, Petersen G, Halling K. MYH Mutations in Patients With Attenuated and Classic Polyposis and With Young-Onset Colorectal Cancer Without Polyps. *Gastroenterology.* 2004;126:9–26.
  188. Ponz De Leon M, Urso EDL, Pucciarelli S, Agostini M, Nitti D, Roncucci L, et al. Clinical and molecular features of attenuated adenomatous polyposis in northern Italy. *Tech Coloproctol.* 2013;17:79–87.
  189. Lorca V, Rueda D, Martín-Morales L, Poves C, Fernández-Aceñero MJ, Ruiz-Ponte C, et al. Role of GALNT12 in the genetic predisposition to attenuated adenomatous polyposis syndrome. *PLoS One.* 2017;12:1–10.
  190. Brosens L, van Hattem W, Jansen M, de Leng W, Giardiello F, Offerhaus G. Gastrointestinal polyposis syndromes. *Curr Mol Med.* 2007;7:29–46.
  191. Ben Q, An W, Jiang Y, Zhan X, Du Y, Cai QC, et al. Body mass index increases risk for colorectal adenomas based on meta-analysis. *Gastroenterology.* 2012;142:762–72.
  192. Ji BT, Weissfeld JL, Chow WH, Huang WY, Schoen RE, Hayes RB. Tobacco smoking and colorectal hyperplastic and adenomatous polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15:897–901.
  193. Bretagne JF, Manfredi S, Piette C, Hamonic S, Durand G, Riou F. Yield of high-grade dysplasia based on polyp size detected at colonoscopy: A series of 2295 examinations following a positive fecal occult blood test in a population-based study. *Dis Colon Rectum.* 2010;53:339–45.

194. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*. 2010;140:883–99.
195. Kraus S, Arber N. Inflammation and colorectal cancer. *Curr Opin Pharmacol*. 2009;9:405–10.
196. Kurome M, Kato J, Nawa T, Fujimoto T, Yamamoto H, Shiode J, et al. Risk factors for high-grade dysplasia or carcinoma in colorectal adenoma cases treated with endoscopic polypectomy. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2008;20:111–7.
197. Rigter LS, Kallenberg FGJ, Bastiaansen B, van Os TAM, van Leeuwen FE, van Leerdam ME, et al. A case series of intestinal adenomatous polyposis of unidentified etiology; a late effect of irradiation? *BMC Cancer*. 2016;16:4–9.
198. Nottage K, McFarlane J, Krasin MJ, Li C, Srivastava D, Robison LL, et al. Secondary colorectal carcinoma after childhood cancer. *J Clin Oncol*. 2012;30:2552–8.
199. Tukenova M, Diallo I, Anderson H, Hawkins M, Garwicz S, Sankila R, et al. Second malignant neoplasms in digestive organs after childhood cancer: A cohort-nested case-control study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012;82:e383-90.
200. Yu S, Yang M, Nam KT. Mouse models of gastric carcinogenesis. *J Gastric Cancer*. 2014;14:67–86.
201. Haines J, Bacher J, Coster M, Huiskamp R, Meijne E, Mancuso M, et al. Microsatellite instability in radiation-induced murine tumours; Influence of tumour type and radiation quality. *Int J Radiat Biol*. 2010;86:555–68.
202. Alustiza M, Hernández-Illán E, Juárez M, Giner-Calabuig M, Mira C, Martínez-Roca A, et al. Increased Th17-Related Cytokine Serum Levels in Patients With Multiple Polyps of Unexplained Origin. *Clin Transl Gastroenterol*. 2020;11:e00143.
203. Barouni M, Ghaderi H, Shahmoradi M. The economic evaluation of screening for colorectal cancer: case of Iran. *Clin Lab*. 2013;59:667–74.
204. Tinmouth J, Lansdorp-Vogelaar I, Allison JE. Faecal immunochemical tests versus guaiac faecal occult blood tests: What clinicians and colorectal cancer screening programme organisers need to know. *Gut*. 2015;64:1327–37.
205. Zorzi M, Fedeli U, Schievano E, Bovo E, Guzzinati S, Baracco S, et al. Impact on colorectal cancer mortality of screening programmes based on the faecal immunochemical test. *Gut*. 2015;64:784–90.
206. Roncucci L, Pedroni M, Mariani F. Attenuated adenomatous polyposis of the large bowel: Present and future. *World J Gastroenterol*. 2017;23:4135–9.
207. Candido J, Hagemann T. Cancer-related inflammation. *J Clin Immunol*. 2013;33:79–84.



208. Jess T, Rungoe C, Peyrin-Biroulet L. Risk of Colorectal Cancer in Patients With Ulcerative Colitis: A Meta-analysis of Population-Based Cohort Studies. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10:639–45.
209. Laukoetter MG, Mennigen R, Hannig CM, Osada N, Rijcken E, Vowinkel T, et al. Intestinal Cancer Risk in Crohn's Disease: A Meta-Analysis. *J Gastrointest Surg*. 2011;15:576–83.
210. Lee HM, Cha JM, Lee JL, Jeon JW, Shin HP, Joo KR, et al. High C-reactive protein level is associated with high-risk adenoma. *Intest Res*. 2017;15:511–7.
211. Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer: An ancient link with novel potentials. *Int J Cancer*. 2007;121:2373–80.
212. Heikkilä K, Harris R, Lowe G, Rumley A, Yarnell J, Gallacher J, et al. Associations of circulating C-reactive protein and interleukin-6 with cancer risk: Findings from two prospective cohorts and a meta-analysis. *Cancer Causes Control*. 2009;20:15–26.
213. Wu J, Cai Q, Li H, Cai H, Gao J, Yang G, et al. Circulating C-reactive protein and colorectal cancer risk: A report from the shanghai men's health study. *Carcinogenesis*. 2013;34:2799–803.
214. Berster JM, Göke B. Type 2 diabetes mellitus as risk factor for colorectal cancer. *Arch Physiol Biochem*. 2008;114:84–98.
215. He X, Wu K, Ogino S, Giovannucci EL, Chan AT, Song M. Association Between Risk Factors for Colorectal Cancer and Risk of Serrated Polyps and Conventional Adenomas. *Gastroenterology*. 2018;155:355-373.e18.
216. Botteri E, Iodice S, Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Cigarette Smoking and Adenomatous Polyps: A Meta-analysis. *Gastroenterology*. 2008;134:388–95.
217. Ma Y, Yang Y, Wang F, Zhang P, Shi C, Zou Y, et al. Obesity and Risk of Colorectal Cancer: A Systematic Review of Prospective Studies. *PLoS One*. 2013;8:e53916.
218. De Pergola G, Silvestris F. Obesity as a Major Risk Factor for Cancer. *J Obes*. 2013;2013:1–11.
219. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *J Am Med Assoc*. 2001;286:327–34.
220. Kawada T. Relationships between the smoking status and plasma fibrinogen, white blood cell count and serum C-reactive protein in Japanese workers. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev*. *Diabetes India*; 2015;9:180–2.
221. Ohsawa M, Okayama A, Nakamura M, Onoda T, Kato K, Itai K, et al. CRP levels are elevated in smokers but unrelated to the number of cigarettes and are decreased by long-term smoking cessation in male smokers. *Prev Med*

(Baltim). 2005;41:651–6.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

# ANEXOS

---



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



**ANEXO I: Participantes en el estudio: Miembros del consorcio EPIPOLIP. (Grupo de Oncología Gastrointestinal de la Asociación Española de Gastroenterología)**

**Hospital General Universitario de Alicante:** Rodrigo Jover (local coordinator), Carla Guarinos, Lucía Pérez-Carbonell, Cristina Sánchez-Fortún, Miriam Juárez, Eva Hernández-Illán, María Rodríguez-Soler, Cristina Alenda, Artemio Payá, Cecilia Egoavil, Estefanía Rojas, Cristina Mira. **Hospital 12 de Octubre, Madrid:** José Carlos Marín (local coordinator), Cristina Alarcón, Pablo Hernán, Bertha de las Heras; **Hospital Clínic, Barcelona:** Anna Serradesanferm (local coordinator), Francesc Balaguer, Teresa Ocaña, Maria Pellisé, Leticia Moreira, Miriam Cuatrecasas, Mireya Jimeno, María López-Cerón, Antoni Castells; **Hospital Clínic Universitario, Zaragoza:** Ángel Lanás (local coordinator), Angel Ferrández, Federico Sopena, Maria Pilar Roncales; **Hospital Cristal-Piñor, Complejo Hospitalario de Ourense:** Joaquin Cubiella (local coordinator), M<sup>a</sup> Carmen Penin, Fatima Valentin; **Hospital del Mar, Barcelona:** Montserrat Andreu (local coordinator), Xavier Bessa, Cristina Álvarez-Urturi. **Hospital Donostia, San Sebastián:** Luis Bujanda (local coordinator) Carol J Cobián, Angel Cosme, Eduardo Elósegui, Marta Herreros-Villanueva, Jose M. Enríque-Navascués, Elizabeth Hijona, Lander Hijona, Carlos Placer; **CHUVI Hospital Meixoeiro, Vigo:** M<sup>a</sup> Luisa de Castro (local coordinator), Antoni Tardío, Luciano Sanromán, Vicent Hernández, Lucía Cid Gómez; **Hospital Universitari Mútua de Terrassa:** Fernando Fernández-Bañares (local coordinator), Antonio Salas, Victoria Gonzalo; **Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida:** Josep M. Reñé (local coordinator), Elena Aguirre; **Hospital Universitario de Canarias:** Enrique Quintero (local coordinator), David Nicolás; **Hospital Universitari Dr. Josep Trueta, Girona:** Virgínia Piñol (local coordinator); **Hospital de Bellvitge, Barcelona:** Francisco Rodríguez-Moranta (local coordinator), Lorena Rodríguez-Alonso; **Hospital Universitario Puertade Hierro, Madrid:** Alberto Herreros de Tejada (local coordinator), Paloma Martín, Aurelio Garrido-Botella; **Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona:** Judith Balmaña (local coordinator), Manuel Ruiz-Echarri; **Clínica Universidad de Navarra, Pamplona:** Maite Herráiz (local coordinator), Maite Betes, Cristina Carretero, Pilar Perez-Rojo; **Instituto**

**Valenciano de Oncología, Valencia:** Fernando Martínez de Juan (local coordinator), Carmen Martínez-Lapiedra; **Hospital Comarcal Bidasoa, Guipúzcoa:** Maria Luisa Rincón-Garmendia (local coordinator), Maria Luisa Goyeneche-Gracia, Angel Tejada, Jose Maria Arrinda; **Hospital Universitario de la Ribera, Alzira, Valencia:** Marco Bustamante (local coordinator); **Hospital Nuestra Señora DeValme, Sevilla:** Manuel Romero-Gómez (local coordinator), Cristina Rodríguez- Alonso; **Hospital General Universitario de Elche:** Jose Luís Soto-Martínez (local coordinator), Adela Castillejo, Víctor Barberá, Isabel Castillejo, María- Dolores Picó. **Hospital Virgen del Camino, Pamplona:** Ana Guerra (local coordinator), Susana Oquiñena, Rosario Aznarez, Antonio Pueyo, Marta Montes. **Hospital Virgen del Rocío, Sevilla:** Angeles Pizarro (local coordinator), Marta Garzón-Benavides. **Hospital de Basurto, Bilbao:** Francisco Polo-Ortiz (local coordinator).



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## ANEXO II

### II.1. Artículos publicados

- Picó MD, Castillejo A, Murcia Ó, Giner-Calabuig M, Alustiza M, Sánchez A, Moreira L, Pellise M, Castells A, Carrillo-Palau M, Ramon Y Cajal T, Gisbert-Beamud A, Llorca G, Yagüe C, López-Fernández A, Alvarez-Urturi C, Cubiella J, Rivas L, Rodríguez-Alcalde D, Herraiz M, Garau C, Dolz C, Bujanda L, Cid L, Povés C, Garzon M, Salces I, Ponce M, Hernández-Villalba L, Alenda C, Balaguer F, Soto JL, Jover R. Clinical and Pathological Characterization of Lynch-Like Syndrome, Clin Gastroenterol Hepatol. 2020 Feb;18(2):368-374
- Murcia O, Juárez M, Rodríguez-Soler M, Hernández-Illán E, Giner-Calabuig M, Alustiza M, Egoavil C, Castillejo A, Alenda C, Barberá V, Mangas-Sanjuan C, Yuste A, Bujanda L, Clofent J, Andreu M, Castells A, Llorca X, Zapater P, Jover R. Colorectal cancer molecular classification using BRAF, KRAS, microsatellite instability and CIMP status: Prognostic implications and response to chemotherapy. PLoSOne. 2018 Sep 6;13(9):e0203051

### II.2. Artículos en revisión

- Juan Ruiz-Banobre, Roshni Roy, Miren Alustiza; Oscar Murcia; Rodrigo Jover; Miguel Pera Roman; Francesc Balaguer; Rafael Lopez-lopez; Ajay Goel. Clinical Significance of a MicroRNA Signature for the Identification and Predicting Prognosis in Colorectal Cancers with Mucinous Differentiation. (En proceso de revisión en la revista Clinical Cancer Research).
- Murcia O, Martínez-Roca A, Juárez M, Giner-Calabuig M, Alustiza M, Mira C, Mangas-Sanjuan C, Serrano E, Ruiz-Gómez FA, Baile-Maxia S, Medina L, Alenda C, Rodríguez-Soler M, Zapater P, Jover R. Effects of Somatic Methylation in Colonic Polyps on Risk of Developing Advanced Metachronous Lesions. (En proceso de revisión en la revista Gut).



- Picó MD, Sánchez-Heras AB, Castillejo A, Giner-Calabuig M, Alustiza M, Sánchez A, Moreira L, Pellise M, Castells A, Llord G, Yagüe C, Ramon y Cajal T, Gisbert-Beamud A, Cubiella J, Rivas L, Herraiz M, Garau C, Salces I, Carrillo-Palau M, Bujanda L, López-Fernández A, Alvarez-Urturi C, López MJ, Alenda C, Zapater P, Lacueva FJ, Balaguer F, Soto JL, Murcia O, Jover R. Risk of cancer in family members of patients with Lynch-Like Syndrome. (En proceso de revisión en la revista Clinical Gastroenterology and Hepatology).

### **II.3. Revisiones bibliográficas**

- Alustiza M, Baile P, Canals A, Murcia O, Jover R, Vidal L. Volatile organic compounds as colorectal cancer biomarkers. (En proceso de revisión).

### **II.4. Comunicaciones en congresos**

#### **XXII Reunión anual de la Asociación Española de Gastroenterología (AEG), Madrid (España), marzo 2019**

- Póster. Aumento de marcadores inflamatorios en pacientes con múltiples pólipos colónicos de origen desconocido. M. Alustiza, M. Giner-Calabuig, E. Hernández-Illán, M. Juárez, C. Guarinos, C. Mira, O. Murcia, R. Francés, P. Giménez, C. Martínez-Cardona, R. Jover, Grupo EPIPOLIP.

#### **Levens Blicke Stiftung Früherkennung Darmkrebs, Mannheim (Alemania), diciembre 2018**

- Comunicación oral. Genetic profile of polyps and risk of advanced metachronous lesions. O. Murcia, M. Juárez, E. Hernández-Illán, C. Egoavil, M. Giner-Calabuig, M. Alustiza, M. Rodríguez, C. Guarinos, C. Alenda, A. García, C. Mangas, JR. Aparicio, FR. Ruiz, J. Martínez, JA. Casellas, JL. Soto, P. Zapater, R. Jover.

**XXXII Congreso de la Sociedad Valenciana de Patología Digestiva (SVPD),  
Valencia (España), noviembre 2018**

- Comunicación oral. Aumento de marcadores inflamatorios en pacientes con múltiples pólipos colónicos de origen desconocido. M. Alustiza, M. Giner-Calabuig, E. Hernández-Illán, M. Juárez, C. Guarinos, C. Mira, O. Murcia, R. Francés, P. Giménez, C. Martínez-Cardona, R. Jover, Grupo EPIPOLIP.

**United European Gastroenterology (UEG) week, Viena (Austria), octubre  
2018**

- Comunicación oral. Role of inflammatory response, insulin resistance and environmental factors in non-filiated attenuated polyposis. M. Alustiza, E. Hernández-Illán, M. Juárez, M. Giner-Calabuig, C. Guarinos, C. Mira, O. Murcia, P. Giménez, C. Martínez-Cardona, R. Francés, R. Jover.

**XXI Reunión anual de la Asociación Española de Gastroenterología (AEG),  
Madrid (España), marzo 2018**

- Póster. Papel de la actividad inflamatoria, resistencia insulínica y factores ambientales en las poliposis atenuadas de origen no filiado. R. Jover, C. Martínez-Cardona, P. Giménez, R. Francés, O. Murcia, C. Mira, C. Guarinos, M. Juárez, E. Hernández-Illán, M. Giner-Calabuig, M. Alustiza.

**XXXI Congreso de la Sociedad Valenciana de Patología Digestiva (SVPD),  
Alicante (España), noviembre 2017**

- Presentación oral. Papel de la actividad inflamatoria, resistencia insulínica y factores ambientales en las poliposis atenuadas de origen no filiado. R. Jover, C. Martínez-Cardona, P. Giménez, R. Francés, O. Murcia, C. Mira, C. Guarinos, M. Juárez, E. Hernández-Illán, M. Giner-Calabuig, M. Alustiza.