



REVISTA DE GASTROENTEROLOGÍA DE MÉXICO

www.elsevier.es/rgmx



ARTÍCULO ORIGINAL

Asociación entre infección por *Fusobacterium nucleatum* y cáncer colorrectal: un estudio mexicano



H. Cuellar-Gómez^a, M.E. Ocharán-Hernández^{a,*}, C.C. Calzada-Mendoza^a
y D.A. Comoto-Santacruz^b

^a Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, CDMX, México

^b Escuela Militar de Graduados de Sanidad, Ciudad de México, CDMX, México

Recibido el 29 de septiembre de 2020; aceptado el 9 de diciembre de 2020

Disponible en Internet el 29 de junio de 2021

PALABRAS CLAVE

Cáncer colorrectal;
Fusobacterium nucleatum;
Inflamación;
Citocinas;
Microbiota

Resumen

Introducción y objetivos: El cáncer colorrectal (CCR) es el tercer cáncer más prevalente en el mundo. Son muchos los factores de riesgo y la evidencia actual apunta a una conexión entre la microbiota intestinal y la carcinogénesis colorrectal. Se propone a la *Fusobacterium nucleatum* como uno de los factores de riesgo en el inicio y la progresión del CCR, por modulación inmune e inflamatoria.

Materiales y métodos: Se recolectaron 90 muestras de tres diferentes regiones del colon por medio de colonoscopia en pacientes con CCR y se realizó qPCR TagMan® para detectar *F. nucleatum* y citocinas (IL-17, IL-23 e IL-10) en el tumor, a nivel peritumoral y en tejido normal. Las diferencias entre las muestras fueron analizadas y correlacionadas.

Resultados: La abundancia de *F. nucleatum* determinada por medio del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ en CCR (7.750 [5.790-10.469]) fue significativamente mayor que el control normal (0.409 [0.251-0.817]) ($p < 0.05$). No se observó asociación significativa entre *F. nucleatum* y las citocinas ($p > 0.05$).

Conclusiones: El CCR es una enfermedad heterogénea que se presenta y progresa en un microambiente complejo, parcialmente debido al desequilibrio en la microbiota intestinal. La *F. nucleatum* se encuentra de manera abundante en los tejidos del CCR, pero aún no está claramente definido si esto es casual o consecuencia del CCR.

© 2021 Asociación Mexicana de Gastroenterología. Publicado por Masson Doyma México S.A. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia. Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina Instituto Politécnico Nacional, Salvador Díaz Mirón esq. Plan de San Luis S/N, Miguel Hidalgo, Casco de Santo Tomas, 11340 Ciudad de México, CDMX.

Correo electrónico: estherocharan@gmail.com (M.E. Ocharán-Hernández).

<https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2020.12.002>

0375-0906/© 2021 Asociación Mexicana de Gastroenterología. Publicado por Masson Doyma México S.A. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Colorectal cancer;
Fusobacterium nucleatum;
 Inflammation;
 Cytokines;
 Microbiota

Association of *Fusobacterium nucleatum* infection and colorectal cancer: A Mexican study

Abstract

Introduction and aims: Colorectal cancer (CRC) is the third most prevalent cancer worldwide. Many risk factors are involved, and current evidence links the gut microbiota and colorectal carcinogenesis. *Fusobacterium nucleatum* is proposed as one of the risk factors at the onset and during the progression of CRC, due to immune system and inflammatory modulation.

Materials and methods: Ninety samples from three different regions of the colon were collected through colonoscopy in patients with CRC, and qPCR TagMan® was conducted to detect *F. nucleatum* and cytokines (IL-17, IL-23, and IL-10) in tumor, peritumor, and normal samples. The differences between them were analyzed and correlated.

Results: The abundance of *F. nucleatum* determined through the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method in CRC (7.750 [5.790-10.469]) was significantly higher than in the normal control (0.409 [0.251-0.817]) ($p < 0.05$). There was no significant association between *F. nucleatum* and the cytokines ($p > 0.05$).

Conclusions: CRC is a heterogeneous disease that presents and progresses in a complex micro-environment, partially due to gut microbiome imbalance. *F. nucleatum* was enriched in CRC tissue, but whether that is a cause of the pathology or a consequence, has not yet been clearly defined.

© 2021 Asociación Mexicana de Gastroenterología. Published by Masson Doyma México S.A. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción y objetivos

El cáncer colorrectal (CCR) es uno de los tumores malignos más comunes en el tracto digestivo y actualmente es considerado un importante problema de salud pública¹. En general, el CCR está en cuarta posición en incidencia (9.2% del total de casos de cáncer), pero segundo en mortalidad (9.2% del total de muertes por cáncer)². En México, se ha observado una tendencia al alza en las tasas de mortalidad por la enfermedad en las tres décadas pasadas. El CCR está entre las 10 causas de morbilidad más prevalentes por malignidad en México³. La carcinogénesis colorrectal es un proceso heterogéneo asociado con varias combinaciones de alteraciones moleculares somáticas que son influidas por la dieta, el medio ambiente y la exposición microbiana. La inflamación ha sido identificada como un factor de riesgo importante⁴. El tracto digestivo humano tiene más de 10^{14} bacterias, eucariotas y virus que forman la llamada microbiota intestinal. Estos microorganismos juegan un papel significativo en actividades fisiológicas humanas normales, incluidas la digestión, el metabolismo, la homeostasis epitelial y el desarrollo de tejido linfoide intestinal. La disbiosis en la microbiota intestinal, como cambios en su población o composición, puede causar enfermedades específicas (p.ej., trastornos cardiometabólicos, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedades neuropsiquiátricas y cáncer)⁵. El enriquecimiento de *Fusobacterium nucleatum* en tejido con CCR en comparación con grupos control ha sido demostrado en análisis metagenómicos que incluyen la secuenciación del genoma completo, la secuenciación del transcriptoma y la secuenciación del gen 16S ARN⁶⁻⁸. Además, *F. nucleatum* tiene una asociación cercana con un mal

pronóstico para pacientes con CCR y muy probablemente con mayor quimiorresistencia^{9,10}.

La *F. nucleatum* es un bacilo anaeróbico gramnegativo, presente en reservorios específicos de la boca humana, el tracto digestivo y otras partes del cuerpo. Está bien establecido que la inflamación crónica inducida por infección bacteriana incrementa el riesgo de cáncer¹¹. En un estudio reciente se observó la relación entre la microbiota intestinal y la capacidad de producción de citocina inflamatoria¹². La *F. nucleatum* induce citocinas inflamatorias locales, incluidas IL-6, IL-8, IL-17, TNF- α y COX-2, en el microambiente del tumor, y dichas citocinas pueden promover carcinogénesis en CCR^{6,13-15}. El objetivo del presente estudio fue evaluar la presencia de *F. nucleatum* y su relación con inflamación local en tejido con tumor y sin tumor en pacientes mexicanos con CCR.

Materiales y métodos

Un total de 30 pacientes consecutivos (18 hombres y 12 mujeres, rango de edad: 45-84 años), que presentaron CCR, confirmado histológicamente como adenocarcinoma, se sometieron a colonoscopia en el Departamento de Cirugía Colorrectal del Hospital Militar en México, entre marzo y septiembre del 2019. No se incluyó a pacientes que tuvieran tumores colorrectales que no fueran adenocarcinoma, que recibieran quimioterapia o radioterapia antes de la colonoscopia y que tuvieran comorbilidades malignas en otros órganos. De cada sujeto se recolectaron muestras de tejido fresco de tumor (una lesión macroscópica), muestras de tejido peritumoral (cerca de una lesión macroscópica) y muestras de mucosa de control (a más de 10 cm de los

márgenes cancerosos). Las muestras de tejido y de mucosa de control fueron congeladas instantáneamente en nitrógeno líquido para almacenamiento de largo plazo a -80°C , hasta el momento de su utilización. Todos los pacientes fueron incluidos en el estudio qPCR.

Extracción de ADN

La extracción de ADN de las muestras de tejido colorrectal fue realizada utilizando el reactivo TRIzol (Ambion, Carlsbad, CA, EE.UU.) y el protocolo correspondiente del fabricante. Se llevó a cabo una síntesis de ADN complementaria utilizando el miScript II RT kit[®] (Qiagen, Hilden, Alemania), con el Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa

Una vez obtenido el cADN, se equalizaron las pruebas en cada muestra por medio de diluciones para formar grupos y realizar la amplificación y secuenciación del gen bacteriano 16S ARNr¹⁶. Las regiones hipervariables V3 y V6 del gen 16S ARNr fueron amplificadas por medio de PCR del ADN genómico microbiano con el partidor delantero (TATGGTAATTGTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA) y trasero (GGACTACHVGGGTWTCTAAT). Los partidores fueron diseñados con adaptadores protuberantes (delantero: AATGATACGGCGACCACCGAG), (trasero: CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT), de acuerdo con el MiSeq[™] System, Illumina, Inc. (San Diego, CA, EE.UU.), para reconocer los adaptadores de secuenciación del índice Illumina que se agregaron en una PCR subsiguiente. Los productos de la PCR fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa al 2% y luego purificados. Tras la purificación, los productos de la PCR fueron cuantificados por medio de espectrofotometría. Las muestras fueron normalizadas a una concentración final de 2 nM. Las bibliotecas de 16S ARNr fueron preparadas utilizando un protocolo PCR de dos pasos: primero las concentraciones de ADN extraídas fueron cuantificadas; a continuación, todas las muestras de ADN fueron diluidas a la concentración de la muestra de ADN más diluida, y se utilizaron 2 μl de cada muestra de ADN para una reacción PCR a 98°C por 30 s (98°C por 30 s, 52°C por 30 s, 72°C por 30 s) por 20 ciclos, y una espera a 4°C . Para cada muestra de ADN, se realizaron cuatro reacciones PCR de 25 μl , las cuales a continuación fueron acumuladas y limpiadas con microesferas AmpureXP. La segunda reacción PCR, 4 μl del producto PCR previo, fueron utilizados con los partidores de código de barras PE-PCR-III-F y PE-PCR-IV en cuatro reacciones de 25 μl con un ciclo PCR a 98°C por 30 s (98°C por 30 s, 83°C por 30 s 72°C por 30 s) por 7 ciclos, y una a 4°C . Cada conjunto de cuatro reacciones PCR fue acumulado y las reacciones fueron aclaradas, utilizando cuentas de purificación de secuenciación metagenómica 16S. Las concentraciones de la biblioteca fueron cuantificadas. La biblioteca fue secuenciada en un solo conjunto de líneas Illumina MiSeq, para la lectura base de 300 pares.

Los niveles de *F. nucleatum* y citocina fueron dados como cuantificación relativa y determinados por $2^{-\Delta\text{Ct}}$, donde ΔCt fue la diferencia en el número Ct para la prueba y

referencia (gliceraldehído fosfato deshidrogenasa [GAPDH, por sus siglas en inglés]) de la evaluación del gen. El cambio en la cuantificación del múltiplo de *F. nucleatum* y citocina en el tejido enfermo sobre el tejido colorrectal de control fue calculado como $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Partidores y sondas previamente publicadas¹⁷⁻¹⁹ fueron sintetizadas por la Integrated DNA Technologies Company (Coralville, Iowa, EE.UU.), con las siguientes secuencias:

- 1) *F. nucleatum*: partidor delantero, 5' CGC AGA AGG TGA AAG TCC TGT AT 3'. partidor trasero, 5' TGG TCC TCA CTG ATT CAC ACA GA 3'.
- 2) IL-17: partidor delantero, 5' CTC ATT GGT GTC ACT GCT ACT G - 3: partidor trasero, 5' CCT GGA TTT CGT GGG ATT GTG - 3:
- 3) IL-23: partidor delantero, 5' ACA CAT GGA TCT AAG AGA AGA GG - 3: partidor trasero, 5' CTA TCA GGG AGC AGA GAA GG - 3:
- 4) IL-10: partidor delantero, 5' AAT AAG GTT TCT CAA GGG GCT - 3: partidor trasero, 5' AGA ACC AAG ACC CAG ACA TCA A - 3:
- 5) GAPDH: partidor delantero 5' GTCTCCTCTGACTTCAA-CAGCG -3: partidor trasero 5' ACCACCCTGTTGCTGTAGC-CAA - 3:

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el SPSS 25.0 para Windows (SPSS Inc. Chicago, IL, EE.UU.). La relación de *F. nucleatum* con niveles de citocina entre tejido tumoral, tejido peritumoral y tejido normal colorrectal fue dada como múltiplo de incremento en $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, donde $\Delta\Delta\text{Ct}$ fue la mediana de la diferencia entre ΔCt del tejido enfermo y ΔCt del tejido normal. Los datos continuos fueron expresados como medianas (percentil 25 y 75). Se realizó una prueba de normalidad utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. Debido a la naturaleza no gaussiana de la distribución de datos de la qPCR, se consideró apropiada una prueba no paramétrica. En consecuencia, la prueba de suma de rangos de Wilcoxon fue utilizada para comparar la mediana de los niveles de *F. nucleatum* y citocinas en el tejido enfermo contra el tejido normal y para comparar los niveles de *F. nucleatum* entre los subsitios del colon. Se realizó la prueba de coeficiente de correlación de rangos de Spearman para comparar la cuantificación de *F. nucleatum* con la expresión de citocina. Para todos los análisis, un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Consideraciones éticas

Los autores declaran que se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos participantes, de acuerdo con la Declaración de Helsinki. También, todos los pacientes fueron codificados para proteger su anonimato. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación del Hospital Central Militar, afiliado con la Universidad del Ejército y de la Fuerza Aérea de México.

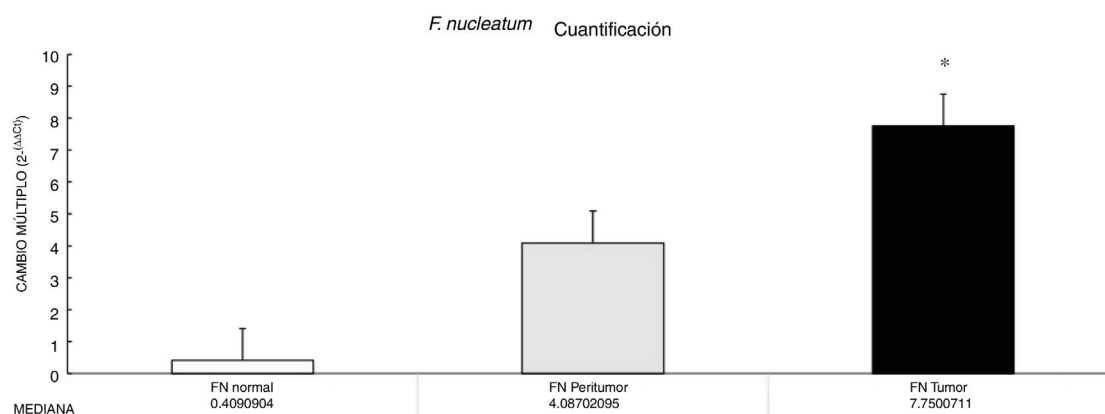


Figura 1 El cambio en el múltiplo de *Fusobacterium nucleatum* en las muestras peritumorales y tumorales, en comparación con el tejido normal, de acuerdo con la prueba de suma de rangos de Wilcoxon, fue: *F. nucleatum* en el tejido tumoroso: *p=0.020. FN: *Fusobacterium nucleatum*.

Tabla 1 Datos clínicos

Resumen de diagnóstico clínico	Cohorte mexicana
Número total de muestras de tejido	90
Sexo, n (masculino/femenino)	18/12
Edad, media ± DE (años)	65 ± 10
Ubicación, n (colon proximal/colon distal/recto)	7/11/12
Índice de masa corporal, media ± DE (kg/m ²)	32.5 ± 3.0
Indicación de colonoscopia, n (sangrado/dolor abdominal/cambio en el hábito intestinal/pérdida de peso)	12/4/9/5
ACE (antígeno carcinoembrionario), media ± DE (ng/ml)	25 ± 32
Etapas, n (etapa I, etapa II, etapa III, etapa IV)	3/10/11/6

ACE: antígeno carcinoembrionario; DE: desviación estándar.

Resultados

La *F. nucleatum* fue más abundante en el tejido con tumor de CCR que en el tejido normal.

Por medio de la qPCR, pudimos confirmar que el cambio en el múltiplo de incremento para *F. nucleatum* fue signifi-

cativamente mayor en el tejido enfermo (muestras de tumor y peritumor), independientemente de la etapa del tumor y su localización, en comparación con el tejido normal, en una cohorte mexicana con cáncer (fig. 1). Los detalles de los datos clínicos y la etapa del cáncer y su localización están resumidos en la tabla 1. Los niveles de *F. nuclea-*

Tabla 2 El cambio en el múltiplo de incremento ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de *Fusobacterium nucleatum* y citocinas en muestras de tejido tumoral y peritumoral en comparación con tejido normal

	IL-17	IL-10	IL-23	<i>F. nucleatum</i>
Tumoral/tejido normal				
Mediana CM	1.741	6.536	0.272	7.750
Rango CM	0.632-2.875	1.383-13.336	0.125-0.345	5.792-10.469
Valor p	0.564	0.248	0.021*	0.020*
Peritumoral/tejido normal				
Mediana CM	0.770	3.639	0.876	4.087
Rango CM	0.403-0.868	0.032-22.935	0.064-2.796	1.062-9.725
Valor p	0.564	1.000	0.564	0.081
Tumoral/peritumoral				
Mediana CM	0.817	3.978	1.030	0.318
Rango CM	0.244-3.717	0.009-6.495	0.291-12.692	0.212-1.226
Valor p	0.309	0.564	0.773	0.248

CM: cambio en el múltiplo; IL: interleucina.

Prueba de suma de rangos de Wilcoxon.

* Valor de p < 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

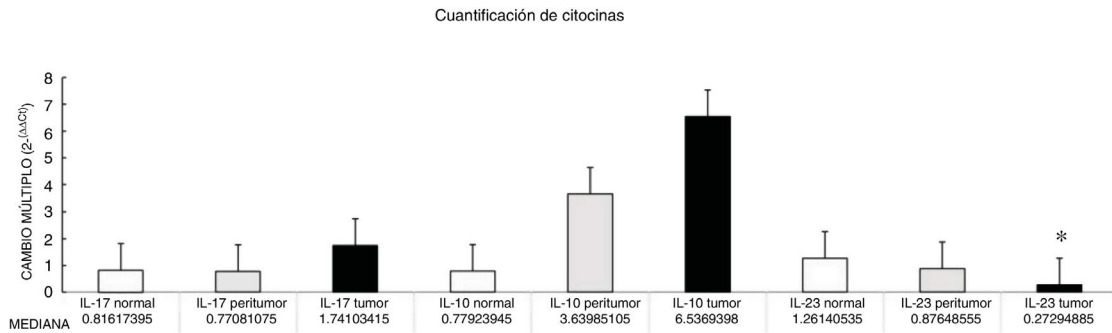


Figura 2 El cambio en el múltiplo de citocinas en las muestras peritumorales y tumorales, en comparación con el tejido normal, de acuerdo con la prueba de suma de rangos de Wilcoxon, fue: IL-23 en tejido tumoral: *p=0.021. IL: interleucina.

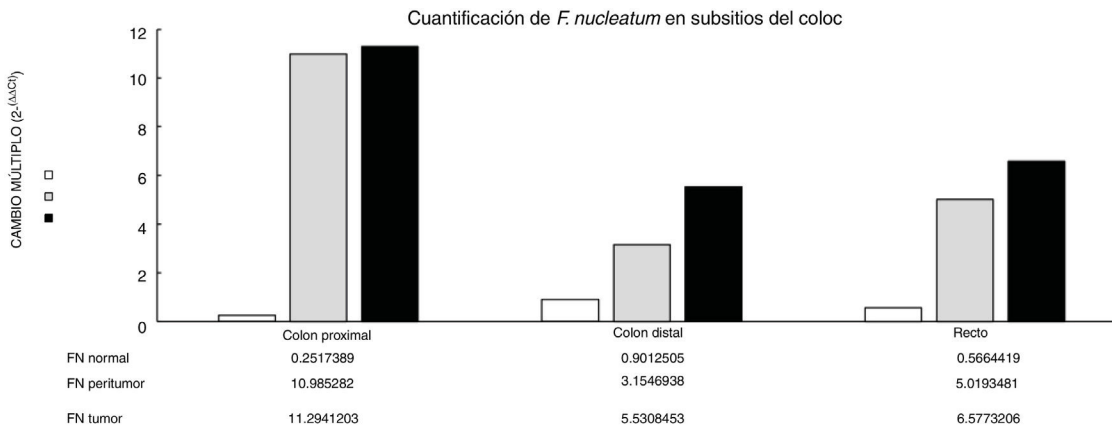


Figura 3 El cambio en el múltiplo de *Fusobacterium nucleatum* en subsitios del colon. FN: *Fusobacterium nucleatum*.

tum y citocina fueron cuantificados en las 30 muestras de CCR y en las respectivas muestras peritumorales y normales. Se encontró un aumento significativo de ADN bacteriano en las muestras tumorales (7.750 [5.792-10.469]). Se realizó un análisis emparejado de la cuantificación de *F. nucleatum* para el grupo de tumor, utilizando tejido normal (0.409 [0.251-0.817]) (tabla 2). Se observaron diferentes expresiones de niveles de *F. nucleatum* a lo largo del colon, de las cuales la más alta fue en el colon proximal, con una mediana de cambio múltiplo de incremento de 11.294 y 10.985 en las muestras de tumor y peritumor, respectivamente. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las ubicaciones ($p > 0.05$) (fig. 2). La interleucina 23 (IL-23) (0.272 [0.125-0.345]) fue significativamente menor en el tejido con tumor en comparación con las muestras normales (1.261 [0.509-1.750]) (fig. 3). No se encontró otra expresión significativa de niveles de citocina en nuestro estudio. En la tabla 2 se resumen los cambios múltiplo en los grupos de tumor y peritumor para *F. nucleatum* y citocinas, en comparación con las muestras normales. Los niveles bacterianos no estuvieron correlacionados significativamente con los niveles de citocinas en el tejido tumoral o el tejido peritumoral (tabla 3).

Discusión

Se piensa que las alteraciones en la composición de la microbiota intestinal juegan un papel en el desarrollo del

Tabla 3 Análisis de correlación entre el cambio en el múltiplo de las citocinas en las muestras normales y el cambio en el múltiplo de *Fusobacterium nucleatum* en las muestras tumorales y peritumorales

Coefficiente de correlación (r)	Tumoral	Peritumoral
IL-17	0.80	-0.20
Valor de p	0.80	0.20
IL-23	-0.80	0.20
Valor de p	0.20	0.80
IL-10	0.80	0.80
Valor de p	0.20	0.20

IL: interleucina.

Prueba de correlación de Spearman.

* Valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

CCR^{4,5,20}. Los resultados del presente estudio confirman, por primera vez en pacientes mexicanos, al igual que en reportes previos de Norteamérica, Europa y Asia^{6,7,10,21}, que la *F. nucleatum* está sobrerrepresentada en el tejido tumoral en CCR, en comparación con el tejido normal. A pesar de que no existieron diferencias significativas entre los niveles de *F. nucleatum* y la ubicación del tumor, se observó un alto nivel de la bacteria en el colon proximal. Existen diferencias bien conocidas en características clínicas, patológicas y epidemiológicas entre los cánceres

de colon proximal y distal^{22,23}. Las mismas diferencias se observan entre la microbiota en el colon proximal y distal. Flynn et al. encontraron que las diferencias en la composición de la microbiota del colon proximal y distal en sujetos sanos podrían deberse a diferencias en la distribución de oxígeno a lo largo de la mucosa del colon. El colon proximal alberga principalmente bacterias aeróbicas en su mucosa, y al contrario, el colon distal alberga principalmente especies anaeróbicas²⁴. Actualmente existe evidencia creciente de que varios factores de riesgo asociados con el desarrollo de CCR (tabaquismo, enfermedad inflamatoria intestinal, alto consumo de alcohol, consumo excesivo de carne roja, diabetes mellitus, obesidad y predisposición genética) afectan en gran medida la síntesis de la microbiota intestinal²⁵. En consecuencia, algunas poblaciones bacterianas son minimizadas, mientras que otras bacterias que son colonizadoras raras del colon, como *Fusobacterium* y *Lactococcus*, muestran un comportamiento adaptativo al nuevo medio ambiente, con lo que se confirma la hipótesis del modelo de «conductor-pasajero bacteriano» que juega un papel clave en la patogénesis del CCR²⁶. Además, algunos estudios sobre *biofilms* bacterianos de la mucosa del colon han revelado nuevo conocimiento sobre los diferentes mecanismos patogénicos que subyacen la carcinogénesis del CCR entre las regiones del colon²⁷. Los cánceres ubicados en las regiones derechas del colon (ciego, colon ascendente y flexura hepática) generalmente muestran una presencia substancial de *biofilm*²⁸. Dejea et al. mostraron que el *biofilm* está asociado con el cáncer de colon humano y ligado a la ubicación del cáncer, con presencia de *biofilm* en virtualmente todos los adenomas y cánceres localizados en las regiones derechas del colon, mientras que los cánceres ubicados en las regiones izquierdas del colon (colon distal a la flexura hepática) raramente tienen *biofilm*^{28,29}. Dichos *biofilms* bacterianos estaban relacionados con cambios epiteliales que caracterizan la progresión de la carcinogénesis, incluida la disminución de E-cadherina y niveles elevados de las citocinas angiogénicas y proinflamatorias³⁰. Utilizando el modelo «conductor-pasajero bacteriano», se ha mostrado que la *F. nucleatum* causa un microambiente inflamatorio que es más favorable para el desarrollo del CCR, a diferencia de otras bacterias que colonizan el sitio del tumor⁶. La interpretación convincente de los datos antes mencionados es algo importante. Primero que nada, ¿la *F. nucleatum* es causa del CCR o consecuencia de la enfermedad? Hasta ahora, la creciente evidencia está a favor de la hipótesis de «causa», ya que nuevos datos han demostrado que la *F. nucleatum* indujo inicialmente lesiones precancerosas (p.ej., pólipos hiperplásicos y adenomas) que eventualmente progresaron a CCR^{9,31}. Además, varios estudios patogénicos han apoyado el papel carcinogénico de *F. nucleatum*, el cual promueve una respuesta oncogénica e inflamatoria por medio de FadA, el principal factor de virulencia de *F. nucleatum*, enlazándose con E-cadherina y activando la vía de B-catenina³². Además, la presencia de *F. nucleatum* en los intestinos afecta las citocinas relacionadas con tumores involucradas en la progresión de tumores de CCR^{15,33}. En las muestras tumorales, encontramos que la IL-23 estaba disminuida significativamente, en comparación con los tejidos normales, mientras que hubo elevación en IL-17 e IL-10, pero la diferencia con

el tejido normal no fue significativa (fig. 1). Debido a la naturaleza transversal de nuestro estudio, el incremento en IL-17 apoya la mayoría de los estudios que consideran a dicha interleucina un promotor importante en la iniciación de tumor y progresión de CCR, por medio de la vía IL-23/IL-17, la cual juega un papel crítico en la patogénesis del CCR³⁴⁻³⁶. En nuestro estudio, hubo una disminución en IL-23, lo que nos lleva a suponer que su reducción durante el desarrollo del tumor fue debida al hecho de que funciona como un iniciador de la vía IL-23/IL-17, resultando en una elevación de IL-17. Grivennikov et al. demostraron que la señalización de IL-23 promovió el crecimiento y progresión tumoral, y el desarrollo de una respuesta tumoral de IL-17. La IL-23 se produce principalmente por células mieloides asociadas a tumor que probablemente son activadas por productos microbianos³⁷. Recientemente, Kostic et al. reportaron que la *F. nucleatum* expandió selectivamente a células inmunes derivadas de mieloides en el CCR. Durante la progresión tumoral, células mieloides reactivas podrían mediar la inmunosupresión por medio de producción de IL-10⁶. La IL-10 es conocida por ser una citocina antiinflamatoria potente³⁸. Debido a su efecto inmunosupresor sobre células dendríticas y macrófagos, la IL-10 puede atenuar la presentación antigénica, al igual que la maduración y diferenciación celular, permitiendo que las células tumorales evadan el mecanismo de vigilancia inmune³⁹. Algunos estudios han mostrado que el miR-21 producido por la *F. nucleatum* elevó los niveles de IL-10 y prostaglandina E2 (PGE2) en células de CCR⁴⁰, y McCoy et al. encontraron una relación positiva significativa entre la abundancia de *F. nucleatum* y la expresión de IL-10 en biopsias de mucosa rectal de pacientes con adenoma, en comparación con controles normales³¹. Nuestros resultados sugieren una expansión de la colonización de *F. nucleatum* en tejidos de CCR, fenómeno que podría llevar a mediadores proinflamatorios (citocinas) elevados, como la IL-10. Un estudio realizado por Proenca et al. examinó la influencia de la *F. nucleatum* en el adenoma colorrectal y el CCR sobre la expresión mediadora inflamatoria por medio de activación de miARN que contribuía a carcinogénesis colorrectal⁴¹. Si se llega a validar, el ADN de *F. nucleatum* en tejido de carcinoma colorrectal podría ser un biomarcador de pronóstico. Además, nuestro estudio podría ofrecer conocimiento para estudios futuros y el desarrollo de estrategias de prevención y tratamiento de CCR, por medio del abordaje de la microbiota.

El presente estudio ha tenido varias fortalezas y debilidades notables. Sus fortalezas incluyen el uso de ADN extraído de tejido congelado fresco, sin fijación de tejido, lo cual resulta en evaluación qPCR > 99% exitosa (con base en la amplificación constante del gen de referencia GAPDH humano en todas las muestras tumorales, las muestras peritumorales y las muestras normales), y el hecho de que evaluamos la utilidad pronóstica de la medición del ADN de *F. nucleatum* en pacientes con CCR, reflejando las características principales en pacientes mexicanos. Una limitación importante fue el pequeño número de pacientes incluidos en el estudio (n = 30). Se deben realizar pruebas en una muestra de mayor tamaño y además de la *F. nucleatum* y las citocinas, también se deben analizar más especies de bacterias intestinales.

Conclusión

El presente estudio apoya la evidencia de que la presencia de *F. nucleatum*, como bacteria simbiótica en el conducto intestinal humano, está relacionada con el desarrollo del CCR. La *F. nucleatum* es aparentemente estimulada en el colon proximal para promover CCR por medio de diferentes mecanismos de virulencia, como la adherencia al epitelio intestinal y la inducción de respuestas inflamatorias e inmunes en el portador. Entre dichas respuestas están la síntesis y liberación de citocinas, incluida la activación de la vía de señalización IL-23/IL-17, lo cual lleva a la progresión de CCR. Por lo tanto, la *F. nucleatum* juega un papel importante en la carcinogénesis colorrectal y podría ser abordada para la prevención y tratamiento de CCR en el futuro.

Financiación

Los autores declaran que no recibieron financiación alguna con relación a este proyecto de investigación.

Autoría

H. Cuellar-Gómez diseñó y realizó la investigación y realizó el borrador del manuscrito; M.E. Ocharán-Hernández diseñó la investigación, contribuyó al análisis, y C. C. Calzada-Mendoza y D.A. Comoto-Santacruz supervisaron la investigación y contribuyeron al análisis.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Agradecimientos

H. Cuellar-Gómez agradece y reconoce la beca del CONACyT para realizar sus estudios de posgrado.

Referencias

1. Tam SY, Wu VWC. A review on the special radiotherapy techniques of colorectal cancer. *Front Oncol*. 2019;9:208, <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2019.00208>.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68:394–424, <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21492>.
3. Sánchez-Barriga JJ. Mortality trends and risk of dying from colorectal cancer in the seven socioeconomic regions of Mexico, 2000-2012. *Rev Gastroenterol Mex*. 2017;82:217–25, <http://dx.doi.org/10.1016/j.rgmx.2016.10.005>.
4. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, et al. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*. 2012;148:1258–70, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.035>.
5. Rea D, Coppola G, Palma G, et al. Microbiota effects on cancer: from risks to therapies. *Oncotarget*. 2018;9:17915–27, <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.24681>.
6. Kostic AD, Chun E, Robertson L, et al. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates

the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe*. 2013;14:207–15, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2013.07.007>.

7. Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, et al. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res*. 2012;22:299–306, <http://dx.doi.org/10.1101/gr.126516.111>.
8. Fukugaiti MH, Ignacio A, Fernandes MR, et al. High occurrence of *Fusobacterium nucleatum* and *Clostridium difficile* in the intestinal microbiota of colorectal carcinoma patients. *Braz J Microbiol*. 2015;46:1135–40, <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246420140665>.
9. Mima K, Nishihara R, Qian ZR, et al. *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. *Gut*. 2016;65:1973–80, <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310101>.
10. Yu T, Guo F, Yu Y, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes chemoresistance to colorectal cancer by modulating autophagy. *Cell*. 2017;170:548–63, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.008>, e16.
11. De Martel C, Franceschi S. Infections and cancer: established associations and new hypotheses. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2009;70:183–94, <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2008.07.021>.
12. Schirmer M, Smeekens SP, Vlamakis H, et al. Linking the human gut microbiome to inflammatory cytokine production capacity. *Cell*. 2016;167:1125–36, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.020>, e8.
13. Liu H, Hong XL, Sun TT, et al. *Fusobacterium nucleatum* exacerbates colitis by damaging epithelial barrier and inducing aberrant inflammation. *J Dig Dis*. 2020;21:385–98, <http://dx.doi.org/10.1111/1751-2980.12909>.
14. Zhang S, Cai S, Ma Y. Association between *Fusobacterium nucleatum* and colorectal cancer: Progress and future directions. *J Cancer*. 2018;9:1652–9, <http://dx.doi.org/10.7150/jca.24048>.
15. Ye X, Wang R, Bhattacharya R, et al. *Fusobacterium nucleatum* subspecies *Animalis* influences proinflammatory cytokine expression and monocyte activation in human colorectal tumors. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2017;10:398–409, <http://dx.doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-16-0178>.
16. Fadrosch DW, Ma B, Gajer P, et al. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome*. 2014;2:6, <http://dx.doi.org/10.1186/2049-2618-2-6>.
17. Topcuoglu N, Paltura C, Külekçi M, et al. Real-Time polymerase chain reaction versus conventional PCR: a comparison between two methods for the detection of *Fusobacterium nucleatum* in saliva, nasopharyngeal secretion and middle ear effusion samples. *Biotechnol Biotechnol Equip*. 2013;27:3825–8, <http://dx.doi.org/10.5504/BBEQ.2013.0022>.
18. Suzuki N, Yoshida A, Nakano Y. Quantitative analysis of multi-species oral biofilms by TaqMan Real-Time PCR. *Clin Med Res*. 2005;3:176–85, <http://dx.doi.org/10.3121/cm.3.3.176>.
19. Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, et al. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*. 2005;21:389–95, <http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00025.2005>.
20. Chen J, Domingue JC, Sears CL. Microbiota dysbiosis in select human cancers: Evidence of association and causality. *Semin Immunol*. 2017;32:25–34, <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2017.08.001>.
21. Repass J. Replication Study: *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Elife*. 2018;7:e25801, <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.25801>.
22. Iacopetta B. Are there two sides to colorectal cancer? *Int J Cancer*. 2002;101:403–8, <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.10635>.

23. Gervaz P, Bucher P, Morel P. Two colons-two cancers: paradigm shift and clinical implications. *J Surg Oncol*. 2004;88:261–6, <http://dx.doi.org/10.1002/jso.20156>.
24. Flynn KJ, Ruffin MT, Turgeon DK, et al. Spatial variation of the native colon microbiota in healthy adults. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2018;11:393–402, <http://dx.doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-17-0370>.
25. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*. 2011;334:105–8, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1208344>.
26. Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR, et al. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10:575–82, <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2819>.
27. Probert HM, Gibson GR. Bacterial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Curr Issues Intest Microbiol*. 2002;3:23–7.
28. Dejea CM, Wick EC, Hechenbleikner EM, et al. Microbiota organization is a distinct feature of proximal colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:18321–6, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1406199111>.
29. Li S, Konstantinov SR, Smits R, et al. Bacterial biofilms in colorectal cancer initiation and progression. *Trends Mol Med*. 2017;23:18–30, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2016.11.004>.
30. Dejea CM, Sears CL. Do biofilms confer a pro-carcinogenic state? *Gut Microbes*. 2016;7:54–7, <http://dx.doi.org/10.1080/19490976.2015.1121363>.
31. McCoy AN, Araujo-Perez F, Azcarate-Peril A, et al. *Fusobacterium* is associated with colorectal adenomas. *PLoS One*. 2013;8:e53653, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0053653>.
32. Rubinstein MR, Wang X, Liu W, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/beta-catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe*. 2013;14:195–206, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2013.07.012>.
33. Yu YN, Yu TC, Zhao HJ, et al. Berberine may rescue *Fusobacterium nucleatum*-induced colorectal tumorigenesis by modulating the tumor microenvironment. *Oncotarget*. 2015;6:32013–26, <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.5166>.
34. Hyun YS, Han DS, Lee AR, et al. Role of IL-17A in the development of colitis-associated cancer. *Carcinogenesis*. 2012;33:931–6, <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgs106>.
35. Straus DS. TNFa and IL-17 cooperatively stimulate glucose metabolism and growth factor production in human colorectal cancer cells. *Mol Cancer*. 2013;12:78, <http://dx.doi.org/10.1186/1476-4598-12-78>.
36. Razi S, Baradaran Noveiry B, Keshavarz-Fathi M, et al. IL-17 and colorectal cancer: From carcinogenesis to treatment. *Cytokine*. 2019;116:7–12, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2018.12.021>.
37. Grivennikov SI, Wang K, Mucida D, et al. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature*. 2012;491:254–8, <http://dx.doi.org/10.1038/nature11465>.
38. Sabat R, Grutz G, Warszawska K, et al. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21:331–44, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2010.09.002>.
39. Hamidullah, Changkija B, Konwar R. Role of interleukin-10 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;133:11–21, <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-011-1855-x>.
40. Noshu K, Sukawa Y, Adachi Y, et al. Association of *Fusobacterium nucleatum* with immunity and molecular alterations in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2016;22:557–66, <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v22.i2.557>.
41. Proenca MA, Biselli JM, Succi M, et al. Relationship between *Fusobacterium nucleatum*, inflammatory mediators and microRNAs in colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2018;24:5351–65, <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v24.i47.5351>.