

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Factores de riesgo genéticos, ambientales y microbiológicos asociados
con el desarrollo de cáncer colorrectal en Medellín, Colombia

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Carolina Hernández Castro

DIRIGIDA POR

David Antonio Carmena Jiménez
Sergio Sánchez Prieto
Miguel Ángel Toro Londoño

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**Factores de riesgo genéticos, ambientales y microbiológicos asociados
con el desarrollo de cáncer colorrectal en Medellín, Colombia**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR:

CAROLINA HERNÁNDEZ CASTRO

DIRECTORES

DAVID ANTONIO CARMENA JIMÉNEZ

SERGIO SÁNCHEZ PRIETO

MIGUEL ÁNGEL TORO LONDOÑO

MADRID, 2025

Notas

Esta tesis doctoral ha dado lugar a la publicación de los siguientes artículos revisados por pares:

1. **Hernández-Castro C**, Maloney JG, Agudelo-López SP, Toro-Londoño MA, Botero-Garcés JH, Orozco MC, Quintero-Quinchia YC, Correa-Cote JC, Múnera-Duque A, Ricaurte-Ciro JC, Londoño-Álvarez LI, Escobar RM, Köster PC, Sánchez S, Carmena D, Santín M. Identification and validation of novel *Blastocystis* subtype ST41 in a Colombian patient undergoing colorectal cancer screening. J Eukaryot Microbiol. 2023:e12978. doi: 10.1111/jeu.12978.

Área o categoría temática, cuartil e índice de impacto (JCR): Microbiology, Q3, 3,880.

2. **Hernández-Castro C**, Múnera Duque A, Hoyos Burgos JP, Toro Londoño MÁ, Agudelo López SdP, Carmena D, Sánchez S. Draft genome sequences of four *Morganella morganii* strains isolated from Colombian colorectal cancer patient stool specimens. Microbiol Resour Announc. 2024; 13(2):e01077-23. doi: 10.1128/mra.01077-23.

Área o categoría temática, cuartil e índice de impacto (JCR): Microbiology, Q4, 0,8.

Para la escritura de este texto se emplearon como referente los textos Claros Díaz (2017) y Ventura *et al.* (1993).

Agradecimientos

Nunca pensé que escribir estas líneas pudiera costarme tanto. Quisiera que la palabra GRACIAS fuera suficiente, pero la considero muy corta para depositar todos los sentimientos que llevo conmigo. Quiero agradecer a todos y cada una de las personas que hizo posible la gestión, desarrollo y finalización de esta tesis doctoral.

Gracias a mis tres directores de tesis, los Doctores David Carmena, Sergio Sánchez y Miguel Toro.

Gracias Dr. David Carmena por haber respondido al correo electrónico de una extranjera con una idea loca. Apostaste sin conocerme y espero no haberte decepcionado en el camino. Gracias por compartir con nobleza tus conocimientos y por tu buena actitud constante. No solo me abriste las puertas de tu laboratorio, sino también las de tu hogar. Gracias Pam Köster por ser esa compañera única para David y por permitirme sentir en familia.

Gracias Dr. Sergio Sánchez por haber permitido que la parasitología te permeara y, a su vez, por haberme permitido conocer la bacteriología. Llegaste en el momento indicado y me enseñaste demasiado. Gracias por trabajar codo a codo conmigo, por tus aportes invaluable al manuscrito, por tu asertividad, tu tiempo y tu paciencia. Gracias Alicia Barquero por permitirme entrar en su hogar y conocer a tu maravillosa familia.

Gracias Dr. Miguel Toro por tu amistad de años que, aunque con altibajos, es muy sincera. Que bueno contar contigo en este proceso formativo.

Gracias al tutor de tesis, Dr. Francisco Ponce, por ayudarme en todas las gestiones académicas en la UCM.

Gracias Dra. Sonia Agudelo por inspirarme, formarme, exigirme, motivarme y ser un ejemplo de mujer luchadora incansable.

Gracias Dr. Jorge Botero porque tus palabras han sido siempre inteligentes y acertadas. Que bueno es poder contar con tu experiencia médica y estadística en todo momento.

Gracias Catherine Quintero porque sin tu carisma, tiempo y entrega por los demás, no hubiera sido posible completar los participantes.

Gracias Dora Orozco por tu buen ojo microscópico y por tu buen humor.

Gracias a todos los integrantes del Grupo de Parasitología - UdeA que estuvieron o están vinculados a mi vida como parasitóloga. Al personal Martha Nelly Montoya, Diana Fernández,

Luis García, Angélica Medina, Marta Zapata, Daniela Hernández, Sara García, Chaquip Numa, Leidylaura Osorno, Juan Santa, Luisa Pinzón, Ana Sofia Mejía y Leonila Garcés.

Gracias Dr. Alonso Martínez por haber creído en esta iniciativa, por haber ayudado a gestar el proyecto y por tus aportes desde el cáncer.

Gracias Dr. Gabriel Bedoya en el cielo por todo lo que hiciste por la ciencia en el país.

Gracias Dr. Winston Rojas por acogerme en el mundo genético, por orientarme y por tu tiempo.

Gracias Dra. Maria Victoria Parra por creer en esta historia y acompañarme en el trasegar científico.

Gracias a todos los integrantes del Grupo GENMOL - UdeA porque me abrieron las puertas de su laboratorio, me instruyeron en el proceso y me hicieron sentir una más. Al personal Omer Campo, Jair García, Conny Duque, Johanna Tejada, Leydy Cano y Viviana Cardona.

Gracias Begoña Bailo porque fuiste más que una compañera de laboratorio, fuiste mi familia y mi amiga en España. Me apoyaste, me escuchaste, me llevabas y me invitabas a todos los lugares. Me abriste las puertas de tu hogar y por eso gracias también a Israel Cruz. Son una familia maravillosa y en Colombia siempre tendrán un lugar especial.

Gracias Dr. Javier Nieto por tus historias, por tu humor, por hacer que los días fríos sean amenos. Gracias Fernando González por venir a Medellín y disfrutar nuestro país.

Gracias a todos los integrantes del Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología del Centro Nacional de Microbiología del ISCIH porque nunca me negaron nada. Todos, sin excepción a los que acudí por un reactivo, un insumo o con una inquietud siempre estuvieron dispuesto a colaborarme. Al personal Isabel de Fuentes, Alejandro Dashti, David González, Belén González, Aida de Lucio, Laura Aragonese, Carmen Chicharro, Emilia García y Marta Lanza.

Gracias Ana Peña por ser mi amiga. Eres una persona muy valiosa y con un carisma excepcional. Gracias por las mudanzas, las idas a Barajas, los paseos. Me dejaste entrar en tu hogar y compartir con tu maravillosa familia en Jaén a quienes nunca olvidaré.

Gracias Dra. Mónica Santín porque siempre tienes la disposición para ayudarnos a sacar adelante los temas complejos. Que bueno contar con tu colaboración.

Gracias a todos los médicos cirujanos oncólogos, gastroenterólogos y auxiliares que se vincularon a este proyecto en cada institución hospitalaria. Al personal de la Clínica Medellín,

Clínica Las Américas, Clínica El Rosario, Hospital Alma Mater de Antioquia y Hospital San Vicente Fundación. Mil gracias por el apoyo recibido.

Gracias Dr. Juan Camilo Correa por tu amistad, por tu ritmo acelerado pero que contagia.

Gracias a todos los participantes del estudio, pacientes y familiares, por la colaboración y aceptación voluntaria.

Gracias Dios y familia. Papi y mami, saben que los amo con todo el corazón. Gracias por haber creído en mí desde pequeña, por nunca rendirse conmigo. Todo es posible sólo y gracias a ustedes dos. Gracias a mis hermanos Carlos H. y Maria T., mi sobrina Helena y mi cuñada Tatiana por entender mis tiempos.

Gracias Rosita y Margarita, Chalo y familia por acompañarme en este proceso.

Gracias Action COST Blastocystis por permitirme conocer a tantas personas en el mundo con un mismo fin en común.

Gracias ISCIII por el apoyo en el desarrollo de la tesis, en especial la Unidad de Genómica.

Gracias Fundación Carolina por esta maravillosa oportunidad de poder hacer mi doctorado en el exterior, por facilitar los espacios sociales y poder conocer a otros carolinos.

Gracias Alma Mater, mi Universidad de Antioquia -UdeA, por permitirme esta oportunidad de formación única e invaluable.

Gracias Universidad Complutense de Madrid - UCM, por los convenios que facilitan la movilidad de estudiantes extranjeros.

Finalmente, Gracias Fabio. Tu eres el motor, el que me impulsa, el que me sostiene, el que me anima, el que me motiva, el que me dice cosas bellas todos los días, el que está orgulloso de mí y que espero eso nunca cambie. GRACIAS infinitas.

Dedicatoria

A mis padres y mi esposo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO	17
ÍNDICE DE FIGURAS.....	21
ÍNDICE DE TABLAS.....	25
ÍNDICE DE ABREVIACIONES	27
RESUMEN	33
SUMMARY.....	37
1 INTRODUCCIÓN.....	41
1.1 Cáncer	41
1.2 Cáncer colorrectal	44
1.2.1 Epidemiología	45
1.2.2 Clasificación.....	48
1.2.3 Mecanismos de carcinogénesis	50
1.2.4 Factores de riesgo	53
1.2.5 Signos y síntomas.....	89
1.2.6 Diagnóstico.....	89
1.2.7 Clasificación anatómica e histológica	91
1.2.8 Tratamiento	92
1.2.9 Prevención	95
2 OBJETIVOS.....	101
2.1 Objetivo general.....	101
2.2 Objetivos específicos.....	101
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	105
3.1 Diseño del estudio.....	105
3.2 Consideraciones éticas.....	105
3.3 Sistema de Salud en Colombia.....	106
3.4 Centros hospitalarios participantes.....	108
3.5 Procedimiento de inclusión de participantes en el estudio	110
3.6 Análisis de origen genético en la población del estudio.....	115
3.6.1 Obtención de sangre periférica	115
3.6.2 Extracción y purificación de DNA genómico a partir de sangre periférica	116
3.6.3 Determinación de la cantidad y pureza del DNA genómico obtenido de sangre periférica	117
3.6.4 Estimación del componente genético ancestral	117

3.6.5	Ensayos de PCR convencional directa y PCR-RFLP para determinar el componente genético ancestral	121
3.6.6	Resolución de los ensayos de PCR convencional directa y PCR-RFLP para determinar el componente genético ancestral	121
3.7	Factores genéticos asociados con cáncer colorrectal	122
3.7.1	Polimorfismos de nucleótido único asociados con cáncer colorrectal	122
3.8	Factores ambientales y conductuales asociados con cáncer colorrectal	124
3.8.1	Encuesta clínico-epidemiológica estructurada	124
3.9	Factores microbiológicos asociados con cáncer colorrectal	126
3.9.1	Técnicas de microscopía para el análisis de heces	126
3.9.2	Entrega del informe de los análisis de heces por técnicas de microscopía y formulación médica	128
3.9.3	Extracción y purificación de DNA a partir de heces.....	129
3.9.4	Detección y caracterización molecular de agentes parasitarios	130
3.9.5	Resolución de los ensayos de PCR convencional para la detección de agentes parasitarios.....	135
3.9.6	Detección de agentes bacterianos	135
3.9.7	Resolución de los ensayos de PCR convencional para la detección de agentes bacterianos.....	138
3.9.8	Aislamiento de cepas de patotipos de <i>Escherichia coli</i> diarreagénica en muestras de heces positivas	138
3.9.9	Aislamiento de <i>Morganella morganii</i> en muestras positivas	140
3.9.10	Técnicas de secuenciación.....	141
3.9.11	Construcción de árboles filogenéticos.....	144
3.9.12	Criterios para la asignación de nuevos subtipos de <i>Blastocystis</i>	145
3.10	Análisis estadístico	146
3.10.1	Control de sesgos.....	146
3.10.2	Plan de análisis	146
4	RESULTADOS	151
4.1	Población de estudio.....	151
4.2	Estimación del componente genético ancestral individual y poblacional	152
4.3	Caracterización sociodemográfica de la población de estudio	154
4.4	Caracterización de los hábitos alimentarios, de tabaquismo, etílicos y de consumo de café	155
4.5	Caracterización de los aspectos relacionados con la vivienda	160
4.6	Caracterización de los aspectos higiénico-sanitarios.....	161
4.7	Caracterización clínica.....	164

4.8	Polimorfismos de nucleótido único (SNP) <i>a priori</i> asociados con cáncer colorrectal.	168
4.9	Detección de agentes parasitarios por técnicas de microscopía	171
4.9.1	Coinfecciones de agentes parasitarios	173
4.10	Detección de agentes parasitarios y bacterianos por técnicas moleculares	174
4.10.1	Coinfecciones de <i>Blastocystis</i> con otros agentes parasitarios y bacterianos	177
4.11	Genotipificación de agentes parasitarios y bacterianos	179
4.11.1	Genotipificación de <i>Blastocystis</i>	179
4.11.2	Coinfecciones por distintos subtipos de <i>Blastocystis</i>	182
4.11.3	Diversidad intrasubtipo en <i>Blastocystis</i>	183
4.11.4	Genotipificación de otros agentes parasitarios	187
4.11.5	Genotipificación de agentes bacterianos	189
4.12	Comparación de técnicas diagnósticas empleadas en la detección de <i>Blastocystis</i>	190
5	DISCUSIÓN	195
5.1	Factores microbiológicos	195
5.2	Factores ambientales y conductuales	210
5.3	Factores genéticos	214
5.4	<i>Blastocystis</i> en el contexto colombiano: prevalencia y epidemiología molecular	217
5.5	Papel de <i>Blastocystis</i> en enfermedad y salud: cambio de paradigma	221
5.6	Limitaciones y fortalezas	223
5.7	Líneas de evolución	225
6	CONCLUSIONES	229
7	BIBLIOGRAFÍA	233
8	ANEXOS	319
	Anexo I. Acta de aprobación del Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Médicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia	319
	Anexo II. Acta de aprobación del Comité de Ética de la Clínica El Rosario	321
	Anexo III. Consentimiento informado Clínica El Rosario	323
	Anexo IV. Acta de aprobación del Comité de Ética de la Clínica Las Américas	326
	Anexo V. Consentimiento informado Clínica Las Américas	328
	Anexo VI. Acta de aprobación del Comité de Ética de la Clínica Medellín de Occidente	331
	Anexo VII. Consentimiento informado Clínica Medellín de Occidente	334
	Anexo VIII. Acta de aprobación del Comité de Ética del Hospital Alma Mater	337
	Anexo IX. Consentimiento informado Hospital Alma Mater	339
	Anexo X. Acta de aprobación del Comité de Ética del Hospital San Vicente Fundación	342

	Anexo XI. Consentimiento informado Hospital San Vicente Fundación	343
	Anexo XII. Encuesta clínico-epidemiológica estructurada	346
9	MATERIAL SUPLEMENTARIO	353
10	ARTÍCULOS PUBLICADOS.....	365

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. A. Incidencia y B. Mortalidad global de cáncer en el año 2022. Adaptada de: Cancer TODAY (https://gco.iarc.who.int/today) (Ferlay <i>et al.</i> , 2024).....	43
Figura 2. Incidencia (color azul) y mortalidad (color rojo) de los diferentes tipos de cáncer en Colombia, 2022, diferenciados por sexos. NHL, linfoma no Hodgkin. Fuente: Cancer TODAY (https://gco.iarc.who.int/today) (Ferlay <i>et al.</i> , 2024).....	44
Figura 3. Posición de Colombia entre los países del continente americano en incidencia (color azul) y mortalidad (color rojo) por cáncer colorrectal en el año 2022. Basada en: Cancer TODAY (https://gco.iarc.who.int/today) (Ferlay <i>et al.</i> , 2024).....	46
Figura 4. Mortalidad por cáncer colorrectal en los diferentes departamentos de Colombia en el año 2022 diferenciado por sexos (hombres en color azul y mujeres en color violeta). Basada en: Instituto Nacional de Cancerología (https://www.cancer.gov.co/conozca-sobre-cancer-1/publicaciones/anuario-estadistico-2022) (Instituto Nacional de Cancerología, 2023). ..	47
Figura 5. Vías de la carcinogénesis colorrectal. CIMP, fenotipo metilador de islas CpG; CIN, inestabilidad cromosómica; MMR, sistema de reparación de bases mal pareadas; MSI, inestabilidad microsatelital. Basada en: Dong y Ren (2018) y Pancione <i>et al.</i> (2012).....	53
Figura 6. Formas de <i>Blastocystis</i> . A. Vacuolares. B. Células gigantes. C. Ameboide. D. Granular.	68
Figura 7. Ciclo de vida propuesto de <i>Blastocystis</i> . a) aguas o alimentos contaminados con heces que contienen las formas quísticas de <i>Blastocystis</i> son ingeridos por b) seres humanos o animales domésticos y salvajes que son los hospedadores de la infección. Tras su paso por el tracto digestivo, las formas quísticas llegan al intestino delgado, donde inician el proceso de desenquistamiento y pasan al c) intestino grueso, donde se liberan las formas vacuolares. Éstas se dividen por fisión binaria y dan origen a las formas granulares y ameboides. Finalmente, en la luz del colon d) las formas vacuolares se pueden volver a enquistar para ser excretadas con las heces reiniciando el ciclo.	69
Figura 8. Algoritmo para el cribado de cáncer colorrectal (CRC). FAP, poliposis adenomatosa familiar; familiar de 1 ^{er} grado: padres, hermanos, hijos; familiar de 2 ^{do} grado: abuelos, tíos, sobrinos; familiar de 3 ^{er} grado: bisabuelos, primos.....	96
Figura 9. Centros hospitalarios de la ciudad de Medellín, Colombia participantes en el estudio.	109
Figura 10. Flujograma procedimental para la inclusión de participantes en el grupo con cáncer colorrectal (CRC). CI, consentimiento informado; ECE, encuesta clínico-epidemiológica; SP, sangre periférica.....	112
Figura 11. Flujograma procedimental para la inclusión de participantes en el grupo sin cáncer colorrectal (No CRC). CI, consentimiento informado; ECE, encuesta clínico-epidemiológica; SP, sangre periférica.....	114
Figura 12. Algoritmo de diagnóstico empleado para la detección de <i>Blastocystis</i> por técnicas de microscopía y técnicas moleculares. PCR, reacción en cadena de la polimerasa; <i>ssu-RNA</i> , subunidad menor del RNA ribosómico; ST, subtipo.	132

Figura 13. Distribución del porcentaje de ascendencia europea (EUR), nativo-americana (NAM) y africana (AFR) en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal.....	153
Figura 14. Frecuencia de agentes parasitarios por técnicas de microscopía en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal.....	172
Figura 15. Coinfecciones por agentes parasitarios detectadas por técnicas de microscopía en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal.	173
Figura 16. Agentes parasitarios detectados por técnicas moleculares en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal.	174
Figura 17. Agentes bacterianos detectados por técnicas moleculares en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal. aEPEC, <i>Escherichia coli</i> enteropatogénica atípica; CRC, cáncer colorrectal; DAEC, <i>Escherichia coli</i> con adherencia difusa, <i>E coli pks+</i> , <i>E coli</i> productora de colibactina; EAEC, <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa; EIEC, <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva; ETEC, <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica; SGG, <i>Streptococcus gallolyticus</i> subespecie <i>gallolyticus</i> ; SGP, <i>Streptococcus gallolyticus</i> subespecie <i>pasteurianus</i> ; STEC, <i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga; tEPEC, <i>Escherichia coli</i> enteropatogénica típica.	175
Figura 18. Presencia diferencial de genes que codifican ciclomodulinas en aislados de patotipos de <i>Escherichia coli</i> diarreagénica. aEPEC, <i>Escherichia coli</i> enteropatogénica atípica; CRC, cáncer colorrectal; DAEC, <i>Escherichia coli</i> con adherencia difusa; EAEC, <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa; ETEC, <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica; gen <i>cdt</i> , <i>cytolethal distending toxin (gene)</i> ; gen <i>cif</i> , <i>cycle-inhibiting factor (gene)</i> ; gen <i>cnf</i> , <i>cytotoxic necrotizing factor (gene)</i> ; gen <i>pks</i> , polyketide synthase (gene).	177
Figura 19. Frecuencia de los subtipos de <i>Blastocystis</i> en el total de participantes reclutados en el estudio. ST, subtipo.	180
Figura 20. Distribución de los subtipos de <i>Blastocystis</i> en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal. CRC, cáncer colorrectal; ST, subtipo.	180
Figura 21. Árbol filogenético resultante del análisis de secuencias nucleotídicas completas del gen codificante para la subunidad menor del RNA ribosómico (<i>ssu-rRNA</i>) de <i>Blastocystis</i> procedentes de la muestra identificada con el nuevo subtipo ST41 en este estudio (círculo de color naranja, grupo No CRC) y de los restantes 36 subtipos actualmente aceptados disponibles en GenBank. ST, subtipo.	181
Figura 22. Frecuencia de coinfecciones de distintos subtipos de <i>Blastocystis</i> en el total de participantes reclutados en el estudio. ST, subtipo.....	182
Figura 23. Coinfecciones por distintos subtipos de <i>Blastocystis</i> en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal. ST, subtipo.	183
Figura 24. Muestras de heces positivas a <i>Giardia duodenalis</i> empleando el ensayo de RT-PCR en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal. En el recuadro en rojo se indican las dos muestras genotipificadas como <i>assemblage</i> B y sub- <i>assemblage</i> BIV. CRC, cáncer colorrectal; C _T , umbral de ciclo.	188
Figura 25. Árbol filogenético resultante del análisis de la matriz de polimorfismos de nucleótido único (SNP) generada a partir de los genomas completos de los 5 aislados de <i>Morganella morganii</i> obtenidos en este estudio (color azul, grupo CRC; color naranja, grupo No CRC) y otros 35 genomas de diferentes orígenes disponibles en GenBank. CRC, cáncer colorrectal.	189

Figura 26. Frecuencia de la detección de *Blastocystis* empleando diferentes aproximaciones diagnósticas. NGS, secuenciación de nueva generación; PCR, reacción en cadena de la polimerasa. 190

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Agentes infecciosos clasificados por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) como carcinógenos para seres humanos (Grupo 1).	62
Tabla 2. Frecuencia y variabilidad molecular de <i>Blastocystis</i> reportada en población colombiana entre 2014 y 2025.	65
Tabla 3. Distribución de los subtipos de <i>Blastocystis</i> en diferentes hospedadores.	71
Tabla 4. Ventajas y desventajas de las técnicas empleadas convencionalmente en el diagnóstico de <i>Blastocystis</i>	76
Tabla 5. Estadificación del cáncer colorrectal siguiendo el sistema del Comité Conjunto Americano del Cáncer (AJCC). Fuente: American Cancer Society (2023).	93
Tabla 6. Relación de los marcadores informativos de la ascendencia empleados para determinar el componente genético ancestral en la población del estudio.	119
Tabla 7. Relación de los polimorfismos de nucleótido único (SNP) <i>a priori</i> asociados con cáncer colorrectal investigados en el estudio.	123
Tabla 8. Métodos y marcadores empleados para la detección y genotipificación de agentes parasitarios por técnicas moleculares.	131
Tabla 9. Dianas y fluoróforos empleados para la detección de patotipos de <i>Escherichia coli</i> diarreagénica.	136
Tabla 10. Dianas y fluoróforos empleados para la detección de <i>Streptococcus gallolyticus</i> subespecie <i>gallolyticus</i> , <i>Streptococcus gallolyticus</i> subespecie <i>pasteurianus</i> y <i>Morganella morganii</i>	138
Tabla 11. Cantidad de participantes del grupo con y sin cáncer colorrectal reclutados en cada centro hospitalario del estudio.	151
Tabla 12. Cantidad de participantes del grupo con y sin cáncer colorrectal reclutados después de parear por sexo y edad en cada centro hospitalario del estudio.	152
Tabla 13. Porcentaje de ascendencia europea, nativo-americana y africana poblacional.	153
Tabla 14. Características sociodemográficas de los participantes pareados del estudio y distribuidos en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal.	154
Tabla 15. Hábitos alimentarios, consumo de tabaco, alcohol y café de los participantes pareados del estudio y distribuidos en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal. Los valores estadísticamente significativos han sido resaltados en negrita.	156
Tabla 16. Características de la vivienda de los participantes pareados del estudio y distribuidos en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal. Los valores estadísticamente significativos han sido resaltados en negrita.	160
Tabla 17. Hábitos higiénico-sanitarios de los participantes pareados del estudio y distribuidos en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal. Los valores estadísticamente significativos han sido resaltados en negrita.	162

Tabla 18. Características clínicas de los participantes pareados del estudio y distribuidos en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal. Los valores estadísticamente significativos han sido resaltados en negrita.	166
Tabla 19. Frecuencias alélicas de los polimorfismos de nucleótido único <i>a priori</i> asociados con cáncer colorrectal de los participantes pareados del estudio y distribuidos en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal.	168
Tabla 20. Frecuencias alélicas y equilibrio Hardy-Weinberg de los marcadores informativos de la ascendencia de los participantes pareados del estudio y distribuidos los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal. Los valores estadísticamente significativos han sido resaltados en negrita.	169
Tabla 21. Frecuencias genotípicas de los marcadores informativos de la ascendencia de los participantes pareados del estudio y distribuidos en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal. Los valores estadísticamente significativos han sido resaltados en negrita.	171
Tabla 22. Agentes parasitarios por técnicas de microscopía en participantes pareados del estudio y distribuidos en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal.	172
Tabla 23. Agentes parasitarios y bacterianos detectadas por técnicas moleculares en participantes pareados del estudio y distribuidos los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal. Los valores estadísticamente significativos han sido resaltados en negrita..	176
Tabla 24. Coinfecciones de <i>Blastocystis</i> con otros agentes parasitarios y bacterianos en participantes pareados del estudio y distribuidos en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal.	178
Tabla 25. Diversidad intrasubtipo de <i>Blastocystis</i> identificadas en el total de participantes reclutados en el estudio.	184
Tabla 26. Información de las variantes únicas intrasubtipo de <i>Blastocystis</i> identificadas en muestras individuales de participantes en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal.	185
Tabla 27. Comparación de la prevalencia de <i>Blastocystis</i> observada con diferentes abordajes diagnósticos en función del índice kappa.	191
Tabla 28. Estudios de casos y controles que han evaluado la posible asociación entre la presencia de <i>Blastocystis</i> y el desarrollo de cáncer colorrectal, con independencia de la conclusión obtenida. Los valores estadísticamente significativos han sido resaltados en negrita. ...	200

ÍNDICE DE ABREVIACIONES

Abreviación	Significado en inglés	Significado en español
% v/v	–	Porcentaje volumen-volumen
°C	<i>Degree Celsius</i>	Grado Celsius
µg/ml	<i>Microgram per milliliter</i>	Microgramo por mililitro
µl	<i>Microliter</i>	Microlitro
<i>aaiC</i>	<i>Type VI secretion protein (gene)</i>	–
<i>aatA</i>	<i>Dispersin transporter protein (gene)</i>	–
<i>afaC</i>	<i>Afimbrial adhesin C (gene)</i>	–
AFR	<i>African ancestry</i>	Ascendencia africana
<i>aggR</i>	<i>AraC transcriptional activator (gene)</i>	–
AIM	<i>Ancestry informative marker</i>	Marcador informativo de la ascendencia
AJCC	American Joint Committee on Cancer	Comité Conjunto Americano del Cáncer
<i>APC</i>	<i>Adenomatous polyposis coli (gene)</i>	–
<i>bfpA</i>	<i>Bundle-forming pilus (gene)</i>	–
<i>bg</i>	<i>β-giardin (gene)</i>	–
BMI	<i>Body mass index</i>	Índice de masa corporal
bp	<i>Base pair</i>	Par de bases
CDC	<i>Centers for diseases control and prevention</i>	Centro para el control y la prevención de enfermedades
CDT	<i>Cytolethal distending toxin</i>	Toxina distendiente citoletal
<i>cdt</i>	<i>Cytolethal distending toxin (gene)</i>	–
Chr	<i>Chromosome</i>	Cromosoma
CI	–	Consentimiento informado
CIF	<i>Cycle-inhibiting factor (gene)</i>	Factor inhibidor del ciclo
<i>cif</i>	<i>Cycle-inhibiting factor (gene)</i>	–
CIMP	<i>CpG island methylator phenotype</i>	Fenotipo metilador de islas CpG
CIN	<i>Chromosome instability</i>	Inestabilidad cromosómica
cm	<i>Centimeter</i>	Centímetro
CNF	<i>Cytotoxic necrotizing factor</i>	Factor necrotizante citotóxico
<i>cnf</i>	<i>Cytotoxic necrotizing factor (gene)</i>	–
CRC	<i>Colorectal cancer</i>	Cáncer colorrectal
C _T	<i>Threshold cycle</i>	Umbral de ciclo
Cy5	<i>Cyanine-5</i>	Cianina 5
D. C.	–	Distrito capital
d/m	–	Días por mes
d/s	–	Días por semana

Abreviación	Significado en inglés	Significado en español
DAEC	<i>Diffusely adherent Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> con adherencia difusa
DEC	<i>Diarrheagenic Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> diarreagénica
dNTP	<i>Deoxynucleotide triphosphate</i>	Desoxinucleótido trifosfato
<i>eae</i>	<i>Intimin (gene)</i>	–
EAEC	<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ECE	–	Encuesta clínico-epidemiológica
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>	Ácido etilendiaminotetraacético
EE. UU.	–	Estados Unidos de América
EIEC	<i>Enteroinvasive Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
EPS	–	Entidad promotora de salud
ETEC	<i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
EUR	<i>European ancestry</i>	Ascendencia europea
FAM	<i>Fluorescein amidites</i>	Amiditas de fluoresceína
FAP	<i>Familial adenomatous polyposis</i>	Poliposis adenomatosa familiar
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>	Suero fetal bovino
g	<i>Gram</i>	Gramo
<i>gdh</i>	<i>Glutamate dehydrogenase (gene)</i>	–
<i>gp60</i>	<i>60-kDa glycoprotein (gene)</i>	–
GWAS	<i>Genome-wide association studies</i>	Estudio de asociación de genoma completo
HEX	<i>Hexachlorofluorescein</i>	Hexacloro de fluoresceína
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
IBS	<i>Irritable bowel syndrome</i>	Síndrome de intestino irritable
IC	<i>Confidence interval</i>	Intervalo de confianza
InDel	<i>Insertion and deletion</i>	Inserción o delección
IPA	–	Índice paquete-año
<i>ipaH</i>	<i>Invasion plasmid antigen (gene)</i>	–
IPS	–	Institución prestadora de salud
IQR	<i>Interquartile range</i>	Rango intercuartílico
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>	Espaciador transcrito interno
KASP-PCR	<i>Kompetitive allele specific PCR</i>	PCR competitiva de alelo específica
kDa	<i>Kilodalton</i>	Kilodalton
kg	<i>Kilogram</i>	Kilogramo
LT	<i>Heat-labile enterotoxin</i>	Enterotoxina termolábil
<i>lt</i>	<i>Heat-labile enterotoxin (gene)</i>	–
M	<i>Molarity</i>	Molaridad
MAC	<i>MacConkey agar</i>	Agar MacConkey
MAF	<i>Minor allele frequency</i>	Frecuencia del alelo menos común

Abreviación	Significado en inglés	Significado en español
MALDI-TOF MS	<i>Mass spectrometry matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight</i>	Espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz con tiempo de vuelo
mg	<i>Milligram</i>	Miligramo
MID	<i>Marker insertion/deletion</i>	Marcador de inserción o delección
min	<i>Minute</i>	Minuto
ml	<i>Milliliter</i>	Mililitro
mM	<i>Millimolar</i>	Milimolar
mm	<i>Millimeter</i>	Milímetro
MMR	<i>Mismatch repair system</i>	Sistema de reparación de bases mal pareadas
MSI	<i>Microsatellite instability</i>	Inestabilidad microsatelital
<i>n</i>	<i>Size of a sample</i>	Tamaño de muestra
n. d.	–	No dato
NA	–	No aplicable
NAM	<i>Native American ancestry</i>	Ascendencia nativo-americana
ng/μl	<i>Nanogram per microliter</i>	Nanogramo por microlitro
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>	Secuenciación de nueva generación
nM	<i>Nanomolar</i>	Nanomolar
NSOPI	–	No se observaron parásitos intestinales
OMS	<i>World Health Organization</i>	Organización Mundial de la Salud
OR	<i>Odds Ratio</i>	Razón de probabilidad
PAHO	<i>Pan American Health Organization</i>	Organización Panamericana de la Salud
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>pks</i>	<i>Polyketide synthase (gene)</i>	–
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RCF	<i>Relative centrifugal force (g force)</i>	Fuerza centrífuga relativa (Fuerza g)
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
ROX	<i>Carboxy-X-rhodamine</i>	Carboxi-X-rodamina
rRNA	<i>Ribosomal RNA</i>	RNA ribosómico
rsID	<i>Reference SNP identification</i>	Número de identificación del polimorfismo de nucleótido único
RT	<i>Room temperature</i>	Temperatura ambiente
RT-PCR	<i>Real time polymerase chain reaction</i>	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
s	<i>Second</i>	Segundo
s. f.	–	Sin fecha

Abreviación	Significado en inglés	Significado en español
SD	<i>Standard deviation</i>	Desviación estándar
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>	Dodecilsulfato de sodio
SEER	<i>Surveillance, epidemiology, and end results program</i>	Programa de vigilancia, epidemiología y resultados finales
SGG	–	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subespecie <i>gallolyticus</i>
SGP	–	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subespecie <i>pasteurianus</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>	Polimorfismo de nucleótido único
SP	–	Sangre periférica
ssu	<i>Small subunit</i>	Subunidad menor
ST	<i>Subtype</i>	Subtipo
STEC	<i>Shiga toxin-producing Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga
STh	<i>Heat-stable enterotoxin human variant</i>	Enterotoxina termoestable humana
sth	<i>Heat-stable enterotoxin human variant (gene)</i>	–
STp	<i>Heat-stable enterotoxin porcine variant</i>	Enterotoxina termoestable porcina
stp	<i>Heat-stable enterotoxin porcine variant (gene)</i>	–
stx	<i>Shiga toxin (gene)</i>	–
stx2f	<i>Shiga toxin 2f variant (gene)</i>	–
TBE	<i>Tris/borate/EDTA</i>	Tampón tris-borato-EDTA
tpi	<i>Triose phosphate isomerase (gene)</i>	–
TSA	<i>Tryptic soy agar</i>	Agar triptona soja
TSB	<i>Tryptic soy broth</i>	Caldo triptona soja
U/μl	<i>Unit per microliter</i>	Unidad por microlitro
UBE	–	Unidad de bebida estándar
V	<i>Volt</i>	Voltio
$\bar{X}$	<i>Mean</i>	Media

RESUMEN

RESUMEN

El cáncer colorrectal (CRC) constituye un problema principal de salud pública en todo el mundo. En Colombia ocupa el tercer lugar en incidencia y mortalidad entre los diferentes tipos de cáncer diagnosticados en la población. Se trata de un proceso multifactorial, producto de una compleja interacción entre factores genéticos, ambientales y microbiológicos, capaces de influir en el inicio y/o progresión tumoral. Este trabajo de tesis doctoral investiga estos factores de riesgo en la población de Medellín, Colombia, poniendo especial atención en *Blastocystis* entre los factores microbiológicos analizados. *Blastocystis* es un protista entérico de patogenidad incierta, especialmente prevalente en la población colombiana, que puede infectar/colonizar el intestino grueso del hombre por periodos prolongados de tiempo. Este agente ha sido asociado reiteradamente con el desarrollo de CRC en diversos estudios publicados en la última década. Sin embargo, estos trabajos tienen en común una serie de deficiencias metodológicas y experimentales que cuestionan la solidez de dicha asociación.

Para esclarecer definitivamente la controversia surgida en la literatura científica acerca de esta asociación, se realizó un estudio de casos (pacientes con CRC, $n = 154$) y controles (individuos sin CRC, $n = 154$) pareados por sexo y edad en cinco centros hospitalarios de Medellín. Para confirmar la homogeneidad de la muestra entre los dos grupos de comparación y con respecto a la población colombiana se estimó el componente genético ancestral individual y poblacional empleando 21 marcadores informativos de la ascendencia (AIM). Respecto a los factores de riesgo genéticos, se compararon las frecuencias alélicas de 10 polimorfismos de nucleótido único (SNP) *a priori* asociados con CRC y de los 21 AIM de forma individual entre ambos grupos. La información relativa a posibles factores de riesgo ambientales y conductuales se obtuvo mediante una encuesta clínico-epidemiológica que contemplaba 46 variables, incluyendo datos sociodemográficos, datos clínicos y aspectos relacionados con los hábitos alimentarios y el consumo de alcohol y tabaco. La evaluación de factores de riesgo microbiológicos se abordó mediante la detección en heces de distintos agentes parasitarios y bacterianos previamente asociados con CRC en la literatura científica, mediante un compendio de técnicas de microscopía y técnicas moleculares que incluía diversos tipos de ensayos de PCR y secuenciación Sanger. En el caso de *Blastocystis*, además se emplearon técnicas de secuenciación de segunda (Illumina) y tercera generación (Oxford Nanopore).

En relación con los factores genéticos, ninguno de los 10 SNP *a priori* asociados con CRC analizados mostró asociación en este estudio. Sin embargo, tres AIM (el alelo C en FYNUL, la

RESUMEN

delección en MID817 y la delección en PV92) sí mostraron asociación cuando fueron analizados de forma individual. En cuanto a los factores ambientales y conductuales, residir en zona rural, habitar una vivienda con suelos de tierra/madera y sin acceso a agua tratada y consumir frecuentemente carne roja, productos ultraprocesados y tabaco constituyeron factores de riesgo de desarrollo de CRC. Por el contrario, consumir frecuentemente fruta fresca, legumbres y verduras y usar frecuentemente hipoclorito sódico para su desinfección constituyeron factores protectores.

En relación con los factores microbiológicos, la presencia de *Blastocystis*, ya sea a nivel de especie, subtipo o variante intrasubtipo, no mostró asociación con el desarrollo de CRC. Por el contrario, la presencia de *Escherichia coli* productora de colibactina, *Morganella morganii* o *Streptococcus gallolyticus* subespecie *pasteurianus* constituyen factores de riesgo de desarrollo de CRC, postulándose como posibles biomarcadores en programas de cribado poblacional. El resto de los agentes parasitarios y bacterianos detectados no mostraron ningún tipo de asociación.

En el caso de *Blastocystis*, su prevalencia global en este estudio fue del 34,6 % y se identificó un total de 11 subtipos (ST) diferentes, incluyendo ST1 a ST4, ST6, ST7, ST10a, ST14, ST30, ST41 y ST44. ST3 fue el ST más prevalente, seguido de ST1, ST2 y ST4. ST3 presentó una baja diversidad intrasubtipo, en comparación con ST1 y ST2, si bien en todos ellos se identificaron variantes únicas especialmente prevalentes en la población de estudio. La secuenciación completa del gen *ssu-rRNA* permitió la descripción y validación formal de un ST nuevo, denominado ST41.

Este trabajo de tesis doctoral constituye el estudio más exhaustivo realizado hasta la fecha en población colombiana analizando factores genéticos, ambientales y microbiológicos en relación con el desarrollo de CRC. Los hallazgos obtenidos demuestran de manera definitiva que no existe una asociación entre *Blastocystis* y el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, de forma paralela se identifican otros factores microbiológicos con alto potencial como marcadores en el diagnóstico temprano de CRC, tanto en programas de cribado poblacional como en estrategias de medicina personalizada.

SUMMARY

SUMMARY

Colorectal cancer (CRC) constitutes a major public health problem worldwide. In Colombia, it ranks third in incidence and mortality among the different types of cancer diagnosed in the population. It is a multifactorial process, resulting from a complex interaction between genetic, environmental, and microbiological factors capable of influencing tumour initiation and/or progression. This doctoral thesis investigates these risk factors in the population of Medellín, Colombia, with special attention to *Blastocystis* among the microbiological factors analysed. *Blastocystis* is an enteric protist of uncertain pathogenicity, highly prevalent in the Colombian population, that can infect/colonize the human large intestine for prolonged periods of time. This agent has been repeatedly associated with the development of CRC in various studies published over the past decade. However, these studies share a series of methodological and experimental shortcomings that question the strength of this association.

To definitively clarify the controversy that has emerged in the scientific literature regarding this association, a case–control study was carried out (CRC patients, $n = 154$; controls without CRC, $n = 154$), matched by sex and age, in five hospitals in Medellín. To confirm the homogeneity of the sample between the two comparison groups and in relation to the Colombian population, both individual- and population-level ancestral genetic components were estimated using 21 ancestry-informative markers (AIM). Regarding genetic risk factors, allele frequencies of 10 single nucleotide polymorphisms (SNP) previously associated with CRC, as well as the 21 AIM, were individually compared between groups. Information on potential environmental and behavioural risk factors was obtained through a clinical-epidemiological survey covering 46 variables, including sociodemographic and clinical data, as well as aspects related to dietary habits and alcohol and tobacco consumption. The assessment of microbiological risk factors was conducted through faecal detection of various parasitic and bacterial agents previously linked to CRC in the scientific literature, using a set of microscopy and molecular techniques that included different PCR assays and Sanger sequencing. In the case of *Blastocystis*, second-generation (Illumina) and third-generation (Oxford Nanopore) sequencing techniques were also employed.

With respect to genetic factors, none of the 10 SNP previously associated with CRC showed an association in this study. However, three AIM (the C allele in FYNUL, the deletion in MID817, and the deletion in PV92) did show association when analysed individually. Regarding environmental and behavioural factors, living in rural areas, residing in homes with unfinished

SUMMARY

floors and without access to treated water, and frequent consumption of red meat, ultra-processed products, and tobacco were found to be risk factors for CRC development. Conversely, frequent consumption of fresh fruit, legumes, and vegetables, as well as frequent use of sodium hypochlorite for disinfecting them, were identified as protective factors.

As for microbiological factors, the presence of *Blastocystis* at the species, subtype, or intra-subtype variant level showed no association with CRC development. On the other hand, the presence of colibactin-producing *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, or *Streptococcus gallolyticus* subspecies *pasteurianus* was identified as risk factors for CRC development and are proposed as potential biomarkers in population screening programs. The other parasitic and bacterial agents detected showed no association.

In the case of *Blastocystis*, its overall prevalence in this study was 34.6%, and a total of 11 different subtypes (ST) were identified, including ST1 to ST4, ST6, ST7, ST10a, ST14, ST30, ST41, and ST44. ST3 was the most prevalent subtype, followed by ST1, ST2, and ST4. ST3 showed low intra-subtype diversity compared to ST1 and ST2, although in all of them unique variants were identified, which were especially prevalent in the study population. Complete sequencing of the *ssu-rRNA* gene allowed the description and formal validation of a new subtype, designated ST41.

This doctoral thesis constitutes the most comprehensive study to date in the Colombian population analysing genetic, environmental, and microbiological factors in relation to CRC development. The findings obtained provide definitive evidence that there is no association between *Blastocystis* and disease development. In parallel, other microbiological factors were identified as promising markers for early CRC diagnosis, both in population screening programs and in personalized medicine strategies.

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento y propagación descontrolada de células anormales (American Cancer Society, 2024a). Se considera una enfermedad de origen genético y de múltiples etapas, en la cual una sola célula sufre una mutación inicial que hace que se divida dando lugar a células genéticamente idénticas para, posteriormente, sufrir mutaciones adicionales que potencian el crecimiento de células anormales (tumores) con propiedades diferenciales, lo que determina la heterogeneidad característica de los tumores (Macdonald *et al.*, 2004).

En condiciones normales, las células crecen y se multiplican para formar nuevas células a medida que el cuerpo las necesita (National Cancer Institute, 2021). Cuando las células envejecen o no funcionan adecuadamente mueren y son reemplazadas por células nuevas. Sin embargo, en ocasiones este proceso ordenado se interrumpe, de tal manera que las células anormales crecen y se multiplican cuando no deberían, propiciando la formación de tumores (National Cancer Institute, 2021).

Las células tumorales se caracterizan porque: a) tienen estimulación autocrina, es decir, secretan sus propios factores de crecimiento para estimular la proliferación tumoral, o alteran los receptores de los factores de crecimiento estimulando la proliferación celular; b) son independientes de anclaje, es decir, no requieren el contacto con la superficie en el medio extracelular; c) suelen crecer sobre o por debajo de otras células perdiendo la capacidad adhesiva; y d) proliferan continuamente invadiendo tejidos adyacentes o incluso en otras partes del cuerpo (Macdonald *et al.*, 2004).

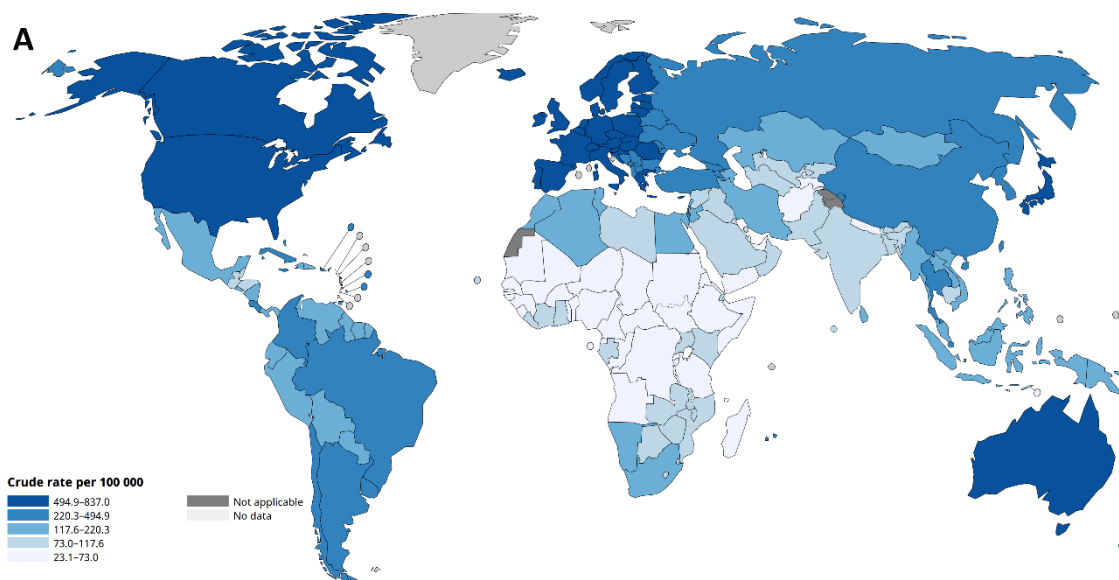
Existen numerosos factores que contribuyen a la persistencia tumoral en el hospedador, aún con un sistema inmunitario plenamente competente. En etapas iniciales los linfocitos T citotóxicos CD8+ y los linfocitos T ayudadores CD4+ producen interferón gamma (IFN- γ) y moléculas citotóxicas para suprimir el crecimiento tumoral (Vinay *et al.*, 2015). Sin embargo, la inflamación crónica y factores inmunitarios como el factor del crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), la prostaglandina 2 (PGE2) y la interleucina 10 (IL-10) contrarrestan estos efectos inhibiendo la respuesta de linfocitos T y promoviendo la proliferación tumoral y la angiogénesis (Pulgar Andrade *et al.*, 2023; Vinay *et*

INTRODUCCIÓN

al., 2015). En este mismo sentido, el sistema inmunitario desempeña un papel fundamental en mantener el equilibrio entre el reconocimiento inmunológico y la progresión tumoral, en cuyo estado se producen subclones o nuevas variantes celulares que acumulan mutaciones y se adaptan permitiendo la latencia tumoral (Pulgar Andrade *et al.*, 2023; Vinay *et al.*, 2015).

En el año 2022 se registraron 19,9 millones de nuevos casos de cáncer en todo el mundo, con la mayor incidencia (número de nuevos casos por cada 100.000 habitantes) en Norte América (716,1), seguida de Oceanía (615,0), Europa (598,2), Latinoamérica y el Caribe (233,1), Asia (211,4) y África (84,3) (Figura 1A) (Ferlay *et al.*, 2024). También se registraron 9,7 millones de defunciones por cáncer, con la mayor mortalidad (número de muertos por cada 100.000 habitantes) en Europa (265,7), seguida de Norte América (189,2), Oceanía (168,6), Asia (117,6), Latinoamérica y el Caribe (112,6) y África (54,3) (Figura 1B) (Ferlay *et al.*, 2024).

Entre los diferentes tipos de cáncer, la mayor incidencia se registró en cáncer de mama (58,7), seguida de próstata (37,0), de pulmón (31,5), colorrectal (24,4) y de cuello uterino (16,9) (Ferlay *et al.*, 2024). La mayor mortalidad se registró por cáncer de pulmón (23,1), seguida de mama (17,0), colorrectal (11,5), de próstata (10,0) y de hígado (9,6) (Ferlay *et al.*, 2024).



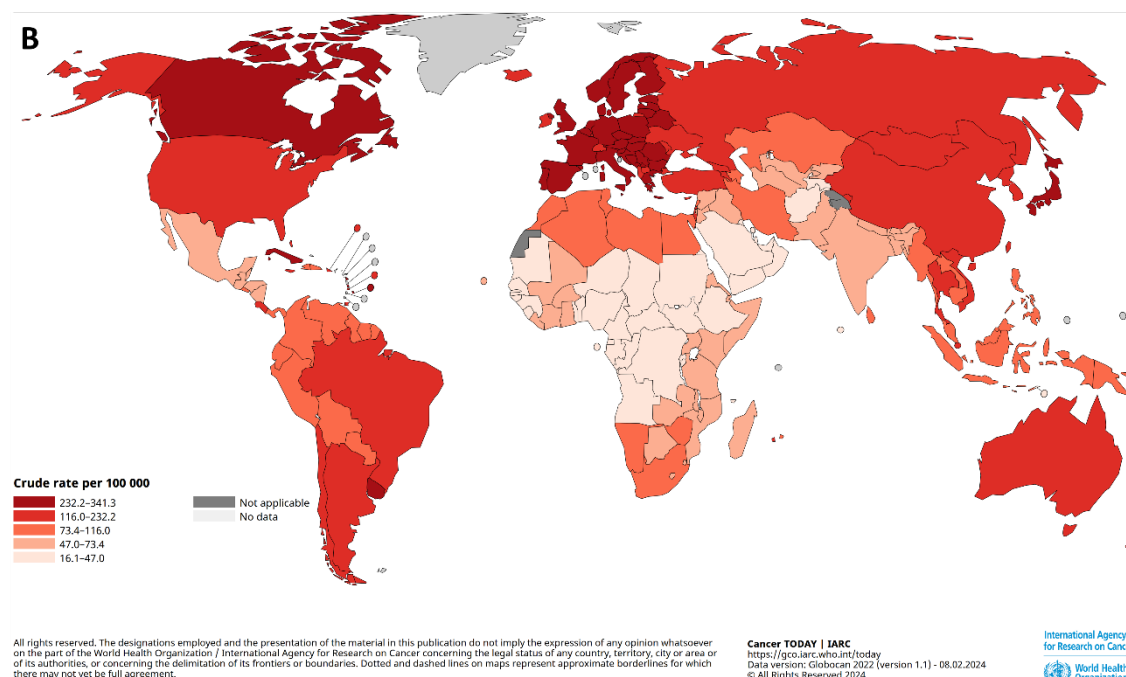
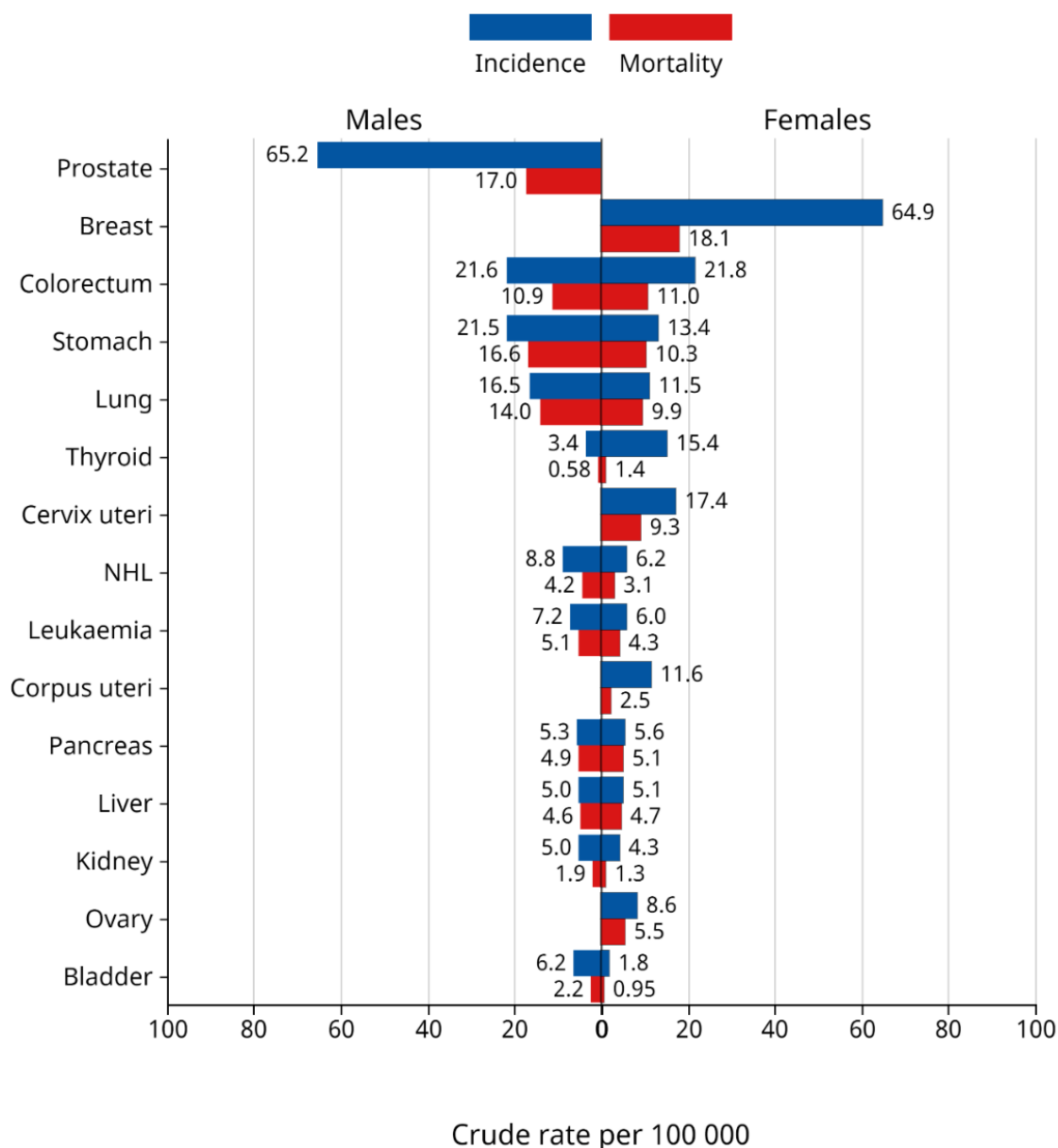


Figura 1. A. Incidencia y B. Mortalidad global de cáncer en el año 2022. Adaptada de: Cancer TODAY (<https://gco.iarc.who.int/today>) (Ferlay *et al.*, 2024).

En el continente americano, según la Organización Panamericana de la Salud (PAHO, del inglés *Pan American Health Organization*), se registraron 4,2 millones de nuevos casos de cáncer y 1,4 millones de muertes por cáncer en 2022 (Ferlay *et al.*, 2024). Entre los diferentes tipos de cáncer, la mayor incidencia se registró en cáncer de mama (100,0), seguida de próstata (94,1), de pulmón (34,9) y colorrectal (31,7). La mayor mortalidad se registró en cáncer de pulmón (23,2), seguida de mama (20,8), de próstata (19,6) y colorrectal (13,5) (Ferlay *et al.*, 2024).

En el año 2022, se registraron 117.620 nuevos casos de cáncer y 56.719 muertes por cáncer en Colombia (Ferlay *et al.*, 2024). Entre los diferentes tipos de cáncer, diferenciados por sexos, en hombres, la mayor incidencia se registró en cáncer de próstata (65,2), seguida de colorrectal (21,6), de estómago (21,5) y de pulmón (16,5), y la mayor mortalidad se registró por cáncer de próstata (17,0), seguida de estómago (16,6), de pulmón (14,0) y colorrectal (10,9) (Figura 2) (Ferlay *et al.*, 2024). En mujeres, la mayor incidencia se registró en cáncer de mama (64,9), seguida de colorrectal (21,8), de cuello uterino (17,4) y de tiroides (15,4), y la mayor mortalidad se registró por cáncer de mama (18,1), seguida de colorrectal (11,0), de estómago (10,3) y de pulmón (9,9) (Figura 2) (Ferlay *et al.*, 2024).



Cancer TODAY | IARC - <https://gco.iarc.who.int/today>

Data version : Globocan 2022 (version 1.1)

© All Rights Reserved 2024

International Agency
for Research on Cancer



Figura 2. Incidencia (color azul) y mortalidad (color rojo) de los diferentes tipos de cáncer en Colombia, 2022, diferenciados por sexos. NHL, linfoma no Hodgkin. Fuente: Cancer TODAY (<https://gco.iarc.who.int/today>) (Ferlay *et al.*, 2024).

1.2 Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CRC, del inglés *colorectal cancer*) agrupa el cáncer de colon, porción más larga del intestino, con una dimensión aproximada de 1,5 metros (m) y el cáncer de recto, última porción del intestino grueso, con una dimensión aproximada de 15 centímetros

(cm) (National Cancer Institute, s. f.-b). Esta agrupación bajo la denominación conjunta de CRC se debe a que tanto el colon como el recto forman parte del intestino grueso y ambos tienen una estructura histológica similar, compuesta por cuatro capas: mucosa, submucosa, muscular y serosa (Paschke *et al.*, 2018). Por todo ello, se denomina CRC al conjunto de todos aquellos tumores ubicados en el intestino grueso, en cualquier localización desde la válvula ileocecal hasta el recto (Tapia *et al.*, 2010).

El CRC generalmente se inicia con un sobrecrecimiento de tejido en el revestimiento interno del colon o recto, conocido como pólipo, el cual, dependiendo de su tipología, tamaño y cantidad, puede con el paso del tiempo, crecer hacia la pared del colon o recto, ocasionando el cáncer propiamente dicho. Éste se origina, de manera inicial, en la capa interna (mucosa) y puede llegar a alcanzar la capa más externa (serosa) e incluso avanzar a los vasos sanguíneos o vasos linfáticos y desde allí a los ganglios linfáticos cercanos, pudiendo diseminarse asimismo a otras partes distantes del cuerpo, lo que se conocen como metástasis (American Cancer Society, 2023).

1.2.1 Epidemiología

En el año 2022, el CRC se ubicó en el cuarto lugar en incidencia (24,4) y en el tercero en mortalidad (11,5) entre los diferentes tipos de cáncer registrados en el mundo. La mayor incidencia se registró en Europa (72,0), seguida de Oceanía (50,8), Norte América (49,3), Latinoamérica y el Caribe (21,8), Asia (20,8) y África (5,0). La mayor mortalidad se registró en Europa (33,2), seguida de Oceanía (18,4), Norte América (17,7), Latinoamérica y el Caribe (11,1), Asia (9,9) y África (3,3) (Ferlay *et al.*, 2024). Al diferenciar por sexos, el CRC se ubicó en el tercer lugar tanto en incidencia (26,9) como en mortalidad (12,6) en hombres y también el tercero tanto en incidencia (21,9) como en mortalidad (10,3) en mujeres (Ferlay *et al.*, 2024).

En América, según la PAHO, la mayor incidencia de CRC se registró en Puerto Rico (65,1), seguida de Canadá (61,8) y Uruguay (59,8) (Figura 3A), y la mayor mortalidad se registró en Barbados (35,4), seguida de Puerto Rico (34,4) y Uruguay (32,6) en 2022 (Figura 3B) (Ferlay *et al.*, 2024). Concretamente Colombia se ubica en el decimosexto lugar en incidencia (21,7) y en el decimoséptimo lugar en mortalidad (11,0) (Ferlay *et al.*, 2024).

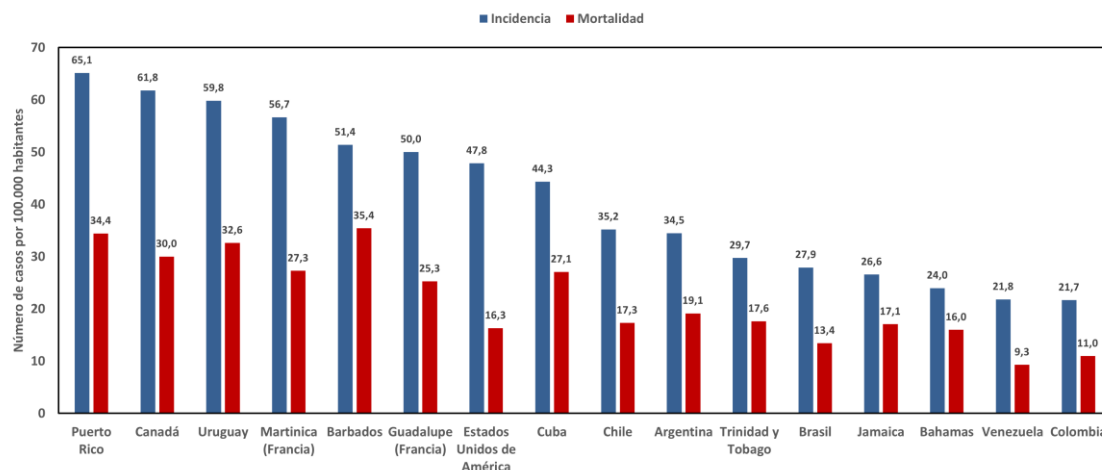


Figura 3. Posición de Colombia entre los países del continente americano en incidencia (color azul) y mortalidad (color rojo) por cáncer colorrectal en el año 2022. Basada en: Cancer TODAY (<https://gco.iarc.who.int/today>) (Ferlay *et al.*, 2024).

En Colombia, se registraron 11.163 nuevos casos de CRC y 5.640 muertes por CRC, ocupando el tercer lugar en incidencia y en mortalidad entre los diferentes tipos de cáncer en 2022 (Ferlay *et al.*, 2024). Separados por departamentos, en hombres la mayor mortalidad se registró en Risaralda (14,1), seguida de Caldas (12,7), Bogotá distrito capital (D. C.) (11,5), Quindío (11,2) y Valle del Cauca (10,8). Igualmente, en mujeres la mayor mortalidad se registró en Risaralda (13,5), seguida de Caldas (12,1), Bogotá D. C. (11,5), Valle del Cauca (10,9) y Quindío (10,3) (Figura 4) (Instituto Nacional de Cancerología, 2023). Es preciso aclarar que en estos datos se incluye a Bogotá D.C. por ser la capital de Colombia y la ciudad que mayor población concentra, aunque no corresponde a un departamento del país propiamente dicho.

En el departamento de Antioquia, en particular, en el año 2018, se notificaron al Registro Poblacional de Cáncer 1.053 nuevos casos de CRC ubicándose en el tercer lugar entre los diferentes tipos de cáncer (Gaviria Correa *et al.*, 2018). Al analizar la incidencia de CRC diferenciando por sexos, en hombres fue de 13,6, ocupando el segundo lugar en incidencias entre los diferentes tipos de cáncer, después del cáncer de próstata. En mujeres, la incidencia fue de 9,1, ocupando también el segundo lugar entre los diferentes tipos de cáncer, después del cáncer de mama (Gaviria Correa *et al.*, 2018). En el año 2023, la mortalidad por CRC en Antioquia fue de 10,4, afectando mayoritariamente a los municipios del Valle de Aburrá (13,0), seguida de los de la subregión del Oriente (9,3) y los de la subregión del Magdalena medio (8,2) (Secretaría Seccional de Salud y Protección Social de Antioquia, 2024). Entre los municipios que comprenden el Valle de Aburrá, Envigado registró la mayor mortalidad (19,5), seguida de Medellín (14,1) y de Itagüí (12,8) (Secretaría Seccional de Salud y Protección Social de Antioquia, 2024).

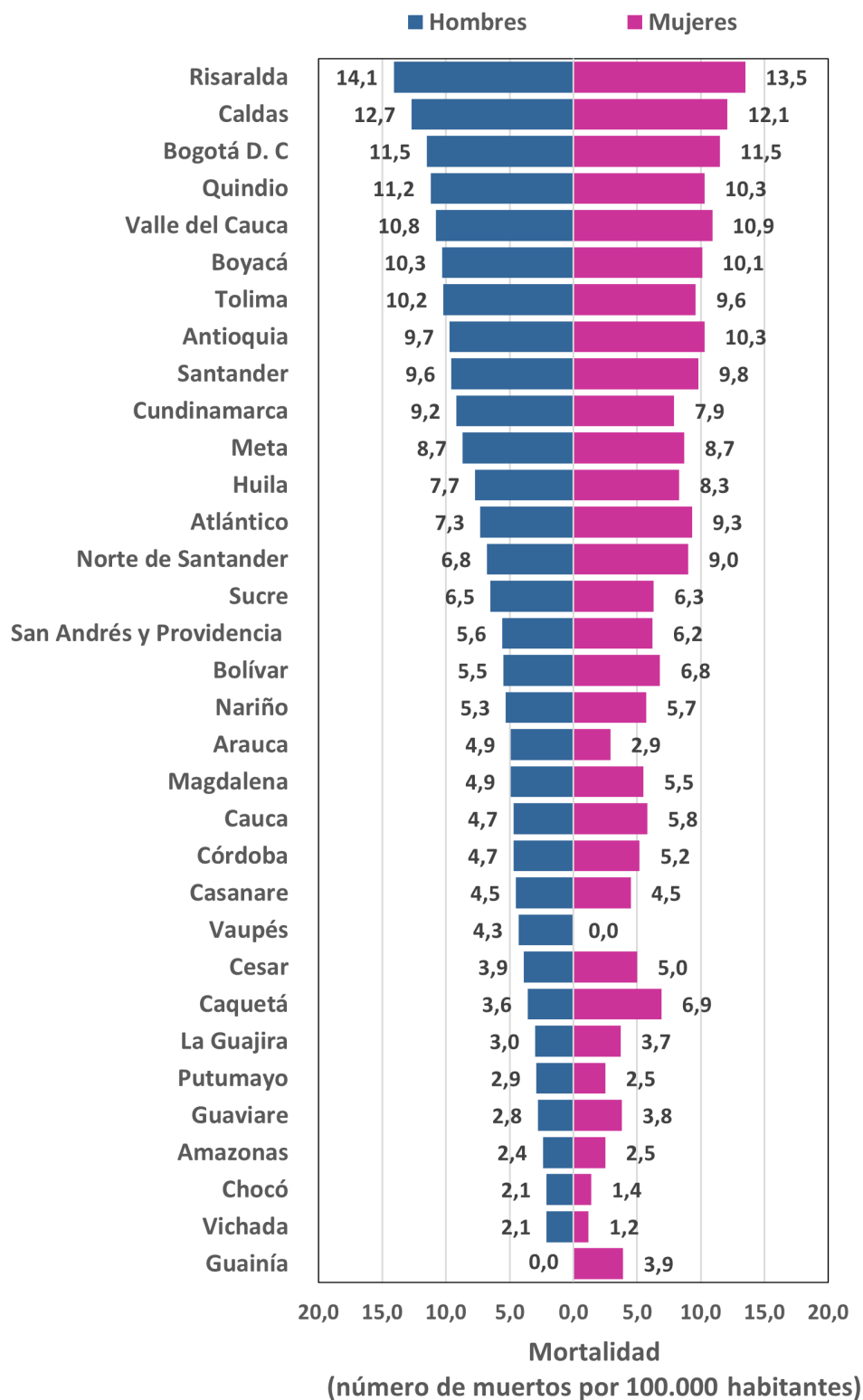


Figura 4. Mortalidad por cáncer colorrectal en los diferentes departamentos de Colombia en el año 2022 diferenciado por sexos (hombres en color azul y mujeres en color violeta). Basada en: Instituto Nacional de Cancerología (<https://www.cancer.gov.co/conozca-sobre-cancer-1/publicaciones/anuario-estadistico-2022>) (Instituto Nacional de Cancerología, 2023).

1.2.2 Clasificación

La clasificación del CRC se basa en su origen, ya sea esporádico o bien hereditario o familiar. Alrededor del 70,0 % de los casos de CRC son de origen esporádico y ocurren en personas sin predisposición genética o historia familiar previa a este tipo de cáncer. Menos del 5,0 % se deben a mutaciones hereditarias en genes relacionados con cáncer (Moreta *et al.*, 2022). El 25,0 % restante corresponde a pacientes con historia familiar previa de CRC, lo que sugiere una contribución específica de determinados genes no identificados ni relacionados expresamente con cáncer hasta el momento (Yamagishi *et al.*, 2016).

1.2.2.1 Cáncer colorrectal de origen esporádico

El CRC esporádico generalmente se desarrolla en personas mayores de 50 años sin antecedentes personales ni familiares a este cáncer (Moreta *et al.*, 2022). En la carcinogénesis del CRC esporádico están implicados múltiples factores entre los que se incluyen los ambientales (dieta, actividad física, etc.) (Gunter y Leitzmann, 2006; Hauret, 2004) y los genéticos (mutaciones somáticas, polimorfismos, etc.) (Curtin *et al.*, 2010; Houlston *et al.*, 2010; Houlston y Tomlinson, 2001; Küry *et al.*, 2008; Pomerantz *et al.*, 2009; von Holst *et al.*, 2010; Webb *et al.*, 2006). Estos últimos serán abordados más adelante (sección 1.2.4.1).

1.2.2.2 Cáncer colorrectal de origen hereditario o familiar

El CRC hereditario se desarrolla por mutaciones en genes concretos asociados con cáncer, que se transmiten de padres a hijos (National Cancer Institute, s. f.-b). Las formas hereditarias tienen consecuencias no sólo para el paciente, sino también para sus familiares, que pueden ser portadores de la misma condición aunque no la padezcan directamente (Balaguer, 2013).

El CRC familiar se desarrolla en pacientes con antecedente familiar de CRC que no presenta mutaciones en genes concretos asociados con cáncer (por lo que no cumplen los criterios de CRC hereditario), sino que está determinado por factores genéticos no identificados hasta el momento que le confieren un mayor riesgo de desarrollo de CRC y que afectan a diferentes miembros de una misma familia (Peñas *et al.*, 2016).

En relación con los mecanismos de carcinogénesis del CRC hereditario, el 85,0 % de los casos se desarrollan por la vía supresora o vía de inestabilidad cromosómica (CIN, del inglés *chromosome instability*), que se asocia con poliposis adenomatosa familiar (FAP, del inglés *familial adenomatous polyposis*). El 15,0 % restante se desarrollan por la vía mutadora o vía de inestabilidad microsatelital (MSI, del inglés *microsatellite instability*), que se asocia con el síndrome de Lynch o cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis (HNPCC) (Sanabria *et al.*, 2012), considerados como los síndromes hereditarios más comunes asociados con CRC.

Poliposis adenomatosa familiar

La poliposis adenomatosa familiar (FAP) es un trastorno hereditario que se caracteriza por la aparición de múltiples pólipos (de cientos a miles) en las paredes internas del colon y recto, que predisponen a desarrollar cáncer (National Cancer Institute, s. f.-b). Con frecuencia se asocia a manifestaciones extracolónicas como quistes cutáneos, lesiones en retina, tumores en tiroides, en páncreas, en sistema nervioso central, hepatoblastomas, adenomas gástricos, anomalías dentales, tumores desmoides y osteomas (Groen *et al.*, 2008; Harned *et al.*, 1991). Esta enfermedad tiene un patrón autosómico dominante causado por mutaciones en el gen *APC* (del inglés *adenomatous polyposis coli*). Dichas mutaciones determinan que la proteína β -catenina se acumule en el citoplasma y posteriormente se transloque al núcleo y se una a factores de la transcripción de la familia Tcf, alterando la expresión de genes que participan en la proliferación, diferenciación, migración y apoptosis celular. El gen *APC* objeto de estas mutaciones controla el ciclo celular y promueve la estabilidad cromosómica (Galiatsatos y Foulkes, 2006).

Síndrome de Lynch

El síndrome de Lynch es un trastorno hereditario que predispone al desarrollo de CRC, cáncer de endometrio, de ovario, de estómago, de intestino delgado, de páncreas, de vías biliares, de vías urinarias y de encéfalo antes de los 50 años (National Cancer Institute, s. f.-b). Esta enfermedad tiene un patrón autosómico dominante causado por mutaciones en los genes del sistema de reparación de bases mal pareadas (MMR, del inglés *mismatch repair system*) del DNA (Lynch y Lynch, 1998; Sinicrope, 2018).

1.2.3 Mecanismos de carcinogénesis

El CRC es una enfermedad heterogénea cuyo desarrollo y progresión está mediado por diferentes vías que incluyen alteraciones en genes importantes como: protooncogenes (codifican proteínas importantes en el control de la proliferación celular, diferenciación, ciclo celular y apoptosis), genes supresores de tumores (inhiben la proliferación celular al detener la progresión a través del ciclo celular y bloquear la diferenciación) y genes de reparación del DNA (American Cancer Society, 2023).

Dentro de las vías de carcinogénesis se distinguen la vía clásica, que a su vez comprende las vías supresora y mutadora, caracterizadas por alteraciones genéticas relacionadas con cambios fenotípicos que favorecen la progresión de un adenoma convencional a un adenocarcinoma, y la vía alterna, que es aquella que permite la progresión de un pólipo serrado a un adenocarcinoma, conocida también como vía serrada (Sanabria *et al.*, 2012).

1.2.3.1 Secuencia adenoma-carcinoma

El modelo clásico de carcinogénesis colorrectal está basado en la secuencia adenoma-carcinoma, descrito por primera vez por Fearon y Vogelstein (1990). En este modelo, el CRC se desarrolla como resultado de la acumulación progresiva de cambios genéticos (por ejemplo mutaciones) y epigenéticos (por ejemplo metilaciones) que conducen a la transformación de un epitelio normal en un epitelio displásico, y finalmente en un carcinoma (Leslie *et al.*, 2002). El cambio inicial desde un epitelio normal a un epitelio hiperproliferativo se desencadena por una mutación en el gen *APC*. A continuación, una de las células hiperprolifera y da lugar a un pequeño adenoma en el cual el DNA está hipometilado, lo que propicia la transición hacia un adenoma temprano y la subsiguiente acumulación de mutaciones en el protooncogen *KRAS*. Estos cambios dan lugar a un epitelio más grande y displásico que conduce al adenoma intermedio. A continuación tiene lugar la pérdida del gen *DCC*, que conduce al adenoma tardío, y finalmente la pérdida del gen *p53*, que culmina con la aparición de un carcinoma (Fearon y Vogelstein, 1990). Estas pérdidas acumuladas de protooncogenes y genes supresores de tumores, derivan en metástasis causando la muerte (Fearon y Vogelstein, 1990).

La mayoría de los casos de CRC se inician desde un pólipo precanceroso que se clasifica inicialmente como adenoma tubular o pólipo serrado, el cual se maligniza cuando los mecanismos normales que regulan la reparación del DNA y la proliferación celular se alteran

(Nguyen *et al.*, 2020). A medida que las células malignas avanzan hacia la luz del colon, el proceso de apoptosis se interrumpe y se forman pólipos adenomatosos que con el tiempo aumentan de tamaño, incrementan las características displásicas y pueden eventualmente adquirir potencial invasivo (Nguyen *et al.*, 2020).

1.2.3.2 Vía supresora o de inestabilidad cromosómica

La vía supresora o de inestabilidad cromosómica (CIN) es la más común en CRC y consiste en la pérdida alélica de genes supresores de tumores como *APC*, *p53*, *DCC*, *SMAD2* y *SMAD4* (Illescas *et al.*, 2015) y mutaciones en los protooncogenes como *KRAS* y *BRAF* (Afanador *et al.*, 2022).

La mutación en el gen *APC* parece ser el evento genético más temprano de la carcinogénesis en CRC, que da como resultado la traslocación nuclear de β -catenina y la activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina, generando la activación de genes asociados con la carcinogénesis como *MYC*, *CCND1*, factor del crecimiento endotelial vascular (VEGF) y receptor delta activado por proliferador de peroxisomas (Nguyen *et al.*, 2020). La inactivación de *APC*, seguida de mutaciones en *KRAS*, favorece la acumulación de nuevas mutaciones en otros genes involucrados en diferentes vías de señalización, entre las que se incluyen la del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y la de la subunidad catalítica alfa del fosfatidilinositol 3 quinas (Pino y Chung, 2010), entre otras.

Alrededor del 80,0 % los casos de CRC esporádicos y casi todos los de FAP se desarrollan por la vía CIN, generando aneuploidía y pérdida de heterocigosidad (National Cancer Institute, s. f.-b; Perea *et al.*, 2011).

1.2.3.3 Vía mutadora o de inestabilidad microsatelital

La vía mutadora o de inestabilidad microsatelital (MSI), se caracteriza por alteraciones en los genes del sistema MMR, que incluye los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1* y *PMS2*, entre otros (Afanador *et al.*, 2022).

Los microsatélites son secuencias cortas (de dos a cuatro nucleótidos) altamente repetitivas en tándem, que pueden sufrir deleciones o inserciones durante la replicación del DNA y que son corregidas por el sistema MMR (Jover y Payá, 2003). Las proteínas del sistema

INTRODUCCIÓN

MMR forman heterodímeros para corregir alteraciones en el emparejamiento de nucleótidos de los genes, comúnmente *MLH1/PMS2* y *MSH2/MSH6* (Gómez Rodríguez *et al.*, 2021). Las alteraciones en este sistema conducen a la acumulación de mutaciones en microsatélites que se traducen en inestabilidad microsatelital (Jover y Payá, 2003).

Si bien en esta vía no se ha descrito una cascada de eventos genéticos consecutivos, se considera que es el primer paso para la progresión del epitelio normal al adenoma, incluye tanto la mutación o inactivación de los dos alelos de un gen del sistema MMR como un fenotipo mutador de inestabilidad microsatelital (Sanabria *et al.*, 2012), alterando genes que participan en el control de ciclo celular como *CTNNB1*, *TGF- β IIR*, *IGF-IIR*, *BAX* y *PTEN* (Kim *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 1999; Yashiro *et al.*, 2010).

Alrededor del 15,0 % de los casos de CRC esporádicos y casi todos los casos de CRC en pacientes con síndrome de Lynch se desarrollan por la vía MSI (Nguyen *et al.*, 2020).

1.2.3.4 Vía del fenotipo metilador de las islas CpG

Las islas CpG son regiones del DNA con alta frecuencia de una citosina (C) seguida de una guanina (G) unidas por un enlace fosfodiéster (p), generalmente localizadas cerca de la región promotora de genes y que se encuentran desmetiladas cuando los genes están expresados o en caso contrario de metilación, provocan el silenciamiento de genes (Perea *et al.*, 2011). La vía del fenotipo metilador de islas CpG (CIMP, del inglés *CpG island methylator phenotype*), se caracteriza por una hipermetilación de éstas regiones en genes supresores de tumores, lo que conlleva la inhibición de la expresión o la pérdida de la función (Toyota *et al.*, 1999).

En la mayoría de los casos, el iniciador de esta vía es una mutación en el gen *BRAF* que inhibe la apoptosis de las células del colon y, conduce a la formación de lesiones en el tejido epitelial, que a su vez desencadenan silenciamiento epigenético de otros genes (Perea *et al.*, 2011). Los tumores que se desarrollan por la vía CIMP se asocian habitualmente a mutaciones en *BRAF* y presencia de inestabilidad microsatelital, pero también se pueden desarrollar tumores por la vía CIMP con estabilidad microsatelital o, mutaciones en el gen *KRAS* en lugar del gen *BRAF*. Estos hechos hacen que esta vía sea controvertida y que aún esté por determinarse si CIMP es una vía en sí misma o si la metilación ocurre como un efecto secundario del proceso carcinogénico (Ferracin *et al.*, 2008; Nagasaka *et al.*, 2008; Xicola y Llor, 2012).

La vía CIMP también se denomina vía serrada, ya que desde el punto de vista histológico se caracteriza por la presencia de pólipos serrados, llamados así por su característico aspecto de dientes de sierra (National Cancer Institute, s. f.-b; Perea *et al.*, 2011).

En conclusión, la clasificación del CRC desde el punto de vista molecular se basa en los eventos celulares globalmente predominantes (CIN, MSI o CIMP) o, de manera equivalente, en el evento iniciador (vía supresora en el caso de CIN, vía mutadora en el caso de MSI o vía metiladora en el caso de CIMP) (Figura 5) (Perea y Rueda, 2012).

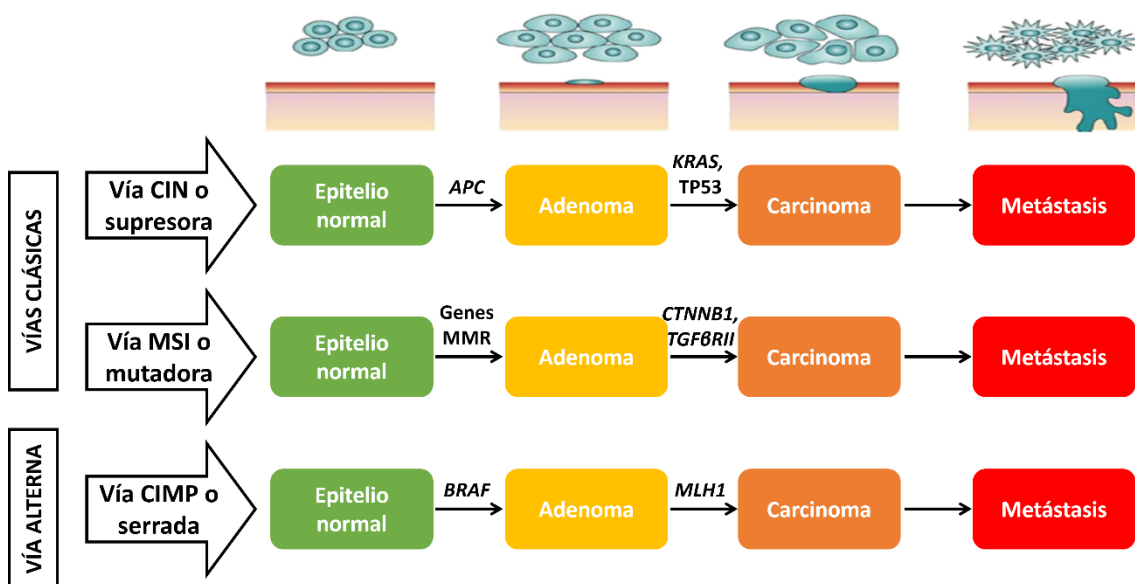


Figura 5. Vías de la carcinogénesis colorrectal. CIMP, fenotipo metilador de islas CpG; CIN, inestabilidad cromosómica; MMR, sistema de reparación de bases mal pareadas; MSI, inestabilidad microsatelital. Basada en: Dong y Ren (2018) y Pancione *et al.* (2012).

1.2.4 Factores de riesgo

Aparte de los mecanismos de carcinogénesis anteriormente descritos, el CRC es una enfermedad compleja en la que participan diferentes factores de riesgo (Huxley *et al.*, 2009). En diversos estudios epidemiológicos se han identificado múltiples factores de riesgo que con frecuencia coexisten e interactúan con el CRC, entre los cuales se incluyen la edad (World Health Organization, 2024), el sexo (White *et al.*, 2018), la etnicidad (Augustus y Ellis, 2018), la historia familiar (Johns y Houlston, 2001; Taylor *et al.*, 2010), la enfermedad inflamatoria intestinal (Shah y Itzkowitz, 2022; Yashiro, 2014), el consumo de tabaco (Liang *et al.*, 2009; Tsoi *et al.*, 2009), de alcohol (Fedirko *et al.*, 2011) y de carnes rojas y procesadas (Chan *et al.*, 2011; Farvid *et al.*,

INTRODUCCIÓN

2021), la obesidad (Gonzalez-Gutierrez *et al.*, 2024; Ma *et al.*, 2013) y la diabetes (Jiang *et al.*, 2011). Además de los factores genéticos y los de tipo sociodemográfico, ambiental o conductual, también se ha propuesto una asociación de ciertos agentes infecciosos con un mayor riesgo de desarrollo de CRC (Brenner *et al.*, 2014).

1.2.4.1 Factores genéticos

Como cualquier otro tipo de cáncer, el CRC cursa con mutaciones somáticas, que ocurren en el tejido afectado durante el proceso de carcinogénesis. Sin embargo, se trata de uno de los tipos de cáncer más ampliamente estudiados en relación con las mutaciones germinales, que ocurren de forma hereditaria y contribuyen a dicho proceso (De La Chapelle, 2004).

Como se ha descrito previamente (secciones 1.2.3.1, 1.2.3.2, 1.2.3.3 y 1.2.3.4), hasta el momento se han identificado varios genes asociados con CRC. La mayoría de las mutaciones genéticas son adquiridas durante la vida de una persona y principalmente ocurren por mutaciones en el gen *APC*, que provoca, entre otras alteraciones, un aumento descontrolado del crecimiento celular y desencadena mutaciones adicionales en otros genes (American Cancer Society, 2023). Un porcentaje minoritario se debe a mutaciones hereditarias, de las cuales se han identificado varios genes que se heredan de forma autosómica dominante (como es el caso de la FAP y el síndrome de Lynch) relacionadas con mutaciones en los genes *APC* y del sistema MMR, respectivamente (American Cancer Society, 2023). Sin embargo, existen también formas autosómicas recesivas como la poliposis asociada al gen *MUTYH* (MAP) (Yamaguchi *et al.*, 2014). En concreto, las mutaciones en personas que expresan el fenotipo (CRC) siendo portadoras de dicha mutación como en los casos de MAP, FAP y de síndrome de Lynch, se estima que representan sólo un 5,0 % de todos los casos de CRC, mientras que las mutaciones en personas que no expresan el fenotipo siendo portadoras de dicha mutación, se estima que representan el 95,0 % de los casos CRC (CRC esporádico). Las bases moleculares responsables de este proceso aún no se comprenden en su totalidad. Desentrañar este mecanismo permitiría en un futuro el desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas, preventivas y terapéuticas (De La Chapelle, 2004).

1.2.4.2 Factores sociodemográficos

Los factores sociodemográficos son aspectos que describen las condiciones de vida de las personas y algunos de ellos se han asociado con un mayor riesgo de desarrollar CRC.

1.2.4.2.1 Edad

En los Estados Unidos de América (EE. UU.), los mayores de 65 años tienen tres veces más probabilidad de desarrollar CRC que aquellos con edades comprendidas entre 50 y 64 años, y 30 veces más probabilidad que aquellos con edades comprendidas entre 25 y 49 años (Rawla *et al.*, 2019).

De acuerdo con la información del programa de vigilancia, epidemiología y resultados finales (SEER, del inglés *surveillance, epidemiology, and end results program*) que recoge las estadísticas del cáncer en EE. UU., entre los años 1975 y 2021 la incidencia de CRC en menores de 50 años pasó de 6,0 a 10,0 y la mortalidad de 2,3 a 1,9. En edades entre 50 y 64 años la incidencia pasó de 89,5 a 67,7 y la mortalidad de 36,4 a 19,5, y para los mayores de 65 años, la incidencia pasó de 334,8 a 141,3 y la mortalidad de 165,7 a 67,2 (SEER Explorer Application, s. f.). En este sentido, en los últimos 40 años la incidencia de CRC en los mayores de 50 años ha disminuido, mientras que por el contrario ésta ha aumentado en los menores de 50 años, lo que algunos investigadores achacan a la implementación de programas de detección temprana y a las recomendaciones de que el cribado de CRC se realice a partir de una edad más temprana (45 años) (Rawla *et al.*, 2019; Wolf *et al.*, 2018).

Desde un punto de vista molecular, el CRC de aparición temprana (diagnosticado antes de los 50 años) en comparación con el de aparición tardía (diagnosticado después de los 50 años), presenta una serie de factores diferenciales como una frecuencia distinta de mutaciones oncogénicas, mayor prevalencia de histología mucoide, un perfil único de metilación del DNA, ubicación más distal y menor tiempo de supervivencia (Marx *et al.*, 2023).

1.2.4.2.2 Sexo

La incidencia de CRC es similar en hombres y mujeres hasta los 35 años, si bien aumenta en los hombres a partir de esa edad (Wolf *et al.*, 2018). En EE. UU., los hombres tienen 1,5 veces más probabilidad de desarrollar CRC que las mujeres (Rawla *et al.*, 2019), con valores de incidencia y mortalidad en hombres (39,2 y 15,2 respectivamente) mayores que en mujeres (31,7 y 10,7 respectivamente) en 2021 (SEER Explorer Application, s. f.). De igual forma, en Reino Unido la mortalidad por CRC fue significativamente mayor en hombres (28,8) que en mujeres (23,6) en 2020 (Ferlay *et al.*, 2024).

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con algunos estudios comparativos realizados en Corea del Sur y Japón, el CRC en el colon ascendente es más frecuente en las mujeres que en los hombres, en los que se asocia con una forma de neoplasia más maligna en comparación con el CRC en colon descendente, que tiene mayor tiempo de supervivencia en mayores de 70 años (Kim *et al.*, 2015). Estas diferencias se podrían explicar por factores hormonales. La exposición a estrógenos sería un factor protector contra la inestabilidad microsatelital, mientras que la pérdida de estrógenos en mujeres adultas se podría asociar con aumento del riesgo a la inestabilidad microsatelital en CRC (Slattery *et al.*, 2001). Por otro lado, algunos estudios realizados en Reino Unido indican que la realización de pruebas para el diagnóstico de enfermedades intestinales, entre ellas la colonoscopia, suele realizarse de forma más frecuente en mujeres que en hombres, lo que podría contribuir a explicar las mayores incidencias registradas en estos últimos (White *et al.*, 2018).

1.2.4.2.3 Autodenominación étnica

De acuerdo con la información del programa SEER en EE. UU., en 1975 la incidencia de CRC en población blanca (60,7) era mayor que en población negra (57,1), sin embargo, en 2021 la incidencia en población negra (40,8) aumentó con respecto a la registrada en población blanca (34,4). Este comportamiento es similar en el caso de la mortalidad por CRC, que en 2021 fue mayor en población negra (16,0) que en población blanca (12,6) (SEER Explorer Application, s. f.).

Algunos autores han intentado explicar a qué se deben estas disparidades raciales debido a que el CRC es ligeramente más común en población negra que en población blanca (Ionescu *et al.*, 2023). Estas disparidades se pueden relacionar con el hecho de que la población negra tiene un menor acceso a los programas de cribado y a los tratamientos con quimioterapia y radioterapia y por lo tanto tienen menor tiempo de supervivencia. Sin embargo, también existen factores diferenciales entre ambas poblaciones en relación con los estilos de vida, tales como los hábitos alimentarios y la actividad física (Ionescu *et al.*, 2023; Lansdorp-Vogelaar *et al.*, 2012).

Adicionalmente, algunos estudios han sugerido que los casos de CRC localizados en el colon proximal, colon transversal y recto son más comunes en población blanca que en población negra y que histológicamente se registran estadios de CRC más avanzados en población negra que en población blanca (Irby *et al.*, 2006).

1.2.4.3 Factores ambientales y conductuales

Los factores ambientales y conductuales describen los factores tanto de riesgo como protectores que se han asociado con el desarrollo de CRC.

1.2.4.3.1 Hábitos alimentarios

La dieta puede ser tanto un factor de riesgo como de protección para el desarrollo de CRC (Thanikachalam y Khan, 2019). Entre los factores considerados de riesgo asociados con el desarrollo de CRC se incluyen: a) alimentos como las carnes rojas, carnes procesadas, huevos y productos ultraprocesados; b) bebidas con elevado contenido de alcohol, azucaradas, carbonatadas y con edulcorantes, y c) grasas dietéticas de origen animal y ácidos grasos trans industriales, colorantes alimentarios sintéticos, glutamato monosódico y dióxido de titanio (Kumar *et al.*, 2023; Thanikachalam y Khan, 2019; Zhou y Rifkin, 2021). Por el contrario, entre los factores considerados protectores se incluyen: a) alimentos como la leche, el queso y los derivados lácteos, frutas, verduras y legumbres, cereales integrales y pescado; b) bebidas como té, café y chocolate, y c) fibras y ácidos grasos dietéticos, calcio, vitaminas A, B, C, D y E, polifenoles, selenio, zinc y magnesio (Kumar *et al.*, 2023).

Entre las denominadas carnes rojas se incluye la carne de ternera, cerdo, cordero, caballo o cabra, que se consideran fuente de grasa, proteínas, aminoácidos esenciales, minerales y micronutrientes (Wolk, 2017). Cuando la carne roja se cocina a temperaturas elevadas se pueden generar compuestos carcinógenos como aminas aromáticas heterocíclicas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y compuestos *N*-nitrosos que promueven la aparición de mutaciones en el DNA (Alaejos y Afonso, 2011; Alomirah *et al.*, 2011; Joosen *et al.*, 2009). Por su parte, las carnes procesadas son aquellas que han sido transformadas mediante salazón, curado, fermentación o ahumado, entre otros procesos empleados para realzar el sabor o mejorar la conservación (Wolk, 2017). Entre ellas se incluyen alimentos como el jamón, la panceta, las salchichas y el salami. Estas carnes procesadas contienen una cantidad de sodio 4 veces mayor que las carnes no procesadas y hasta un 50,0 % de conservantes, incluyendo nitratos, nitritos y nitrosaminas (Micha *et al.*, 2010). La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, del inglés *International Agency for Research on Cancer*), establece una asociación entre el consumo elevado (superior a 200 g/día) de carne roja y el desarrollo de CRC, cáncer de páncreas y de próstata, y entre el consumo de carnes procesadas

y el desarrollo de CRC y cáncer de estómago (Bouvard *et al.*, 2015; International Agency for Research on Cancer, 2024).

Los productos ultraprocesados son formulaciones industriales derivadas de alimentos o sintetizados a partir de otras fuentes orgánicas que se presentan en formatos listos para el consumo o previo calentamiento. Su lista de ingredientes incluye una gran cantidad de conservantes y aditivos como estabilizadores, emulsificantes, solventes, aglutinantes, cohesionantes, aumentadores de volumen, edulcorantes, resaltadores sensoriales, colorantes y saborizantes (Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud, 2015). Entre ellos se incluyen las patatas fritas, aperitivos dulces o salados, helados, chocolates y caramelos, mezclas para repostería, barras energizantes, postres empaquetados, sopas enlatadas, embotelladas, deshidratadas o empaquetadas, bebidas gaseosas y energizantes y zumos de fruta (Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud, 2015). Diversos estudios han sugerido una asociación entre el elevado consumo de productos ultraprocesados y un mayor riesgo de desarrollo de CRC (Meine *et al.*, 2024). Este efecto se ha asociado principalmente a los aditivos que contienen y que pueden afectar la microbiota o, la permeabilidad intestinal y generar inflamación (Whelan *et al.*, 2024). Sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales sobre las propiedades carcinogénicas específicas de dichos aditivos, así como las cantidades asumibles de cada uno de ellos en la dieta en relación con el riesgo de desarrollo de CRC (Isaksen y Dankel, 2023).

Por otro lado, la leche, el queso y los derivados lácteos, se han considerado como posibles agentes protectores frente al desarrollo de CRC debido a su contenido de calcio, vitamina D, ácido linoleico conjugado, esfingolípidos, ácido butírico y productos de fermentación (Barrubés *et al.*, 2019; Norat y Riboli, 2003). La leche entera tiene, entre otros micronutrientes, un elevado contenido de calcio, cuyo metabolismo depende en gran medida de los niveles de vitamina D (Baena y Salinas, 2015). El calcio extracelular que se ingiere en la dieta activa los receptores de calcio en las células del epitelio intestinal, los cuales a su vez activan vías de señalización relacionadas con proliferación, diferenciación y control de la apoptosis (Chang *et al.*, 1997; Lipkin y Newmark, 1995). Un estudio realizado en EE. UU. demostró que el aumento en los niveles circulantes de vitamina D se asociaba con una disminución del riesgo de desarrollar CRC (McCullough *et al.*, 2019).

Las frutas y las verduras se han considerado asimismo como posibles agentes protectores frente al desarrollo de CRC debido a su elevado contenido en varios componentes anticarcinógenos, entre los que se incluyen los carotenoides, vitaminas C y E, selenio, fibra,

glucosinolatos, isotiocianatos, flavonoides y fitoesteroles (Steinmetz y Potter, 1991), si bien existen datos contradictorios en función del estudio consultado. En este sentido, Lee *et al.* (2017) encontraron una importante reducción del riesgo de desarrollo de CRC en función del color de las frutas y verduras que se consumen, de tal manera que las frutas y verduras de color verde, disminuirían el riesgo de desarrollo de CRC debido a su elevado contenido en folato, fibra, luteína, sulforafano e indol, que induce la apoptosis e inhibe el crecimiento en células cancerosas evitando el daño celular (Frydoonfar *et al.*, 2004; Nishikawa *et al.*, 2010). Este sería el caso asimismo de las frutas y verduras de color blanco que, debido a su contenido de diversos fitoquímicos y nutrientes como polisacáridos, glucanos, saponinas y quercetina, desempeñan una función como antioxidante, reducen el daño del DNA y son anticancerígenos (Li *et al.*, 2015). Sin embargo, otros estudios encuentran una asociación débil o incluso inversa entre la ingesta de frutas y verduras con el riesgo de desarrollar CRC, variando incluso por factores como la cantidad de consumo (Terry *et al.*, 2001), el sexo (Nomura *et al.*, 2008), la localización anatómica del CRC (Annema *et al.*, 2011), y el consumo de tabaco (Van Duijnhoven *et al.*, 2009) o alcohol (Koushik *et al.*, 2007).

Las dietas ricas en fibra comprenden un grupo heterogéneo de alimentos que, a pesar de ser indigeribles en el intestino humano, son fermentados por mediación de bacterias intestinales dando lugar a ácidos grasos de cadena corta (Ocvirk *et al.*, 2019). Precisamente algunos estudios han considerado la fibra de la dieta como factor protector frente al desarrollo de CRC, ya que aumenta la motilidad intestinal y por lo tanto reduce el tiempo del tránsito, lo que limita la exposición de la mucosa epitelial a posibles agentes carcinógenos fecales (Zhou y Rifkin, 2021).

1.2.4.3.2 Tabaquismo

La asociación entre el consumo de tabaco y el desarrollo de CRC ha sido ampliamente estudiada. En consecuencia, se ha podido establecer que la incidencia y mortalidad por CRC es significativamente mayor en los fumadores actuales y exfumadores a largo plazo en comparación con no fumadores (Cheng *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2009). Algunos estudios han observado incluso diferencias en la localización anatómica del CRC en función del sexo y el consumo de tabaco, de tal manera que los hombres fumadores tendrían mayor riesgo de desarrollo de CRC en el colon descendente mientras que en las mujeres el mayor riesgo se concentraría en el colon ascendente y en el recto (Gram *et al.*, 2020). El cigarrillo contiene más de 7.000 compuestos químicos, entre los que se incluyen al menos 70 que pueden causar cáncer

INTRODUCCIÓN

por inhalación del humo (Food and Drug Administration, 2024). Los mecanismos que podrían explicar el papel del tabaquismo en la etiología del CRC están basados en el efecto oncogénico directo mediados por carcinógenos presentes en el humo del cigarrillo, como hidrocarburos aromáticos policíclicos, nitrosaminas, aminos heterocíclicas, aminos aromáticas y benceno (Momi *et al.*, 2012).

1.2.4.3.3 Alcoholismo

La IARC ha clasificado las bebidas alcohólicas como carcinógeno para seres humanos (International Agency for Research on Cancer, 2024). En este sentido, algunos estudios han puesto de manifiesto una asociación entre el consumo elevado de alcohol (mayor o igual a 50 g/día de etanol) y la mortalidad por CRC (Cai *et al.*, 2014). Si bien se desconoce el mecanismo molecular y bioquímico por el cual el consumo de alcohol ejerce un efecto carcinógeno, algunos estudios sugieren que el alcohol promueve la hipometilación del DNA genómico en la mucosa del colon y conduce a una hiperproliferación de la mucosa rectal (Choi *et al.*, 1999; Simanowski *et al.*, 2001). Algunos estudios han indicado que el alcohol y sus metabolitos pueden conducir a carcinogénesis colorrectal provocando anomalías genéticas (mutaciones, síntesis defectuosa, inestabilidad y problemas en la reparación), desregulación epigenética (hipometilación global, desregulación de microRNA, alteración en los niveles de enzimas modificantes de histonas como acetiltransferasas y desacetilasas, alteración en las vías de señalización celular (vías como TGF- β /SMAD4, IL-6/STAT3, NF- κ B, Ras, Wnt/ β -catenina/GSK3 β , VEGF-VEGFR2-AKT/FAK y ERK1/2) y modificaciones en el microbioma del hombre (disbiosis microbiana, sobrecrecimiento bacteriano, aumento de permeabilidad intestinal, inflamación mediada por citoquinas o quimoquinas, producción de especies reactivas de oxígeno y actividad de mastocitos y macrófagos) (Rossi *et al.*, 2018).

1.2.4.3.4 Actividad física

La actividad física se ha considerado asimismo como posible agente protector frente al desarrollo de CRC (Slattery *et al.*, 1997). En concreto, tiene un efecto positivo en la disminución de la incidencia y mortalidad de CRC porque mejora la calidad de vida y mitiga los efectos secundarios de algunas estrategias terapéuticas en pacientes con CRC, pero también porque la actividad física suprime la inflamación, modula vías de señalización como Wnt/ β -catenina y

regula la apoptosis y la inmunidad (Amirsasan *et al.*, 2022). Además, la actividad física está directamente relacionada con el índice de masa corporal (BMI, del inglés *body mass index*), de tal manera que el sobrepeso ($\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$) y la obesidad ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) se consideran factores de riesgo para el desarrollo de CRC (World Health Organization, 1999). En este sentido, la obesidad incrementa entre el 19,0 y el 41,0 % el riesgo de desarrollo de CRC y podría asociarse asimismo a una mayor recurrencia de un cáncer primario, a una mayor mortalidad o a una reducción de la sensibilidad a las terapias antiangiogénicas empleadas en el tratamiento del CRC (Bardou *et al.*, 2013; Mandic *et al.*, 2023).

1.2.4.4 Factores microbiológicos

Existe consenso acerca de la capacidad carcinogénica de algunos agentes infecciosos en el hombre, incluyendo tanto agentes parasitarios como bacterianos y víricos (National Cancer Institute, 2019). Según la Sociedad Americana contra el Cáncer, entre el 15,0 y el 20,0 % de los casos de cáncer en el mundo son causados por agentes infecciosos (American Cancer Society, 2016), que han sido clasificados por la IARC en cinco grupos (International Agency for Research on Cancer, 2012):

Grupo 1: El agente es carcinógeno para seres humanos. En este grupo se incluyen aquellos agentes en los que existe evidencia suficiente de su capacidad carcinogénica en el hombre.

Grupo 2A: El agente probablemente es carcinógeno para seres humanos. En este grupo se incluyen aquellos agentes en los que existe evidencia limitada de su capacidad carcinogénica en el hombre, pero suficiente en animales de experimentación.

Grupo 2B: El agente posiblemente es carcinógeno para seres humanos. En este grupo se incluyen aquellos agentes en los que existe evidencia limitada de su capacidad carcinogénica en el hombre, pero menos que suficiente en animales de experimentación, o no hay evidencia en el hombre, pero hay evidencia suficiente en animales de experimentación.

Grupo 3: El agente no es clasificable como carcinógeno para seres humanos. En este grupo se incluyen aquellos agentes en los que no hay evidencia de su capacidad carcinogénica en el hombre y es limitada en animales de experimentación.

INTRODUCCIÓN

Grupo 4: El agente probablemente no es carcinógeno para seres humanos. En este grupo se incluyen aquellos agentes en los que no hay evidencia de su capacidad carcinogénica en el hombre y en animales de experimentación.

Así mismo, se ha propuesto que los agentes infecciosos relacionados con la iniciación, desarrollo y progresión del cáncer pueden actuar de manera individual o en combinación cuando se establecen coinfecciones. Sin embargo, es probable que los mecanismos por los cuales los agentes infecciosos inducen el cáncer, o su papel en la interacción con el entorno, el hospedador y los posibles factores de riesgo concomitantes, se desconozcan en su totalidad (National Cancer Institute, s. f.-a).

En el Grupo 1 de la IARC se han incluido 11 agentes infecciosos que se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Agentes infecciosos clasificados por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) como carcinógenos para seres humanos (Grupo 1).

Tipo de agente infeccioso	Agente infeccioso	Tipo	Tipo de cáncer al cual se ha asociado
Parasitarios	<i>Clonorchis sinensis</i>	–	Colangiocarcinoma
	<i>Opisthorchis viverrini</i>	–	Colangiocarcinoma
	<i>Schistosoma haematobium</i>	–	Cáncer de vejiga
Bacterianos	<i>Helicobacter pylori</i>	–	Cáncer gástrico no cardial y linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa gástrica de células B de bajo grado
Víricos	Virus de la hepatitis	HBV	Carcinoma hepatocelular
		HCV	Carcinoma hepatocelular y linfoma no Hodgkin
	Virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)	HIV-1	Cáncer de cuello uterino, ano, conjuntivas, sarcoma de Kaposi, linfoma no Hodgkin y linfoma Hodgkin
	Virus del herpes humano	Virus de Epstein-Barr (HHV-4)	Linfoma de Burkitt, linfoma no Hodgkin relacionado con inmunosupresión, linfoma extranodal de células NK/T de tipo nasal, linfoma Hodgkin y carcinoma nasofaríngeo

Tipo de agente infeccioso	Agente infeccioso	Tipo	Tipo de cáncer al cual se ha asociado
Víricos	Virus del herpes humano	Virus de sarcoma de Kaposi (HHV-8)	Sarcoma de Kaposi y linfoma primario de las efusiones
	Virus del papiloma humano	HPV-16	Cáncer de cuello uterino, vulva, vagina, pene, ano, cavidad oral, orofaringe y amígdala
		HPV-18	Cáncer de cuello uterino, vulva, pene, ano, cavidad oral y laringe
		HPV-31, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	Cáncer de cuello uterino
		HPV-33	Cáncer de cuello uterino, vulva y ano
	Virus linfotrópico humano de células T	HTLV-1	Leucemia/linfoma de células T del adulto

HBV, virus de la hepatitis B; HCV, virus de la hepatitis C; HHV, virus del herpes humano; HIV, virus de la inmunodeficiencia humana; HPV, virus del papiloma humano; HTLV, virus linfotrópico humano de células T; NK, asesinas naturales. Basada en: International Agency for Research on Cancer (2012) y Wild *et al.* (2020).

Si bien hasta el momento no se ha incluido en el Grupo 1 ningún agente infeccioso específicamente asociado con CRC, de manera general se considera que la microbiota intestinal y sus metabolitos modulan la carcinogénesis del tracto digestivo a través de diversos mecanismos (Brennan y Garrett, 2016; Garrett, 2015; Tilg *et al.*, 2018), como mutagénesis directa, secreción de productos mutagénicos o incremento de la proliferación celular consecuencia de la inflamación resultante de la infección prolongada (Antonic *et al.*, 2013). En particular, entre estos mecanismos se considera especialmente relevante la producción de moléculas de pequeño tamaño con efecto genotóxico directo, demostrable en distintos microorganismos integrantes de la microbiota intestinal (Arthur *et al.*, 2012; Cougnoux *et al.*, 2014; Cuevas-Ramos *et al.*, 2010; Nougayrède *et al.*, 2006).

A continuación, se describen los agentes infecciosos parasitarios, bacterianos y víricos que han sido asociados con el desarrollo de CRC en el hombre hasta el momento, de acuerdo con la literatura científica, en función del grado de evidencia observado y haciendo especial mención a *Blastocystis*, como principal objeto de estudio de esta tesis doctoral.

INTRODUCCIÓN

1.2.4.4.1 Agentes parasitarios asociados con CRC

Blastocystis

Blastocystis es un protista estramenopilo que se reproduce asexualmente y cuyo papel patogénico es controvertido. En este sentido, existen estudios, tanto clínicos como experimentales (sobre todo en modelos animales murinos), que apuntan a que *Blastocystis* puede causar manifestaciones clínicas gastrointestinales como diarrea, dolor abdominal, flatulencias, náuseas, vómito, estreñimiento, pérdida de peso, fatiga o síndrome de intestino irritable (IBS, del inglés *irritable bowel syndrome*) (Boorom *et al.*, 2008; Stensvold *et al.*, 2009; Stenzel y Boreham, 1996; Wawrzyniak *et al.*, 2013), así como manifestaciones clínicas extraintestinales, en concreto desórdenes cutáneos como la urticaria (Hameed *et al.*, 2011; Verma y Delfanian, 2013; Vogelberg *et al.*, 2010). Sin embargo, la presencia de *Blastocystis* es un hallazgo frecuente también en individuos asintomáticos (Beghini *et al.*, 2017; Even *et al.*, 2021; Tito *et al.*, 2019).

De hecho, se considera el protista intestinal humano más frecuente en el mundo, con prevalencias que oscilan entre el 0,5 y el 100 % (El Safadi *et al.*, 2014; Sagnuankiat *et al.*, 2016) y al menos 1.000 millones de personas están infectadas o colonizadas (Stensvold *et al.*, 2020). Por continentes, la mayor prevalencia se ha registrado en Oceanía (52,0 %), seguido de América (43,8 %), África (41,0 %), Europa (34,4 %) y Asia (22,6 %) (Popruk *et al.*, 2021). Dentro del continente americano, en 13 de los 35 países que lo integran se ha detectado la presencia de *Blastocystis* en hospedadores humanos y animales (Fusaro *et al.*, 2024).

En Colombia, la última Encuesta Nacional de Parasitismo Intestinal se realizó en población escolar entre los años 2012 y 2014, donde *Blastocystis* fue el protista más frecuentemente identificado con una prevalencia del 57,7 % (Ministerio de Salud y Protección Social y Universidad de Antioquia, 2015). En una revisión de la literatura científica publicada sobre la situación epidemiológica de *Blastocystis*, en el país para la última década se estima que su frecuencia determinada mediante el uso de técnicas de microscopía y/o moleculares oscila entre el 6,4 y el 88,7 % en población infantil (Sánchez *et al.*, 2017; Villafañe Ferrer y Pinilla Pérez, 2016) y entre el 8,1 y el 90,9 % en población adulta (Backhaus *et al.*, 2023; Espinosa Aranzales *et al.*, 2018). Estos valores varían significativamente entre las regiones biogeográficas del país, como lo demuestra el estudio de Higuera *et al.* (2020), que registró la más alta frecuencia de *Blastocystis* en la región Caribe (94,7 %), seguida de la región Orinoquía (66,0 %) y la región Andina (58,0 %) (Tabla 2). En este mismo sentido, algunos de estos estudios han subtipificado a *Blastocystis* y han indicado que, para Colombia, los subtipos (ST, del inglés *subtype*) más

frecuentes son ST1 (entre el 20,3 y el 56,0 %), seguido de ST3 (entre el 12,0 y el 55,5 %) y ST2 (entre el 14,5 y el 32,9 %) y en menor frecuencia los subtipos ST4 (entre el 0,8 y el 5,1 %), ST5 (4,1 %), ST6 (entre el 0,5 y el 5,0 %), ST7 (entre el 0,8 y el 4,0 %), ST8 (0,9 %) y ST9 (0,9 %) (Tabla 2).

Tabla 2. Frecuencia y variabilidad molecular de *Blastocystis* reportada en población colombiana entre 2014 y 2025.

Año de publicación	Municipio de Colombia	Población de estudio	Frecuencia <i>n</i> /total (%) y técnica diagnóstica para <i>Blastocystis</i>	Subtipo de <i>Blastocystis</i> (<i>n</i> /total analizadas)	Referencia
2014	Calarcá	Pediátricos	158/275 (57,5): MD	n. d.	Londoño-Franco <i>et al.</i> (2014)
2014	n. d.	Pediátricos y adultos	125/277 (45,1): MD	ST1: 70/125 ST2: 40/125 ST3: 15/125	Ramírez <i>et al.</i> (2014)
2015	Cartagena de Indias	Pediátricos	54/286 (18,8): MD	n. d.	Pinilla Pérez <i>et al.</i> (2015)
2016	Turbaco	Pediátricos	25/390 (6,4): MD	n. d.	Villafañe Ferrer y Pinilla Pérez (2016)
2017	Puerto Nariño	Pediátricos	92/284 (32,4): MD 252/284 (88,7): PCR	ST1: 59/203 ST2: 62/203 ST3: 70/203 ST4: 6/203 ST6: 1/203	Sánchez <i>et al.</i> (2017)
2018	Guachené, Quibdó, Urabá	Adultos	23/284 (8,1): MD	n. d.	Carvajal-Restrepo <i>et al.</i> (2018)
2018	Bogotá	Adultos	83/331 (25,1): MD 25/48 (52,1): PCR	n. d.	Espinosa Aranzales <i>et al.</i> (2018)
2019 y 2023	Apulo	Pediátricos	69/97 (71,1): MD 71/98 (72,4): PCR	ST1: 28/71 ST2: 30/71 ST3: 15/71 ST4: 1/71 ST5: 4/71	Hernández <i>et al.</i> (2019, 2023)
2019	Popayán	Pediátricos	65/258 (25,2): MD 100/255 (39,2): PCR	ST1: 24/62 ST2: 9/62 ST3: 27/62 ST4: 2/62	Villamizar <i>et al.</i> (2019)
2020	Medellín y Unguía	Pediátricos	100/122 (81,9): PCR	n. d.	Bryan <i>et al.</i> (2020)
2020	Popayán	Pediátricos	22/57 (38,6): MD 30/57 (52,6): PCR	n. d.	Castañeda <i>et al.</i> (2020)
2020	Varios*	Pediátricos y adultos	189/649 (29,1): MD 336/649 (51,8): PCR	ST1: 48/116 ST2: 21/116 ST3: 42/116 ST4: 3/116 ST8: 1/116 ST9: 1/116	Higuera <i>et al.</i> (2020)

INTRODUCCIÓN

2021	Bogotá	Adultos	92/131 (70,2): PCR	ST1: 10/40 ST2: 10/40 ST3: 18/40 ST6: 2/40	Hernández <i>et al.</i> (2021)
2021	Medellín	Pediátricos	42/265 (15,8): MD 141/265 (53,2): PCR	ST1: 12/59 ST2: 14/59 ST3: 18/59 ST4: 3/59 ST6: 1/59 ST16: 9/59	Osorio-Pulgarin <i>et al.</i> (2021)
2022	Arcabuco, Sogamoso, Garagoa, Toca	Pediátricos	266/338 (78,7): MD	n. d.	Arcos Lucero <i>et al.</i> (2022)
2022	Santa Marta	Pediátricos y adultos	173/192 (90,1): PCR	n. d.	Kann <i>et al.</i> (2022)
2023	Santa Marta	Pediátricos y adultos	222/245 (90,6): PCR	n. d.	Backhaus <i>et al.</i> (2023)
2023	Quibdó, Apartadó, Guachené, Granada	Pediátricos	52/240 (21,7): MD	n. d.	Bravo-González <i>et al.</i> (2023)
2023	Cali, Nariño	Adultos	47/139 (33,8): MD 69/139 (49,6): PCR	n. d.	Potes-Morales y Crespo-Ortiz (2023)
2024	Popayán	Pediátricos y adultos	23/99 (23,2): MD 90/99 (90,9): PCR	ST1: 4/34 ST2: 26/34 ST3: 11/34 ST9: 1/34 ST14: 1/34 ST28: 1/34	Castañeda <i>et al.</i> (2024)
2024	Santa Marta	Pediátricos y adultos	391/773 (50,6): PCR	n. d.	Frickmann <i>et al.</i> (2024)
2024	Puerto Berrio, Segovia, Salgar	Pediátricos	183/384 (47,7): MD	n. d.	Hernández-Castro <i>et al.</i> (2024)
2024	Cali	Adultos	45/66 (68,2): MD	n. d.	Zapata-Valencia <i>et al.</i> (2024)

MD, microscopía directa; n. d., no dato; PCR; reacción en cadena de la polimerasa; ST, subtipo.

*Se incluyeron 32 municipios de las distintas regiones biogeográficas de Colombia, ellos son: Montería, Mompós, Popayán, Poré, Tamara, Yopal, Arcabuco, Paipa, Tunja, Tuta, Villa de Leyva, Bogotá, Chaguaní, Fómeque, San Francisco, Soacha, Armenia, Calarcá, Córdoba, Pereira, Amalfi, Bello, Medellín, Caldas, El Santuario, Rionegro, Puerto Inírida, Caño Cornejo, Coco Nuevo, Coco Viejo, Leticia, Puerto Nariño.

A esta controversia acerca del papel patogénico de *Blastocystis* se ha venido sumando en los últimos años la hipótesis de que pudiera formar parte de la microbiota intestinal normal del hombre (Tito *et al.*, 2019), e incluso, más recientemente, que pudiera desempeñar un papel beneficioso para el hospedador (Aykur *et al.*, 2024; Stensvold, 2025). En este sentido, Piperni *et al.* (2024), en un estudio que incluyó 59.989 individuos de 32 países, encontraron una fuerte asociación de la presencia de *Blastocystis* en individuos que tienen dietas ricas en productos

vegetales, así como perfiles cardiometabólicos favorables o que están sometidos a programas de mejoras dietética (Piperni *et al.*, 2024). Otros estudios, en concreto en Colombia, han sugerido que la presencia de *Blastocystis* favorece comunidades microbianas más estables y diversas relacionadas con un mejor estado de salud, asimismo promueve la presencia de taxones microbianos asociados con funciones metabólicas e inmunológicas mejoradas, incluyendo la promoción de propiedades anti-inflamatorias e incluso sugieren que *Blastocystis* podría servir como biomarcador de microbiota favorable (Castañeda *et al.*, 2025).

Blastocystis es un protista polimórfico del cual se han descrito cuatro formas básicas: vacuolar, ameboide, quística y granular (Tan, 2008). La forma vacuolar tiene un tamaño que oscila entre 2 y 200 μm (promedio 4 a 15 μm), es esférica y se caracteriza por tener una vacuola central que ocupa aproximadamente el 90,0 % del volumen celular y que se visualiza vacía, desplazando las organelas internas hacia la periferia, así como los núcleos, que pueden ser uno o varios rodeados por una envoltura nuclear con poros. La forma vacuolar es la más frecuentemente observada en heces (Stenzel y Boreham, 1996; Tan, 2008). La forma granular tiene un tamaño que oscila entre 3 y 80 μm , se caracteriza por la presencia de gránulos heterogéneos en el citoplasma (que se han descrito como gránulos tipo mielina), pequeñas vesículas, gránulos cristalinos y gotas lipídicas. La forma granular es la más frecuentemente observada en cultivos (Stenzel y Boreham, 1996; Zierdt *et al.*, 1967). La forma ameboide tiene un tamaño que oscila entre 10 y 15 μm , son células irregulares con uno o dos pseudópodos que sin embargo no están involucrados en la movilidad del organismo (Tan *et al.*, 1996). Algunos autores refieren la presencia de un citoplasma compartimentado conteniendo bacterias fagocitadas sugiriendo un papel nutricional de esta forma ameboide, pero discrepan en la presencia o no de vacuola central, aparato de Golgi y mitocondrias citoplasmáticas (Dunn *et al.*, 1989; Tan y Zierdt, 1973). Esta forma ameboide predomina en los cultivos de heces provenientes de pacientes sintomáticos, por lo que se ha asociado con una posible mayor virulencia (Tan y Suresh, 2006; Vassalos *et al.*, 2010). La forma quística tiene un tamaño que oscila entre 2 y 5 μm , es generalmente redonda u oval, se caracteriza por tener una pared celular multilaminar y un citoplasma con hasta 4 núcleos, mitocondria, depósitos de glucógeno y pequeñas vacuolas. La forma quística se considera el estadio transmisible o infectante del protista (Tan, 2008). Algunos autores proponen además la existencia de quistes de pared gruesa, implicados en la infección externa, y quistes de pared delgada, implicados en procesos de autoinfección (Singh *et al.*, 1995). Otras formas descritas para *Blastocystis* son la forma avacuolar (con tamaños de entre 5 y 8 μm y carente de vacuola central), la forma multivacuolar (de igual tamaño pero

INTRODUCCIÓN

conteniendo múltiples vacuolas en su citoplasma) y las células gigantes (con tamaños de entre 20 y 40 μm con estructuras filamentosas en la vacuola central) (Tan, 2008) (Figura 6).

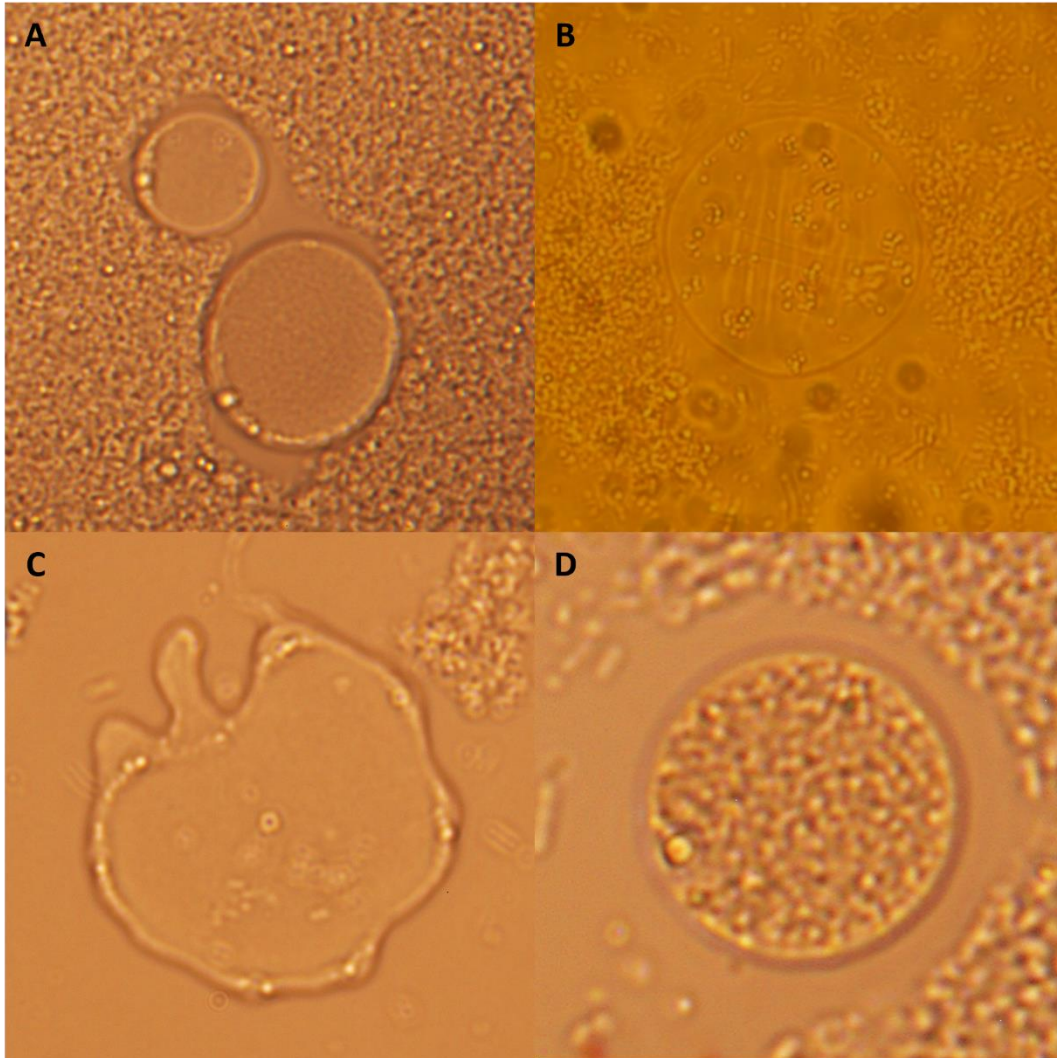


Figura 6. Formas de *Blastocystis*. A. Vacuolares. B. Células gigantes. C. Ameboide. D. Granular.

El ciclo de vida de *Blastocystis* no se conoce de manera fehaciente. La forma quística es considerada como el estadio infectante, que puede adquirirse por ingestión de agua o alimentos contaminados con heces. Tras llegar al intestino delgado se inicia el proceso de desenquistamiento y posterior colonización del intestino grueso (considerado como el hábitat natural del protista) donde se liberan las formas vacuolares (Anuar *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2012). Estas formas vacuolares se dividen por fisión binaria para dar lugar a formas ameboides o granulares (Tan, 2008). Finalmente, las formas vacuolares se enquistan en la luz del intestino grueso para dar origen nuevamente a la forma quística excretada al medio ambiente junto con

las heces y contaminando eventualmente aguas superficiales o alimentos frescos no procesados (Parija y Jeremiah, 2013), como se ilustra en la Figura 7.

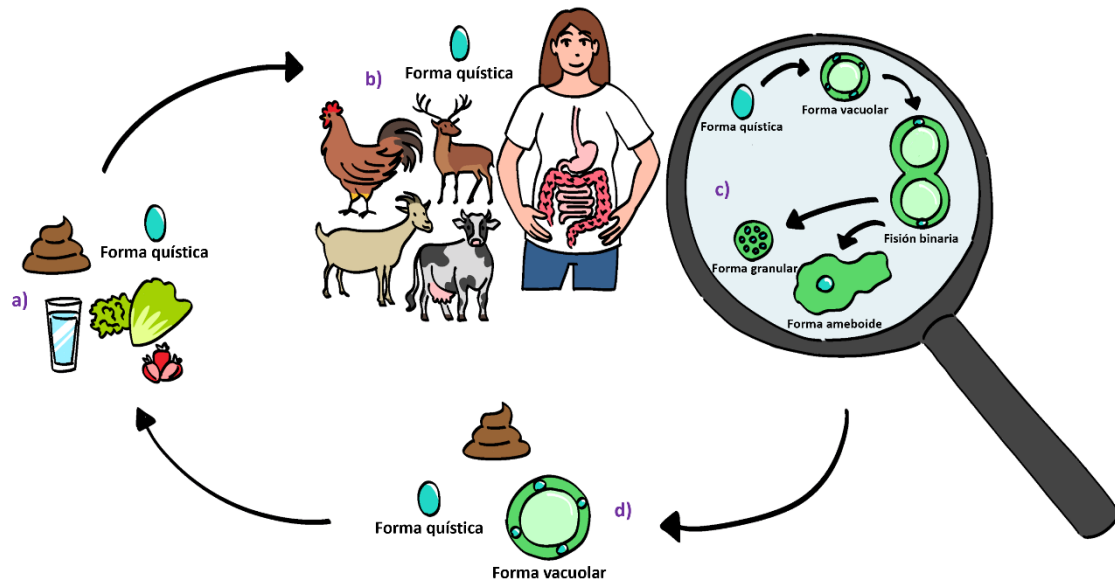


Figura 7. Ciclo de vida propuesto de *Blastocystis*. a) aguas o alimentos contaminados con heces que contienen las formas quísticas de *Blastocystis* son ingeridos por b) seres humanos o animales domésticos y salvajes que son los hospedadores de la infección. Tras su paso por el tracto digestivo, las formas quísticas llegan al intestino delgado, donde inician el proceso de desenquistamiento y pasan al c) intestino grueso, donde se liberan las formas vacuolares. Éstas se dividen por fisión binaria y dan origen a las formas granulares y ameboides. Finalmente, en la luz del colon d) las formas vacuolares se pueden volver a enquistar para ser excretadas con las heces reiniciando el ciclo.

Las formas infectantes de *Blastocystis*, se encuentran con frecuencia, contaminando fuentes como aguas superficiales, suelo o alimentos frescos (El Safadi *et al.*, 2023; Mahdavi *et al.*, 2024; Villanueva-Lizama *et al.*, 2025), provenientes de heces de diversos hospedadores humanos y/o animales no humanos, incluyendo animales de compañía, de producción y salvajes. Su ubicuidad en el medio ambiente y su capacidad de infectar/colonizar un amplio rango de especies animales, facilitan la transmisión intraespecies, incluyendo la posible transmisión zoonótica (animal-persona o persona-animal) (Hublin *et al.*, 2021). Teniendo en cuenta la elevada variabilidad molecular característica del gen de la subunidad menor del RNA ribosómico (*ssu-rRNA*) de *Blastocystis*, hasta el momento se han descrito 45 subtipos designados del ST1 al ST49 (Baek *et al.*, 2022; Figueiredo *et al.*, 2025a; Hernández-Castro *et al.*, 2023b; Higuera *et al.*, 2021; Koehler *et al.*, 2024; Maloney *et al.*, 2019a, 2020a, 2021a, 2021b, 2022; Santin *et al.*, 2024; Šejnohová *et al.*, 2024; Stensvold *et al.*, 2007b, 2023; Stensvold y Clark, 2020; Yu *et al.*, 2023). Cuatro de ellos (ST18, ST19, ST20 y ST22) no son considerados taxonómicamente

INTRODUCCIÓN

válidos al ser el resultado de quimeras, es decir, secuencias que no provienen de productos reales de la amplificación del gen *ssu*-rRNA sino de una mezcla del mismo y/u otros organismos (Maloney y Santin, 2021; Stensvold y Clark, 2020). En el hombre se han identificado 17 subtipos (ST1 - ST10, ST12, ST14, ST15, ST16, ST23, ST35 y ST41), entre los cuales los casos de infección de ST1 a ST4 representan más del 90,0 % de los casos documentados. Por su parte, de ST5 a ST8 se identifican con menos frecuencia y los restantes corresponden a hallazgos esporádicos (Rudzińska y Sikorska, 2023) (Tabla 3).

Tabla 3. Distribución de los subtipos de *Blastocystis* en diferentes hospedadores.

[illegible]

HOSPEDADORES	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST8	ST9	ST10	ST11	ST12	ST13	ST14	ST15	ST16	ST17	ST21	ST23	ST24	ST25	ST26	ST27	ST28	ST29	ST30	ST31	ST32	ST33	ST34	ST35	ST36	ST37	ST38	ST39	ST40	ST41	ST42	ST43	ST44	ST45	ST46	ST47	ST48	ST49									
Pantera			X																																																			
Papio			X																																																			
Pato	X	X					X			X													X	X																														
Pavo	X					X	X	X	X														X	X																														
Perro	X	X	X	X	X	X	X	X	X										X		X																																	
Puerco espín								X																																														
Rata			X	X				X																												X																		
Reno									X			X																																										
Roedor	X			X				X									X																																					
Vaca	X	X	X	X	X	X	X		X			X	X	X			X	X	X	X	X						X																											
Zarigüeya	X							X																																														
Zorro polar	X		X				X																																															

ST, subtipo.

La posible capacidad patógena de *Blastocystis* se fundamenta sobre todo en estudios *in vitro* realizados con líneas celulares humanas y estudios *in vivo* realizados con modelos animales, principalmente murinos. Estos estudios han identificado moléculas potencialmente implicadas en la patogenicidad de *Blastocystis*. Unas de las más estudiadas son las proteasas de cisteína, que están implicadas en la regulación de procesos biológicos e infecciosos importantes como el ciclo celular o las interacciones hospedador-parásito (Mirza y Tan, 2009). En el caso concreto de *Blastocystis*, las proteasas de cisteína degradan los anticuerpos tipo inmunoglobulina A (IgA) generados en respuesta a la presencia del protista, favoreciendo su persistencia en el intestino (Puthia *et al.*, 2005). Otras proteasas de cisteína, como la legumina y la catepsina B, intervienen en el aumento de la permeabilidad celular (Nourrisson *et al.*, 2016). Otras proteasas secretadas por *Blastocystis* participan en la hidrólisis de proteínas en los tejidos conectivos de la mucosa intestinal que dan lugar al inicio de lesiones intestinales (Sio *et al.*, 2006). También se ha sugerido que *Blastocystis* causa apoptosis mediada por activación de caspasas 3 y 9, subregulando la respuesta inflamatoria en el hospedador (Puthia *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2014). Así mismo, altera la barrera epitelial mediante la reorganización de la F-actina y la *zonula occludens* (ZO), disminuyendo la resistencia eléctrica transepitelial e incrementando la permeabilidad a través de la monocapa celular por desestabilización de las uniones estrechas (Puthia *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2014).

En el ámbito inmunológico, se ha propuesto que *Blastocystis* modula la respuesta inmune del hospedador estimulando la liberación de citoquinas proinflamatorias como las IL-1 β , IL-6, IL-8, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la activación de la proteína de quinasa activada por mitógenos (MAPK) (Kumarasamy *et al.*, 2018; Lim *et al.*, 2014). Recientemente se ha descrito en *Blastocystis*, al igual que en otros agentes parasitarios, la presencia de vesículas extracelulares (EV), que contienen proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y metabolitos de la célula hospedadora esenciales para el intercambio genético, identificación de biomarcadores y diagnóstico de enfermedades. Se ha propuesto que estas EV serían mediadores en el mantenimiento de la homeostasis intestinal y en la transferencia horizontal de genes de virulencia y promotores de la patogénesis (Carrera-Bravo *et al.*, 2021). Sin embargo, pese a toda la evidencia referida anteriormente, la capacidad patógena de *Blastocystis* como agente de diarrea y otras manifestaciones clínicas gastrointestinales en el hombre no ha podido contrastarse hasta el momento en estudios clínicos (Ajjampur y Tan, 2016; Wawrzyniak *et al.*, 2013).

INTRODUCCIÓN

En lo que respecta a su posible asociación con el desarrollo de CRC, algunos estudios han puesto de manifiesto que *Blastocystis* puede estar presente en mayor frecuencia en pacientes con CRC que en pacientes sin esta condición (Labania *et al.*, 2023; Mohamed *et al.*, 2017). En el hombre, Sulżyc-Bielicka *et al.* (2021), encontraron que la infección por *Blastocystis* es 5 veces más frecuente en pacientes con CRC antes del tratamiento oncológico en comparación con pacientes sin CRC (Sulżyc-Bielicka *et al.*, 2021). En concreto, ST3 ha sido el subtipo más frecuentemente detectado en pacientes con CRC, seguido de ST2 y ST1, si bien no se han observado diferencias estadísticamente significativas en comparación con pacientes con *Blastocystis* pero sin CRC (Ali *et al.*, 2022). Algunos autores incluso han sugerido que *Blastocystis* puede modular la respuesta inmune del hospedador aumentando el estrés oxidativo, induciendo disbiosis intestinal y alterando la integridad de la barrera intestinal y por lo tanto su permeabilidad (Tocci *et al.*, 2024). Estudios preliminares *in vitro* en líneas celulares de carcinoma colorrectal humano (HCT116) infectadas con antígeno soluble de *Blastocystis* mostraron efectos citopáticos e inmunológicos importantes sugiriendo que la presencia de *Blastocystis* podría tener un efecto potenciador de las fases de proliferación, invasión y metástasis en CRC (Chan *et al.*, 2012; Chandramathi *et al.*, 2010). Así mismo se ha establecido que ST3, en particular, aumenta significativamente la proliferación de la línea celular HCT116 y debilita la respuesta inmune en la misma, desregulando la expresión de IFN- γ y de la proteína supresora de tumores p53 (TP53) en comparación con otros subtipos (Kumarasamy *et al.*, 2013). Posteriormente se informaron estudios *in vivo* en ratas infectadas con aislados de *Blastocystis* y tratadas con azoximetano, un potente agente carcinógeno, mostrando una mayor displasia y presencia de criptas aberrantes, así como un aumento en los niveles de índices oxidativos, en comparación con ratas sin tratamiento (Kumarasamy *et al.*, 2017).

En relación con el diagnóstico de *Blastocystis*, éste puede llevarse a cabo mediante el uso de técnicas microscópicas, inmunológicas y moleculares, tal y como se resume en la Tabla 4.

En cuanto al diagnóstico microscópico, para la visualización directa de *Blastocystis* las técnicas más frecuentemente utilizadas son el examen en fresco de las heces y el uso de tinciones con Giemsa o coloración tricrómica (del Coco *et al.*, 2017). Si los montajes en fresco se acompañan de técnicas de concentración, se aumenta la sensibilidad, además de mejorar la visibilidad de las estructuras parasitarias (Allen y Ridley, 1970; Ritchie *et al.*, 1953). De forma complementaria, y debido a su alta sensibilidad, conveniencia y simplicidad (Termmathurapoj *et al.*, 2004) se ha propuesto la realización de cultivos xénicos (cultivos en presencia de la microbiota intestinal normal) utilizando el medio de Jones (Clark y Stensvold, 2016). Así mismo

es posible el establecimiento de cultivos axénicos (cultivo de un solo tipo de microorganismo) que, más allá del diagnóstico, facilitan estudios del protista en profundidad (Ho *et al.*, 1993; Zierdt y Williams, 1974), sin embargo, son más laboriosos y no están disponibles en todos los laboratorios. Actualmente solo existen cultivos axénicos para los subtipos ST1, ST4 y ST7 de *Blastocystis* (Tan, 2008). En este sentido, se ha planteado la posibilidad de realizar cultivos monofásicos y bifásicos con el fin de poder desarrollar estudios morfológicos, inmunológicos y farmacológicos del protista (Mei *et al.*, 2023; Tan *et al.*, 2000).

En cuanto al diagnóstico inmunológico, existen en el mercado productos basados tanto en pruebas de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA, del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*) como en ensayos de inmunofluorescencia para la detección de antígenos de *Blastocystis* en muestras de heces, si bien los valores de sensibilidad y especificidad que ofrecen frente a otras técnicas diagnósticas son dispares y en ocasiones contradictorios (Dogruman-Al *et al.*, 2015; Kozłowski *et al.*, 2019).

En cuanto al diagnóstico molecular, la detección de *Blastocystis* se basa principalmente en la amplificación de un fragmento del gen *ssu-rRNA* mediante ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*). El primer ensayo de PCR convencional fue desarrollado por Stensvold *et al.* (2006) para amplificar una región de aproximadamente 300 pares de bases (bp, del inglés *base pair*). A continuación Scicluna *et al.* (2006) publicaron un protocolo de PCR directa que amplifica una región de aproximadamente 600 bp del mismo gen *ssu-rRNA* utilizando un enfoque que se ha denominado “región *barcoding*” que permitía la identificación de todos los subtipos de *Blastocystis* conocidos hasta esa fecha (ST1-ST9). Posteriormente se han publicado otros ensayos entre los que destaca el de Santín *et al.* (2011), que amplifica un fragmento de 479 bp del mismo gen. Entre las ventajas que ofrecen estos ensayos de PCR se encuentra la posibilidad de asignación de ST, que puede basarse en el uso de parejas de cebadores específicos para cada ST o genéricos para todos ellos (*barcoding*) (Stensvold, 2013). También se han publicado ensayos de PCR en tiempo real (RT-PCR, del inglés *real time polymerase chain reaction*) en formatos individual o múltiple y ensayos de PCR cuantitativa (qPCR, del inglés *quantitative polymerase chain reaction*). Sin embargo el menor tamaño de los fragmentos amplificados (entre 152 y 342 bp) del gen *ssu-rRNA* reduce considerablemente la capacidad de discriminación de distintos subtipos (Dashti *et al.*, 2024; Jones II *et al.*, 2008; Poirier *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2024).

Tradicionalmente la secuenciación Sanger ha sido empleada para la caracterización de los fragmentos del gen *ssu-rRNA* generados a partir de los métodos antes descritos, ya que el

INTRODUCCIÓN

tamaño de los productos obtenidos permitían su comparación con secuencias previamente depositadas en repositorios públicos como GenBank o PubMLST (*Public Databases for Molecular Typing and Microbial Genome Diversity*) (Stensvold, 2013). Sin embargo, la secuenciación Sanger tiene la limitación de que, en el caso de coinfecciones por dos o más subtipos de *Blastocystis*, solo permite la identificación de la variante genética más abundante en la muestra analizada. Para resolver este inconveniente es necesario recurrir a la secuenciación de nueva generación (NGS, del inglés *next generation sequencing*), cuya alta sensibilidad posibilita la identificación no solo de coinfecciones sino también de subtipos poco representados (Maloney *et al.*, 2019b). Esto aumenta la capacidad de discriminación inter e intrasubtipos y contribuye a la mejora de la taxonomía del protista (Maloney y Santin, 2021). Recientemente, la identificación de nuevos subtipos de *Blastocystis* se ha basado en el uso de nuevas plataformas de NGS capaces de generar lecturas de secuencias largas como el MinION de Oxford Nanopore (Maloney *et al.*, 2020b). Esta tecnología permite obtener la secuencia completa del gen *ssu-rRNA* de *Blastocystis* (de aproximadamente 1.800 pb), lo que técnicamente no es posible empleando plataformas de NGS que generan lecturas de secuencias más cortas que la propia longitud del gen, como es el caso de Illumina.

Tabla 4. Ventajas y desventajas de las técnicas empleadas convencionalmente en el diagnóstico de *Blastocystis*.

Técnica diagnóstica	Ventajas	Desventajas
Microscopía de examen en fresco y concentración de heces	Rápida y sencilla para la visualización directa. Bajo coste en reactivos.	Requiere personal experto en microscopía óptica.
Cultivos xénicos	Bajo coste en reactivos.	Requiere personal experto en microscopía óptica. Laborioso y limitado en el tiempo. No se obtiene un cultivo puro.
Cultivos axénicos	Se obtiene un cultivo puro.	Proceso dispendioso. Protocolo estandarizado no replicable. Sólo se ha logrado para un número limitado de subtipos.
Inmunoensayos	Altamente sensibles y específicos.	Proceso dispendioso. Elevado coste en reactivos. No confirman la infección.
PCR convencional	Muy sensible.	Requiere confirmación por técnicas de secuenciación.
RT-PCR y qPCR	Permite tanto la detección como la cuantificación.	Elevado coste en reactivos.

Técnica diagnóstica	Ventajas	Desventajas
Secuenciación Sanger	Permite la confirmación. Asigna subtipos específicos sin ambigüedades.	No detecta coinfecciones. Requiere equipos especiales. Elevado coste en reactivos.
NGS - Illumina	Permite la confirmación. Detecta infecciones mixtas por distintos ST.	Requiere equipos especiales. Elevado coste en reactivos. Requiere personal técnico especializado en preparación de librerías y técnicas bioinformáticas para el análisis de las secuencias.
NGS - Oxford Nanopore	Permite la confirmación. Detecta infecciones mixtas por distintos ST. Genera la secuencia completa del gen <i>ssu-rRNA</i> .	Requiere equipos especiales. Elevado coste en reactivos. Requiere personal técnico especializado en preparación de librerías y técnicas bioinformáticas para el análisis de las secuencias.

NGS, secuenciación de nueva generación; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; qPCR reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, RT-PCR, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real; *ssu-rRNA*, subunidad menor del RNA ribosómico; ST, subtipo.

Otro aspecto controvertido de *Blastocystis* es la conveniencia o no de instaurar tratamiento farmacológico en el caso de individuos portadores del protista. En este sentido, es importante destacar que no hay ningún consenso establecido al respecto y los criterios varían entre profesionales y centros médicos (Figueiredo *et al.*, 2025b). Algunos autores consideran que el tratamiento no es necesario en pacientes asintomáticos, mientras que en pacientes sintomáticos el tratamiento debería considerarse después de descartar otros agentes infecciosos de origen parasitario, bacteriano y/o vírico que puedan enmascarar la sintomatología detectada (Kurt *et al.*, 2016; Stensvold *et al.*, 2010). En cuanto al tratamiento en sí, el fármaco de elección debería alcanzar altas concentraciones en la luz del colon, tener un tránsito corto en el intestino delgado y no ser inactivado por la acción de la microbiota intestinal presente (Kurt *et al.*, 2016). Así, el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, del inglés *Centers for Diseases Control and Prevention*) recomienda el uso de los siguientes fármacos para el tratamiento de pacientes sintomáticos mono infectados por *Blastocystis* (CDC, 2024; Coyle *et al.*, 2012):

- 1) Metronidazol: Dosis de 250 a 750 mg, tres veces al día durante 10 días.
- 2) Trimetoprim (TMP)/sulfametoxazol (SMX): Dosis de 320 mg de TMP y 1.600 mg de SMX, una vez al día durante 10 días.
- 3) Nitazoxanida: Dosis de 500 mg, dos veces al día durante tres días.

INTRODUCCIÓN

Cryptosporidium spp.

Cryptosporidium spp. es un protista apicomplejo intracelular obligado que tiene la capacidad de reproducirse asexual y sexualmente localizándose en el borde en cepillo de las células del epitelio intestinal (Guérin y Striepen, 2020). Infecta a una amplia variedad de hospedadores y comprende al menos 44 especies y más de 120 genotipos, siendo las especies *C. hominis* y *C. parvum* las causantes de aproximadamente el 95,0 % de las infecciones en el hombre (Ryan *et al.*, 2021). La infección por *Cryptosporidium* spp. se presenta habitualmente como una diarrea acuosa profusa que cursa con emaciación debido a malabsorción que, en la mayoría de los casos, se resuelve de forma espontánea en un plazo de 7 a 14 días (Janssen y Snowden, 2025). La diarrea crónica suele presentarse en pacientes inmunodeprimidos, particularmente en pacientes VIH positivos y puede durar de meses a años, además de acompañarse de complicaciones biliares y pulmonares (Chalmers y Davies, 2010; Janssen y Snowden, 2025).

Desde el punto de vista de la patogénesis, entre los mecanismos descritos en la infección por *Cryptosporidium* spp., se incluye la alteración del citoesqueleto de la célula hospedadora, y se ha sugerido en modelos murinos un fenotipo transformante en células epiteliales infectadas con *Cryptosporidium* spp. como consecuencia de la modulación de las vías de señalización celular, que podrían inducir a neoplasia (Benamrouz *et al.*, 2014). Algunos autores han sugerido que la infección por *Cryptosporidium* spp. se observa con mayor frecuencia en pacientes con CRC en comparación con pacientes sin CRC (Ghanadi *et al.*, 2022a; Sulżyc-Bielicka *et al.*, 2012, 2018), así como en pacientes con neoplasia intraepitelial en colon y adenocarcinoma (Osman *et al.*, 2017). Incluso Zhang *et al.* (2020) han propuesto una asociación estadísticamente significativa de *C. parvum*, en particular, con algunos cánceres gastrointestinales. No obstante, es probable que estas diferencias respondan más bien al conocido carácter oportunista de este agente. Aunque se desconoce el mecanismo por el cual *Cryptosporidium* spp. participaría en el desarrollo de este tipo de cánceres, algunos autores han propuesto que podría conducir al desarrollo de carcinoma colorrectal como consecuencia de su actividad proliferativa, que se traduce en una pérdida de enterocitos y transición hacia un epitelio más inmaduro, con una reducción significativa de células diferenciadas en el ápice de las microvellosidades y la subsecuente alteración de funciones estructurales y fisiológicas del intestino (Svec *et al.*, 2024; Wallbank *et al.*, 2024). De esta forma, se alteraría la continua renovación de las células del epitelio intestinal, que es un proceso controlado por la vía de señalización Wnt/ β -catenina, la proteína morfogenética ósea y el factor de crecimiento epidérmico (Svec *et al.*, 2024; Wallbank *et al.*, 2024).

1.2.4.4.2 Agentes bacterianos asociados con CRC

Bacteroides fragilis

Bacterioides fragilis es un bacilo, gram-negativo, inmóvil y anaerobio estricto. En el hombre forma parte de la microbiota normal del colon y se adquiere probablemente al nacer (Elsaghir y Reddivari, 2025). Dentro de la especie, existen cepas enterotoxigénicas y cepas no-toxigénicas en función de si producen o no la toxina de *B. fragilis* (BFT). En concreto las cepas enterotoxigénicas son las que se han asociado con CRC (Sears *et al.*, 2014), además de IBS (Prindiville *et al.*, 2000) y enfermedad de Crohn (Becker *et al.*, 2021).

Generalmente se trata de una bacteria comensal, pero cuando se altera la barrera de la mucosa intestinal, es capaz de formar abscesos y diseminar produciendo bacteriemia, lo cual es particularmente común en pacientes que padecen síndromes abdominales graves o enfermedades subyacentes, condiciones de inmunodepresión (incluido el cáncer), complicaciones cardíacas y diabetes (Yekani *et al.*, 2021). Su principal factor de virulencia es la producción de BFT, que es una metaloproteasa dependiente de zinc que al unirse a los receptores de las células del epitelio del colon induce degradación de E-cadherina, incrementado la permeabilidad y la activación de las vías de señalización Wnt/ β -catenina y NF- κ B, lo cual desencadena la carcinogénesis en el colon distal (Chung *et al.*, 2018).

Campylobacter jejuni

Campylobacter jejuni es un bacilo, gram-negativo, móvil, generalmente microaerófilo (Bolton, 2015). La mayoría de las especies de *Campylobacter* forman parte de la microbiota normal de tracto gastrointestinal de los animales. Más del 80,0 % de las infecciones en el hombre se deben principalmente a la especie *C. jejuni* y un 10,0 % a la especie *C. coli*, que son agentes habituales de gastroenteritis aguda asociada principalmente con el consumo de aguas o alimentos contaminados (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2018). Además, *C. jejuni*, en particular, se ha asociado con CRC (He *et al.*, 2019), IBS (Takakura *et al.*, 2022), artritis reactiva (Hannu *et al.*, 2002) y síndrome de Guillain-Barré (Nyati y Nyati, 2013).

Dentro de los mecanismos patogénicos de *C. jejuni* se reconoce la producción de la toxina de distensión citoletal (CDT), una genotoxina capaz de inducir inestabilidad en el genoma humano promoviendo el desarrollo de CRC al inducir cambios en la microbiota intestinal y en el perfil transcripcional de la misma (He *et al.*, 2019).

INTRODUCCIÓN

Clostridium perfringens y *Clostridium ramosum*

El género *Clostridium* incluye bacilos, gram-positivos, inmóviles y anaerobios. En el hombre y los animales forma parte de la microbiota normal del tracto gastrointestinal (Bush y Vazquez-Pertejo, 2023). Se han descrito entre 25 y 30 especies que causan enfermedades en seres humanos y en animales. Entre ellas, *C. perfringens* y *C. ramosum* se han asociado particularmente con CRC, además de colecistitis, peritonitis, apendicitis y perforación intestinal (Bush y Vazquez-Pertejo, 2023; Sears *et al.*, 2014).

En un estudio realizado en pacientes oncológicos con bacteriemia por *Clostridium* spp., el 92,0 % de ellos presentaban lesiones malignas en el tracto digestivo, siendo las especies más comúnmente aisladas *C. perfringens* (60,0 %) y *C. ramosum* (15,0 %) (Yamamoto *et al.*, 2020). En este sentido, algunos estudios sugieren que las bacterias de la microbiota intestinal normal aprovechan el deterioro de la barrera epitelial característico de las lesiones neoplásicas como puerta de entrada al sistema circulatorio durante la etapa temprana de la carcinogénesis colorrectal para causar bacteriemia en pacientes oncológicos (Kwong *et al.*, 2018).

Enterococcus faecalis

Enterococcus faecalis es un coco, gram-positivo, inmóvil, anaerobio facultativo. En el hombre forma parte de la microbiota intestinal normal pero que con frecuencia causa infecciones en vías urinarias, bacteriemia, endocarditis, celulitis, prostatitis, heridas infectadas y abscesos abdominales (Bush, 2023). Algunas cepas de *E. faecalis* se consideran probióticas y con efectos antiinflamatorios a través de la inducción de IFN- γ , IL-10 y otras citoquinas antiinflamatorias, mientras que otras cepas se han propuesto como promotores de carcinogénesis a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que provocan daños en el DNA e inestabilidad genómica (Huycke *et al.*, 2002; Molina *et al.*, 2015).

Se sugiere que la actividad carcinógena de *E. faecalis* en CRC se debe a la capacidad de dañar el DNA del hospedador mediante la producción de superóxido o mediante un efecto indirecto inducido por macrófagos (Dougherty y Jobin, 2023).

Escherichia coli

Escherichia coli es un bacilo, gram-negativo, móvil, anaerobio facultativo. En el hombre y los animales forma parte de la microbiota intestinal normal. No obstante, algunas cepas de *E. coli* han adquirido factores de virulencia específicos que le confieren la capacidad de causar enfermedades tanto intestinales como extraintestinales, que varían desde cuadros limitados como una gastroenteritis leve hasta complicaciones graves como síndrome urémico o choque séptico (Mueller y Tainter, 2025). En el caso de las cepas de *E. coli* productoras de diarrea o *E. coli* diarreagénica (DEC, del inglés *diarrheagenic E. coli*), en virtud de los factores de virulencia que presentan se establecen patotipos. Los principales patotipos DEC descritos hasta el momento son *E. coli* con adherencia difusa (DAEC, del inglés *diffusely adherent E. coli*), *E. coli* enteroagregativa (EAEC, del inglés *enteroaggregative E. coli*), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC, del inglés *enteroinvasive E. coli*), *E. coli* enteropatogénica (EPEC, del inglés *enteropathogenic E. coli*), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC, del inglés *enterotoxigenic E. coli*) y *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC, del inglés *Shiga toxin-producing E. coli*) (Croxen *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2016; Nataro y Kaper, 1998).

Con independencia de esta capacidad patógena, la contribución concreta de *E. coli* al desarrollo y progresión de CRC se fundamenta en la producción, por parte de determinadas cepas comensales, de una genotoxina denominada colibactina (Nougayrède *et al.*, 2006; Zechner y Kienesberger, 2024). De hecho, aunque son muchas las especies bacterianas que se han asociado con el desarrollo de CRC, en la mayoría de ellas no se ha llegado a demostrar una relación de causalidad, si bien *E. coli*, a través de la colibactina, representa la principal excepción en este sentido (Pleguezuelos-Manzano *et al.*, 2020). Los genes que codifican la colibactina se localizan en la isla genómica policétido sintasa (*pks*, del inglés *polyketide synthase*). Su papel promotor de la carcinogénesis intestinal en modelos de ratón se debe al daño que provoca en el DNA de las células epiteliales intestinales por ruptura de su doble cadena, detención del ciclo celular, producción de mutaciones e inestabilidad cromosómica (Cuevas-Ramos *et al.*, 2010; De Souza *et al.*, 2024; DeLira-Bustillos *et al.*, 2024; Nougayrède *et al.*, 2006). Así mismo, la exposición repetida de organoides de epitelio colónico humano normal a *E. coli pks+* causa una firma mutacional específica, medida por NGS, que está presente en genes comúnmente mutados en el CRC, como el gen *APC* (Pleguezuelos-Manzano *et al.*, 2020). En este sentido, las cepas de *E. coli* productoras de colibactina o *E. coli pks+*, se detectan con frecuencia en pacientes con CRC, hasta en un 68,0 % de ellos, si bien es posible detectarlas asimismo en el 20,0 % de los individuos sanos (Jans y Vereecke, 2025). Además de esta relación de causalidad entre la colibactina y el desarrollo de CRC, ampliamente documentada, un estudio publicado muy

INTRODUCCIÓN

recientemente sugiere incluso que la exposición mutagénica a bacterias productoras de colibactina en los primeros años de vida puede contribuir al aumento de la incidencia de CRC de aparición temprana (Díaz-Gay *et al.*, 2025). Este nuevo hallazgo en relación con la contribución de la colibactina al desarrollo y progresión de CRC resulta trascendental si tenemos en cuenta que en las dos últimas décadas la incidencia de CRC de aparición temprana, que afecta a personas menores de 50 años, se ha duplicado en muchos países (Patel *et al.*, 2022; Siegel *et al.*, 2009, 2019; Vuik *et al.*, 2019).

La colibactina forma parte de un grupo más amplio de genotoxinas que se han identificado en *E. coli* y que desempeñan un papel en la carcinogénesis, conocido como ciclodulinas (Canizalez-Roman *et al.*, 2021; Collins *et al.*, 2011), entre las cuales se incluyen la toxina distensora citoletal (CDT, del inglés *cytolethal distending toxin*), que provoca daños en el DNA que conducen a la inhibición del ciclo celular (Lara-Tejero y Galán, 2002); el factor inhibidor del ciclo (CIF, del inglés *cycle inhibitory factor*), que activa vías de señalización en la célula que conducen a la inhibición de la transición de la fase G2 a mitosis en el ciclo celular (Taieb *et al.*, 2006), y el factor necrotizante citotóxico (CNF, del inglés *cytotoxic necrotizing factor*), que activa proteínas G de la familia Rho y conduce a alteraciones en el citoesqueleto modificando las fibras de actina en las células (Fiorentini *et al.*, 1997).

La producción de colibactina no sólo se circunscribe a *E. coli*, sino que se ha puesto de manifiesto asimismo en otras especies de bacterias gram-negativas que colonizan el tracto intestinal en el hombre, como es el caso de las bacterias del género *Klebsiella* (Strakova *et al.*, 2021). En el caso de *E. coli*, aunque se ha identificado principalmente en cepas comensales, en su mayoría del filogrupo B2, algunos estudios recientes han investigado la presencia de colibactina, entre otras ciclodulinas, en patotipos concretos de *E. coli* como EPEC o DAEC en relación con una posible asociación de patotipos concretos con el desarrollo de CRC (Canizalez-Roman *et al.*, 2021)

Fusobacterium nucleatum

Fusobacterium nucleatum es un bacilo, gram-negativo, inmóvil, anaerobio estricto (Brennan y Garrett, 2019; Zhou *et al.*, 2018). En el hombre forma parte de la microbiota normal de la cavidad oral y del tracto gastrointestinal, si bien con frecuencia se comporta como oportunista causando enfermedades infecciosas extraintestinales, apendicitis (Swidsinski *et al.*, 2011), miopericarditis (Kearney y Knoll, 2015), absceso cerebral (Han *et al.*, 2003), absceso hepático (Louis-Jean *et al.*, 2023), discitis, osteomielitis (Ramos *et al.*, 2013), afecciones durante

el embarazo (Vander Haar *et al.*, 2018) entre otras (Han, 2015) y, aquellas principalmente asociadas al tracto gastrointestinal como periodontitis (Signat *et al.*, 2011), colitis ulcerosa (Su *et al.*, 2020) e IBS (Strauss *et al.*, 2011).

Cabe destacar que *F. nucleatum*, se ha asociado con carcinogénesis que incluyen, CRC (Villar-Ortega *et al.*, 2022), cáncer de mama (Little *et al.*, 2023), carcinoma escamoso de esófago (Ding *et al.*, 2023) y cáncer gástrico (Chen *et al.*, 2022). Concretamente *F. nucleatum*, se ha asociado con el desarrollo de CRC a través de diferentes mecanismos, entre los cuales, el más ampliamente estudiando es la adherencia, invasión e inducción de respuesta oncogénica e inflamatoria a través de la unión de la adhesina FadA a E-cadherina activando las vías de señalización Wnt/ β -catenina y regulando la respuesta oncogénica e inflamatoria (Ou *et al.*, 2022; Rubinstein *et al.*, 2013).

Helicobacter pylori

Helicobacter pylori es un bacilo, gram-negativo, móvil, microaerófilico. Se encuentra en la mucosa gástrica del hombre y primates no humanos causando inflamación y ulceración (Parikh y Ahlawat, 2025).

La infección prolongada por *H. pylori* es uno de los mecanismos propuestos para el desarrollo de cambios neoplásicos, así como la producción de moléculas que tienen un efecto directo sobre las células epiteliales (amoníaco, citotoxina CagA-positivo) o un efecto indirecto mediante la estimulación de la producción de nitratos y radicales libres por los macrófagos (Antonic *et al.*, 2013). Así mismo, se ha determinado que la infección por *H. pylori* altera la integridad de la mucosa acompañada de una fuerte respuesta proinflamatoria que activa vías de señalización como NF- κ B y STAT3 facilitando de esta forma la carcinogénesis (Ralser *et al.*, 2023).

Klebsiella pneumoniae

Klebsiella pneumoniae es un bacilo, gram-negativo, inmóvil, anaerobio facultativo. Se comporta como patógeno oportunista ubicuo, ya que coloniza las superficies mucosas y con frecuencia causa enfermedades graves como septicemia, neumonía, infección del tracto urinario e infección de tejidos blandos (Guo *et al.*, 2012).

INTRODUCCIÓN

Al igual que en *E. coli*, existen cepas de *K. pneumoniae* productoras de colibactina y que se han asociado asimismo con inflamación en el colon y desarrollo de CRC (Faïs *et al.*, 2018; Lai *et al.*, 2014; Strakova *et al.*, 2021).

Morganella morganii

Morganella morganii es un bacilo, gram-negativo, móvil y anaerobio facultativo. En el hombre y los animales forma parte de la microbiota intestinal normal, pero que con frecuencia causa infecciones oportunistas en el tracto respiratorio, en el tracto urinario y en heridas (Kim *et al.*, 2007). El género *Morganella* consta de una única especie, *M. morganii*, que a su vez incluye dos subespecies: *M. morganii* subespecie *morganii* y *M. morganii* subespecie *sibonii* (O'Hara *et al.*, 2000).

Aunque de muy reciente descripción, la asociación de *M. morganii* con el desarrollo de CCR es similar a la anteriormente descrita y ampliamente documentada en el caso de *E. coli pks+*. De forma similar a *E. coli pks+* asociada a la mucosa del colon, *M. morganii* es particularmente abundante en el tejido canceroso en pacientes con CRC en comparación con los controles (Arthur *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2012). En concreto, explorando el impacto de otras genotoxinas derivadas de la microbiota intestinal, más allá de la colibactina, Cao *et al.* (2022) descubrieron una nueva familia de genotoxinas, descrita específicamente en *M. morganii*, conocidas como indoliminas (Cao *et al.*, 2022). Así mismo, estos autores identificaron una nueva descarboxilasa bacteriana, anotada como aspartato aminotransferasa y codificada por el gen *aat*, esencial para la síntesis de indolimina. La construcción de un mutante isogénico que carecía de genotoxicidad en ensayos de daño del DNA les permitió demostrar la participación de la indolimina en el aumento de la permeabilidad intestinal, la inducción de firmas transcripcionales asociadas con la replicación anormal del DNA y la proliferación de células epiteliales intestinales en ratones gnotobióticos, así como un aumento de la carga tumoral en modelo murino de CRC (Cao *et al.*, 2022).

Parvimonas micra

Parvimonas micra es un coco, gram-positivo, inmóvil, no esporulado, anaerobio estricto. En el hombre forma parte de la microbiota oral normal, aunque con frecuencia causa infecciones oportunistas como periodontitis, infecciones orofaciales odontogénicas, pleuresía purulenta y abscesos endodónticos (Mohammadi *et al.*, 2022).

Específicamente el filotipo A de *P. micra*, se ha asociado con el desarrollo de CRC mediante, su capacidad hemolítica y propiedades adherentes que le permiten colonizar la mucosa colónica e inducir cambios en la metilación del DNA, lo que conlleva a que se acumulen alteraciones genómicas, se promueva la migración celular, la invasión y se desencadenen eventos metastásicos que progresan hacia carcinogénesis (Bergsten *et al.*, 2023).

Porphyromonas gingivalis

Porphyromonas gingivalis es un cocobacilo, gram-negativo, inmóvil, anaerobio estricto. En el hombre forma parte de la microbiota oral normal, aunque que se asocia con periodontitis (Orrego-Cardozo *et al.*, 2015). Dentro de los principales factores de virulencia de *P. gingivalis* se incluye la producción de toxinas, principalmente proteasas, llamadas gingipaínas, que promueven la invasión del tejido, la producción de polisacáridos capsulares, fimbrias y vesículas de la membrana externa que le ayudan a evadir la respuesta inmune (Lunar Silva y Cascales, 2021).

Algunos estudios han sugerido que *P. gingivalis* promueve la progresión de CRC al impedir la acción citotóxica de las células asesinas naturales (NK) a través de la sobreexpresión de la proteína quinasa 3 tipo 1, encargada de ejercer como punto de control inmunológico, favoreciendo la evasión de la respuesta inmune en el hospedador. Alternativamente, se ha propuesto también un posible papel en el reclutamiento de células mieloides tumorales infiltrantes, que activan el inflamosoma NLRP3 y generan un ambiente proinflamatorio que favorece las neoplasias colorrectales (Díaz-Basabe *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2021).

Salmonella enterica

El género *Salmonella* incluye bacilos, gram-negativos, móviles, anaerobios facultativos. Con frecuencia causa infecciones que incluyen la gastroenteritis, la fiebre entérica o fiebre tifoidea o la bacteriemia, además del estado de portador crónico (Ajmera y Shabbir, 2025). Actualmente se reconocen dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*. La especie *S. enterica* incluye a su vez seis subespecies, cada una de ellas integrada por distintos serotipos. En concreto los serotipos Typhi y Paratyphi son los causantes de fiebre tifoidea, mientras que otros serotipos no tifoideos como Enteritidis o Typhimurium son causante principalmente de gastroenteritis (Ajmera y Shabbir, 2025).

INTRODUCCIÓN

Los serotipos no tifoideos de *Salmonella* han desarrollado mecanismos para infectar de manera eficiente y exitosa al hombre, convirtiéndolos en patógenos transmitidos por alimentos que causan infecciones prolongadas. Así, se ha observado un mayor riesgo de desarrollar CRC en colon ascendente y transversal en pacientes con antecedente de infección por serotipos no tifoideos de *Salmonella*, que incrementa en menores de 60 años, en comparación con población sin antecedente de infección (Mughini-Gras *et al.*, 2018; Shanker y Sun, 2023).

Streptococcus gallolyticus

Streptococcus gallolyticus, conocido previamente como *Streptococcus bovis*, es un coco, gram-positivo, inmóvil, anaerobio facultativo, catalasa y oxidasa-negativos, que puede presentar propiedades hemolíticas. Dentro de la especie *S. gallolyticus* se incluyen hoy día tres subespecies: *S. gallolyticus* subespecie *gallolyticus*, *S. gallolyticus* subespecie *pasteurianus* y *S. gallolyticus* subespecie *macedonicus* (Périchon *et al.*, 2022; Romero-Hernández *et al.*, 2013). En particular, *S. gallolyticus* subespecie *gallolyticus* (SGG) se relaciona con endocarditis infecciosas y bacteriemias monomicrobianas asociadas con CRC. Así mismo, *S. gallolyticus* subespecie *pasteurianus* (SGP) se relaciona con comorbilidades inmunosupresoras y bacteriemias polimicrobianas asociadas a neoplasias gástricas, pancreáticas y hepatobiliares (Gómez-Garcés *et al.*, 2012; Pompilio *et al.*, 2019; Sánchez *et al.*, 2014; Sheng *et al.*, 2014), aunque existen algunas referencias a su posible asociación también con CRC (Chand *et al.*, 2016; Gospodinova *et al.*, 2023; Takamura *et al.*, 2014).

Hasta la fecha numerosos estudios han sugerido la asociación de SGG, y en menor medida SGP, con el desarrollo de CRC, habiendo constatado que entre el 25,0 y el 80,0 % de los pacientes con bacteriemia por *S. bovis* y entre el 18,0 y el 62,0 % de los pacientes con endocarditis por *S. bovis* se diagnostican con neoplasia en el colon. Más del 80,0 % de estas bacteriemias asociadas a CRC son causadas concretamente por SGG, si bien un 18,0 % serían causadas por SGP (Abdulmir *et al.*, 2011; Zarkin *et al.*, 1990). En este sentido, las endocarditis y/o bacteriemias causadas por *S. gallolyticus*, principalmente por SGG, se consideran actualmente en la práctica clínica como indicadores tempranos de sospecha de CRC, de tal manera que en cualquier paciente con bacteriemia causada por SGG se recomienda realizar colonoscopia y estudio por imagen de vías biliares para valorar un posible diagnóstico de neoplasia en el tracto digestivo (Şahin *et al.*, 2023; Sheng *et al.*, 2014).

En el caso de SGG, que como se ha indicado anteriormente es la subespecie de *S. gallolyticus* con mayor evidencia de asociación con desarrollo de CRC, se han propuesto incluso

algunos mecanismos que explicarían esta asociación, entre los que se incluyen el reclutamiento leucocitario, la colonización selectiva de células tumorales, los cambios en la microbiota intestinal, la disrupción del tejido que permite su paso al torrente sanguíneo, la inducción de citoquinas y factores de transcripción la transformación del tejido colónico (Abdulmir *et al.*, 2011). Así mismo, recientemente se ha descrito una isla de patogenicidad relacionada con una toxina formadora de poros en la membrana de las células epiteliales intestinales humanas (Teh *et al.*, 2023), cuyo mecanismo sin embargo está ausente en SGP.

1.2.4.4.3 Agentes víricos asociados con CRC

Virus John Cunningham (JC)

El virus John Cunningham (JC) es un virus DNA de doble cadena lineal. Pertenece a la familia *Polyomaviridae*, se encuentra en el 80,0 % de individuos sanos de forma latente y se reactiva bajo condiciones de inmunodepresión causando leucoencefalopatía multifocal progresiva (Antonic *et al.*, 2013; Saji y Gupta, 2025).

La asociación entre el virus JC y el desarrollo de CRC se ha estudiado ampliamente en el tejido de la mucosa colónica. Algunos estudios han indicado la presencia del virus JC en el 40,0 % de los tejidos provenientes de personas sin CRC, en comparación con su presencia en el 90,0 % de los tejidos provenientes de pacientes con CRC (Coelho *et al.*, 2013). Así mismo, se ha indicado que pacientes infectados por el virus JC tienen 3,9 veces mayor posibilidad de desarrollar CRC que pacientes no infectados (Shavaleh *et al.*, 2020). En este sentido se ha sugerido que el virus JC intervendría en el desarrollo de CRC mediante la metilación anormal del DNA y la inestabilidad cromosómica, debido a la presencia de antígeno T (T-Ag). Este antígeno es una fosfoproteína transcrita y codificada por el virus JC que interfiere con las funciones celulares, con las vías de señalización celular Wnt/ β -catenina y con las proteínas supresoras de tumores TP53 y pRb (proteína del retinoblastoma) (Enam *et al.*, 2002; Ksiaa *et al.*, 2015; Noshio *et al.*, 2009).

Virus del Papiloma Humano (HPV)

El virus del papiloma humano (HPV) es un virus DNA de doble cadena circular sin envoltura. Pertenece a la familia *Papillomavirus* y causa múltiples lesiones epiteliales y distintos tipos de cáncer, principalmente en superficies cutáneas y mucosas (Luria y Cardoza-Favarato,

INTRODUCCIÓN

2025). Los tipos de HPV clasificados como de alto riesgo oncogénico incluyen principalmente HPV 16, 18, 31, 33 y 35, sin embargo se considera que su capacidad carcinogénica depende de cada cepa (Antonic *et al.*, 2013).

La posible asociación de HPV con CRC es controvertida. Si bien existe evidencia de la asociación causal del HPV con el carcinoma anal (American Cancer Society, s. f.), se trata de una enfermedad distinta del carcinoma rectal y, más aún, del carcinoma en colon. No obstante, algunos autores indican que la prevalencia de HPV en el tejido proveniente de pacientes con CRC es mayor en comparación con pacientes sin CRC (Bernabe-Dones *et al.*, 2016; Bodaghi *et al.*, 2005). En este sentido se ha sugerido que HPV intervendría en el desarrollo de CRC a través de las proteínas virales E6 y E7, que interfieren con las proteínas supresora de tumores TP53 y pRb y modulan las vías de señalización celular Wnt/ β -catenina (Bello *et al.*, 2015; Burnett-Hartman *et al.*, 2008; Marongiu y Allgayer, 2022).

Virus de Epstein-Barr

El virus de Epstein-Barr (EBV) es un virus DNA de doble cadena. Perteneciente a la familia *Herpesviridae*, se encuentra en el 90,0 % de individuos sanos de forma latente y es el causante de la mononucleosis infecciosa (Hoover y Higginbotham, 2025).

Si bien la posible asociación de EBV con CRC es incierta, algunos estudios han sugerido que EBV puede inducir mutagénesis “*hit-and-run*” que se trata de un proceso de mutagénesis donde el virus es un iniciador tumoral que luego desaparece de la célula cancerígena, lo que indica que no se requiere la persistencia del virus para mantener la mutagénesis (Goon *et al.*, 2023). En este sentido EBV inicia el proceso carcinogénico, induce inestabilidad genómica, evade la respuesta inmune y desaparece, contribuyendo a carcinogénesis, progresión e incluso metástasis (Ferreira *et al.*, 2021; Marongiu y Allgayer, 2022). Aunque hasta el momento se desconoce el mecanismo molecular exacto que explicaría la asociación de EBV con el desarrollo de CRC, la infección latente por EBV, la actividad de los genes virales relacionados con latencia, la inhibición de la apoptosis por proteínas virales y la inflamación en el hospedador podrían ser factores clave en este proceso (Jafari Maskouni *et al.*, 2023).

1.2.5 Signos y síntomas

En sus etapas iniciales el CRC no causa sintomatología. Sin embargo, ciertos hallazgos se consideran síntomas prodrómicos (American Cancer Society, 2023), incluyendo:

- 1) Cambios en los hábitos de evacuación como diarrea o estreñimiento o reducción en la frecuencia de evacuación.
- 2) Sensación de no evacuación intestinal, necesidad de evacuar aún después de la evacuación.
- 3) Sangrado rectal, con presencia de sangre de color rojo brillante en las heces.
- 4) Sangre en heces proveniente del tracto digestivo, con heces de color café oscuro o negro.
- 5) Dolor abdominal o cólico.
- 6) Debilidad y cansancio.
- 7) Pérdida inexplicable de peso.

Con el paso del tiempo, el sangrado gastrointestinal crónico puede desencadenar anemia que se manifiesta con fatiga, debilidad y palidez. Puede aparecer también obstrucción intestinal debida al tumor que bloquea el paso de las heces, provocando hinchazón, náuseas y vómito. En caso de metástasis, pueden aparecer otros signos asociados con el órgano afectado (American Cancer Society, 2023; National Cancer Institute, 2015).

1.2.6 Diagnóstico

En el momento de realizar el diagnóstico de CRC es fundamental realizar una anamnesis completa del paciente y conocer los antecedentes familiares y/o personales de CRC (American Cancer Society, 2023). Las pruebas diagnósticas disponibles para el CRC van desde la prueba de sangre oculta en heces hasta la colonoscopia con o sin biopsia, esta última empleada como prueba confirmatoria.

1.2.6.1 Prueba de sangre oculta en heces

Ante la presencia de algún síntoma asociado con CRC o anemia sin causa conocida, una de las primeras pruebas que se solicita es la de sangre oculta en heces, con el fin de evidenciar la presencia de sangre en heces que no sea visible a simple vista. No obstante, un resultado positivo en esta prueba no es indicativo de CRC, sino que también puede relacionarse con la presencia de pólipos, hemorroides, divertículos o úlceras, entre otras afecciones gastrointestinales (National Cancer Institute, 2023).

Existen dos tipos de pruebas para la detección de sangre oculta en heces: la prueba de guayacol y la prueba de inmunoquímica fecal (FIT, del inglés *fecal immunochemical test*). La prueba de guayacol emplea unas tarjetas impregnadas con una resina vegetal (guayaco), que actúa como sustrato cromógeno que puede oxidarse y cambiar de color. Al contacto con heces que contienen el grupo hemo se cataliza la oxidación del cromógeno, de tal modo que, al añadir la fuente oxidante, peróxido de hidrógeno, se produce un cambio de color que indica la presencia del grupo hemo, y en definitiva de sangre, en las heces. Esta prueba cuenta con dos claras limitaciones. La primera es la necesidad de seguir una dieta tres días antes de la toma de la muestra en la que no se deben consumir carnes rojas (por la presencia del grupo hemo), ni alimentos como rábano, brócoli, coliflor, entre otros (por la presencia de peroxidasas vegetales). La segunda limitación consiste en que la presencia del grupo hemo que detecta la prueba no implica específicamente la presencia de hemoglobina humana. Por su parte, la prueba FIT emplea anticuerpos específicos anti-hemoglobina humana, permitiendo la detección de la presencia de glóbulos rojos degradados en la muestra de heces. Las pruebas FIT pueden ser cualitativas o cuantitativas. Las pruebas FIT cualitativas se basan en una inmunocromatografía de flujo lateral que emplea anticuerpos anti-hemoglobina humana fijados en una membrana. Las pruebas FIT cuantitativas se basan en inmunoensayos tipo ELISA, quimioluminiscencia o turbidimetría que emplean anticuerpos anti-hemoglobina humana que actúan capturando el antígeno y emitiendo una señal, que a su vez se registra por medio de un analizador tipo espectrofotómetro, luminómetro o turbidímetro/nefelómetro.

1.2.6.2 Colonoscopia completa

La colonoscopia es el procedimiento que se realiza para visualizar el interior del colon y del recto mediante el uso de un endoscopio (tubo delgado y flexible que tiene una fuente emisora de luz y una cámara de video pequeña en uno de sus extremos). Si durante la realización

de este procedimiento se observan lesiones en colon y/o recto, se procede a la toma de una muestra de tejido (biopsia) para estudios posteriores, de carácter diagnóstico y/o confirmatorio, y, de ser posible, se procede a la extirpación de las áreas de apariencia sospechosa identificadas, como es el caso de los pólipos, en el transcurso del propio procedimiento (American Cancer Society, 2024b).

El estudio subsiguiente de la muestra de tejido incluye pruebas para determinar si las células muestran MSI asociadas a cambios en MMR, incluyendo la búsqueda de los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*. La mayoría de los casos de CRC esporádicos no presentan niveles elevados de MSI ni cambios en los genes del MMR, pero sí lo hacen los casos de CRC vinculados al síndrome de Lynch (American Cancer Society, 2023). En casos de CRC metastásico, además se buscan cambios genéticos en la muestra de tejido como mutaciones en los genes *KRAS*, *NRAS* y *BRAF* (American Cancer Society, 2023).

1.2.6.3 Otros estudios de diagnóstico por imagen

El diagnóstico por imagen suele utilizar ondas sonoras, rayos X, campos magnéticos o sustancias radioactivas para obtener imágenes del interior del cuerpo. Entre las más usadas en el diagnóstico de CRC se incluyen la tomografía computarizada (TC), en la que se suele determinar si el CRC se ha propagado a ganglios linfáticos cercanos u otros órganos, y la resonancia magnética (RM) en pelvis, que suele determinar si el tumor se ha propagado a órganos adyacentes al colon (American Cancer Society, 2023).

1.2.7 Clasificación anatómica e histológica

Anatómicamente el colon se puede dividir en derecho (ascendente) o proximal e izquierdo (descendente) o distal y existen diferencias en la localización preferente del CRC en función de la vía de carcinogénesis que se activa en cada caso, de tal manera que, en el colon ascendente predominan las vías MSI o CIMP, mientras que en el colon descendente predomina la vía CIN (Sanabria *et al.*, 2012).

Histológicamente el tejido con valor diagnóstico se puede clasificar en: normal, adenomas y lesiones serradas. El tejido normal, incluye hallazgos inespecíficos como mucosa reactiva, inflamación o congestión. Los adenomas (proliferación epitelial con algún grado de

INTRODUCCIÓN

displasia o lesión premaligna) son responsables de entre el 70,0 y el 80,0 % de los casos de CRC. Se trata de lesiones neoplásicas y, por lo tanto, con potencial maligno, que típicamente muestran inactivación del gen *APC* promoviendo la MSI. Microscópicamente presentan criptas tubulares, rectas, revestidas de células displásicas con núcleo elongado e hiper cromático y macroscópicamente pueden ser pediculadas o sésiles. Por definición, los adenomas muestran displasia que puede ser de bajo grado (displasia leve y moderada, neoplasia intraepitelial de bajo grado y neoplasia mucosa de bajo grado) o de alto grado (displasia grave, carcinoma *in situ*, carcinoma intramucoso, neoplasia intraepitelial de alto grado y neoplasia mucosa de alto grado). Las lesiones serradas (epitelio de las criptas en forma de dientes de sierra) son responsables de entre el 20,0 y el 30,0 % de los casos de CRC, hacen referencia a pólipos serrados no displásicos (pólipo hiperplásico o pólipo/adenoma serrado sésil) o serrados displásicos (pólipo/adenoma serrado sésil con displasia o adenoma serrado tradicional) (Portillo *et al.*, 2017; Sanabria *et al.*, 2012).

1.2.8 Tratamiento

1.2.8.1 Cirugía

El principal tratamiento contra el CRC en etapa inicial y no metastásico es la cirugía, cuyo éxito depende de la extensión del cáncer y su localización en el colon. El procedimiento común es la polipectomía (extirpación de un pólipo) o la escisión local de pequeños cánceres en el colon, que se realizan durante la colonoscopia con el objetivo de extirpar el tumor en una sola pieza. Si las pruebas de laboratorio demuestran que hay posibilidad de metástasis, el abordaje indicado podría ser una colectomía, que consiste en una cirugía para extraer todo (colectomía total) o parte (hemicolectomía) del colon. El abordaje quirúrgico más frecuente en pacientes con CRC suele ser la hemicolectomía, mientras que la colectomía total se realiza principalmente en pacientes con FAP (American Cancer Society, 2023).

Una vez realizada la cirugía, el tejido extraído suele analizarse para determinar la etapa del CRC en la que se encuentra el paciente (estadificación) empleando para ello el sistema establecido por el Comité Conjunto Americano del Cáncer (AJCC, del inglés *American Joint Committee on Cancer*), que agrupa a los pacientes con pronóstico y tratamientos similares mediante la clasificación TNM. Esta clasificación hace referencia en sus siglas a tres aspectos del cáncer: T (tamaño o extensión del tumor primario); N (nódulos o propagación a ganglios

linfáticos adyacentes) y M (metástasis o propagación a órganos distantes) (American Cancer Society, 2023). En este sentido, la etapa más temprana del CRC se identifica como etapa 0 y las sucesivas etapas van desde la I a la IV. Cuanto menor sea el número en esta clasificación, menor será la propagación del cáncer en el momento de la evaluación, tal y como se describe en la Tabla 5.

Tabla 5. Estadificación del cáncer colorrectal siguiendo el sistema del Comité Conjunto Americano del Cáncer (AJCC). Fuente: American Cancer Society (2023).

Etapa AJCC	Agrupaciones por etapas	Descripción de la etapa
0	Tis N0 M0	El cáncer se encuentra en su etapa más temprana. También se conoce como carcinoma <i>in situ</i> o carcinoma intramucoso (Tis).
I	T1 o T2 N0 M0	El cáncer ha crecido a través de la mucosa hasta la submucosa (T1) o hasta la capa muscular propia (T2).
IIA	T3 N0 M0	El cáncer ha crecido hacia las capas más externas del colon o recto, pero no ha atravesado estas capas (T3).
IIB	T4a N0 M0	El cáncer ha crecido a través de la pared del colon o recto, pero no ha alcanzado otros tejidos u órganos adyacentes (T4a).
IIC	T4b N0 M0	El cáncer ha crecido a través de la pared del colon o recto y está unido o crece hacia otros tejidos u órganos adyacentes (T4b).
IIIA	T1 o T2 N1 o N1c M0	El cáncer ha crecido a través de la mucosa hasta la submucosa (T1) o hasta la capa muscular propia (T2), se ha propagado a entre 1 y 3 ganglios linfáticos adyacentes (N1) o hacia áreas de grasa cercanas a los ganglios linfáticos (N1c).
	T1 N2a M0	El cáncer ha crecido a través de la mucosa hasta la submucosa (T1) y, se ha propagado a entre 4 y 6 ganglios linfáticos adyacentes (N2a).
IIIB	T3 o T4a N1 o N1c M0	El cáncer ha crecido hacia las capas más externas del colon o recto (T3) o a través del peritoneo visceral (T4a) y, se ha propagado a entre 1 y 3 ganglios linfáticos adyacentes (N1a o N1b) o hacia áreas de grasa cercanas a los ganglios linfáticos (N1c).
	T2 o T3 N2a M0	El cáncer ha crecido hasta la capa muscular propia (T2) o hacia las capas más externas del colon o recto (T3) y, se ha propagado a entre 4 y 6 ganglios linfáticos adyacentes (N2a).

INTRODUCCIÓN

Etapa AJCC	Agrupaciones por etapas	Descripción de la etapa
IIIB	T1 o T2 N2b M0	El cáncer ha crecido a través de la mucosa hasta la submucosa (T1) o hasta la capa muscular propia (T2) y, se ha propagado a ≥ 7 ganglios linfáticos adyacentes (N2b).
IIIC	T4a N2a M0	El cáncer ha crecido a través de la pared del colon o recto (incluyendo el peritoneo vesical), pero no ha alcanzado otros tejidos u órganos adyacentes (T4a) y, se ha propagado a entre 4 y 6 ganglios linfáticos adyacentes (N2a).
	T3 o T4a N2b M0	El cáncer ha crecido hacia las capas más externas del colon o recto (T3) o a través del peritoneo visceral (T4a) y, se ha propagado a ≥ 7 ganglios linfáticos adyacentes (N2b).
	T4b N1 o N2 M0	El cáncer ha crecido a través de la pared del colon o recto y está unido o crece hacia otros tejidos u órganos adyacentes (T4b) y, se ha propagado por lo menos a 1 ganglio linfático adyacentes o hacia áreas de grasa cercanas a los ganglios linfáticos (N1 o N2).
IVA	Cualquier T Cualquier N M1a	El cáncer puede o no haber crecido a través de la pared del colon o recto (cualquier T), puede o no haberse propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (cualquier N) y se ha propagado a un órgano distante (hígado o pulmón) o a un ganglio linfático distante (M1a).
IVB	Cualquier T Cualquier N M1b	El cáncer puede o no haber crecido a través de la pared del colon o recto (cualquier T), puede o no haberse propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (cualquier N) y se ha propagado a más de 1 órgano distante (hígado o pulmón) o a un grupo de ganglios linfáticos distantes (M1b).
IVC	Cualquier T Cualquier N M1c	El cáncer puede o no haber crecido a través de la pared del colon o recto (cualquier T), puede o no haberse propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (cualquier N) y se ha propagado a partes distantes del peritoneo (revestimiento de la cavidad abdominal) y puede o no haberse propagado a órganos o ganglios linfáticos distantes (M1c).

AJCC, comité conjunto americano del cáncer; M, metástasis o propagación a órganos distantes; N, nódulos o propagación a ganglios linfáticos adyacentes y T, tamaño o extensión del tumor primario.

A menudo antes o después de la cirugía suele administrarse radioterapia o quimioterapia, principalmente en casos de CRC metastásico.

1.2.8.2 Radioterapia

Uno de los tratamientos que a menudo suele administrarse antes o después de la cirugía es la radioterapia, que consiste en utilizar radiación (como los rayos X) para destruir las células cancerosas. Este tipo de tratamiento suele emplearse en cáncer de recto pero no en cáncer de colon (American Cancer Society, 2023).

1.2.8.3 Quimioterapia

El otro tratamiento empleado habitualmente antes o después de la cirugía es la quimioterapia, que consiste en utilizar medicamentos contra el cáncer administrados por vía oral o intravenosa, que alcanzan casi todos los órganos del cuerpo a través del torrente sanguíneo (American Cancer Society, 2023).

1.2.9 Prevención

Se estima que alrededor de un tercio de todos los casos de cáncer podrían prevenirse evitando factores de riesgo claves y, participando en los programas de cribado y vacunación, ya que muchos de los tipos de cáncer, tienen una elevada probabilidad de curación si se detectan de forma temprana y se tratan adecuadamente (Pan American Health Organization, 2024). En países como Australia, Canadá, Reino Unido y EE. UU., se ha evidenciado que la incidencia de CRC en mayores de 55 años ha disminuido gracias a los programas de detección temprana que permiten detectar y eliminar pólipos colorrectales precancerosos, previniendo la aparición de neoplasias malignas (Siegel *et al.*, 2017). En concreto, el cribado de CRC se basa en la adecuada aplicación de una estrategia de profilaxis primaria, tal y como se ilustra en la Figura 8 (CTO, 2021).

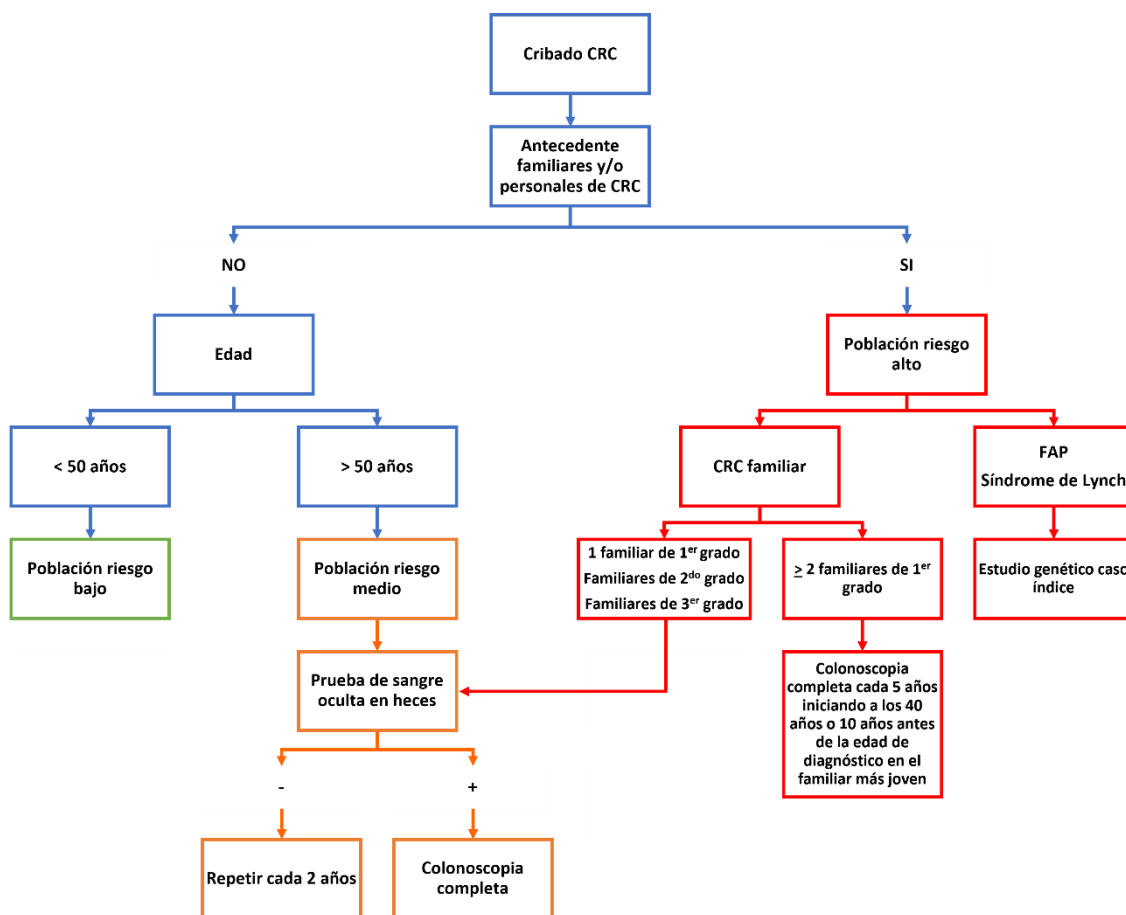


Figura 8. Algoritmo para el cribado de cáncer colorrectal (CRC). FAP, poliposis adenomatosa familiar; familiar de 1^{er} grado: padres, hermanos, hijos; familiar de 2^{do} grado: abuelos, tíos, sobrinos; familiar de 3^{er} grado: bisabuelos, primos.

En los casos de presencia de pólipos, se recomienda realizar un seguimiento planificado:

- a) revisión en 10 años, pacientes con colonoscopia normal;
- b) revisión en 5 años, pacientes con ≥ 2 familiares de primer grado de consanguinidad con CRC con colonoscopia normal;
- c) revisión en 3 años, pacientes con pólipos neoplásicos que cumplen al menos con uno de los criterios de alto riesgo de malignización (tamaño ≥ 10 mm, ≥ 3 adenomas o lesiones serradas, displasia de alto grado);
- d) revisión en 1 año, pacientes con pólipo neoplásico ≥ 20 mm, carcinoma intramucoso o con > 10 adenomas, y
- e) revisión en 6 meses, pacientes con colonoscopias mal preparadas o incompletas (CTO, 2021).

1.2.9.1 Nuevas estrategias diagnósticas

Aunque se conocen ciertos genes y vías concretas que están implicados en el inicio y progresión del CRC, el abordaje de esta enfermedad requiere una visión más completa de la misma. Por ello, recientemente se tiende a secuenciar el exoma de los tumores o analizar polimorfismos en el genoma. Este último enfoque busca identificar polimorfismos de nucleótido único (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphism*) asociados con CRC mediante estudios de asociación de genoma completo (GWAS, del inglés *genome-wide association studies*) (Yao *et al.*, 2014). Los SNP localizados en regiones codificantes del DNA provocan cambios fenotípicos, o pueden estar localizados en la región promotora del gen afectando la actividad transcripcional del gen, o localizados en intrones modulando la estabilidad de la proteína, o localizados en sitios de *splicing* donde ocurre la eliminación de intrones y unión de exones, o bien localizados en regiones intragénicas (Checa Caratachea, 2007).

De este modo algunos SNP localizados en regiones codificantes de genes asociados con CRC se han propuesto como potenciales biomarcadores, confiriendo un papel pronóstico o predictivo de respuesta y toxicidad al tratamiento, que es uno de los retos actuales en el diagnóstico de CRC (Perea *et al.*, 2011; Villa, 2011).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar posibles factores de riesgo genéticos, ambientales y microbiológicos asociados con el desarrollo de cáncer colorrectal en la población de Medellín, Colombia.

2.2 Objetivos específicos

1. Estudiar la posible asociación entre 10 SNP *a priori* asociados con CRC y 21 AIM analizados de forma individual y el desarrollo de la enfermedad.
2. Estudiar la posible asociación entre distintos factores sociodemográficos, clínicos y hábitos alimentarios y de consumo de alcohol y tabaco y el desarrollo de CRC.
3. Estudiar la posible asociación entre la presencia de *Blastocystis* en heces, a nivel de especie, subtipo y variante intrasubtipo y el desarrollo de CRC.
4. Estudiar la posible asociación entre la presencia de agentes infecciosos asociados previamente con CRC como *Cryptosporidium* spp., *E. coli* productora de colibactina, *M. morganii* y *S. gallolyticus* en heces y el desarrollo de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño del estudio

En esta tesis doctoral se evaluó la posible asociación de diferentes factores de riesgo genéticos, ambientales, conductuales y microbiológicos con el desarrollo de CRC, mediante un estudio observacional descriptivo de corte transversal. Se incluyeron participantes con cáncer colorrectal (grupo CRC o grupo de casos) y sin cáncer colorrectal (grupo No CRC o grupo comparador) atendidos en distintos centros hospitalarios de la ciudad de Medellín, Colombia.

Con el fin de tener un mayor poder estadístico a la hora de establecer posibles asociaciones entre los distintos factores estudiados en esta tesis doctoral y el hecho de ser diagnosticado de CRC, se decidió parear los dos grupos de participantes por sexo y edad, admitiendo una variación de ± 5 años.

3.2 Consideraciones éticas

El presente estudio contó con la aprobación del Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Médicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, recogida en el acta N° 006 del 13 de mayo de 2021 (Anexo I). La documentación sometida a evaluación por el Comité de Ética incluyó el proyecto completo, un documento de consentimiento informado (CI), una encuesta clínico-epidemiológica (ECE) estructurada y los protocolos de toma y recolección de muestras biológicas aplicables a cada participante en el estudio.

Una vez obtenida la aprobación, el estudio fue sometido, a su vez, a evaluación por los Comités de Ética de cada uno de los centros hospitalarios participantes, con la subsiguiente aprobación recogida en las siguientes actas: N° 0670 del 8 de febrero de 2022 de la Clínica El Rosario (Anexo II), N° 178 del 20 de diciembre de 2021 de la Clínica Las Américas (Anexo IV), N° 2 del 11 de agosto de 2021 de la Clínica Medellín de Occidente (Anexo VI), N° 166 del 08 de junio de 2021 del Hospital Alma Mater (Anexo VIII) y N° 1 del 18 de enero de 2022 del Hospital San Vicente Fundación (Anexo X).

Cada participante del estudio recibió una explicación detallada de los objetivos de la investigación, los procedimientos para obtener las muestras necesarias y los beneficios y riesgos derivados. A continuación, se rellenó y firmó el CI con los datos del participante, de los testigos del estudio y del equipo investigador, y se entregó una copia firmada al participante, garantizándose en todo momento la confidencialidad de la información personal obtenida (Anexo III, Anexo V, Anexo VII, Anexo IX y Anexo XI).

El estudio se realizó con arreglo a la Resolución N° 8430 de 1993 del Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia (Ministerio de Salud y Protección Social, 1993) y la Declaración de Helsinki 2013 (Asociación Médica Mundial, 2013). Esta última establece principios éticos para la investigación médica en seres humanos, incluida la protección de la dignidad, autonomía, privacidad y confidencialidad de los participantes en la investigación y la expresión del CI para utilizar el material biológico humano y la información recolectada. El estudio se consideró de riesgo mínimo, ya que únicamente se solicitaron muestras de heces y sangre periférica (SP) a los participantes. La participación en el mismo fue de carácter voluntario y no tuvo ningún coste ni compensación económica para el participante. Así mismo, se explicó a cada participante que su negativa a ser incluido en el estudio no afectaría a la atención médica recibida y que en cualquier momento podría retirar su CI si así lo deseaba, sin necesidad de explicar los motivos y con la subsiguiente destrucción de las muestras aportadas hasta ese momento y retirada de los datos asociados con las mismas de la correspondiente base de datos.

3.3 Sistema de Salud en Colombia

El Sistema General de Seguridad Social Integral en Colombia se estableció con la Ley 100 de 1993 y hace referencia al *<<conjunto de instituciones, normas y procedimientos, de que disponen la persona y la comunidad para gozar de una calidad de vida, mediante el cumplimiento progresivo de los planes y programas que el Estado y la sociedad desarrollen para proporcionar la cobertura integral de las contingencias, especialmente las que menoscaban la salud y la capacidad económica, de los habitantes del territorio nacional, con el fin de lograr el bienestar individual y la integración de la comunidad>>* (Congreso de la República de Colombia, 1993). El Sistema General de Seguridad Social Integral se compone de cuatro subsistemas, que son el Sistema General de Pensiones, el Sistema General de Salud, el Sistema General de Riesgos y los Servicios Sociales Complementarios.

El objeto del Sistema General de Pensiones es *<<garantizar a la población el amparo contra las contingencias derivadas de la vejez, la invalidez y la muerte, mediante el reconocimiento de las pensiones y prestaciones..., así como propender por la ampliación progresiva de cobertura a los segmentos de población no cubiertos con un sistema de pensiones>>* (Congreso de la República de Colombia, 1993).

El Sistema General de Salud *<<desarrolla los fundamentos que lo rigen, determina su dirección, organización y funcionamiento, sus normas administrativas, financieras y de control y las obligaciones que se derivan de su aplicación>>* (Congreso de la República de Colombia, 1993). Además, se basa en unos principios generales de equidad, obligatoriedad, protección integral, libre escogencia, autonomía de instituciones, descentralización administrativa, participación social, concertación y calidad.

En el Sistema General de Salud, según la Ley 100 de 1993, se establecen cuatro actores principales: a) el Gobierno (Estado), representado por el Ministerio de Salud y Protección Social, que se encarga de orientar, regular, supervisar, vigilar y controlar el Sistema General de Seguridad Social Integral en Salud y atender las políticas, planes, programas y prioridades del Gobierno en la lucha contra las enfermedades y en el mantenimiento y educación, información y fomento de la salud; b) las Entidades Promotoras de Salud (EPS), que son responsables de la afiliación y el registro de los afiliados y del recaudo de sus cotizaciones por delegación del Fondo de Solidaridad y Garantía, así como de organizar y garantizar la prestación del Plan Obligatorio de Salud a los afiliados; c) las Instituciones Prestadoras de Salud (IPS), que son entidades oficiales, de naturaleza privada o mixta, comunitarias y solidarias, organizadas para la asistencia sanitaria a los afiliados dentro de las EPS o fuera de ellas, y d) las personas (Congreso de la República de Colombia, 1993).

Así mismo, en la Ley 100 de 1993, se establecen dos tipos de afiliados al Sistema General de Salud: a) el régimen contributivo, conformado por las personas con capacidad de pago, entre las que se incluyen trabajadores dependientes (contratados, funcionarios públicos, pensionistas y jubilados) y trabajadores independientes. Dentro de este régimen se establecen dos figuras, el cotizante, que es la persona que realiza el aporte, y el(los) beneficiario(s), que son las personas amparadas por el cotizante, generalmente pertenecientes a su núcleo familiar, y b) el régimen subsidiado, conformado por personas sin capacidad de pago, y que en general corresponde a la población más pobre y vulnerable del país. Finalmente existen excepciones respecto a las afiliaciones al Sistema General de Salud, como es el caso de los miembros de las Fuerzas Militares y de la Policía Nacional, los afiliados al Fondo Nacional de Prestaciones Sociales del

Magisterio y los funcionarios públicos de la Empresa Colombiana de Petróleos y los pensionistas de la misma (Congreso de la República de Colombia, 1993).

El Sistema General de Riesgos Laborales contempla <<las pensiones de invalidez originadas en accidente de trabajo o enfermedad profesionales>> (Congreso de la República de Colombia, 1993).

El objeto de los Servicios Sociales Complementarios es el auxilio para los colombianos con edad superior o igual a 65 años y carentes de rentas o de ingresos suficientes para su subsistencia, que se encuentren en condición de extrema pobreza o indigencia, que residan en una institución sin ánimo de lucro o que tengan una limitación física o mental y no dependan económicamente de persona alguna (Congreso de la República de Colombia, 1993).

3.4 Centros hospitalarios participantes

Medellín es la capital del departamento de Antioquia (Colombia) y la segunda ciudad más poblada del país, después de Bogotá D. C. Según datos de 2023 (Alcaldía de Medellín, 2023), Medellín cuenta con una población aproximada de 2.650.000 habitantes y está distribuida político-administrativamente en dieciséis comunas que subdividen el área urbana de la ciudad (Popular, Santa Cruz, Manrique, Aranjuez, Castilla, Doce de Octubre, Robledo, Villa Hermosa, Buenos Aires, La Candelaria, Laureles-Estadio, La América, San Javier, El Poblado, Guayabal y Belén) y cinco corregimientos que subdividen el área rural (San Sebastián de Palmitas, San Cristóbal, Altavista, San Antonio de Prado y Santa Elena). La ciudad cuenta con un total de 589 IPS, según datos de 2024 (Gobernación de Antioquia, 2024), seis de ellas de naturaleza jurídica pública, 582 privada y solo una mixta, incluyendo clínicas, hospitales, laboratorios clínicos, centros médicos, centros de diagnóstico y ayudas diagnósticas, corporaciones, fundaciones, gremios de salud, empresas sociales del estado y unidades médicas, entre otras.

En la ciudad de Medellín, las IPS se concentran principalmente en las comunas La Candelaria, Laureles-Estadio y El Poblado (Alcaldía de Medellín, Secretaría de Salud, 2022), si bien están presentes en cada una de las comunas y corregimientos de la ciudad. Según datos de 2022, en cuanto a la cobertura del aseguramiento en salud de la ciudad de Medellín, a 2021 la cifra supera el 100 % y se ofertan 7,5 camas por cada 1.000 habitantes, de las cuales el 72,0 % se utiliza en atención de población adulta y el 28,0 % en atención pediátrica (Alcaldía de Medellín, Secretaría de Salud, 2022). Estas cifras superan los valores de referencia establecidos

por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (4 a 4,75 camas por 1.000 habitantes) y se debe al fortalecimiento en la red hospitalaria de la ciudad como respuesta a la pandemia de la enfermedad por coronavirus de 2019 (COVID-19) en la ciudad, donde se ofrece asistencia sanitaria de alta (centros hospitalarios equipados para la atención de problemas de salud que requieren mayor tecnología y especialización o subespecialización médica) y mediana (centros hospitalarios con especialización en servicios básicos) complejidad (Ministerio de Salud y Protección Social, 1994).

En este estudio se incluyeron cinco centros hospitalarios de la ciudad de Medellín: Clínica El Rosario, Clínica Las Américas, Clínica Medellín de Occidente y Hospital San Vicente Fundación, todos ellos de naturaleza jurídica privada, y Hospital Alma Mater de Antioquia, el único de naturaleza jurídica mixta (Figura 9). En todos los centros hospitalarios antes mencionados se ofrece asistencia sanitaria a la población oficial de Medellín o de municipios aledaños, ya que la ciudad es referente en el ámbito departamental, nacional e internacional por sus servicios hospitalarios de alta complejidad.

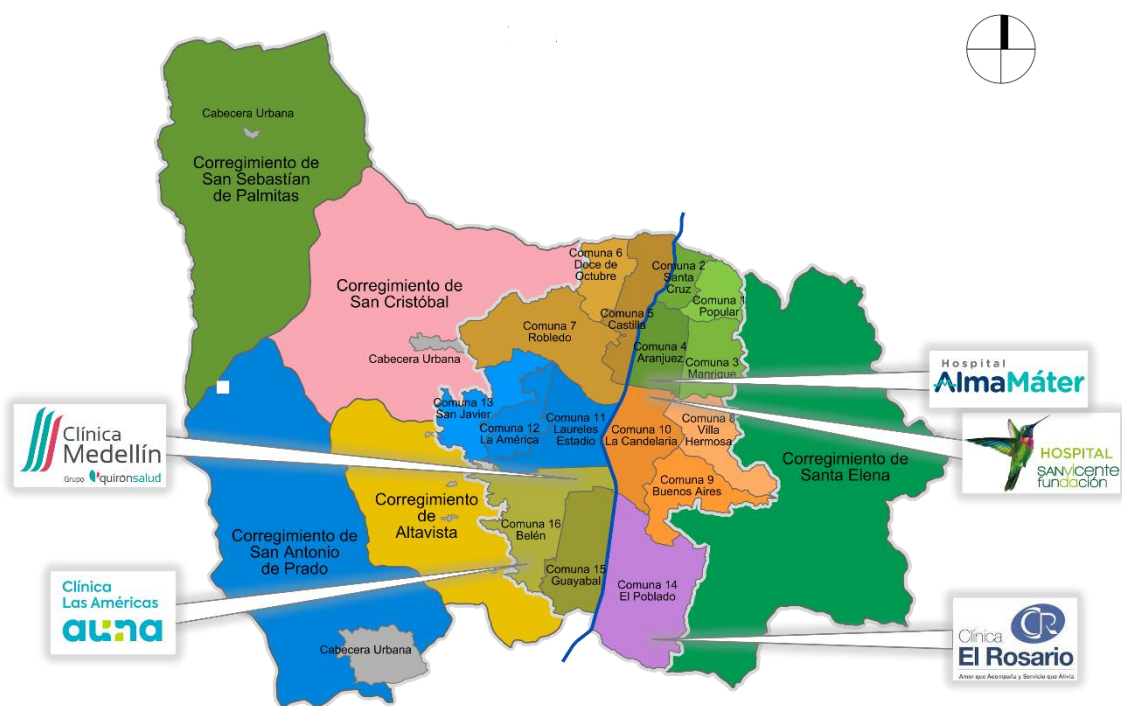


Figura 9. Centros hospitalarios de la ciudad de Medellín, Colombia participantes en el estudio.

3.5 Procedimiento de inclusión de participantes en el estudio

El procedimiento para la inclusión de participantes en el presente estudio se fundamentó en la estrecha colaboración con una serie de médicos cirujanos oncólogos y gastroenterólogos de la ciudad de Medellín con motivación por la investigación básica que previamente habían expresado su interés por vincularse al estudio, aportando tanto sus conocimientos y experiencia en la práctica clínica como la posibilidad de acceso a sus pacientes. Posteriormente se vincularon los cinco centros hospitalarios referidos en el apartado anterior, una vez aprobada su participación por los respectivos comités de ética y aportada toda la documentación requerida de cada miembro del equipo investigador, incluyendo las normas de buena práctica clínica ICH E6, el acuerdo ético y de confidencialidad y la declaración de conflicto de intereses. En algunas ocasiones se mantuvieron reuniones para subsanar o modificar aspectos referentes a la documentación aportada, previamente a la emisión de la carta de aprobación del estudio y el CI con sello del comité de ética de cada centro hospitalario. Este último conformó el único documento legal que se aportó a los participantes.

Tras la aprobación, en cada centro hospitalario se realizó una reunión informativa presencial con los miembros del equipo investigador y el personal sanitario de la institución, incluyendo médicos cirujanos oncólogos y gastroenterólogos, enfermeras, auxiliares de enfermería, personal del laboratorio clínico, secretarías y personal administrativo, constituyendo una red de trabajo colaborativo para la inclusión de los participantes.

En cuanto a los criterios de inclusión, para el grupo CRC se estableció que los participantes tuvieran edad igual o superior a 18 años y un diagnóstico de cáncer de colon o cáncer de recto confirmado por colonoscopia y/o biopsia, tomografía axial computarizada o resonancia magnética con presencia de adenomas, masas o tumores en cualquier lugar anatómico del colon o del recto. Para el grupo No CRC se estableció igualmente que los participantes tuvieran edad igual o superior a 18 años y que por recomendación médica tuvieran concertado un procedimiento de colonoscopia en cuya conclusión el resultado hubiera sido normal, esto es, sin hallazgos de pólipos adenomatosos, adenomas o cáncer. Se excluyó del estudio a mujeres gestantes y a aquellos participantes que por cualquier razón no hubieran completado la información de la ECE o no hubieran aportado las muestras biológicas requeridas.

El procedimiento para la inclusión de los participantes fue adaptado a los requerimientos específicos de cada centro hospitalario y varió considerablemente en función del grupo que conformaban (CRC o No CRC). En la Clínica El Rosario y el Hospital San Vicente

Fundación solo se incluyeron participantes para el grupo CRC, mientras que en la Clínica Las Américas, Clínica Medellín de Occidente y el Hospital Alma Mater de Antioquia se incluyeron participantes para ambos grupos.

En el grupo CRC, el procedimiento para la inclusión de participantes se llevó a cabo en cuatro fases (Figura 10):

Fase 1: Una vez diagnosticados, los médicos cirujanos oncólogos informaban a sus pacientes de que iban a ser contactados por personal del equipo investigador para invitarles a participar en el estudio. Además, se encargaban de comunicar al equipo investigador los datos de identificación y de contacto del paciente y si éste se encontraba ingresado o en casa a la espera de la cirugía para la extirpación del tumor en las siguientes semanas (paciente ambulatorio).

Fase 2: En el caso de los pacientes ingresados, el personal del equipo investigador realizaba una visita presencial al paciente donde le explicaba detalladamente en qué consistía el estudio. Si en ese momento el paciente aceptaba voluntariamente participar en el mismo se procedía con la fase 3 del proceso. En caso contrario se le agradecía por su tiempo y se le explicaba claramente que su decisión no afectaría negativamente a la atención recibida por parte del centro hospitalario. En el caso de que los participantes solicitaran un periodo de reflexión sobre su decisión, se les dejaba el CI sin rellenar para que se tomaran el tiempo necesario para leerlo y/o socializarlo con sus familiares.

Por su parte, los pacientes ambulatorios se contactaban telefónicamente por el personal del equipo investigador, se les explicaba detalladamente el estudio y se les enviaba el CI por vía telemática para su lectura, análisis y socialización. Además, se concertaba un día y hora para una segunda llamada telefónica en la que pudieran comunicar su decisión.

Fase 3: En el caso de los pacientes ingresados que aceptaban participar en el estudio se les agradecía su participación y: a) se rellenaba y firmaba el CI, incluyendo las firmas de los testigos y del personal del equipo investigador; b) se completaba la ECE, lo que requería entre 20 y 30 minutos (min); c) se tomaba la muestra de SP, que se transportaba al laboratorio del Grupo de Parasitología de la Universidad de Antioquia, para su procesamiento y análisis; y d) se entregaba un kit de recogida de heces, conteniendo un recipiente plástico de tapa roscada y una espátula de madera dispuesta para la recogida de heces junto con indicaciones para hacerlo de forma correcta y segura, haciendo hincapié en que ésta debía recogerse antes de iniciar la preparación para la cirugía y entregarse al personal del equipo investigador. Una vez el paciente

recolectaba las heces, se contactaba con el personal del equipo investigador para proceder con la última fase del estudio.

En el caso de los pacientes ambulatorios, se realizaba una segunda llamada telefónica y, en caso de aceptar la participación en el estudio, se les agradecía su participación y a continuación: a) se completaba la ECE, y b) se transmitían las indicaciones claras y precisas para recoger las heces, haciendo hincapié en que ésta debía recogerse antes de iniciar la preparación para la cirugía y entregarse al personal del equipo investigador el mismo día de la cirugía para continuar con la última fase del estudio.

Fase 4: En el caso de los pacientes ingresados, se realizaba una última visita presencial para recoger las heces y ésta se transportaba al laboratorio del Grupo de Parasitología de la Universidad de Antioquia, para su subsiguiente procesamiento y análisis.

En el caso de los pacientes ambulatorios, el día y hora del encuentro acordado en la fase anterior y previo a la cirugía: a) se rellenaba y firmaba el CI, b) se recibían las heces, y c) se concertaba con el personal sanitario del centro hospitalario la toma de la muestra de SP en el momento de la preparación para la cirugía. Una vez obtenidas ambas muestras (heces y SP) se transportaban al laboratorio del Grupo de Parasitología de la Universidad de Antioquia, para su procesamiento y análisis.

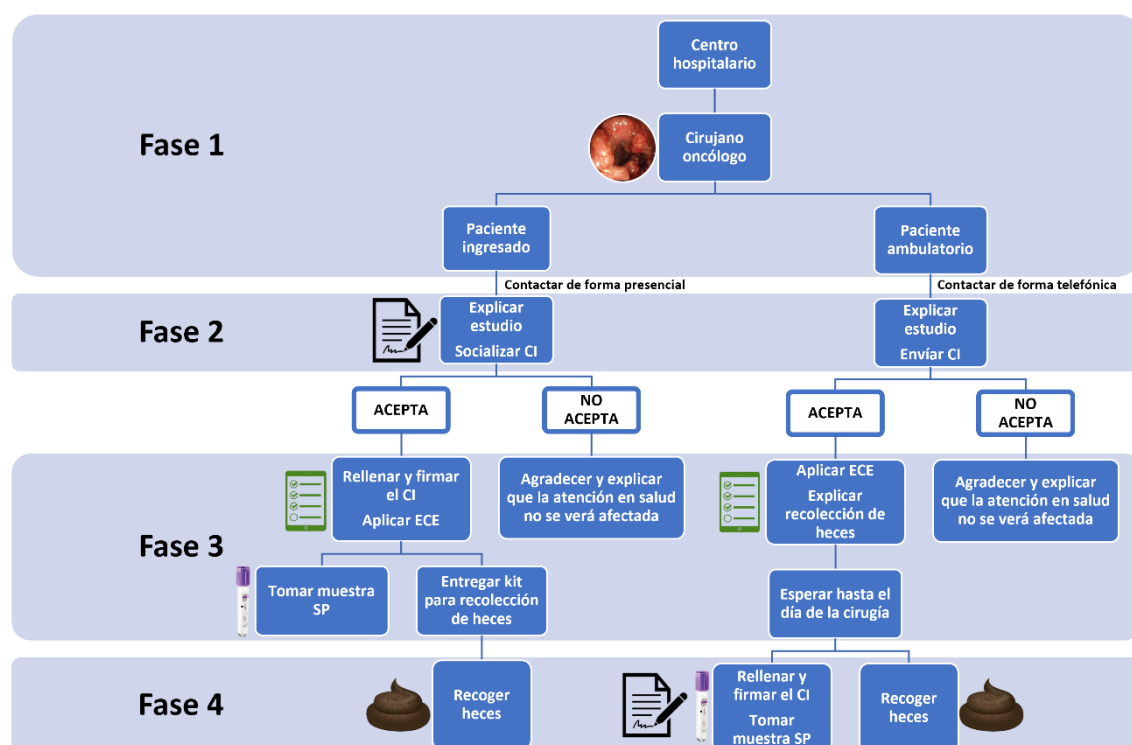


Figura 10. Flujograma procedimental para la inclusión de participantes en el grupo con cáncer colorrectal (CRC). CI, consentimiento informado; ECE, encuesta clínico-epidemiológica; SP, sangre periférica.

En el grupo No CRC, el procedimiento para la inclusión de participantes se llevó a cabo en cuatro fases (Figura 11):

Fase 1: El personal administrativo del Servicio de Gastroenterología de los centros hospitalarios responsables de la programación de los pacientes para el procedimiento de colonoscopia o los médicos cirujanos gastroenterólogos encargados de realizarlo, les comunicaban a los pacientes (previa autorización) que iban a ser contactados por personal del equipo investigador para invitarles a participar en el estudio. Además, si el paciente aceptaba voluntariamente participar en el mismo, se encargaban de comunicar al equipo investigador los datos de identificación y contacto del paciente.

Fase 2: Los pacientes eran contactados telefónicamente por personal del equipo investigador para explicarles detalladamente el estudio y se les enviaba el CI por vía telemática para su lectura, análisis y socialización. Además, se concertaba un día y hora para una segunda llamada telefónica en la que pudieran comunicar su decisión.

Fase 3: Se realizaba una segunda llamada telefónica y, en caso de aceptar la participación en el estudio, se les agradecía su participación y: a) se completaba la ECE, y b) se transmitían las indicaciones claras y precisas para recoger las heces, haciendo hincapié en que ésta debía recogerse antes de iniciar la preparación para la colonoscopia y entregarse al personal del equipo investigador el mismo día de la prueba para continuar con la última fase del estudio.

Fase 4: En el encuentro previo a la colonoscopia acordado en la fase anterior: a) se rellenaba y firmaba el CI, b) se recibían las heces, y c) se concertaba con el personal sanitario del centro hospitalario la toma de la muestra de SP en el momento de la preparación para la colonoscopia. Una vez obtenidas, ambas muestras (heces y SP) se transportaban al laboratorio del Grupo de Parasitología de la Universidad de Antioquia, para su procesamiento y análisis.

Los participantes reclutados en el estudio de cara a su posible inclusión dentro del grupo No CRC que al obtener el resultado de la colonoscopia y/o biopsia hubieran tenido un hallazgo de lesión preneoplásica (presencia de pólipos adenomatosos) fueron finalmente incluidos dentro del grupo CRC.

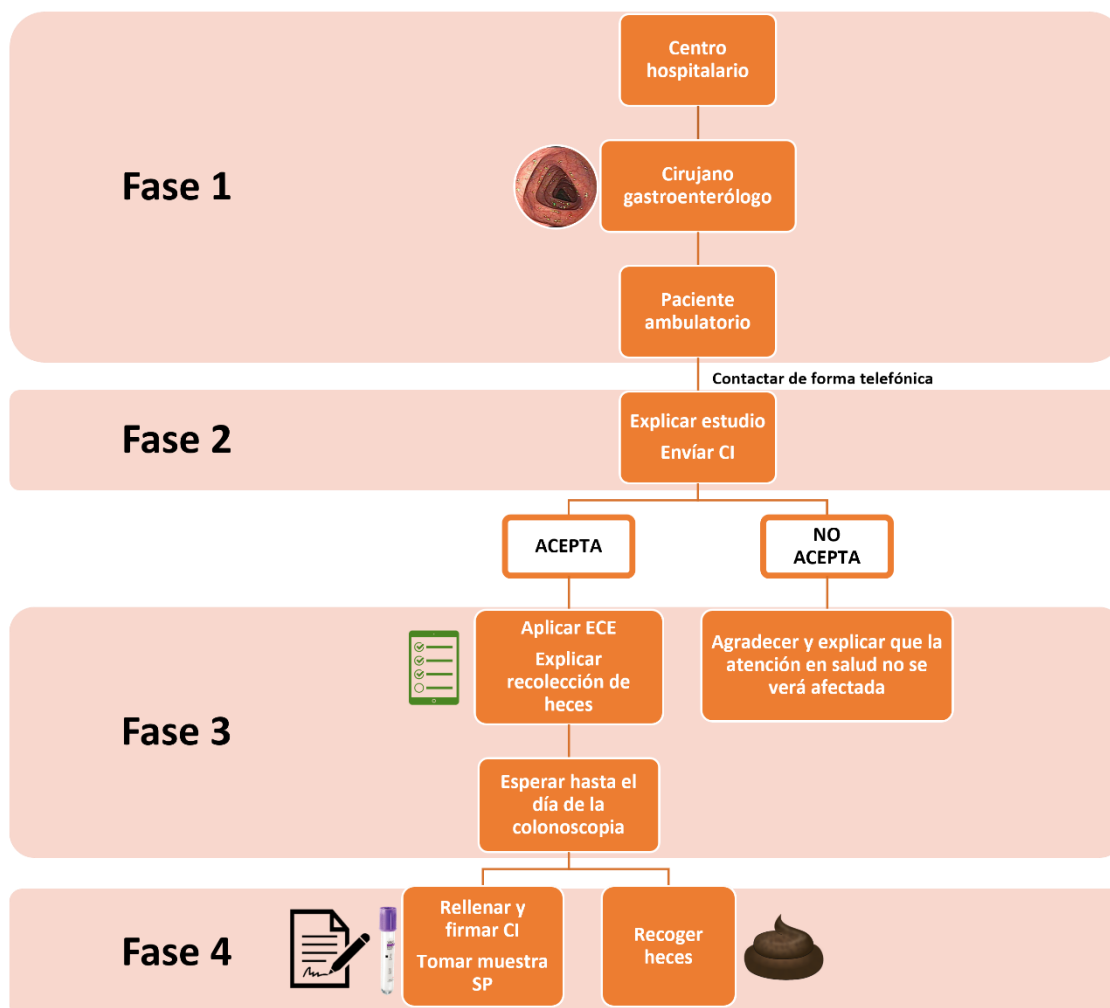


Figura 11. Flujograma procedimental para la inclusión de participantes en el grupo sin cáncer colorrectal (No CRC). CI, consentimiento informado; ECE, encuesta clínico-epidemiológica; SP, sangre periférica.

Finalmente, y con objeto de aumentar el tamaño muestral, se incluyeron participantes en ambos grupos provenientes de contactos personales del equipo investigador que por recomendación médica tuvieran programada una colonoscopia. En estos casos, los participantes acudieron directamente al Grupo de Parasitología de la Universidad de Antioquia manifestando su interés de participar voluntariamente en el estudio, el procedimiento para su inclusión se llevó a cabo en dos fases:

Fase 1: En el momento de llegada al Grupo de Parasitología: a) se rellenaba y firmaba el CI, b) se completaba la ECE, c) se tomaba la muestra de SP, y d) se entregaba un kit de recogida de heces, conteniendo un recipiente plástico de tapa roscada y una espátula de madera dispuesta para la recogida de heces junto con indicaciones para hacerlo de forma correcta y segura. Además, se acordaba una fecha para entregar las heces junto con el resultado de la colonoscopia.

Fase 2: El día que el participante había recolectado las heces, la transportaba al laboratorio del Grupo de Parasitología de la Universidad de Antioquia, para su procesamiento y análisis y entregaba una copia del resultado de la colonoscopia.

3.6 Análisis de origen genético en la población del estudio

Con el fin de evitar la estratificación en el muestreo de los participantes y asegurar que ambos grupos (CRC y No CRC) eran similares en relación con su origen genético antes de proceder al análisis estadístico de distintos factores de riesgo, se estimó el componente genético ancestral individual y poblacional en los participantes del estudio, empleando tres poblaciones parentales: ascendencia europea (EUR, del inglés *European ancestry*), ascendencia nativo-americana (NAM, del inglés *Native American ancestry*) y ascendencia africana (AFR, del inglés *African ancestry*). Los valores obtenidos se compararon con los descritos previamente en la población colombiana, con un porcentaje de EUR que oscila entre el 45,0 y el 96,7 %, de NAM entre el 2,1 y el 18,2 % y de AFR entre el 1,2 y el 36,8 % (Rishishwar *et al.*, 2015), y concretamente con valores descritos en la población de Medellín, con un porcentaje de EUR entre el 64,0 y el 75,0 %, de NAM entre el 18,0 y el 29,0 % y de AFR del 7,0 % (Conley *et al.*, 2017; Norris *et al.*, 2018). La determinación del componente genético ancestral se llevó a cabo, siguiendo el procedimiento que se describe a continuación.

3.6.1 Obtención de sangre periférica

De cada participante se obtuvieron 8 mililitros (ml) de SP total, repartidos en dos tubos BD Vacutainer® con ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) como anticoagulante (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, EE. UU.). El procedimiento para la obtención de SP fue realizado principalmente por personal sanitario (enfermeras, auxiliares de enfermería o personal del laboratorio clínico) de los centros hospitalarios y excepcionalmente por miembros del equipo investigador. La muestra de SP de cada paciente se transportó a temperatura ambiente (RT, del inglés *room temperature*) de forma inmediata en contenedores de bioseguridad hasta el laboratorio del Grupo de Parasitología de la Universidad de Antioquia, donde se realizó el proceso de extracción y purificación de DNA genómico.

3.6.2 Extracción y purificación de DNA genómico a partir de sangre periférica

En el presente estudio se empleó el método conocido como *salting-out* o precipitación por sales (Lahiri y Numberger, 1991; Miller *et al.*, 1988) adaptado por el equipo investigador para la obtención de DNA genómico en cantidad y pureza óptima. Se realizaron dos extracciones de DNA genómico de SP por cada participante, una por cada tubo. Tras la llegada de la muestra al laboratorio, ésta se homogenizó invirtiendo ocho veces de forma suave los tubos con EDTA para evitar la formación de coágulos. Se procedió a centrifugar a 800 fuerzas centrífuga relativa (RCF, del inglés *relative centrifugal force*) durante 10 min para separar el componente celular del plasma. Este último se retiró con pipeta Pasteur y se almacenó a -80 grados Celsius (°C) para estudios posteriores. El volumen retirado se reemplazó con tampón salino con fosfato (PBS) y la fase celular restante de cada tubo se transfirió a un nuevo tubo cónico estéril de 15 ml.

El protocolo adaptado se inició con la lisis de las células sanguíneas, añadiendo en el tubo cónico con el contenido celular precipitado del paso anterior, solución TKM1 que contenía clorhidrato de tris (tris-HCl) 1 molar (M) pH 7,5, cloruro de potasio (KCl) 1 M, cloruro de magnesio (MgCl₂) 1 M, EDTA 0,5 M y Tritón X-100 2,5 porcentaje volumen-volumen (% v/v), hasta completar 3 veces el volumen inicial de SP. Se mezcló suavemente el contenido del tubo y se centrifugó a 2.000 RCF durante 10 min a RT. El sobrenadante se descartó con cuidado de no desprender el sedimento y se añadió nuevamente solución TKM1 hasta completar 3 veces el volumen inicial de SP, se centrifugó a 2.000 RCF durante 10 min a RT y este paso se repitió una vez más hasta completar tres lavados con solución TKM1. A continuación, se procedió con la desnaturalización de las proteínas, para lo cual se resuspendió el sedimento en 1 ml de solución TKM2 que contenía tris-HCl 1 M pH 7,5, KCl 1 M, MgCl₂ 1 M, EDTA 0,5 M y cloruro de sodio (NaCl) 5 M y se añadieron 100 microlitros (μl) de dodecilsulfato sódico (SDS, del inglés *sodium dodecyl sulfate*) al 10,0 %. Posteriormente, el contenido se agitó en el mezclador de vórtice durante 1 min y se incubó a 65 °C durante 20 min, agitando a su vez en el mezclador de vórtice cada 5 min para lograr homogenizar completamente el sedimento. Tras la incubación, se añadieron 300 μl de NaCl 5 M, se agitó en el mezclador de vórtice durante 1 min, y se centrifugó a 2.000 RCF durante 15 min a RT para recuperar el DNA genómico a partir del sobrenadante. Para ello, el sobrenadante completo se transfirió a un nuevo tubo cónico de 15 ml, se añadieron 4 ml de etanol a -20 °C al 100 %, se mezcló suavemente y se observó la precipitación del DNA. Después se centrifugó a 2.000 RCF durante 5 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante, se añadieron 2 ml de etanol al 70,0 %, se agitó en el mezclador de vórtice durante 1 min, se centrifugó a 3.000 RCF

durante 5 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante con especial cuidado de no perder el sedimento y se dejó el tubo cónico boca abajo sobre una toalla de papel absorbente hasta que el etanol se evaporó en su totalidad. Luego el tubo cónico se incubó a 37 °C en un agitador orbital y se dejó secar el DNA hasta que se visualizó transparente. Finalmente, el DNA se resuspendió en 500 µl de tampón tris-EDTA 0,1 milimolar (mM) pH 8 (TE *low*-EDTA) y se incubó a 37 °C en un agitador orbital hasta el día siguiente para su completa elución. El DNA eluido en los dos tubos cónicos de 15 ml se transfirió a un único tubo cónico de 1,5 ml libre de DNAsas y RNAsas para proceder con la determinación de su cantidad y pureza y posterior almacenamiento a –20 °C hasta su uso.

3.6.3 Determinación de la cantidad y pureza del DNA genómico obtenido de sangre periférica

La cantidad y pureza del DNA genómico obtenido a partir de SP se determinó por espectrofotometría utilizando el equipo NanoPhotometer® N60 (Implen GmbH, Múnich, Alemania), empleando para ello 2 µl del DNA eluido. La cantidad de DNA genómico presente en el extracto se determinó en nanogramos por microlitros (ng/µl), se normalizó a una concentración de 100 ng/µl y se almacenaron dos alícuotas de cada extracto normalizado a –20 °C para su uso posterior. El grado de pureza se estimó con arreglo al cociente A260/A280 (con valores de aceptación entre 1,8 y 2,0) y A260/A230 (con valores de aceptación entre 2,0 y 2,2). En los casos en los cuales el DNA genómico obtenido no alcanzó la cantidad mínima requerida (20 ng/µl) ni los valores de aceptación de la pureza, el paciente fue excluido de los análisis de estimación del componente genético ancestral.

3.6.4 Estimación del componente genético ancestral

El DNA genómico obtenido a partir de SP y normalizado a 100 ng/µl se utilizó para estimar el componente genético ancestral de cada participante. Este proceso consistió en determinar las frecuencias alélicas de las tres poblaciones parentales (EUR, NAM y AFR) empleando marcadores informativos de la ascendencia (AIM, del inglés *ancestry informative marker*).

Estos AIM se encuentran ampliamente distribuidos a lo largo del genoma humano y presentan diferencias absolutas de la frecuencia alélica en cada una de las poblaciones parentales, de tal manera que dicha diferencia determina el poder para inferir la composición ancestral promedio de una población y a su vez la de un individuo (Tabla 6). Como criterio general, para la selección de los AIM se tuvo en cuenta que el valor delta, es decir, la diferencia de la frecuencia del alelo entre dos poblaciones parentales, calculada con arreglo a los datos más recientes recogidos en el proyecto internacional 1.000 genomas, tuviera un valor de 0,3 o superior (Baye *et al.*, 2009; Collins-Schramm *et al.*, 2002). No obstante, algunos marcadores se emplearon en la estimación del componente genético ancestral atendiendo a su utilidad demostrada históricamente en este tipo de estudios, pese a no cumplir estrictamente el criterio general (Tabla 6).

La amplificación de los AIM se realizó empleando un ensayo de PCR convencional directa o de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, del inglés *restriction fragment length polymorphism*). Este último consistía en un ensayo de PCR seguida de digestión con enzimas de restricción que se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa, permitiendo la tipificación de cada uno de los AIM en función del tamaño del producto. Una vez tabulada la información de los 21 AIM analizados, se realizó la prueba de equilibrio Hardy-Weinberg (HW) y se estimaron las frecuencias alélicas y genotípicas para cada uno de ellos con el programa libre PLINK versión 1.9 (Chang *et al.*, 2015).

Además, se estimaron las proporciones del componente genético ancestral individual y poblacional usando el programa Admixmap versión 3.8 (Hoggart *et al.*, 2003) que emplea aproximaciones clásicas y bayesianas para modelizar la mezcla individual, haciendo uso de la información aportada por los genotipos para los AIM en la población híbrida en estudio, así como de la información *a priori* sobre la frecuencia de estos marcadores en las poblaciones parentales.

Tabla 6. Relación de los marcadores informativos de la ascendencia empleados para determinar el componente genético ancestral en la población del estudio.

Chr	AIM	rsID	Posición	Polimorfismo	Frecuencias alélicas parentales			Delta de frecuencias alélicas			Tipo de variante	Referencia
					EUR	NAM	AFR	EUR-NAM	EUR-AFR	NAM-AFR		
1	MID1752 ^a	rs2307948	54870823-54870887	InDel (64 bp)	0,476	0,647	0,731	0,171	0,255	0,084	Intrónica gen DHCR24	Ensembl (s. f.)
1	FYNUL	rs2814778	159204893	T/C	0,994	0,922	0,036	0,072	0,958	0,886	5' UTR gen ACKR1	Ensembl (s. f.)
1	AT3	rs3138521	173917605-173917636	InDel (31 bp)	0,282	0,061	0,858	0,221	0,576	0,797	Intrónica gen SERPINC1	Ensembl (s. f.); Nascimento <i>et al.</i> (2016)
1	MID1386	rs2307582	247768775	InDel	0,860	0,290	0,830	0,570	0,030	0,054	n. d.	Andrade <i>et al.</i> (2018); Pereira <i>et al.</i> (2012)
4	GCH	rs7041	71752617	A/C	0,417	0,463	0,906	0,046	0,489	0,443	Mutación con cambio de sentido	Ensembl (s. f.)
4	GCS ^a	rs4588	71752606	G/T	0,752	0,793	0,933	0,041	0,181	0,140	Mutación con cambio de sentido	Ensembl (s. f.)
5	MID817 ^a	rs1610901	11346928-11346953	InDel (25 bp)	0,683	0,598	0,852	0,085	0,169	0,254	Intrónica gen CTNND2	Ensembl (s. f.)
5	MID1039	rs2067128	34009694	InDel	0,520	0,760	0,860	0,240	0,340	0,100	n. d.	Andrade <i>et al.</i> (2018)
5	MID1358	rs2307554	35619871-35619888	InDel (17 bp)	0,133	0,195	0,601	0,062	0,468	0,406	Intrónica gen SPEF2	Ensembl (s. f.)
5	MID856	rs1610941	65989041-65989067	InDel (26 bp)	0,132	0,347	0,471	0,215	0,339	0,124	Intrónica gen ERBIN	Ensembl (s. f.)
5	MID944	rs1611027	92978840-92978869	InDel (29 bp)	0,513	0,686	0,828	0,173	0,315	0,142	Intergénica	Ensembl (s. f.)

Chr	AIM	rsID	Posición	Polimorfismo	Frecuencias alélicas parentales			Delta de frecuencias alélicas			Tipo de variante	Referencia
					EUR	NAM	AFR	EUR-NAM	EUR-AFR	NAM-AFR		
6	MID2062	rs2308254	40119157-40119178	InDel (21 bp)	–	–	–	–	–	–	Intergénica	Ensembl (s. f.)
7	MID1066	rs2067155	30374603	InDel	0,280	0,260	0,840	0,020	0,560	0,580	n. d.	Chacón-Duque (2013)
8	LPL	rs285	19957678	T/C	0,517	0,461	0,933	0,056	0,416	0,472	Intrónica gen LPL	Ensembl (s. f.)
11	DRD2	rs1800498	113420866	G/A	0,387	0,622	0,852	0,235	0,465	0,230	Intrónica gen DRD2	Ensembl (s. f.)
11	APOA1	rs3138522	116835751-116837622	InDel	0,925	0,977	0,420	0,052	0,505	0,557	n. d.	Nascimento <i>et al.</i> (2016)
13	RB2300	rs2252544	48304156	G/A	0,287	0,271	0,909	0,016	0,622	0,638	Intrónica gen RB1	Ensembl (s. f.)
15	OCA2	rs1800404	27990627	C/T	0,214	0,421	0,873	0,207	0,659	0,452	Sinónima gen OCA2	Ensembl (s. f.)
16	MID818	rs1610902	2150622-2150629	InDel (7 bp)	0,760	0,752	0,272	0,008	0,488	0,480	Intrónica gen RAB26	Ensembl (s. f.)
16	PV92	rs3138523	82877960-82878504	InDel	0,152	0,792	0,225	0,640	0,073	0,567	n. d.	Nascimento <i>et al.</i> (2016)
19	Sb19.3	rs3138524	27200000	InDel	0,903	0,645	0,415	0,258	0,488	0,230	n. d.	Nascimento <i>et al.</i> (2016)

^a. Aunque los valores delta calculados con arreglo al proyecto internacional 1.000 genomas no cumplen el criterio de diferencia mínima entre alelos establecido en 0,3 o superior (Baye *et al.*, 2009; Collins-Schramm *et al.*, 2002), se emplea el marcador atendiendo a la utilidad demostrada históricamente en este tipo de estudios.

A, adenina; AFR, ascendencia africana; AIM, marcador informativo de la ascendencia; bp, pares de bases; C, citosina; Chr, cromosoma; EUR, ascendencia europea; G, guanina; InDel, inserción o delección; MID, marcador de inserción o delección; n. d., no dato; NAM, ascendencia nativo-americana; rsID, número de identificación del polimorfismo de nucleótido único; s. f., sin fecha; T, timina; UTR, región no traducida (del inglés *untranslated region*).

3.6.5 Ensayos de PCR convencional directa y PCR-RFLP para determinar el componente genético ancestral

Como se ha indicado anteriormente, la amplificación de los AIM se realizó mediante el ensayo de PCR convencional directa o de PCR-RFLP. La mezcla de reacción para el ensayo de PCR convencional directa contenía tampón Taq 1× con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Thermo Scientific, Waltham, EE. UU.), 200 μM de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dNTP, del inglés *deoxynucleotide triphosphate*) 10 mM (Thermo Scientific), entre 1,5 y 2,5 mM de MgCl_2 25 mM (Thermo Scientific), 200 μM de cada cebador específico para el AIM, 0,5 unidades por microlitro (U/ μl) de la enzima Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific), 2 μl de DNA genómico y agua grado biología molecular hasta completar un volumen final de entre 15 y 40 μl . En cada ensayo de PCR se incluyeron un control negativo, empleando agua grado biología molecular en lugar de DNA genómico, y un control positivo, empleando DNA genómico de muestras positivas confirmadas previamente. Los ensayos de PCR convencional directa se realizaron en un termociclador Applied Biosystems MiniAmp Plus A37835 (Applied Biosystems, Waltham, EE. UU.) cuyas condiciones se especifican en la Tabla suplementaria 1.

El ensayo de PCR-RFLP se inició con la PCR convencional directa siguiendo las mismas condiciones anteriormente descritas. Del producto del ensayo de PCR obtenido se emplearon 5 μl para verificar la amplificación de la región de interés (resuelta por electroforesis) y con el volumen restante se realizó la subsiguiente digestión del producto amplificado usando enzimas de restricción específicas para los AIM que así lo requerían (Tabla suplementaria 1). La reacción contenía 1 U/ μl de la enzima específica, 2 μl de tampón de digestión 1× de la misma enzima y 15 μl del producto amplificado. En concreto, la digestión para los AIM: FYNUL, GCH, GCS, LPL, RB2300 y OCA2 se realizó en estufa a 37 °C durante 24 h y para el AIM DRD2 en termobloque a 65 °C durante 16 h.

3.6.6 Resolución de los ensayos de PCR convencional directa y PCR-RFLP para determinar el componente genético ancestral

Los productos de los ensayos de PCR convencional directa y PCR-RFLP se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (VWR Life Science AMRESCO, Pennsylvania, EE. UU.) al 3,0 y al 2,5 %, respectivamente, a 90 voltios (V) durante 40 min en tampón TBE 1× (Tris base 890 mM, ácido bórico 890 mM y 0,5 M EDTA pH 8,0) (Moore, 2001) empleando 3 μl del marcador de peso

molecular Norgen PCR Ranger 100 bp DNA Ladder (Norgen Biotek Corporation, Thorold, Canadá). Los geles fueron preparados con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 microgramos por mililitro ($\mu\text{g/ml}$) y los productos de amplificación se visualizaron en un transiluminador con luz ultravioleta. La interpretación de los distintos genotipos fue realizada por dos observadores independientes.

3.7 Factores genéticos asociados con cáncer colorrectal

3.7.1 Polimorfismos de nucleótido único asociados con cáncer colorrectal

En el DNA genómico obtenido a partir de SP y normalizado a 100 ng/ μl se estudiaron 10 SNP *a priori* asociados con CRC (Tabla 7). La selección se realizó de acuerdo con la bibliografía existente, teniendo en cuenta para ello estudios de GWAS que mostraron asociación de los SNP a CRC esporádico. Para la selección de las variantes se tuvo en cuenta su funcionalidad, el valor de frecuencia del alelo menos común (MAF) $> 0,05$ y las frecuencias alélicas y genotípicas determinadas en el proyecto internacional 1.000 genomas que constituye el mayor catálogo público de datos sobre variantes genéticas humanas (*1000 Genomes Project*, s. f.; The International Genome Sample Resource, s. f.).

La identificación de los 10 SNP se realizó por ensayo de PCR competitiva de alelo específica (KASP-PCR, del inglés *kompetitive allele specific PCR*) por la empresa LGC Genomics Ltd (<http://www.lgcgroup.com>). El ensayo utilizaba dos cebadores sentido, cada uno con una secuencia específica de alelo en su extremo 3' y un *cassette* único en su extremo 5', y un cebador antisentido común. Además, la reacción contenía dos cebadores homólogos a las secuencias de los *cassettes*, uno marcado con el fluoróforo FAM y otro marcado con el fluoróforo HEX, y sus secuencias complementarias unidas a un apagador (*quencher*).

El primer ciclo del ensayo de PCR iniciaba con la desnaturalización del DNA molde de doble cadena y el alineamiento de los cebadores sentido específicos de alelo que contenían el *cassette* al igual que el cebador antisentido común. A continuación, los dos cebadores sentido específicos de alelo de cada *cassette*, competían por unirse al polimorfismo de interés en la hebra de DNA molde e iniciaban la elongación. En el segundo ciclo de la reacción, se generaba la secuencia complementaria a la hebra que tiene unido el *cassette*. A partir del tercer ciclo de la reacción, se sintetizaba la hebra completa conteniendo las secuencias *cassette* antisentido,

permitiendo que los cebadores marcados con el fluoróforo FAM o HEX se unieran, quedando incorporadas a las nuevas hebras de DNA sintetizadas y separándose de los apagadores. A medida que avanzaba la reacción, se aumentaban exponencialmente los fragmentos de DNA de interés recién sintetizados, que incorporaban cada vez mayor cantidad de cebadores marcados con el fluoróforo, emitiendo señal fluorescente y permitiendo evidenciar la presencia de uno u otro alelo (Biosearch Technologies, 2021). El ensayo de PCR competitiva de alelo específica lograba la discriminación bialélica, es decir, si el genotipo de un SNP dado era homocigótico solo se generaba una de las dos señales fluorescentes posibles, pero si el genotipo era heterocigótico se generaba una señal fluorescente mixta (Biosearch Technologies, 2021).

Tabla 7. Relación de los polimorfismos de nucleótido único (SNP) *a priori* asociados con cáncer colorrectal investigados en el estudio.

Chr	Posición	Gen	Nombre del gen	rsID	SNP (riesgo/no riesgo)	Referencia
1	45331833	MUTYH	<i>mutY DNA glycosylase</i>	rs3219489	C/G	Santos <i>et al.</i> (2012)
3	66392011	LRIG1	<i>Leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 1</i>	rs812481	C/G	Shumacher <i>et al.</i> (2015)
5	112840073	APC	<i>APC regulator of Wnt signaling pathway</i>	rs41115	G/A	Wallis <i>et al.</i> (1999)
8	127401060	CCAT2	<i>Colon cancer associated transcript 2</i>	rs6983267	G/T	Tanikawa <i>et al.</i> (2018)
11	111300984	COLCA2	<i>Colorectal cancer associated 2</i>	rs3802842	C/A	Lu <i>et al.</i> (2020)
14	53944201		–	rs4444235	T/C	Schmit <i>et al.</i> (2019)
15	32702555	GREM1	<i>Gremlin 1</i>	rs4779584	T/C	Peters <i>et al.</i> (2013)
16	68787043	CDH1	<i>Cadherin 1</i>	rs9929218	G/A	Schmit <i>et al.</i> (2019)
18	48927093	SMAD7	<i>SMAD family member 7</i>	rs4939827	T/C	Lu <i>et al.</i> (2019)
20	6423634		–	rs961253	C/A	Shumacher <i>et al.</i> (2015)

A, adenina; C, citosina; Chr, cromosoma; G, guanina; rsID, número de identificación del polimorfismo de nucleótido único; SNP, polimorfismo de nucleótido único; T, timina.

3.8 Factores ambientales y conductuales asociados con cáncer colorrectal

3.8.1 Encuesta clínico-epidemiológica estructurada

La información relativa a los factores ambientales y conductuales evaluados en el presente estudio se obtuvo mediante una ECE estructurada que contenía 46 variables codificadas (Anexo XII). Con el fin de digitalizar la ECE estructurada se desarrolló una aplicación móvil específica, que se instaló en tabletas Lenovo TB-X103F (Lenovo Group, Pekin, China) para facilitar y agilizar la recogida de información. La ECE estructurada fue cumplimentada únicamente por personal del equipo investigador previamente entrenado. Las variables contempladas en la ECE estructurada incluyeron:

a) Datos de identificación y sociodemográficos del paciente (sexo al nacer, edad, lugar de nacimiento, autorreconocimiento de pertenecer a un grupo étnico y ocupación u oficio).

b) Aspectos relacionados con los hábitos alimentarios (frecuencia en el consumo de carbohidratos, derivados lácteos, huevos, carnes rojas, pollo, frutas frescas, verduras y legumbres y productos ultraprocesados).

c) Aspectos relacionados con los hábitos de tabaquismo (pasado y actual), para lo cual se calculó el índice paquete-año (IPA), empleando las siguientes fórmulas:

IPA para fumador diario:

$$\text{IPA} = \frac{\text{número de cigarrillos al día} \times \text{número de años fumando}}{20}$$

IPA para fumador ocasional:

$$\text{IPA} = \frac{\text{número de cigarrillos al día} \times \frac{\text{número de días al mes fumando}}{30} \times \text{número de años fumando}}{20}$$

Con el resultado obtenido de la aplicación de las fórmulas anteriores, tanto para IPA diario como para IPA ocasional, según correspondiera, y con arreglo a los intervalos considerados por Villalba Caloca y Martínez Heredero (2004), se establecieron cuatro categorías de consumo de tabaco: muy bajo (IPA < 10), bajo (IPA 10-20), moderado (IPA 21-40) o alto (IPA > 40). Este mismo criterio se aplicó tanto para IPA pasado como para IPA actual.

d) Aspectos relacionados con los hábitos etílicos (pasado y actual), para lo cual se calculó la unidad de bebida estándar (UBE) con la suma del consumo de los diferentes tipos de bebidas alcohólicas, empleando la siguiente tabla de conversión:

Cerveza	200 ml = 1 UBE	330 ml = 1,65 UBE	750 ml = 3,75 UBE
Vino	100 ml = 1 UBE	500 ml = 5 UBE	750 ml = 7,5 UBE
Bebida espirituosa	50 ml = 2 UBE	375 ml = 15 UBE	750 ml = 30 UBE

Con el resultado obtenido, y con arreglo a los intervalos considerados por el Ministerio de Sanidad, Gobierno de España (s. f.), se establecieron tres categorías de consumo de alcohol: bajo (UBE < 17), moderado (UBE 17-28) o alto (UBE > 28), en el caso de los hombres, y bajo (UBE < 11), moderado (UBE 11-17) o alto (UBE > 17), en el caso de las mujeres. Este mismo criterio se aplicó tanto para UBE pasado como para UBE actual.

e) Aspectos relacionados con el consumo de café y alimentos preparados en casa o fuera de casa.

f) Aspectos relacionados con la vivienda (lugar de residencia, ubicación (rural o urbana), material del suelo de la vivienda).

g) Aspectos relacionados con la convivencia con animales, distinguiendo entre animales de compañía (perros y gatos) y animales de granja (aves de corral, vacas, cerdos, caballos y peces).

h) Aspectos higiénico-sanitarios (abastecimiento del agua para el consumo, mecanismo para la eliminación de excretas y hábitos de higiene personal como desinfección de frutas y verduras, lavado de manos y uso de calzado).

i) Aspectos clínicos (síntomatología actual y antecedentes personales y familiares) y tratamiento antiparasitario. Para agrupar las enfermedades se empleó la Clasificación Internacional de Enfermedades - CIE-11 (versión: 01/2023) (Organización Mundial de la Salud, s. f.).

3.9 Factores microbiológicos asociados con cáncer colorrectal

3.9.1 Técnicas de microscopía para el análisis de heces

Las muestras de heces de los participantes reclutados en el presente estudio fueron analizadas por microscopía posteriormente a la realización de: montaje en fresco, técnica de concentración, coloración de Ziehl-Neelsen modificada y cultivo en medio de Jones para *Blastocystis*.

3.9.1.1 Montaje en fresco

El montaje en fresco de las heces permite la identificación de agentes parasitarios, tanto protistas como helmintos. Inicialmente se realizó una exploración de macroestructuras de las heces con el fin de determinar características como la consistencia (líquida, blanda o dura), el color con significancia patológica (melena o acolia) y la presencia de moco, sangre (disentería), restos alimentarios (lientérica) o macroestructuras parasitarias como gusanos adultos o proglótides de cestodos (Botero y Restrepo, 2012). A continuación, se procedió con la exploración microscópica que incluyó homogenizar las heces con ayuda de un aplicador de madera sin algodón. Con el mismo aplicador, se recolectaron aproximadamente 2 mg de heces y se mezclaron con una gota de solución salina al 0,85 % y luego con una gota de solución yodada o lugol (Merck, Darmstadt, Alemania) sobre un portaobjetos (Botero y Restrepo, 2012; Faust *et al.*, 1939). Seguidamente, se depositó un cubreobjetos sobre la preparación fresca de solución salina y otro cubreobjetos sobre la preparación fresca de lugol y el montaje se observó al microscopio óptico en 100× y 400× haciendo un recorrido completo de las preparaciones (Botero y Restrepo, 2012; Faust *et al.*, 1939).

3.9.1.2 Técnica de concentración

Las técnicas de concentración persiguen aumentar el número de parásitos presentes en el volumen de heces que se examina (Botero y Restrepo, 2012). En el presente estudio se empleó el kit comercial Mini Parasep® SF (Apacor, Wokingham, Reino Unido). Este sistema de concentración de las heces incluye un tubo plástico con extremo romo en el que se añadió 1 ml

de acetato de etilo o éter etílico (Merck) y la porción correspondiente de heces (espátula medidora del sistema). El sistema se selló y se homogenizó mezclando vigorosamente hasta conseguir una emulsión completa del solvente y las heces. Después se invirtió el sistema quedando el tubo cónico (sin contenido) hacia abajo y el tubo con extremo romo (con la solución) hacia arriba y se centrifugó a 1.200 RCF durante 2 min. Tras la centrifugación, en el filtro quedaron retenidas las partículas fecales grandes y en el tubo cónico se observó el sedimento, que contenía las formas parasitarias concentradas, y el sobrenadante, correspondiente al solvente orgánico. A continuación, se desenroscó el sistema, se desechó la parte superior y se descartó el sobrenadante por inversión. El sedimento se analizó al microscopio óptico siguiendo el mismo protocolo del examen directo previamente descrito.

3.9.1.3 Coloración de Ziehl-Neelsen modificada

La coloración de Ziehl-Neelsen modificada es una técnica enfocada en la identificación de los protistas apicomplejos intestinales de mayor relevancia en salud humana: *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis* y *Cystoisospora belli* (Botero y Restrepo, 2012). La modificación con respecto a la coloración de Ziehl-Neelsen clásica, empleada convencionalmente para la coloración de micobacterias, consiste en que el colorante no se calienta.

En un portaobjetos se depositó una gota de solución salina al 0,85 % sobre la cual se realizó una extensión de aproximadamente 1 cm de largo y 0,5 cm de ancho con la ayuda de una espátula de madera impregnada con heces. La extensión se dejó secar a RT y luego se fijó sumergiendo el portaobjetos en metanol absoluto durante 5 min. A continuación, se cubrió completamente la extensión con fucsina fenicada en solución según Ziehl-Neelsen (Merck) durante 20 min y posteriormente se retiró la solución haciendo lavados con agua del grifo durante 2 min. Después se cubrió la extensión con ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 7,0 % (Merck) durante 1 a 2 min y se detuvo la decoloración realizando un lavado con agua del grifo durante 2 min. Como colorante de contraste se empleó azul de metileno en solución según Löffler (Merck), cubriendo completamente la extensión durante 3 min y retirándola posteriormente con agua de grifo durante 2 min. El portaobjetos con la extensión teñida se dejó secar a RT y se observó al microscopio óptico en 1.000x usando aceite de inmersión (Nikon Corp., Tokio, Japón).

3.9.1.4 Cultivo xénico en medio de Jones para *Blastocystis*

Una porción de las heces se tomó para realizar el cultivo xénico en medio de Jones específico para *Blastocystis*. Si bien originalmente el medio de Jones fue descrito para aislar y cultivar *Entamoeba* spp. (Jones, 1946), hoy en día es el medio de cultivo xénico más empleado para *Blastocystis*, en el que pueden crecer además otros microorganismos.

En el presente estudio se utilizó medio de Jones preparado con 2,65 g de hidrogenofosfato disódico dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), 0,41 g de dihidrogenofosfato de potasio (KH_2PO_4), 7,36 g de cloruro de sodio (NaCl) y 1 g de extracto de levadura en 950 ml de agua destilada y ajustado a pH 7,2. El medio se repartió en tubos cónicos de 15 ml a razón de 9,5 ml por tubo y se adicionaron 500 μl de suero fetal bovino (FBS) Sigma F7524 (MilliporeSigma, Burlington, EE. UU.). El tipo de suero empleado, FBS, constituye una modificación del protocolo original de Clark y Stensvold (2016), en el que se emplea suero de caballo. A cada tubo cónico con medio suplementado se añadió aproximadamente 200 mg de heces y se incubó en estufa a 37 °C durante una semana. Cada muestra de heces se cultivó por duplicado. Tras la semana de incubación, se tomó 1 ml del sedimento del cultivo con una pipeta Pasteur estéril, se observó una gota al microscopio óptico a 100× y 400× para identificar formas compatibles con *Blastocystis* y el volumen restante se transfirió a un nuevo tubo cónico de 15 ml con medio de Jones suplementado con FBS al 5,0 % para realizar un nuevo pase del cultivo. En total, se realizaron dos pases por cada muestra de heces de cada participante, en las condiciones antes descritas. En el último pase, en caso de que el cultivo fuera positivo a *Blastocystis*, ambos tubos cónicos de 15 ml se centrifugaron a 1.200 RCF durante 5 min y el sedimento se unificó en un mismo tubo cónico de 1,5 ml y se almacenó a –80 °C para su uso posterior. Los cultivos negativos a *Blastocystis* fueron inmediatamente descartados.

3.9.2 Entrega del informe de los análisis de heces por técnicas de microscopía y formulación médica

Todos los participantes del estudio recibieron un informe con los resultados del análisis de las heces obtenidos por las cuatro técnicas de microscopía anteriormente mencionadas.

En participantes positivos, a algunos de los agentes infecciosos analizados, adicionalmente al informe se entregó la prescripción médica con el antiparasitario requerido según cada caso. En general, en caso de blastocistosis se formuló tinidazol a razón de 2 g diarios

cada 12 horas durante dos días. En caso de presencia de amebas comensales, se propusieron recomendaciones generales para prevenir las infecciones por agentes parasitarios, entre las cuales se incluyeron: a) lavarse las manos antes de comer y después de ir al baño; b) hervir el agua de consumo en caso de tratarse de agua no potable; c) lavar con abundante agua limpia o hervida todo tipo de alimentos que se consumen en fresco o sin tratamiento térmico; d) usar calzado, y e) realizar un cocinado adecuado de la carne.

3.9.3 Extracción y purificación de DNA a partir de heces

La extracción de DNA a partir de heces se realizó empleando el kit comercial QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania). Una vez recibidas en el laboratorio, se pesaron entre 180 y 220 mg de heces en un tubo cónico de 2 ml. A continuación, se añadió 1 ml de tampón InhibitEX, se agitó en el mezclador de vórtice continuamente durante 1 min o hasta conseguir una mezcla homogénea y se calentó en un termobloque a 96 °C durante 10 min. Tras el calentamiento, la suspensión se centrifugó a 16.000 RCF durante 3 min. En un nuevo tubo cónico de 1,5 ml se añadieron 15 µl de proteinasa K, 200 µl del sobrenadante obtenido tras la centrifugación y 200 µl de tampón AL (lisis). La mezcla se agitó en el mezclador de vórtice continuamente durante 15 s y se calentó en un termobloque a 70 °C durante 10 min. Después del calentamiento, se añadió a la suspensión 200 µl de etanol absoluto y se homogenizó en el mezclador de vórtice. El volumen total de la suspensión se transfirió a una columna de centrifugación dispuesta sobre un tubo colector de 2 ml, se centrifugó a 16.000 RCF durante 1 min, se descartó el tubo colector y se dispuso la columna en un nuevo tubo colector de 2 ml. Se añadieron 500 µl de tampón AW1 (lavado) y se centrifugó a 16.000 RCF durante 1 min. Se descartó el tubo colector, se dispuso la columna en un nuevo tubo colector de 2 ml, se añadieron 500 µl de tampón AW2 (lavado) y se centrifugó a 16.000 RCF durante 3 min. Se descartó el tubo colector, se dispuso la columna en un nuevo tubo colector de 2 ml y se centrifugó a 16.000 RCF durante 1 min para eliminar cualquier resto de las soluciones tampón empleadas en la extracción. A continuación, se descartó el tubo colector y se dispuso la columna en un nuevo tubo colector de 2 ml. Se añadieron 200 µl de agua grado biología molecular directamente sobre la columna y se dejó a RT durante 5 minutos. Finalmente se centrifugó a 16.000 RCF durante 1 min y el extracto obtenido se transfirió en su totalidad a un tubo cónico de 1,5 ml libre de DNAsas y RNAsas para su almacenamiento a -20 °C hasta su uso posterior.

3.9.4 Detección y caracterización molecular de agentes parasitarios

La detección y caracterización molecular de los agentes parasitarios incluyó los protistas *Blastocystis*, *Cryptosporidium* spp., *D. fragilis*, *E. histolytica*, *E. dispar* y *G. duodenalis* y los microsporidios *Encephalitozoon* spp. y *E. bienewi*, estos últimos que de forma controvertida han sido clasificados cercanos a los hongos.

El procedimiento se llevó a cabo mediante protocolos específicos de ensayo de PCR a partir del DNA genómico extraído de las heces, incluyendo tanto ensayos de PCR convencional ya sea directa, anidada o semianidada, como de ensayos de RT-PCR, en función del patógeno analizado y el marcador genético usado.

El ensayo de PCR convencional se empleó para la detección molecular y la genotipificación de los parásitos *Blastocystis*, *Cryptosporidium* spp., *D. fragilis*, *Encephalitozoon* spp. y *E. bienewi*, y para la genotipificación de *G. duodenalis* (Tabla 8). Para todos los casos, la reacción contenía 1× MyTaq DNA Polymerase (Meridian Bioscience, Cincinnati, EE. UU.), entre 200 y 500 nanomolar (nM) de los cebadores según el caso, entre 1 y 5 µl de extracto de DNA y agua grado biología molecular hasta completar un volumen final de 25 ó 50 µl, según cada protocolo. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Applied Biosystems 2720 (Applied Biosystems) y las condiciones del ensayo de PCR se especifican en la Tabla suplementaria 2. En cada ensayo de PCR se incluyeron un control negativo, empleando agua grado biología molecular en lugar de DNA genómico, y un control positivo, empleando DNA genómico de muestras positivas confirmadas previamente en el laboratorio.

El ensayo de RT-PCR se empleó para la detección y diagnóstico diferencial de los parásitos intestinales *E. histolytica*, *E. dispar* y *G. duodenalis* (Tabla 8). La reacción contenía 1× TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), 200 nM de la sonda específica correspondiente, 500 nM de los cebadores, 3 µl del extracto de DNA y agua grado biología molecular hasta completar un volumen final de 25 µl. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Rotor-Gene Q Thermocycler (QIAGEN) y las condiciones del ensayo de PCR se especifican en la Tabla suplementaria 2. En cada ensayo de RT-PCR se incluyeron un control negativo, empleando agua grado biología molecular en lugar de DNA genómico, y dos controles positivos con diferente concentración conocida de DNA parasitario.

Tabla 8. Métodos y marcadores empleados para la detección y genotipificación de agentes parasitarios por técnicas moleculares.

Agentes parasitarios	Método de detección y marcador	Método de genotipificación y marcador
<i>Blastocystis</i>	PCR convencional directa (<i>ssu</i> -rRNA)	
<i>Cryptosporidium</i> spp.	PCR convencional anidada (<i>ssu</i> -rRNA)	PCR convencional anidada (<i>gp60</i>)
<i>Dientamoeba fragilis</i>	PCR convencional directa (<i>ssu</i> -rRNA)	
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	RT-PCR (<i>ssu</i> -rRNA)	NA
<i>Giardia duodenalis</i>	RT-PCR (<i>ssu</i> -rRNA)	PCR convencional anidada (<i>ssu</i> -rRNA) PCR convencional anidada (<i>bg</i>) PCR convencional semianidada (<i>gdh</i>) PCR convencional anidada (<i>tpi</i>)
<i>Encephalitozoon</i> spp.	PCR convencional directa (<i>ssu</i> -rRNA)	
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	PCR convencional anidada (ITS)	

bg, beta-giardina; *gdh*, glutamato deshidrogenasa; *gp60*, glicoproteína de 60 kDa; ITS, espaciador transcrito interno; NA, no aplicable; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; RT-PCR, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real; *ssu*-rRNA, subunidad menor del RNA ribosómico; *tpi*, triosa fosfato isomerasa.

3.9.4.1 *Blastocystis*

La detección molecular de *Blastocystis* se realizó mediante la amplificación de un fragmento del *ssu*-rRNA en un ensayo de PCR convencional con los cebadores RD5/BhRDr (Scicluna *et al.*, 2006). Las condiciones del ensayo de PCR se especifican en la Tabla suplementaria 2. En todas las muestras positivas a *Blastocystis*, el producto amplificado obtenido en este marcador se usó para realizar secuenciación Sanger (sección 3.9.10.1) y la totalidad de las muestras positivas (producto de amplificación del tamaño e intensidad esperado confirmado por secuenciación Sanger) y dudosas (producto de amplificación del tamaño esperado pero de poca intensidad y no confirmado por secuenciación Sanger) fueron confirmadas y se asignó el ST mediante NGS (sección 3.9.10.2) siguiendo el algoritmo diagnóstico descrito en la Figura 12.

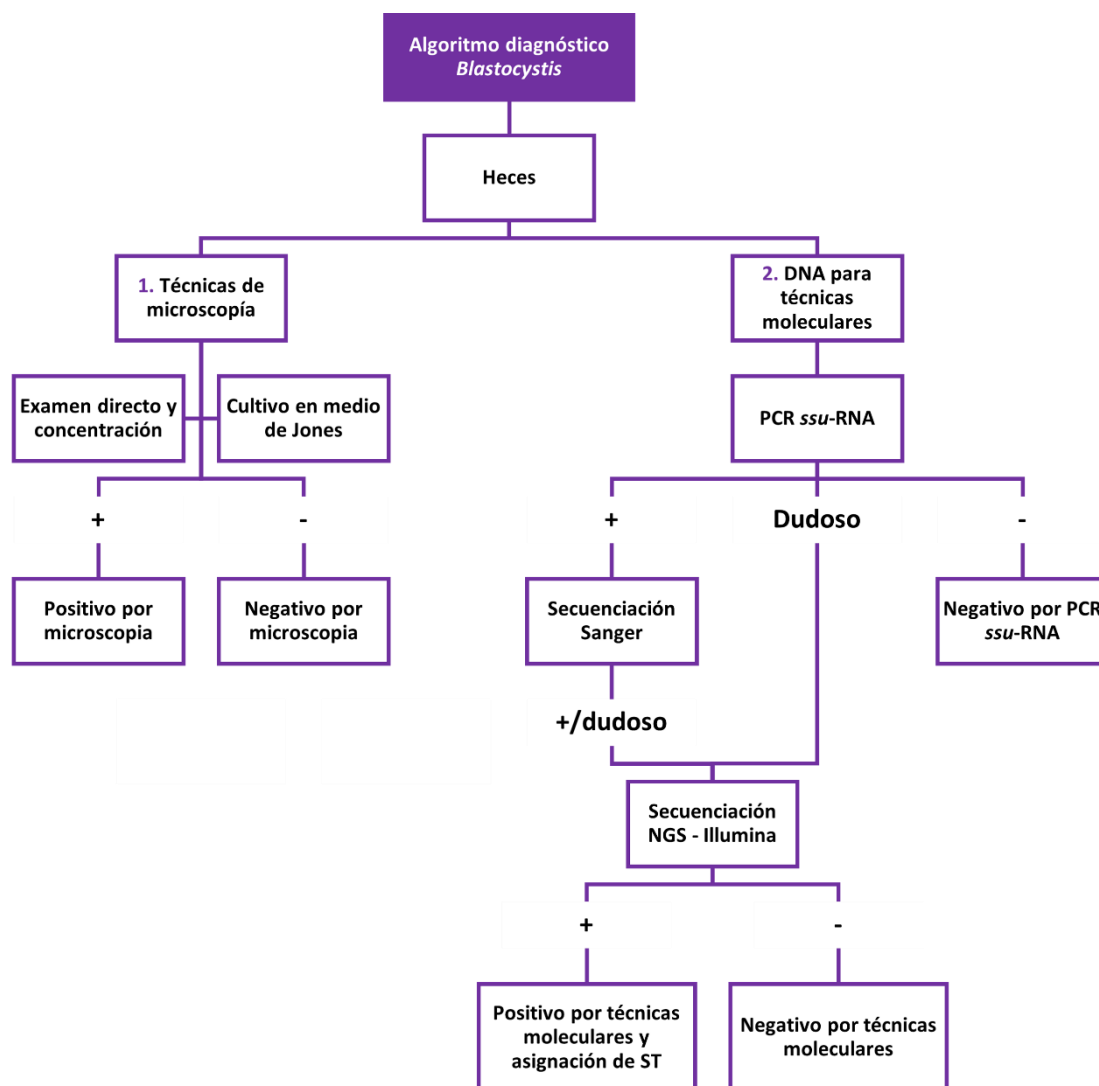


Figura 12. Algoritmo de diagnóstico empleado para la detección de *Blastocystis* por técnicas de microscopía y técnicas moleculares. PCR, reacción en cadena de la polimerasa; *ssu-RNA*, subunidad menor del RNA ribosómico; ST, subtipo.

3.9.4.2 *Cryptosporidium* spp.

La detección molecular de *Cryptosporidium* spp. se realizó mediante la amplificación de un fragmento del gen *ssu-rRNA* en un ensayo de PCR anidada con los cebadores CR-P1/CR-P2 para la primera reacción y CR-P3/CPB-DIAGR para la segunda reacción (Tiangtip y Jongwutiwes, 2002). Las condiciones del ensayo de PCR se especifican en la Tabla suplementaria 2. En todas las muestras positivas a *Cryptosporidium* spp., el producto amplificado obtenido en este marcador se usó para realizar secuenciación Sanger (sección 3.9.10.1) para la confirmación de género y especie.

En todas las muestras identificadas como *Cryptosporidium* spp. se procedió a su genotipificación mediante ensayo de PCR anidada para la amplificación del gen monocopia codificante de la glicoproteína de 60 kilodalton (kDa) conocida como *gp60*, compuesta por una primera reacción con los cebadores AL-3531/AL3535 y seguida de una segunda reacción con los cebadores AL3532/AL3534 (Feltus *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2003). Las condiciones del ensayo de PCR se especifican en la Tabla suplementaria 2. El producto amplificado obtenido en este marcador se usó para realizar secuenciación Sanger (sección 3.9.10.1) para la confirmación de género, especie y genotipos.

3.9.4.3 *Dientamoeba fragilis*

La detección molecular de *D. fragilis* se realizó mediante la amplificación del gen *ssu*-rRNA en un ensayo de PCR convencional con los cebadores DF400/DF1250 (Stark *et al.*, 2005). Las condiciones del ensayo de PCR se especifican en la Tabla suplementaria 2. En todas las muestras positivas a *D. fragilis* el producto amplificado obtenido en este marcador se usó para realizar secuenciación Sanger (sección 3.9.10.1) para la confirmación de género, especie y genotipos.

3.9.4.4 *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*

El diagnóstico diferencial de *E. histolytica* y *E. dispar* se realizó de forma simultánea mediante la amplificación del gen *ssu*-rRNA en un ensayo de RT-PCR múltiple con una sonda específica para *E. histolytica* y otra para *E. dispar* y con los cebadores Ehd-239F/Ehd-88R, comunes para ambas especies (Gutiérrez-Cisneros *et al.*, 2010; Verweij *et al.*, 2003a). En el caso particular de estos dos parásitos no se llevó a cabo la genotipificación de las muestras positivas. Las condiciones del ensayo de RT-PCR se especifican en la Tabla suplementaria 2.

3.9.4.5 *Giardia duodenalis*

La detección molecular de *G. duodenalis* se realizó mediante la amplificación de un fragmento del gen multicopia *ssu*-rRNA en un ensayo de RT-PCR con una sonda específica y con

los cebadores Gd-80F/Gd-127R (Verweij *et al.*, 2003b). Las condiciones del ensayo de RT-PCR se especifican en la Tabla suplementaria 2.

Todas las muestras positivas a *G. duodenalis* con valores de umbral de ciclo (C_T , del inglés *threshold cycle*) menores o iguales a 34 fueron reanalizadas para determinar el genotipo (*assemblage*) del parásito. La determinación del genotipo de *G. duodenalis* se realizó mediante ensayo de PCR anidada para la amplificación de un fragmento del gen *ssu*-rRNA usando las parejas de cebadores GiaF/GiaR y RH11/RH4 en la primera y segunda reacción, respectivamente (Appelbee *et al.*, 2003; Hopkins *et al.*, 1997). En caso de amplificaciones positivas, se prosiguió con la determinación del subgenotipo (*sub-assemblage*) mediante la amplificación de los genes monocopia beta-giardina (*bg*), glutamato deshidrogenasa (*gdh*) y triosa fosfato isomerasa (*tpi*). Para el marcador *bg* se empleó un ensayo de PCR anidada con los cebadores G7_F/G759_R para la primera reacción y G99_F/G609_R para la segunda reacción (Cacciò *et al.*, 2002; Lalle *et al.*, 2005). Para el marcador *gdh* se empleó un ensayo de PCR semianidada con los cebadores GDHe_F/GDHi_R para la primera reacción y GDHi_F/GDHi_R para la segunda reacción (Read *et al.*, 2004). Para el marcador *tpi* se empleó un ensayo de PCR anidada con los cebadores AL3543_F/AL3546_R para la primera reacción y AL3544_F/AL3545_R para la segunda reacción (Sulaiman *et al.*, 2003). Las condiciones de cada ensayo de PCR se especifican en la Tabla suplementaria 2. Los productos de amplificación obtenidos en los marcadores *ssu*-rRNA, *bg*, *gdh* y *tpi*, se usaron para realizar secuenciación Sanger (sección 3.9.10.1) para la confirmación de género, especie, *assemblage* y *sub-assemblage*.

3.9.4.6 *Encephalitozoon* spp. y *Enterocytozoon bieneusi*

La detección y caracterización molecular de *Encephalitozoon* spp. y *E. bieneusi* se llevó a cabo mediante protocolos específicos del ensayo de PCR convencional a partir del DNA genómico extraído de las heces (Tabla 8).

Para *Encephalitozoon* spp., se amplificó de un fragmento del gen *ssu*-rRNA en un ensayo de PCR convencional directa con los cebadores Micro_F/Micro_R (Fedorko *et al.*, 1995). Para *E. bieneusi* se amplificó el gen multicopia, espaciador transcrito interno (ITS), en un ensayo de PCR convencional anidada con los cebadores EBITS3/EBITS4 para la primera reacción y EBITS1/EBITS2.4 para la segunda reacción (Buckholt *et al.*, 2002). Las condiciones del ensayo de PCR se especifican en la Tabla suplementaria 2. En todas las muestras positivas a microsporidios

el producto amplificado obtenido en los marcadores *ssu*-rRNA o ITS se usó para realizar secuenciación Sanger (sección 3.9.10.1) para la confirmación de género, especie y genotipo.

3.9.5 Resolución de los ensayos de PCR convencional para la detección de agentes parasitarios

Los productos obtenidos en ensayos de PCR convencional de agentes parasitarios se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (D1 Media EEO Condalab, Madrid, España) con 0,002 % (% v/v) de CondaSafe (Condalab) en tampón TBE 0,5× a 140 V durante 40 min empleando 18 µl del producto amplificado y 2 µl de tampón de carga (sacarosa 40,0 %, *orange G* 0,2 % y cianol de xileno 0,0624 %) (*10X Orange G DNA Loading Buffer Recipe*, s. f.). En el primer pocillo de cada gel se cargaron 3 µl del marcador de peso molecular Biotools DNA Markers 100 bp Ladder (Biotools B&M Labs S.A., Madrid, España). Los geles se visualizaron en un transiluminador con luz ultravioleta y los productos amplificados que mostraron una banda única y bien definida del tamaño esperado, por comparación con el control positivo, se almacenaron a –20 °C hasta su uso posterior con fines de genotipificación.

3.9.6 Detección de agentes bacterianos

3.9.6.1 *Escherichia coli*

3.9.6.1.1 Ciclomodulina colibactina

La detección molecular de la ciclomodulina colibactina se realizó mediante la amplificación del gen *pks* en un ensayo de PCR convencional directa con los cebadores clbB-F/clbB-R (Canizalez-Roman *et al.*, 2021). La reacción contenía 2× DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific), 200 nM de cada cebador, 5 µl de extracto de DNA y agua grado biología molecular hasta completar un volumen final de 25 µl (Le Bouguénec *et al.*, 2001). Este ensayo de PCR se realizó en un termociclador Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems). En cada ensayo de PCR se incluyeron un control negativo, empleando agua grado biología molecular en lugar de DNA genómico, y un control positivo, empleando DNA genómico de muestras positivas confirmadas previamente en el laboratorio. Las condiciones del ensayo de PCR se especifican en la Tabla suplementaria 2. En todas las muestras positivas a colibactina

MATERIALES Y MÉTODOS

(*E. coli psk+*) el producto amplificado obtenido del gen *psk* se usó para realizar secuenciación Sanger (sección 3.9.10.1) para su confirmación.

3.9.6.1.2 Patotipos de *Escherichia coli* diarreagénica (DEC)

La detección molecular de los patotipos DEC se realizó mediante cuatro ensayos de RT-PCR múltiple para la detección de EAEC, STEC, ETEC, EIEC y EPEC y un ensayo de PCR convencional directa para la detección de DAEC.

Los ensayos de RT-PCR se realizaron en un termociclador CFX Opus 96 Real-Time PCR (Biorad Laboratories, Hercules, EE. UU.). En cada ensayo de RT-PCR se incluyeron un control negativo, empleando agua grado biología molecular en lugar de DNA genómico, un control positivo, empleando DNA genómico de muestras positivas confirmadas previamente en el laboratorio y un control interno de amplificación formado por 170 copias del plásmido comercial DNA pUC19 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.), 40 µM de la sonda control y 100 µM de cada cebador IAC_F/IAC_R, de acuerdo con Fricker *et al.* (2007).

Para los ensayos de RT-PCR múltiple (M4 a M7) (Tabla 9), cada reacción contenía 2× SsoAdvanced Universal Probes Supermix (Biorad Laboratories), 200 nM de las sondas específicas, 500 nM de cada uno de los cebadores correspondientes, 2 µl del extracto de DNA y agua grado biología molecular hasta completar un volumen final de 20 µl. Las condiciones del ensayo de RT-PCR se especifican en la Tabla suplementaria 2.

Tabla 9. Dianas y fluoróforos empleados para la detección de patotipos de *Escherichia coli* diarreagénica.

RT-PCR múltiple	Patotipo DEC	Diana	Fluoróforo	Referencia
M4	EAEC	<i>aatA</i>	FAM	Hahn <i>et al.</i> (2017)
	EAEC	<i>aaiC</i>	HEX	Istituto Superiore di Sanità (2013a)
	EAEC	<i>aggR</i>	ROX	
M5	STEC	<i>stx1</i>	FAM	Istituto Superiore di Sanità (2013d)
	STEC	<i>stx2</i>	HEX	
	STEC	<i>stx2f</i>	ROX	Istituto Superiore di Sanità (2017)
M6	ETEC	<i>lt</i>	FAM	Istituto Superiore di Sanità (2013c)
	ETEC	<i>sth</i>	HEX	
	ETEC	<i>stp</i>	ROX	

RT-PCR múltiple	Patotipo DEC	Diana	Fluoróforo	Referencia
M7	EIEC	<i>ipaH</i>	FAM	Istituto Superiore di Sanità (2013b)
	EPEC	<i>bfpA</i>	HEX	Liu <i>et al.</i> (2016)
	EPEC	<i>eae</i>	ROX	Istituto Superiore di Sanità (2013a)

aaIC, type VI secretion protein (gene); *aatA*, dispersin transporter protein (gene); *aggR*, AraC transcriptional activator (gene); *bfpA*, bundle-forming pilus (gene); DEC, *Escherichia coli* diarreaagénica; *eae*, intimin (gene); EAEC, *Escherichia coli* enteroagregativa; EIEC, *Escherichia coli* enteroinvasiva; EPEC, *Escherichia coli* enteropatogénica; ETEC, *Escherichia coli* enterotoxigénica; FAM, amiditas de fluoresceína; HEX, hexacloro de fluoresceína; *ipaH*, invasion plasmid antigen (gene); *lt*, heat-labile enterotoxin (gene); ROX, Carboxi-X-rodamina; RT-PCR, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real; STEC, *Escherichia coli* productora de toxina Shiga; *sth*, heat-stable enterotoxin human variant (gene); *stp*, heat-stable enterotoxin porcine variant (gene); *stx1*, Shiga toxin 1 (gene); *stx2*, Shiga toxin 2 (gene); *stx2f*, Shiga toxin 2f variant (gene).

En el ensayo de PCR convencional para el patotipo DAEC se llevó a cabo la amplificación del gen *afaC* (*afimbrial adhesin C gene*) con los cebadores afa-F/afa-R (Le Bouguénec *et al.*, 2001). Las condiciones del ensayo de PCR convencional empleadas fueron las mismas usadas para la ciclomodulina colibactina y se especifican en la Tabla suplementaria 2. En todas las muestras positivas al patotipo DAEC, el producto amplificado obtenido del gen *afaC* se usó para realizar secuenciación Sanger para su confirmación (sección 3.9.10.1).

3.9.6.2 *Streptococcus gallolyticus* y *Morganella morganii*

En un ensayo de RT-PCR múltiple (M8) (Tabla 10), se realizó la detección molecular de *S. gallolyticus* subespecie *gallolyticus* (SGG), *S. gallolyticus* subespecie *pasteurianus* (SGP) y *M. morganii*, empleando el mismo protocolo descrito para la detección molecular de los patotipos DEC mediante ensayos de RT-PCR múltiple. Las condiciones del ensayo de RT-PCR se especifican en la Tabla suplementaria 2.

Tabla 10. Dianas y fluoróforos empleados para la detección de *Streptococcus gallolyticus* subespecie *gallolyticus*, *Streptococcus gallolyticus* subespecie *pasteurianus* y *Morganella morganii*.

RT-PCR múltiple	Bacteria entérica	Diana	Fluoróforo	Referencia
M8	<i>S. gallolyticus</i> subespecie <i>gallolyticus</i>	SGG	FAM	Lopes <i>et al.</i> (2014)
	<i>S. gallolyticus</i> subespecie <i>pasteurianus</i>	SGP	HEX	
	<i>M. morganii</i>	<i>M. morganii</i>	ROX	Fukumoto <i>et al.</i> (2015)

FAM, amiditas de fluoresceína; HEX, hexacloro de fluoresceína; ROX, Carboxi-X-rodamina; RT-PCR, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real; SGG, *Streptococcus gallolyticus* subespecie *gallolyticus*; SGP, *Streptococcus gallolyticus* subespecie *pasteurianus*.

3.9.7 Resolución de los ensayos de PCR convencional para la detección de agentes bacterianos

Los productos obtenidos en los ensayos de PCR convencional para la ciclomodulina colibactina y la detección de DAEC se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (D1 Media EEO Condalab, Madrid, España) al 1,8 % con 1× SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Scientific) en tampón TAE 1× (40 mM tris acetato y 2 mM Na₂EDTA · 2H₂O pH 8,5) (Moore, 2001) a 100 V durante 30 min empleando directamente 8 µl del producto amplificado. En el primer pocillo de cada gel se cargaron 3 µl del marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Los geles se visualizaron en un transiluminador con luz ultravioleta y los productos amplificados que mostraron una banda única y bien definida del tamaño esperado, por comparación con el control positivo, se almacenaron a -20 °C hasta su confirmación definitiva mediante secuenciación Sanger (sección 3.9.10.1).

3.9.8 Aislamiento de cepas de patotipos de *Escherichia coli* diarreagénica en muestras de heces positivas

Las muestras de heces en cuyo extracto de DNA se obtuvo un resultado positivo a alguno de los seis patotipos DEC se cultivaron para llevar a cabo el aislamiento de la(s) cepa(s) DEC presente(s) en la muestra. Para ello, un hisopo impregnado de heces se introdujo en 9 ml de caldo triptona soja (TSB) (Becton, Dickinson and Company) y se incubó a 37 °C durante 18 h. Una

vez realizado este enriquecimiento no selectivo, el cultivo en TSB se subcultivó en placas de agar triptona soja (TSA) (Becton, Dickinson and Company) y agar MacConkey (MAC) (Becton Dickinson and Company), los cuales fueron incubados a 37 °C durante 18 h. La siembra en placa se realizó por agotamiento con objeto de obtener colonias aisladas.

Tras la incubación, a partir del cultivo en TSA se recogió el crecimiento equivalente a un asa de siembra de 1 µl de la zona de crecimiento confluyente y en un tubo cónico de 2 ml se suspendió en 0,7 ml de agua destilada estéril. La suspensión se calentó a 100 °C en un termobloque durante 5 min y se centrifugó a 16.000 RCF durante 5 min. El sobrenadante se empleó directamente como DNA molde para repetir el ensayo de PCR que hubiera resultado positivo a partir del extracto de DNA obtenido a partir de heces.

En caso de obtener un resultado positivo a partir del confluyente del cultivo en TSA se recurrió al cultivo en MAC para seleccionar entre 10 y 20 colonias aisladas morfológicamente compatibles con colonias de *E. coli*, que se subcultivaron en placas de TSA a 37 °C durante 18 h, incluyendo 10 colonias por placa. A partir de cada colonia creciendo individualmente en TSA, se recogió el crecimiento equivalente a un asa de siembra de 1 µl y en un tubo cónico de 2 ml se suspendió en 0,7 ml de agua destilada estéril. La suspensión se calentó a 100 °C en un termobloque durante 5 min y se centrifugó a 16.000 RCF durante 5 min. El sobrenadante se empleó directamente como DNA molde para repetir el ensayo de PCR que hubiera resultado positivo a partir del crecimiento confluyente, primero de forma conjunta en grupos de cinco colonias y posteriormente, en caso positivo, de forma individual. Los productos obtenidos en los ensayos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa de acuerdo con la metodología descrita anteriormente en la sección 3.9.7.

En el caso de que ninguna de las 20 colonias seleccionadas y evaluadas hubiera resultado positiva se consideró la muestra como “positiva sin aislamiento”. Igualmente, en el caso de que hubiera resultado negativo el ensayo de PCR a partir del crecimiento confluyente, no se procedió a la selección de colonias y se consideró la muestra como “positiva sin aislamiento”. Finalmente, los aislados DEC obtenidos se conservaron a –20 °C en criotubos con leche desnatada al 10,0 % en agua (Scharlab, Barcelona, España) para posteriormente estudiar la presencia de ciclodulinas en los aislados de cada patotipo DEC.

3.9.8.1 Detección de ciclomodulinas en aislados DEC

Los aislados DEC obtenidos y conservados a -20°C se sembraron en TSA y se incubaron a 37°C durante 18 h. Tras la incubación, se recogió el crecimiento equivalente a un asa de siembra de 1 μl de la zona de crecimiento confluyente y en un tubo cónico de 2 ml se suspendió en 0,7 ml de agua destilada estéril. La suspensión se calentó a 100°C en un termobloque durante 5 min y se centrifugó a 16.000 RCF durante 5 min. El sobrenadante se empleó directamente como DNA molde para la amplificación específica de los genes *pks*, *cif*, *cnf* y *cdt*, en cuatro ensayos de PCR convencional directa con los cebadores clbB-F/clbB-R (Canizalez-Roman *et al.*, 2021), cif-int-s/cif-int-as (Canizalez-Roman *et al.*, 2021), CNF-s/CNF-as (Tóth *et al.*, 2003) y CDT-s1/CDT-s2/CDT-as1/CDT-as2 (Tóth *et al.*, 2003), respectivamente. Las condiciones del ensayo de PCR convencional empleadas fueron las mismas usadas para el patotipo DAEC y se especifican en la Tabla suplementaria 2. Los productos obtenidos en los ensayos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa de acuerdo con la metodología descrita anteriormente en la sección 3.9.7.

3.9.9 Aislamiento de *Morganella morganii* en muestras positivas

Las muestras de heces en cuyo extracto de DNA se obtuvo un resultado positivo a *M. morganii* se cultivaron para llevar a cabo el aislamiento de la cepa presente en la muestra. Para ello, un hisopo impregnado de heces se sembró directamente en MAC a 37°C durante 18 h. La siembra en placa se realizó por agotamiento con objeto de obtener colonias aisladas. Tras la incubación, a partir del crecimiento en MAC se seleccionaron colonias aisladas pequeñas y no fermentadoras de la lactosa, morfológicamente compatibles con colonias de *M. morganii*, que se subcultivaron en placas de TSA a 37°C durante 18 h, incluyendo entre 5 y 10 colonias por placa. A partir de cada colonia creciendo individualmente en TSA, se recogió el crecimiento equivalente a un asa de siembra de 1 μl y se suspendió en 0,7 ml de agua destilada estéril. La suspensión se calentó a 100°C en un termobloque durante 5 min y se centrifugó a 16.000 RCF durante 5 min. El sobrenadante se empleó directamente como DNA molde para la amplificación del gen 16S rRNA en un ensayo de PCR convencional directa con los cebadores fd1/rP2 (Marín *et al.*, 2012), seguido de la secuenciación Sanger (sección 3.9.10.1) del producto amplificado, cuyo análisis permitió la identificación definitiva de cada aislado como *M. morganii*.

En el caso de que no hubiera colonias compatibles con *M. morganii* en el crecimiento en MAC o que ninguna de las colonias compatibles seleccionadas se identificara finalmente como *M. morganii* se consideró la muestra como “positiva sin aislamiento”. Finalmente, los aislados identificados como *M. morganii* se conservaron a -20°C en viales con leche desnatada al 10,0 % en agua (Scharlab) de cara a una caracterización posterior de los mismos.

3.9.10 Técnicas de secuenciación

3.9.10.1 Secuenciación de primera generación (Secuenciación Sanger)

En determinados ensayos de PCR convencional referidos anteriormente, los productos amplificados se sometieron a una secuenciación de primera generación o secuenciación Sanger, para confirmar definitivamente el resultado obtenido y/o para proceder a la genotipificación de muestras positivas. Este método de secuenciación emplea electroforesis capilar y marcaje con fluorocromos utilizando la química BigDye Terminator (Applied Biosystems) en un secuenciador de DNA automático ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems). El ensayo fue realizado en la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III en Majadahonda, España.

Los productos de amplificación obtenidos en los ensayos de PCR para detección y caracterización molecular de agentes parasitarios (sección 3.9.4) siguieron el siguiente procesado previo a su envío para secuenciación Sanger: primero se realizó una dilución 1:50 con agua grado biología molecular y luego se preparó separadamente una mezcla que incluyó 1,2 μl del producto de amplificación diluido 1:50, 2 μl del cebador sentido implicado en concentración 10 μM y agua grado biología molecular hasta completar un volumen final de 10 μl . Esta misma mezcla se repitió incluyendo el cebador antisentido.

Los productos de amplificación obtenidos en los ensayos de PCR para la detección de la ciclodulina colibactina y del patotipo DAEC (secciones 3.9.6.1.1 y 3.9.6.1.2, respectivamente) siguieron el siguiente procesado previo a su envío para secuenciación Sanger: primero se realizó un paso de purificación mezclando 2 μl del producto de amplificación y 5 μl de ilustra ExoProStar 1-Step (MilliporeSigma) y sometiendo la mezcla a 37°C y luego a 80°C durante 15 min a cada temperatura en un termociclador Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems). A continuación, se preparó una mezcla que incluyó 1 μl del producto de amplificación purificado, 1,2 μl del cebador sentido implicado en concentración 10 μM y agua

grado biología molecular hasta completar un volumen final de 10 µl. Esta misma mezcla se repitió incluyendo el cebador antisentido.

Los datos crudos obtenidos de las secuencias generadas en ambos sentidos fueron inspeccionados visualmente usando el programa libre de análisis de secuencias Chromas versión 2.6.6 (Technelysium Pty Ltd., South Brisbane, Australia). Se prestó especial atención a la presencia de posiciones ambiguas (dobles picos) en el cromatograma, indicativos de posibles coinfecciones. Tras ser editadas y validadas, las secuencias se copiaron en el programa libre MEGA versión 11.0.8 (Tamura *et al.*, 2021), se alinearon y se generó la secuencia consenso que se usó para determinar la homología existente entre la secuencia nucleotídica obtenida y las depositadas previamente en la base de datos del repositorio público GenBank en la herramienta BLAST del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Bethesda, EE. UU.). Esta herramienta permitió identificar especies, genotipos y subgenotipos, así como la presencia y frecuencia de SNP tanto en forma de posiciones ambiguas (dobles picos) como de mutaciones, inserciones o deleciones en la secuencia nucleotídica. En el caso concreto de *Blastocystis*, además de GenBank se usó la base de datos PubMLST.

En caso de obtener secuencias de calidad insuficiente, se repitió el ensayo de PCR, en algunos casos aumentando incluso la cantidad de DNA molde empleado, y se procedió a secuenciar el nuevo producto de amplificación siguiendo la metodología previamente descrita. En caso de que, una vez más, se obtuvieran secuencias de calidad insuficiente o que la secuencia obtenida no se correspondiera con el producto esperado en el ensayo de PCR en cuestión, finalmente la muestra se consideró negativa (secuencia legible pero inespecífica) o no tipable (secuencia ilegible).

3.9.10.2 Secuenciación de nueva generación (NGS): segunda generación (Illumina) y tercera generación (Oxford Nanopore)

3.9.10.2.1 Secuenciación de segunda generación (Illumina)

Blastocystis

En el caso de *Blastocystis*, la secuenciación de segunda generación con la metodología de Illumina se empleó para asignar el(los) ST presentes, identificar ST subrepresentados y variantes intrasubtipo en la población presente en coinfección. El ensayo fue realizado en el

Laboratorio de Seguridad Alimentaria y Microbios Ambientales del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) en Maryland, Estados Unidos.

Para todos los casos, se amplificó un fragmento aproximado de 500 bp del gen *ssu*-rRNA mediante ensayo de PCR usando los cebadores ILMN_Blast505_532F (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGAGGTAGTGACAATAAATC-3') y ILMN_Blast998_1017R (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGCTTTCGCACTTGTTTCATC-3') incluyendo en su extremo 5' los adaptadores necesarios para garantizar su compatibilidad con los adaptadores de índices y de secuenciación de Illumina (Santín *et al.*, 2011). Los productos obtenidos (librerías) se cuantificaron en un fluorímetro Qubit 4 (Invitrogen, Waltham, EE. UU.), se normalizaron ajustándose su concentración a 8 pM con un 20,0 % de control PhiX y se mezclaron para llevar a cabo finalmente la secuenciación en la plataforma MiSeq empleando el kit MiSeq Reagent Kit v3 de 600 ciclos (Illumina, San Diego, EE. UU.). Las lecturas pareadas obtenidas se procesaron y analizaron empleando diferentes herramientas bioinformáticas de acuerdo con una cadena de procesamiento propia (Maloney *et al.*, 2019a, 2019b).

Morganella morganii

En el caso de *M. morganii*, la secuenciación de segunda generación con la metodología de Illumina se empleó para determinar el genoma completo de los aislados obtenidos. El ensayo fue realizado en la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III en Majadahonda, España.

El DNA genómico de los aislados fue extraído y purificado empleando el kit comercial NZY Tissue gDNA Isolation Kit (NZYTech, Lisboa, Portugal) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los extractos obtenidos se cuantificaron en un fluorímetro Quantus (Promega, Madison, EE. UU.) y se procedió a la preparación de librerías empleando el kit Illumina DNA Prep (Illumina) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, la secuenciación de las librerías se llevó a cabo en la plataforma NextSeq 500 empleando el kit NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 de 300 ciclos (Illumina). Los datos de secuenciación obtenidos se procesaron y analizaron empleando diferentes herramientas bioinformáticas de acuerdo con una cadena de procesamiento propia (Llorente *et al.*, 2023).

3.9.10.2 Secuenciación de tercera generación (Oxford Nanopore)

La secuenciación nucleotídica completa del gen *ssu*-rRNA de *Blastocystis* en aquellas muestras positivas al protista y sospechosas de pertenecer a ST infrecuentes o no previamente descritos, se llevó a cabo la secuenciación de tercera generación con la metodología de Oxford Nanopore (Maloney *et al.*, 2020b). El ensayo fue realizado en el Laboratorio de Seguridad Alimentaria y Microbios Ambientales del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) en Maryland, Estados Unidos.

Para todos los casos, se llevaron a cabo reacciones de amplificación mediante ensayo de PCR usando los cebadores MinION-tailed directa (5'–TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCAACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTC–3') y MinION-tailed reversa (5'–ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTCTGTCCTTCTGCAGGTTACCTACG–3') incluyendo en su extremo 5' los correspondientes adaptadores. Los productos obtenidos se cuantificaron en un fluorímetro Qubit 4 y se procedió a la preparación de librerías empleando los kits Ligation Sequencing kit V12 (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido) y ensayo de PCR Barcoding Expansion 1-12 (Oxford Nanopore Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, la secuenciación de las librerías se llevó a cabo en la plataforma MinION empleando el kit Flow Cell (R10.4.1) (Oxford Nanopore Technologies). Los datos de secuenciación obtenidos se procesaron y analizaron empleando diferentes herramientas bioinformáticas de acuerdo con una cadena de procesamiento propia (Maloney *et al.*, 2020b).

3.9.11 Construcción de árboles filogenéticos

En el caso de *Blastocystis*, se realizaron árboles filogenéticos a partir de las secuencias nucleotídicas obtenidas, incorporando secuencias de referencia y secuencias apropiadas para fines comparativos obtenidas de GenBank. Las secuencias fueron alineadas con ClustalW en el programa MEGA versión 11.0.8 (Tamura *et al.*, 2021) a partir del cual se construyó un árbol filogenético usando el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) aplicando el modelo de Kimura con 2 parámetros (Kimura, 1980) con un *bootstrap* de 1.000 repeticiones (Felsenstein, 1985). Este algoritmo se basa en el criterio de mínima evolución, en el que el mejor árbol es aquel que minimiza la longitud de las ramas internas, y donde la longitud indica la cantidad de cambio evolutivo. El árbol filogenético resultante fue enraizado con la secuencia de

Proteromonas lacertae (un estramenópilo cercano a *Blastocystis*) como *outgroup* y el árbol fue anotado con la herramienta iTOL 6.6 (Letunic y Bork, 2019).

En el caso de *M. morganii*, los genomas completos obtenidos en este estudio se compararon con 35 genomas diferentes disponibles en GenBank mediante un análisis de SNP realizado con la herramienta Snippy 4.6.0 (disponible en: <https://github.com/tseemann/snippy>) y usando como genoma de referencia la cepa AR_0057 (Tabla suplementaria 3). Los SNP identificados en el análisis comparativo de todos los genomas disponibles se emplearon para realizar un análisis de *cluster* con la herramienta IQ-TREE 2.1.4 (Minh *et al.*, 2020) a partir del cual se construyó un árbol filogenético usando el método de máxima verosimilitud aplicando el modelo Kimura 3 parámetros desigual con distribución F e invariantes (K3Pu+F+I) con un *bootstrap* de 1.000 repeticiones. El árbol filogenético resultante fue enraizado en el punto medio y anotado con la herramienta iTOL 6.6 (Letunic y Bork, 2019).

3.9.12 Criterios para la asignación de nuevos subtipos de *Blastocystis*

Aunque no se ha adoptado de forma universal, se ha sugerido que las nuevas designaciones de ST de *Blastocystis* solo se establezcan si se ha generado una secuencia casi completa del gen *ssu-rRNA* (> 80 %) y se ha demostrado que cumple un determinado umbral de divergencia con respecto al resto de secuencias completas de referencia (Stensvold y Clark, 2020). Para evaluar el grado de divergencia se llevó a cabo un análisis de distancias por pares aplicando el modelo de Kimura con 2 parámetros en el programa MEGA versión 11.0.8 (Kimura, 1980). En cuanto al umbral de divergencia empleado, aunque no existe un consenso generalizado, el criterio aplicado en esta tesis doctoral para considerar la asignación de un nuevo ST fue una divergencia igual o superior al 2 %, tal y como sugieren algunos estudios de este tipo publicados recientemente (Figueiredo *et al.*, 2025a; Santin *et al.*, 2024).

3.10 Análisis estadístico

3.10.1 Control de sesgos

Este estudio consideró como posibles fuentes de error sistemático los sesgos de selección, medición e información. Con el fin de controlarlos, se adoptaron las siguientes medidas:

- a) Selección de los participantes en los centros hospitalarios siguiendo las recomendaciones de la guía de práctica clínica (GPC) colombiana para la detección temprana, diagnóstico, tratamiento, seguimiento y rehabilitación de pacientes con diagnóstico de cáncer de colon y recto (Ministerio de Salud y Protección Social, 2013).
- b) Aplicación estricta de los criterios de inclusión y exclusión del estudio y entrenamiento de los miembros del equipo investigador para la verificación previa de los criterios en la inclusión de los participantes en el estudio.
- c) Reunión de los miembros del equipo investigador y del personal sanitario en los centros hospitalarios encargados del contacto inicial con los pacientes, con el fin de estandarizar los procedimientos para el estudio.
- d) Anonimización de muestras y datos recolectados de los participantes.
- e) Estandarización en los procedimientos para la toma, recolección, transporte, procesamiento y almacenamiento de muestras y la interpretación de los resultados.
- f) Entrenamiento y unificación de criterios entre los miembros del equipo investigador para la recolección de datos en la ECE, que fue completada directamente en un dispositivo móvil con enlace directo a la base de datos en formato .csv, eliminando de esta forma el sesgo de digitación y facilitando la recolección de información y la confidencialidad de los datos.

3.10.2 Plan de análisis

Una vez estimado el componente genético ancestral individual y poblacional, y conociendo que la población de estudio tenía un origen genético similar, se realizaron los diferentes análisis estadísticos necesarios en cada sección.

Para evaluar el grado de asociación de las diferentes variables de la ECE (sociodemográficas, hábitos de consumo) y la presencia de microorganismos en relación con

CRC, se calcularon distribuciones de frecuencia y sus respectivos porcentajes en el caso de las variables cualitativas. Para las variables cuantitativas, se evaluó el supuesto de normalidad, el cual se verificó mediante la prueba de Shapiro-Wilk, este tipo de variable se representó por medio de estadísticos descriptivos de resumen, media ($\bar{X}$) y desviación estándar (SD, del inglés *standard deviation*). En el caso de que no se cumpliera el supuesto de normalidad, se informaron la mediana y su respectivo rango intercuartílico (IQR). Así mismo, se determinó la razón de probabilidad (OR, del inglés *odds ratio*) y su respectivo intervalo de confianza al 95,0 % (IC 95 %) entre el grupo CRC y el grupo No CRC con cada una de las variables de la ECE. La asociación pudo evaluarse mediante la prueba de Chi cuadrado de Pearson (X^2), al contar con un tamaño de muestra suficiente ($n = 308$). Además, se efectuó de manera exploratoria, un análisis de las variables medidas en escala numérica en aquellos casos en que se cumplieron los supuestos de normalidad y/o homocedasticidad mediante la prueba t de Student.

Las variables identificadas en el análisis bivariado como potenciales de confusión, con valores $p < 0,25$, y/o que por plausibilidad biológica debían incluirse en el análisis, fueron usadas en una regresión logística condicional binaria múltiple por el método ENTER (*Backward*), con el propósito de evaluar la asociación de las diferentes variables independientes (clínico-epidemiológicas) en relación con CRC. Se evaluó el ajuste del modelo por medio de la razón de verosimilitud y finalmente se estimó el porcentaje de explicación del cambio en relación con la variable mediante la prueba de Nagelkerke.

Para evaluar la asociación de los distintos SNP analizados en relación con CRC, se determinó la frecuencia y la asociación alélica de los 10 SNP, se calcularon frecuencias, OR y valor p con una significancia del 95,0 %. Se estimó el equilibrio HW con el propósito de establecer que la población no estaba siendo afectada por factores evolutivos como la selección natural o la deriva genética, que tenía un emparejamiento aleatorio y que la frecuencia de los alelos y genotipos permanecían constantes a través de las generaciones (Mayo, 2008).

De igual forma, dada la existencia de antecedentes de asociación del grupo étnico y CRC, se determinó la frecuencia y la asociación alélica de los 21 AIM, se calcularon frecuencias, OR y valor p con una significancia del 95,0 %. Además, se determinó la frecuencia y asociación genotípica en aquellos AIM que mostraron diferencia estadísticamente significativa, para los cuales se empleó una regresión logística con el programa SNPStats (disponible en: <https://www.snpstats.net/>), que evaluó los modelos de herencia: codominante, dominante y recesivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para determinar la concordancia entre las diferentes técnicas diagnósticas empleadas en *Blastocystis*, se calculó el índice kappa (k). El valor de k oscila entre 0,0 y 1,0, de tal manera que, cuanto más cercano sea a 1,0, mayor será el grado de concordancia, mientras que un valor igual a 0,0, refleja que la concordancia observada se debe exclusivamente del azar (Cerdeira L y Villarroel Del P, 2008). La interpretación del valor k se realiza asignando una escala cualitativa de concordancia que incluye seis categorías: pobre ($k = 0,00$), leve ($k = 0,01$ a $0,20$), aceptable ($k = 0,21$ a $0,40$), moderada ($k = 0,41$ a $0,60$), considerable ($k = 0,61$ a $0,80$) y casi perfecta ($k = 0,81$ a $1,00$) (Landis y Koch, 1977).

Los análisis anteriormente referidos se llevaron a cabo con el programa estadístico SPSS versión 27 (International Business Machines Corporation - IBM, Nueva York, EE. UU.). Se utilizó una significancia del 95,0 %, es decir, un error tipo I (α) igual al 5,0 %, considerándose estadísticamente significativo un valor p menor o igual a 0,05.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Población de estudio

El reclutamiento de participantes se realizó entre septiembre de 2021 y junio de 2023. Se contactaron por vía telefónica o presencial aproximadamente 1.500 personas para incluir finalmente 338 participantes, lo que resultó en una participación cercana a 1 de cada 4 contactados. Como se observa en la Tabla 11, el mayor porcentaje de participantes fue proporcionado por los centros hospitalarios Clínica Medellín de Occidente (39,3 %, 133/338) y Clínica Las Américas (37,0 %, 125/338).

Tabla 11. Cantidad de participantes del grupo con y sin cáncer colorrectal reclutados en cada centro hospitalario del estudio.

Centro hospitalario	Grupo CRC <i>n</i>	Grupo No CRC <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
Clínica El Rosario	2	0	2
Clínica Las Américas	28	97	125
Clínica Medellín de Occidente	54	79	133
Hospital Alma Mater de Antioquia	57	1	58
Hospital San Vicente Fundación	12	0	12
Contactos personales	1	7	8
TOTAL	154	184	338

CRC, cáncer colorrectal.

Aunque el estudio consiguió incluir un total de 338 participantes, como se ha indicado anteriormente, no todos pudieron ser pareados por sexo y edad para realizar los análisis estadísticos de asociación, dada la dificultad para incluir participantes del grupo CRC. En concreto, se pudieron parrear 154 participantes del grupo CRC con otros tantos del grupo No CRC, por lo que los análisis estadísticos de asociación, en todas las variables genéticas, ambientales y microbiológicas sometidas a estudio, se llevaron a cabo con un total de 308 participantes pareados por sexo y edad, salvo en aquellas variables en las que no se disponía de información en alguno de los participantes pareados, en cuyo caso se indicará convenientemente. Los valores *p* obtenidos en las variables sexo (*p* = 1,000) y edad (*p* = 0,055) evidencian que el pareamiento entre los grupos fue efectivo. Es importante destacar que los restantes 30 participantes, aunque no fueron considerados para el análisis estadístico de

RESULTADOS

asociación, sí lo fueron para los restantes análisis. La Tabla 12 muestra la distribución de participantes del grupo CRC y No CRC por centro hospitalario después de parear por sexo y edad.

Tabla 12. Cantidad de participantes del grupo con y sin cáncer colorrectal reclutados después de parear por sexo y edad en cada centro hospitalario del estudio.

Centro hospitalario	Grupo CRC <i>n</i>	Grupo No CRC <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
Clínica El Rosario	2	0	2
Clínica Las Américas	28	86	114
Clínica Medellín de Occidente	54	60	114
Hospital Alma Mater de Antioquia	57	1	58
Hospital San Vicente Fundación	12	0	12
Contactos personales	1	7	8
TOTAL	154	154	308

CRC, cáncer colorrectal.

4.2 Estimación del componente genético ancestral individual y poblacional

Del total de participantes pareados del estudio, 12 participantes del grupo CRC no fueron incluidos en los análisis de estimación del componente genético ancestral, debido a que el DNA extraído a partir de sus muestras de SP no cumplía con los criterios de calidad establecidos en la sección 3.6.3. Por ello, los resultados que se muestran en esta sección corresponden a un total de 296 participantes: 142 en el grupo CRC y 154 en el grupo No CRC. Adicionalmente, el número de participantes en el grupo CRC y No CRC con resultado para cada AIM estudiado pudo variar debido a que, en algunos participantes, no se obtuvo amplificación en alguno de los AIM, a pesar de que, en todos estos casos, se repitió el procedimiento siguiendo la metodología descrita en la sección 3.6.4.

La media de la composición genética poblacional fue: EUR 66,5 %, NAM 22,9 % y AFR 10,7 %, según lo esperado en población colombiana. En la Tabla 13 se muestra la mediana, el IQR y su respectivo cuartil, debido a que ninguno de los componentes genéticos ancestrales tuvo una distribución normal, lo cual se corroboró mediante la prueba de Shapiro-Wilk (valor $p < 0,001$).

Tabla 13. Porcentaje de ascendencia europea, nativo-americana y africana poblacional.

Ascendencia	Mediana	Q ₃	IQR
EUR	67,2 %	72,1	11,3
NAM	22,4 %	27,2	9,5
AFR	8,9 %	13,1	7,0

AFR, ascendencia africana; EUR, ascendencia europea; IQR, rango intercuartílico; NAM, ascendencia nativo-americana; Q₃, tercer cuartil (percentil 75).

En relación con la estimación de los porcentajes individuales del componente genético ancestral, en la Figura 13 se muestra que en el grupo CRC los porcentajes de EUR oscilaron entre el 43,1 y el 82,5 % con una mediana de 67,0 %; de NAM entre el 10,3 y el 48,5 % con una mediana de 22,3 % y de AFR entre el 3,4 y el 44,0 % con una mediana de 9,6 %. Para el grupo No CRC los porcentajes de EUR oscilaron entre el 40,9 y el 81,4 % con una mediana de 67,5 %; de NAM entre el 13,2 y el 39,8 % con una mediana de 22,6 % y el porcentaje de AFR se distribuyó entre el 3,9 y el 35,1 % con una mediana de 8,6 %.

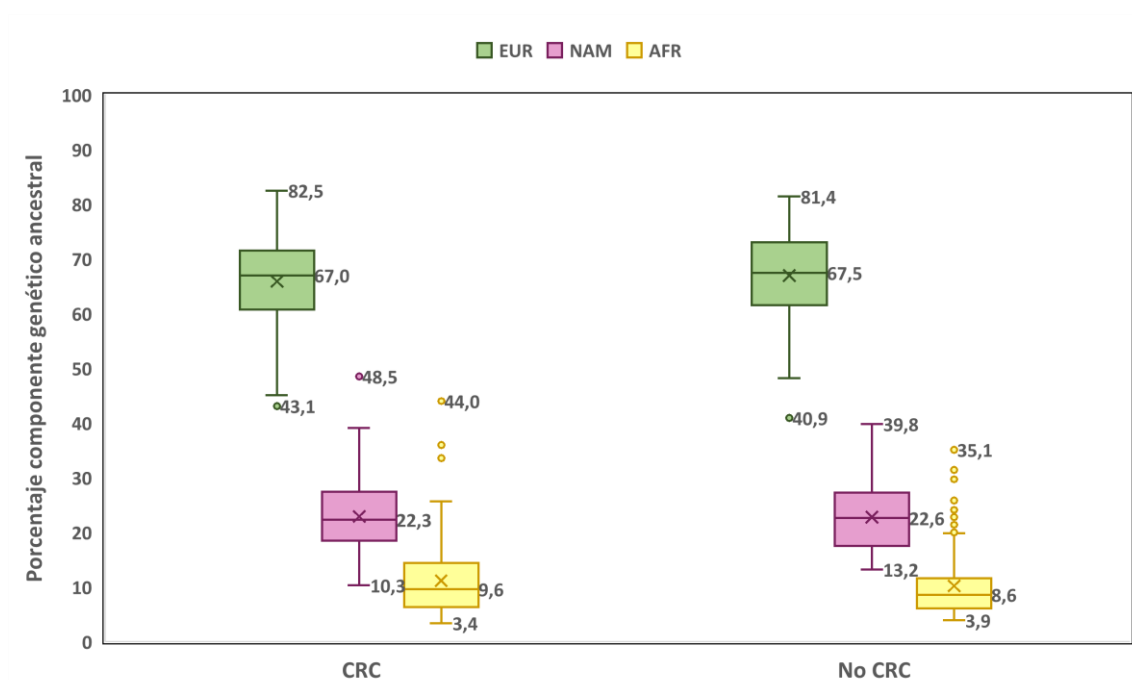


Figura 13. Distribución del porcentaje de ascendencia europea (EUR), nativo-americana (NAM) y africana (AFR) en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal.

4.3 Caracterización sociodemográfica de la población de estudio

Es preciso aclarar que, aunque se analizaron las variables de interés en relación con el centro hospitalario, no se encontró ninguna asociación, probablemente debido a las grandes diferencias que se presentaron entre los distintos centros tanto en el número participantes reclutados como en el grupo al que aportaba (CRC o No CRC).

De los 338 participantes reclutados en el estudio, la mayoría eran mujeres (63,3 %, 214/338, IC 95 % 57,9 a 68,5), con edades entre 45 y 69 años (60,9 %, 206/338, IC 95 % 55,5 a 66,2) y procedentes de Colombia (99,4 %, 336/338, IC 95 % 97,9 a 99,9), concretamente de la región Andina del país (90,8 %, 307/338, IC 95 % 87,2 a 93,7). En relación con la autodenominación étnica, la mayoría se autodenominaron como no pertenecientes a ningún grupo étnico (97,6 %, 330/338, IC 95 % 95,4 a 98,9) y de la situación laboral, la mayoría eran amas de casa (36,7 %, 124/338, IC 95 % 31,5 a 42,1). La distribución de las variables sociodemográficas se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14. Características sociodemográficas de los participantes pareados del estudio y distribuidos en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal.

Variables		TOTAL (n = 338) n (%)	CRC (n = 154) n (%)	No CRC (n = 184) n (%)
Sexo	Masculino	124 (36,7)	61 (39,6)	63 (34,2)
	Femenino	214 (63,3)	93 (60,4)	121 (65,8)
Edad	< 45	50 (14,8)	13 (8,4)	37 (20,1)
	45 a 69	206 (60,9)	91 (59,1)	115 (62,5)
	≥ 70	82 (24,3)	50 (32,5)	32 (17,4)
País de origen	Colombia	336 (99,4)	153 (99,4)	183 (99,5)
	Foráneo	2 (0,6)	1 (0,6)	1 (0,5)
Región de origen	Andina	307 (90,8)	143 (92,9)	164 (89,1)
	Pacífico	16 (4,7)	8 (5,2)	8 (4,3)
	Caribe	13 (3,8)	2 (1,3)	11 (6,0)
	Otros	2 (0,6)	1 (0,6)	1 (0,5)
Autodenominación étnica	Ninguno	330 (97,6)	147 (95,5)	183 (99,5)
	Negro afrocolombiano	7 (2,1)	6 (3,9)	1 (0,5)
	Indígena	1 (0,3)	1 (0,6)	0 (0,0)
Situación laboral	Ama de casa	124 (36,7)	60 (39,0)	64 (34,8)
	Empleado	88 (26,0)	29 (18,8)	59 (32,1)
	Autónomo	73 (21,6)	36 (23,4)	37 (20,1)
	Pensionado	45 (13,3)	27 (17,5)	18 (9,8)
	Empleador	4 (1,2)	1 (0,6)	3 (1,6)
	Estudiante	4 (1,2)	1 (0,6)	3 (1,6)

CRC, cáncer colorrectal.

4.4 Caracterización de los hábitos alimentarios, de tabaquismo, etílicos y de consumo de café

En relación con los hábitos alimentarios, se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los participantes del grupo CRC y No CRC en el consumo de carnes rojas ($p = 0,033$) y productos ultraprocesados ($p = 0,001$), de tal manera que los participantes que consumían carnes rojas y los participantes que consumían ultraprocesados de 1 a 2 días por semana (d/s) tienen 2,1 (IC 95 % 1,1 a 4,0) y 2,5 (IC 95 % 1,5 a 3,9) veces, respectivamente, mayor probabilidad de pertenecer al grupo CRC que los que no los consumían. Así mismo, se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos de participantes en el consumo de fruta fresca ($p = 0,025$) y verduras y legumbres ($p = 0,012$), si bien, en este caso, los participantes que consumían fruta fresca y verduras y legumbres de 5 a 6 d/s tienen 5 (1/0,2) (IC 95 % 0,0 a 0,9) y 10 (1/0,1) (IC 95 % 0,0 a 0,7) veces, respectivamente, mayor probabilidad de pertenecer al grupo No CRC que los que no los consumían (Tabla 15).

En relación con el consumo de tabaco, concretamente en el IPA pasado, se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los participantes del grupo CRC y No CRC en el consumo alto de tabaco ($p = 0,003$), de tal manera que los participantes con IPA pasado mayor de 40 tienen 4,6 (IC 95 % 1,5 a 14,1) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo CRC que los participantes sin hábitos de tabaquismo (Tabla 15).

En lo que respecta a otros hábitos, no se observaron diferencias entre ambos grupos en relación con el consumo de alcohol, el consumo de café y el consumo de alimentos preparados en casa o fuera de casa (Tabla 15).

Tabla 15. Hábitos alimentarios, consumo de tabaco, alcohol y café de los participantes pareados del estudio y distribuidos en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal. Los valores estadísticamente significativos han sido resaltados en negrita.

Variables		Frecuencia	Total (n = 308) n (%)	Grupo CRC (n = 154) n (%)	Grupo No CRC (n = 154) n (%)	OR (IC 95 %)	Valor p
Hábitos alimentarios	Carbohidratos	0 d/s ^{ref.}	6 (1,9)	5 (3,2)	1 (0,6)	–	–
		1 a 2 d/s	12 (3,9)	8 (5,2)	4 (2,6)	0,4 (0,0 a 4,7)	0,465
		3 a 4 d/s	22 (7,1)	5 (3,2)	17 (11,0)	0,1 (0,0 a 0,6)	0,019
		5 a 6 d/s	14 (4,5)	6 (3,9)	8 (5,2)	0,2 (0,0 a 1,6)	0,120
		7 d/s	254 (82,5)	130 (84,4)	124 (80,5)	0,2 (0,0 a 1,8)	0,157
		0 d/s ^{ref.}	61 (19,8)	30 (19,5)	31 (20,1)	–	–
		1 a 2 d/s	43 (14,0)	24 (15,6)	19 (12,3)	1,3 (0,6 a 2,9)	0,505
	Lácteos	3 a 4 d/s	30 (9,7)	16 (10,4)	14 (9,1)	1,2 (0,5 a 2,8)	0,710
		5 a 6 d/s	20 (6,5)	9 (5,8)	11 (7,1)	0,8 (0,3 a 2,3)	0,746
		7 d/s	154 (50,0)	75 (48,7)	79 (51,3)	1,0 (0,5 a 1,8)	0,949
		0 d/s ^{ref.}	13 (4,2)	8 (5,2)	5 (3,2)	–	–
	Huevos	1 a 2 d/s	40 (13,0)	19 (12,3)	21 (13,6)	0,6 (0,2 a 2,0)	0,382
		3 a 4 d/s	65 (21,1)	32 (20,8)	33 (21,4)	0,6 (0,2 a 2,0)	0,421
		5 a 6 d/s	31 (10,1)	14 (9,1)	17 (11,0)	0,5 (1,4 a 1,9)	0,325
		7 d/s	159 (51,6)	81 (52,6)	78 (50,6)	0,7 (0,2 a 2,1)	0,465
	Carnes rojas	0 d/s ^{ref.}	265 (86,0)	126 (81,8)	139 (90,3)	–	–
		1 a 2 d/s	43 (14,0)	28 (18,2)	15 (9,7)	2,1 (1,1 a 4,0)	0,033
		3 a 4 d/s	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)		
		5 a 6 d/s	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	–	–
		7 d/s	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)		

Variables		Frecuencia	Total (n = 308) n (%)	Grupo CRC (n = 154) n (%)	Grupo No CRC (n = 154) n (%)	OR (IC 95 %)	Valor p
Hábitos alimentarios	Pollo	0 d/s ^{ref.}	15 (4,9)	10 (6,5)	5 (3,2)	–	–
		1 a 2 d/s	94 (30,5)	39 (25,3)	55 (35,7)	0,4 (0,1 a 1,1)	0,077
		3 a 4 d/s	118 (38,3)	53 (34,4)	65 (42,2)	0,4 (0,1 a 1,3)	0,121
		5 a 6 d/s	45 (14,6)	31 (20,1)	14 (9,1)	1,1 (0,3 a 3,8)	0,873
		7 d/s	36 (11,7)	21 (13,6)	15 (9,7)	0,7 (0,2 a 2,5)	0,579
		0 d/s ^{ref.}	20 (6,5)	13 (8,4)	7 (4,5)	–	–
		1 a 2 d/s	61 (19,8)	36 (23,4)	25 (16,2)	0,8 (0,3 a 2,2)	0,635
	Fruta fresca	3 a 4 d/s	55 (17,9)	26 (16,9)	29 (18,8)	0,5 (0,2 a 1,4)	0,178
		5 a 6 d/s	15 (4,9)	4 (2,6)	11 (7,1)	0,2 (0,0 a 0,9)	0,025
		7 d/s	157 (51,0)	75 (48,7)	82 (53,2)	0,5 (0,2 a 1,3)	0,153
		0 d/s ^{ref.}	13 (4,2)	11 (7,1)	2 (1,3)	–	–
	Verduras y legumbres	1 a 2 d/s	45 (14,6)	29 (18,8)	16 (10,4)	0,3 (0,1 a 1,7)	0,181
		3 a 4 d/s	46 (14,9)	25 (16,2)	21 (13,6)	0,2 (0,0 a 1,1)	0,063
		5 a 6 d/s	24 (7,8)	10 (6,5)	14 (9,1)	0,1 (0,0 a 0,7)	0,012
		7 d/s	180 (58,4)	79 (51,3)	101 (65,6)	0,1 (0,0 a 0,7)	0,004
		0 d/s ^{ref.}	129 (41,9)	48 (31,2)	81 (52,6)	–	–
	Ultraprocesados	1 a 2 d/s	179 (58,1)	106 (68,8)	73 (47,4)	2,5 (1,5 a 3,9)	0,001
		3 a 4 d/s	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)		
		5 a 6 d/s	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	–	–
		7 d/s	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)		
Consumo de tabaco	Sí		130 (42,2)	71 (46,1)	59 (38,3)	1,4 (0,9 a 2,2)	0,166
	No		178 (57,8)	83 (53,9)	95 (61,7)		

Variables			Frecuencia	Total (n = 308) n (%)	Grupo CRC (n = 154) n (%)	Grupo No CRC (n = 154) n (%)	OR (IC 95 %)	Valor p
Consumo de tabaco	IPA pasado	No fumaba ^{ref. a}		187 (60,7)	90 (58,4)	97 (63,0)	–	–
		Muy bajo		59 (19,2)	30 (19,5)	29 (18,8)	1,1 (0,6 a 2,0)	0,716
		Bajo		29 (9,4)	10 (6,5)	19 (12,3)	0,6 (0,3 a 1,3)	0,174
		Moderado		12 (3,9)	7 (4,5)	5 (3,2)	1,5 (0,5 a 4,9)	0,496
		Alto		21 (6,8)	17 (11,0)	4 (2,6)	4,6 (1,5 a 14,1)	0,003
	IPA actual	No fuma ^{ref. b}		288 (93,5)	140 (90,9)	148 (96,1)	–	–
		Muy bajo		17 (5,5)	11 (7,1)	6 (3,9)	1,9 (0,7 a 5,4)	0,204
		Bajo		1 (0,3)	1 (0,6)	0 (0,0)	–	0,999
		Moderado		1 (0,3)	1 (0,6)	0 (0,0)	–	0,999
		Alto		1 (0,3)	1 (0,6)	0 (0,0)	–	0,999
Consumo de alcohol	Sí			266 (86,4)	130 (84,4)	136 (88,3)	0,7 (0,4 a 1,4)	0,321
		No		42 (13,6)	24 (15,6)	18 (11,7)		
			Diario	10 (3,2)	8 (5,2)	2 (1,3)	3,0 (0,6 a 15,9)	0,196
			1 a 3 d/s	16 (5,2)	6 (3,9)	10 (6,5)	0,5 (0,1 a 1,5)	0,186
			4 a 6 d/s	4 (1,3)	2 (1,3)	2 (1,3)	0,8 (0,1 a 5,8)	0,784
			1 a 3 d/m	20 (6,5)	9 (5,8)	11 (7,1)	0,6 (0,2 a 1,8)	0,372
			4 a 6 d/m	17 (5,5)	12 (7,8)	5 (3,2)	1,8 (0,5 a 6,0)	0,341
			Ocasional	199 (64,6)	93 (60,4)	106 (68,8)	0,7 (0,3 a 1,3)	0,222
	Masculino (n = 122)	No bebía ^{ref. c}		76 (62,3)	33 (54,1)	43 (70,5)	–	–
		Bajo		8 (6,6)	4 (6,6)	4 (6,6)	1,3 (0,3 a 5,6)	0,722
		Moderado		5 (4,1)	3 (4,9)	2 (3,3)	1,9 (0,3 a 12,4)	0,477
		Alto		33 (27,0)	21 (34,4)	12 (19,7)	2,3 (1,0 a 5,3)	0,055
	UBF pasado							

Variables			Frecuencia	Total (n = 308) n (%)	Grupo CRC (n = 154) n (%)	Grupo No CRC (n = 154) n (%)	OR (IC 95 %)	Valor p
Consumo de alcohol	Femenino (n = 186)	No bebía ^{ref. d}		174 (93,5)	115 (92,0)	59 (96,7)	–	–
		Bajo		4 (2,2)	4 (3,2)	0 (0,0)	–	0,999
		Moderado		0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	–	–
		Alto		8 (4,3)	6 (4,8)	2 (3,3)	1,5 (0,3 a 7,9)	0,604
	Masculino (n = 122)	No bebe ^{ref. e}		99 (81,1)	52 (85,2)	47 (77,0)	–	–
		Bajo		5 (4,1)	1 (1,6)	4 (6,6)	0,2 (0,0 a 2,1)	0,190
		Moderado		6 (4,9)	1 (1,6)	5 (8,2)	0,2 (0,0 a 1,6)	0,125
		Alto		12 (9,8)	7 (11,5)	5 (8,2)	1,3 (0,4 a 4,3)	0,704
	Femenino (n = 186)	No bebe ^{ref. f}		179 (96,2)	91 (97,8)	88 (94,6)	–	–
		Bajo		2 (1,1)	0 (0,0)	2 (2,2)	–	0,999
		Moderado		1 (0,5)	1 (1,1)	0 (0,0)	–	0,999
		Alto		4 (2,2)	1 (1,1)	3 (3,2)	0,3 (0,0 a 3,2)	0,331
Consumo de café	Sí			219 (71,1)	102 (66,2)	117 (76,0)	0,6 (0,4 a 1,0)	0,060
	No			89 (28,9)	52 (33,8)	37 (24,0)		
Consumo de alimentos	En casa			290 (94,2)	147 (95,5)	143 (92,9)	1,6 (0,6 a 4,3)	0,335
	Fuera de casa			18 (5,8)	7 (4,5)	11 (7,1)		

a. Incluyen los participantes que no fumaban en el pasado.

b. Incluye a los participantes que no fuman en el presente.

c. Incluye a los participantes masculinos que no bebían en el pasado.

d. Incluye a los participantes femeninos que no bebían en el pasado.

e. Incluye a los participantes masculinos que no beben en el presente.

f. Incluye a los participantes femeninos que no beben en el presente.

ref. Referencia o ausencia de exposición.

CRC, cáncer colorrectal; d/m, días por mes; d/s, días por semana; IC 95 %, intervalo de confianza del 95 %; IPA; índice paquete-año; OR, razón de probabilidad; UBE, unidad de bebida estándar.

4.5 Caracterización de los aspectos relacionados con la vivienda

En relación con las características de la vivienda, se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los participantes del grupo CRC y No CRC en la ubicación de la vivienda ($p = 0,009$) y el material del suelo de la vivienda ($p = 0,019$), de tal manera que los participantes que vivían en zona rural tienen 2,6 (IC 95 % 1,3 a 5,6) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo CRC que los que vivían en zonas urbanas y los que tenían suelo de tierra o madera tienen mayor probabilidad de pertenecer al grupo CRC que los que tenían suelo de baldosa o cemento (Tabla 16).

En relación con la convivencia con animales, se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los participantes del grupo CRC y No CRC en la convivencia con animales de granja ($p = < 0,001$), de tal manera que los participantes que convivían con animales de granja tienen 3 (IC 95 % 1,6 a 5,7) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo CRC en comparación con los que no convivían con animales (Tabla 16).

Tabla 16. Características de la vivienda de los participantes pareados del estudio y distribuidos en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal. Los valores estadísticamente significativos han sido resaltados en negrita.

Variables		Total (n = 308) n (%)	Grupo CRC (n = 154) n (%)	Grupo No CRC (n = 154) n (%)	OR (IC 95 %)	Valor p
Ubicación de la vivienda	Urbana	271 (88,0)	128 (83,1)	143 (92,9)	2,6 (1,3 a 5,6)	0,009
	Rural	37 (12,0)	26 (16,9)	11 (7,1)		
Región de residencia	Andina	297 (96,4)	147 (95,5)	150 (97,4)	–	0,058
	Pacífico	5 (1,6)	5 (3,2)	0 (0,0)		
	Caribe	6 (1,9)	2 (1,3)	4 (2,6)		
Material del suelo de la vivienda	Baldosa/cemento	297 (96,4)	144 (93,5)	153 (99,4)	–	0,019
	Tierra	6 (1,9)	5 (3,2)	1 (0,6)		
	Madera	5 (1,6)	5 (3,2)	0 (0,0)		
Convivencia con animales	Sí	161 (52,3)	85 (55,2)	76 (49,4)	1,3 (0,8 a 2,0)	0,305
	No	147 (47,7)	69 (44,8)	78 (50,6)		
Tipo de animales	De compañía	186 (60,4)	99 (64,3)	87 (56,5)	1,3 (0,8 a 2,0)	0,255
	De granja	66 (21,4)	48 (31,2)	18 (11,7)	3,0 (1,6 a 5,7)	< 0,001

CRC, cáncer colorrectal; IC 95 %, intervalo de confianza del 95 %; OR, razón de probabilidad.

4.6 Caracterización de los aspectos higiénico-sanitarios

En relación con los aspectos higiénico-sanitarios, se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los participantes del grupo CRC y No CRC en el tipo de abastecimiento de agua para el consumo humano ($p = 0,009$), de tal manera que los participantes que consumían agua de pozo, agua de río/arroyo o agua de lluvia tienen mayor probabilidad de pertenecer al grupo CRC que los que consumían agua procedente de la red de saneamiento. Así mismo, se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos en el empleo de hipoclorito sódico para el lavado de las frutas o verduras de consumo ($p = 0,036$), de tal manera que los participantes que siempre adicionaban este tipo de desinfectantes a las frutas o verduras de consumo y los que lo hacían casi siempre tienen 1,7 (1/0,6) (IC 95 % 1,1 a 4,0) y 2 (1/0,5) (IC 95 % 1,1 a 4,0) veces, respectivamente, mayor probabilidad de pertenecer al grupo No CRC en comparación con los que nunca los usaban (Tabla 17).

Tabla 17. Hábitos higiénico-sanitarios de los participantes pareados del estudio y distribuidos en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal. Los valores estadísticamente significativos han sido resaltados en negrita.

Variables		Frecuencia	Total (n = 308) n (%)	Grupo CRC (n = 154) n (%)	Grupo No CRC (n = 154) n (%)	OR (IC 95 %)	Valor p
Abastecimiento de agua para el consumo	De red de saneamiento		288 (93,5)	137 (89,0)	151 (98,1)		0,009
	De lluvia		7 (2,3)	7 (4,5)	0 (0,0)		
	De río/arroyo		10 (3,2)	8 (5,2)	2 (1,3)		
	De pozo		3 (1,0)	2 (1,3)	1 (0,6)		
Eliminación de excretas	Inodoro con conexión		301 (97,7)	149 (96,8)	152 (98,7)		0,359
	Inodoro sin conexión		3 (1,0)	2 (1,3)	1 (0,6)		
	Letrina		1 (0,3)	0 (0,0)	1 (0,6)		
	Campo abierto		2 (0,6)	2 (1,3)	0 (0,0)		
	Río/arroyo		1 (0,3)	1 (0,6)	0 (0,0)		
Hábitos de higiene	Adición de hipoclorito sódico a frutas o verduras ^a	Siempre	96 (32,5)	43 (28,9)	53 (36,3)	0,6 (0,3 a 0,9)	0,036
		Casi siempre	38 (12,9)	15 (10,1)	23 (15,8)	0,5 (0,2 a 0,9)	0,036
		Casi nunca	25 (8,5)	11 (7,4)	14 (9,6)	0,6 (0,2 a 1,3)	0,173
		Nunca ^{ref.}	136 (46,1)	80 (53,7)	56 (38,4)	–	–
	Lavado de manos antes de usar el inodoro ^b	Siempre	274 (92,3)	145 (95,4)	129 (89,0)	1,1 (0,1 a 18,2)	0,934
		Casi siempre	21 (7,1)	6 (3,9)	15 (10,3)	0,4 (0,0 a 7,5)	0,540
		Casi nunca	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	–	–
	Lavado de manos después de usar el inodoro ^c	Nunca ^{ref.}	2 (0,7)	1 (0,7)	1 (0,7)	–	–
		Siempre	280 (95,2)	145 (96,0)	135 (94,4)	1,1 (0,0 a 54,5)	0,972
		Casi siempre	14 (4,8)	6 (4,0)	8 (5,6)	0,8 (0,0 a 43,9)	0,897
		Casi nunca	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	–	–
		Nunca ^{ref.}	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	–	–

Variables		Frecuencia	Total (n = 308) n (%)	Grupo CRC (n = 154) n (%)	Grupo No CRC (n = 154) n (%)	OR (IC 95 %)	Valor p
Hábitos de higiene	Uso de calzado	Siempre	282 (91,6)	143 (92,9)	139 (90,3)	3,0 (0,1 a 76,4)	0,491
		Casi siempre	18 (5,8)	7 (4,5)	11 (7,1)	1,9 (0,1 a 54,7)	0,693
		Casi nunca	7 (2,3)	4 (2,6)	3 (1,9)	3,9 (0,1 a 126,7)	0,449
		Nunca ^{ref.}	1 (0,3)	0 (0,0)	1 (0,6)	–	–

a. Cálculo sobre n total = 295 (n CRC = 149 y n No CRC= 146).
b. Cálculo sobre n total = 297 (n CRC = 152 y n No CRC= 145).
c. Cálculo sobre n total = 294 (n CRC = 151 y n No CRC= 143).
^{ref.} Referencia o ausencia de exposición.
CRC, cáncer colorrectal; IC 95 %, intervalo de confianza del 95 %; OR, razón de probabilidad.

4.7 Caracterización clínica

En relación con las características clínicas, en particular las manifestaciones clínicas en las últimas dos semanas, se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los participantes del grupo CRC y No CRC en las variables dolor abdominal ($p < 0,001$), pérdida de peso ($p < 0,001$), diarrea ($p = 0,001$), sangre en heces ($p < 0,001$), vómito ($p = 0,004$) y fiebre ($p = 0,042$). En concreto, los participantes con estas manifestaciones clínicas tienen entre 2,2 (IC 95 % 1,4 a 3,5) y 5,4 (IC 95 % 3,2 a 9,3) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo CRC que los participantes que no tuvieron dichas manifestaciones clínicas adicionales en las últimas dos semanas (Tabla 18).

Así mismo, se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos en los antecedentes personales de anemia ($p < 0,001$) y CRC ($p < 0,001$), de tal manera que los participantes con antecedente de anemia y CRC tienen 2,5 (IC 95 % 1,5 a 4,1) y 4,2 (IC 95 % 1,8 a 9,6) veces, respectivamente, mayor probabilidad de pertenecer al grupo CRC que los participantes que no tuvieron ningún antecedente personal (Tabla 18). También se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos en los antecedentes personales de IBS ($p = 0,024$) y enfermedades del sistema digestivo ($p < 0,001$), si bien, en este caso, los participantes con antecedentes de IBS y enfermedades del sistema digestivo tienen 2 (1/0,5) (IC 95 % 0,3 a 0,9) y 3,4 (1/0,3) (IC 95 % 0,2 a 0,6) veces, respectivamente, mayor probabilidad de pertenecer al grupo No CRC en comparación con los que no tuvieron ningún antecedente personal (Tabla 18). Cuando se valoró esta misma asociación en relación con los antecedentes familiares, en lugar de personales, igualmente se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos en los antecedentes familiares de IBS ($p = 0,036$) y colitis ulcerosa ($p = 0,006$), de tal manera que los participantes con antecedentes de IBS y colitis ulcerosa tienen 2,5 (1/0,4) (IC 95 % 0,2 a 0,9) y 5 (1/0,2) (IC 95 % 0,0 a 0,67) veces, respectivamente, mayor probabilidad de pertenecer al grupo No CRC en comparación con los que no tuvieron ningún antecedente familiar (Tabla 18).

Finalmente, se valoró asimismo una posible asociación entre el tratamiento antiparasitario reciente y el desarrollo de CRC, y en este sentido se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos en la administración reciente de tratamiento antiparasitario ($p = 0,023$), de tal manera que los participantes que recibieron tratamiento antiparasitario en los tres meses previos a la inclusión en el estudio tienen 2,1 (IC 95 % 1,1 a 4,2)

veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo CRC en comparación con los participantes sin tratamiento antiparasitario previo (Tabla 18).

Tabla 18. Características clínicas de los participantes pareados del estudio y distribuidos en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal. Los valores estadísticamente significativos han sido resaltados en negrita.

Variables		Total (n = 308) n (%)	Grupo CRC (n = 154) n (%)	Grupo No CRC (n = 154) n (%)	OR (IC 95 %)	Valor p
Manifestaciones clínicas en las últimas dos semanas	Dolor abdominal	125 (40,6)	77 (50,0)	48 (31,2)	2,2 (1,4 a 3,5)	< 0,001
	Pérdida de peso	101 (32,8)	77 (50,0)	24 (15,6)	5,4 (3,2 a 9,3)	< 0,001
	Estreñimiento	101 (32,8)	55 (35,7)	46 (29,9)	1,3 (0,8 a 2,1)	0,275
	Diarrea	92 (29,9)	59 (38,3)	33 (21,4)	2,3 (1,4 a 3,8)	0,001
	Sangre en heces	87 (28,2)	62 (40,3)	25 (16,2)	3,5 (2,0 a 6,0)	< 0,001
	Vómito	31 (10,1)	23 (14,9)	8 (5,2)	3,2 (1,4 a 7,4)	0,004
	Fiebre	21 (6,8)	15 (9,7)	6 (3,9)	2,7 (1,1 a 7,1)	0,042
	Anemia	98 (31,8)	64 (41,6)	34 (22,1)	2,5 (1,5 a 4,1)	< 0,001
	Pólipos	57 (18,5)	24 (15,6)	33 (21,4)	0,7 (0,4 a 2,1)	0,187
	Síndrome de intestino irritable (IBS)	53 (17,2)	19 (12,3)	34 (22,1)	0,5 (0,3 a 0,9)	0,024
	Cáncer colorrectal previo	37 (12,0)	29 (18,8)	8 (5,2)	4,2 (1,8 a 9,6)	< 0,001
	Otras neoplasias	29 (9,4)	10 (6,5)	19 (12,3)	0,5 (0,2 a 1,1)	0,079
Antecedentes personales	Colitis ulcerosa	15 (4,9)	4 (2,6)	11 (7,1)	0,4 (0,1 a 1,1)	0,064
	Enfermedad de Crohn	1 (0,3)	0 (0,0)	1 (0,6)	–	0,317
	Enfermedades del sistema circulatorio	140 (45,5)	74 (48,1)	66 (42,9)	1,2 (0,8 a 1,9)	0,360
	Enfermedades endocrinas	118 (38,3)	59 (38,3)	59 (38,3)	1,0 (0,6 a 1,6)	0,999
	Enfermedades del sistema digestivo	54 (17,5)	15 (9,7)	39 (25,3)	0,3 (0,2 a 0,6)	< 0,001
	Enfermedades del sistema músculo esquelético locomotoras	22 (7,1)	7 (4,5)	15 (9,7)	0,4 (0,2 a 1,1)	0,077
	Enfermedades del sistema respiratorio	16 (5,2)	9 (5,8)	7 (4,5)	1,3 (0,5 a 3,6)	0,608
	Enfermedades del sistema genitourinario	14 (4,5)	10 (6,5)	4 (2,6)	2,6 (0,8 a 8,5)	0,101
	Trastornos mentales y del comportamiento	8 (2,6)	3 (1,9)	5 (3,2)	0,6 (0,1 a 2,5)	0,474
	Enfermedades del sistema nervioso	6 (1,9)	1 (0,6)	5 (3,2)	0,2 (0,0 a 1,7)	0,099
	Enfermedades del ojo	5 (1,6)	3 (1,9)	2 (1,3)	1,5 (0,3 a 9,2)	0,652
	Enfermedades del oído	3 (1,0)	3 (1,9)	0 (0,0)	–	0,082
	Enfermedades de la piel	2 (0,6)	1 (0,6)	1 (0,6)	1,0 (0,1 a 16,1)	0,999
	Enfermedades de la sangre o de los órganos hematopoyéticos	2 (0,6)	0 (0,0)	2 (1,3)	–	0,156
	Enfermedades infecciosas	1 (0,3)	1 (0,6)	0 (0,0)	–	0,317

Variables		Total (n = 308) n (%)	Grupo CRC (n = 154) n (%)	Grupo No CRC (n = 154) n (%)	OR (IC 95 %)	Valor p
Antecedentes familiares	Relacionados con CRC	Otras neoplasias	70 (45,5)	70 (45,5)	1,0 (0,6 a 1,6)	1,000
		Cáncer colorrectal	57 (20,4)	27 (19,0)	0,9 (0,5 a 1,5)	0,660
		Síndrome de intestino irritable (IBS)	28 (11,3)	9 (7,1)	0,4 (0,2 a 0,9)	0,036
		Pólipos	21 (8,6)	7 (5,6)	0,5 (0,2 a 1,2)	0,090
		Colitis ulcerosa	14 (5,5)	2 (1,6)	0,2 (0,0 a 0,7)	0,006
	Enfermedades del sistema circulatorio	Enfermedades del sistema circulatorio	149 (48,4)	68 (44,2)	0,7 (0,5 a 1,1)	0,138
		Enfermedades endocrinas	85 (27,6)	35 (22,7)	0,6 (0,4 a 1,0)	0,056
		Enfermedades del sistema digestivo	15 (4,9)	5 (3,2)	0,5 (0,2 a 1,5)	0,186
		Enfermedades del sistema músculo esquelético locomotoras	8 (2,6)	3 (1,9)	0,6 (0,1 a 2,5)	0,474
		Enfermedades del sistema respiratorio	17 (5,5)	12 (7,8)	2,5 (0,9 a 7,3)	0,081
	Trastornos mentales y del comportamiento	Enfermedades del sistema genitourinario	8 (2,6)	3 (1,9)	0,6 (0,1 a 2,5)	0,474
		Trastornos mentales y del comportamiento	8 (2,6)	7 (4,5)	7,3 (0,9 a 60,0)	0,033
		Enfermedades del sistema nervioso	7 (2,3)	6 (3,9)	6,2 (0,7 a 52,1)	0,056
	Enfermedades de la sangre o de los órganos hematopoyéticos	Enfermedades del ojo	1 (0,3)	0 (0,0)	–	0,317
		Enfermedades del oído	1 (0,3)	0 (0,0)	–	0,317
		Enfermedades de la sangre o de los órganos hematopoyéticos	1 (0,3)	1 (0,6)	–	0,317
		Enfermedades de la piel	3 (1,0)	2 (1,3)	2,0 (0,2 a 22,4)	0,562
		Enfermedades infecciosas	3 (1,0)	1 (0,6)	0,5 (0,1 a 5,5)	0,562
Tratamiento antiparasitario	Recibido en los últimos tres meses	Sí	44 (14,3)	29 (18,8)	2,1 (1,1 a 4,2)	0,023
		No	264 (85,7)	125 (81,2)		
	Con prescripción médica	Sí	34 (11,0)	21 (13,6)	1,7 (0,8 a 3,6)	0,146
		No	10 (3,2)	8 (5,2)	4,2 (0,9 a 19,9)	0,054

CRC, cáncer colorrectal; IBS, síndrome de intestino irritable; IC 95 %, intervalo de confianza del 95 %; OR, razón de probabilidad.

4.8 Polimorfismos de nucleótido único (SNP) *a priori* asociados con cáncer colorrectal

Del total de participantes pareados, 8 participantes del grupo CRC y 3 del grupo No CRC, no pudieron ser incluidos en los análisis de SNP *a priori* asociados con CRC debido a dificultades en la genotipificación. Por ello, los resultados que se muestran en esta sección corresponden a un total de 297 participantes: 146 en el grupo CRC y 151 en el grupo No CRC. Adicionalmente, el número de participantes en los grupos CRC y No CRC con resultado para cada SNP estudiado pudo variar debido a que, en algunos participantes, no se obtuvo el genotipo en alguno de los SNP siguiendo la metodología descrita en la sección 3.7.1.

En relación con los 10 SNP analizados, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los participantes del grupo CRC y del grupo No CRC. Se estimó el equilibrio HW cuyos valores p se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Frecuencias alélicas de los polimorfismos de nucleótido único *a priori* asociados con cáncer colorrectal de los participantes pareados del estudio y distribuidos en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal.

rsID	Alelo	Frecuencias alélicas		OR (IC 95 %)	Valor p	Equilibrio HW	
		Grupo CRC n (%)	Grupo No CRC n (%)			Grupo CRC Valor p	Grupo No CRC Valor p
rs3219489	C	182 (60,3)	171 (60,2)	1,0 (0,7 a 1,4)	0,989	0,079	0,612
	G	120 (39,7)	113 (39,8)				
rs812481	C	90 (29,8)	79 (28,4)	1,1 (0,7 a 1,5)	0,714	0,835	1,000
	G	212 (70,2)	199 (71,6)				
rs41115	G	101 (33,4)	100 (36,5)	0,9 (0,6 a 1,2)	0,443	0,580	0,715
	A	201 (66,6)	174 (63,5)				
rs6983267	G	149 (49,3)	153 (55,4)	0,8 (0,6 a 1,1)	0,143	0,606	0,329
	T	153 (50,7)	123 (44,6)				
rs3802842	C	49 (16,2)	59 (21,2)	0,7 (0,5 a 1,1)	0,122	0,620	0,230
	A	253 (83,8)	219 (78,8)				
rs4444235	T	184 (60,9)	164 (56,9)	1,2 (0,8 a 1,6)	0,326	0,041	1,000
	C	118 (39,1)	124 (43,1)				
rs4779584	T	60 (20,1)	69 (24,6)	0,8 (0,5 a 1,1)	0,193	0,497	1,000
	C	238 (79,9)	211 (75,4)				
rs9929218	G	238 (79,3)	207 (74,5)	1,3 (0,9 a 1,9)	0,164	0,659	0,454
	A	62 (20,7)	71 (25,5)				
rs4939827	T	114 (37,7)	100 (36,0)	1,1 (0,8 a 1,5)	0,658	0,714	0,606
	C	188 (62,3)	178 (64,0)				
rs961253	C	202 (67,8)	168 (61,3)	1,3 (0,9 a 1,9)	0,106	1,000	1,191
	A	96 (32,2)	106 (38,7)				

A, adenina; C, citosina; CRC, cáncer colorrectal; G, guanina; HW, Hardy-Weinberg; IC 95 %, intervalo de confianza del 95 %; OR, razón de probabilidad; rsID, número de identificación del polimorfismo de nucleótido único; T, timina.

En los polimorfismos genéticos, además de los SNP, se incluyen los InDel, que se han empleado principalmente para estimar la composición genética ancestral. Algunas de las variantes de estos polimorfismos genéticos pueden afectar la función y regulación génica, razón por la cual también se incluyeron en los análisis de asociación con CRC. En este sentido y pese a la falta de asociación observada en los 10 SNP estudiados, análisis estadísticos adicionales de los distintos AIM de forma individual entre ambos grupos mostraron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias alélicas entre los participantes del grupo CRC y No CRC concretamente en los AIM FYNUL (p = 0,003), MID817 (p = 0,040) y PV92 (p = 0,021), de tal manera que los participantes que presentaron el alelo C en FYNUL, delección en MID817 y delección en PV92 tienen 2,1 (IC 95 % 1,3 a 3,6), 1,5 (IC 95 % 1,0 a 2,1) y 1,5 (IC 95 % 1,1 a 2,1) veces, respectivamente, mayor probabilidad de pertenecer al grupo CRC en comparación con los participantes que presentaron el alelo T en FYNUL, inserción en MID817 e inserción en PV92 (Tabla 20). Estos resultados se corroboraron con las frecuencias genotípicas de los AIM, donde de forma similar se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los participantes del grupo CRC y No CRC en los AIM FYNUL (p = 0,011), MID817 (p = 0,027) y PV92 (p = 0,020), de tal manera que los participantes que presentaron el genotipo T/C o C/C en FYNUL, así como delección (D/D o I/D) en MID817 y delección (D/D o I/D) en PV92 tienen 2,1 (IC 95 % 1,2 a 3,7), 1,7 (IC 95 % 1,1 a 2,7) y 2,2 (1,1 a 4,4) veces, respectivamente mayor probabilidad de pertenecer al grupo CRC en comparación con los participantes que presentaron el genotipo T/T en FYNUL, inserción I/I en MID817 e inserción I/I en PV92 (Tabla 21).

Tabla 20. Frecuencias alélicas y equilibrio Hardy-Weinberg de los marcadores informativos de la ascendencia de los participantes pareados del estudio y distribuidos los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal. Los valores estadísticamente significativos han sido resaltados en negrita.

AIM	Alelo	Frecuencias alélicas		OR (IC 95 %)	Valor p	Equilibrio HW	
		Grupo CRC n (%)	Grupo No CRC n (%)			Grupo CRC Valor p	Grupo No CRC Valor p
MID1752	Delección	110 (39,3)	128 (43,2)	0,8 (0,6 a 1,2)	0,335	0,287	0,407
	Inserción	170 (60,7)	168 (56,8)				
FYNUL	C	45 (16,0)	25 (8,1)	2,1 (1,3 a 3,6)	0,003	0,124	1,000
	T	237 (84,0)	283 (91,9)				
AT3	Delección	199 (74,8)	226 (73,4)	1,1 (0,7 a 1,6)	0,696	0,647	0,216
	Inserción	67 (25,2)	82 (26,6)				
MID1386	Delección	104 (37,7)	99 (33,9)	1,2 (0,8 a 1,7)	0,348	1,000	0,855
	Inserción	172 (62,3)	193 (66,1)				
GCH	A	123 (43,6)	132 (43,7)	1,0 (0,7 a 1,4)	0,982	1,000	0,248
	C	159 (56,4)	170 (56,3)				

RESULTADOS

AIM	Alelo	Frecuencias alélicas		OR (IC 95 %)	Valor p	Equilibrio HW	
		Grupo CRC n (%)	Grupo No CRC n (%)			Grupo CRC Valor p	Grupo No CRC Valor p
GCS	G	229 (81,2)	241 (79,3)	1,1 (0,7 a 1,7)	0,558	0,581	0,134
	T	53 (18,8)	63 (20,7)				
MID817	Delección	98 (36,6)	83 (28,4)	1,5 (1,0 a 2,1)	0,040	0,853	0,415
	Inserción	170 (63,4)	209 (71,6)				
MID1039	Delección	129 (45,4)	136 (44,7)	1,0 (0,7 a 1,4)	0,867	0,062	0,325
	Inserción	155 (54,6)	168 (55,3)				
MID1358	Delección	218 (77,3)	238 (77,8)	1,0 (0,7 a 1,5)	0,891	0,810	1,000
	Inserción	64 (22,7)	68 (22,2)				
MID856	Delección	193 (68,0)	224 (72,7)	0,8 (0,5 a 1,1)	0,204	0,700	0,222
	Inserción	91 (32,0)	84 (27,3)				
MID944	Delección	91 (33,0)	107 (36,4)	0,8 (0,6 a 1,2)	0,391	0,563	0,722
	Inserción	185 (67,0)	187 (63,6)				
MD2062	Delección	134 (47,9)	150 (49,7)	0,9 (0,7 a 1,3)	0,662	0,027	0,625
	Inserción	146 (52,1)	152 (50,3)				
MID1066	Delección	175 (62,9)	184 (62,2)	1,0 (0,7 a 1,4)	0,846	1,000	1,000
	Inserción	103 (37,1)	112 (37,8)				
LPL	T	147 (52,9)	145 (47,4)	1,2 (0,9 a 1,7)	0,185	0,611	0,195
	C	131 (47,1)	161 (52,6)				
DRD2	G	89 (31,3)	85 (28,3)	1,2 (0,8 a 1,6)	0,428	1,000	1,000
	A	195 (68,7)	215 (71,7)				
APOA1	Delección	31 (11,0)	30 (9,9)	1,1 (0,7 a 1,9)	0,676	0,218	0,363
	Inserción	251 (89,0)	272 (90,1)				
RB2300	G	83 (29,6)	80 (26,3)	1,2 (0,8 a 1,7)	0,371	0,839	0,062
	A	197 (70,4)	224 (73,7)				
OCA2	C	185 (65,1)	178 (58,6)	1,3 (0,9 a 1,8)	0,101	0,355	0,509
	T	99 (34,9)	126 (41,4)				
MID818	Delección	69 (25,9)	94 (30,9)	0,8 (0,5 a 1,1)	0,189	0,822	0,851
	Inserción	197 (74,1)	210 (69,1)				
PV92	Delección	190 (67,4)	178 (58,2)	1,5 (1,1 a 2,1)	0,021	0,848	0,319
	Inserción	92 (32,6)	128 (41,8)				
SB19	Delección	50 (17,6)	59 (19,3)	0,9 (0,6 a 1,4)	0,600	0,771	0,294
	Inserción	234 (82,4)	247 (80,7)				

A, adenina; AIM, marcador informativo de la ascendencia; C, citosina; CRC, cáncer colorrectal; G, guanina; HW, Hardy-Weinberg; IC 95 %, intervalo de confianza del 95 %; MID, marcador de inserción o delección; OR, razón de probabilidad; T, timina.

Tabla 21. Frecuencias genotípicas de los marcadores informativos de la ascendencia de los participantes pareados del estudio y distribuidos en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal. Los valores estadísticamente significativos han sido resaltados en negrita.

AIM	Modelo	Genotipo	Frecuencias genotípicas		OR (IC 95 %)	Valor p
			Grupo CRC n (%)	Grupo No CRC n (%)		
FYNUL (n = 141 CRC y n = 154 No CRC)	Codominante	T/T	102 (72,3)	130 (84,4)	1	0,014
		T/C	33 (23,4)	23 (14,9)	1,8 (1,0 a 3,3)	
		C/C	6 (4,3)	1 (0,6)	7,6 (0,9 a 64,5)	
	Dominante	C/C	6 (4,3)	1 (0,6)	6,8 (0,8 a 57,2)	0,042
		T/T-T/C	135 (95,7)	153 (99,3)		
	Recesivo	T/C-C/C	39 (27,7)	24 (15,6)	2,1 (1,2 a 3,7)	0,011
		T/T	102 (72,3)	130 (84,4)		
MID817 (n = 134 CRC y n = 146 No CRC)	Codominante	I/I	53 (39,5)	77 (52,7)	1	0,086
		I/D	64 (47,8)	55 (37,7)	1,7 (1,0 a 2,8)	
		D/D	17 (12,7)	14 (9,6)	1,8 (0,8 a 3,9)	
	Dominante	D/D	17 (12,7)	14 (9,6)	1,4 (0,6 a 2,9)	0,409
		I/D-I/I	117 (87,3)	132 (90,4)		
	Recesivo	D/D-I/D	81 (60,5)	69 (47,3)	1,7 (1,1 a 2,7)	0,027
		I/I	53 (39,5)	77 (52,7)		
PV92 (n = 141 CRC y n = 153 No CRC)	Codominante	I/I	14 (9,9)	30 (19,6)	1	0,047
		I/D	64 (45,4)	68 (44,4)	2,0 (1,0 a 4,1)	
		D/D	63 (44,7)	55 (36)	2,4 (1,2 a 5,1)	
	Dominante	D/D	63 (44,7)	55 (36)	1,4 (0,9 a 2,3)	0,127
		I/D-I/I	78 (55,3)	98 (64)		
	Recesivo	D/D-I/D	127 (90,1)	123 (80,4)	2,2 (1,1 a 4,4)	0,020
		I/I	14 (9,9)	30 (19,6)		

AIM, marcador informativo de la ascendencia; C, citosina; CRC, cáncer colorrectal; D, delección; I, inserción; IC 95 %, intervalo de confianza del 95 %; MID, marcador de inserción o delección; OR, razón de probabilidad; T, timina.

4.9 Detección de agentes parasitarios por técnicas de microscopía

El agente parasitario más frecuentemente detectado por técnicas de microscopía fue *Blastocystis* (33,1 %, 112/338, IC 95 % 28,1 a 38,4), con frecuencias similares en el grupo CRC (36,4 %, 56/154) y en el grupo No CRC (30,4 %, 56/184), seguido de *E. nana* (9,2 %, 31/338, IC 95 % 6,3 a 12,8), también con frecuencias similares en el grupo CRC (9,1 %, 14/154) y en el grupo No CRC (9,2 %, 17/184). No se observaron helmintos intestinales en ninguno de los participantes del estudio y en el 60,4 % (204/338, IC 95 % 54,9 a 65,6), no se observó ningún parásito intestinal (Figura 14).

RESULTADOS

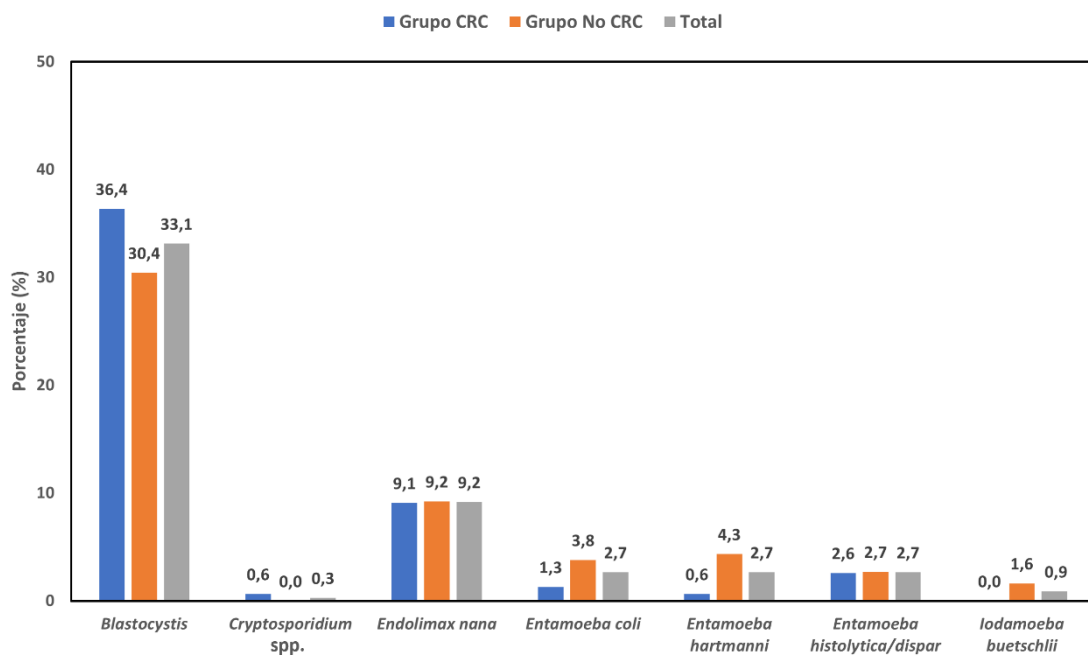


Figura 14. Frecuencia de agentes parasitarios por técnicas de microscopía en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los participantes del grupo CRC y No CRC en la frecuencia de los agentes parasitarios detectados por técnicas de microscopía (Tabla 22).

Tabla 22. Agentes parasitarios por técnicas de microscopía en participantes pareados del estudio y distribuidos en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal.

Variables		Total (n = 308) n (%)	Grupo CRC (n = 154) n (%)	Grupo No CRC (n = 154) n (%)	OR (IC 95 %)	Valor p
NSOPI ^{ref.}		181 (58,8)	88 (57,1)	93 (60,4)	–	–
Total <i>Blastocystis</i>		106 (34,4)	56 (36,4)	50 (32,5)	1,2 (0,7 a 1,9)	0,472
<i>Blastocystis</i>	<i>Blastocystis</i> mono infectado	79 (25,6)	46 (29,9)	33 (21,4)	1,5 (0,9 a 2,5)	0,090
	<i>Blastocystis</i> y amebas comensales ^a	27 (8,8)	10 (6,5)	17 (11,0)	0,6 (0,2 a 1,3)	0,158
Amebas comensales ^a		21 (6,8)	10 (6,5)	11 (7,1)	1,0 (0,4 a 2,2)	0,821

^a Amebas comensales (*Endolimax nana*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Iodamoeba buetschlii*).

^{ref.} Referencia o ausencia de parásitos.

CRC, cáncer colorrectal; IC 95 %, intervalo de confianza del 95 %; NSOPI, no se observaron parásitos intestinales; OR, razón de probabilidad.

4.9.1 Coinfecciones de agentes parasitarios

Se detectaron un total de 14 coinfecciones diferentes que englobaron dos o tres agentes parasitarios. La coinfección *Blastocystis* y *E. nana* (3,8 %, 13/338, IC 95 % 2,1 a 6,5) fue la coinfección más frecuente en términos generales y *Blastocystis*, *E. histolytica/dispar* y *E. hartmanni* (0,6 %, 2/338, IC 95 % 0,1 a 2,1) fue la más frecuente entre las coinfecciones por tres agentes parasitarios (Figura 15).

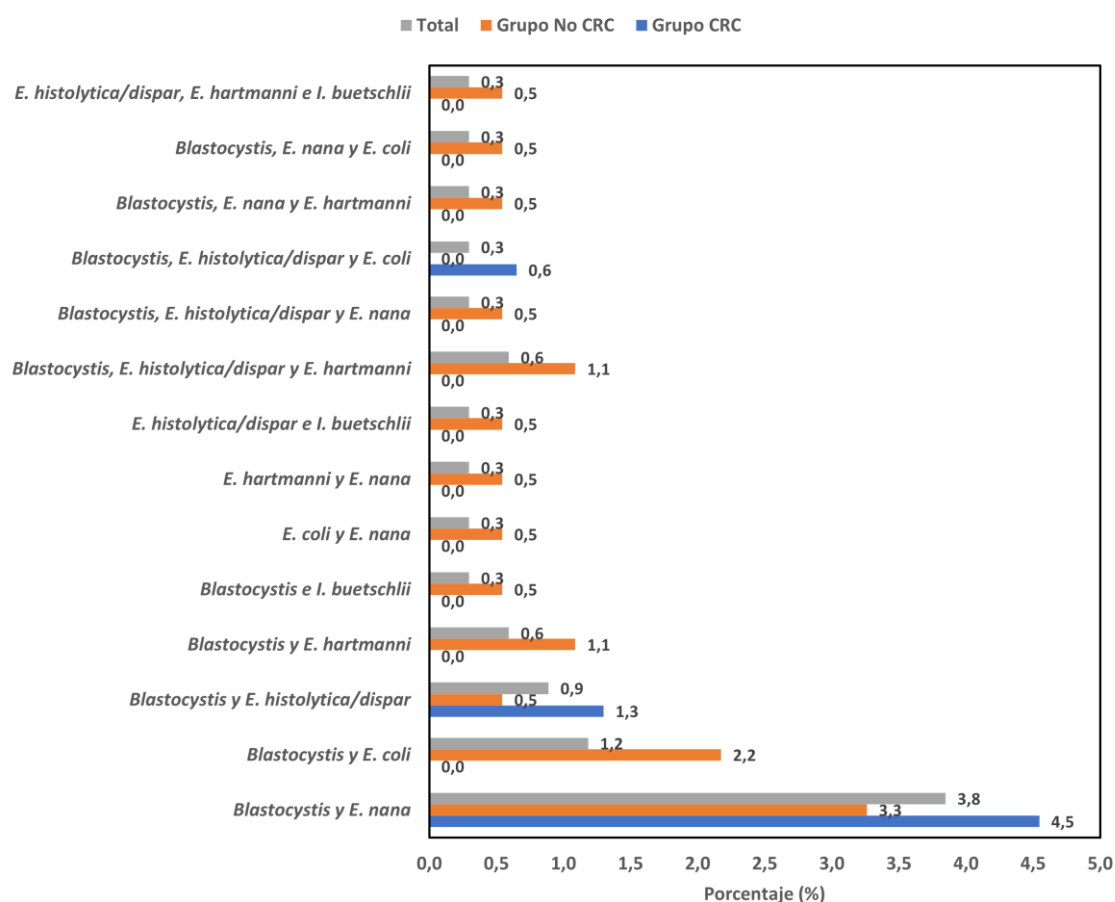


Figura 15. Coinfecciones por agentes parasitarios detectadas por técnicas de microscopía en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal.

4.10 Detección de agentes parasitarios y bacterianos por técnicas moleculares

El agente parasitario más frecuentemente detectado por técnicas moleculares fue *Blastocystis* (34,6 %, 117/338, IC 95 % 2,9 a 3,9), con frecuencias similares en el grupo CRC (35,7 %, 55/154) y en el grupo No CRC (33,7 %, 62/184), seguido de *G. duodenalis* (7,4 %, 25/338, IC 95 % 0,5 a 1,1), con frecuencias similares entre ambos grupos (8,4 %, 13/25 en el grupo CRC y 6,5 %, 12/25 en el grupo No CRC). Los casos de infección por *E. histolytica/dispar* detectados mediante técnicas de microscopía, se identificaron definitivamente como *E. dispar* (4,1 %, 14/338, IC 95 % 0,2 a 0,7) por técnicas moleculares. También se detectaron *D. fragilis* (0,6 %, 2/338, IC 95 % 0,0 a 0,2), *Cryptosporidium* spp. (0,3 %, 1/338, IC 95 % 0,0 a 0,1) y *Encephalitozoon* spp. (0,3 %, 1/338, IC 95 % 0,0 a 0,1) (Figura 16).

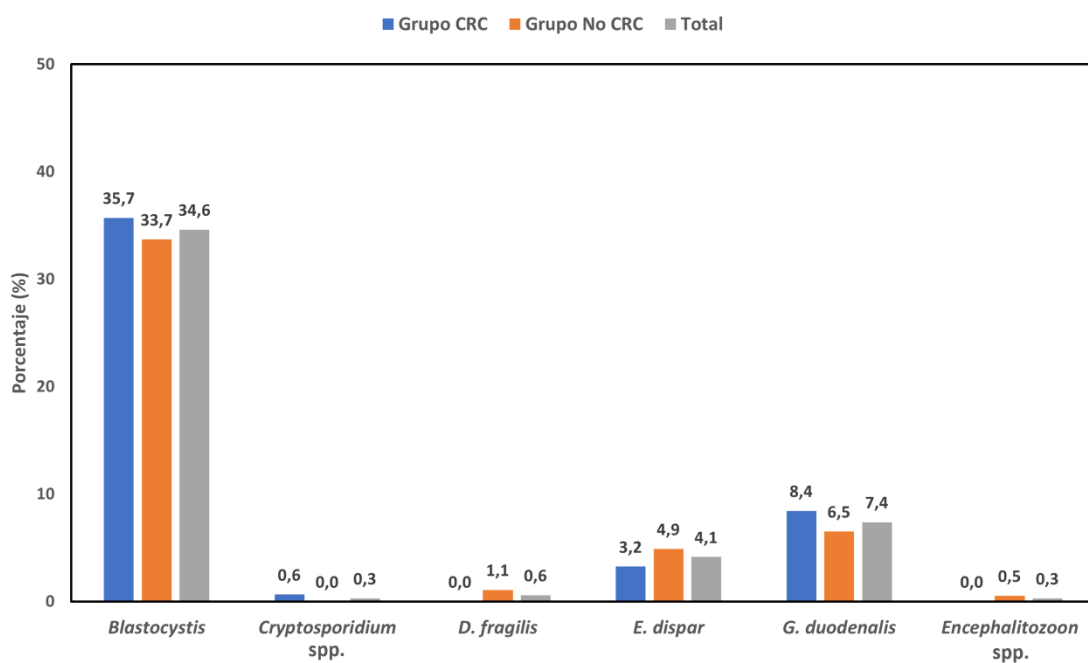


Figura 16. Agentes parasitarios detectados por técnicas moleculares en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal.

Por su parte, el agente bacteriano más frecuentemente detectado por técnicas moleculares fue EAEC (15,4 %, 52/338, IC 95 % 1,2 a 1,9), con frecuencias similares en el grupo CRC (17,5 %, 27/154) y en el grupo No CRC (13,6 %, 25/184), seguido de DAEC (12,7 %, 43/338, IC 95 % 1,0 a 1,8), también con porcentajes similares en ambos grupos (13,0 %, 20/154 en el grupo CRC y 12,5 %, 23/184 en el grupo No CRC) y aEPEC (10,7 %, 36/338, IC 95 % 0,7 a 1,4), de

nuevo con porcentajes similares en ambos grupos (10,4 %, 16/154 en el grupo CRC y 10,9 %, 20/184 en el grupo No CRC) (Figura 17).

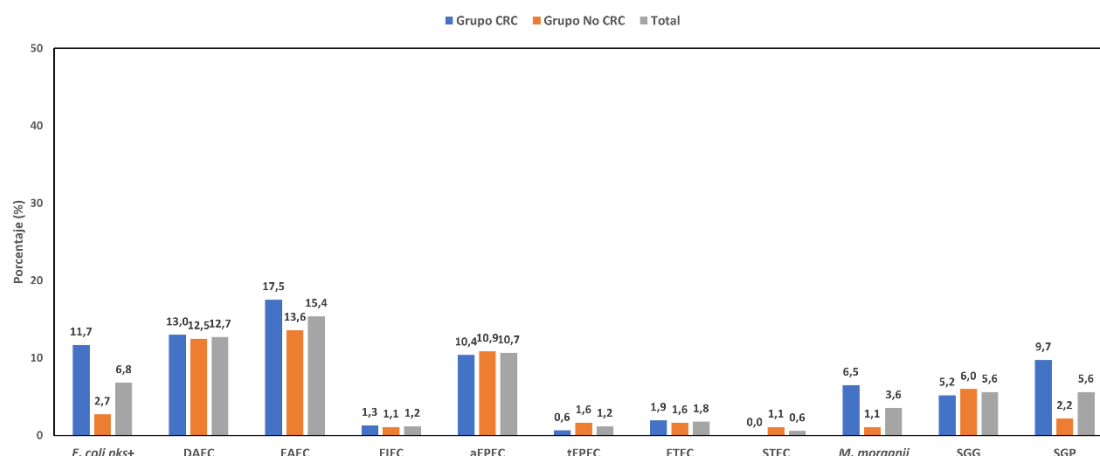


Figura 17. Agentes bacterianos detectados por técnicas moleculares en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal. aEPEC, *Escherichia coli* enteropatogénica atípica; CRC, cáncer colorrectal; DAEC, *Escherichia coli* con adherencia difusa, *E. coli pks+*, *E. coli* productora de colibactina; EAEC, *Escherichia coli* enteroagregativa; EIEC, *Escherichia coli* enteroinvasiva; ETEC, *Escherichia coli* enterotoxigénica; SGG, *Streptococcus gallolyticus* subespecie *gallolyticus*; SGP, *Streptococcus gallolyticus* subespecie *pasteurianus*; STEC, *Escherichia coli* productora de toxina Shiga; tEPEC, *Escherichia coli* enteropatogénica típica.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los participantes del grupo CRC y No CRC en la frecuencia de agentes parasitarios (Tabla 23). Sin embargo, sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los participantes del grupo CRC y No CRC en la frecuencia de tres agentes bacterianos, *E. coli pks+* ($p = 0,005$), *M. morganii* ($p = 0,018$) y SGP ($p = 0,009$). En concreto, los participantes con presencia de *E. coli pks+*, *M. morganii* o SGP en sus heces, tienen 3,9 (IC 95 % 1,4 a 10,9), 5,3 (IC 95 % 1,1 a 24,5) y 4,0 (IC 95 % 1,3 a 12,5) veces, respectivamente, mayor probabilidad de pertenecer al grupo CRC en comparación con los no portadores (Tabla 23).

RESULTADOS

Tabla 23. Agentes parasitarios y bacterianos detectados por técnicas moleculares en participantes pareados del estudio y distribuidos los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal. Los valores estadísticamente significativos han sido resaltados en negrita.

Variables	Total (n = 308) n (%)	Grupo CRC (n = 154) n (%)	Grupo No CRC (n = 154) n (%)	OR (IC 95%)	Valor p
<i>Blastocystis</i>	111 (36,0)	55 (35,7)	56 (36,4)	1,0 (0,6 a 1,6)	0,906
<i>Cryptosporidium</i> spp.	1 (0,3)	1 (0,6)	0 (0,0)	–	0,317
<i>D. fragilis</i>	2 (0,6)	0 (0,0)	2 (1,3)	–	0,156
<i>E. dispar</i>	14 (4,5)	5 (3,2)	9 (5,8)	0,5 (0,2 a 1,7)	0,274
<i>G. duodenalis</i>	23 (7,5)	13 (8,4)	10 (6,5)	1,3 (0,6 a 3,1)	0,516
<i>E. coli pks+</i>	23 (7,5)	18 (11,7)	5 (3,2)	3,9 (1,4 a 10,9)	0,005
DAEC	39 (12,7)	20 (13,0)	19 (12,3)	1,1 (0,5 a 2,1)	0,864
EAEC	48 (15,6)	27 (17,5)	21 (13,6)	1,4 (0,7 a 2,5)	0,346
EIEC	4 (1,3)	2 (1,3)	2 (1,3)	1,0 (0,1 a 7,2)	1,000
aEPEC	33 (10,7)	16 (10,4)	17 (11,0)	0,9 (0,5 a 1,9)	0,854
teEPEC	3 (1,0)	1 (0,6)	2 (1,3)	0,5 (0,1 a 5,5)	0,569
ETEC	4 (1,3)	3 (1,9)	1 (0,6)	3,0 (0,3 a 30,0)	0,314
STEC	1 (0,3)	0 (0,0)	1 (0,6)	–	0,317
<i>M. morgani</i>	12 (3,9)	10 (6,5)	2 (1,3)	5,3 (1,1 a 24,5)	0,018
SGG	19 (6,2)	8 (5,2)	11 (7,1)	0,7 (0,3 a 1,8)	0,477
SGP	19 (6,2)	15 (9,7)	4 (2,6)	4,0 (1,3 a 12,5)	0,009

aEPEC, *Escherichia coli* enteropatogénica atípica; CRC, cáncer colorrectal; DAEC, *Escherichia coli* con adherencia difusa; *E. coli pks+*, *E. coli* productora de colibactina; EAEC, *Escherichia coli* enteroagregativa; EIEC, *Escherichia coli* enteroinvasiva; ETEC, *Escherichia coli* enterotoxigénica; IC 95 %, intervalo de confianza del 95 %; OR, razón de probabilidad; SGG, *Streptococcus gallolyticus* subespecie *gallolyticus*; SGP, *Streptococcus gallolyticus* subespecie *pasteurianus*; STEC, *Escherichia coli* productora de toxina Shiga; teEPEC, *Escherichia coli* enteropatogénica típica.

En cuanto a la detección de ciclomodulinas en aislados DEC para valorar una posible presencia diferencial de los genes que codifican las principales ciclomodulinas descritas en *E. coli* en patotipos concretos, en total se obtuvieron 33 aislados DEC distribuidos en cinco patotipos: DAEC (13 aislados), EAEC (10 aislados), aEPEC (6 aislados), ETEC (2 aislados), DAEC/aEPEC (1 aislado) y EAEC/ETEC (1 aislado). Sin embargo, sólo en el 9,1 % (3/33) de los aislados se detectó algún gen de ciclomodulinas y sólo en los patotipos DAEC (1 aislado *cdt+*/*cnf+* y 1 aislado *cnf+*/*pks+*) y aEPEC (1 aislado *cdt+*/*cif+*) (Figura 18).

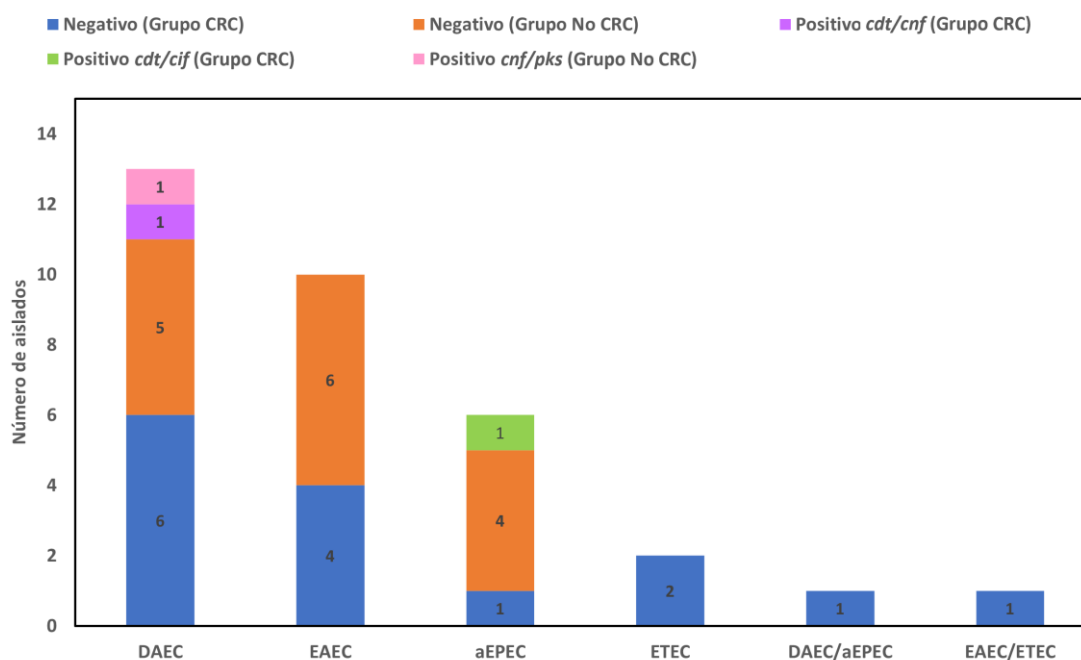


Figura 18. Presencia diferencial de genes que codifican ciclodulinas en aislados de patotipos de *Escherichia coli* diarreagénica. aEPEC, *Escherichia coli* enteropatogénica atípica; CRC, cáncer colorrectal; DAEC, *Escherichia coli* con adherencia difusa; EAEC, *Escherichia coli* enteroagregativa; ETEC, *Escherichia coli* enterotoxigénica; gen *cdt*, *cytolethal distending toxin* (gene); gen *cif*, *cycle-inhibiting factor* (gene); gen *cnf*, *cytotoxic necrotizing factor* (gene); gen *pks*, *polyketide synthase* (gene).

4.10.1 Coinfecciones de *Blastocystis* con otros agentes parasitarios y bacterianos

En total se detectaron 34 coinfecciones diferentes entre *Blastocystis* y otros agentes parasitarios y bacterianos englobando entre 2 y hasta 5 agentes infecciosos. La coinfección por *Blastocystis* y EAEC (3,2 %, 10/308, IC 95 % 0,3 a 3,5) fue la más frecuente, seguida de *Blastocystis* y EPEC (2,3 %, 7/308, IC 95 % 0,3 a 6,1) (Tabla 24). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los participantes del grupo CRC y No CRC en la frecuencia de las distintas coinfecciones detectadas (Tabla 24).

RESULTADOS

Tabla 24. Coinfecciones de *Blastocystis* con otros agentes parasitarios y bacterianos en participantes pareados del estudio y distribuidos en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal.

Variables	Total (n = 308) n (%)	Grupo CRC (n = 154) n (%)	Grupo No CRC (n = 154) n (%)	OR (IC 95%)	Valor p
DOS AGENTES INFECCIOSOS					
<i>Blastocystis</i> y EAEC	10 (3,2)	5 (3,2)	5 (3,2)	1,0 (0,3 a 3,5)	1,000
<i>Blastocystis</i> y EPEC	7 (2,3)	4 (2,6)	3 (1,9)	1,3 (0,3 a 6,1)	0,702
<i>Blastocystis</i> y DAEC	5 (1,6)	2 (1,3)	3 (1,9)	0,7 (0,1 a 4,0)	0,652
<i>Blastocystis</i> y <i>G. duodenalis</i>	5 (1,6)	5 (3,2)	0 (0,0)	–	0,101
<i>Blastocystis</i> y SGG	4 (1,3)	1 (0,6)	3 (1,9)	0,3 (0,0 a 3,2)	0,338
<i>Blastocystis</i> y <i>D. fragilis</i>	2 (0,6)	0 (0,0)	2 (1,3)	–	0,296
<i>Blastocystis</i> y <i>E. dispar</i>	2 (0,6)	1 (0,6)	1 (0,6)	1,0 (0,1 a 16,1)	1,000
<i>Blastocystis</i> y <i>M. morganii</i>	2 (0,6)	1 (0,6)	1 (0,6)	1,0 (0,1 a 16,1)	1,000
<i>Blastocystis</i> y SGP	2 (0,6)	2 (1,3)	0 (0,0)	–	0,296
<i>Blastocystis</i> y <i>E. coli pks+</i>	1 (0,3)	0 (0,0)	1 (0,6)	–	0,499
TRES AGENTES INFECCIOSOS					
<i>Blastocystis</i> , EAEC y ETEC	2 (0,6)	2 (1,3)	0 (0,0)	–	0,296
<i>Blastocystis</i> , EAEC y <i>E. coli pks+</i>	2 (0,6)	2 (1,3)	0 (0,0)	–	0,296
<i>Blastocystis</i> , EAEC y SGG	2 (0,6)	0 (0,0)	2 (1,3)	–	0,296
<i>Blastocystis</i> , DAEC y <i>E. coli pks+</i>	1 (0,3)	1 (0,6)	0 (0,0)	–	0,499
<i>Blastocystis</i> , DAEC y SGG	1 (0,3)	0 (0,0)	1 (0,6)	–	0,499
<i>Blastocystis</i> , <i>E. dispar</i> y DAEC	1 (0,3)	0 (0,0)	1 (0,6)	–	0,499
<i>Blastocystis</i> , <i>E. dispar</i> y EAEC	1 (0,3)	0 (0,0)	1 (0,6)	–	0,499
<i>Blastocystis</i> , <i>E. dispar</i> y EPEC	1 (0,3)	0 (0,0)	1 (0,6)	–	0,499
<i>Blastocystis</i> , EAEC y DAEC	1 (0,3)	1 (0,6)	0 (0,0)	–	0,499
<i>Blastocystis</i> , EAEC y EIEC	1 (0,3)	1 (0,6)	0 (0,0)	–	0,499
<i>Blastocystis</i> , EAEC y EPEC	1 (0,3)	0 (0,0)	1 (0,6)	–	0,499
<i>Blastocystis</i> , EAEC y <i>M. morganii</i>	1 (0,3)	0 (0,0)	1 (0,6)	–	0,499
<i>Blastocystis</i> , EIEC y DAEC	1 (0,3)	0 (0,0)	1 (0,6)	–	0,499
<i>Blastocystis</i> , <i>G. duodenalis</i> y SGG	1 (0,3)	0 (0,0)	1 (0,6)	–	0,499
<i>Blastocystis</i> , <i>M. morganii</i> y <i>E. coli pks+</i>	1 (0,3)	1 (0,6)	0 (0,0)	–	0,499
<i>Blastocystis</i> , SGG y SGP	1 (0,3)	1 (0,6)	0 (0,0)	–	0,499
<i>Blastocystis</i> , SGP y <i>M. morganii</i>	1 (0,3)	1 (0,6)	0 (0,0)	–	0,499
CUATRO AGENTES INFECCIOSOS					
<i>Blastocystis</i> , EAEC, DAEC y <i>E. coli pks+</i>	1 (0,3)	1 (0,6)	0 (0,0)	–	0,499
<i>Blastocystis</i> , EPEC, DAEC y SGP	1 (0,3)	0 (0,0)	1 (0,6)	–	0,499
<i>Blastocystis</i> , EPEC, DAEC y SGP	1 (0,3)	1 (0,6)	0 (0,0)	–	0,499

Variables	Total (n = 308) n (%)	Grupo CRC (n = 154) n (%)	Grupo No CRC (n = 154) n (%)	OR (IC 95%)	Valor p
<i>Blastocystis</i> , <i>G. duodenalis</i> , DAEC y <i>E. coli pks+</i>	1 (0,3)	1 (0,6)	0 (0,0)	–	0,499
CINCO AGENTES INFECCIOSOS					
<i>Blastocystis</i> , <i>E. dispar</i> , EAEC, EPEC, ETEC	1 (0,3)	0 (0,0)	1 (0,6)	–	0,499
<i>Blastocystis</i> , <i>E. dispar</i> , EPEC, SGP y <i>E. coli pks+</i>	1 (0,3)	1 (0,6)	0 (0,0)	–	0,499
<i>Blastocystis</i> , <i>G. duodenalis</i> , DAEC, SGP y <i>E. coli pks+</i>	1 (0,3)	1 (0,6)	0 (0,0)	–	0,499

CRC, cáncer colorrectal; DAEC, *Escherichia coli* con adherencia difusa, *E. coli pks+*, *E. coli* productora de colibactina; EAEC, *Escherichia coli* enteroagregativa; EIEC, *Escherichia coli* enteroinvasiva; EPEC, *Escherichia coli* enteropatogénica; ETEC, *Escherichia coli* enterotoxigénica; IC 95 %, intervalo de confianza del 95 %; OR, razón de probabilidad; SGG, *Streptococcus gallolyticus* subespecie *gallolyticus*; SGP, *Streptococcus gallolyticus* subespecie *pasteurianus*.

4.11 Genotipificación de agentes parasitarios y bacterianos

4.11.1 Genotipificación de *Blastocystis*

En las muestras positivas a *Blastocystis* del total de participantes reclutados en el estudio se identificaron un total de 11 ST diferentes. ST3 fue el subtipo más frecuente (59,0 %, 69/117, IC 95 % 0,7 a 3,5), seguido de ST1 (31,6 %, 37/117, IC 95 % 0,6 a 2,8) y ST2 (27,4 %, 32/117, IC 95 % 0,4 a 2,2). Entre los ST menos frecuentes y únicos en el grupo CRC se identificaron ST14, ST30 y ST44 (1,8 %, 1/55 en cada ST), y único en el grupo No CRC se identificó ST41 (1,6 %, 1/62), un nuevo subtipo no descrito hasta el momento (Figura 19).

RESULTADOS

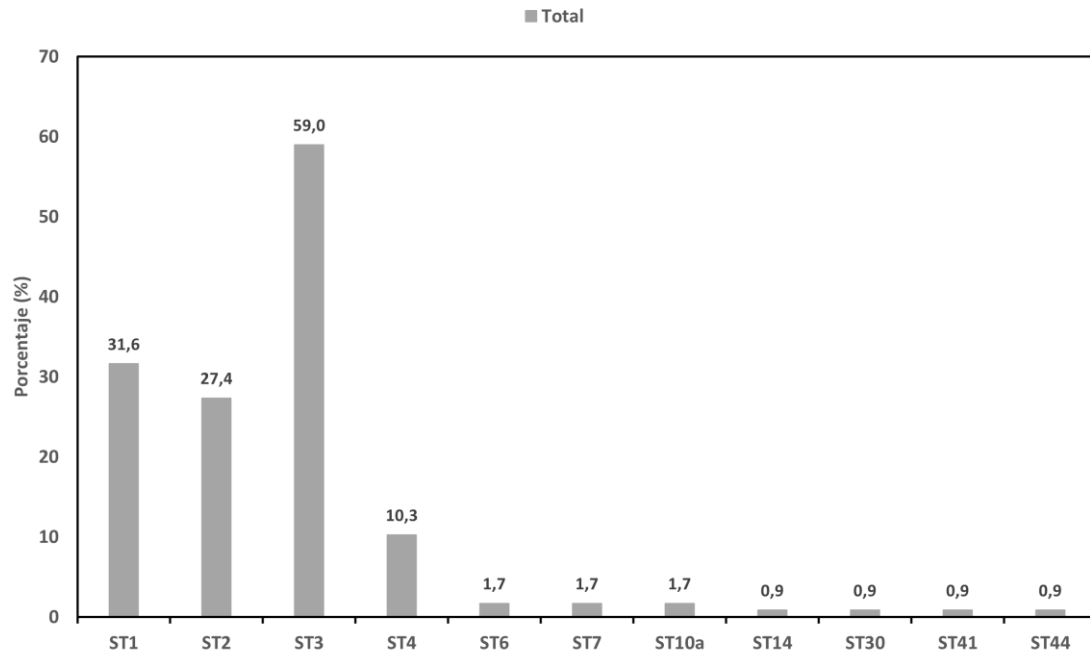


Figura 19. Frecuencia de los subtipos de *Blastocystis* en el total de participantes reclutados en el estudio. ST, subtipo.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias de los distintos ST de *Blastocystis* detectados en los participantes del grupo CRC y No CRC (Figura 20).

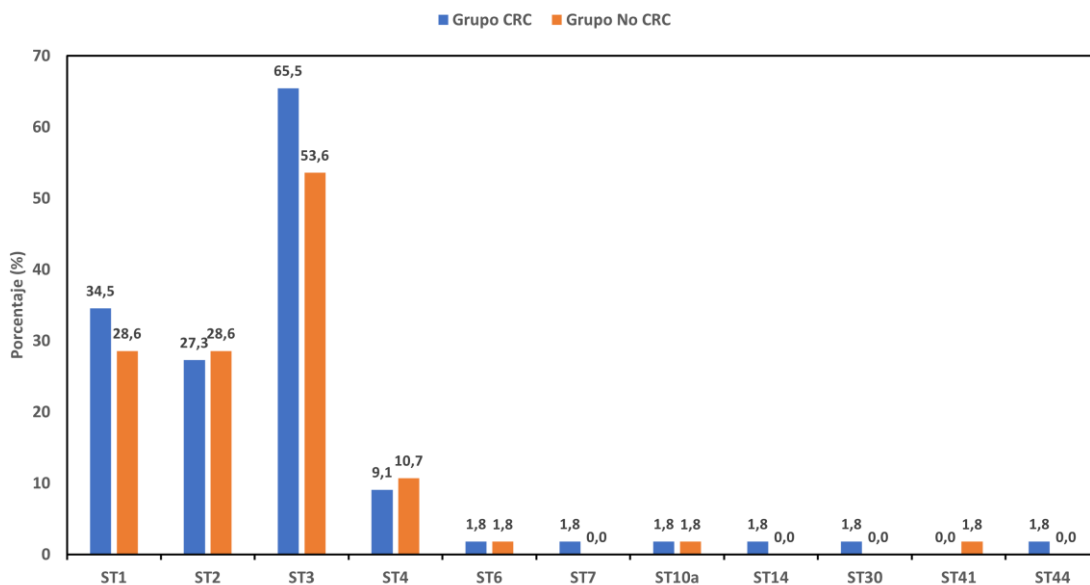


Figura 20. Distribución de los subtipos de *Blastocystis* en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal. CRC, cáncer colorrectal; ST, subtipo.

Para la asignación y validación formal de un nuevo ST (ST41), a partir de la muestra correspondiente se obtuvo la secuencia nucleotídica completa del gen *ssu*-rRNA mediante secuenciación de tercera generación (Oxford Nanopore). En los correspondientes análisis filogenéticos realizados a partir de la secuencia completa, este aislado varió al menos en un 98% con respecto a todos los ST válidos reconocidos hasta el momento (Figura suplementaria 1), incluido ST17, con el que forma un clúster con el 100 % de *bootstrap* (Figura 21), lo que permitió designar un nuevo ST con el nombre de ST41.

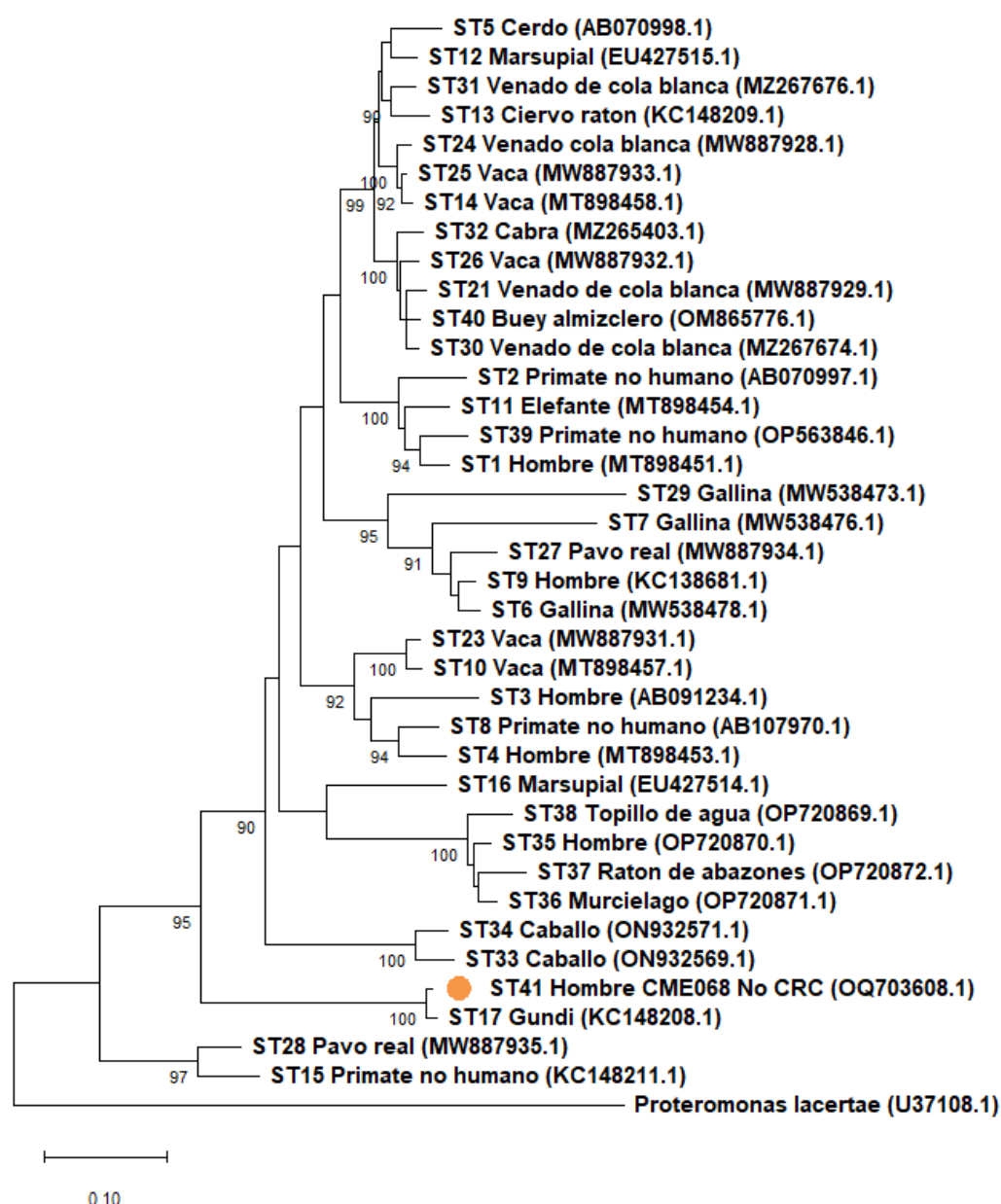


Figura 21. Árbol filogenético resultante del análisis de secuencias nucleotídicas completas del gen codificante para la subunidad menor del RNA ribosómico (*ssu*-rRNA) de *Blastocystis* procedentes de la muestra identificada con el nuevo subtipo ST41 en este estudio (círculo de color naranja, grupo No CRC) y de los restantes 36 subtipos actualmente aceptados disponibles en GenBank. ST, subtipo.

4.11.2 Coinfecciones por distintos subtipos de *Blastocystis*

La genotipificación de las muestras positivas a *Blastocystis* basada en secuenciación de nueva generación, permitió identificar coinfecciones por diferentes ST en una misma muestra. En concreto, se detectaron coinfecciones por dos o más subtipos de *Blastocystis* en 29 muestras (51,7 %, 15/29 en el grupo CRC y 48,3 %, 14/29 en el grupo No CRC) con 9 combinaciones distintas de entre dos y seis ST distintos. Concretamente en el grupo CRC las coinfecciones más frecuentes fueron ST1/ST3 (7,3 %, 4/55, IC 95 % 0,2 a 3,5), seguido de ST1/ST2/ST3 (5,5 %, 3/55). En el grupo No CRC, la coinfección más frecuente fue ST1/ST3 (8,1 %, 5/62, IC 95 % 0,2 a 3,5), seguido de ST3/ST4 (4,8 %, 3/62, IC 95 % 0,1 a 4,6) (Figura 22).

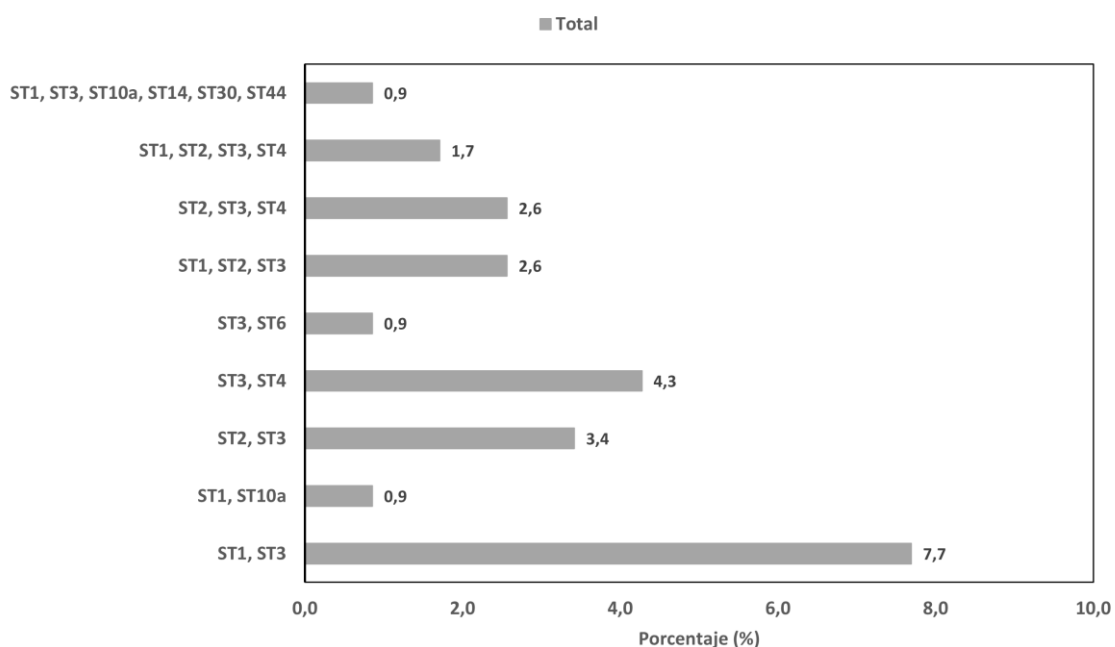


Figura 22. Frecuencia de coinfecciones de distintos subtipos de *Blastocystis* en el total de participantes reclutados en el estudio. ST, subtipo.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias de las distintas coinfecciones de ST de *Blastocystis* detectados en los participantes del grupo CRC y No CRC (Figura 23).

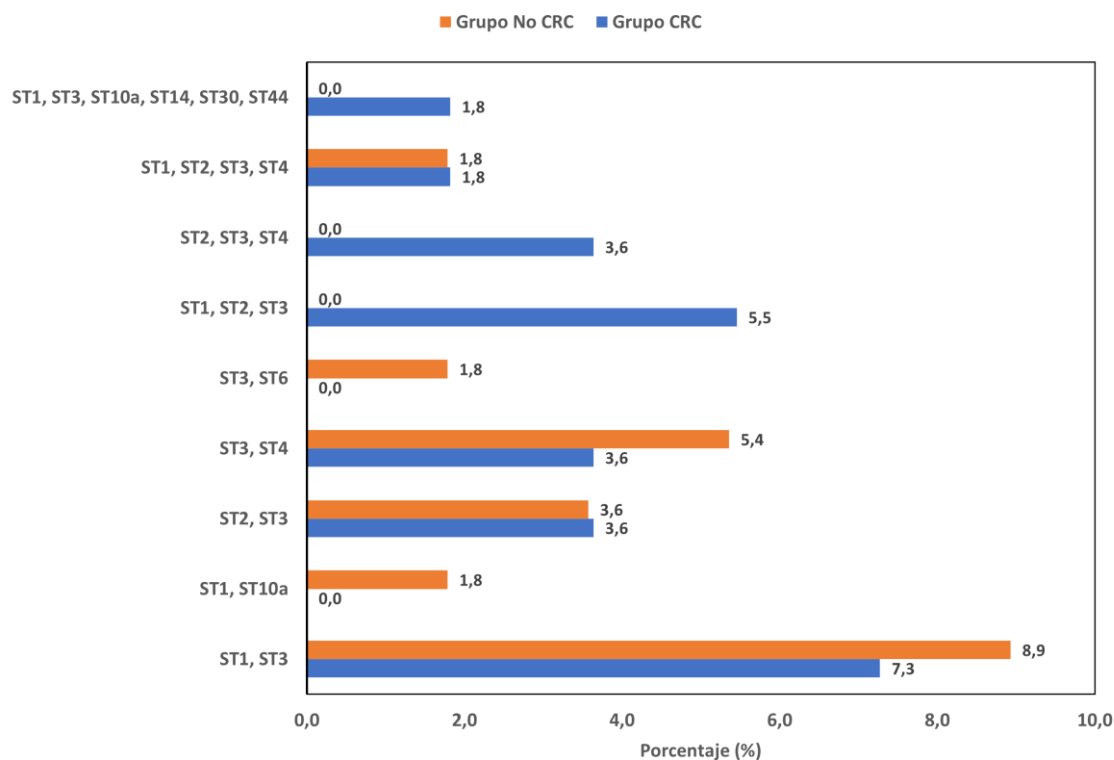


Figura 23. Coinfecciones por distintos subtipos de *Blastocystis* en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal. ST, subtipo.

4.11.3 Diversidad intrasubtipo en *Blastocystis*

La secuenciación de nueva generación de las muestras positivas a *Blastocystis* del total de participantes reclutados permitió investigar asimismo la diversidad genética existente dentro de un mismo ST (diversidad intrasubtipo). En total se detectaron 103 variantes únicas entre los 11 subtipos identificados en el estudio (Tabla 25). El subtipo que mostró una mayor variabilidad en términos absolutos fue ST7, un subtipo poco frecuente (solo detectado en 2 muestras en el estudio), en el que sin embargo se identificaron 16 variantes únicas. Entre los cuatro subtipos más frecuentes en el estudio (ST3, ST1, ST2 y ST4), también se observaron notables diferencias de diversidad. Por un lado, ST1 mostró una gran variabilidad con 30 variantes únicas en 37 muestras positivas. De forma similar ST2 mostró una gran variabilidad con 25 variantes únicas en 32 muestras positivas. Sin embargo, ST3 presentó una variabilidad menor con 23 variantes únicas en 69 muestras positivas y ST4 mostró una variabilidad escasa con 2 variantes únicas en 12 muestras positivas (Tabla 25).

Con frecuencia, cada muestra albergó múltiples variantes únicas de un mismo ST, si bien este aspecto varió considerablemente entre distintos ST, en la misma línea observada en la

RESULTADOS

variabilidad en términos absolutos. Así, mientras que las muestras positivas a ST3 albergaron una sola variante única, en las muestras positivas a ST1 se observaron coinfecciones de 2 y hasta 3 variantes únicas de ST1 en el 43,2 y el 5,4 % de los casos, respectivamente. En las muestras positivas a ST2 se observaron coinfecciones de 2 y hasta 3 variantes únicas de ST2 en el 62,5 y el 3,1 % de los casos, respectivamente. Nuevamente, el caso más extremo fue ST7, en el que las dos únicas muestras positivas albergaron coinfecciones de 7 y 9 variantes únicas de ST7 (Tabla 25).

Tabla 25. Diversidad intrasubtipo de *Blastocystis* identificadas en el total de participantes reclutados en el estudio.

Subtipo (número de muestras positivas)	Número de variantes distintas intrasubtipo	Coinfección intrasubtipo en una misma muestra	Total n (%)
ST1 (n = 37)	30	1 variante	19 (51,4)
		2 variantes	16 (43,2)
		3 variantes	2 (5,4)
ST2 (n = 32)	25	1 variante	11 (34,4)
		2 variantes	20 (62,5)
		3 variantes	1 (3,1)
ST3 (n = 69)	23	1 variante	69 (100,0)
ST4 (n = 12)	2	1 variante	12 (100,0)
ST6 (n = 2)	2	1 variante	2 (100,0)
ST7 (n = 2)	16	7 variantes	1 (50,0)
		9 variantes	1 (50,0)
ST10a (n = 2)	1	1 variante	2 (100,0)
ST14 (n = 1)	1	1 variante	1 (100,0)
ST30 (n = 1)	1	1 variante	1 (100,0)
ST41 (n = 1)	1	1 variante	1 (100,0)
ST44 (n = 1)	1	1 variante	1 (100,0)

ST, subtipo.

La Tabla 26 relaciona para cada ST de *Blastocystis*, la cantidad de muestras con cada variante intrasubtipo y su distribución en los grupos CRC y No CRC. Las variantes únicas identificadas en los cuatro subtipos más frecuentes (ST3, ST1, ST2 y ST4) se distribuyeron de forma relativamente uniforme entre las muestras de los grupos CRC y No CRC, y en todos los casos se observaron variantes comunes a ambos grupos y variantes específicas de grupo (Tabla 26). Valorando la diversidad intrasubtipo entre los participantes del grupo CRC y No CRC, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 26).

Tabla 26. Información de las variantes únicas intrasubtipo de *Blastocystis* identificadas en muestras individuales de participantes en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal.

Subtipo	Variantes intrasubtipo	Número de muestras que contienen la variante	Número de muestras que contienen la variante Grupo CRC	Número de muestras que contienen la variante Grupo No CRC
ST1	uniq-9	6	4	2
	uniq-10	5	3	2
	uniq-11	3	1	2
	uniq-12	3	1	2
	uniq-13	1	1	0
	uniq-18	3	3	0
	uniq-20	4	0	4
	uniq-24	2	0	2
	uniq-25	3	2	1*
	uniq-30	1	0	1
	uniq-39	2	1	1*
	uniq-44	1	1	0
	uniq-47	2	2	0
	uniq-49	3	1	2
	uniq-51	1	0	1
	uniq-52	2	1	1*
	uniq-55	1	0	1
	uniq-61	1	1	0
	uniq-66	1	1	0
	uniq-71	1	0	1
	uniq-74	1	0	1
	uniq-75	2	2	0
	uniq-78	1	1	0
	uniq-84	1	1	0
	uniq-90	1	1	0
	uniq-91	1	0	1*
	uniq-95	1	0	1
	uniq-103	1	0	1
	uniq-108	1	0	1*

RESULTADOS

Subtipo	Variantes intrasubtipo	Número de muestras que contienen la variante	Número de muestras que contienen la variante Grupo CRC	Número de muestras que contienen la variante Grupo No CRC
	uniq-111	1	0	1
ST2	uniq-5	6	1	5
	uniq-15	8	4	4
	uniq-16	2	1	1
	uniq-17	4	2	2
	uniq-22	4	1	3
	uniq-32	1	1	0
	uniq-36	1	1	0
	uniq-42	1	0	1
	uniq-43	2	0	2
	uniq-46	2	2	0
	uniq-48	2	0	2
	uniq-53	1	0	1
	uniq-57	1	0	1
	uniq-58	4	3	1*
	uniq-59	1	0	1
	uniq-60	1	0	1
	uniq-65	4	3	1*
	uniq-73	1	1	0
	uniq-76	1	0	1
	uniq-79	2	2	0
	uniq-82	1	1	0
	uniq-86	1	1	0
	uniq-89	1	0	1
	uniq-96	1	0	1
	uniq-102	1	1	0
ST3	uniq-1	23	9	14*
	uniq-2	5	3	2
	uniq-3	6	5	1
	uniq-4	4	1	3
	uniq-7	4	3	1
	uniq-8	2	2	0
	uniq-14	2	1	1
	uniq-19	2	0	2
	uniq-21	4	0	4*
	uniq-23	2	2	0
	uniq-27	1	0	1
	uniq-29	1	0	1
	uniq-31	1	1	0
	uniq-33	1	1	0
	uniq-35	1	1	0
	uniq-37	1	1	0
	uniq-38	2	2	0

Subtipo	Variantes intrasubtipo	Número de muestras que contienen la variante	Número de muestras que contienen la variante Grupo CRC	Número de muestras que contienen la variante Grupo No CRC
ST3	uniq-50	1	0	1
	uniq-54	2	1	1
	uniq-68	1	0	1*
	uniq-81	1	1	0
	uniq-105	1	1	0
	uniq-110	1	1	0
ST4	uniq-6	11	4	7*
	uniq-109	1	1	0
ST6	uniq-28	1	1	0
	uniq-62	1	0	1
ST7	uniq-40	1	0	1*
	uniq-64	1	1	0
	uniq-67	1	0	1*
	uniq-69	1	0	1*
	uniq-72	1	1	0
	uniq-77	1	1	0
	uniq-83	1	1	0
	uniq-87	1	1	0
	uniq-92	1	0	1*
	uniq-93	1	1	0
	uniq-97	1	0	1*
	uniq-98	1	0	1*
	uniq-99	1	0	1*
	uniq-101	1	0	1*
	uniq-104	1	0	1*
	uniq-106	1	1	0
ST10a	uniq-88	2	1	1
ST14	uniq-94	1	1	0
ST30	uniq-80	1	1	0
ST41	uniq-34	1	0	1
ST44	uniq-100	1	1	0

* Variante identificada en una muestra fuera del grupo pareado de comparación. CRC, cáncer colorrectal; ST, subtipo.

4.11.4 Genotipificación de otros agentes parasitarios

Las 25 muestras positivas a *G. duodenalis* en RT-PCR fueron halladas en participantes reclutados de ambos grupos (13 del CRC y 12 del No CRC). Los valores de C_T obtenidos variaron entre el 24,6 y el 38,6 (mediana: 34,9). El 92,0 % (23/25) de estas muestras tenían valores de $C_T \geq 32$. La genotipificación sólo fue posible en dos de las muestras (CLA063 y CME042), ambas con

RESULTADOS

valores de $C_T < 32$ y pertenecientes al grupo No CRC (Figura 24). Ambas muestras fueron confirmadas como *assemblage* B en el marcador *ssu*-rRNA. La muestra CME042 pudo ser amplificada además en el marcador *gdh* (pero no en los marcadores *bg* ni *tpi*), siendo identificada como *sub-assemblage* BIV. La muestra CLA063 no pudo ser amplificada en ninguno de los marcadores *bg*, *gdh* ni *tpi*, por lo que no fue posible determinar su *sub-assemblage*.

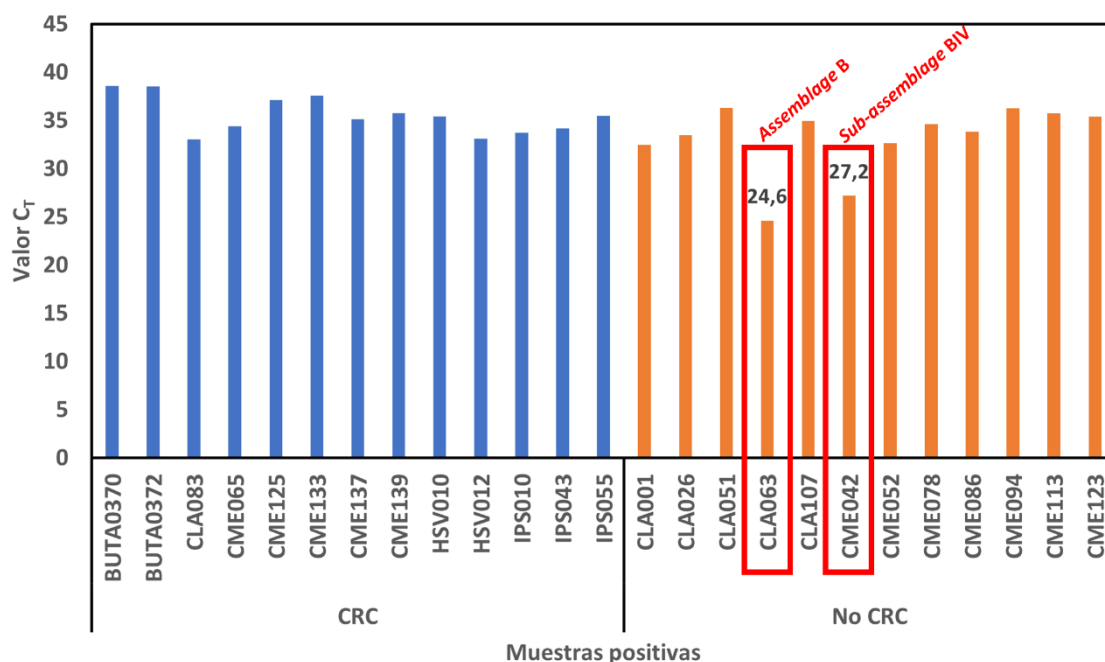


Figura 24. Muestras de heces positivas a *Giardia duodenalis* empleando el ensayo de RT-PCR en los grupos con (CRC) y sin (No CRC) cáncer colorrectal. En el recuadro en rojo se indican las dos muestras genotipificadas como *assemblage* B y *sub-assemblage* BIV. CRC, cáncer colorrectal; C_T , umbral de ciclo.

Las dos muestras positivas a *D. fragilis* fueron halladas en participantes del grupo No CRC. La genotipificación sólo fue posible en uno de ellos que en concreto perteneció al Genotipo 1.

La única muestra de heces positiva a *Cryptosporidium* spp. fue hallada en un paciente del grupo CRC. La genotipificación en el marcador *ssu*-rRNA permitió su identificación como *Cryptosporidium parvum*. El fragmento de DNA amplificado contenía los SNP T590A, A646G, T649G, 686_689DelTAAT, A691T, A892G y A993G. Esta muestra no pudo ser amplificada en el marcador *gp60*, por lo que ni su familia ni su subtipo pudieron ser determinados.

4.11.5 Genotipificación de agentes bacterianos

Las 12 muestras positivas a *M. morganii* del total de participantes reclutados fueron halladas en participantes de ambos grupos (10 del CRC y 2 del No CRC). Se logró aislar la bacteria en cultivo a partir de cinco de ellas, cuatro procedentes del grupo CRC y una del grupo No CRC. Los aislados obtenidos se genotipificaron mediante la secuenciación del genoma completo. El análisis comparativo de estos cinco genomas entre sí y con respecto a otros 35 genomas de *M. morganii* disponibles en GenBank permitió construir el árbol filogenético que se muestra en la Figura 25.



Figura 25. Árbol filogenético resultante del análisis de la matriz de polimorfismos de nucleótido único (SNP) generada a partir de los genomas completos de los 5 aislados de *Morganella morganii* obtenidos en este estudio (color azul, grupo CRC; color naranja, grupo No CRC) y otros 35 genomas de diferentes orígenes disponibles en GenBank. CRC, cáncer colorrectal.

4.12 Comparación de técnicas diagnósticas empleadas en la detección de *Blastocystis*

En el caso particular de *Blastocystis*, en el que se llevó a cabo un abordaje diagnóstico más amplio y completo que en el resto de los agentes, por considerarse el principal factor microbiológico objeto de estudio en esta tesis doctoral, se compararon los resultados obtenidos mediante diferentes abordajes diagnósticos en el total de participantes reclutados en el estudio ($n = 338$). En la Figura 26 se muestran las frecuencias de detección de *Blastocystis* encontradas con cada abordaje diagnóstico, que oscilaron entre el 31,7 y el 34,6 %.

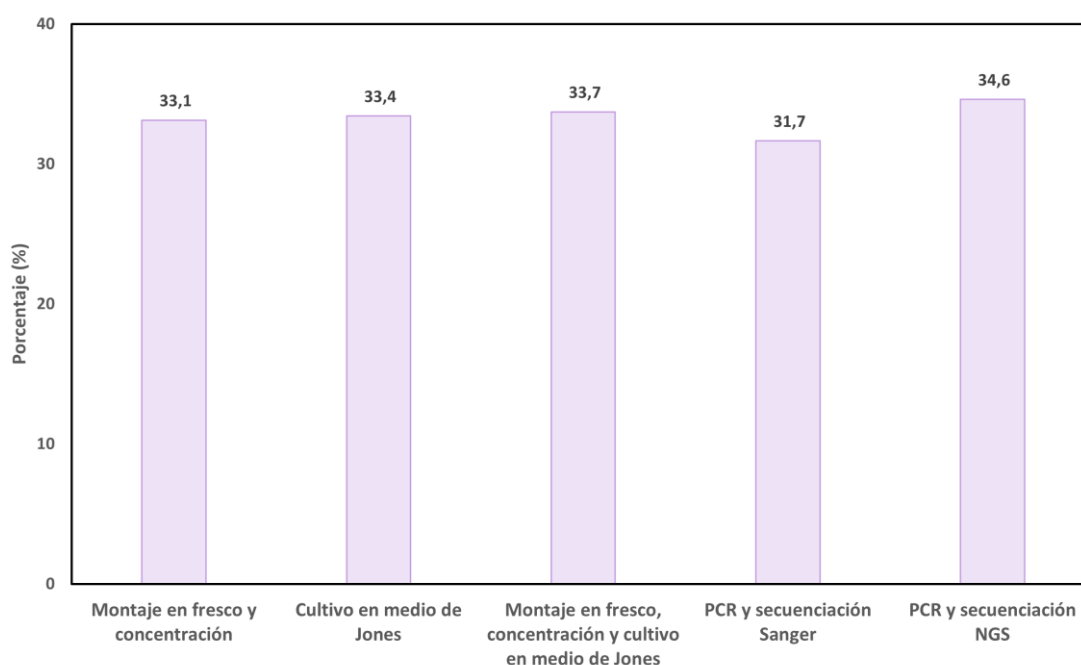


Figura 26. Frecuencia de la detección de *Blastocystis* empleando diferentes aproximaciones diagnósticas. NGS, secuenciación de nueva generación; PCR, reacción en cadena de la polimerasa.

Se calcularon los índices kappa comparando los diferentes abordajes diagnósticos empleados en la detección de *Blastocystis*, resultando en unos valores de concordancia entre las diferentes pruebas que oscilaron entre 0,777 (montaje en fresco y concentración en comparación con ensayos de PCR y la subsecuente secuenciación Sanger) y 0,993 (cultivo en medio de Jones en comparación con montaje en fresco, concentración y cultivo en medio de Jones) (Tabla 27).

Todos los abordajes que incluyeron técnicas de microscopía (montaje en fresco y concentración, sólo cultivo en medio de Jones o montaje en fresco, concentración y cultivo en medio de Jones) tuvieron un desempeño similar en la detección de *Blastocystis*, con valores de kappa cercanos a 1,0, de tal manera que indican que, la concordancia entre estas técnicas es casi perfecta (Tabla 27). Esto mismo ocurre al comparar las técnicas moleculares entre sí (ensayo de PCR y secuenciación Sanger con ensayo de PCR y secuenciación NGS).

En relación con la comparación entre la detección de *Blastocystis* por técnicas de microscopía y la detección por técnicas moleculares, se encontraron valores de kappa cercanos a 0,8, de tal manera que indican que, la concordancia entre estas técnicas es considerable, aunque no perfecta, de donde se deduce la conveniencia de emplear técnicas de microscopía y técnicas moleculares de forma complementaria.

Tabla 27. Comparación de la prevalencia de *Blastocystis* observada con diferentes abordajes diagnósticos en función del índice kappa.

	Montaje en fresco y concentración	Cultivo en medio de Jones	Montaje en fresco, concentración y cultivo en medio de Jones	PCR y secuenciación Sanger	PCR y secuenciación NGS
Montaje en fresco y concentración	–	0,980	0,987	0,777	0,783
Cultivo en medio de Jones	–	–	0,993	0,784	0,789
Montaje en fresco, concentración y cultivo en medio de Jones	–	–	–	0,778	0,783
PCR y secuenciación Sanger	–	–	–	–	0,920
PCR y secuenciación NGS	–	–	–	–	–

NGS, secuenciación de nueva generación; PCR, reacción en cadena de la polimerasa.

DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

En Colombia, el CRC ocupa el tercer lugar en incidencia y mortalidad entre los diferentes tipos de cáncer diagnosticados en la población adulta y por tanto constituye un problema principal de salud pública. Como se ha indicado anteriormente (sección 1.2.4), se trata de una enfermedad compleja en la que participan diferentes factores de riesgo, entre los que se incluyen factores genéticos, ambientales o conductuales y microbiológicos.

5.1 Factores microbiológicos

En relación con los factores microbiológicos, *Blastocystis* es un protista intestinal frecuentemente identificado en todo el mundo, con independencia de su papel controvertido como patógeno gastrointestinal. *Blastocystis* es especialmente prevalente en individuos en Colombia, donde comparativamente ha recibido una mayor atención por parte de microbiólogos y clínicos en comparación con otros países de rentas similares o superiores. *Blastocystis* es un agente parasitario que infecta/coloniza el intestino grueso del hombre incluso por periodos prolongados de tiempo (Hernández-Castro *et al.*, 2023a; Scanlan *et al.*, 2014). Esta persistencia de *Blastocystis* en el tracto gastrointestinal podría contribuir al desarrollo de procesos inflamatorios o de disbiosis, condiciones que se han vinculado sistemáticamente al desarrollo de neoplasias colorrectales (Mármol *et al.*, 2017).

Si bien la bibliografía recoge una serie de estudios que ponen de manifiesto una posible asociación entre la presencia de *Blastocystis* y el desarrollo de CRC, es preciso analizar pormenorizada y críticamente cada uno de ellos, con especial atención a su diseño metodológico, para poder valorar el grado de evidencia que estos estudios pueden llegar a aportar. Por otro lado, esta revisión crítica requiere inevitablemente el reanálisis estadístico de los datos originales en muchos de estos estudios (Tabla 28), ya que con frecuencia presentan errores que pueden conducir al establecimiento de conclusiones que generan confusión. La existencia o ausencia de asociación debe sustentarse necesariamente en un estudio de casos y controles, en el que individuos con una enfermedad o condición particular (los casos) son seleccionados para compararlos con una serie de individuos en los que la enfermedad o condición está ausente (los controles). Casos y controles se comparan respecto a atributos o exposiciones presentes o pasadas cuya relación con el desarrollo de la enfermedad o condición

bajo estudio se presupone. Aunque es deseable que los casos constituyan una muestra representativa de la población de sujetos con la enfermedad, es esencial elegir unos controles representativos y comparables a los casos incluidos en el estudio. En este sentido, para evitar o al menos minimizar la introducción de sesgos, lo ideal es conseguir que tanto los casos como los controles provengan de una misma población de estudio.

Entre todos los estudios de este tipo recogidos en la bibliografía, cabe destacar, por su diseño metodológico, especialmente dos. El primero de ellos se realizó en Uzbekistán, con un grupo de 200 pacientes con diagnóstico de CRC (casos) y un grupo de 200 individuos sin enfermedades gastrointestinales (controles), pareados por sexo y edad (Toychiev *et al.*, 2018). En este estudio la detección de *Blastocystis* se llevó a cabo exclusivamente por técnicas de microscopía y se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) en la frecuencia de *Blastocystis* entre los casos (80,0 %, 160/200) y los controles (18,0 %, 36/200) (Toychiev *et al.*, 2018). En concreto, se concluyó que los participantes portadores de *Blastocystis* tenían 18 (IC 95 % 11,0 a 30,0) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo de casos en comparación con los no portadores (Toychiev *et al.*, 2018) (Tabla 28). Desde el punto de vista metodológico, este estudio de casos y controles cuenta con un buen tamaño muestral y con un pareamiento adecuado de los grupos de comparación, lo que en principio avalaría la validez de los resultados obtenidos. Sin embargo, es preciso destacar que la detección de *Blastocystis*, como muchos otros agentes parasitarios, mediante técnicas de microscopía requiere un entrenamiento y experiencia por parte del microscopista suficientes para garantizar la validez del diagnóstico realizado. Es por ello por lo que, en un estudio como éste, dada la trascendencia de las conclusiones que establece, sería altamente recomendable la validación, parcial o total, de los resultados diagnósticos obtenidos mediante el uso de una técnica confirmatoria como la PCR. El segundo de los estudios destacados se realizó en Emiratos Árabes Unidos, con un grupo de 52 pacientes con diagnóstico de cáncer, subdividido en 15 pacientes con CRC (casos) y 37 pacientes con cáncer fuera del tracto gastrointestinal, y un grupo de 52 individuos sin cáncer (controles), pareados por sexo y edad (Labania *et al.*, 2023). En este segundo estudio, la detección de *Blastocystis* se llevó a cabo mediante la combinación de técnicas de microscopía y moleculares y se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,001$) en la frecuencia de *Blastocystis* entre los casos (60,0 %, 9/15) y los controles (17,3 %, 9/52) (Labania *et al.*, 2023). En concreto, se concluyó que los participantes portadores de *Blastocystis* tenían 7,1 (IC 95 % 2,0 a 25,2) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo de casos en comparación con los no portadores (Labania *et al.*, 2023) (Tabla 28). A diferencia del trabajo de Toychiev *et al.* antes mencionado, y a pesar de usar técnicas moleculares confirmatorias, este

segundo estudio cuenta con un tamaño muestral muy reducido (104 participantes). Aún más importante es el hecho de que dentro de los 52 pacientes con diagnóstico de cáncer tan solo 15 tenían CRC, que son los únicos que constituirían el grupo de casos, lo que reduce considerablemente (a sólo 67 participantes) un tamaño muestral ya de por sí insuficiente. Por otro lado, en lo que respecta al pareamiento de los grupos de comparación, el estudio presenta dos limitaciones especialmente destacables. Así, atendiendo a los datos que se muestran en el estudio resulta imposible establecer cuáles de los 52 controles se seleccionaron de forma pareada con los 15 casos, lo que dificulta la comparación de los datos de frecuencia entre grupos de comparación pareados. A esta dificultad en el pareamiento de casos y controles hay que añadir el hecho de que se incluyeran en el estudio participantes de distintas nacionalidades procedentes de África, América, Sudeste asiático, Europa, Mediterráneo oriental y Pacífico occidental, incumpliendo el principio básico de que tanto los casos como los controles provengan de una misma población de estudio, imprescindible en este tipo de estudios, como se ha comentado anteriormente.

Al margen de los dos estudios mencionados anteriormente (Labania *et al.*, 2023; Toychiev *et al.*, 2018), en la bibliografía se recogen otros cuatro estudios de casos y controles en los que también se refiere una asociación entre la presencia de *Blastocystis* y el desarrollo de CRC, pero con un diseño metodológico que no contempla el pareamiento por sexo y edad de los grupos de comparación. Dos de ellos, realizados en Malasia y Polonia (Kumarasamy *et al.*, 2014; Sulżyc-Bielicka *et al.*, 2021), contaban con un tamaño muestral adecuado (204 casos versus 221 controles y 107 casos versus 124 controles, respectivamente) y emplearon técnicas moleculares y de microscopía, respectivamente, para la detección de *Blastocystis*. Estos estudios encontraron una mayor frecuencia de *Blastocystis* en casos que en controles, diferencias que en ambos estudios resultaron estadísticamente significativas ($p = 0,001$ y $p = 0,003$, respectivamente). En concreto, los autores de estos estudios concluyeron que los participantes portadores de *Blastocystis* tenían respectivamente 2,4 (IC 95 % 1,4 a 4,2) y 5,5 (IC 95 % 1,5 a 20,1) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo de casos en comparación con los no portadores (Kumarasamy *et al.*, 2014; Sulżyc-Bielicka *et al.*, 2021) (Tabla 28). Los dos estudios restantes, realizados en Irán y Arabia Saudita (Mahmoudvand *et al.*, 2021; Mohamed *et al.*, 2017), con 67 casos versus 67 controles y 74 casos versus 80 controles, respectivamente, empleando una combinación de técnicas de microscopía y moleculares para la detección de *Blastocystis* también encontraron una mayor frecuencia de *Blastocystis* en casos que en controles, diferencias que en ambos estudios resultaron estadísticamente significativas ($p = 0,019$ y $p = 0,027$, respectivamente). En concreto, se concluyó que los participantes portadores

de *Blastocystis* tenían respectivamente 3,2 (IC 95 % 1,2 a 8,7) y 2,4 (IC 95 % 1,1 a 5,2) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo de casos en comparación con los no portadores (Mahmoudvand *et al.*, 2021; Mohamed *et al.*, 2017) (Tabla 28). Sin embargo, además de no contemplar el pareamiento por sexo y edad de los grupos de comparación, ambos estudios contaban con un tamaño muestral claramente insuficiente.

Además de los estudios anteriormente mencionados que apuntan a una posible asociación entre la presencia de *Blastocystis* y el desarrollo de CRC, la bibliografía recoge otros estudios de casos y controles que sin embargo no han podido constatar dicha asociación. Así, en un estudio realizado en Egipto, con un grupo de 100 pacientes con diagnóstico de CRC (casos) y un grupo de 100 individuos sin cáncer (controles) pareados por sexo y edad, empleando técnicas de microscopía Ali *et al.* (2022) no encontraron una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,156$) en la frecuencia de *Blastocystis* entre los casos (52,0 %, 52/100) y los controles (42,0 %, 42/100) (Ali *et al.*, 2022) (Tabla 28). En la misma línea, en un estudio realizado en Arabia Saudita, con un grupo de 75 pacientes con diagnóstico de CRC (casos) y un grupo de 25 pacientes sin cáncer, pero con enfermedades en tracto gastrointestinal (controles), pareados por sexo y edad, empleando técnicas moleculares Hawash *et al.* (2021) tampoco encontraron una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,051$) en la frecuencia de *Blastocystis* entre los casos (26,6 %, 20/75) y los controles (8,0 %, 2/25) (Hawash *et al.*, 2021) (Tabla 28). Sin embargo, este estudio presenta importantes limitaciones, como un tamaño muestral muy reducido (100 participantes en total) o la inclusión de un número de controles considerablemente inferior al de casos (proporción 1:3), pese a que los autores refieren haber pareado por sexo y edad los grupos de comparación. Estos hechos dificultan la comparación de los datos de frecuencia entre grupos y por tanto cuestiona las conclusiones obtenidas.

Sobre la base de todos estos antecedentes, y ante la disparidad de diseños experimentales y resultados previos obtenidos, se planteó como objetivo central de esta tesis doctoral, estudiar la posible asociación entre la presencia de *Blastocystis* y el desarrollo de CRC en una población en la que ambos aspectos tienen un especial impacto, como es el caso de la población colombiana. Para ello se diseñó cuidadosamente un estudio de casos y controles que garantiza la validez y el rigor de las conclusiones obtenidas a través del cumplimiento de varias premisas. En primer lugar, la obtención de un adecuado tamaño muestral (308 participantes, repartidos en 154 casos y 154 controles), el máximo posible teniendo en cuenta el tiempo y los recursos disponibles y la dificultad que conlleva el reclutamiento de este tipo de participantes. En segundo lugar, la inclusión del mismo número de controles que de casos (proporción 1:1). En tercer lugar, el pareamiento de los grupos de comparación por sexo y edad. En cuarto y último

lugar, la estimación del componente genético ancestral individual y poblacional, que permite corroborar la homogeneidad de la muestra entre los dos grupos de comparación y con respecto a la población colombiana. Con este planteamiento, nuestros resultados no mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,472$ por técnicas de microscopía, $p = 0,906$ por técnicas moleculares) en la frecuencia de *Blastocystis* entre los casos (36,4 %, 56/154 por técnicas de microscopía; 35,7 %, 55/154 por técnicas moleculares) y los controles (32,5 %, 50/154 por técnicas de microscopía; 36,4 %, 56/154 por técnicas moleculares). Por lo tanto, en base a la robustez tanto de nuestro diseño experimental como de los resultados generados, podemos concluir que no existe una asociación entre la presencia de *Blastocystis* y el desarrollo de CRC.

Tabla 28. Estudios de casos y controles que han evaluado la posible asociación entre la presencia de *Blastocystis* y el desarrollo de cáncer colorrectal, con independencia de la conclusión obtenida. Los valores estadísticamente significativos han sido resaltados en negrita.

No.	País	Año	Muestra	Método diagnóstico	Resultado	Conclusión ^a	Referencia
ESTUDIOS DE CASOS Y CONTROLES PAREADOS POR SEXO Y EDAD							
1	Uzbequistán	Enero 2015 a enero 2017	400 participantes pareados por sexo y edad: • Casos: 200 pacientes con CRC • Controles: 200 individuos sin enfermedades en tracto gastrointestinal	Microscopía (directo y concentración)	• 80,0 % (160/200) en casos versus 18,0 % (36/200) en controles • p < 0,0001	18 (IC 95 % 11,0 a 30,0) veces mayor probabilidad	Toychiev <i>et al.</i> (2018)
2	Emiratos Árabes Unidos	Marzo 2020 a abril 2022	104 participantes pareados por sexo y edad: • Casos: 52 pacientes con cáncer. Subdivido en 15 con CRC y 37 con cáncer fuera del tracto gastrointestinal • Controles: 52 individuos sin cáncer	Combinación de microscopía (directo y coloración) y molecular (PCR y secuenciación)	• 60,0 % (9/15) en casos versus 17,3 % (9/52) en controles • p = 0,001*	7,1 (IC 95 % 2,0 a 25,2) veces mayor probabilidad*	Labania <i>et al.</i> (2023)
3	Arabia Saudita	Diciembre 2018 a diciembre 2019	100 participantes pareados por sexo y edad: • Casos: 75 pacientes con CRC • Controles: 25 pacientes sin cáncer, pero con desórdenes gastrointestinales	Molecular (PCR)	• 26,6 % (20/75) en casos versus 8,0 % (2/25) en controles • p = 0,051*	No hay asociación*	Hawash <i>et al.</i> (2021)

No.	País	Año	Muestra	Método diagnóstico	Resultado	Conclusión ^a	Referencia
4	Egipto	Febrero 2019 a febrero 2021	200 participantes pareados por sexo y edad: - Casos: 100 pacientes con CRC (50 recibiendo quimioterapia contra el cáncer y 50 sin recibir quimioterapia ni antiparasitarios) - Controles: 100 individuos sin cáncer	Microscopía (cultivo)	52,0 % (52/100) en casos versus 42,0 % (42/100) en controles - p = 0,156	No hay asociación	Ali <i>et al.</i> (2022)
5	Colombia	Septiembre 2021 a Junio 2023	308 participantes pareados por sexo y edad: - Casos: 154 pacientes con CRC - Controles: 154 individuos sin cáncer	Molecular (PCR y secuenciación)	35,7 % (55/154) en casos versus 36,4 % (56/154) en controles - p = 0,906	No hay asociación	Esta tesis doctoral
ESTUDIOS DE CASOS Y CONTROLES SIN PAREAR							
6	Malasia	2010 a 2012	425 participantes: - Casos: 204 pacientes con neoplasias colorrectales. - Controles: 221 individuos sin cáncer	Molecular (PCR)	21,1 % (43/204) en casos versus 9,9 % (22/221) en controles - p = 0,001*	2,4 (IC 95 % 1,4 a 4,2) veces mayor probabilidad*	Kumarasamy <i>et al.</i> (2014)
7	Arabia Saudita	Abril 2013 a marzo 2015	218 participantes: - Casos: 138 pacientes con cáncer (74 con CRC y 64 con cáncer fuera del tracto gastrointestinal) - Controles: 80 individuos sin cáncer	Combinación de microscopía (cultivo) y molecular (PCR)	29,7 % (22/74) en casos versus 15,0 % (12/80) en controles - p = 0,027	2,4 (IC 95 % 1,1 a 5,2) veces mayor probabilidad	Mohamed <i>et al.</i> (2017)

No.	País	Año	Muestra	Método diagnóstico	Resultado	Conclusión ^a	Referencia
8	Irán	Octubre 2017 a agosto 2018	134 participantes: • Casos: 67 pacientes con CRC • Controles: 67 individuos sin cáncer	Combinación de microscopía (directo y coloración) y molecular (PCR)	• 23,9 % (16/67) en casos versus 8,9 % (6/67) en controles • p = 0,019*	3,2 (IC 95 % 1,2 a 8,7) veces mayor probabilidad*	Mahmoudvand <i>et al.</i> (2021)
9	Polonia	2009 a 2014	231 participantes: • Casos: 107 pacientes con CRC • Controles: 124 individuos sin CRC	Microscopía (directo)	• 12,1 % (13/107) en casos versus 2,4 % (3/124) en controles • p = 0,003	5,5 (IC 95 % 1,5 a 20,1) veces mayor probabilidad	Sulżyc-Bielicka <i>et al.</i> (2021)

a. Se refiere a la diferencia de probabilidad de pertenecer al grupo de casos de los participantes portadores de *Blastocystis* en comparación con los no portadores.

CRC, Cáncer colorrectal; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; ST, subtipo.

* Análisis calculados en esta tesis doctoral a partir de los datos originales.

Una vez constatada la ausencia de diferencias entre los casos y los controles en cuanto a la presencia de *Blastocystis* en general, se valoró la existencia de diferencias en subtipos concretos. En este sentido, conviene destacar que en dos de los estudios mencionados anteriormente en los que se refiere una asociación entre la presencia de *Blastocystis* y el desarrollo de CRC se ponen de manifiesto además diferencias en la frecuencia de presentación de subtipos concretos entre los casos y los controles. En el primero de ellos, Kumarasamy *et al.* (2014) encontraron una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,029$) en la frecuencia del subtipo ST3 de *Blastocystis* entre los casos (60,5 %, 26/43) y los controles (31,8 %, 7/22). Estos autores concluyeron que los participantes portadores del subtipo ST3 de *Blastocystis* tenían 3,2 (IC 95 % 1,1 a 9,7) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo de casos en comparación con los portadores de otros subtipos distintos a ST3 (Kumarasamy *et al.*, 2014). En el segundo, Mohamed *et al.* (2017) encontraron una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,032$) en la frecuencia del subtipo ST1 de *Blastocystis* entre los casos (54,5 %, 12/22) y los controles (16,7 %, 2/12). Estos autores concluyeron que los participantes portadores del subtipo ST1 de *Blastocystis* tenían 6 (IC 95 % 1,1 a 34,0) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo de casos en comparación con los portadores de otros subtipos distintos a ST1 (Mohamed *et al.*, 2017). No obstante, nuestros resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de ninguno de los 11 subtipos de *Blastocystis* identificados en el estudio (ST1, ST2, ST3, ST4, ST6, ST7, ST10a, ST14, ST30, ST41 y ST44) entre los casos y los controles (Figura 20), pese a que dos de ellos (ST3 y ST1), los más frecuentemente identificados en ambos grupos, son precisamente los subtipos supuestamente asociados previamente con el desarrollo de CRC (Kumarasamy *et al.*, 2014; Mohamed *et al.*, 2017).

Finalmente, para completar el estudio de la posible asociación entre la presencia de *Blastocystis* y el desarrollo de CRC a todos los niveles, una vez constatada la ausencia de diferencias entre los casos y los controles a nivel de subtipo, se valoró asimismo la existencia de diferencias intrasubtipos, gracias al análisis comparativo de la información sobre variabilidad genética obtenida mediante la secuenciación NGS de todas las muestras positivas a *Blastocystis* en casos y controles. No obstante, de nuevo nuestros resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de variantes concretas dentro de un mismo subtipo entre los casos y los controles (Tabla 26).

A continuación, se procedió a valorar la posible asociación de otros agentes infecciosos y el desarrollo de CRC. En el caso de *Cryptosporidium* spp., como se ha indicado, nuestros resultados no mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,317$) en la frecuencia de *Cryptosporidium* spp. entre los casos (0,6 %, 1/154) y los controles (0,0 %, 0/154).

Por lo tanto, no existe una asociación entre la infección por *Cryptosporidium* spp. y el desarrollo de CRC, si bien este resultado debe considerarse con reservas, ya que podría estar condicionado por la baja prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en la población de estudio. Sin embargo, la bibliografía recoge cinco estudios de casos y controles en los que se sugiere dicha asociación. El primero de ellos se realizó en China, con un grupo de 116 pacientes con diagnóstico de CRC (casos) y un grupo de 141 individuos sin cáncer (controles) (Zhang *et al.*, 2020). En este estudio la detección de *Cryptosporidium* spp. se llevó a cabo por técnicas moleculares y se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$) en la frecuencia de *Cryptosporidium* spp. entre los casos (17,2 %, 20/116) y los controles (0,0 %, 0/141) (Zhang *et al.*, 2020). Al no identificarse ninguna muestra positiva en el grupo de controles no fue posible establecer la razón de probabilidad. El segundo estudio se realizó en Turquía, con un grupo de 108 pacientes con diagnóstico de CRC (casos) y un grupo de 102 individuos sin cáncer ni IBS (controles) (Muftuoglu *et al.*, 2025). En este estudio la detección de *Cryptosporidium* spp. se llevó a cabo combinando técnicas de microscopía y moleculares y se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,003$) en la frecuencia de *Cryptosporidium* spp. entre los casos (12,9 %, 14/108) y los controles (1,9 %, 2/102) (Muftuoglu *et al.*, 2025). En concreto, se concluyó que los participantes infectados por *Cryptosporidium* spp. tenían 7,4 (IC 95 % 1,6 a 33,6) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo de casos en comparación con los no infectados (Muftuoglu *et al.*, 2025). Si bien ambos estudios contaban con un adecuado tamaño muestral, ninguno contempló el pareamiento por sexo y edad de los grupos de comparación. Los otros tres estudios destacados tampoco contemplaron el pareamiento de los grupos de comparación, que incluso estuvieron descompensados numéricamente en alguno de ellos, además de contar con un tamaño muestral más reducido, inferior a 100 participantes (Abd El-Latif *et al.*, 2023; Ghanadi *et al.*, 2022b; Osman *et al.*, 2017). En estos estudios la detección de *Cryptosporidium* spp. se llevó a cabo por técnicas moleculares o bien combinando técnicas de microscopía y moleculares y en ellos se encontró una mayor frecuencia de la infección por *Cryptosporidium* spp. en casos que en controles, diferencias que resultaron estadísticamente significativas ($p < 0,001$, $p = 0,005$ y $p < 0,001$, respectivamente). En concreto, se concluyó que los participantes infectados por *Cryptosporidium* spp. tenían respectivamente 5,1 (IC 95 % 2,4 a 10,9), 11,3 (IC 95 % 1,4 a 89,0) y 17,2 (IC 95 % 4,6 a 64,1) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo de casos en comparación con los no infectados (Abd El-Latif *et al.*, 2023; Ghanadi *et al.*, 2022b; Osman *et al.*, 2017).

Otro de los agentes infecciosos tradicionalmente asociados con el desarrollo de CRC y cuya posible implicación se ha valorado en esta tesis doctoral es *E. coli*, en concreto las cepas

productoras de colibactina (o *E. coli pks+*). Como se ha indicado, nuestros resultados mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,005$) en la frecuencia de *E. coli pks+* entre los casos (11,7 %, 18/154) y los controles (3,2 %, 5/154), concluyendo que los participantes portadores de *E. coli pks+* tienen 3,9 (IC 95 % 1,4 a 10,9) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo de casos en comparación con los que no son portadores.

Para poder contrastar estos resultados, conviene destacar que la mayoría de los estudios que han valorado una posible asociación entre la presencia de *E. coli pks+* en el tracto intestinal y el desarrollo de CRC lo han hecho comparando la presencia del gen *pks* entre aislados de *E. coli* obtenidos a partir de muestras de tejido procedentes de lesiones (casos) y aislados obtenidos a partir de muestras de tejido de colon sano (controles). Este material provenía bien del mismo paciente o bien de participantes sin lesiones pero a quienes se les había realizado una biopsia (Bonnet *et al.*, 2014; Piciocchi *et al.*, 2021; Tariq *et al.*, 2022). Las muestras analizadas incluían tejido fresco congelado o muestras fijadas en formol y embebidas en parafina. Estas diferencias en el origen y preparación de las muestras pueden arrojar resultados diferentes con respecto a los obtenidos en estudios realizados con muestras de heces. Además, este enfoque no sería escalable para su uso rutinario en programas de cribado de CRC en la población general, que constituyen actualmente el abordaje más efectivo para reducir la morbilidad y mortalidad relacionadas con CRC y que se han aplicado con éxito en muchos países (Ladabaum *et al.*, 2020; Sung *et al.*, 2021).

En este sentido, el aislamiento de bacterias asociadas a la mucosa del intestino grueso es mucho más complejo que la toma de una muestra de heces y probablemente menos factible como herramienta de cribado de CRC en la población general. Precisamente, la determinación de la presencia de *E. coli pks+* en muestras de heces recogidas en programas de cribado de CRC ha sido evaluada recientemente como posible indicador de riesgo de CRC atribuible a la exposición a este agente en un estudio a gran escala llevado a cabo en Holanda (de Klaver *et al.*, 2024). Se trató de un estudio de casos y controles sin parear realizado a partir de remanente de muestras fecales de pruebas FIT disponibles en biobancos. Los casos ($n = 81$) eran muestras positivas a la prueba FIT de pacientes con diagnóstico de CRC en la colonoscopia subsiguiente y los controles ($n = 4.258$) eran muestras positivas a la prueba FIT de pacientes sin lesiones aparentes en la colonoscopia o bien muestras negativas a la prueba FIT de participantes a los que no se les hacía colonoscopia debido al resultado negativo en la prueba previa. La detección del gen *pks* se llevó a cabo mediante una RT-PCR cuantitativa y no se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,449$) en la frecuencia de *E. coli pks+* entre los casos (29,6 %, 24/81) y los controles (25,9 %, 1.103/4.258) (de Klaver *et al.*, 2024). A la luz de estos resultados

y los obtenidos en algunos trabajos previos (Iwasaki *et al.*, 2022; Shimpoh *et al.*, 2017), de Klaver *et al.* (2024) descartaron la detección rápida de *E. coli pks+* en heces como biomarcador para la estratificación del riesgo de CRC en los programas de cribado que se aplican a la población general. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral invitan a reconsiderar esta decisión, no sólo por la clara asociación constatada entre la presencia de *E. coli pks+* en heces y el desarrollo de CRC, sino también por la solidez que aporta a las conclusiones el presente estudio de casos y controles pareados por sexo y edad, en proporción 1:1 y con grupos de comparación homogéneos entre sí y con respecto a la población de estudio. Estas premisas no se cumplen en el estudio de Klaver *et al.* (2024), pese a tratarse de un estudio de casos y controles de una magnitud inédita, con más de 4.000 participantes. Nuestros resultados están en línea con los de otros dos estudios de casos y controles previamente publicados en los que también se refiere una asociación entre la presencia de *E. coli pks+* en heces y el desarrollo de CRC (Eklöf *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2021). Sin embargo, el diseño metodológico de estos estudios estaba limitado por un tamaño muestral insuficiente y/o no contemplaba el pareamiento por sexo y edad de los grupos de comparación. El primero de ellos se realizó en Suecia, con un grupo de 39 pacientes con diagnóstico de CRC (casos) y un grupo de 65 individuos sin cáncer (controles) (Eklöf *et al.*, 2017). En este estudio la detección de *E. coli pks+* se llevó a cabo mediante una RT-PCR cuantitativa y se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$) en la frecuencia de *E. coli pks+* entre los casos (56,4 %, 22/39) y los controles (18,5 %, 12/65) (Eklöf *et al.*, 2017). En concreto, se concluyó que los participantes portadores de *E. coli pks+* tenían 5,7 (IC 95 % 2,3 a 13,9) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo de casos en comparación con los no portadores (Eklöf *et al.*, 2017). El segundo estudio se realizó en China, con un grupo de 60 pacientes con diagnóstico de CRC (casos) y un grupo de 42 individuos sin cáncer (controles) (Liu *et al.*, 2021). De nuevo, la detección del gen *pks* se llevó a cabo mediante una RT-PCR cuantitativa y se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$) en la frecuencia de *E. coli pks+* entre los casos (70,0 %, 42/60) y los controles (21,4 %, 9/42) (Liu *et al.*, 2021). En concreto, se concluyó que los participantes portadores de *E. coli pks+* tenían 8,6 (IC 95 % 3,4 a 21,5) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo de casos en comparación con los no portadores (Liu *et al.*, 2021).

En relación con la posible asociación de patotipos DEC concretos con el desarrollo de CRC, como se ha indicado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de ninguno de los seis patotipos DEC investigados (EAEC, STEC, ETEC, EIEC, EPEC y DAEC) entre los casos y los controles. Este hallazgo podría relacionarse con la escasa presencia de genes de ciclodulinas observada en los aislados obtenidos de cada uno de estos patotipos,

que hace imposible establecer ningún tipo de asociación entre ciclodulinas y patotipos DEC concretos y que viene a refrendar la idea de que la producción de colibactina en *E. coli* es independiente de su capacidad patógena, al menos como agente causante de diarrea, y que se circunscribe principalmente a cepas comensales de la bacteria que forman parte de la microbiota intestinal normal (Zechner y Kienesberger, 2024).

En la misma línea argumental que en el caso de *E. coli*, otro agente infeccioso en el que se ha llegado a demostrar una relación de causalidad con el desarrollo de CRC, más allá de la mera asociación estadística, es *M. morganii*. Esta relación de causalidad se fundamenta, al igual que en *E. coli*, en la producción de una genotoxina, descrita muy recientemente y de forma específica en *M. morganii*, y conocida como indolimina (Cao *et al.*, 2022). A pesar del escaso tiempo transcurrido desde este hallazgo, la posible implicación de *M. morganii* en el desarrollo de CRC también se ha podido valorar en esta tesis doctoral. Como se ha indicado, nuestros resultados mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,018$) en la frecuencia de *M. morganii* entre los casos (6,5 %, 10/154) y los controles (1,3 %, 2/154), concluyendo que los participantes portadores de *M. morganii* tienen 5,3 (IC 95 % 1,1 a 24,5) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo de casos en comparación con los no portadores. En un intento por contrastar estos resultados, el análisis pormenorizado de la bibliografía únicamente ha permitido identificar un estudio en el que se valoró la posible asociación entre la presencia de *M. morganii* en el tracto intestinal y el desarrollo de CRC. En concreto, se trata de un estudio de casos y controles realizado en Ghana, con un grupo de 47 pacientes con diagnóstico de CRC (casos) y un grupo de 50 individuos sin cáncer (controles) (Bachelle *et al.*, 2024). En este estudio la detección de *M. morganii*, entre otras enterobacterias, en heces se llevó a cabo mediante cultivo, aislamiento e identificación de los aislados obtenidos a partir de las heces mediante pruebas bioquímicas convencionales y espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz con tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS, del inglés *mass spectrometry matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight*) (Bachelle *et al.*, 2024). Aunque no se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,299$) en la frecuencia de *M. morganii* entre los casos (2,1 %, 1/47) y los controles (0,0 %, 0/50), su presencia sólo se pudo confirmar en el grupo de casos (Bachelle *et al.*, 2024).

Como se ha apuntado anteriormente en el caso de *E. coli*, estos resultados invitan a considerar la detección rápida de *M. morganii* en heces como otro posible biomarcador para la estratificación del riesgo de CRC en los programas de cribado aplicados en la población general. Aunque se conoce que el gen *aat* es esencial para la síntesis de las genotoxinas de la familia de las indolimas y que está ampliamente conservado en distintos genomas conocidos de *M.*

morganii (Cao *et al.*, 2022), lo que implica que la producción de indolimina debe de ser un rasgo común en la especie, su uso como marcador en ensayos de PCR y/o RT-PCR, de forma análoga al gen *pks* en *E. coli* y otras enterobacterias, aún no se ha generalizado. En este sentido, los cinco genomas de *M. morganii* obtenidos en esta tesis doctoral a partir de cuatro aislados procedentes del grupo CRC y uno procedente del grupo No CRC sin duda contribuirán a ampliar el conocimiento del entorno genético del gen *aat* de *M. morganii* y a su más que posible aplicación en el desarrollo de herramientas diagnósticas susceptibles de incorporarse en los programas de cribado de CRC.

Otro de los agentes infecciosos tradicionalmente asociados con el desarrollo de CRC y cuya posible implicación se ha valorado asimismo en esta tesis doctoral es *S. gallolyticus*, en concreto las dos subespecies asociadas hasta el momento con CRC, SGG y, en mucha menor medida, SGP. Como se ha indicado, nuestros resultados no mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,477$) en la frecuencia de SGG entre los casos (5,2 %, 8/154) y los controles (7,1 %, 11/154), concluyendo que no existe una asociación entre el estado portador de SGG y el desarrollo de CRC. Sin embargo, sí hallaron una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,009$) en la frecuencia de SGP entre los casos (9,7 %, 15/154) y los controles (2,6 %, 4/154), concluyendo que los participantes portadores de SGP tienen 4,0 (IC 95 % 1,3 a 12,5) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo de casos en comparación con los no portadores. Para poder contrastar estos resultados, conviene destacar que la mayoría de los estudios de casos y controles que han valorado una posible asociación entre la presencia de *S. gallolyticus* en el tracto intestinal y el desarrollo de CRC lo han hecho sobre muestras de tejido procedentes de lesiones (casos) y muestras de tejido de colon sano (controles) (Eldegla *et al.*, 2021; Tabl *et al.*, 2019). Como se ha indicado anteriormente en *E. coli pks+*, este tipo de estudios pueden arrojar resultados diferentes con respecto a los estudios realizados con muestras de heces. Entre los estudios recogidos en la bibliografía que han valorado esta posible asociación en muestras de heces cabe destacar tres. El primero de ellos se realizó en Malasia, con un grupo de 33 pacientes con diagnóstico de CRC (casos) y un grupo de 80 individuos sin cáncer (controles) (Bin Ismail *et al.*, 2023). En este estudio la detección de *S. gallolyticus* se llevó a cabo mediante PCR convencional y se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,002$) en la frecuencia de *S. gallolyticus* entre los casos (48,5 %, 16/33) y los controles (20,0 %, 16/80) (Bin Ismail *et al.*, 2023). En concreto, se concluyó que los participantes infectados por *S. gallolyticus* tenían 3,8 (IC 95 % 1,6 a 9,0) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo de casos en comparación con los no infectados (Bin Ismail *et al.*, 2023). Sin embargo, los dos estudios restantes, realizados en Egipto (Tabl *et al.*, 2019) y Túnez (Zrelli *et al.*, 2024), con 35 casos versus

20 controles y 14 casos versus 13 controles, respectivamente, empleando PCR convencional o RT-PCR para la detección de *S. gallolyticus* no encontraron una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,911$ y $p = 0,224$, respectivamente) en la frecuencia de *S. gallolyticus* entre los casos y los controles (Tabl *et al.*, 2019; Zrelli *et al.*, 2024) y por lo tanto no pudieron constatar dicha asociación. Con independencia de los resultados obtenidos en estos estudios, aspectos metodológicos como el escaso o incluso insuficiente tamaño muestral, la falta de pareamiento por sexo y edad de los grupos de comparación o la inclusión de un menor número de controles que de casos invitan a cuestionar sus conclusiones. Por otro lado, en ninguno de estos estudios se contempla la detección diferencial de las dos subespecies de *S. gallolyticus* asociadas hasta el momento con CRC, SGG y SGP, lo que impide valorar el riesgo de CRC atribuible a la exposición a cada una de ellas.

Siguiendo una analogía con los resultados obtenidos en otros agentes infecciosos y las implicaciones que de ellos se derivan, esta asociación entre la presencia de SGP (aunque no de SGG) en el tracto intestinal y el desarrollo de CRC invitaría a considerar a SGP como otro importante biomarcador cuya detección rápida en heces sería susceptible de emplearse asimismo en la estratificación del riesgo de CRC en los programas de cribado aplicados en población general. Aparte de esta aproximación generalista en programas de cribado, nuestros resultados podrían tener aplicación asimismo en la práctica clínica. Como se ha indicado anteriormente, las endocarditis y/o bacteriemias causadas por *S. gallolyticus* se consideran actualmente indicadores tempranos de sospecha de CRC y, en este sentido, las guías clínicas para el manejo de la endocarditis infecciosa tanto europeas como americanas recomiendan realizar sistemáticamente una colonoscopia en cualquier paciente con bacteriemia por *S. gallolyticus* y alta sospecha de endocarditis infecciosa (Baddour *et al.*, 2015; Habib *et al.*, 2015). Esta asociación se ha referido tradicionalmente a la subespecie SGG, si bien algunas referencias previas apuntan también a la posible asociación de la endocarditis y/o bacteriemia por SGP con CRC (Agnes *et al.*, 2021; Chand *et al.*, 2016; Gospodinova *et al.*, 2023; Takamura *et al.*, 2014), de tal manera que nuestros resultados vendrían a reforzar la consideración de realizar una evaluación colonoscópica de forma rutinaria en cualquier paciente con bacteriemia causada por *S. gallolyticus*, con independencia de la subespecie implicada.

5.2 Factores ambientales y conductuales

Una vez valorada la asociación de distintos factores microbiológicos con el desarrollo de CRC, que, como se ha expuesto, ha permitido identificar factores de riesgo concretos, se procedió a estudiar asimismo la influencia de distintos factores ambientales y conductuales. En este sentido, se valoró en primer lugar la influencia de determinadas condiciones relacionadas con la vivienda, la convivencia con animales y determinados aspectos higiénico-sanitarios. Así, según nuestros resultados, las personas que residen en zonas rurales tienen 2,6 (IC 95 % 1,3 a 5,6) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo CRC en comparación con las que residen en zonas urbanas. Estos resultados están en línea con los obtenidos en varios estudios previos de casos y controles realizados en Latinoamérica (México) y el norte de África (Marruecos y Túnez), en los que se identificó un riesgo entre 1,3 (IC 95 % 1,2 a 1,6) y 4,1 (IC 95 % 1,6 a 10,4) veces mayor de pertenecer al grupo de casos en poblaciones rurales en comparación con poblaciones urbanas (Deoula *et al.*, 2020; Gharbi *et al.*, 2020; Ramírez-Díaz *et al.*, 2021). Por su parte, las personas que habitan en viviendas con suelo de tierra o madera tienen 10,6 (IC 95 % 1,3 a 84,0) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo CRC en comparación con las que habitan en viviendas con suelo de baldosa o cemento. Así mismo, las personas que conviven con animales de granja tienen 3,0 (IC 95 % 1,6 a 5,7) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo CRC en comparación con los que no conviven con animales. De igual manera, las personas que consumen agua no tratada (de lluvia, de río/arroyo o de pozo) tienen 6,2 (IC 95 % 1,8 a 21,8) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo CRC en comparación con las que consumen agua tratada (de la red de saneamiento). Por el contrario, las personas que usan de forma frecuente (siempre o casi siempre) hipoclorito sódico para la desinfección de frutas y verduras tienen entre 1,7 (IC 95 % 0,3 a 0,9 para siempre) y 2 (IC 95 % 0,2 a 0,9 para casi siempre) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo No CRC en comparación con las que no realizan esta práctica de higiene. En conjunto, estos hallazgos sugieren que los ambientes con condiciones sanitarias deficientes en general y acceso limitado a los servicios básicos, frecuentes en el entorno rural, que entre otros aspectos se caracteriza por la convivencia habitual con animales de granja, podrían desempeñar un papel en el desarrollo del CRC de forma indirecta, al favorecer una mayor exposición a agentes infecciosos de naturaleza entérica transmitidos por vía fecal-oral, algunos de los cuales se han puesto de manifiesto precisamente en esta tesis doctoral.

En segundo lugar, se valoró la posible influencia de determinados hábitos alimentarios en el desarrollo de CRC. Así, según nuestros resultados, las personas que consumen carne roja de 1 a 2 d/s tienen 2,1 (IC 95 % 1,1 a 4,0) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo CRC

en comparación con las que no consumen este tipo de carne. Estos resultados están en línea con los obtenidos en dos estudios previos de casos y controles realizados en Polonia (400 casos versus 400 controles) y Corea del Sur (150 casos versus 116 controles), en los que se identificó que las personas con un consumo elevado de carne roja (> 80 g/día o > 500 g/semana o $> 2,7$ porciones/semana) tenían 13,0 (IC 95 % 8,6 a 19,6) y 1,8 (IC 95 % 1,1 a 3,0) veces, respectivamente, mayor probabilidad de pertenecer al grupo de casos en comparación con las que tenían un consumo bajo (< 80 g/día o 500 g/semana o $< 0,9$ porciones/semana) (Chun *et al.*, 2015; Lewandowska *et al.*, 2022). Así mismo, esta asociación se ha puesto de manifiesto en estudios de casos y controles realizado en México (98 casos versus 196 controles), en el que se identificó que las personas que tenían un consumo frecuente de carne de vaca o cerdo (≥ 3 d/s) tenían 3,9 (IC 95 % 1,6 a 9,7) o 3,4 (IC 95 % 1,6 a 7,5) veces, respectivamente, mayor probabilidad de pertenecer al grupo de casos en comparación con las que tenían un consumo infrecuente (< 3 d/s) (Ramírez-Díaz *et al.*, 2021). De manera similar, Aune *et al.* (2009) en Uruguay encontraron que las personas con un consumo elevado de todo tipo de carne roja (> 250 g/día de carne de vaca, cerdo, cordero o procesada) tenían 2,3 (IC 95 % 1,7 a 3,2) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo de casos en comparación con las que tenían un consumo bajo (< 10 g/día). En cuanto al consumo de productos ultraprocesados, según nuestros resultados, las personas que consumen este tipo de productos de 1 a 2 d/s tienen 2,5 (IC 95 % 1,5 a 3,9) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo CRC en comparación con las que no consumen este tipo de productos. Estos resultados son consistentes con los obtenidos previamente por Romaguera *et al.* (2021) en España, Fliss-Isakov *et al.* (2020) en Israel y Jafari *et al.* (2023) en Irán. En estos tres estudios se determinó que las personas con un consumo elevado de ultraprocesados tenían entre 1,4 (IC 95 % 1,2 a 1,7) y 2,5 (IC 95 % 1,2 a 5,2) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo de casos en comparación con las que tenían un consumo bajo (Fliss-Isakov *et al.*, 2020; Jafari *et al.*, 2023; Romaguera *et al.*, 2021). En conjunto, nuestros resultados y los obtenidos en estudios previos sugieren que el consumo elevado de carnes rojas y/o productos ultraprocesados constituyen un factor de riesgo en relación con el desarrollo de CRC.

Además de factores de riesgo, se han podido identificar asimismo ciertos factores protectores en relación con el desarrollo de CRC en determinados hábitos alimentarios, como es el caso del consumo de fruta fresca y/o verduras y legumbres. En concreto, según nuestros resultados, las personas que consumen fruta fresca y/o verduras y legumbres de 5 a 6 d/s tienen 5 (IC 95 % 0,0 a 0,9) y 10 (IC 95 % 0,0 a 0,7) veces, respectivamente, mayor probabilidad de pertenecer al grupo No CRC en comparación con las que no consumen fruta fresca ni verduras

y legumbres. Estos resultados están en línea con los obtenidos en los estudios de casos y controles realizados en Corea del Sur y México anteriormente mencionados (Chun *et al.*, 2015; Ramírez-Díaz *et al.*, 2021). En el primer caso, Chun *et al.* (2015) encontraron que las personas con un consumo de frutas y verduras elevado ($> 9,7$ porciones/semana en frutas y > 52 porciones/semana en verduras) tenían 2,1 (IC 95 % 0,3 a 0,9) y 2,6 (IC 95 % 0,2 a 0,7) veces, respectivamente, mayor probabilidad de pertenecer al grupo de controles en comparación con las que tenían un consumo bajo ($< 4,5$ porciones/semana en frutas y $< 34,8$ porciones/semana en verduras). Por su parte, Ramírez-Díaz *et al.* (2021) encontraron que las personas que tenían un consumo de frutas frecuente ($\geq$ a 3 d/s) tenían 2,1 (IC 95 % 1,3 a 3,5) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo de casos en comparación con las que tenían un consumo infrecuente (< 3 d/s), una asociación que sin embargo no se evidenció en relación con el consumo de verduras. En conjunto, nuestros resultados y los obtenidos en estudios previos sugieren que el consumo frecuente y/o elevado de frutas y verduras y legumbres constituye un factor protector en relación con el desarrollo de CRC. En la base de esta asociación estaría el elevado contenido de frutas y verduras en compuestos considerados anticancerígenos, como folato, vitaminas, fibra, minerales, flavonoides y glucosinolatos que actuarían diluyendo los ácidos biliares secundarios, favoreciendo el tránsito intestinal y promoviendo la fermentación bacteriana que conduce a una reducción del pH luminal del colon (Song *et al.*, 2015).

En tercer lugar, se valoró la posible influencia del tabaquismo en el desarrollo de CRC. Según nuestros resultados, las personas con un historial de consumo de tabaco alto (IPA > 40) tienen 4,6 (IC 95 % 1,5 a 14,1) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo CRC en comparación con las que no fumaban. Estos resultados apuntan a un potente efecto dosis-dependiente del consumo de tabaco, de tal manera que podemos concluir que tanto la intensidad del consumo como su duración en el tiempo son determinantes críticos que incrementan el riesgo de desarrollo de CRC. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en varios estudios previos de casos y controles. Así, Zhao *et al.* (2010) en Canadá (702 casos versus 717 controles) encontraron que los exfumadores y fumadores actuales tenían 1,3 (IC 95 % 1,1 a 1,7) y 2,1 (IC 95 % 1,5 a 2,9) veces, respectivamente, mayor probabilidad de pertenecer al grupo de casos en comparación con los no fumadores. Además, los fumadores con un consumo de tabaco elevado (IPA > 40) tenían 1,7 (IC 95 % 1,3 a 2,4) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo de casos en comparación con los no fumadores (Zhao *et al.*, 2010). De manera similar, Verla-Tebit *et al.* (2006) en Alemania (540 casos versus 614 controles) encontraron que los fumadores con un consumo de tabaco elevado tenían 1,9 (IC 95 % 1,2 a 3,1) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo de casos en comparación con los no

fumadores. Por su parte, Lee *et al.* (2019) en Corea del Sur (925 casos versus 2.775 controles) encontraron que los hombres con consumo de tabaco elevado tenían 2,1 (IC 95 % 1,6 a 2,9) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo de casos en comparación con los no fumadores, una asociación que sin embargo no se evidenció en las mujeres. En conjunto, nuestros resultados y los obtenidos en estudios previos, todos con adecuados tamaños muestrales y metodologías comparables, vienen a reforzar el consenso generalizado que existe acerca del papel del tabaquismo como factor de riesgo de desarrollo de CRC.

En otro orden de cosas, se valoró la posible asociación de distintas manifestaciones clínicas, antecedentes personales y antecedentes familiares con el desarrollo de CRC. Respecto a las manifestaciones clínicas, según nuestros resultados, los pacientes con dolor abdominal, pérdida de peso, diarrea, sangre en heces, vómito y fiebre, tienen 2,2 (IC 95 % 1,4 a 3,5), 5,4 (IC 95 % 3,2 a 9,3), 2,3 (IC 95 % 1,4 a 3,8), 3,5 (IC 95 % 2,0 a 6,0), 3,2 (IC 95 % 1,4 a 7,4) y 2,7 (IC 95 % 1,1 a 7,1) veces, respectivamente, mayor probabilidad de pertenecer al grupo CRC en comparación con los participantes que no presentan dichas manifestaciones clínicas adicionales. Estos resultados son consistentes con los obtenidos previamente por Hamilton *et al.* (2005, 2009) y Bener *et al.* (2024) en Reino Unido (349 casos versus 1.744 controles y 704 casos versus 704 controles, respectivamente). Estos autores encontraron que los pacientes con dolor abdominal tienen entre 1,8 (IC 95 % 1,4 a 2,4) y 4,5 (IC 95 % 3,7 a 5,5) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo de casos en comparación con los participantes que no presentaron esta manifestación clínica adicional, entre 2,2 (IC 95 % 1,6 a 3,0) y 5,1 (IC 95 % 3,9 a 6,6) veces en pacientes con pérdida de peso, entre 1,6 (IC 95 % 1,2 a 2,1) y 3,8 (IC 95 % 3,2 a 4,6) veces en pacientes con diarrea, entre 1,8 (IC 95 % 1,3 a 2,4) y 13,0 (IC 95 % 11,6 a 14,5) veces en pacientes con sangre en heces y 2,2 (IC 95 % 1,6 a 2,9) veces en pacientes con vómito (Bener *et al.*, 2024; Hamilton *et al.*, 2005, 2009). En relación con los antecedentes personales, según nuestros resultados, los participantes con antecedentes de anemia tienen 2,5 (IC 95 % 1,5 a 4,1) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo CRC en comparación con los participantes que no padecían anemia. En la misma línea Bener *et al.* (2024) encontraron que los participantes con antecedentes de anemia tenían 1,5 (IC 95 % 1,2 a 2,0) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo de casos en comparación con los participantes que no habían padecido anemia (Bener *et al.*, 2024). Por otro lado, según nuestros resultados, los participantes con antecedentes personales y/o familiares de IBS y colitis ulcerosa tienen entre 2 (IC 95 % 0,3 a 0,9) y 5 (IC 95 % 0,0 a 0,7) veces, respectivamente, mayor probabilidad de pertenecer al grupo No CRC en comparación con los participantes que no tenían estos antecedentes. Este último resultado difiere notablemente de los obtenidos en algunos estudios previos que señalan que los

pacientes con IBS, en el que se incluye la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, tienen mayor probabilidad de desarrollar CRC (Axelrad *et al.*, 2016; Faye *et al.*, 2022).

Por otro lado, también se valoró la posible asociación del tratamiento antiparasitario con el desarrollo de CRC. En este sentido, según nuestros resultados los participantes que recibieron tratamiento antiparasitario en los tres meses previos a su inclusión en el estudio tienen 2,1 (IC 95 % 1,1 a 4,2) veces mayor probabilidad de pertenecer al grupo CRC en comparación con los participantes que no recibieron tratamiento antiparasitario. En la base de esta asociación podría estar la disbiosis intestinal ocasionada por el tratamiento, al promover un enriquecimiento de ciertas bacterias protumorales (entre las que podrían encontrarse algunas de las identificadas precisamente en esta tesis doctoral) y disminución de otras consideradas beneficiosas. De hecho, este efecto se ha demostrado en fármacos activos frente a comensales anaerobios, como es el caso del metronidazol y de otros antibióticos como los betalactámicos, el cloranfenicol, la clindamicina, los macrólidos y las tetraciclinas (Brook *et al.*, 2013; Maier *et al.*, 2021). Esta disbiosis asociada a la administración oral de fármacos no sólo implica agentes antibióticos, sino también agentes quimioterápicos y antiinflamatorios no esteroideos. En concreto, los antibióticos, tanto antibacterianos como antiparasitarios, tienen un potencial intrínseco para alterar el equilibrio de la microbiota intestinal debido, por un lado, a su efecto antimicrobiano directo y, por el otro, al efecto promotor del crecimiento de bacterias resistentes derivado de la exposición repetitiva a los antibióticos (Pandey *et al.*, 2023; Weiss y Hennet, 2017; Zou *et al.*, 2018). En cualquier caso, la disbiosis intestinal ocasionada por el tratamiento antimicrobiano puede inducir inflamación, dañar el DNA y/o promover la proliferación celular, factores implicados en el desarrollo y progresión del CRC.

5.3 Factores genéticos

Finalmente, la valoración de la asociación de distintos factores de riesgo con el desarrollo de CRC llevada a cabo en esta tesis doctoral se completó con el estudio de la posible influencia de determinados factores genéticos. En cuanto a los 10 SNP *a priori* asociados con CRC analizados (Tabla 19), según nuestros resultados no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los casos y los controles en las frecuencias alélicas determinadas en cada uno de ellos. Sin embargo, sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias alélicas de tres de los 21 AIM empleados en la estimación del componente genético ancestral cuando se analizaron de manera individual comparativamente

entre los dos grupos. En concreto, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias alélicas de FYNUL (p = 0,011), MID817 (p = 0,027) y PV92 (p = 0,020), de tal manera que los participantes que tienen el alelo C en FYNUL, delección en MID817 y delección en PV92 tienen 2,1 (IC 95 % 1,2 a 3,7), 1,7 (IC 95 % 1,1 a 2,7) y 2,2 (IC 95 % 1,1 a 4,4) veces, respectivamente, mayor probabilidad de pertenecer al grupo CRC en comparación con los que tienen el alelo T en FYNUL, inserción en MID817 e inserción en PV92.

Algunas de las variantes InDel que se emplean como AIM corresponden a elementos nucleares intercalados cortos (SINE, del inglés *short interspersed nuclear element*), que son secuencias repetitivas de DNA que abundan en el genoma humano y representan cerca del 9,0 % de todo el genoma, pero que no se encuentran en el genoma de referencia GRCh38 (Ensembl, s. f.). Su uso en genética de poblaciones, junto con otros polimorfismos de tipo SNP, refleja la estructura y mezcla poblacional (Wong *et al.*, 2018) y ha demostrado que este tipo de variaciones estructurales contribuyen significativamente a la diversidad del genoma (Hehir-Kwa *et al.*, 2016). Aunque muchas de estas secuencias InDel se encuentran en regiones intergénicas e intrónicas del genoma, existe la posibilidad de que se trate de exones no anotados previamente o elementos reguladores con potencial de transcripción y, en este sentido, contribuyen hasta en un 0,4 % a las enfermedades genéticas humanas (Deininger y Batzer, 1999).

En relación con FYNUL (polimorfismo rs2814778), este SNP se ubica dentro de un locus que codifica antígenos del sistema sanguíneo Duffy, en la región promotora del gen ACKR1, el cual, a su vez, codifica un receptor de alta afinidad para la fracción constante (Fc) de las inmunoglobulinas (Ensembl, s. f.). Está próximo asimismo al gen FCGR1A, que codifica un receptor de alta afinidad para inmunoglobulina G (IgG), involucrado en la respuesta inmunitaria mediada por células (Ensembl, s. f.). Precisamente, en un estudio reciente, Xu y Guo (2020) identificaron a FCGR1A como biomarcador potencial en distintos tipos de cáncer, entre ellos el cáncer cervical, cáncer renal, colangiocarcinoma y melanoma cutáneo, relacionándolo con la activación, regulación e inducción de células inmunitarias. En este sentido, nuestros resultados invitan a profundizar en el estudio del gen FCGR1A en relación con otros tipos de cáncer, y en particular con CRC. Por otro lado, en el marco de un proyecto internacional llevado a cabo entre 2008 y 2015 para generar el mayor catálogo público de datos sobre variantes genéticas humanas (*1000 Genomes Project*, s. f.), específicamente en la muestra de población colombiana procedente de Medellín (CLM) se ha podido constatar que FYNUL está en desequilibrio de ligamiento con 54 SNP ubicados a lo largo de una región de aproximadamente 100 kb que incluye el gen CADM3 (Molécula 3 de adhesión celular) y el pseudogen Pentraxina 1 mucosal (Ensembl,

s. f.). En el caso particular de CADM3, éste actúa como gen supresor de tumores, por lo que su pérdida o inactivación contribuyen a la progresión y metástasis, de ahí que haya sido recientemente identificado como biomarcador de CRC, convirtiéndose en un posible objetivo para futuras investigaciones (Wei *et al.*, 2023; Xie *et al.*, 2023).

Por su parte, MID817 (polimorfismo rs1610901) es una variante InDel que se ubica dentro del intrón 5 del gen CTNND2 (Catenin delta 2), junto con alrededor de 60 SNP en desequilibrio de ligamiento (Ensembl, s. f.). En concreto, la sobreexpresión del gen CTNND2 se ha relacionado con una promoción de la invasión y la metástasis en varios carcinomas, incluyendo CRC y cáncer de próstata, considerándose por tanto un indicador de mal pronóstico (Zhang *et al.*, 2015, 2018). En este sentido, CTNND2 se ha propuesto recientemente como biomarcador para el diagnóstico y tratamiento en diversos tipos de cáncer y enfermedades neurológicas (Zhang *et al.*, 2025).

Por último, PV92 (polimorfismo rs3138523) es una variante InDel que puede o no contener la inserción de un elemento *Alu*, una secuencia de DNA repetitiva que se relaciona con distintos tipos de cáncer. En concreto, en el caso del CRC, se ha demostrado que estos elementos *Alu* exhiben distintos perfiles de metilación en células normales y en células cancerosas procedentes de CRC, lo que se relaciona con una baja actividad transcripcional, replicación tardía del DNA y mayor inestabilidad cromosómica (Jordà *et al.*, 2017). Esta variante se ubica en el cromosoma 16, que alberga asimismo un fragmento del gen CDH13 (Cadherin 13), también conocido como T-cadherina. Este gen se considera un regulador esencial de la angiogénesis y la remodelación vascular (Popov *et al.*, 2023), un proceso crítico involucrado en la proliferación, invasión y metástasis en distintos tipos de cáncer (Wen *et al.*, 2025; Ye *et al.*, 2017). Se trata asimismo de un gen supresor de tumores relacionado con hipermetilación, por lo que también se ha propuesto como biomarcador para la detección temprana de CRC (Duan *et al.*, 2017).

En su conjunto, estos resultados derivados del estudio de la posible influencia de determinados factores genéticos en el desarrollo de CRC vienen a resaltar la importancia de explorar otras variantes genéticas adicionales a las analizadas en este estudio y/u otros genes vinculados de alguna manera a dichas variantes. Además de aportar nuevas perspectivas sobre la susceptibilidad genética al CRC en poblaciones concretas, estos hallazgos abren la posibilidad de futuras investigaciones enfocadas en la identificación y validación de nuevos biomarcadores de detección, pronósticos o de riesgo.

5.4 *Blastocystis* en el contexto colombiano: prevalencia y epidemiología molecular

Al margen del papel de *Blastocystis* como factor de riesgo microbiológico para el desarrollo de CRC, que se ha demostrado inexistente, esta tesis doctoral ha puesto de manifiesto gran cantidad de información detallada acerca de la prevalencia y epidemiología molecular de *Blastocystis* en la población adulta colombiana. Tal como se indicó al inicio de la discusión, *Blastocystis* ha suscitado particular interés en Colombia debido a su elevada prevalencia en la población general, si bien los estudios realizados hasta el momento en población adulta son minoritarios (Tabla 2). Mediante el uso de técnicas de microscopía y/o moleculares, algunos autores han estimado que la prevalencia de *Blastocystis* en el país oscila entre el 6,4 y el 88,7 % en población infantil (Sánchez *et al.*, 2017; Villafañe Ferrer y Pinilla Pérez, 2016) y entre el 8,1 y el 90,9 % en población adulta (Backhaus *et al.*, 2023; Espinosa Aranzales *et al.*, 2018), con diferencias marcadas entre diferentes regiones naturales del país (Andina, Amazonía, Caribe, Orinoquía y Pacífico) e incluso entre diferentes municipios dentro de una misma región (Higuera *et al.*, 2020). En nuestro estudio, realizado en una población adulta residente principalmente en el municipio de Medellín (región Andina), se encontró una prevalencia de *Blastocystis* de 34,4 % (106/308) empleando técnicas de microscopía y de 36,0 % (111/308) empleando técnicas moleculares. Estos resultados son similares a los obtenidos por Potes-Morales y Crespo-Ortiz (2023) en el municipio de Cali (región Andina), también en población adulta, donde se encontró una prevalencia de *Blastocystis* de 33,8 % (47/139) empleando técnicas de microscopía y de 49,6 % (69/139) empleando técnicas moleculares.

Como se ha indicado anteriormente (sección 4.12), en el presente estudio llama la atención la concordancia casi perfecta (valores de kappa cercanos a 1,0) observada entre los distintos abordajes realizados mediante técnicas de microscopía (montaje en fresco y concentración, cultivo en medio de Jones o montaje en fresco, concentración y cultivo en medio de Jones) y entre los distintos abordajes realizados mediante técnicas moleculares (ensayo de PCR y secuenciación Sanger o ensayo de PCR y secuenciación NGS) en la detección de *Blastocystis*, así como la considerable concordancia (valores de kappa cercanos a 0,8) observada en términos generales entre técnicas de microscopía y técnicas moleculares, que contrasta de forma considerable con la mayoría de estudios previos (Roberts *et al.*, 2011; Stensvold *et al.*, 2007a). Esta concordancia considerable, aunque no perfecta, pone de manifiesto la conveniencia de emplear de forma complementaria técnicas de microscopía y técnicas moleculares en la detección de *Blastocystis*. No obstante, es preciso hacer hincapié en la

importancia de contar con personal con experiencia en microscopía para que este grado de concordancia sea posible, especialmente en aquellos laboratorios de microbiología clínica donde las técnicas de microscopía no pueden ser reemplazadas por técnicas moleculares. Por otro lado, la concordancia casi perfecta observada entre los distintos abordajes realizados mediante técnicas de microscopía ha revelado que la mejora en el diagnóstico (aumento de la prevalencia) que aporta el cultivo en medio de Jones en la detección de *Blastocystis* no es significativa cuando se compara con el montaje en fresco y concentración (33,4 % versus 33,1 %), a pesar de que muchos autores recomiendan su uso de forma sistemática (Darwish *et al.*, 2021; Santos y Rivera, 2013; Zamani *et al.*, 2021). No obstante, es preciso destacar una vez más la importancia de contar con personal con la suficiente experiencia en microscopía como para prescindir del cultivo en medio de Jones sin que con ello disminuya el rendimiento del diagnóstico microscópico.

Desde el punto de vista de la epidemiología molecular, los ST de *Blastocystis* más frecuentemente identificados en Colombia son ST1 (entre el 20,3 y el 56,0 %), ST3 (entre el 12,0 y el 55,5 %) y ST2 (entre el 14,5 y el 32,9 %), seguidos de ST4 (entre el 0,8 y el 5,1 %), ST5 (4,1 %), ST6 (entre el 0,5 y el 5,0 %), ST7 (entre el 0,8 y el 4,0 %), ST8 (0,9 %) y ST9 (0,9 %) (Tabla 2). En el presente estudio, el ST más prevalente fue ST3, con gran diferencia, seguido de ST1, ST2 y, con menor frecuencia, ST4 (Tabla 25), y son habituales las coinfecciones por dos o más de estos ST. Estos datos son similares a los obtenidos por Ramírez *et al.* (2017) en un estudio realizado en nueve municipios diferentes de Colombia (8 en la región Andina y 1 en la Orinoquía) y los obtenidos por Villamizar *et al.* (2019) en un estudio realizado en el municipio de Popayán (región Andina), si bien ambos estudios se realizaron en población pediátrica. En ellos, el ST más frecuente fue ST3 (55,5 y 43,5 %, respectivamente), seguido de ST1 (21,4 y 38,7 %, respectivamente) y ST2 (19,5 y 14,5 %, respectivamente), y con menor frecuencia ST4 (0,8 y 3,2 %, respectivamente), ST6 (1,9 %) y ST7 (0,8 %). Además de los ST predominantes (ST3, ST1, ST2 y ST4), en el presente estudio se identificaron otros ST mucho menos frecuentes e incluso únicos, identificados sólo de forma puntual. Entre ellos, es preciso destacar ST41, que constituye el cuadragésimo quinto ST de *Blastocystis* formalmente aceptado, y cuya descripción y validación se llevó a cabo en esta tesis doctoral. Precisamente ST41 y ST35 (Maloney *et al.*, 2022; Nieto-Clavijo *et al.*, 2024) son las únicas variantes genéticas descritas exclusivamente en el hombre hasta el momento, si bien este resultado debe ser refrendado en futuros estudios de epidemiología molecular tanto en Colombia como en otros países.

En relación con los subtipos de *Blastocystis* identificados en el presente estudio, conviene destacar asimismo la presencia, aunque poco frecuente o incluso incidental, en la

mayoría de los casos, de subtipos específicamente adaptados a colonizar especies animales distintas al hombre. Éste es el caso de ST4 (10,3 %), ST6 (1,7 %), ST7 (1,7 %), ST10a (1,7 %), ST14 (0,9 %), ST30 (0,9 %) y ST44 (0,9 %) (Figura 19). Aunque ni los objetivos ni la propia naturaleza de esta tesis doctoral permiten afirmarlo de manera concluyente, la presencia de dichos ST en la población objeto de estudio podría ser indicativa de posibles episodios de transmisión zoonótica.

En el caso de ST4, se trata de un ST especialmente adaptado a colonizar roedores (Farzam *et al.*, 2025), si bien se ha identificado asimismo en cerdos y cucarachas en Brasil (Valença-Barbosa *et al.*, 2019) y en primates no humanos en Colombia (Ramírez *et al.*, 2014). La frecuencia relativa de ST4 en poblaciones humanas portadoras de *Blastocystis* en Latinoamérica oscila entre el 0,8 y el 25,0 %. En Colombia, ST4 se ha identificado con una frecuencia de entre el 0,8 y el 5,1 % en niños portadores de *Blastocystis* (Hernández *et al.*, 2023; Osorio-Pulgarin *et al.*, 2021; Ramírez *et al.*, 2017; Villamizar *et al.*, 2019). En Brasil, la frecuencia de ST4 se sitúa entre el 2,0 y el 3,5 % en población general (Barbosa *et al.*, 2018; Seguí *et al.*, 2018; Valença Barbosa *et al.*, 2017) y alcanza el 21,4 % en pacientes con urticaria (Melo *et al.*, 2019). En Chile, ST4 se ha identificado en el 25,0 % de los pacientes con IBS (Peña *et al.*, 2020). En México, la frecuencia de ST4 se sitúa entre el 14,2 y el 16,8 % en estudiantes universitarios y pacientes con diversas enfermedades metabólicas (Pérez *et al.*, 2020; Yañez *et al.*, 2021).

Por otra parte, ST6 y ST7 se consideran ST específicamente adaptados a colonizar aves (Mohammadi *et al.*, 2025). En concreto, ST6 se ha identificado en pollos en Brasil con una frecuencia del 17,7 % (Maloney *et al.*, 2021a) y en caballos en Colombia, aunque con una frecuencia inferior al 1,0 % (Baek *et al.*, 2022). En el caso de ST7, se trata del subtipo predominante en pollos en Brasil con una frecuencia del 33,1 % (Maloney *et al.*, 2021a). La frecuencia relativa de estos ST en poblaciones humanas portadoras de *Blastocystis* en Latinoamérica oscila entre el 1,0 y el 7,5 %. En concreto, ST6 se ha identificado en Colombia con frecuencias de entre el 1,7 y el 2,0 % (Osorio-Pulgarin *et al.*, 2021; Ramírez *et al.*, 2016, 2017) y del 5,9 % en pacientes con espondiloartritis (Hernández *et al.*, 2021). En Argentina, se ha identificado con una frecuencia del 7,5 % en pacientes con urticaria (Casero *et al.*, 2015) y del 5,0 % en pacientes con síntomas gastrointestinales (Ramírez *et al.*, 2016). En Brasil, ST6 se ha identificado con una frecuencia del 1,0 % en población general (Seguí *et al.*, 2018) y del 3,6 % en pacientes con urticaria (Melo *et al.*, 2019). En el caso de ST7, se ha sido identificado predominantemente en poblaciones pediátricas en Colombia con una frecuencia de entre el 0,8 y el 4,0 % (Ramírez *et al.*, 2016, 2017), esporádicamente en población general en Argentina (Alegre *et al.*, 2025), en población asintomática en Brasil con una frecuencia del 4,5 % (Ramírez

et al., 2016), y en pacientes con síntomas gastrointestinales y diversas enfermedades metabólicas en México con frecuencias entre el 2,0 y el 14,2 % (Villalobos *et al.*, 2014; Yañez *et al.*, 2021).

Los restantes subtipos, ST10a, ST14, ST30 y ST44, se consideran ST particularmente adaptados a colonizar el tracto digestivo de los rumiantes. De hecho, ST10 (incluyendo todas sus variantes y ST escindidos: ST10a, ST10b, ST42a, ST42b, ST43 y ST44) y ST14 son los más frecuentemente identificados en ganado bovino, ovino y caprino, con frecuencias de entre el 43,4 y el 20,0 %, respectivamente (Rehena *et al.*, 2025). Estos subtipos se han identificado en diversas especies de rumiantes tanto domésticos como silvestres, incluyendo el ganado bovino (Abarca *et al.*, 2021; Alfellani *et al.*, 2013; Figueiredo *et al.*, 2024; Heydarian *et al.*, 2024; Santin *et al.*, 2024), el ganado ovino y caprino (Chang *et al.*, 2021; Figueiredo *et al.*, 2024; Naguib *et al.*, 2024; Santin *et al.*, 2024), los camélidos (Asghari *et al.*, 2024; Yang *et al.*, 2021), el ciervo de cola blanca (Maloney *et al.*, 2021b) y otras especies de rumiantes silvestres (Figueiredo *et al.*, 2025a; Wang *et al.*, 2022), incluso en Colombia (Baek *et al.*, 2022; Higuera *et al.*, 2021; Jiménez *et al.*, 2024).

Dentro del estudio de la diversidad genética de *Blastocystis* un aspecto especialmente destacable de esta tesis doctoral, por su carácter novedoso, es el estudio de la diversidad intrasubtipo. Como se ha indicado anteriormente (sección 4.11.3), se detectaron 103 variantes únicas entre los 11 ST identificados en el estudio, si bien se observaron notables diferencias de diversidad entre los cuatro ST más frecuentes (ST3, ST1, ST2 y ST4), siendo ST1 y ST2 los que mostraron una mayor variabilidad. Cada muestra positiva a uno o varios ST de *Blastocystis* con frecuencia albergó múltiples variantes únicas de un mismo ST, si bien, de nuevo, este aspecto varió considerablemente entre distintos ST, en la misma línea observada en la variabilidad en términos absolutos. En concreto, las muestras positivas a ST3 albergaron siempre una sola variante única, mientras que las muestras positivas a ST1 y/o ST2 presentaban con frecuencia 2 y hasta 3 variantes únicas. Estos resultados, indicativos de una baja diversidad intrasubtipo en ST3 frente a una diversidad mucho más alta en ST1 y ST2, están en línea con los obtenidos en varios estudios realizados muy recientemente en poblaciones humanas de Colombia (Hernández *et al.*, 2023), México (Rojas-Velázquez *et al.*, 2019) y Zambia (Mutengo *et al.*, 2024). Por otro lado, aunque las variantes únicas identificadas en cada ST se distribuyeron de manera relativamente uniforme entre las muestras positivas a dicho ST, algunas de estas variantes únicas dentro de cada ST se identificaron en múltiples participantes (Tabla 26), lo que indicaría que se trata de variantes más comunes en esta población, tal y como ha sido destacado en los

estudios previos anteriormente mencionados (Hernández *et al.*, 2023; Mutengo *et al.*, 2024; Rojas-Velázquez *et al.*, 2019).

5.5 Papel de *Blastocystis* en enfermedad y salud: cambio de paradigma.

Durante décadas, la comunidad científica ha mantenido un debate activo sobre el papel de *Blastocystis* como potencial agente etiológico asociado a manifestaciones clínicas intestinales y extraintestinales bajo determinadas condiciones del hospedador. En este sentido, algunos estudios han podido establecer una asociación entre síntomas gastrointestinales como diarrea, dolor abdominal, náuseas, flatulencia, colitis ulcerosa e IBS y la presencia de *Blastocystis* (Beyhan *et al.*, 2023; Cekin *et al.*, 2012; Parija y Jeremiah, 2013; Tan *et al.*, 2010) y otros incluso han encontrado asociación con síntomas extraintestinales, principalmente urticaria y dolor articular, sugiriendo que *Blastocystis* o sus productos metabólicos pueden desencadenar una respuesta inmune sistémica (Bahrami *et al.*, 2020; Fonte Galindo *et al.*, 2023; Jafari *et al.*, 2024; Pawelec-Pęciak *et al.*, 2025). No obstante, otros estudios no han podido establecer ninguna asociación entre cualquier tipo de sintomatología y la presencia de *Blastocystis* (Leder *et al.*, 2005; Rudzińska *et al.*, 2019), contribuyendo a mantener la controversia en torno a su patogenicidad. En este sentido, es importante destacar que todo estudio orientado a investigar la posible asociación entre la presencia de *Blastocystis* y la aparición de manifestaciones clínicas (principalmente las relacionadas con el tracto intestinal) debe contemplar el efecto confundidor derivado de posibles infecciones concomitantes por otros enteropatógenos de origen bacteriano, vírico o parasitario. Por ello, con el fin de minimizar este sesgo, este tipo de estudios debería llevarse a cabo siempre en pacientes con un diagnóstico positivo para *Blastocystis* pero negativo para cualquier otro enteropatógeno (Seijas-Pereda *et al.*, 2025).

Por otra parte, el tratamiento farmacológico frente a la posible infección por *Blastocystis* en pacientes sintomáticos en ausencia de otros enteropatógenos se ha asociado en algunos casos con una mejora significativa del estado clínico, lo que reforzaría el posible papel patógeno propuesto para *Blastocystis* (Roberts *et al.*, 2014; Sekar y Shanthi, 2013). Sin embargo, la respuesta terapéutica no es uniforme en todos los pacientes tratados. Por ejemplo, un ensayo piloto aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo que evaluaba la eficacia del metronidazol (el fármaco de elección para el tratamiento de la infección) en pacientes con síntomas gastrointestinales y mono infectados por *Blastocystis* demostró que el grupo tratado

no presentaba una mejoría significativa en comparación con el grupo que había recibido placebo (Cobuccio *et al.*, 2023). Estas diferencias en la sensibilidad al tratamiento podrían estar relacionadas con factores propios del protista (como su variabilidad genética o la carga parasitaria), y con factores propios del hospedador (como su estado inmunológico o incluso su microbiota intestinal) (Aykur *et al.*, 2024; Deng *et al.*, 2021).

Precisamente, esta situación ha motivado el estudio de la relación entre *Blastocystis* y las comunidades microbianas con las que coexiste en el tracto intestinal. Nourrisson *et al.* (2014) encontraron una reducción significativa de *Bifidobacterium* sp. en pacientes con IBS y constipación infectados/colonizados por *Blastocystis*, mientras que en los controles igualmente infectados/colonizados por *Blastocystis*, se detectó una reducción significativa de *Faecalibacterium prausnitzii*, una bacteria con propiedades antiinflamatorias. Estos hallazgos sugieren que el protista podría ser un indicador de cambios en la microbiota. De manera complementaria, otros autores han relacionado la presencia de *Blastocystis* con una mayor diversidad bacteriana, representada principalmente por los filos Firmicutes y Bacteroidetes, lo que se interpreta como un indicador de una microbiota intestinal más saludable (Kim *et al.*, 2021; Stensvold *et al.*, 2022). En este mismo sentido, algunos autores apuntan a que los individuos infectados/colonizados por *Blastocystis* presentan una mayor riqueza y, en particular, una mayor abundancia de bacterias consideradas beneficiosas, como las de la clase Clostridia, y menor abundancia de bacterias potencialmente patógenas, como las de la familia Enterobacteriaceae (Audebert *et al.*, 2016; Even *et al.*, 2021). De forma conjunta, estos hallazgos sugieren un posible papel de *Blastocystis* como indicador de una microbiota intestinal equilibrada, contribuyendo a mantener la diversidad microbiana en lugar de inducir disbiosis, que suele asociarse con procesos inflamatorios gastrointestinales (Audebert *et al.*, 2016; Even *et al.*, 2021). Esta variación de la diversidad bacteriana asociada a la presencia de *Blastocystis* se ha relacionado incluso con los ST implicados. En concreto, ST3 se ha correlacionado negativamente con la abundancia de *Akkermansia*, mientras que ST4 ha mostrado una asociación opuesta (Tito *et al.*, 2019).

Todos estos hallazgos han propiciado recientemente un cambio de paradigma en el estudio de *Blastocystis*. En la actualidad, su presencia en el tracto intestinal tiende a asociarse con estados cardiometabólicos favorables y con patrones o estilos de vida saludables, dada la estrecha relación observada entre las dietas basadas en el consumo de vegetales y la colonización por *Blastocystis* (Beghini *et al.*, 2017; Piperni *et al.*, 2024). En esta misma línea, un estudio reciente realizado en Colombia ha puesto de manifiesto que una mayor intensidad de colonización por *Blastocystis* se asocia con abundancia de los géneros *Alistipes*, *Lachnospira* y

Arcanobacterium, mientras que una menor intensidad de colonización se asocia con abundancia de los géneros *Bacteroides*, *Phascolarctobacterium*, *Paraprevotella* y *Akkermansia*. Estos resultados sugieren que incluso la variación en la intensidad de colonización por *Blastocystis* podría tener un impacto en la composición y estructura de la microbiota intestinal del hospedador (Castañeda *et al.*, 2025).

5.6 Limitaciones y fortalezas

Este trabajo de tesis doctoral presenta una serie de limitaciones que es preciso reconocer y tener en cuenta al interpretar sus resultados en cada uno de sus ámbitos de estudio. En relación con la posible influencia de determinados factores genéticos en el desarrollo de CRC, el análisis se restringió a un número limitado de SNP *a priori* asociados con CRC ($n = 10$), de entre todos los referidos en la bibliografía existente. Aunque la selección se realizó con arreglo a los criterios establecidos, es posible que la inclusión de un mayor número de SNP hubiera permitido identificar algunas variantes genéticas asociadas con el desarrollo de CRC en la población analizada, más allá de los 10 SNP analizados que, como se ha indicado, no mostraron ningún tipo de asociación. Esta limitación debería tenerse en cuenta en futuros estudios, en los que sería recomendable la implementación de abordajes genómicos más amplios como GWAS o secuenciación del exoma.

En el estudio de la posible influencia de determinados factores ambientales y conductuales en el desarrollo de CRC, la recolección de la información relativa a estos factores a través de la ECE podría haber introducido sesgos de subjetividad y memoria, lo que puede afectar a la precisión y comparabilidad de los datos.

En el estudio de la posible influencia de determinados factores microbiológicos en el desarrollo de CRC deben reconocerse varias limitaciones. En primer lugar, se trató de un estudio transversal en el que los factores microbiológicos se evaluaron únicamente en el momento del diagnóstico de CRC. Dado que muchos de los microorganismos asociados con el desarrollo de la enfermedad probablemente actúen como iniciadores de un proceso que tiene lugar a largo plazo, esta circunstancia claramente limita la capacidad de establecer relaciones causales y de comprender la cronología del proceso carcinogénico en relación con el agente iniciador. En segundo lugar, a diferencia del abordaje empleado para los protistas entéricos, el estudio no incluyó un diagnóstico molecular específico para helmintos intestinales. Estos parásitos presentan una alta prevalencia en Colombia, aunque podrían haber sido subestimados en

cuanto a su frecuencia y diversidad debido a la aplicación de un abordaje diagnóstico basado exclusivamente en técnicas de microscopía. De forma similar, la detección de *E. coli pks+* se llevó a cabo mediante un ensayo de PCR convencional, en lugar de ensayos de RT-PCR, empleados en la detección de otras bacterias y dotados de una mayor sensibilidad diagnóstica. Esta diferencia metodológica podría haber dado lugar a una subestimación de su frecuencia en ambos grupos de comparación. En tercer lugar, el aislamiento de patotipos DEC o de *M. morganii* a partir de muestras positivas, necesario para su caracterización molecular, se realizó a partir de muestras previamente conservadas a -20°C . La congelación puede comprometer la viabilidad bacteriana y su capacidad de crecimiento, lo que representa una restricción metodológica importante al dificultar o incluso imposibilitar la obtención de aislados bacterianos a partir de muestras positivas.

A pesar de las limitaciones anteriormente mencionadas, este trabajo de tesis doctoral presenta fortalezas metodológicas y analíticas que refuerzan la solidez de sus hallazgos y garantizan la validez y el rigor de las conclusiones que de ellos pueden extraerse. Una de las principales fortalezas radica en el diseño del estudio, al tratarse de un estudio de casos y controles, con ambos grupos de comparación pareados por sexo y edad y en proporción suficiente, y con un tamaño muestral adecuado para asegurar su representatividad y poder estadístico. Así mismo, el diseño incluyó la estimación del componente genético ancestral individual y poblacional, lo que permitió corroborar la homogeneidad de la muestra entre los dos grupos de comparación y con respecto a la población colombiana, minimizando la introducción de sesgos. Este aspecto es particularmente relevante en una población como la colombiana, cuya heterogeneidad genética podría afectar a la validez de los resultados si no se controla adecuadamente. Otra fortaleza destacable es el abordaje diagnóstico integral y exhaustivo de la infección/colonización por *Blastocystis*, empleando tanto técnicas de microscopía como técnicas moleculares de detección y caracterización, incluyendo métodos de secuenciación NGS de segunda y tercera generación. Esta estrategia no sólo ha permitido confirmar la frecuencia de *Blastocystis* en ambos grupos de comparación, sino también identificar los distintos ST y variantes intrasubtipo presentes, posibilitando la evaluación de la asociación de la presencia de *Blastocystis* con el desarrollo de CRC a todos los niveles. La aplicación de técnicas de secuenciación NGS de tercera generación ha permitido asimismo la identificación de un nuevo subtipo de *Blastocystis*, denominado ST41, cuya descripción y validación se llevó a cabo en esta tesis doctoral. Adicionalmente, este abordaje diagnóstico integral ha permitido valorar el desempeño de distintas técnicas clásicas de microscopía y poner

en valor su utilidad, no sólo en contextos con menos recursos como el latinoamericano, sino también de forma complementaria a las técnicas moleculares en cualquier contexto.

5.7 Líneas de evolución

A partir de los hallazgos obtenidos en este trabajo de tesis doctoral, surgen múltiples líneas de evolución orientadas principalmente a validar los factores de riesgo de desarrollo de CRC identificados y/o confirmados, profundizar en su comprensión, más allá de la mera asociación estadística, y explorar su posible aplicación práctica. En el caso de los factores de riesgo genéticos, se plantea la conveniencia de explorar otros genes relacionados con las variantes FYNUL, MID817 y PV92, además de otras variantes adicionales, lo que permitiría construir perfiles de riesgo más completos con un mayor valor diagnóstico y/o pronóstico. En el caso de los factores de riesgo microbiológicos, se plantea la conveniencia de ampliar su estudio en muestras procedentes de biopsias de tejido colónico para validar las asociaciones establecidas a partir de muestras de heces obtenidas en esta tesis doctoral, teniendo en cuenta en cualquier caso la complejidad que conllevan este tipo de estudios, especialmente en lo que se refiere a la constitución del grupo control. Al margen de esto, aprovechando el carácter no invasivo y la relativa facilidad de obtención de muestras de heces, una línea de evolución que se plantea con claridad es la evaluación de la detección de *E. coli pks+*, *M. morganii* y *S. gallolyticus* subespecie *pasteurianus* en heces como posibles biomarcadores de riesgo de CRC en los programas de cribado aplicados en la población general, lo que podría complementar o mejorar las estrategias actuales de detección temprana.

CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

1. No existe una asociación entre la presencia de *Blastocystis* en heces, ya sea a nivel de especie, subtipo o variante intrasubtipo, y el desarrollo de CRC.
2. La presencia de *Escherichia coli* productora de colibactina, *Morganella morganii* o *Streptococcus gallolyticus* subespecie *pasteurianus* en heces constituyen factores de riesgo de desarrollo de CRC, postulándose como posibles biomarcadores en programas de cribado poblacional.
3. No existe una asociación entre la presencia de los patotipos de *E. coli* diarreagénica investigados en heces y el desarrollo de CRC, lo que se relaciona con la escasa presencia de genes de ciclomodulinas observada en estos patotipos.
4. La residencia en zona rural, la residencia en una vivienda con suelo de tierra o madera y el consumo de agua no tratada constituyen factores de riesgo de desarrollo de CRC, mientras que el uso frecuente de hipoclorito sódico para la desinfección de frutas y verduras constituye un factor protector.
5. El consumo frecuente de carne roja y de productos ultraprocesados constituyen factores de riesgo de desarrollo de CRC, mientras que el consumo frecuente de fruta fresca y de verduras y legumbres constituyen factores protectores.
6. El consumo elevado de tabaco constituye un factor de riesgo de desarrollo de CRC.
7. Algunas manifestaciones clínicas adicionales como dolor abdominal, pérdida de peso, diarrea, sangre en heces, vómito y fiebre, los antecedentes personales de anemia, los antecedentes personales y/o familiares de síndrome de intestino irritable y colitis ulcerosa y el tratamiento antiparasitario previo constituyen factores de riesgo de desarrollo de CRC.
8. Los 10 polimorfismos de nucleótido único *a priori* asociados con CRC analizados en este estudio no muestran asociación con CRC.
9. Tres marcadores informativos de la ascendencia, concretamente el alelo C en FYNUL, la delección en MID817 y la delección en PV92, constituyen factores de riesgo de desarrollo de CRC.
10. El uso complementario de técnicas microscópicas y moleculares en la detección de *Blastocystis* en heces es recomendable, siempre y cuando se disponga de personal con experiencia en microscopía.

CONCLUSIONES

11. ST3 es el subtipo de *Blastocystis* más prevalente en la población de estudio, seguido de ST1, ST2 y, con menor frecuencia, ST4, y son frecuentes las coinfecciones por dos o más de estos subtipos.
12. ST3 presenta una baja diversidad intrasubtipo, a diferencia de ST1 y ST2, si bien en cada uno de ellos se identifican algunas variantes únicas especialmente prevalentes en la población de estudio.
13. Se describe y valida formalmente mediante la secuenciación completa del gen *ssu*-rRNA un nuevo subtipo de *Blastocystis* denominado ST41.

BIBLIOGRAFÍA

7 BIBLIOGRAFÍA

10X Orange G DNA Loading Buffer Recipe. (s. f.). Recuperado 10 de julio de 2023, a partir de <http://www.thelabrat.com/protocols/DNALoadingBuffer.shtml>.

1000 Genomes Project. (s. f.). Recuperado 24 de septiembre de 2025, a partir de <https://www.coriell.org/1/NHGRI/Collections/1000-Genomes-Project-Collection/1000-Genomes-Project>.

Abarca, N., Santín, M., Ortega, S., Maloney, J. G., George, N. S., Molokin, A., Cardona, G. A., Dashti, A., Köster, P. C., Bailo, B., Hernández-de-Mingo, M., Muadica, A. S., Calero-Bernal, R., Carmena, D., y González-Barrio, D. (2021). Molecular detection and characterization of *Blastocystis* sp. and *Enterocytozoon bieneusi* in cattle in Northern Spain. *Veterinary Sciences*, 8(9), 191. <https://doi.org/10.3390/vetsci8090191>.

Abd El-Latif, N. F., Kandil, N. S., Shamseya, M., Elwany, Y. N., y Ibrahim, H. S. (2023). Role of *Cryptosporidium* spp in development of colorectal cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 24(2), 667-674. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2023.24.2.667>.

Abdulmir, A. S., Hafidh, R. R., y Abu Bakar, F. (2011). The association of *Streptococcus bovis/gallolyticus* with colorectal tumors: The nature and the underlying mechanisms of its etiological role. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-11>.

Afanador, C. H., Palacio, K. A., Isaza, L. F., Ahumada, E., Ocampo, C. M., y Muñetón, C. M. (2022). Caracterización molecular de pacientes con cáncer colorrectal. *Biomédica*, 42(Sp. 1), 154-171. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5957>.

Agnes, A., Biondi, A., Belia, F., Di Giambenedetto, S., Addolorato, G., Antonelli, M., D'Ugo, D., y Persiani, R. (2021). Association between colorectal cancer and *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteuranus* (former *S. bovis*) endocarditis: Clinical relevance and cues for microbiota science. Case report and review of the literature. *European Review for*

BIBLIOGRAFÍA

- Medical and Pharmacological Sciences*, 25(1), 480-486.
https://doi.org/10.26355/eurev_202101_24417.
- Ajjampur, S. S. R., y Tan, K. S. W. (2016). Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. - interpreting results from in vitro and in vivo studies. *Parasitology International*, 65(6 Pt B), 772-779. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.05.007>.
- Ajmera, A., y Shabbir, N. (2025). *Salmonella*. En *StatPearls*. StatPearls Publishing.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555892/>.
- Alaejos, M. S., y Afonso, A. M. (2011). Factors that affect the content of heterocyclic aromatic amines in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(2), 52-108.
<https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00141.x>.
- Alcaldía de Medellín. (2023, diciembre). *Información general de la ciudad*.
<https://www.medellin.gov.co/es/wp-content/uploads/2023/11/1.-Informacion-General-de-Ciudad.pdf>.
- Alcaldía de Medellín, Secretaría de Salud. (2022). *Análisis de situación de salud con el modelo de los determinantes sociales de salud*. https://www.medellin.gov.co/es/wp-content/uploads/2023/06/ASIS_Medellin_2022_-V2.pdf.
- Alegre, R. E., Vaschalde, P. J., Milano, F., y Monje, L. D. (2025). *Blastocystis* in humans and domestic animals: Risk factors assessment and potential zoonotic transmission in a periurban and rural region of Northeastern Argentina. *Parasitology International*, 106, 103035. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2025.103035>.
- Alfellani, M. A., Taner-Mulla, D., Jacob, A. S., Imeede, C. A., Yoshikawa, H., Stensvold, C. R., y Clark, C. G. (2013). Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. *Protist*, 164(4), 497-509. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2013.05.003>.
- Ali, S. H., Ismail, M. A. M., El-Badry, A. A., Abu-Sarea, E. Y., Dewidar, A. M., y Hamdy, D. A. (2022). An association between *Blastocystis* subtypes and colorectal cancer patients: A

- significant different profile from non-cancer individuals. *Acta Parasitologica*, 67(2), 752-763. <https://doi.org/10.1007/s11686-021-00508-y>.
- Allen, A. V., y Ridley, D. S. (1970). Further observations on the formol-ether concentration technique for faecal parasites. *Journal of Clinical Pathology*, 23(6), 545-546. <https://doi.org/10.1136/jcp.23.6.545>.
- Alomirah, H., Al-Zenki, S., Al-Hooti, S., Zaghloul, S., Sawaya, W., Ahmed, N., y Kannan, K. (2011). Concentrations and dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from grilled and smoked foods. *Food Control*, 22(12), 2028-2035. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.05.024>.
- American Cancer Society. (s. f.). *Risk Factors for Anal Cancer*. Recuperado 15 de marzo de 2025, a partir de <https://www.cancer.org/cancer/types/anal-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>.
- American Cancer Society. (2016). *Infections that can lead to cancer*. <https://www.cancer.org/cancer/risk-prevention/infections/infections-that-can-lead-to-cancer.html>.
- American Cancer Society. (2023). *Cáncer de colon o de recto*. <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-colon-o-recto.html>.
- American Cancer Society. (2024a). Cancer facts & figures 2024. *American Cancer Society*, 88.
- American Cancer Society. (2024b, febrero). *Colonoscopy*. <https://www.cancer.org/cancer/diagnosis-staging/tests/endoscopy/colonoscopy.html>
- Amirsasan, R., Akbarzadeh, M., y Akbarzadeh, S. (2022). Exercise and colorectal cancer: Prevention and molecular mechanisms. *Cancer Cell International*, 22(1), 247. <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02670-3>.
- Andrade, R. B., Amador, M. A. T., Cavalcante, G. C., Leitão, L. P. C., Fernandes, M. R., Modesto, A. A. C., Moreira, F. C., Khayat, A. S., Assumpção, P. P., Ribeiro-Dos-Santos, Â., Santos, S., y Santos, N. P. C. (2018). Estimating Asian contribution to the Brazilian population: A

BIBLIOGRAFÍA

- new application of a validated set of 61 ancestry informative markers. *G3*, 8(11), 3577-3582. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200650>.
- Annema, N., Heyworth, J. S., McNaughton, S. A., Iacopetta, B., y Fritschi, L. (2011). Fruit and vegetable consumption and the risk of proximal colon, distal colon, and rectal cancers in a case-control study in Western Australia. *Journal of the American Dietetic Association*, 111(10), 1479-1490. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2011.07.008>.
- Antonic, V., Stojadinovic, A., Kester, K. E., Weina, P. J., Brücher, B. L., Protic, M., Avital, I., y Izzadjoo, M. (2013). Significance of infectious agents in colorectal cancer development. *Journal of Cancer*, 4(3), 227-240. <https://doi.org/10.7150/jca.5835>.
- Anuar, T. S., Ghani, M. K. A., Azreen, S. N., Salleh, F. M., y Moktar, N. (2013). *Blastocystis* infection in Malaysia: Evidence of waterborne and human-to-human transmissions among the Proto-Malay, Negrito and Senoi tribes of Orang Asli. *Parasites & Vectors*, 6(1), 40. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-40>.
- Appelbee, A. J., Frederick, L. M., Heitman, T. L., y Olson, M. E. (2003). Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. *Veterinary Parasitology*, 112(4), 289-294. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00422-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00422-3).
- Arcos Lucero, D. S., Agudelo Motta, M. L., González Gómez, A. C., Manrique, J. F., Vásquez Arteaga, L. R., Giraldo Forero, J. C., Bernal Lizarazú, M. C., y Benítez Matallana, V. A. (2022). Ecoepidemiología de protozoos intestinales en la población infantil de cuatro municipios de Boyacá – Colombia. *Brazilian Journal of Health Review*, 5(5), 20490-20508. <https://doi.org/10.34119/bjhrv5n5-217>.
- Arthur, J. C., Perez-Chanona, E., Mühlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J. M., Fan, T.-J., Campbell, B. J., Abujamel, T., Dogan, B., Rogers, A. B., Rhodes, J. M., Stintzi, A., Simpson, K. W., Hansen, J. J., Keku, T. O., Fodor, A. A., y Jobin, C. (2012). Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science*, 338(6103), 120-123. <https://doi.org/10.1126/science.1224820>.

- Asghari, A., Yousefi, A., Badali, R., Mohammadi, M. R., Shamsi, L., Maleki, F., y Bahrami, A. M. (2024). First molecular subtyping and zoonotic significance of *Blastocystis* sp. in Dromedary (*C. dromedarius*) and Bactrian (*C. bactrianus*) camels in Iran: A molecular epidemiology and review of available literature. *Veterinary Medicine and Science*, 10(3), e1442. <https://doi.org/10.1002/vms3.1442>.
- Asociación Médica Mundial. (2013). *Declaración de Helsinki*. <https://www.wma.net/es/policies-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/>.
- Audebert, C., Even, G., Cian, A., Blastocystis Investigation Group, Loywick, A., Merlin, S., Viscogliosi, E., y Chabé, M. (2016). Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Scientific Reports*, 6, 25255. <https://doi.org/10.1038/srep25255>.
- Augustus, G. J., y Ellis, N. A. (2018). Colorectal cancer disparity in African Americans: Risk factors and carcinogenic mechanisms. *The American Journal of Pathology*, 188(2), 291-303. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.07.023>.
- Aune, D., De Stefani, E., Ronco, A., Boffetta, P., Deneo-Pellegrini, H., Acosta, G., y Mendilaharsu, M. (2009). Meat consumption and cancer risk: A case-control study in Uruguay. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 10(3), 429-436.
- Axelrad, J. E., Lichtiger, S., y Yajnik, V. (2016). Inflammatory bowel disease and cancer: The role of inflammation, immunosuppression, and cancer treatment. *World Journal of Gastroenterology*, 22(20), 4794-4801. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i20.4794>.
- Aykur, M., Malatyali, E., Demirel, F., Cömert-Koçak, B., Gentekaki, E., Tsaousis, A. D., y Dogruman-Al, F. (2024). *Blastocystis*: A mysterious member of the gut microbiome. *Microorganisms*, 12(3), 461. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030461>.
- Bachelle, S. V., Bah, S. Y., Addo, R. T., Bediako-Bowan, A. A. A., Egyir, B., Tsatsu, S. E., Dzudzor, B., y Amarh, V. (2024). Genomic analysis of Enterobacteriaceae from colorectal cancer

BIBLIOGRAFÍA

- patients at a tertiary hospital in Ghana: A case-control study. *Scientific Reports*, 14(1), 23195. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-74299-3>.
- Backhaus, J., Frickmann, H., Hagen, R. M., Concha, G., Molitor, E., Hoerauf, A., y Kann, S. (2023). Gastrointestinal pathogens in multi-infected individuals: A cluster analysis of interaction. *Microorganisms*, 11(11), 2642. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112642>.
- Baddour, L. M., Wilson, W. R., Bayer, A. S., Fowler, V. G., Tleyjeh, I. M., Rybak, M. J., Barsic, B., Lockhart, P. B., Gewitz, M. H., Levison, M. E., Bolger, A. F., Steckelberg, J. M., Baltimore, R. S., Fink, A. M., O’Gara, P., Taubert, K. A., y American Heart Association Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, and Stroke Council. (2015). Infective endocarditis in adults: Diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications. A scientific statement for healthcare professionals from the american heart association. *Circulation*, 132(15), 1435-1486. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000296>.
- Baek, S., Maloney, J. G., Molokin, A., George, N. S., Cortés Vecino, J. A., y Santin, M. (2022). Diversity of *Blastocystis* subtypes in horses in Colombia and identification of two new subtypes. *Microorganisms*, 10(9), 1693. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091693>.
- Baena, R., y Salinas, P. (2015). Diet and colorectal cancer. *Maturitas*, 80(3), 258-264. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2014.12.017>.
- Bahrami, F., Babaei, E., Badirzadeh, A., Riabi, T. R., y Abdoli, A. (2020). *Blastocystis*, urticaria, and skin disorders: Review of the current evidences. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 39(6), 1027-1042. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03793-8>.

- Balaguer, F. (2013). Genética del cáncer colorrectal. *Gastroenterología y Hepatología*, 36, 73-79.
[https://doi.org/10.1016/S0210-5705\(13\)70056-6](https://doi.org/10.1016/S0210-5705(13)70056-6).
- Barbosa, C. V., Barreto, M. M., Andrade, R. de J., Sodré, F., d'Avila-Levy, C. M., Peralta, J. M., Igreja, R. P., de Macedo, H. W., y Santos, H. L. C. (2018). Intestinal parasite infections in a rural community of Rio de Janeiro (Brazil): Prevalence and genetic diversity of *Blastocystis* subtypes. *PLoS One*, 13(3), e0193860.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193860>.
- Bardou, M., Barkun, A. N., y Martel, M. (2013). Obesity and colorectal cancer. *Gut*, 62(6), 933-947. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-304701>.
- Barrubés, L., Babio, N., Becerra-Tomás, N., Rosique-Esteban, N., y Salas-Salvadó, J. (2019). Association between dairy product consumption and colorectal cancer risk in adults: A systematic review and meta-analysis of epidemiologic studies. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*, 10(suppl_2), S190-S211. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy114>.
- Baye, T. M., Tiwari, H. K., Allison, D. B., y Go, R. C. (2009). Database mining for selection of SNP markers useful in admixture mapping. *BioData Mining*, 2(1), 1.
<https://doi.org/10.1186/1756-0381-2-1>.
- Becker, H. E. F., Jamin, C., Bervoets, L., Boleij, A., Xu, P., Pierik, M. J., Stassen, F. R. M., Savelkoul, P. H. M., Penders, J., y Jonkers, D. M. A. E. (2021). Higher prevalence of *Bacteroides fragilis* in Crohn's disease exacerbations and strain-dependent increase of epithelial resistance. *Frontiers in Microbiology*, 12, 598232.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.598232>.
- Beghini, F., Pasolli, E., Truong, T. D., Putignani, L., Cacciò, S. M., y Segata, N. (2017). Large-scale comparative metagenomics of *Blastocystis*, a common member of the human gut microbiome. *The ISME Journal*, 11(12), 2848-2863.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2017.139>.

BIBLIOGRAFÍA

- Bello, J. O. M., Nieva, L. O., Paredes, A. C., Gonzalez, A. M. F., Zavaleta, L. R., y Lizano, M. (2015). Regulation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway by human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins. *Viruses*, 7(8), 4734-4755. <https://doi.org/10.3390/v7082842>.
- Benamrouz, S., Conseil, V., Chabe, M., Praet, M., Audebert, C., Blervaque, R., Guyot, K., Gazzola, S., Mouray, A., Chassat, T., Delaire, B., Goetinck, N., Gantois, N., Osman, M., Slomianny, C., Dehennaut, V., Lefebvre, T., Viscogliosi, E., Cuvelier, C., ... Certad, G. (2014). *Cryptosporidium parvum*-induced ileo-caecal adenocarcinoma and Wnt signaling in a rodent model. *Disease Models & Mechanisms*, dmm.013292. <https://doi.org/10.1242/dmm.013292>.
- Bener, A., Öztürk, A. E., Dasdelen, M. F., Barisik, C. C., Dasdelen, Z. B., Agan, A. F., De La Rosette, J., y Day, A. S. (2024). Colorectal cancer and associated genetic, lifestyle, cigarette, nargileh-hookah use and alcohol consumption risk factors: A comprehensive case-control study. *Oncology Reviews*, 18, 1449709. <https://doi.org/10.3389/or.2024.1449709>.
- Bergsten, E., Mestivier, D., Donnadieu, F., Pedron, T., Barau, C., Meda, L. T., Mettouchi, A., Lemichez, E., Gorgette, O., Chamaillard, M., Vaysse, A., Volant, S., Doukani, A., Sansonetti, P. J., Sobhani, I., y Nigro, G. (2023). *Parvimonas micra*, an oral pathobiont associated with colorectal cancer, epigenetically reprograms human colonocytes. *Gut Microbes*, 15(2), 2265138. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2265138>.
- Bernabe-Dones, R. D., Gonzalez-Pons, M., Villar-Prados, A., Lacourt-Ventura, M., Rodríguez-Arroyo, H., Fonseca-Williams, S., Velazquez, F. E., Diaz-Algorri, Y., Lopez-Diaz, S. M., Rodríguez, N., Yamamura, Y., y Cruz-Correa, M. (2016). High prevalence of human papillomavirus in colorectal cancer in hispanics: A case-control study. *Gastroenterology Research and Practice*, 2016, 7896716. <https://doi.org/10.1155/2016/7896716>.
- Beyhan, Y. E., Güven, İ., y Aydın, M. (2023). Detection of *Blastocystis* sp. in ulcerative colitis, Crohn's and chronic diarrheal patients by microscopy, culture and real-time polymerase

- chain reaction. *Microbial Pathogenesis*, 177, 106039.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106039>.
- Bin Ismail, C. M. K. H., Bin Mohammad Aidid, E., Binti Hamzah, H. A., Bin Shalihin, M. S. E., y Bin Md Nor, A. (2023). *Streptococcus gallolyticus* infection: A neglected marker for colorectal cancer? *Arab Journal of Gastroenterology*, 24(3), 163-167.
<https://doi.org/10.1016/j.ajg.2023.02.002>.
- Biosearch Technologies. (2021). *KASP genotyping manual*. LGCBiosearch. <https://biosearch-cdn.azureedge.net/assetsv6/KASP-genotyping-chemistry-User-guide.pdf>.
- Bodaghi, S., Yamanegi, K., Xiao, S.-Y., Da Costa, M., Palefsky, J. M., y Zheng, Z.-M. (2005). Colorectal papillomavirus infection in patients with colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 11(8), 2862-2867. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1680>.
- Bolton, D. J. (2015). *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food Microbiology*, 48, 99-108. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.017>.
- Bonnet, M., Buc, E., Sauvanet, P., Darcha, C., Dubois, D., Pereira, B., Déchelotte, P., Bonnet, R., Pezet, D., y Darfeuille-Michaud, A. (2014). Colonization of the human gut by *E. coli* and colorectal cancer risk. *Clinical Cancer Research*, 20(4), 859-867.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1343>.
- Boorom, K. F., Smith, H., Nimri, L., Viscogliosi, E., Spanakos, G., Parkar, U., Li, L.-H., Zhou, X.-N., Ok, Ü. Z., Leelayoova, S., y Jones, M. S. (2008). Oh my aching gut: Irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. *Parasites & Vectors*, 1(1), 40.
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-1-40>.
- Botero, D., y Restrepo, M. (2012). *Parasitosis humanas, 5a Ed.* Corporación para investigaciones Biológicas CIB. <https://books.google.es/books?id=bgT2DwAAQBAJ>.
- Bouvard, V., Loomis, D., Guyton, K. Z., Grosse, Y., Ghissassi, F. E., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Mattock, H., y Straif, K. (2015). Carcinogenicity of consumption of red and processed

BIBLIOGRAFÍA

- meat. *The Lancet Oncology*, 16(16), 1599-1600. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00444-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00444-1).
- Bravo-González, A., Villa-Tamayo, D., Giraldo-Hinestroza, T., Manjarrés-Sierra, N., Córdoba-Alzate, D., Buitrago-Salazar, C., Carvajal-Restrepo, H., Romero-Montoya, M. R.-M., Sánchez-Jiménez, M., y Cardona-Castro, N. (2023). Prevalence and risk factors related to intestinal parasitosis in children under 18 years of age in four populations of Colombia: A cross-sectional study. *Infectio*, 217-222. <https://doi.org/10.22354/24223794.1149>.
- Brennan, C. A., y Garrett, W. S. (2016). Gut microbiota, inflammation, and colorectal cancer. *Annual Review of Microbiology*, 70. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095513>.
- Brennan, C. A., y Garrett, W. S. (2019). *Fusobacterium nucleatum* -symbiont, opportunist and oncobacterium. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 156-166. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0129-6>.
- Brenner, H., Kloor, M., y Pox, C. P. (2014). Colorectal cancer. *The Lancet*, 383(9927), 1490-1502. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61649-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61649-9).
- Brook, I., Wexler, H. M., y Goldstein, E. J. C. (2013). Antianaerobic antimicrobials: Spectrum and susceptibility testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(3), 526-546. <https://doi.org/10.1128/CMR.00086-12>.
- Bryan, P. E., Romero, M., Sánchez, M., Torres, G., Gómez, W., Restrepo, M., Restrepo, A., y Mejía, R. (2020). Urban versus rural prevalence of intestinal parasites using multi-parallel qPCR in Colombia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 104(3), 907-909. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-1202>.
- Buckholt, M. A., Lee, J. H., y Tzipori, S. (2002). Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine: An 18-month survey at a slaughterhouse in Massachusetts. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2595-2599. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2595-2599.2002>.

- Burnett-Hartman, A. N., Newcomb, P. A., y Potter, J. D. (2008). Infectious agents and colorectal cancer: A review of *Helicobacter pylori*, *Streptococcus bovis*, JC virus, and human papillomavirus. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 17(11), 2970-2979. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0571>.
- Bush, L. M. (2023). *Infecciones por enterococos* (Vol. 2023). Manual MSD. <https://www.msdmanuals.com/es/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas-bacterias-grampositivas/infecciones-por-enterococos>.
- Bush, L. M., y Vazquez-Pertejo, M. T. (2023). *Overview of clostridial infections* (Vol. 2023). MSD Manual. <https://www.msdmanuals.com/professional/infectious-diseases/anaerobic-bacteria/overview-of-clostridial-infections>.
- Cacciò, S. M., De Giacomo, M., y Pozio, E. (2002). Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *International Journal for Parasitology*, 32(8), 1023-1030. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(02\)00068-1](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(02)00068-1).
- Cai, S., Li, Y., Ding, Y., Chen, K., y Jin, M. (2014). Alcohol drinking and the risk of colorectal cancer death: A meta-analysis. *European Journal of Cancer Prevention*, 23(6), 532-539. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000076>.
- Caldeiro Ventura, M. Á., Feliu Frasnado, E., Foz Sala, M., Gracia Guillén, D., Herranz Rodríguez, G., Lience Durán, E., Pulido Mestre, M., Ribera Santasusana, J. M., Rey-Joly Barroso, C., Ruiz Rivera, F. J., y Vilarroya Oliver, Ó. (1993). *Manual de estilo: Publicaciones biomédicas*. Doyma S.A.
- Canizalez-Roman, A., Reina-Reyes, J. E., Angulo-Zamudio, U. A., Geminiano-Martínez, E. E., Flores-Carrillo, A. F., García-Matus, R. R., Valencia-Mijares, N. M., Leon-Sicairos, N., Velazquez-Roman, J., Martínez-Villa, F. A., y Tapia-Pastrana, G. (2021). Prevalence of cyclomodulin-positive *E. coli* and *Klebsiella* spp. strains in Mexican patients with colon

- diseases and antimicrobial resistance. *Pathogens*, 11(1), 14.
<https://doi.org/10.3390/pathogens11010014>.
- Cao, Y., Oh, J., Xue, M., Huh, W. J., Wang, J., Gonzalez-Hernandez, J. A., Rice, T. A., Martin, A. L., Song, D., Crawford, J. M., Herzon, S. B., y Palm, N. W. (2022). Commensal microbiota from patients with inflammatory bowel disease produce genotoxic metabolites. *Science*, 378(6618), eabm3233. <https://doi.org/10.1126/science.abm3233>.
- Carrera-Bravo, C., Koh, E. Y., y Tan, K. (2021). The roles of parasite-derived extracellular vesicles in disease and host-parasite communication. *Parasitology International*, 83, 102373. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102373>.
- Carvajal-Restrepo, H., Orrego-Morales, C., Vega-Orrego, T., Arango-Arango, S., Buitrago-Agudelo, D., Maya-Betancourt, M. C., Maya-Betancourt, V., Restrepo-Álvarez, L., Silva-Cáceres, N., Suarez-Urquijo, S., Massaro-Ceballos, M., Romero-Montoya, M., Sánchez-Jiménez, M., y Cardona-Castro, N. (2018). Screening for intestinal parasites in adults from three different regions of Colombia. *Infectio*, 23(1), 33. <https://doi.org/10.22354/in.v23i1.753>.
- Casero, R. D., Mongi, F., Sánchez, A., y Ramírez, J. D. (2015). *Blastocystis* and urticaria: Examination of subtypes and morphotypes in an unusual clinical manifestation. *Acta Tropica*, 148, 156-161. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.05.004>.
- Castañeda, S., Acosta, C. P., Vasquez-A, L. R., Patiño, L. H., Mejía, R., y Ramírez, J. D. (2024). Molecular detection of intestinal parasites in a rural community of Colombia: A one health approach to explore potential environmental-zoonotic transmission. *Zoonoses and Public Health*, 71(6), 723-735. <https://doi.org/10.1111/zph.13138>.
- Castañeda, S., Muñoz, M., Villamizar, X., Hernández, P. C., Vásquez, L. R., Tito, R. Y., y Ramírez, J. D. (2020). Microbiota characterization in *Blastocystis*-colonized and *Blastocystis*-free school-age children from Colombia. *Parasites & Vectors*, 13(1), 521. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04392-9>.

- Castañeda, S., Tomiak, J., Andersen, L. O., Acosta, C. P., Vasquez-A, L. R., Stensvold, C. R., y Ramírez, J. D. (2025). Impact of *Blastocystis* carriage and colonization intensity on gut microbiota composition in a non-westernized rural population from Colombia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 19(5), e0013111. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0013111>.
- CDC. (2024, marzo 22). *Clinical care of blastocystosis*. Blastocystis. <https://www.cdc.gov/blastocystis/hcp/clinical-care/index.html>.
- Cekin, A. H., Cekin, Y., Adakan, Y., Tasdemir, E., Koclar, F. G., y Yolcular, B. O. (2012). Blastocystosis in patients with gastrointestinal symptoms: A case-control study. *BMC Gastroenterology*, 12, 122. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-12-122>.
- Cerda L, J., y Villarroel Del P, L. (2008). Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. *Revista Chilena de Pediatría*, 79(1). <https://doi.org/10.4067/s0370-41062008000100008>.
- Chacón-Duque, J. C. (2013). *La composición genética ancestral y su relación con el comportamiento de la infección con el virus del dengue en una muestra de población colombiana* [Universidad de Antioquia]. <https://www.hgm.gov.co/loader.php?IServicio=Tools2&ITipo=descargas&IFuncion=descargar&idFile=743>.
- Chalmers, R. M., y Davies, A. P. (2010). Minireview: Clinical cryptosporidiosis. *Experimental Parasitology*, 124(1), 138-146. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.02.003>.
- Chan, D., Lau, R., Aune, D., Vieira, R., Greenwood, D. C., Kampman, E., y Norat, T. (2011). Red and processed meat and colorectal cancer incidence: Meta-analysis of prospective studies. *PloS One*, 6(6), e20456. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020456>.
- Chan, K., Chandramathi, S., Suresh, K., Chua, K. H., y Kuppusamy, U. R. (2012). Effects of symptomatic and asymptomatic isolates of *Blastocystis hominis* on colorectal cancer cell

BIBLIOGRAFÍA

- line, HCT116. *Parasitology Research*, 110(6), 2475-2480.
<https://doi.org/10.1007/s00436-011-2788-3>.
- Chand, G., Shamban, L., Forman, A., y Sinha, P. (2016). The association of *Streptococcus gallolyticus* subspecies *pasteurianus* bacteremia with the detection of premalignant and malignant colonic lesions. *Case Reports in Gastrointestinal Medicine*, 2016, 7815843.
<https://doi.org/10.1155/2016/7815843>.
- Chandramathi, S., Suresh, K., y Kuppusamy, U. R. (2010). Solubilized antigen of *Blastocystis hominis* facilitates the growth of human colorectal cancer cells, HCT116. *Parasitology Research*, 106(4), 941-945. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1764-7>.
- Chang, C. C., Chow, C. C., Tellier, L. C., Vattikuti, S., Purcell, S. M., y Lee, J. J. (2015). Second-generation PLINK: Rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience*, 4, 7. <https://doi.org/10.1186/s13742-015-0047-8>.
- Chang, W., Chapkin, R. S., y Lupton, J. R. (1997). Predictive value of proliferation, differentiation and apoptosis as intermediate markers for colon tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 18(4), 721-730. <https://doi.org/10.1093/carcin/18.4.721>.
- Chang, Y., Yan, Y., Han, H., Wu, Y., Li, J., Ning, C., Zhang, S., y Zhang, L. (2021). Prevalence of *Blastocystis* infection in free-range Tibetan sheep and Tibetan goats in the Qinghai-Tibetan Plateau in China. *One Health*, 13, 100347.
<https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100347>.
- Checa Caratachea, M. A. (2007). Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 20(3), 213-221.
- Chen, W., Liu, F., Ling, Z., Tong, X., y Xiang, C. (2012). Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PLoS One*, 7(6), e39743.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039743>.
- Chen, Y., Huang, Z., Tang, Z., Huang, Y., Huang, M., Liu, H., Ziebolz, D., Schmalz, G., Jia, B., y Zhao, J. (2022). More than just a periodontal pathogen -the research progress on

- Fusobacterium nucleatum*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 815318.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.815318>.
- Cheng, J., Chen, Y., Wang, X., Wang, J., Yan, Z., Gong, G., Li, G., y Li, C. (2015). Meta-analysis of prospective cohort studies of cigarette smoking and the incidence of colon and rectal cancers. *European Journal of Cancer Prevention*, 24(1), 6-15.
<https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000011>.
- Choi, S.-W., Stickel, F., Baik, H. W., Kim, Y.-I., Seitz, H. K., y Mason, J. B. (1999). Chronic alcohol consumption induces genomic but not p53-specific dna hypomethylation in rat colon. *The Journal of Nutrition*, 129(11), 1945-1950. <https://doi.org/10.1093/jn/129.11.1945>.
- Chun, Y., Sohn, S.-K., Song, H. K., Lee, S. M., Youn, Y. H., Lee, S., y Park, H. (2015). Associations of colorectal cancer incidence with nutrient and food group intakes in korean adults: A case-control study. *Clinical Nutrition Research*, 4(2), 110-123.
<https://doi.org/10.7762/cnr.2015.4.2.110>.
- Chung, L., Thiele Orberg, E., Geis, A. L., Chan, J. L., Fu, K., DeStefano Shields, C. E., Dejea, C. M., Fathi, P., Chen, J., Finard, B. B., Tam, A. J., McAllister, F., Fan, H., Wu, X., Ganguly, S., Lebid, A., Metz, P., Van Meerbeke, S. W., Huso, D. L., ... Housseau, F. (2018). *Bacteroides fragilis* toxin coordinates a pro-carcinogenic inflammatory cascade via targeting of colonic epithelial cells. *Cell Host & Microbe*, 23(2), 203-214.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.01.007>.
- Clark, C. G., y Stensvold, C. R. (2016). *Blastocystis*: Isolation, xenic cultivation, and cryopreservation. *Current Protocols in Microbiology*, 43, 20A.1.1-20A.1.8.
<https://doi.org/10.1002/cpmc.18>.
- Claros Díaz, M. G. (2017). *Cómo traducir y redactar textos científicos en español: Reglas, ideas y consejos* (2ª ed. corr. y aum). Fundación Dr. Antonio Esteve.
- Cobuccio, L. G., Laurent, M., Gardiol, C., Wampfler, R., Poppert, S., Senn, N., Eperon, G., Genton, B., Locatelli, I., y de Vallière, S. (2023). Should we treat *Blastocystis* sp.? A double-blind

BIBLIOGRAFÍA

- placebo-controlled randomized pilot trial. *Journal of Travel Medicine*, 30(1), taac143.
<https://doi.org/10.1093/jtm/taac143>.
- Coelho, T. R., Gaspar, R., Figueiredo, P., Mendonça, C., Lazo, P. A., y Almeida, L. (2013). Human JC polyomavirus in normal colorectal mucosa, hyperplastic polyps, sporadic adenomas, and adenocarcinomas in Portugal. *Journal of Medical Virology*, 85(12), 2119-2127.
<https://doi.org/10.1002/jmv.23705>.
- Collins, D., Hogan, A. M., y Winter, D. C. (2011). Microbial and viral pathogens in colorectal cancer. *The Lancet Oncology*, 12(5). [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70186-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70186-8).
- Collins-Schramm, H. E., Phillips, C. M., Operario, D. J., Lee, J. S., Weber, J. L., Hanson, R. L., Knowler, W. C., Cooper, R., Li, H., y Seldin, M. F. (2002). Ethnic-difference markers for use in mapping by admixture linkage disequilibrium. *The American Journal of Human Genetics*, 70(3), 737-750. <https://doi.org/10.1086/339368>.
- Congreso de la República de Colombia. (1993, diciembre 23). *Ley 100 de 1993*.
<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/ley-100-de-1993.pdf>.
- Conley, A. B., Rishishwar, L., Norris, E. T., Valderrama-Aguirre, A., Mariño-Ramírez, L., Medina-Rivas, M. A., y Jordan, I. K. (2017). A comparative analysis of genetic ancestry and admixture in the Colombian populations of Chocó and Medellín. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, 7(10), 3435-3447. <https://doi.org/10.1534/g3.117.11118>.
- Cougnoux, A., Dalmaso, G., Martinez, R., Buc, E., Delmas, J., Gibold, L., Sauvanet, P., Darcha, C., Déchelotte, P., Bonnet, M., Pezet, D., Wodrich, H., Darfeuille-Michaud, A., y Bonnet, R. (2014). Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. *Gut*, 63(12), 1932-1942.
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-305257>.
- Coyle, C. M., Varughese, J., Weiss, L. M., y Tanowitz, H. B. (2012). *Blastocystis*: To treat or not to treat. *Clinical Infectious Diseases*, 54(1), 105-110. <https://doi.org/10.1093/cid/cir810>

- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., y Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 822-880. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>.
- CTO. (2021). *Manual CTO de Medicina y Cirugía* (12a Edición). CTO Editorial.
- Cuevas-Ramos, G., Petit, C. R., Marcq, I., Boury, M., Oswald, E., y Nougayrède, J.-P. (2010). *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(25), 11537-11542. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001261107>.
- Curtin, K., Wolff, R. K., Herrick, J. S., Abo, R., y Slattery, M. L. (2010). Exploring multilocus associations of inflammation genes and colorectal cancer risk using hapConstructor. *BMC Medical Genetics*, 11(1), 170. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-11-170>.
- Darwish, B., Aboualchamat, G., y Nahhas, S. A. (2021). Detection of *Blastocystis* in stool isolates using different diagnostic methods. *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-386319/v1>.
- Dashti, A., Alonso, H., Escolar-Miñana, C., Köster, P. C., Bailo, B., Carmena, D., y González-Barrio, D. (2024). Evaluation of the use of singleplex and duplex certest viasure real-time pcr assays to detect common intestinal protist parasites. *Diagnostics*, 14(3), 319. <https://doi.org/10.3390/diagnostics14030319>.
- de Klaver, W., de Wit, M., Bolijn, A., Tijssen, M., Delis-van Diemen, P., Lemmens, M., Spaander, M. C., Dekker, E., van Leerdam, M. E., Coupé, V. M., van Boxtel, R., Clevers, H., Carvalho, B., y Meijer, G. A. (2024). Polyketide synthase positive *Escherichia coli* one-time measurement in stool is not informative of colorectal cancer risk in a screening setting. *The Journal of Pathology*, 263(2), 217-225. <https://doi.org/10.1002/path.6276>.
- De La Chapelle, A. (2004). Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4(10), 769-780. <https://doi.org/10.1038/nrc1453>.

BIBLIOGRAFÍA

- De Souza, J. B., De Almeida Campos, L. A., Palácio, S. B., Brelaz-de-Castro, M. C. A., y Cavalcanti, I. M. F. (2024). Prevalence and implications of pKs-positive *Escherichia coli* in colorectal cancer. *Life Sciences*, 341, 122462. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2024.122462>.
- Deininger, P. L., y Batzer, M. A. (1999). Alu repeats and human disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 67(3), 183-193. <https://doi.org/10.1006/mgme.1999.2864>.
- del Coco, V. F., Molina, N. B., Basualdo, J. A., y Córdoba, M. A. (2017). *Blastocystis* spp.: Avances, controversias y desafíos futuros. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(1), 110-118. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.08.004>.
- DeLira-Bustillos, N., Angulo-Zamudio, U. A., Leon-Sicairos, N., Flores-Villaseñor, H., Velazquez-Roman, J., Tapia-Pastrana, G., Martínez-Villa, F. A., Velázquez-Cruz, R., Salmerón, J., Canizales-Quinteros, S., y Canizalez-Roman, A. (2024). Distribution and virulence of *Escherichia coli* harboring cyclomodulins and supplementary virulence genes isolates from clinical and environmental samples. *Microbial Pathogenesis*, 190, 106634. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.106634>.
- Deng, L., Wojciech, L., Gascoigne, N. R. J., Peng, G., y Tan, K. S. W. (2021). New insights into the interactions between *Blastocystis*, the gut microbiota, and host immunity. *PLoS Pathogens*, 17(2), e1009253. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009253>.
- Deoula, M., El Kinany, K., Huybrechts, I., Gunter, M. J., Hatime, Z., Boudouaya, H. A., Benslimane, A., Nejari, C., El Abkari, M., Badre, W., El Feydi, A. E., Afkir, S., Abda, N., y El Rhazi, K. (2020). Consumption of meat, traditional and modern processed meat and colorectal cancer risk among the Moroccan population: A large-scale case-control study. *International Journal of Cancer*, 146(5), 1333-1345. <https://doi.org/10.1002/ijc.32689>.
- Díaz-Basabe, A., Lattanzi, G., Perillo, F., Amoroso, C., Baeri, A., Farini, A., Torrente, Y., Penna, G., Rescigno, M., Ghidini, M., Cassinotti, E., Baldari, L., Boni, L., Vecchi, M., Caprioli, F., Facciotti, F., y Strati, F. (2024). *Porphyromonas gingivalis* fuels colorectal cancer through

- CHI3L1-mediated iNKT cell-driven immune evasion. *Gut Microbes*, 16(1), 2388801.
<https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2388801>.
- Díaz-Gay, M., Dos Santos, W., Moody, S., Kazachkova, M., Abbasi, A., Steele, C. D., Vangara, R., Senkin, S., Wang, J., Fitzgerald, S., Bergstrom, E. N., Khandekar, A., Otlu, B., Abedi-Ardekani, B., De Carvalho, A. C., Cattiaux, T., Penha, R. C. C., Gaborieau, V., Chopard, P., ... Alexandrov, L. B. (2025). Geographic and age variations in mutational processes in colorectal cancer. *Nature*, 643(8070), 230-240. <https://doi.org/10.1038/s41586-025-09025-8>.
- Ding, N., Cheng, Y., Liu, H., Wu, Y., Weng, Y., Cui, H., Cheng, C., Zhang, W., y Cui, Y. (2023). *Fusobacterium nucleatum* infection induces malignant proliferation of esophageal squamous cell carcinoma cell by putrescine production. *Microbiology Spectrum*, 11(2), e02759-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02759-22>.
- Dogruman-Al, F., Turk, S., Adiyaman-Korkmaz, G., Hananel, A., Levi, L., Kopelowitz, J., Babai, O., Gross, S., Greenberg, Z., Herschkovitz, Y., y Mumcuoglu, I. (2015). A novel ELISA test for laboratory diagnosis of *Blastocystis* spp. in human stool specimens. *Parasitology Research*, 114(2), 495-500. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4208-y>.
- Dong, L., y Ren, H. (2018). Blood-based DNA methylation biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, 11(6). <https://doi.org/10.4172/jpb.1000477>.
- Dougherty, M. W., y Jobin, C. (2023). Intestinal bacteria and colorectal cancer: Etiology and treatment. *Gut Microbes*, 15(1), 2185028. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2185028>.
- Duan, B.-S., Xie, L.-F., y Wang, Y. (2017). Aberrant methylation of T-cadherin can be a diagnostic biomarker for colorectal cancer. *Cancer Genomics & Proteomics*, 14(4), 277-284. <https://doi.org/10.21873/cgp.20038>.

BIBLIOGRAFÍA

- Dunn, L. A., Boreham, P. F. L., y Stenzel, D. J. (1989). Ultrastructural variation of *Blastocystis hominis* stocks in culture. *International Journal for Parasitology*, 19(1), 43-56. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(89\)90020-9](https://doi.org/10.1016/0020-7519(89)90020-9).
- Eklöf, V., Löfgren-Burström, A., Zingmark, C., Edin, S., Larsson, P., Karling, P., Alexeyev, O., Rutegård, J., Wikberg, M. L., y Palmqvist, R. (2017). Cancer-associated fecal microbial markers in colorectal cancer detection. *International Journal of Cancer*, 141(12), 2528-2536. <https://doi.org/10.1002/ijc.31011>.
- El Safadi, D., Gaayeb, L., Meloni, D., Cian, A., Poirier, P., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Dabboussi, F., Delhaes, L., Seck, M., Hamze, M., Riveau, G., y Viscogliosi, E. (2014). Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC Infectious Diseases*, 14, 164. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-164>.
- El Safadi, D., Osman, M., Hanna, A., Hajar, I., Kassem, I. I., Khalife, S., Dabboussi, F., y Hamze, M. (2023). Parasitic contamination of fresh leafy green vegetables sold in Northern Lebanon. *Pathogens*, 12(8), 1014. <https://doi.org/10.3390/pathogens12081014>.
- Eldegl, H., Abdel-Wahhab, M., y Moemen, D. (2021). Association between *Streptococcus gallolyticus* and colorectal cancer in Mansoura University hospitals. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 8(1), 397-406. <https://doi.org/10.1080/2314808X.2021.2001618>.
- Elsaghir, H., y Reddivari, A. K. R. (2025). *Bacteroides fragilis*. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553032/>.
- Enam, S., Del Valle, L., Lara, C., Gan, D.-D., Ortiz-Hidalgo, C., Palazzo, J. P., y Khalili, K. (2002). Association of human polyomavirus JCV with colon cancer: Evidence for interaction of viral T-antigen and beta-catenin. *Cancer Research*, 62(23), 7093-7101.
- Ensembl. (s. f.). *Human (Homo sapiens)*. Recuperado 9 de agosto de 2025, a partir de https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index.

- Espinosa Aranzales, A. F., Radon, K., Froeschl, G., Pinzón Rondón, Á. M., y Delius, M. (2018). Prevalence and risk factors for intestinal parasitic infections in pregnant women residing in three districts of Bogotá, Colombia. *BMC Public Health*, 18(1), 1071. <https://doi.org/10.1186/s12889-018-5978-4>.
- Even, G., Lokmer, A., Rodrigues, J., Audebert, C., Viscogliosi, E., Ségurel, L., y Chabé, M. (2021). Changes in the human gut microbiota associated with colonization by *Blastocystis* sp. and *Entamoeba* spp. in non-industrialized populations. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 533528. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.533528>.
- Faïs, T., Delmas, J., Barnich, N., Bonnet, R., y Dalmasso, G. (2018). Colibactin: More than a new bacterial toxin. *Toxins*, 10(4), 151. <https://doi.org/10.3390/toxins10040151>.
- Farvid, M. S., Sidahmed, E., Spence, N. D., Mante Angua, K., Rosner, B. A., y Barnett, J. B. (2021). Consumption of red meat and processed meat and cancer incidence: A systematic review and meta-analysis of prospective studies. *European Journal of Epidemiology*, 36(9), 937-951. <https://doi.org/10.1007/s10654-021-00741-9>.
- Farzam, A., Karampour, A., Nazem-Sadati, S.-S., Sadat-Madani, P., y Asghari, A. (2025). Global prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in rodent populations: A systematic review and meta-analysis. *Veterinary Medicine and Science*, 11(1), e70178. <https://doi.org/10.1002/vms3.70178>.
- Faust, E. C., Sawitz, W., Tobie, J., Odom, V., Peres, C., y Lincicome, D. R. (1939). Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminths in feces. *The Journal of Parasitology*, 25(3), 241-262. JSTOR. <https://doi.org/10.2307/3272508>.
- Faye, A. S., Holmer, A. K., y Axelrad, J. E. (2022). Cancer in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology Clinics of North America*, 51(3), 649-666. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2022.05.003>.
- Fearon, E. R., y Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759-767. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-I](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-I).

BIBLIOGRAFÍA

- Fedirko, V., Tramacere, I., Bagnardi, V., Rota, M., Scotti, L., Islami, F., Negri, E., Straif, K., Romieu, I., La Vecchia, C., Boffetta, P., y Jenab, M. (2011). Alcohol drinking and colorectal cancer risk: An overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Annals of Oncology*, 22(9), 1958-1972. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq653>.
- Fedorko, D. P., Nelson, N. A., y Cartwright, C. P. (1995). Identification of microsporidia in stool specimens by using PCR and restriction endonucleases. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(7), 1739-1741. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.7.1739-1741.1995>.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 39(4), 783-791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>.
- Feltus, D. C., Giddings, C. W., Schneck, B. L., Monson, T., Warshauer, D., y McEvoy, J. M. (2006). Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(12), 4303-4308. <https://doi.org/10.1128/JCM.01067-06>.
- Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Laversanne, M., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., Znaor, A., Soerjomataram, I., y Bray, F. (2024). *Global cancer observatory: Cancer today*. Globocan 2022. <https://gco.iarc.who.int/today/>.
- Ferracin, M., Gafà, R., Miotto, E., Veronese, A., Pultrone, C., Sabbioni, S., Lanza, G., y Negrini, M. (2008). The methylator phenotype in microsatellite stable colorectal cancers is characterized by a distinct gene expression profile. *The Journal of Pathology*, 214(5), 594-602. <https://doi.org/10.1002/path.2318>.
- Ferreira, D. A., Tayyar, Y., Idris, A., y McMillan, N. A. J. (2021). A «hit-and-run» affair—A possible link for cancer progression in virally driven cancers. *Biochimica Et Biophysica Acta. Reviews on Cancer*, 1875(1), 188476. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188476>.
- Figueiredo, A., Dashti, A., Maloney, J. G., Molokin, A., George, N. S., Köster, P. C., Bailo, B., de Las Matas, A. S., Habela, M. Á., Rivero-Juarez, A., Vicente, J., Serrano, E., Arnal, M. C., de

- Luco, D. F., Morrondo, P., Armenteros, J. A., Balseiro, A., Cardona, G. A., Martínez-Carrasco, C., ... Carmena, D. (2025a). *Blastocystis* in free-ranging wild ruminant species across the Iberian Peninsula. *Veterinary Research*, 56(1), 145. <https://doi.org/10.1186/s13567-025-01563-3>.
- Figueiredo, A., Santín, M., Köster, P. C., Dashti, A., Maloney, J. G., Torres, R. T., Fonseca, C., Mysterud, A., Carvalho, J., Hipólito, D., Rossa, M., Palmeira, J. D., González-Barrio, D., Calero-Bernal, R., y Carmena, D. (2024). Molecular detection and characterization of *Blastocystis* in herbivore livestock species in Portugal. *Veterinary Parasitology*, 327, 110147. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2024.110147>.
- Figueiredo, A., Shaw, D., Tunalı, V., Gentekaki, E., Tsaousis, A. D., y Carmena, D. (2025b). Update on *Blastocystis*: Highlights from the Fourth International *Blastocystis* Conference. *Open Research Europe*, 5, 11. <https://doi.org/10.12688/openreseurope.19168.1>.
- Fiorentini, C., Fabbri, A., Flatau, G., Donelli, G., Matarrese, P., Lemichez, E., Falzano, L., y Boquet, P. (1997). *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1), a toxin that activates the Rho GTPase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(31), 19532-19537. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.31.19532>.
- Fliss-Isakov, N., Zelber-Sagi, S., Ivancovsky-Wajcman, D., Shibolet, O., y Kariv, R. (2020). Ultra-processed food intake and smoking interact in relation with colorectal adenomas. *Nutrients*, 12(11), 3507. <https://doi.org/10.3390/nu12113507>.
- Fonte Galindo, L., Aleaga Santiesteban, Y., Ginori Gilke, M., Molina, Y., y Hernández Barrios, Y. (2023). Blastocystosis and urticaria: An overview from a syndemic perspective. *Archives of Gastroenterology Research*, 4(1), 36-42. <https://doi.org/10.33696/Gastroenterology.4.046>.
- Food and Drug Administration. (2024). Cigarettes. FDA. <https://www.fda.gov/tobacco-products/products-ingredients-components/cigarettes>.

BIBLIOGRAFÍA

- Fricker, M., Messelhäußer, U., Busch, U., Scherer, S., y Ehling-Schulz, M. (2007). Diagnostic real time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1892-1898. <https://doi.org/10.1128/AEM.02219-06>.
- Frickmann, H., Backhaus, J., Hoerauf, A., Hagen, R. M., y Kann, S. (2024). Collider bias assessment in Colombian indigenous Wiwa and Kogui populations with chronic gastroenteric disorder of likely infectious etiology suggests complex microbial interactions rather than clear assignments of etiological relevance. *Microorganisms*, 12(5), 970. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12050970>.
- Frydoonfar, H. R., McGrath, D. R., y Spigelman, A. D. (2004). Sulforaphane inhibits growth of a colon cancer cell line. *Colorectal Disease*, 6(1), 28-31. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1318.2004.00488.x>.
- Fukumoto, H., Sato, Y., Hasegawa, H., Saeki, H., y Katano, H. (2015). Development of a new real-time PCR system for simultaneous detection of bacteria and fungi in pathological samples. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(11), 15479-15488.
- Fusaro, C., Bernal, J. E., Baldiris-Ávila, R., González-Cuello, R., Cisneros-Lorduy, J., Reales-Ruiz, A., Castro-Orozco, R., y Sarria-Guzmán, Y. (2024). Molecular prevalence and subtypes distribution of *Blastocystis* spp. in humans of Latin America: A systematic review. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 9(2), 38. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed9020038>.
- Galiatsatos, P., y Foulkes, W. D. (2006). Familial Adenomatous Polyposis. *The American Journal of Gastroenterology*, 101(2), 385-398. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00375.x>.
- Garrett, W. S. (2015). Cancer and the microbiota. *Science*, 348(6230), 80-86. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4972>.

- Gaviria Correa, A., Bustamante Sánchez, L. M., y Montoya Palacio, N. (2018). Situación del cáncer, departamento de Antioquia. Año 2018. *Secretaria Seccional de Salud y Protección Social de Antioquia*, 50.
- Ghanadi, K., Khalaf, A. K., Jafrasteh, A., Anbari, K., y Mahmoudvand, H. (2022a). High prevalence of *Cryptosporidium* infection in Iranian patients suffering from colorectal cancer. *Parasite Epidemiology and Control*, 19, e00271. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2022.e00271>.
- Ghanadi, K., Khalaf, A. K., Jafrasteh, A., Anbari, K., y Mahmoudvand, H. (2022b). High prevalence of *Cryptosporidium* infection in Iranian patients suffering from colorectal cancer. *Parasite Epidemiology and Control*, 19, e00271. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2022.e00271>.
- Gharbi, I., Letaief, F., Dadaa, Z., Yahyaoui, Y., Gabsi, A., Maghrebi, H., Ayadi, M., y Mezlini, A. (2020). The consumption of red and processed meat and the risk of colorectal cancer: A case-control study among the tunisian population. *La Tunisie Medicale*, 98(10), 726-729.
- Gobernación de Antioquia. (2024, marzo 26). *Prestadores de Salud Departamento de Antioquia / Datos Abiertos Colombia*. https://www.datos.gov.co/Salud-y-Proteccion-Social/Prestadores-de-Salud-Departamento-de-Antioquia/b4dp-ximh/about_data.
- Gomes, T. A. T., Elias, W. P., Scaletsky, I. C. A., Guth, B. E. C., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M. F., Ferreira, L. C. S., y Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 3-30. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>.
- Gómez Rodríguez, O., Baracaldo Ayala, R., Polo, J. F., Velasquez, E., López Correa, P., y Parra Medina, R. (2021). Presencia de inestabilidad microsatélite en pacientes colombianos con adenocarcinoma colorrectal. *Revista colombiana de Gastroenterología*, 36(3), 349-357. <https://doi.org/10.22516/25007440.686>.
- Gómez-Garcés, J. L., Gil, Y., Burillo, A., Wilhelmi, I., y Palomo, M. (2012). Cuadros clínicos asociados a bacteriemia causada por las nuevas especies incluidas en el antiguo grupo

BIBLIOGRAFÍA

- Streptococcus bovis*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(4), 175-179.
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.015>.
- Gonzalez-Gutierrez, L., Motiño, O., Barriuso, D., de la Puente-Aldea, J., Alvarez-Frutos, L., Kroemer, G., Palacios-Ramirez, R., y Senovilla, L. (2024). Obesity-associated colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(16), 8836.
<https://doi.org/10.3390/ijms25168836>.
- Goon, P., Sudhoff, H., y Goerner, M. (2023). Hit and run oncogeneses in head and neck cancers requires greater investigation. *Journal of Medical Virology*, 95(1), e28254.
<https://doi.org/10.1002/jmv.28254>.
- Gospodinova, G. R., Demirevska, L., Daskalov, I., y Dimitrov, G. D. (2023). A rare case of *Streptococcus pasteurianus* endocarditis signaling colon cancer. *Cureus*, 15(11), e48328.
<https://doi.org/10.7759/cureus.48328>.
- Gram, I. T., Park, S.-Y., Wilkens, L. R., Haiman, C. A., y Le Marchand, L. (2020). Smoking-related risks of colorectal cancer by anatomical subsite and sex. *American Journal of Epidemiology*, 189(6), 543-553. <https://doi.org/10.1093/aje/kwaa005>.
- Groen, E. J., Roos, A., Muntinghe, F. L., Enting, R. H., De Vries, J., Kleibeuker, J. H., Witjes, M. J. H., Links, T. P., y Van Beek, A. P. (2008). Extra-intestinal manifestations of familial adenomatous polyposis. *Annals of Surgical Oncology*, 15(9), 2439-2450.
<https://doi.org/10.1245/s10434-008-9981-3>.
- Guérin, A., y Striepen, B. (2020). The biology of the intestinal intracellular parasite *Cryptosporidium*. *Cell Host & Microbe*, 28(4), 509-515.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.09.007>.
- Gunter, M. J., y Leitzmann, M. F. (2006). Obesity and colorectal cancer: Epidemiology, mechanisms and candidate genes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 17(3), 145-156. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.06.011>.

- Guo, Y., Cen, Z., Zou, Y., Fang, X., Li, T., Wang, J., Chang, D., Su, L., Liu, Y., Chen, Y., Yang, R., y Liu, C. (2012). Whole-Genome Sequence of *Klebsiella pneumonia* strain LCT-KP214. *Journal of Bacteriology*, 194(12), 3281-3281. <https://doi.org/10.1128/JB.00531-12>.
- Gutiérrez-Cisneros, M. J., Cogollos, R., López-Vélez, R., Martín-Rabadán, P., Martínez-Ruiz, R., Subirats, M., Merino, F. J., y Fuentes, I. (2010). Application of real-time PCR for the differentiation of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* in cyst-positive faecal samples from 130 immigrants living in Spain. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 104(2), 145-149. <https://doi.org/10.1179/136485910X12607012373759>.
- Habib, G., Lancellotti, P., Antunes, M. J., Bongioni, M. G., Casalta, J.-P., Del Zotti, F., Dulgheru, R., El Khoury, G., Erba, P. A., Iung, B., Miro, J. M., Mulder, B. J., Plonska-Gosciniak, E., Price, S., Roos-Hesselink, J., Snygg-Martin, U., Thuny, F., Tornos Mas, P., Vilacosta, I., ... ESC Scientific Document Group. (2015). 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: The Task Force for the Management of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). *European Heart Journal*, 36(44), 3075-3128. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv319>.
- Hahn, A., Luetgehetmann, M., Landt, O., Schwarz, N. G., y Frickmann, H. (2017). Comparison of one commercial and two in-house TaqMan multiplex real-time PCR assays for detection of enteropathogenic, enterotoxigenic and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Tropical Medicine & International Health*, 22(11), 1371-1376. <https://doi.org/10.1111/tmi.12976>.
- Hameed, D. M. A., Hassanin, O. M., y Zuel-Fakkar, N. M. (2011). Association of *Blastocystis hominis* genetic subtypes with urticaria. *Parasitology Research*, 108(3), 553-560. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2097-2>.

BIBLIOGRAFÍA

- Hamilton, W., Lancashire, R., Sharp, D., Peters, T. J., Cheng, K., y Marshall, T. (2009). The risk of colorectal cancer with symptoms at different ages and between the sexes: A case-control study. *BMC Medicine*, 7, 17. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-7-17>.
- Hamilton, W., Round, A., Sharp, D., y Peters, T. J. (2005). Clinical features of colorectal cancer before diagnosis: A population-based case-control study. *British Journal of Cancer*, 93(4), 399-405. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602714>.
- Han, X., Weinberg, J. S., Prabhu, S. S., Hassenbusch, S. J., Fuller, G. N., Tarrand, J. J., y Kontoyiannis, D. P. (2003). Fusobacterial brain abscess: A review of five cases and an analysis of possible pathogenesis. *Journal of Neurosurgery*, 99(4), 693-700. <https://doi.org/10.3171/jns.2003.99.4.0693>.
- Han, Y. (2015). *Fusobacterium nucleatum*: A commensal-turned pathogen. *Current Opinion in Microbiology*, 23, 141-147. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.11.013>.
- Hannu, T., Mattila, L., Rautelin, H., Pelkonen, P., Lahdenne, P., Siitonen, A., y Leirisalo-Repo, M. (2002). *Campylobacter*-triggered reactive arthritis: A population-based study. *Rheumatology*, 41(3), 312-318. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/41.3.312>.
- Harned, R. K., Buck, J. L., Olmsted, W. W., Moser, R. P., y Ros, P. R. (1991). Extracolonic manifestations of the familial adenomatous polyposis syndromes. *American Journal of Roentgenology*, 156(3), 481-485. <https://doi.org/10.2214/ajr.156.3.1847274>.
- Hauret, K. G. (2004). Physical activity and reduced risk of incident sporadic colorectal adenomas: Observational support for mechanisms involving energy balance and inflammation modulation. *American Journal of Epidemiology*, 159(10), 983-992. <https://doi.org/10.1093/aje/kwh130>.
- Hawash, Y. A., Ismail, K. A., Saber, T., Eed, E. M., Khalifa, A. S., Alsharif, K. F., Alghamdi, S. A., Dahlawi, H. A., Alsanie, W., Khalifa, A. M., y Khalifa, O. M. (2021). Predominance of infection with *Blastocystis hominis* in patients with colorectal cancer and its association with high mucin content, infiltration of inflammatory cells and elevated serum tumor

- necrosis factor α . *Infectious Diseases in Clinical Practice*, 29(1), e32-e38.
<https://doi.org/10.1097/IPC.0000000000000931>.
- He, Z., Gharaibeh, R. Z., Newsome, R. C., Pope, J. L., Dougherty, M. W., Tomkovich, S., Pons, B., Mirey, G., Vignard, J., Hendrixson, D. R., y Jobin, C. (2019). *Campylobacter jejuni* promotes colorectal tumorigenesis through the action of cytolethal distending toxin. *Gut*, 68(2), 289-300. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317200>.
- Hehir-Kwa, J. Y., Marschall, T., Kloosterman, W. P., Francioli, L. C., Baaijens, J. A., Dijkstra, L. J., Abdellaoui, A., Koval, V., Thung, D. T., Wardenaar, R., Renkens, I., Coe, B. P., Deelen, P., de Ligt, J., Lameijer, E.-W., van Dijk, F., Hormozdiari, F., Genome of the Netherlands Consortium, Uitterlinden, A. G., ... Guryev, V. (2016). A high-quality human reference panel reveals the complexity and distribution of genomic structural variants. *Nature Communications*, 7, 12989. <https://doi.org/10.1038/ncomms12989>.
- Hernández, P. C., Maloney, J. G., Molokin, A., George, N. S., Morales, L., Chaparro-Olaya, J., y Santin, M. (2023). Exploring *Blastocystis* genetic diversity in rural schoolchildren from Colombia using next-generation amplicon sequencing reveals significant associations between contact with animals and infection risk. *Parasitology Research*, 122(7), 1451-1462. <https://doi.org/10.1007/s00436-023-07841-3>.
- Hernández, P. C., Morales, L., Chaparro-Olaya, J., de Avila, J., Bautista-Molano, W., Bello-Gualtero, J., Beltrán-Ostos, A., y Romero-Sánchez, C. (2021). Frequency and distribution of *Blastocystis* sp. subtypes in patients with spondyloarthritis in Bogotá, Colombia. *Parasite Epidemiology and Control*, 15, e00227. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2021.e00227>.
- Hernández, P. C., Morales, L., Chaparro-Olaya, J., Sarmiento, D., Jaramillo, J. F., Ordoñez, G. A., Cortés, F., y Sánchez, L. K. (2019). Intestinal parasitic infections and associated factors in children of three rural schools in Colombia. A cross-sectional study. *PLoS One*, 14(7), e0218681. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218681>.

BIBLIOGRAFÍA

- Hernández-Castro, C., Agudelo-López, S. D. P., Medina-Lozano, A. P., López-García, D., García-Tuberquia, L. A., Botero-Garcés, J. H., Orozco-Peláez, M. C., Bolaños-Muñoz, M., Bejarano-Villafañe, D. A., y Carmena, D. (2024). The burden of intestinal parasitic infections in Antioquia, Colombia: Impact in childhood growth development and nutritional status. *Acta Tropica*, 251, 107119. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2024.107119>.
- Hernández-Castro, C., Dashti, A., Vusirikala, A., Balasegaram, S., Köster, P. C., Bailo, B., Imaña, E., López, A., Llorente, M. T., González-Barrio, D., Sánchez, S., y Carmena, D. (2023a). Prevalence and temporal dynamics of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Blastocystis* sp. among toddlers attending day-care centres in Spain. A prospective molecular-based longitudinal study. *European Journal of Pediatrics*, 182(1), 213-223. <https://doi.org/10.1007/s00431-022-04662-x>.
- Hernández-Castro, C., Maloney, J. G., Agudelo-López, S. P., Toro-Londoño, M. A., Botero-Garcés, J. H., Orozco, M. C., Quintero-Quinchia, Y. C., Correa-Cote, J. C., Múnera-Duque, A., Ricaurte-Ciro, J. C., Londoño-Álvarez, L. I., Escobar, R. M., Köster, P. C., Sánchez, S., Carmena, D., y Santín, M. (2023b). Identification and validation of novel *Blastocystis* subtype ST41 in a Colombian patient undergoing colorectal cancer screening. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 70(5), e12978. <https://doi.org/10.1111/jeu.12978>.
- Heydarian, M., Manouchehri Naeini, K., Kheiri, S., y Abdizadeh, R. (2024). Prevalence and subtyping of *Blastocystis* sp. in ruminants in Southwestern, Iran. *Scientific Reports*, 14(1), 20254. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-70907-4>.
- Higuera, A., Herrera, G., Jimenez, P., García-Corredor, D., Pulido-Medellín, M., Bulla-Castañeda, D. M., Pinilla, J. C., Moreno-Pérez, D. A., Maloney, J. G., Santín, M., y Ramírez, J. D. (2021). Identification of multiple *Blastocystis* subtypes in domestic animals from Colombia using amplicon-based next generation sequencing. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 732129. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.732129>.

- Higuera, A., Villamizar, X., Herrera, G., Giraldo, J. C., Vasquez-A, L. R., Urbano, P., Villalobos, O., Tovar, C., y Ramírez, J. D. (2020). Molecular detection and genotyping of intestinal protozoa from different biogeographical regions of Colombia. *PeerJ*, 8, e8554. <https://doi.org/10.7717/peerj.8554>.
- Ho, L. C., Singh, M., Suresh, G., Ng, G. C., y Yap, E. H. (1993). Axenic culture of *Blastocystis hominis* in Iscove's modified Dulbecco's medium. *Parasitology Research*, 79(7), 614-616. <https://doi.org/10.1007/BF00932249>.
- Hoggart, C. J., Parra, E. J., Shriver, M. D., Bonilla, C., Kittles, R. A., Clayton, D. G., y McKeigue, P. M. (2003). Control of confounding of genetic associations in stratified populations. *American Journal of Human Genetics*, 72(6), 1492-1504. <https://doi.org/10.1086/375613>.
- Hoover, K., y Higginbotham, K. (2025). Epstein-Barr Virus. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559285/>.
- Hopkins, R. M., Meloni, B. P., Groth, D. M., Wetherall, J. D., Reynoldson, J. A., y Thompson, R. C. (1997). Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *The Journal of Parasitology*, 83(1), 44-51.
- Houlston, R. S., Cheadle, J., Dobbins, S. E., Tenesa, A., Jones, A. M., Howarth, K., Spain, S. L., Broderick, P., Domingo, E., Farrington, S., Prendergast, J. G. D., Pittman, A. M., Theodoratou, E., Smith, C. G., Olver, B., Walther, A., Barnetson, R. A., Churchman, M., Jaeger, E. E. M., ... Tomlinson, I. P. M. (2010). Meta-analysis of three genome-wide association studies identifies susceptibility loci for colorectal cancer at 1q41, 3q26.2, 12q13.13 and 20q13.33. *Nature Genetics*, 42(11), 973-977. <https://doi.org/10.1038/ng.670>.
- Houlston, R. S., y Tomlinson, I. P. M. (2001). Polymorphisms and colorectal tumor risk. *Gastroenterology*, 121(2), 282-301. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.26265>.

BIBLIOGRAFÍA

- Hublin, J. S. Y., Maloney, J. G., y Santin, M. (2021). *Blastocystis* in domesticated and wild mammals and birds. *Research in Veterinary Science*, 135, 260-282. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.09.031>.
- Huxley, R. R., Ansary-Moghaddam, A., Clifton, P., Czernichow, S., Parr, C. L., y Woodward, M. (2009). The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: A quantitative overview of the epidemiological evidence. *International Journal of Cancer*, 125(1), 171-180. <https://doi.org/10.1002/ijc.24343>.
- Huycke, M. M., Abrams, V., y Moore, D. R. (2002). *Enterococcus faecalis* produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis*, 23(3), 529-536. <https://doi.org/10.1093/carcin/23.3.529>.
- Illescas, E., Politti, P., y Lewi, D. (2015). Mecanismos moleculares diferenciales en la carcinogénesis del carcinoma colorrectal. *Oncología Clínica*, 20(1). <https://doi.org/10.56969/oc.v20i1.107>.
- Instituto Nacional de Cancerología. (2023). *Anuario estadístico 2022* (Vol. 20). Strategy S.A.S. www.cancer.gov.co.
- International Agency for Research on Cancer. (2012). *Biological agents* (Vol. 100B). IARC Monographs. <https://publications.iarc.fr/119>.
- International Agency for Research on Cancer. (2024). *Reduction or cessation of alcoholic beverage consumption* (Vol. 20A). IARC Handbooks. <https://www.iarc.who.int/faq/iarc-handbooks-of-cancer-prevention-volume-20a-reduction-or-cessation-of-alcohol-consumption>.
- Ionescu, V. A., Gheorghe, G., Bacalbasa, N., Chiotoroiu, A. L., y Diaconu, C. (2023). Colorectal cancer: From risk factors to oncogenesis. *Medicina*, 59(9), 1646. <https://doi.org/10.3390/medicina59091646>.
- Irby, K., Anderson, W. F., Henson, D. E., y Devesa, S. S. (2006). Emerging and widening colorectal carcinoma disparities between blacks and whites in the United States (1975-2002).

- Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 15(4), 792-797.
<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0879>.
- Isaksen, I. M., y Dankel, S. N. (2023). Ultra-processed food consumption and cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Nutrition*, 42(6), 919-928.
<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2023.03.018>.
- Istituto Superiore di Sanità. (2013a). *Detection of Enteraggregative Escherichia coli in food by real time PCR amplification of the aggR and aaiC genes*. Laboratory Methods - ISS (EN).
<https://www.iss.it/web/iss-en/vtec-laboratory-methods>.
- Istituto Superiore di Sanità. (2013b). *Detection of Enteroinvasive Escherichia coli in food by real time PCR amplification of the ipaH gene*. Laboratory Methods - ISS (EN).
<https://www.iss.it/web/iss-en/vtec-laboratory-methods>.
- Istituto Superiore di Sanità. (2013c). *Detection of Enterotoxigenic Escherichia coli in food by real time PCR amplification of the It, sth, and stp genes, encoding the heat-labile and heat-stable enterotoxins*. Laboratory Methods - ISS (EN). <https://www.iss.it/web/iss-en/vtec-laboratory-methods>.
- Istituto Superiore di Sanità. (2013d). *Identification and characterization of verocytotoxin-producing Escherichia coli (vtec) by real time PRC amplification of the main virulence genes and the genes associated with the serogroups mainly associated with severe human infections*. Laboratory Methods - ISS (EN). <https://www.iss.it/web/iss-en/vtec-laboratory-methods>.
- Istituto Superiore di Sanità. (2017). *Detection of Escherichia coli producing the Stx2f subtype by real time PCR*. Laboratory Methods - ISS (EN). <https://www.iss.it/web/iss-en/vtec-laboratory-methods>.
- Iwasaki, M., Kanehara, R., Yamaji, T., Katagiri, R., Mutoh, M., Tsunematsu, Y., Sato, M., Watanabe, K., Hosomi, K., Kakugawa, Y., Ikematsu, H., Hotta, K., Kunisawa, J., Wakabayashi, K., y Matsuda, T. (2022). Association of *Escherichia coli* containing

BIBLIOGRAFÍA

- polyketide synthase in the gut microbiota with colorectal neoplasia in Japan. *Cancer Science*, 113(1), 277-286. <https://doi.org/10.1111/cas.15196>.
- Jafari, A., Bahrami, F., Nasiri-Kalmarzi, R., y Abdoli, A. (2024). Chronic urticaria associated with *Blastocystis hominis* infection. *Archives of Dermatological Research*, 316(7), 413. <https://doi.org/10.1007/s00403-024-03019-8>.
- Jafari, F., Yarmand, S., Nouri, M., Nejad, E. T., Ramezani, A., Sohrabi, Z., y Rashidkhani, B. (2023). Ultra-processed food intake and risk of colorectal cancer: A matched case-control study. *Nutrition and Cancer*, 75(2), 532-541. <https://doi.org/10.1080/01635581.2022.2125990>.
- Jafari Maskouni, E., Jamalvandi, T., Tabatabaei, F., Bourenjan Shirazi, S., Saadati, H., Letafati, A., Hosseini, M., Motlaghzadeh, S., Khalesi, Z., Moradi, P., Saeb, S., Sheikh, N., Fozouni, E., Khatami, A., Baker, A. H., Keyvanlou, Z., Tamrchi, V., Tavakoli, A., y Ghorbani, S. (2023). Association between Epstein-Bar virus and colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Microbial Pathogenesis*, 179, 106087. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106087>.
- Jans, M., y Vereecke, L. (2025). Physiological drivers of *pks+* *E. coli* in colorectal cancer. *Trends in Microbiology*, S0966-842X(25)00121-0. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2025.04.010>
- Janssen, B., y Snowden, J. (2025). Cryptosporidiosis. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448085/>.
- Jiang, Y., Ben, Q., Shen, H., Lu, W., Zhang, Y., y Zhu, J. (2011). Diabetes mellitus and incidence and mortality of colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *European Journal of Epidemiology*, 26(11), 863-876. <https://doi.org/10.1007/s10654-011-9617-y>.
- Jiménez, P., Muñoz, M., Cruz-Saavedra, L., Camargo, A., y Ramírez, J. D. (2024). *Blastocystis* genetic diversity in animal and human samples from different departments of Colombia using complete sequencing of the 18S rRNA gene (SSU rRNA) by Oxford Nanopore

- Technologies (ONT). *Acta Tropica*, 249, 107090.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.107090>.
- Johns, L. E., y Houlston, R. S. (2001). A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *The American Journal of Gastroenterology*, 96(10), 2992-3003.
<https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2001.04677.x>.
- Jones, D. R. (1946). A medium for investigating the breakdown of pectin by bacteria. *Nature*, 158(4018), 625. <https://doi.org/10.1038/158625b0>.
- Jones II, M. S., Ganac, R. D., Hiser, G., Hudson, N. R., Le, A., y Whipps, C. M. (2008). Detection of *Blastocystis* from stool samples using real-time PCR. *Parasitology Research*, 103(3), 551-557. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1006-4>.
- Joosen, A. M. C. P., Kuhnle, G. G. C., Aspinall, S. M., Barrow, T. M., Lecommandeur, E., Azqueta, A., Collins, A. R., y Bingham, S. A. (2009). Effect of processed and red meat on endogenous nitrosation and DNA damage. *Carcinogenesis*, 30(8), 1402-1407.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgp130>.
- Jordà, M., Díez-Villanueva, A., Mallona, I., Martín, B., Lois, S., Barrera, V., Esteller, M., Vavouri, T., y Peinado, M. A. (2017). The epigenetic landscape of Alu repeats delineates the structural and functional genomic architecture of colon cancer cells. *Genome Research*, 27(1), 118-132. <https://doi.org/10.1101/gr.207522.116>.
- Jover, R., y Payá, A. (2003). Inestabilidad de microsatélites en el cáncer colorrectal: Concepto, métodos de detección y utilidad clínica. *Gastroenterología y Hepatología*, 26(10), 656-663.
- Kann, S., Concha, G., Köller, T., Alker, J., Schotte, U., Hahn, A., Frickmann, H., y Warnke, P. (2022). Enteric bacteria and parasites with pathogenic potential in individuals of the Colombian indigenous tribe Kogui. *Microorganisms*, 10(9), 1862.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10091862>.

BIBLIOGRAFÍA

- Kearney, A., y Knoll, B. (2015). Myopericarditis associated with *Fusobacterium nucleatum*-caused liver abscess. *Infectious Diseases*, 47(3), 187-189. <https://doi.org/10.3109/00365548.2014.969306>.
- Kim, I., Kang, H. C., Park, J.-H., Shin, Y., Ku, J.-L., Lim, S.-B., Park, S. Y., Jung, S.-Y., Kim, H. K., y Park, J.-G. (2003). Development and applications of a beta-catenin oligonucleotide microarray: Beta-catenin mutations are dominantly found in the proximal colon cancers with microsatellite instability. *Clinical Cancer Research*, 9(8), 2920-2925.
- Kim, J., Cho, C. R., Um, T. H., Rhu, J. Y., Kim, E. S., Jeong, J. W., y Lee, H. R. (2007). *Morganella morganii* sepsis with massive hemolysis. *Journal of Korean Medical Science*, 22(6), 1082. <https://doi.org/10.3346/jkms.2007.22.6.1082>.
- Kim, M.-J., Lee, Y. J., Kim, T.-J., y Won, E. J. (2021). Gut microbiome profiles in colonizations with the enteric protozoa *Blastocystis* in Korean populations. *Microorganisms*, 10(1), 34. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010034>.
- Kim, S., Paik, H. Y., Yoon, H., Lee, J. E., Kim, N., y Sung, M.-K. (2015). Sex- and gender-specific disparities in colorectal cancer risk. *World Journal of Gastroenterology*, 21(17), 5167-5175. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i17.5167>.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111-120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>.
- Koehler, A. V., Herath, H. M. P. D., Hall, R. S., Wilcox, S., y Gasser, R. B. (2024). Marked genetic diversity within *Blastocystis* in Australian wildlife revealed using a next generation sequencing-phylogenetic approach. *International Journal for Parasitology. Parasites and Wildlife*, 23, 100902. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2023.100902>.
- Koushik, A., Hunter, D. J., Spiegelman, D., Beeson, W. L., Van Den Brandt, P. A., Buring, J. E., Calle, E. E., Cho, E., Fraser, G. E., Freudenheim, J. L., Fuchs, C. S., Giovannucci, E. L., Goldbohm, R. A., Harnack, L., Jacobs, D. R., Kato, I., Krogh, V., Larsson, S. C., Leitzmann, M. F., ...

- Smith-Warner, S. A. (2007). Fruits, vegetables, and colon cancer risk in a pooled analysis of 14 cohort studies. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 99(19), 1471-1483. <https://doi.org/10.1093/jnci/djm155>.
- Kozłowski, P., Waszczuk-Gajda, A., Drozd-Sokołowska, J. E., Pawełczyk, A. M., Bednarska, M., Salamatin, R., Janasz, H., Brzozowska, M., Dzieciatkowski, T. J., Dwilewicz-Trojaczek, J., Jedrzejczak, W. W., Ciepiela, O., y Basak, G. W. (2019). The effectiveness of light microscopy, immunofluorescence assays, ELISA, culture, and PCR in detecting *Blastocystis* sp infection. *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia*, 71(2-4), 127-135. <https://doi.org/10.32394/mdm.71.13>.
- Ksiaa, F., Allous, A., Ziadi, S., Mokni, M., y Trimeche, M. (2015). Assessment and biological significance of JC polyomavirus in colorectal cancer in Tunisia. *Journal of B.U.ON.*, 20(3), 762-769.
- Kumar, A., Chinnathambi, S., Kumar, M., y Pandian, G. N. (2023). Food intake and colorectal cancer. *Nutrition and Cancer*, 75(9), 1710-1742. <https://doi.org/10.1080/01635581.2023.2242103>.
- Kumarasamy, V., Anbazhagan, D., Subramaniyan, V., y Vellasamy, S. (2018). *Blastocystis* sp., parasite associated with gastrointestinal disorders: An overview of its pathogenesis, immune modulation and therapeutic strategies. *Current Pharmaceutical Design*, 24(27), 3172-3175. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180807101536>.
- Kumarasamy, V., Kuppusamy, U. R., Jayalakshmi, P., Samudi, C., Ragavan, N. D., y Kumar, S. (2017). Exacerbation of colon carcinogenesis by *Blastocystis* sp. *PLoS ONE*, 12(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183097>.
- Kumarasamy, V., Kuppusamy, U. R., Samudi, C., y Kumar, S. (2013). *Blastocystis* sp. subtype 3 triggers higher proliferation of human colorectal cancer cells, HCT116. *Parasitology Research*, 112(10). <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3538-5>.

BIBLIOGRAFÍA

- Kumarasamy, V., Roslani, A. C., Rani, K. U., y Kumar Govind, S. (2014). Advantage of using colonic washouts for *Blastocystis* detection in colorectal cancer patients. *Parasites & Vectors*, 7, 162. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-162>.
- Kurt, Ö., Doğruman Al, F., y Tanyüksel, M. (2016). Eradication of *Blastocystis* in humans: Really necessary for all? *Parasitology International*, 65(6 Pt B), 797-801. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.01.010>.
- Küry, S., Buecher, B., Robiou-du-Pont, S., Scoul, C., Colman, H., Le Neel, T., Le Houérou, C., Faroux, R., Ollivry, J., Lafraise, B., Chupin, L.-D., Sébille, V., y Béziau, S. (2008). Low-penetrance alleles predisposing to sporadic colorectal cancers: A French case-controlled genetic association study. *BMC Cancer*, 8, 326. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-326>.
- Kwong, T. N. Y., Wang, X., Nakatsu, G., Chow, T. C., Tipoe, T., Dai, R. Z. W., Tsoi, K. K. K., Wong, M. C. S., Tse, G., Chan, M. T. V., Chan, F. K. L., Ng, S. C., Wu, J. C. Y., Wu, W. K. K., Yu, J., Sung, J. J. Y., y Wong, S. H. (2018). Association between bacteremia from specific microbes and subsequent diagnosis of colorectal cancer. *Gastroenterology*, 155(2), 383-390.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.04.028>.
- Labania, L., Zoughbor, S., Ajab, S., Olanda, M., Shantour, S. N. M., y Al Rasbi, Z. (2023). The associated risk of *Blastocystis* infection in cancer: A case control study. *Frontiers in Oncology*, 13, 1115835. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1115835>.
- Ladabaum, U., Dominitz, J. A., Kahi, C., y Schoen, R. E. (2020). Strategies for colorectal cancer screening. *Gastroenterology*, 158(2), 418-432. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.06.043>.
- Lahiri, D. K., y Numberger, J. I., Jr. (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research*, 19(19), 5444. <https://doi.org/10.1093/nar/19.19.5444>.

- Lai, Y.-C., Lin, A.-C., Chiang, M.-K., Dai, Y.-H., Hsu, C.-C., Lu, M.-C., Liao, C.-Y., y Chen, Y.-T. (2014). Genotoxic *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *PLoS ONE*, 9(5), e96292. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096292>.
- Lalle, M., Pozio, E., Capelli, G., Bruschi, F., Crotti, D., y Cacciò, S. M. (2005). Genetic heterogeneity at the β -giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *International Journal for Parasitology*, 35(2), 207-213. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.10.022>.
- Landis, J. R., y Koch, G. G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33(1), 159-174.
- Lansdorp-Vogelaar, I., Kuntz, K. M., Knudsen, A. B., Van Ballegooijen, M., Zauber, A. G., y Jemal, A. (2012). Contribution of screening and survival differences to racial disparities in colorectal cancer rates. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 21(5), 728-736. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-12-0023>.
- Lara-Tejero, M., y Galán, J. E. (2002). Cytolethal distending toxin: Limited damage as a strategy to modulate cellular functions. *Trends in Microbiology*, 10(3), 147-152. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(02\)02316-8](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)02316-8).
- Le Bouguénec, C., Lalioui, L., du Merle, L., Jouve, M., Courcoux, P., Bouzari, S., Selvarangan, R., Nowicki, B. J., Germani, Y., Andremont, A., Gounon, P., y Garcia, M.-I. (2001). Characterization of AfaE adhesins produced by extraintestinal and intestinal human *Escherichia coli* isolates: PCR assays for detection of Afa adhesins that do or do not recognize Dr blood group antigens. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(5), 1738-1745. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.5.1738-1745.2001>.
- Leder, K., Hellard, M. E., Sinclair, M. I., Fairley, C. K., y Wolfe, R. (2005). No correlation between clinical symptoms and *Blastocystis hominis* in immunocompetent individuals. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 20(9), 1390-1394. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2005.03868.x>.

BIBLIOGRAFÍA

- Lee, J., Shin, A., Oh, J. H., y Kim, J. (2017). Colors of vegetables and fruits and the risks of colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 23(14), 2527-2538. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i14.2527>.
- Lee, L., Chye, T. T., Karmacharya, B. M., y Govind, S. K. (2012). *Blastocystis* sp.: Waterborne zoonotic organism, a possibility? *Parasites & Vectors*, 5(1), 130. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-130>.
- Lee, S., Woo, H., Lee, J., Oh, J.-H., Kim, J., y Shin, A. (2019). Cigarette smoking, alcohol consumption, and risk of colorectal cancer in South Korea: A case-control study. *Alcohol*, 76, 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2018.06.004>.
- Leslie, A., Carey, F. A., Pratt, N. R., y Steele, R. J. C. (2002). The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *The British Journal of Surgery*, 89(7), 845-860. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2168.2002.02120.x>.
- Letunic, I., y Bork, P. (2019). Interactive tree of life (iTOL) v4: Recent updates and new developments. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W256-W259. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>.
- Lewandowska, A., Rudzki, G., Lewandowski, T., Strykowska-Góra, A., y Rudzki, S. (2022). Risk factors for the diagnosis of colorectal cancer. *Cancer Control: Journal of the Moffitt Cancer Center*, 29, 10732748211056692. <https://doi.org/10.1177/10732748211056692>.
- Li, Y.-H., Niu, Y.-B., Sun, Y., Zhang, F., Liu, C.-X., Fan, L., y Mei, Q.-B. (2015). Role of phytochemicals in colorectal cancer prevention. *World Journal of Gastroenterology*, 21(31), 9262-9272. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i31.9262>.
- Liang, P. S., Chen, T.-Y., y Giovannucci, E. (2009). Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: Systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cancer*, 124(10), 2406-2415. <https://doi.org/10.1002/ijc.24191>.

- Lim, M. X., Png, C. W., Tay, C. Y. B., Teo, J. D. W., Jiao, H., Lehming, N., Tan, K., y Zhang, Y. (2014). Differential regulation of proinflammatory cytokine expression by mitogen-activated protein kinases in macrophages in response to intestinal parasite infection. *Infection and Immunity*, 82(11), 4789-4801. <https://doi.org/10.1128/IAI.02279-14>.
- Lipkin, M., y Newmark, H. (1995). Calcium and the prevention of colon cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 59(S22), 65-73. <https://doi.org/10.1002/jcb.240590810>.
- Little, A., Tangney, M., Tunney, M. M., y Buckley, N. E. (2023). *Fusobacterium nucleatum*: A novel immune modulator in breast cancer? *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 25, e15. <https://doi.org/10.1017/erm.2023.9>.
- Liu, J., Gratz, J., Amour, C., Nshama, R., Walongo, T., Maro, A., Mduma, E., Platts-Mills, J., Boisen, N., Nataro, J., Haverstick, D. M., Kabir, F., Lertsethtakarn, P., Silapong, S., Jeamwattanalert, P., Bodhidatta, L., Mason, C., Begum, S., Haque, R., ... Houpt, E. R. (2016). Optimization of quantitative PCR methods for enteropathogen detection. *PLoS One*, 11(6), e0158199. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158199>.
- Liu, K., Yang, X., Zeng, M., Yuan, Y., Sun, Jianhong, He, P., Sun, Jiayu, Xie, Q., Chang, X., Zhang, S., Chen, X., Cai, L., Xie, Y., y Jiao, X. (2021). The role of fecal *Fusobacterium nucleatum* and *pks+* *Escherichia coli* as early diagnostic markers of colorectal cancer. *Disease Markers*, 2021, 1171239. <https://doi.org/10.1155/2021/1171239>.
- Llorente, M. T., Escudero, R., Ramiro, R., Remacha, M. A., Martínez-Ruiz, R., Galán-Sánchez, F., De Frutos, M., Elía, M., Onrubia, I., y Sánchez, S. (2023). Enteropathogenic *Escherichia coli* as etiological agent of endemic diarrhea in Spain: A prospective multicenter prevalence study with molecular characterization of isolates. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1120285. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1120285>.
- Londoño-Franco, Á. L., Loaiza-Herrera, J., Lora-Suárez, F. M., y Gómez-Marín, J. E. (2014). *Blastocystis* sp. frequency and sources among children from 0 to 5 years of age attending

BIBLIOGRAFÍA

- public day care centers in Calarcá, Colombia. *Biomedica*, 34(2), 218-227.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.2124>.
- Lopes, P. G. M., Cantarelli, V. V., Agnes, G., Costabeber, A. M., y d'Azevedo, P. A. (2014). Novel real-time PCR assays using TaqMan minor groove binder probes for identification of fecal carriage of *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex from rectal swab specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(3), 974-976.
<https://doi.org/10.1128/JCM.03253-13>.
- Louis-Jean, S. F., Agrawal, N., y Bisht, S. (2023). *Fusobacterium nucleatum* pyogenic liver abscess and the role of bacterial virulence and gut microbiota dysbiosis. *Cureus*, 15(2), e34548.
<https://doi.org/10.7759/cureus.34548>.
- Lu, Y., Kweon, S.-S., Cai, Q., Tanikawa, C., Shu, X.-O., Jia, W.-H., Xiang, Y.-B., Huyghe, J. R., Harrison, T. A., Kim, J., Shin, A., Kim, D.-H., Matsuo, K., Jee, S. H., Guo, X., Wen, W., Shi, J., Li, B., Wang, N., ... Zheng, W. (2020). Identification of novel loci and new risk variant in known loci for colorectal cancer risk in East Asians. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 29(2), 477-486. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-19-0755>.
- Lu, Y., Kweon, S.-S., Tanikawa, C., Jia, W.-H., Xiang, Y.-B., Cai, Q., Zeng, C., Schmit, S. L., Shin, A., Matsuo, K., Jee, S. H., Kim, D.-H., Kim, J., Wen, W., Shi, J., Guo, X., Li, B., Wang, N., Zhang, B., ... Zheng, W. (2019). Large-scale genome-wide association study of East Asians identifies loci associated with risk for colorectal cancer. *Gastroenterology*, 156(5), 1455-1466. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.11.066>.
- Lunar Silva, I., y Cascales, E. (2021). Molecular strategies underlying *Porphyromonas gingivalis* virulence. *Journal of Molecular Biology*, 433(7), 166836.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.166836>.
- Luria, L., y Cardoza-Favarato, G. (2025). Human Papillomavirus. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448132/>.

- Lynch, H. T., y Lynch, J. F. (1998). Genetics of colonic cancer. *Digestion*, 59(5), 481-492.
<https://doi.org/10.1159/000007525>.
- Ma, Y., Yang, Y., Wang, F., Zhang, P., Shi, C., Zou, Y., y Qin, H. (2013). Obesity and risk of colorectal cancer: A systematic review of prospective studies. *PloS One*, 8(1), e53916.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053916>.
- Macdonald, F., Ford, C., y Casson, A. (2004). *Molecular biology of cancer* (2nd ed). BIOS Scientific Publishers.
- Mahdavi, F., Maleki, F., Mohammadi, M. R., Mehboodi, M., Hanifeh, F., Asghari, A., y Mohammadi-Ghalehbin, B. (2024). A worldwide systematic review and meta-analysis of the prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in water sources: A public health concern. *Foodborne Pathogens and Disease*.
<https://doi.org/10.1089/fpd.2024.0107>.
- Mahmoudvand, H., Sepahvand, A., Badparva, E., Khatami, M., Niazi, M., y Moayyedkazemi, A. (2021). Possible association and risk factors of *Blastocystis* infection and colorectal cancers in Western Iran. *Archives of Clinical Infectious Diseases*, 16(1).
<https://doi.org/10.5812/archcid.90861>.
- Maier, L., Goemans, C. V., Wirbel, J., Kuhn, M., Eberl, C., Pruteanu, M., Müller, P., Garcia-Santamarina, S., Cacace, E., Zhang, B., Gekeler, C., Banerjee, T., Anderson, E. E., Milanese, A., Löber, U., Forslund, S. K., Patil, K. R., Zimmermann, M., Stecher, B., ... Typas, A. (2021). Unravelling the collateral damage of antibiotics on gut bacteria. *Nature*, 599(7883), 120-124. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03986-2>.
- Maloney, J. G., da Cunha, M. J. R., Molokin, A., Cury, M. C., y Santin, M. (2021a). Next-generation sequencing reveals wide genetic diversity of *Blastocystis* subtypes in chickens including potentially zoonotic subtypes. *Parasitology Research*, 120(6), 2219-2231.
<https://doi.org/10.1007/s00436-021-07170-3>.

BIBLIOGRAFÍA

- Maloney, J. G., Jang, Y., Molokin, A., George, N. S., y Santin, M. (2021b). Wide genetic diversity of *Blastocystis* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) from Maryland, USA. *Microorganisms*, 9(6), 1343. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061343>.
- Maloney, J. G., Lombard, J. E., Urie, N. J., Shivley, C. B., y Santin, M. (2019a). Zoonotic and genetically diverse subtypes of *Blastocystis* in US pre-weaned dairy heifer calves. *Parasitology Research*, 118(2), 575-582. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6149-3>.
- Maloney, J. G., Molokin, A., da Cunha, M. J. R., Cury, M. C., y Santin, M. (2020a). *Blastocystis* subtype distribution in domestic and captive wild bird species from Brazil using next generation amplicon sequencing. *Parasite Epidemiology and Control*, 9, e00138. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2020.e00138>.
- Maloney, J. G., Molokin, A., y Santin, M. (2019b). Next generation amplicon sequencing improves detection of *Blastocystis* mixed subtype infections. *Infection, Genetics and Evolution*, 73, 119-125. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.04.013>.
- Maloney, J. G., Molokin, A., y Santin, M. (2020b). Use of Oxford Nanopore MinION to generate full-length sequences of the *Blastocystis* small subunit (SSU) rRNA gene. *Parasites & Vectors*, 13(1), 595. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04484-6>.
- Maloney, J. G., Molokin, A., Seguí, R., Maravilla, P., Martínez-Hernández, F., Villalobos, G., Tsaousis, A. D., Gentekaki, E., Muñoz-Antolí, C., Klisiowicz, D. R., Oishi, C. Y., Toledo, R., Esteban, J. G., Köster, P. C., de Lucio, A., Dashti, A., Bailo, B., Calero-Bernal, R., González-Barrio, D., ... Santín, M. (2022). Identification and molecular characterization of four new *Blastocystis* subtypes designated ST35-ST38. *Microorganisms*, 11(1), 46. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010046>.
- Maloney, J. G., y Santin, M. (2021). Mind the gap: New full-length sequences of *Blastocystis* subtypes generated via oxford nanopore minion sequencing allow for comparisons between full-length and partial sequences of the small subunit of the ribosomal RNA gene. *Microorganisms*, 9(5), 997. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050997>.

- Mandic, M., Li, H., Safizadeh, F., Niedermaier, T., Hoffmeister, M., y Brenner, H. (2023). Is the association of overweight and obesity with colorectal cancer underestimated? An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *European Journal of Epidemiology*, 38(2), 135-144. <https://doi.org/10.1007/s10654-022-00954-6>.
- Marín, M., García-Lechuz, J. M., Alonso, P., Villanueva, M., Alcalá, L., Gimeno, M., Cercenado, E., Sánchez-Somolinos, M., Radice, C., y Bouza, E. (2012). Role of universal 16S rRNA gene PCR and sequencing in diagnosis of prosthetic joint infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3), 583-589. <https://doi.org/10.1128/JCM.00170-11>.
- Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., y Rodríguez Yoldi, M. J. (2017). Colorectal carcinoma: A general overview and future perspectives in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 197. <https://doi.org/10.3390/ijms18010197>.
- Marongiu, L., y Allgayer, H. (2022). Viruses in colorectal cancer. *Molecular Oncology*, 16(7), 1423-1450. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13100>.
- Marx, O., Mankarious, M., y Yochum, G. (2023). Molecular genetics of early-onset colorectal cancer. *World Journal of Biological Chemistry*, 14(2), 13-27. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v14.i2.13>.
- Mayo, O. (2008). A century of hardy–weinberg equilibrium. *Twin Research and Human Genetics*, 11(3), 249-256. <https://doi.org/10.1375/twin.11.3.249>.
- McCullough, M. L., Zoltick, E. S., Weinstein, S. J., Fedirko, V., Wang, M., Cook, N. R., Eliassen, A. H., Zeleniuch-Jacquotte, A., Agnoli, C., Albanes, D., Barnett, M. J., Buring, J. E., Campbell, P. T., Clendenen, T. V., Freedman, N. D., Gapstur, S. M., Giovannucci, E. L., Goodman, G. G., Haiman, C. A., ... Smith-Warner, S. A. (2019). Circulating vitamin d and colorectal cancer risk: An international pooling project of 17 cohorts. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 111(2), 158-169. <https://doi.org/10.1093/jnci/djy087>.

BIBLIOGRAFÍA

- Mei, X., Wei, L., Su, C., Yang, Z., Tian, X., Zhang, Z., y Wang, S. (2023). Advances in the axenic isolation methods of *Blastocystis* sp. and their applications. *Parasitology*, 1-10. <https://doi.org/10.1017/S0031182023001300>.
- Meine, G. C., Picon, R. V., Espírito Santo, P. A., y Sander, G. B. (2024). Ultra-processed food consumption and gastrointestinal cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *American Journal of Gastroenterology*, 119(6), 1056-1065. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000002826>.
- Melo, G. B. de, Malta, F. de M., Maruta, C. W., Criado, P. R., Castilho, V. L. P., Gonçalves, E. M. do N., Espírito-Santo, M. C. de C. do, Paula, F. M. de, y Gryscek, R. C. B. (2019). Characterization of subtypes of *Blastocystis* sp. isolated from patients with urticaria, São Paulo, Brazil. *Parasite Epidemiology and Control*, 7, e00124. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2019.e00124>.
- Micha, R., Wallace, S. K., y Mozaffarian, D. (2010). Red and processed meat consumption and risk of incident coronary heart disease, stroke, and diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Circulation*, 121(21), 2271-2283. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.924977>.
- Miller, S. A., Dykes, D. D., y Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16(3), 1215. <https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>.
- Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., Von Haeseler, A., y Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molecular Biology and Evolution*, 37(5), 1530-1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>.
- Ministerio de Salud y Protección Social. (1993, octubre 4). *Resolución número 8430 de 1993*. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/RESOLUCION-8430-DE-1993.PDF>.

Ministerio de Salud y Protección Social. (1994, agosto 5). *Resolución número 5261 de 1994.*

https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/RESOLUCI%C3%93N%205261%20DE%201994.pdf.

Ministerio de Salud y Protección Social. (2013). *Guía de práctica clínica (GPC) para la detección temprana, diagnóstico, tratamiento, seguimiento y rehabilitación de pacientes con diagnóstico de cáncer de colon y recto.* Independencia Editorial.

<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/INEC/IETS/gpc-completa-ca-colon.pdf>.

Ministerio de Salud y Protección Social, y Universidad de Antioquia. (2015). *Encuesta nacional de parasitismo intestinal en población escolar Colombia, 2012 – 2014: Análisis en profundidad.*

<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ET/encuesta-nacional-de-parasitismo-2012-2014.pdf>.

Ministerio de Sanidad, Gobierno de España. (s. f.). *Portal plan nacional sobre drogas—Alcohol.*

Plan Nacional sobre Drogas. Recuperado 5 de febrero de 2024, a partir de <https://pnsd.sanidad.gob.es/ciudadanos/informacion/alcohol/home.htm>.

Mirza, H., y Tan, K. (2009). *Blastocystis* exhibits inter- and intra-subtype variation in cysteine protease activity. *Parasitology Research*, 104(2), 355-361.

<https://doi.org/10.1007/s00436-008-1203-1>.

Mohamed, A. M., Ahmed, M. A., Ahmed, S. A., Al-Semany, S. A., Alghamdi, S. S., y Zagloul, D. A.

(2017). Predominance and association risk of *Blastocystis hominis* subtype I in colorectal cancer: A case control study. *Infectious Agents and Cancer*, 12(1), 21.

<https://doi.org/10.1186/s13027-017-0131-z>.

Mohammadi, M., Mirzaei, H., y Motallebi, M. (2022). The role of anaerobic bacteria in the development and prevention of colorectal cancer: A review study. *Anaerobe*, 73,

102501. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2021.102501>.

BIBLIOGRAFÍA

- Mohammadi, M. R., Asghari, A., Badri, M., Maleki, F., Bijani, B., y Karampour, A. (2025). Global epidemiology and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in birds: A systematic review and meta-analysis. *Foodborne Pathogens and Disease*. <https://doi.org/10.1089/fpd.2025.0007>.
- Molina, M. A., Díaz, A. M., Hesse, C., Ginter, W., Gentilini, M. V., Nuñez, G. G., Canellada, A. M., Sparwasser, T., Berod, L., Castro, M. S., y Manghi, M. A. (2015). Immunostimulatory effects triggered by *Enterococcus faecalis* CECT7121 probiotic strain involve activation of dendritic cells and interferon-gamma production. *PLOS ONE*, 10(5), e0127262. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127262>.
- Momi, N., Kaur, S., Ponnusamy, M. P., Kumar, S., Wittel, U. A., y Batra, S. K. (2012). Interplay between smoking-induced genotoxicity and altered signaling in pancreatic carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 33(9), 1617-1628. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs186>.
- Moore, D. D. (2001). Commonly used reagents and equipment. *Current Protocols in Molecular Biology*, Appendix 2, Appendix 2. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mba02s35>.
- Moreta, M. J., Llach, J., y Moreira, L. (2022). Cáncer colorrectal: Factores de riesgo, diagnóstico y cribado. *Medicina*, 44(3), 372-385. <https://doi.org/10.56050/01205498.2183>.
- Mueller, M., y Tainter, C. R. (2025). *Escherichia coli* infection. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298/>.
- Muftuoglu, C., Yoldas, T., Bozbiyik, O., Bagci, O. U., Alizadeh, H., Mert, U., y Caner, A. (2025). Cryptosporidiosis as an opportunistic infection in colorectal cancer patients. *European Journal of Cancer Prevention*. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000950>.
- Mughini-Gras, L., Schaapveld, M., Kramers, J., Mooij, S., Neefjes-Borst, E. A., Pelt, W. V., y Neefjes, J. (2018). Increased colon cancer risk after severe *Salmonella* infection. *PLOS ONE*, 13(1), e0189721. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189721>.

- Mutengo, M., Kaduková, M., Mulunda, N. R., Chabala, F. W., Dashti, A., Hayashida, K., Chinyanta, S., Chisanga, K., Castro, L., Sánchez, S., Mwansa, J., Köster, P. C., González-Barrio, D., Maloney, J. G., Santín, M., Sotillo, J., y Carmena, D. (2024). Asymptomatic carriage of intestinal protists is common in children in Lusaka Province, Zambia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 18(12), e0012717. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012717>.
- Nagasaka, T., Koi, M., Kloor, M., Gebert, J., Vilkin, A., Nishida, N., Shin, S. K., Sasamoto, H., Tanaka, N., Matsubara, N., Boland, C. R., y Goel, A. (2008). Mutations in both KRAS and BRAF may contribute to the methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology*, 134(7), 1950-1960, 1960.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.02.094>.
- Naguib, D., Gantois, N., Desramaut, J., Dominguez, R. G., Arafat, N., Atwa, S. M., Even, G., Devos, D. P., Certad, G., Chabé, M., y Viscogliosi, E. (2024). Large-scale molecular epidemiological survey of *Blastocystis* sp. among herbivores in Egypt and assessment of potential zoonotic risk. *Microorganisms*, 12(7), 1286. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12071286>.
- Nascimento, A. F., Oliveira, J. S., Silva Junior, J. C., y Barbosa, A. a. L. (2016). Genomic ancestry evaluated by ancestry-informative markers in patients with sickle cell disease. *Genetics and Molecular Research*, 15(1). <https://doi.org/10.4238/gmr.15017604>.
- Nataro, J. P., y Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), 142-201. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.1.142>.
- National Cancer Institute. (s. f.-a). *Infectious Agents and Cancer*. Infectious Agents and Cancer | EGRP/DCCPS/NCI/NIH. Recuperado 12 de enero de 2025, a partir de <https://epi.grants.cancer.gov/infectious-agents/>.
- National Cancer Institute. (s. f.-b). *NCI Dictionaries*. NCI Dictionaries. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries>.
- National Cancer Institute. (2015, abril 29). *Treatment for Cancer* (nciglobal,ncienterprise [cgvMiniLanding]). <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment>.

BIBLIOGRAFÍA

- National Cancer Institute. (2019). *Risk factors: Infectious agents* (nciglobal,ncienterprise) [cgvArticle]. <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/infectious-agents>.
- National Cancer Institute. (2021). *Understanding Cancer—NCI* (nciglobal,ncienterprise) [cgvMiniLanding]. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding>.
- National Cancer Institute. (2023, octubre). *Colorectal Cancer* (nciglobal,ncienterprise) [cgvCancerTypeHome]. <https://www.cancer.gov/types/colorectal/hp>.
- Nguyen, L. H., Goel, A., y Chung, D. C. (2020). Pathways of colorectal carcinogenesis. *Gastroenterology*, 158(2), 291-302. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.08.059>.
- Nieto-Clavijo, C., Morales, L., Delgado-Aldana, A., Hernández, P. C., Torres-Molina, I., Gonzalez-Cuiza, A., Cortés-Muñoz, F., y Chaparro-Olaya, J. (2024). Enhanced *Blastocystis* subtyping from stool samples using semi-nested barcode PCR: Validation with an NGS-based approach. *BioTechniques*, 76(12), 581-591. <https://doi.org/10.1080/07366205.2024.2442835>.
- Nishikawa, T., Tsuno, N. H., Okaji, Y., Shuno, Y., Sasaki, K., Hongo, K., Sunami, E., Kitayama, J., Takahashi, K., y Nagawa, H. (2010). Inhibition of autophagy potentiates sulforaphane-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Annals of Surgical Oncology*, 17(2), 592-602. <https://doi.org/10.1245/s10434-009-0696-x>.
- Nomura, A. M., Wilkens, L. R., Murphy, S. P., Hankin, J. H., Henderson, B. E., Pike, M. C., y Kolonel, L. N. (2008). Association of vegetable, fruit, and grain intakes with colorectal cancer: The Multiethnic Cohort Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(3), 730-737. <https://doi.org/10.1093/ajcn/88.3.730>.
- Norat, T., y Riboli, E. (2003). Dairy products and colorectal cancer. A review of possible mechanisms and epidemiological evidence. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57(1), 1-17. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601522>.

- Norris, E. T., Wang, L., Conley, A. B., Rishishwar, L., Mariño-Ramírez, L., Valderrama-Aguirre, A., y Jordan, I. K. (2018). Genetic ancestry, admixture and health determinants in Latin America. *BMC Genomics*, 19(S8), 861. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5195-7>.
- Nosho, K., Shima, K., Kure, S., Irahara, N., Baba, Y., Chen, L., Fuchs, C. S., y Ogino, S. (2009). JC virus T-antigen in colorectal cancer is associated with p53 expression and chromosomal instability, independent of CpG island methylator phenotype. *Neoplasia*, 11(1), 87-95. <https://doi.org/10.1593/neo.81188>.
- Nougayrède, J.-P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Buchrieser, C., Hacker, J., Dobrindt, U., y Oswald, E. (2006). *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science*, 313(5788), 848-851. <https://doi.org/10.1126/science.1127059>.
- Nourrisson, C., Scanzi, J., Pereira, B., NkoudMongo, C., Wawrzyniak, I., Cian, A., Viscogliosi, E., Livrelli, V., Delbac, F., Dapoigny, M., y Poirier, P. (2014). *Blastocystis* is associated with decrease of fecal microbiota protective bacteria: Comparative analysis between patients with irritable bowel syndrome and control subjects. *PLoS One*, 9(11), e111868. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111868>.
- Nourrisson, C., Wawrzyniak, I., Cian, A., Livrelli, V., Viscogliosi, E., Delbac, F., y Poirier, P. (2016). On *Blastocystis* secreted cysteine proteases: A legumain-activated cathepsin B increases paracellular permeability of intestinal Caco-2 cell monolayers. *Parasitology*, 143(13), 1713-1722. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001396>.
- Nyati, K. K., y Nyati, R. (2013). Role of *Campylobacter jejuni* infection in the pathogenesis of Guillain-Barré syndrome: An update. *BioMed Research International*, 2013, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2013/852195>.
- Ocvirk, S., Wilson, A. S., Appolonia, C. N., Thomas, T. K., y O'Keefe, S. J. D. (2019). Fiber, fat, and colorectal cancer: New insight into modifiable dietary risk factors. *Current Gastroenterology Reports*, 21(11), 62. <https://doi.org/10.1007/s11894-019-0725-2>.

BIBLIOGRAFÍA

- O'Hara, C. M., Brenner, F. W., y Miller, J. M. (2000). Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 534-546. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.4.534>.
- Organización Mundial de la Salud. (s. f.). *Publicación de la CIE-11 2022*. Recuperado 5 de febrero de 2024, a partir de <https://www.who.int/es/news/item/11-02-2022-icd-11-2022-release>.
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2018). Infección por *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*. En *Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres* (8ª edición, pp. 1-10). OIE. https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.10.04_Campilobacter_jejuni.pdf.
- Organización Panamericana de la Salud, y Organización Mundial de la Salud. (2015). *Alimentos y bebidas ultraprocesados en América Latina: Tendencias, efecto sobre la obesidad e implicaciones para las políticas públicas*. https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/7698/9789275318645_esp.pdf.
- Orrego-Cardozo, M., Parra-Gil, M. A., Salgado-Morales, Y. P., Muñoz-Guarín, E., y Fandiño-Henao, V. (2015). *Porphyromonas gingivalis* y enfermedades sistémicas. *CES Odontología*, 28, 57-73.
- Osman, M., Benamrouz, S., Guyot, K., Baydoun, M., Frealle, E., Chabe, M., Gantois, N., Delaire, B., Goffard, A., Aoun, A., Jurdi, N., Dabboussi, F., Even, G., Slomianny, C., Gosset, P., Hamze, M., Creusy, C., Viscogliosi, E., y Certad, G. (2017). High association of *Cryptosporidium* spp. infection with colon adenocarcinoma in Lebanese patients. *PLoS ONE*, 12(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189422>.
- Osorio-Pulgarin, M. I., Higuera, A., Beltran-Álzate, J. C., Sánchez-Jiménez, M., y Ramírez, J. D. (2021). Epidemiological and molecular characterization of *Blastocystis* infection in

- children attending daycare centers in Medellín, Colombia. *Biology*, 10(7), 669.
<https://doi.org/10.3390/biology10070669>.
- Ou, S., Wang, H., Tao, Y., Luo, K., Ye, J., Ran, S., Guan, Z., Wang, Y., Hu, H., y Huang, R. (2022). *Fusobacterium nucleatum* and colorectal cancer: From phenomenon to mechanism. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 1020583.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1020583>.
- Pan American Health Organization. (2024, mayo 30). *Cancer—PAHO/WHO*.
<https://www.paho.org/en/topics/cancer>.
- Pancione, M., Remo, A., y Colantuoni, V. (2012). Genetic and Epigenetic Events Generate Multiple Pathways in Colorectal Cancer Progression. *Pathology Research International*, 2012, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2012/509348>.
- Pandey, H., Tang, D. W. T., Wong, S. H., y Lal, D. (2023). Gut microbiota in colorectal cancer: Biological role and therapeutic opportunities. *Cancers*, 15(3), 866.
<https://doi.org/10.3390/cancers15030866>.
- Parija, S. C., y Jeremiah, S. (2013). *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence. *Tropical Parasitology*, 3(1), 17-25. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.113894>.
- Parikh, N. S., y Ahlawat, R. (2025). *Helicobacter pylori*. En *StatPearls*. StatPearls Publishing.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534233/>.
- Paschke, S., Jafarov, S., Staib, L., Kreuser, E.-D., Maulbecker-Armstrong, C., Roitman, M., Holm, T., Harris, C. C., Link, K.-H., y Kornmann, M. (2018). Are colon and rectal cancer two different tumor entities? A proposal to abandon the term colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2577.
<https://doi.org/10.3390/ijms19092577>.
- Patel, S. G., Karlitz, J. J., Yen, T., Lieu, C. H., y Boland, C. R. (2022). The rising tide of early-onset colorectal cancer: A comprehensive review of epidemiology, clinical features, biology,

- risk factors, prevention, and early detection. *The Lancet. Gastroenterology & Hepatology*, 7(3), 262-274. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(21\)00426-X](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(21)00426-X).
- Pawelec-Pęciak, O., Łanocha-Arendarczyk, N., Grzeszczak, K., y Kosik-Bogacka, D. (2025). The role of *Blastocystis* spp. in the etiology of gastrointestinal and autoimmune diseases. *Pathogens*, 14(4), 313. <https://doi.org/10.3390/pathogens14040313>.
- Peng, M. M., Meshnick, S. R., Cunliffe, N. A., Thindwa, B. D. M., Hart, C. A., Broadhead, R. L., y Xiao, L. (2003). Molecular epidemiology of cryptosporidiosis in children in Malawi. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50(s1), 557-559. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2003.tb00628.x>.
- Peña, S., Carrasco, G., Rojas, P., Castillo, D., Ozaki, L. S., y Mercado, R. (2020). Determination of subtypes of *Blastocystis* sp. in Chilean patients with and without inflammatory bowel syndrome, A preliminary report. *Parasite Epidemiology and Control*, 8, e00125. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2019.e00125>.
- Peñas, B., Tavío, E., Sánchez-Vegazo, C. T., y Aicart-Ramos, M. (2016). Protocolo sobre el manejo del paciente con carcinoma colorrectal familiar y hereditario. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(6), 325-329. <https://doi.org/10.1016/j.med.2016.03.007>.
- Perea, J., Lomas, M., y Hidalgo, M. (2011). Bases moleculares del cáncer colorrectal: ¿Hacia un manejo individualizado? *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 103(1), 29-35.
- Perea, J., y Rueda, D. (2012). Methylation in colorectal cancer. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 104(3), 107-110. <https://doi.org/10.4321/S1130-01082012000300001>.
- Pereira, R., Phillips, C., Pinto, N., Santos, C., dos Santos, S. E. B., Amorim, A., Carracedo, Á., y Gusmão, L. (2012). Straightforward inference of ancestry and admixture proportions through ancestry-informative insertion deletion multiplexing. *PLoS One*, 7(1), e29684. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029684>.

- Pérez, M. R., Yáñez, C. M., Hernández, A. M., Sustaita, J. J. D., Jiménez, E. G., Andrade, M. R., Vargas, G. G. G., y Gómez, J. O. G. (2020). *Blastocystis* infection frequency and subtype distribution in university students. *Heliyon*, 6(12), e05729. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05729>.
- Périchon, B., Lichtl-Häfele, J., Bergsten, E., Delage, V., Trieu-Cuot, P., Sansonetti, P., Sobhani, I., y Dramsi, S. (2022). Detection of *Streptococcus gallolyticus* and four other CRC-associated bacteria in patient stools reveals a potential “driver” role for enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 794391. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.794391>.
- Peters, U., Jiao, S., Schumacher, F. R., Hutter, C. M., Aragaki, A. K., Baron, J. A., Berndt, S. I., Bézieau, S., Brenner, H., Butterbach, K., Caan, B. J., Campbell, P. T., Carlson, C. S., Casey, G., Chan, A. T., Chang-Claude, J., Chanock, S. J., Chen, L. S., Coetzee, G. A., ... Hsu, L. (2013). Identification of genetic susceptibility loci for colorectal tumors in a genome-wide meta-analysis. *Gastroenterology*, 144(4), 799-807.e24. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.12.020>.
- Piciocchi, A., Germinario, E. A. P., Garcia Etxebarria, K., Rossi, S., Sanchez-Mete, L., Porowska, B., Stigliano, V., Trentino, P., Oddi, A., Accarpio, F., Grazi, G. L., Bruno, G., Bonucci, M., Giambenedetti, M., Spigaglia, P., Barbanti, F., Owczarek, S., Luzzi, I., Delibato, E., ... Fabbri, A. (2021). Association of polygenic risk score and bacterial toxins at screening colonoscopy with colorectal cancer progression: A multicenter case-control study. *Toxins*, 13(8), 569. <https://doi.org/10.3390/toxins13080569>.
- Pinilla Pérez, M., Villafañe Ferrer, L. M., Mendoza Mendoza, B., Garcés Alvarado, E., Licona Chiquillo, L., y Pinto Perez, K. (2015). Estudio comparativo de la frecuencia de *Blastocystis hominis* en niños en edad preescolar de una zona urbana y una rural de la ciudad de Cartagena de Indias y su relación con las manifestaciones clínicas y factores de riesgo. *Acta Odontológica Colombiana*, 5(1), Article 1.

BIBLIOGRAFÍA

- Pino, M. S., y Chung, D. C. (2010). The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2059-2072. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.065>.
- Piperni, E., Nguyen, L. H., Manghi, P., Kim, H., Pasolli, E., Andreu-Sánchez, S., Arrè, A., Bermingham, K. M., Blanco-Míguez, A., Manara, S., Valles-Colomer, M., Bakker, E., Busonero, F., Davies, R., Fiorillo, E., Giordano, F., Hadjigeorgiou, G., Leeming, E. R., Lobina, M., ... Asnicar, F. (2024). Intestinal *Blastocystis* is linked to healthier diets and more favorable cardiometabolic outcomes in 56,989 individuals from 32 countries. *Cell*, 187(17), 4554-4570.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.06.018>.
- Pleguezuelos-Manzano, C., Puschhof, J., Rosendahl Huber, A., van Hoeck, A., Wood, H. M., Nomburg, J., Gurjao, C., Manders, F., Dalmasso, G., Stege, P. B., Paganelli, F. L., Geurts, M. H., Beumer, J., Mizutani, T., Miao, Y., van der Linden, R., van der Elst, S., Genomics England Research Consortium, Garcia, K. C., ... Clevers, H. (2020). Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic *pks+* *E. coli*. *Nature*, 580(7802), 269-273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2080-8>.
- Poirier, P., Wawrzyniak, I., Albert, A., El Alaoui, H., Delbac, F., y Livrelli, V. (2011). Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: Prospective study of patients with hematological malignancies. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(3), 975-983. <https://doi.org/10.1128/JCM.01392-10>.
- Pomerantz, M. M., Ahmadiyeh, N., Jia, L., Herman, P., Verzi, M. P., Doddapaneni, H., Beckwith, C. A., Chan, J. A., Hills, A., Davis, M., Yao, K., Kehoe, S. M., Lenz, H.-J., Haiman, C. A., Yan, C., Henderson, B. E., Frenkel, B., Barretina, J., Bass, A., ... Freedman, M. L. (2009). The 8q24 cancer risk variant rs6983267 shows long-range interaction with MYC in colorectal cancer. *Nature Genetics*, 41(8), 882-884. <https://doi.org/10.1038/ng.403>.
- Pompilio, A., Di Bonaventura, G., y Gherardi, G. (2019). An overview on *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex isolates: Identification to the species/subspecies

- level and antibiotic resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 480.
<https://doi.org/10.3390/ijms20030480>.
- Popov, V. S., Brodsky, I. B., Balatskaya, M. N., Balatskiy, A. V., Ozhimalov, I. D., Kulebyakina, M. A., Semina, E. V., Arbatskiy, M. S., Isakova, V. S., Klimovich, P. S., Sysoeva, V. Y., Kalinina, N. I., Tkachuk, V. A., y Rubina, K. A. (2023). T-cadherin deficiency is associated with increased blood pressure after physical activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(18), 14204. <https://doi.org/10.3390/ijms241814204>.
- Popruk, S., Adao, D. E. V., y Rivera, W. L. (2021). Epidemiology and subtype distribution of *Blastocystis* in humans: A review. *Infection, Genetics and Evolution*, 95, 105085.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105085>.
- Portillo, I., Idigoras, I., Bilbao, I., Hurtado, J. L., Urrejola, M., Calvo, B., Mentxaka, A., y Hurtado, J. K. (2017, septiembre). *Programa de cribado de cáncer colorrectal de Euskadi*. Centro Coordinador del programa de Cribado de Cáncer Colorrectal.
https://www.osakidetza.euskadi.eus/contenidos/informacion/deteccion_cancer_colorrectal/es_def/adjuntos/PROGRAMA2017.pdf.
- Potes-Morales, C., y Crespo-Ortiz, M. D. P. (2023). Molecular diagnosis of intestinal protozoa in young adults and their pets in Colombia, South America. *PLoS One*, 18(5), e0283824.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0283824>.
- Prindiville, T. P., Sheikh, R. A., Cohen, S. H., Tang, Y. J., Cantrell, M. C., y Silva, J. (2000). *Bacteroides fragilis* enterotoxin gene sequences in patients with inflammatory bowel disease. *Emerging Infectious Diseases*, 6(2), 171-174.
<https://doi.org/10.3201/eid0602.000210>.
- Pulgar Andrade, A. A., Carvallo Ruiz, D. E., y Martínez Núñez, E. N. (2023). Mecanismos de evasión tumoral a la respuesta inmune. *Revista Científica Ciencia Médica*, 25(2), 157-167. <https://doi.org/10.51581/rccm.v25i2.514>.

BIBLIOGRAFÍA

- Puthia, M. K., Sio, S. W. S., Lu, J., y Tan, K. (2006). *Blastocystis ratti* induces contact-independent apoptosis, F-actin rearrangement, and barrier function disruption in IEC-6 Cells. *Infection and Immunity*, 74(7), 4114-4123. <https://doi.org/10.1128/IAI.00328-06>.
- Puthia, M. K., Vaithilingam, A., Lu, J., y Tan, K. (2005). Degradation of human secretory immunoglobulin A by *Blastocystis*. *Parasitology Research*, 97(5), 386-389. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-1461-0>.
- Ralser, A., Dietl, A., Jarosch, S., Engelsberger, V., Wanisch, A., Janssen, K. P., Middelhoff, M., Vieth, M., Quante, M., Haller, D., Busch, D. H., Deng, L., Mejías-Luque, R., y Gerhard, M. (2023). *Helicobacter pylori* promotes colorectal carcinogenesis by deregulating intestinal immunity and inducing a mucus-degrading microbiota signature. *Gut*, 72(7), 1258-1270. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2022-328075>.
- Ramírez, J. D., Flórez, C., Olivera, M., Bernal, M. C., y Giraldo, J. C. (2017). *Blastocystis* subtyping and its association with intestinal parasites in children from different geographical regions of Colombia. *PloS One*, 12(2), e0172586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172586>.
- Ramírez, J. D., Sánchez, A., Hernández, C., Flórez, C., Bernal, M. C., Giraldo, J. C., Reyes, P., López, M. C., García, L., Cooper, P. J., Vicuña, Y., Mongi, F., y Casero, R. D. (2016). Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. *Infection, Genetics and Evolution*, 41, 32-35. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.03.017>.
- Ramírez, J. D., Sánchez, L. V., Bautista, D. C., Corredor, A. F., Flórez, A. C., y Stensvold, C. R. (2014). *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infection, Genetics and Evolution*, 22, 223-228. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.07.020>.
- Ramírez-Díaz, M. D. P., Alvarez-Bañuelos, M. T., Robaina-Castellanos, M. S., Castro-Enríquez, P. P., y Guzmán-García, R. E. (2021). Association of family history and life habits in the development of colorectal cancer: A matched case-control study in Mexico.

- International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(16), 8633.
<https://doi.org/10.3390/ijerph18168633>.
- Ramos, A., Berbari, E., y Huddleston, P. (2013). Diagnosis and treatment of *Fusobacterium nucleatum* discitis and vertebral osteomyelitis: Case report and review of the literature. *Spine*, 38(2), E120-122. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e31827b4d61>.
- Rawla, P., Sunkara, T., y Barsouk, A. (2019). Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors. *Gastroenterology Review*, 14(2), 89-103.
<https://doi.org/10.5114/pg.2018.81072>.
- Read, C. M., Monis, P. T., y Andrew Thompson, R. C. (2004). Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infection, Genetics and Evolution*, 4(2), 125-130. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2004.02.001>.
- Rehena, J., Harun, A. B., y Karim, M. R. (2025). Epidemiology of *Blastocystis* in farm animals: A review. *Veterinary Parasitology*, 334, 110382.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2024.110382>.
- Rishishwar, L., Conley, A. B., Wigington, C. H., Wang, L., Valderrama-Aguirre, A., y King Jordan, I. (2015). Ancestry, admixture and fitness in Colombian genomes. *Scientific Reports*, 5(1), 12376. <https://doi.org/10.1038/srep12376>.
- Ritchie, L. S., Pan, C., y Hunter, G. W. (1953). A comparison of the zinc sulfate and the formalin-ether (406th MGL) technic. *The Medical Bulletin of the U. S. Army Far East*, 1(7), 111-113.
- Roberts, T., Barratt, J., Harkness, J., Ellis, J., y Stark, D. (2011). Comparison of microscopy, culture, and conventional polymerase chain reaction for detection of *Blastocystis* sp. in clinical stool samples. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(2), 308-312.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0447>.

BIBLIOGRAFÍA

- Roberts, T., Stark, D., Harkness, J., y Ellis, J. (2014). Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut Pathogens*, 6, 17. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-6-17>.
- Rojas-Velázquez, L., Maloney, J. G., Molokin, A., Morán, P., Serrano-Vázquez, A., González, E., Pérez-Juárez, H., Ximénez, C., y Santin, M. (2019). Use of next-generation amplicon sequencing to study *Blastocystis* genetic diversity in a rural human population from Mexico. *Parasites & Vectors*, 12(1), 566. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3814-z>.
- Romaguera, D., Fernández-Barrés, S., Gracia-Lavedán, E., Vendrell, E., Azpiri, M., Ruiz-Moreno, E., Martín, V., Gómez-Acebo, I., Obón, M., Molinuevo, A., Fresán, U., Molina-Barceló, A., Olmedo-Requena, R., Tardón, A., Alguacil, J., Solans, M., Huerta, J. M., Ruiz-Dominguez, J. M., Aragonés, N., ... Amiano, P. (2021). Consumption of ultra-processed foods and drinks and colorectal, breast, and prostate cancer. *Clinical Nutrition*, 40(4), 1537-1545. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2021.02.033>.
- Romero-Hernández, B., Del Campo, R., y Cantón, R. (2013). *Streptococcus bovis*, situación taxonómica, relevancia clínica y sensibilidad antimicrobiana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31, 14-19. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(13\)70109-5](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(13)70109-5).
- Rossi, M., Jahanzaib Anwar, M., Usman, A., Keshavarzian, A., y Bishehsari, F. (2018). Colorectal cancer and alcohol consumption—Populations to molecules. *Cancers*, 10(2), 38. <https://doi.org/10.3390/cancers10020038>.
- Rubinstein, M. R., Wang, X., Liu, W., Hao, Y., Cai, G., y Han, Y. W. (2013). *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host & Microbe*, 14(2), 195-206. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.07.012>.
- Rudzińska, M., Kowalewska, B., Wąż, P., Sikorska, K., y Szostakowska, B. (2019). *Blastocystis* subtypes isolated from travelers and non-travelers from the north of Poland—A single

- center study. *Infection, Genetics and Evolution*, 75, 103926.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103926>.
- Rudzińska, M., y Sikorska, K. (2023). Epidemiology of *Blastocystis* infection: A review of data from poland in relation to other reports. *Pathogens*, 12(8), 1050.
<https://doi.org/10.3390/pathogens12081050>.
- Ryan, U. M., Feng, Y., Fayer, R., y Xiao, L. (2021). Taxonomy and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia* – a 50 year perspective (1971–2021). *International Journal for Parasitology*, 51(13-14), 1099-1119. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.08.007>.
- Sagnuankiat, S., Wanichsuwan, M., Bhunnachet, E., Jungarat, N., Panraksa, K., Komalamisra, C., Maipanich, W., Yoonuan, T., Pubampen, S., Adisakwattana, P., y Watthanakulpanich, D. (2016). Health status of immigrant children and environmental survey of child daycare centers in Samut Sakhon province, Thailand. *Journal of Immigrant and Minority Health*, 18(1), 21-27. <https://doi.org/10.1007/s10903-014-0146-0>.
- Şahin, T., Kiliç, Ö., Acar, A. G., y Severoğlu, Z. (2023). A review the role of *Streptococcus bovis* in colorectal cancer. *Arts & Humanities Open Access Journal*, 5(3), 165-173.
<https://doi.org/10.15406/ahoaj.2021.05.00203>.
- Saitou, N., y Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.
- Saji, A. M., y Gupta, V. (2025). Progressive multifocal leukoencephalopathy. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560584/>.
- Sanabria, M. C., Umaña, A., Serrano, M. L., Sánchez, M., Mesa, J., y Hernández, G. A. (2012). Vías de carcinogénesis colorrectal y sus implicaciones clínicas. *Revista Colombiana de Cancerología*, 16(3), 170-181.
- Sánchez, A., Munoz, M., Gómez, N., Tabares, J., Segura, L., Salazar, Á., Restrepo, C., Ruíz, M., Reyes, P., Qian, Y., Xiao, L., López, M. C., y Ramírez, J. D. (2017). Molecular epidemiology

- of *Giardia*, *Blastocystis* and *Cryptosporidium* among indigenous children from the Colombian Amazon Basin. *Frontiers in Microbiology*, 8, 248. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00248>.
- Sánchez, J., García-Garrote, F., Coira, A., López-Agreda, H., y Alonso-García, M. P. (2014). Colorectal neoplasia associated with *Streptococcus gallolyticus* subspecies *pasteurianus*. *The Lancet. Infectious Diseases*, 14(4), 272-273. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70031-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70031-3).
- Santin, M., Figueiredo, A., Molokin, A., George, N. S., Köster, P. C., Dashti, A., González-Barrio, D., Carmena, D., y Maloney, J. G. (2024). Division of *Blastocystis* ST10 into three new subtypes: ST42-ST44. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 71(1), e12998. <https://doi.org/10.1111/jeu.12998>.
- Santín, M., Gómez-Muñoz, M. T., Solano-Aguilar, G., y Fayer, R. (2011). Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitology Research*, 109(1), 205-212. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2244-9>.
- Santos, H. J., y Rivera, W. L. (2013). Comparison of direct fecal smear microscopy, culture, and polymerase chain reaction for the detection of *Blastocystis* sp. in human stool samples. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(10), 780-784. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60138-8](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60138-8).
- Santos, L. S., Branco, S. C., Silva, S. N., Azevedo, A. P., Gil, O. M., Manita, I., Ferreira, T. C., Limbert, E., Rueff, J., y Gaspar, J. F. (2012). Polymorphisms in base excision repair genes and thyroid cancer risk. *Oncology Reports*, 28(5), 1859-1868. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1975>.
- Scanlan, P. D., Stensvold, C. R., Rajilić-Stojanović, M., Heilig, H. G. H. J., De Vos, W. M., O'Toole, P. W., y Cotter, P. D. (2014). The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(1), 326-330. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12396>.

- Schmit, S. L., Edlund, C. K., Schumacher, F. R., Gong, J., Harrison, T. A., Huyghe, J. R., Qu, C., Melas, M., Van Den Berg, D. J., Wang, H., Tring, S., Plummer, S. J., Albanes, D., Alonso, M. H., Amos, C. I., Anton, K., Aragaki, A. K., Arndt, V., Barry, E. L., ... Gruber, S. B. (2019). Novel common genetic susceptibility loci for colorectal cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 111(2), 146-157. <https://doi.org/10.1093/jnci/djy099>.
- Schumacher, F. R., Schmit, S. L., Jiao, S., Edlund, C. K., Wang, H., Zhang, B., Hsu, L., Huang, S.-C., Fischer, C. P., Harju, J. F., Idos, G. E., Lejbkowitz, F., Manion, F. J., McDonnell, K., McNeil, C. E., Melas, M., Rennert, H. S., Shi, W., Thomas, D. C., ... Peters, U. (2015). Genome-wide association study of colorectal cancer identifies six new susceptibility loci. *Nature Communications*, 6(1), 7138. <https://doi.org/10.1038/ncomms8138>.
- Scicluna, S. M., Tawari, B., y Clark, C. G. (2006). DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist*, 157(1), 77-85. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2005.12.001>.
- Sears, C. L., Geis, A. L., y Housseau, F. (2014). *Bacteroides fragilis* subverts mucosal biology: From symbiont to colon carcinogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 124(10), 4166-4172. <https://doi.org/10.1172/JCI72334>.
- Secretaria Seccional de Salud y Protección Social de Antioquia. (2024). *Secretaria seccional de salud y protección social de Antioquia*. <https://www.dssa.gov.co/catalogo-de-informacion>.
- SEER Explorer Application. (s. f.). *Surveillance, Epidemiology, and End Results Program*. SEER National Cancer Institute. Recuperado 30 de octubre de 2024, a partir de <https://seer.cancer.gov>.
- Seguí, R., Muñoz-Antoli, C., Klisiowicz, D. R., Oishi, C. Y., Köster, P. C., de Lucio, A., Hernández-de-Mingo, M., Puente, P., Toledo, R., Esteban, J. G., y Carmena, D. (2018). Prevalence of intestinal parasites, with emphasis on the molecular epidemiology of *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp., in the Paranaguá Bay, Brazil: A community survey. *Parasites & Vectors*, 11(1), 490. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3054-7>.

BIBLIOGRAFÍA

- Seijas-Pereda, L., Köster, P. C., Dashti, A., Bailo, B., Guadano-Procesi, I., Rescalvo-Casas, C., Hernando-Gozaño, M., Cuadros-González, J., Carmena, D., y Pérez-Tanoira, R. (2025). Intragenomic diversity of the small subunit rDNA gene shows limited impact on the pathogenicity of *Blastocystis* infection in clinical patients. *Microbes and Infection*, 27(2), 105422. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2024.105422>.
- Šejnohová, A., Koutenská, M., Jirků, M., Brožová, K., Pavlíčková, Z., Kadlecová, O., Cinek, O., Maloney, J. G., Santín, M., Petrželková, K. J., y Jirků, K. (2024). A cross-sectional survey of *Blastocystis* sp. and *Dientamoeba fragilis* in non-human primates and their caregivers in Czech zoos. *One Health*, 19, 100862. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2024.100862>.
- Sekar, U., y Shanthi, M. (2013). *Blastocystis*: Consensus of treatment and controversies. *Tropical Parasitology*, 3(1), 35-39. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.113901>.
- Shah, S. C., y Itzkowitz, S. H. (2022). Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: Mechanisms and management. *Gastroenterology*, 162(3), 715-730.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.10.035>.
- Shanker, E. B., y Sun, J. (2023). *Salmonella* infection acts as an environmental risk factor for human colon cancer. *Cell Insight*, 2(5), 100125. <https://doi.org/10.1016/j.cellin.2023.100125>.
- Shavaleh, R., Kamandi, M., Feiz Disfani, H., Mansori, K., Naseri, S. N., Rahmani, K., y Ahmadi Kanrashi, F. (2020). Association between JC virus and colorectal cancer: Systematic review and meta-analysis. *Infectious Diseases*, 52(3), 152-160. <https://doi.org/10.1080/23744235.2019.1692145>.
- Sheng, W.-H., Chuang, Y.-C., Teng, L.-J., y Hsueh, P.-R. (2014). Bacteraemia due to *Streptococcus gallolyticus* subspecies *pasteurianus* is associated with digestive tract malignancies and resistance to macrolides and clindamycin. *The Journal of Infection*, 69(2), 145-153. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.03.010>.

- Shimpoh, T., Hirata, Y., Ihara, S., Suzuki, N., Kinoshita, H., Hayakawa, Y., Ota, Y., Narita, A., Yoshida, S., Yamada, A., y Koike, K. (2017). Prevalence of *pks*-positive *Escherichia coli* in Japanese patients with or without colorectal cancer. *Gut Pathogens*, 9, 35. <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0185-x>.
- Siegel, R. L., Jemal, A., y Ward, E. M. (2009). Increase in incidence of colorectal cancer among young men and women in the United States. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 18(6), 1695-1698. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-0186>.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fedewa, S. A., Ahnen, D. J., Meester, R. G. S., Barzi, A., y Jemal, A. (2017). Colorectal cancer statistics, 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(3), 177-193. <https://doi.org/10.3322/caac.21395>.
- Siegel, R. L., Torre, L. A., Soerjomataram, I., Hayes, R. B., Bray, F., Weber, T. K., y Jemal, A. (2019). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence in young adults. *Gut*, 68(12), 2179-2185. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319511>.
- Signat, B., Roques, C., Poulet, P., y Duffaut, D. (2011). *Fusobacterium nucleatum* in periodontal health and disease. *Current Issues in Molecular Biology*, 13(2), 25-36.
- Simanowski, U. A., Homann, N., Knühl, M., Arce, L., Waldherr, R., Conradt, C., Bosch, F. X., y Seitz, H. K. (2001). Increased rectal cell proliferation following alcohol abuse. *Gut*, 49(3), 418-422. <https://doi.org/10.1136/gut.49.3.418>.
- Singh, M., Suresh, K., Ho, L. C., Ng, G. C., y Yap, E. H. (1995). Elucidation of the life cycle of the intestinal protozoan *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research*, 81(5), 446-450. <https://doi.org/10.1007/BF00931510>.
- Sinicrope, F. A. (2018). Lynch syndrome—associated colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 379(8), 764-773. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1714533>.
- Sio, S. W. S., Puthia, M. K., Lee, A. S. Y., Lu, J., y Tan, K. (2006). Protease activity of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research*, 99(2), 126-130. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0131-1>.

BIBLIOGRAFÍA

- Slattery, M. L., Edwards, S. L., Ma, K.-N., Friedman, G. D., y Potter, J. D. (1997). Physical activity and colon cancer: A public health perspective. *Annals of Epidemiology*, 7(2), 137-145. [https://doi.org/10.1016/S1047-2797\(96\)00129-9](https://doi.org/10.1016/S1047-2797(96)00129-9).
- Slattery, M. L., Potter, J. D., Curtin, K., Edwards, S., Ma, K. N., Anderson, K., Schaffer, D., y Samowitz, W. S. (2001). Estrogens reduce and withdrawal of estrogens increase risk of microsatellite instability-positive colon cancer. *Cancer Research*, 61(1), 126-130.
- Song, M., Garrett, W. S., y Chan, A. T. (2015). Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. *Gastroenterology*, 148(6), 1244-1260.e16. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.12.035>.
- Souza, R. F., Wang, S., Thakar, M., Smolinski, K. N., Yin, J., Zou, T.-T., Kong, D., Abraham, J. M., Toretsky, J. A., y Meltzer, S. J. (1999). Expression of the wild-type insulin-like growth factor II receptor gene suppresses growth and causes death in colorectal carcinoma cells. *Oncogene*, 18(28), 4063-4068. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202768>.
- Stark, D., Beebe, N., Marriott, D., Ellis, J., y Harkness, J. (2005). Detection of *Dientamoeba fragilis* in fresh stool specimens using PCR. *International Journal for Parasitology*, 35(1), 57-62. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.09.003>.
- Steinmetz, K. A., y Potter, J. D. (1991). Vegetables, fruit, and cancer. II. Mechanisms. *Cancer Causes and Control*, 2(6), 427-442. <https://doi.org/10.1007/BF00054304>.
- Stensvold, C. R. (2013). Comparison of sequencing (barcode region) and sequence-tagged-site PCR for *Blastocystis* subtyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(1), 190-194. <https://doi.org/10.1128/JCM.02541-12>.
- Stensvold, C. R. (2025). *Blastocystis* in stool: Friend, foe or both? *Journal of Travel Medicine*, 32(2), taaf011. <https://doi.org/10.1093/jtm/taaf011>.
- Stensvold, C. R., Arendrup, M. C., Jespersgaard, C., Mølbak, K., y Nielsen, H. V. (2007a). Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: A comparative study.

- Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 59(3), 303-307.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.06.003>.
- Stensvold, C. R., Berg, R. P. K. D., Maloney, J. G., Molokin, A., y Santin, M. (2023). Molecular characterization of *Blastocystis* and *Entamoeba* of muskoxen and sheep in Greenland. *International Journal for Parasitology*, 53(11-12), 673-685.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2023.05.005>.
- Stensvold, C. R., Brillowska-Dabrowska, A., Nielsen, H. V., y Arendrup, M. C. (2006). Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. *Journal of Parasitology*, 92(5), 1081-1087. <https://doi.org/10.1645/GE-840R.1>.
- Stensvold, C. R., y Clark, C. G. (2020). Pre-empting pandora's box: *Blastocystis* subtypes revisited. *Trends in Parasitology*, 36(3), 229-232. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.12.009>.
- Stensvold, C. R., Lewis, H. C., Hammerum, A. M., Porsbo, L. J., Nielsen, S. S., Olsen, K. E. P., Arendrup, M. C., Nielsen, H. V., y Mølbak, K. (2009). *Blastocystis*: Unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite. *Epidemiology and Infection*, 137(11), 1655-1663. <https://doi.org/10.1017/S0950268809002672>.
- Stensvold, C. R., Smith, H. V., Nagel, R., Olsen, K. E. P., y Traub, R. J. (2010). Eradication of *Blastocystis* carriage with antimicrobials: Reality or delusion? *Journal of Clinical Gastroenterology*, 44(2), 85-90. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e3181bb86ba>.
- Stensvold, C. R., Sørland, B. A., Berg, R. P. K. D., Andersen, L. O., van der Giezen, M., Bowtell, J. L., El-Badry, A. A., Belkessa, S., Kurt, Ö., y Nielsen, H. V. (2022). Stool microbiota diversity analysis of *Blastocystis*-positive and *Blastocystis*-negative individuals. *Microorganisms*, 10(2), 326. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020326>.
- Stensvold, C. R., Suresh, G. K., Tan, K., Thompson, R. C. A., Traub, R. J., Viscogliosi, E., Yoshikawa, H., y Clark, C. G. (2007b). Terminology for *Blastocystis* subtypes – a consensus. *Trends in Parasitology*, 23(3), 93-96. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.01.004>.

BIBLIOGRAFÍA

- Stensvold, C. R., Tan, K., y Clark, C. G. (2020). *Blastocystis*. *Trends in Parasitology*, 36(3), 315-316.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.12.008>.
- Stenzel, D. J., y Boreham, P. F. (1996). *Blastocystis hominis* revisited. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(4), 563-584. <https://doi.org/10.1128/CMR.9.4.563>.
- Strakova, N., Korena, K., y Karpiskova, R. (2021). *Klebsiella pneumoniae* producing bacterial toxin colibactin as a risk of colorectal cancer development—A systematic review. *Toxicon*, 197, 126-135. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.04.007>.
- Strauss, J., Kaplan, G. G., Beck, P. L., Rioux, K., Panaccione, R., Devinney, R., Lynch, T., y Allen-Vercoe, E. (2011). Invasive potential of gut mucosa-derived *Fusobacterium nucleatum* positively correlates with IBD status of the host. *Inflammatory Bowel Diseases*, 17(9), 1971-1978. <https://doi.org/10.1002/ibd.21606>.
- Su, W., Chen, Yongyu, Cao, P., Chen, Yan, Guo, Y., Wang, S., y Dong, W. (2020). *Fusobacterium nucleatum* promotes the development of ulcerative colitis by inducing the autophagic cell death of intestinal epithelial. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 594806. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.594806>.
- Sulaiman, I. M., Fayer, R., Bern, C., Gilman, R. H., Trout, J. M., Schantz, P. M., Das, P., Lal, A. A., y Xiao, L. (2003). Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerging Infectious Diseases*, 9(11), 1444-1452.
<https://doi.org/10.3201/eid0911.030084>.
- Sulżyc-Bielicka, V., Kołodziejczyk, L., Adamska, M., Skotarczak, B., Jaczewska, S., Safranow, K., Bielicki, P., Kładny, J., y Bielicki, D. (2021). Colorectal cancer and *Blastocystis* sp. infection. *Parasites & Vectors*, 14(1), 200. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04681-x>.
- Sulżyc-Bielicka, V., Kołodziejczyk, L., Jaczewska, S., Bielicki, D., Kładny, J., y Safranow, K. (2012). Prevalence of *Cryptosporidium* sp. in patients with colorectal cancer. *Polish Journal of Surgery*, 84(7). <https://doi.org/10.2478/v10035-012-0058-4>.

- Sulżyc-Bielicka, V., Kołodziejczyk, L., Jaczewska, S., Bielicki, D., Safranow, K., Bielicki, P., Kładny, J., y Rogowski, W. (2018). Colorectal cancer and *Cryptosporidium* spp. Infection. *PLoS One*, 13(4), e0195834. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195834>.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., y Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- Svec, J., Onhajzer, J., y Korinek, V. (2024). Origin, development and therapy of colorectal cancer from the perspective of a biologist and an oncologist. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 204, 104544. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2024.104544>.
- Swidsinski, A., Dörffel, Y., Loening-Baucke, V., Theissig, F., Rückert, J. C., Ismail, M., Rau, W. A., Gaschler, D., Weizenegger, M., Kühn, S., Schilling, J., y Dörffel, W. V. (2011). Acute appendicitis is characterised by local invasion with *Fusobacterium nucleatum/necrophorum*. *Gut*, 60(1), 34-40. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.191320>.
- Tabl, H., Zidan, A., ElFeky, H., y Abd El-Fattah, G. (2019). Association between *Streptococcus gallolyticus* and colorectal cancer in Egyptian patients. *Egyptian Journal of Medical Microbiology*, 28(3), 85-93. <https://doi.org/10.21608/ejmm.2019.283032>.
- Taieb, F., Nougayrède, J.-P., Watrin, C., Samba-Louaka, A., y Oswald, E. (2006). *Escherichia coli* cyclomodulin CIF induces G₂ arrest of the host cell cycle without activation of the DNA-damage checkpoint-signalling pathway. *Cellular Microbiology*, 8(12), 1910-1921. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00757.x>.
- Takakura, W., Kudaravalli, P., Chatterjee, C., Pimentel, M., y Riddle, M. S. (2022). *Campylobacter* infection and the link with irritable bowel syndrome: On the pathway towards a causal association. *Pathogens and Disease*, 80(1), ftac003. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftac003>.

BIBLIOGRAFÍA

- Takamura, N., Kenzaka, T., Minami, K., y Matsumura, M. (2014). Infective endocarditis caused by *Streptococcus gallolyticus* subspecies *pasteurianus* and colon cancer. *BMJ Case Reports*, 2014, bcr2013203476. <https://doi.org/10.1136/bcr-2013-203476>.
- Tamura, K., Stecher, G., y Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Tan, H., y Zierdt, C. H. (1973). Ultrastructure of *Blastocystis hominis*. *Zeitschrift Für Parasitenkunde*, 42(4), 315-324. <https://doi.org/10.1007/BF00328892>.
- Tan, K. S. W. (2008). New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(4), 639-665. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-08>.
- Tan, K. S. W., Mirza, H., Teo, J. D. W., Wu, B., y Macary, P. A. (2010). Current views on the clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Current Infectious Disease Reports*, 12(1), 28-35. <https://doi.org/10.1007/s11908-009-0073-8>.
- Tan, K. S. W., Ng, G. C., Quek, E., Howe, J., Ramachandran, N. P., Yap, E., y Singh, M. (2000). *Blastocystis hominis*: A simplified, high-efficiency method for clonal growth on solid agar. *Experimental Parasitology*, 96(1), 9-15. <https://doi.org/10.1006/expr.2000.4544>.
- Tan, K. S. W., Singh, M., Thong, K., Ho, L. C., Moe, K.-T., Chen, X., Ng, G. C., y Yap, E. (1996). Clonal growth of *Blastocystis hominis* in soft agar with sodium thioglycollate. *Parasitology Research*, 82(8), 737-739. <https://doi.org/10.1007/s004360050194>.
- Tan, T., y Suresh, K. G. (2006). Predominance of amoeboid forms of *Blastocystis hominis* in isolates from symptomatic patients. *Parasitology Research*, 98(3), 189-193. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-0033-7>.
- Tanikawa, C., Kamatani, Y., Takahashi, A., Momozawa, Y., Leveque, K., Nagayama, S., Mimori, K., Mori, M., Ishii, H., Inazawa, J., Yasuda, J., Tsuboi, A., Shimizu, A., Sasaki, M., Yamaji, T., Sawada, N., Iwasaki, M., Tsugane, S., Naito, M., ... Matsuda, K. (2018). GWAS identifies

- two novel colorectal cancer loci at 16q24.1 and 20q13.12. *Carcinogenesis*, 39(5), 652-660. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy026>.
- Tapia, O., Roa S, J. C., Manterola D, C., y Bellolio J, E. (2010). Cáncer de colon y recto: Descripción morfológica y clínica de 322 casos. *International Journal of Morphology*, 28(2). <https://doi.org/10.4067/S0717-95022010000200010>.
- Tariq, H., Noreen, Z., Ahmad, A., Khan, L., Ali, M., Malik, M., Javed, A., Rasheed, F., Fatima, A., Kocagoz, T., Sezerman, U., y Bokhari, H. (2022). Colibactin possessing *E. coli* isolates in association with colorectal cancer and their genetic diversity among Pakistani population. *PLoS One*, 17(11), e0262662. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262662>.
- Taylor, D. P., Burt, R. W., Williams, M. S., Haug, P. J., y Cannon-Albright, L. A. (2010). Population-based family history-specific risks for colorectal cancer: A constellation approach. *Gastroenterology*, 138(3), 877-885. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.11.044>.
- Teh, W. K., Ding, Y., Gubellini, F., Filloux, A., Poyart, C., Givskov, M., y Dramsi, S. (2023). Characterization of Tele, a T7SS LXG effector exhibiting a conserved c-terminal glycine zipper motif required for toxicity. *Microbiology Spectrum*, 11(4), e0148123. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01481-23>.
- Termmathurapoj, S., Leelayoova, S., Aimpun, P., Thathaisong, U., Nimmanon, T., Taamasri, P., y Mungthin, M. (2004). The usefulness of short-term in vitro cultivation for the detection and molecular study of *Blastocystis hominis* in stool specimens. *Parasitology Research*, 93(6). <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1157-x>.
- Terry, P., Giovannucci, E., Michels, K. B., Bergkvist, L., Hansen, H., Holmberg, L., y Wolk, A. (2001). Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 93(7), 525-533. <https://doi.org/10.1093/jnci/93.7.525>.
- Thanikachalam, K., y Khan, G. (2019). Colorectal cancer and nutrition. *Nutrients*, 11(1), 164. <https://doi.org/10.3390/nu11010164>.

BIBLIOGRAFÍA

- The International Genome Sample Resource. (s. f.). *1000 Genomes. A deep catalog of human genetic variation*. Recuperado 17 de julio de 2025, a partir de <https://www.internationalgenome.org/>.
- Tiangtip, R., y Jongwutiwes, S. (2002). Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand. *Tropical Medicine & International Health*, 7(4), 357-364. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2002.00855.x>.
- Tilg, H., Adolph, T. E., Gerner, R. R., y Moschen, A. R. (2018). The intestinal microbiota in colorectal cancer. *Cancer Cell*, 33(6). <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.004>.
- Tito, R., Chaffron, S., Caenepeel, C., Lima-Mendez, G., Wang, J., Vieira-Silva, S., Falony, G., Hildebrand, F., Darzi, Y., Rymenans, L., Verspecht, C., Bork, P., Vermeire, S., Joossens, M., y Raes, J. (2019). Population-level analysis of *Blastocystis* subtype prevalence and variation in the human gut microbiota. *Gut*, 68(7), 1180-1189. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316106>.
- Tocci, S., Das, S., y Sayed, I. M. (2024). An update on *Blastocystis*: Possible mechanisms of *Blastocystis*-mediated colorectal cancer. *Microorganisms*, 12(9), 1924. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12091924>.
- Tóth, I., Héroult, F., Beutin, L., y Oswald, E. (2003). Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: Establishment of the existence of a new *cdt* variant (Type IV). *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), 4285-4291. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4285-4291.2003>.
- Toychiev, A., Abdujapparov, S., Imamov, A., Navruzov, B., Davis, N., Badalova, N., y Osipova, S. (2018). Intestinal helminths and protozoan infections in patients with colorectal cancer: Prevalence and possible association with cancer pathogenesis. *Parasitology Research*, 117(12), 3715-3723. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6070-9>.
- Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J. G., Baylin, S. B., y Issa, J. P. (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America*, 96(15), 8681-8686.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.15.8681>.
- Tsoi, K. K. F., Pau, C. Y. Y., Wu, W. K. K., Chan, F. K. L., Griffiths, S., y Sung, J. J. Y. (2009). Cigarette smoking and the risk of colorectal cancer: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 7(6), 682-688.e1-5.
<https://doi.org/10.1016/j.cgh.2009.02.016>.
- Valença Barbosa, C., de Jesus Batista, R., Pereira Igreja, R., d'Avila Levy, C. M., Werneck de Macedo, H., y Carneiro Santos, H. L. (2017). Distribution of *Blastocystis* subtypes isolated from humans from an urban community in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasites & Vectors*, 10(1), 518. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2458-0>.
- Valença-Barbosa, C., do Bomfim, T. C. B., Teixeira, B. R., Gentile, R., Neto, S. F. da C., Magalhães, B. S. N., Balthazar, D. de A., da Silva, F. A., Biot, R., d'Avila Levy, C. M., y Santos, H. L. C. (2019). Molecular epidemiology of *Blastocystis* isolated from animals in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One*, 14(1), e0210740.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210740>.
- Van Duijnhoven, F. J., Bueno-De-Mesquita, H. B., Ferrari, P., Jenab, M., Boshuizen, H. C., Ros, M. M., Casagrande, C., Tjønneland, A., Olsen, A., Overvad, K., Thorlacius-Ussing, O., Clavel-Chapelon, F., Boutron-Ruault, M.-C., Morois, S., Kaaks, R., Linseisen, J., Boeing, H., Nöthlings, U., Trichopoulou, A., ... Riboli, E. (2009). Fruit, vegetables, and colorectal cancer risk: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89(5), 1441-1452.
<https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.27120>.
- Vander Haar, E. L., So, J., Gyamfi-Bannerman, C., y Han, Y. W. (2018). *Fusobacterium nucleatum* and adverse pregnancy outcomes: Epidemiological and mechanistic evidence. *Anaerobe*, 50, 55-59. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.01.008>.

BIBLIOGRAFÍA

- Vassalos, C. M., Spanakos, G., Vassalou, E., Papadopoulou, C., y Vakalis, N. (2010). Differences in clinical significance and morphologic features of *Blastocystis* sp subtype 3. *American Journal of Clinical Pathology*, 133(2), 251-258. <https://doi.org/10.1309/AJCPDOWQSL6E8DMN>.
- Verla-Tebit, E., Lilla, C., Hoffmeister, M., Brenner, H., y Chang-Claude, J. (2006). Cigarette smoking and colorectal cancer risk in Germany: A population-based case-control study. *International Journal of Cancer*, 119(3), 630-635. <https://doi.org/10.1002/ijc.21875>.
- Verma, R., y Delfanian, K. (2013). *Blastocystis hominis* associated acute urticaria. *The American Journal of the Medical Sciences*, 346(1), 80-81. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e3182801478>.
- Verweij, J., Oostvogel, F., Brienens, E. A. T., Nang-Beifubah, A., Ziem, J., y Polderman, A. M. (2003a). Short communication: Prevalence of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Northern Ghana. *Tropical Medicine & International Health*, 8(12), 1153-1156. <https://doi.org/10.1046/j.1360-2276.2003.01145.x>.
- Verweij, J., Schinkel, J., Laeijendecker, D., van Rooyen, M. A. A., van Lieshout, L., y Polderman, A. M. (2003b). Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. *Molecular and Cellular Probes*, 17(5), 223-225. [https://doi.org/10.1016/S0890-8508\(03\)00057-4](https://doi.org/10.1016/S0890-8508(03)00057-4).
- Villa, C. (2011). *Implicaciones pronósticas de los polimorfismos relacionados con las dianas de microRNAs en el cáncer colorrectal avanzado* [Universidad de Córdoba]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=70000>.
- Villafañe Ferrer, L., y Pinilla Pérez, M. (2016). Intestinal parasites in children and soil from Turbaco, Bolívar and associated risk factors. *Revista de Salud Pública*, 18(1), 117-128. <https://doi.org/10.15446/rsap.v18n1.42471>.
- Villalba Caloca, J., y Martínez Heredero, R. (2004). Frecuencia del carcinoma broncopulmonar en pacientes fumadores y no fumadores diagnosticados en el instituto nacional de

- enfermedades respiratorias en el año 2001. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 17(1), 27-34.
- Villalobos, G., Orozco-Mosqueda, G. E., Lopez-Perez, M., Lopez-Escamilla, E., Córdoba-Aguilar, A., Rangel-Gamboa, L., Olivo-Diaz, A., Romero-Valdovinos, M., Maravilla, P., y Martinez-Hernandez, F. (2014). Suitability of internal transcribed spacers (ITS) as markers for the population genetic structure of *Blastocystis* spp. *Parasites & Vectors*, 7, 461. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0461-2>.
- Villamizar, X., Higuera, A., Herrera, G., Vasquez-A, L. R., Buitron, L., Muñoz, L. M., Gonzalez-C, F. E., Lopez, M. C., Giraldo, J. C., y Ramírez, J. D. (2019). Molecular and descriptive epidemiology of intestinal protozoan parasites of children and their pets in Cauca, Colombia: A cross-sectional study. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 190. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3810-0>.
- Villanueva-Lizama, L. E., Cruz-Coral, A., Teh-Poot, C., Cruz-Chan, J. V., y Mejia, R. (2025). Detection of parasite DNA in soil samples from rural Yucatan, Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 112(2), 304-306. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.23-0385>.
- Villar-Ortega, P., Expósito-Ruiz, M., Gutiérrez-Soto, M., Ruiz-Cabello Jiménez, M., Navarro-Marí, J. M., y Gutiérrez-Fernández, J. (2022). La asociación entre *Fusobacterium nucleatum* y el cáncer colorrectal: Una revisión sistemática y metaanálisis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 40(5), 224-234. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2021.01.005>.
- Vinay, D. S., Ryan, E. P., Pawelec, G., Talib, W. H., Stagg, J., Elkord, E., Lichtor, T., Decker, W. K., Whelan, R. L., Kumara, H. M. C. S., Signori, E., Honoki, K., Georgakilas, A. G., Amin, A., Helferich, W. G., Boosani, C. S., Guha, G., Ciriolo, M. R., Chen, S., ... Kwon, B. S. (2015). Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology*, 35 Suppl, S185-S198. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.004>.

BIBLIOGRAFÍA

- Vogelberg, C., Stensvold, C. R., Monecke, S., Ditzen, A., Stopsack, K., Heinrich-Gräfe, U., y Pöhlmann, C. (2010). *Blastocystis* sp. subtype 2 detection during recurrence of gastrointestinal and urticarial symptoms. *Parasitology International*, 59(3), 469-471. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.03.009>.
- von Holst, S., Picelli, S., Edler, D., Lenander, C., Dalén, J., Hjern, F., Lundqvist, N., Lindforss, U., Pählman, L., Smedh, K., Törnqvist, A., Holm, J., Janson, M., Andersson, M., Ekelund, S., Olsson, L., Ghazi, S., Papadogiannakis, N., Tenesa, A., ... Lindblom, A. (2010). Association studies on 11 published colorectal cancer risk loci. *British Journal of Cancer*, 103(4), 575-580. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605774>.
- Vuik, F. E., Nieuwenburg, S. A., Bardou, M., Lansdorp-Vogelaar, I., Dinis-Ribeiro, M., Bento, M. J., Zadnik, V., Pellisé, M., Esteban, L., Kaminski, M. F., Suchanek, S., Ngo, O., Májek, O., Leja, M., Kuipers, E. J., y Spaander, M. C. (2019). Increasing incidence of colorectal cancer in young adults in Europe over the last 25 years. *Gut*, 68(10), 1820-1826. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317592>.
- Wallbank, B. A., Pardy, R. D., Brodsky, I. E., Hunter, C. A., y Striepen, B. (2024). *Cryptosporidium* impacts epithelial turnover and is resistant to induced death of the host cell. *mBio*, 15(8), e0172024. <https://doi.org/10.1128/mbio.01720-24>.
- Wallis, Y. L., Morton, D. G., McKeown, C. M., y Macdonald, F. (1999). Molecular analysis of the APC gene in 205 families: Extended genotype-phenotype correlations in FAP and evidence for the role of APC amino acid changes in colorectal cancer predisposition. *Journal of Medical Genetics*, 36(1), 14-20.
- Wang, Q., Liu, X., Li, Y., Xin, L., Zhou, X., Yu, F., Zhao, A., y Qi, M. (2022). Genetic diversity of *Blastocystis* subtypes in the Alpine musk deer (*Moschus chrysogaster*) in Gansu province, northwestern China. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 69(4), e12910. <https://doi.org/10.1111/jeu.12910>.

- Wang, X., Jia, Y., Wen, L., Mu, W., Wu, X., Liu, T., Liu, X., Fang, J., Luan, Y., Chen, P., Gao, J., Nguyen, K.-A., Cui, J., Zeng, G., Lan, P., Chen, Q., Cheng, B., y Wang, Z. (2021). *Porphyromonas gingivalis* promotes colorectal carcinoma by activating the hematopoietic *NLRP3* inflammasome. *Cancer Research*, 81(10), 2745-2759. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-3827>.
- Wawrzyniak, I., Poirier, P., Viscogliosi, E., Dionigia, M., Texier, C., Delbac, F., y Alaoui, H. E. (2013). *Blastocystis*, an unrecognized parasite: An overview of pathogenesis and diagnosis. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 1(5), 167-178. <https://doi.org/10.1177/2049936113504754>.
- Webb, E. L., Rudd, M. F., Sellick, G. S., El Galta, R., Bethke, L., Wood, W., Fletcher, O., Penegar, S., Withey, L., Qureshi, M., Johnson, N., Tomlinson, I., Gray, R., Peto, J., y Houlston, R. S. (2006). Search for low penetrance alleles for colorectal cancer through a scan of 1467 non-synonymous SNPs in 2575 cases and 2707 controls with validation by kin-cohort analysis of 14 704 first-degree relatives. *Human Molecular Genetics*, 15(21), 3263-3271. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl401>.
- Wei, W., Li, Y., y Huang, T. (2023). Using machine learning methods to study colorectal cancer tumor micro-environment and its biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 11133. <https://doi.org/10.3390/ijms241311133>.
- Weiss, G. A., y Hennet, T. (2017). Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(16), 2959-2977. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2509-x>.
- Wen, Y., Ma, L., Liu, Y., Xiong, H., y Shi, D. (2025). Decoding the enigmatic role of T-cadherin in tumor angiogenesis. *Frontiers in Immunology*, 16, 1564130. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1564130>.

BIBLIOGRAFÍA

- Whelan, K., Bancel, A. S., Lindsay, J. O., y Chassaing, B. (2024). Ultra-processed foods and food additives in gut health and disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 21(6), 406-427. <https://doi.org/10.1038/s41575-024-00893-5>.
- White, A., Ironmonger, L., Steele, R. J. C., Ormiston-Smith, N., Crawford, C., y Seims, A. (2018). A review of sex-related differences in colorectal cancer incidence, screening uptake, routes to diagnosis, cancer stage and survival in the UK. *BMC Cancer*, 18(1), 906. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4786-7>.
- Wild, C. P., Weiderpass, E., y Stewart, B. W. (2020). *World cancer report: Cancer research for cancer prevention*. International Agency for Research on Cancer. <https://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-Cancer-Research-For-Cancer-Prevention-2020>.
- Wolf, A. M. D., Fontham, E. T. H., Church, T. R., Flowers, C. R., Guerra, C. E., LaMonte, S. J., Etzioni, R., McKenna, M. T., Oeffinger, K. C., Shih, Y. T., Walter, L. C., Andrews, K. S., Brawley, O. W., Brooks, D., Fedewa, S. A., Manassaram-Baptiste, D., Siegel, R. L., Wender, R. C., y Smith, R. A. (2018). Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(4), 250-281. <https://doi.org/10.3322/caac.21457>.
- Wolk, A. (2017). Potential health hazards of eating red meat. *Journal of Internal Medicine*, 281(2), 106-122. <https://doi.org/10.1111/joim.12543>.
- Wong, K. H. Y., Levy-Sakin, M., y Kwok, P.-Y. (2018). De novo human genome assemblies reveal spectrum of alternative haplotypes in diverse populations. *Nature Communications*, 9(1), 3040. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05513-w>.
- World Health Organization. (1999). *Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation*. WHO technical report series. <https://iris.who.int/handle/10665/42330>.

- World Health Organization. (2024). *Cancer—WHO*. Cancer. <https://www.who.int/health-topics/cancer>.
- Wu, Z., Mirza, H., Teo, J. D. W., y Tan, K. (2014). Strain-dependent induction of human enterocyte apoptosis by *Blastocystis* disrupts epithelial barrier and ZO-1 organization in a caspase 3- and 9-dependent manner. *BioMed Research International*, 2014, 209163. <https://doi.org/10.1155/2014/209163>.
- Xicola, R. M., y Llor, X. (2012). Defectos de la metilación del ADN en el cáncer colorrectal esporádico y hereditario. *Gastroenterología y Hepatología*, 35(7), 480-487. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2012.01.010>.
- Xie, Z., Ke, Y., Li, Z., Chen, J., Lei, D., Chen, G., Wang, C., Chen, Y., Ding, H., y Cheng, L. (2023). GRIK5 stimulates colon cancer growth and metastasis through cAMP/PKA/CADM3 signaling. *Cell Biology International*, 47(7), 1259-1266. <https://doi.org/10.1002/cbin.12022>.
- Xu, J.-L., y Guo, Y. (2020). FCGR1a serves as a novel biomarker and correlates with immune infiltration in four cancer types. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 581615. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.581615>.
- Yamagishi, H., Kuroda, H., Imai, Y., y Hiraishi, H. (2016). Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. *Chinese Journal of Cancer*, 35(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s40880-015-0066-y>.
- Yamaguchi, S., Ogata, H., Katsumata, D., Nakajima, M., Fujii, T., Tsutsumi, S., Asao, T., Sasaki, K., Kuwano, H., y Kato, H. (2014). MUTYH-associated colorectal cancer and adenomatous polyposis. *Surgery Today*, 44(4), 593-600. <https://doi.org/10.1007/s00595-013-0592-7>.
- Yamamoto, Y., Itoh, N., Sugiyama, T., y Kurai, H. (2020). Clinical features of *Clostridium* bacteremia in cancer patients: A case series review. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 26(1), 92-94. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2019.07.019>.

BIBLIOGRAFÍA

- Yang, X., Li, Yunhui, Wang, Y., Wang, J., Lai, P., Li, Yuan, Song, J., Qi, M., y Zhao, G. (2021). Molecular characterization of *Blastocystis* sp. in *Camelus bactrianus* in Northwestern China. *Animals*, 11(11), 3016. <https://doi.org/10.3390/ani11113016>.
- Yañez, C. M., Hernández, A. M., Sandoval, A. M., Domínguez, M. A. M., Muñiz, S. A. Z., y Gómez, J. O. G. (2021). Prevalence of *Blastocystis* and its association with *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio in clinically healthy and metabolically ill subjects. *BMC Microbiology*, 21(1), 339. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02402-z>.
- Yao, L., Tak, Y. G., Berman, B. P., y Farnham, P. J. (2014). Functional annotation of colon cancer risk SNPs. *Nature Communications*, 5, 5114. <https://doi.org/10.1038/ncomms6114>.
- Yashiro, M. (2014). Ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 20(44), 16389-16397. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i44.16389>.
- Yashiro, M., Hirakawa, K., y Boland, C. R. (2010). Mutations in TGFbeta-RII and BAXmediate tumor progression in the later stages of colorectal cancer with microsatellite instability. *BMC Cancer*, 10(1), 303. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-303>.
- Ye, M., Huang, T., Li, J., Zhou, C., Yang, P., Ni, C., y Chen, S. (2017). Role of CDH13 promoter methylation in the carcinogenesis, progression, and prognosis of colorectal cancer: A systematic meta-analysis under PRISMA guidelines. *Medicine*, 96(4), e5956. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000005956>.
- Yekani, M., Baghi, H. B., Vahed, S. Z., Ghanbari, H., Hosseinpour, R., Azargun, R., Azimi, S., y Memar, M. Y. (2021). Tightly controlled response to oxidative stress; An important factor in the tolerance of *Bacteroides fragilis*. *Research in Microbiology*, 172(2), 103798. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2021.103798>.
- Yu, M., Yao, Y., Xiao, H., Xie, M., Xiong, Y., Yang, S., Ni, Q., Zhang, M., y Xu, H. (2023). Extensive prevalence and significant genetic differentiation of *Blastocystis* in high- and low-altitude populations of wild rhesus macaques in China. *Parasites & Vectors*, 16(1), 107. <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05691-7>.

- Yu, X., Xu, H., Mu, X., Yuan, K., Li, Y., Xu, N., Li, Q., Zeng, W., Chen, S., y Hong, Y. (2024). A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium parvum*, *Blastocystis* spp. and *Enterocytozoon bieneusi* in goats. *Veterinary Sciences*, 11(9), 448. <https://doi.org/10.3390/vetsci11090448>.
- Zamani, R., Khademvatan, S., Tappeh, K. H., Diba, K., y Abasi, E. (2021). Comparison of diagnostic methods (wet mount, trichrome staining, formol-ether, PCR, and xenic in vitro culture) for the detection of *Blastocystis* in stool samples in Urmia educational hospitals, the Northwest of Iran. *Annals of Parasitology*, 67(4), 795-803. <https://doi.org/10.17420/ap6704.398>.
- Zapata-Valencia, J. I., Jurado-Orejuela, D. M., Flórez-Echeverry, O., Aristizábal-Giraldo, E. M., Gallego-Franco, J. L., Ramírez-Urbe, M. C. Y., Rentería-Molina, J., Sandoval-Villareal, A., Ulabarri-Valencia, Y., y Zambrano-Camelo, J. C. (2024). Prevalence of intestinal parasites in street dwellers attending a shelter in Cali, Colombia. *Biomedica*, 44(4), 524-536. <https://doi.org/10.7705/biomedica.7269>.
- Zarkin, B. A., Lillemoe, K. D., Cameron, J. L., Effron, P. N., Magnuson, T. H., y Pitt, H. A. (1990). The triad of *Streptococcus bovis* bacteremia, colonic pathology, and liver disease. *Annals of Surgery*, 211(6), 786-791; discussion 791-792. <https://doi.org/10.1097/00000658-199006000-00019>.
- Zechner, E. L., y Kienesberger, S. (2024). Microbiota-derived small molecule genotoxins: Host interactions and ecological impact in the gut ecosystem. *Gut Microbes*, 16(1), 2430423. <https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2430423>.
- Zhang, H., Dai, S.-D., Liu, S.-L., Zhang, F.-Y., y Dai, C.-L. (2015). Overexpression of δ -catenin is associated with a malignant phenotype and poor prognosis in colorectal cancer. *Molecular Medicine Reports*, 12(3), 4259-4265. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3918>.

BIBLIOGRAFÍA

- Zhang, N., Yu, X., Zhang, H., Cui, L., Li, Xiaoou, Zhang, Xiaowei, Gong, P., Li, J., Li, Z., Wang, X., Li, Xin, Li, T., Liu, X., Yu, Y., y Zhang, Xichen. (2020). Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium parvum* in gastrointestinal cancer patients. *Journal of Cancer*, 11(11), 3334-3339. <https://doi.org/10.7150/jca.42393>.
- Zhang, P., Schaefer-Klein, J., Cheville, J. C., Vasmatazis, G., y Kovtun, I. V. (2018). Frequently rearranged and overexpressed δ -catenin is responsible for low sensitivity of prostate cancer cells to androgen receptor and β -catenin antagonists. *Oncotarget*, 9(36), 24428-24442. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25319>.
- Zhang, Y., Xie, K., y Jiang, T. (2025). Roles and regulation of δ -catenin in tumorigenesis and neuronal diseases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 13, 1559059. <https://doi.org/10.3389/fcell.2025.1559059>.
- Zhao, J., Halfyard, B., Roebbothan, B., West, R., Buehler, S., Sun, Z., Squires, J., McLaughlin, J. R., Parfrey, P. S., y Wang, P. P. (2010). Tobacco smoking and colorectal cancer: A population-based case-control study in Newfoundland and Labrador. *Canadian Journal of Public Health*, 101(4), 281-289. <https://doi.org/10.1007/BF03405287>.
- Zhou, E., y Rifkin, S. (2021). Colorectal cancer and diet. *Gastroenterology Clinics of North America*, 50(1), 101-111. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2020.10.012>.
- Zhou, Z., Chen, J., Yao, H., y Hu, H. (2018). *Fusobacterium* and colorectal cancer. *Frontiers in Oncology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00371>.
- Zierdt, C. H., Rude, W. S., y Bull, B. S. (1967). Protozoan characteristics of *Blastocysts hominis*. *American Journal of Clinical Pathology*, 48(5), 495-501. <https://doi.org/10.1093/ajcp/48.5.495>.
- Zierdt, C. H., y Williams, R. L. (1974). *Blastocystis hominis*: Axenic cultivation. *Experimental Parasitology*, 36(2), 233-243. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(74\)90062-9](https://doi.org/10.1016/0014-4894(74)90062-9).

- Zou, S., Fang, L., y Lee, M.-H. (2018). Dysbiosis of gut microbiota in promoting the development of colorectal cancer. *Gastroenterology Report*, 6(1), 1-12. <https://doi.org/10.1093/gastro/gox031>.
- Zrelli, M., Ferjani, A., Noura, M., Hammami, S., Ghithia, N., Mouelhi, L., Debbèche, R., Raoult, D., y Boutiba Ben Boubaker, I. (2024). Diversity in gut microbiota among colorectal cancer patients: Findings from a case-control study conducted at a Tunisian University Hospital. *Discover Oncology*, 15(1), 402. <https://doi.org/10.1007/s12672-024-01232-5>.

ANEXOS

8 ANEXOS

Anexo I. Acta de aprobación del Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Médicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia

	ACTA APROBACIÓN PROYECTOS	FACULTAD DE MEDICINA
		CÓDIGO F-017-00
		VERSIÓN 01

Acta No. de aprobación **No. 006**

Nombre del proyecto: "Caracterización de Blastocystis sp. y su asociación con factores genéticos de susceptibilidad relacionados con el desarrollo de cáncer colorrectal".

Investigadora Principal: Sonia del Pilar Agudelo Lopez

Versión No 1

Enmienda revisada:NO

Fecha de aprobación: **13 de mayo del 2021**

El Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Médicas se constituyó mediante Resolución del Consejo de Facultad en reunión del 30 de mayo 2008, acta 177 y está regido por los principios éticos vigentes en la Resolución 003480 del 4 de octubre de 1993, la Declaración de Helsinki de 2008, la Asamblea Médica Mundial y el Departamento de Salud y Servicios Humanos del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica Resolución 2378 del 2008. En ellos se delinearán las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en seres humanos. El Comité de Bioética de la Facultad de Medicina está identificado ante el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH) con los códigos IORG0010323 y IRB00012257. El código de Garantía Federal del comité es: FWA00028864

El Instituto de Investigaciones Médicas certifica que:

1. Se revisaron los siguientes documentos en el presente proyecto:

- Resumen del proyecto (NO)
- Protocolo de investigación (SI)
- Formato de recolección de datos (SI)
- Formato de consentimiento informado (SI)
- Manual del investigador (NO)
- Evaluaciones de otros comités de ética (SI)

2. El proyecto fue aprobado por los siguientes miembros: Gabriel Jaime Montoya Montoya, Dra. Olga Lucia Giraldo Salazar,, Dra. Paula Andrea Velilla Hernández, Dr. Julio Cesar Bueno Sánchez y Juan Pablo Zapata Ospina. José Antonio García Pereañez y la Representante de la Comunidad Claudia Isabel Calderon.

3. El comité considera que el proyecto no contiene tensiones éticas que vulneren los derechos y el bienestar de los participantes. El riesgo involucrado en el estudio es:

- Sin riesgo ()
- Riesgo mínimo (x)
- Riesgo mayor que el mínimo ()

 UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA 1903	ACTA APROBACIÓN PROYECTOS	FACULTAD DE MEDICINA
		CÓDIGO F-017-00
		VERSIÓN 01

4. El comité considera que tanto la forma de obtención del consentimiento cuando aplica como las medidas tomadas para proteger el bienestar y los derechos de los participantes son adecuadas. No aplica
5. El comité se reserva el derecho de hacer nuevas revisiones del proyecto a solicitud de alguno o algunos de sus miembros o de las directivas institucionales con el fin de revisar lo relacionado con el bienestar y los derechos de los participantes en la investigación.
6. Se informará a la dirección del Instituto de Investigaciones sobre situaciones como: 1) efectos dañinos que se ocasionen a los participantes de esta investigación; 2) situaciones que signifiquen riesgos para los participantes o para personas independientes; 3) cambios ocurridos en el proyecto que fueran aprobados por el comité; y 4) situaciones distintas que de alguna manera puedan influenciar negativamente el buen desarrollo de la investigación.
7. La aprobación de este proyecto tendrá una duración de un año a partir de la fecha de aprobación; si se debe continuar por más tiempo, deberá someterse a aprobaciones anuales hasta la finalización del mismo. El investigador deberá anexar la documentación pertinente para cada nueva revisión del proyecto por parte del comité.

El investigador deberá informar al comité y al Instituto sobre los siguientes eventos:

- a. Cambios que se realicen en el proyecto, los cuales deberán ser aprobados en una nueva sesión del comité. b. Situaciones imprevistas que puedan implicar riesgos para los participantes. c. Efectos adversos que ocurran en los participantes, en las 24 horas siguientes a su ocurrencia. d. Alteraciones del rumbo de la investigación que alteren la adecuada proporción entre riesgos y beneficios. e. Las decisiones tomadas por comités de ética de otras instituciones que participen en el proyecto. f. Los informes parciales, finales o de suspensión temporal o permanente del proyecto, con las debidas razones que los justifiquen.

El investigador deberá presentar informes parciales del estudio cada (6) meses.

En este proyecto no se encontraron conflictos de interés por parte de los investigadores

Sugerencias y comentarios: Si el proyecto pasa a la convocatoria debe enviar informes cada seis (6) meses

Nota: Para efectos de la investigación sólo podrá utilizarse el Consentimiento Informado avalado, con el sello del Comité de Bioética.

Atentamente,


 GABRIEL JAIME MONTOYA MONTOYA
 Presidente
 Comité de Bioética

Anexo II. Acta de aprobación del Comité de Ética de la Clínica El Rosario



Medellín, 07 de Febrero de 2022

Doctor,
Miguel Angel Toro Londoño
Investigador Principal

Clínica El Rosario	
Nro. Radicado	2022-00670-T-CE
Asunto	Gestión de Correspondencia.
Radicado	2022-02-08-02:29



Referencia: "Caracterización de *Blastocystis* sp. y su asociación con factores genéticos de susceptibilidad relacionados con el desarrollo de cáncer colorrectal"

De acuerdo con la solicitud realizada al comité de ética en Investigación de la Clínica El Rosario de la Ciudad de Medellín, para que sea revisado y aprobado dicho proyecto de acuerdo a los elementos bioéticos aplicables, le informo que en reunión realizada el pasado 27 de Enero de 2022, se evaluó el protocolo versión 1, consentimiento informado versión 1 y formato de recolección de la información, una vez analizado con los lineamientos normativos de la Resoluciones 8430 de 1993 y 2378 de 2008, el comité ha decidido requerir el ajuste del consentimiento informado en lo que corresponde a la firma del investigador que solicita el consentimiento, así como anexar el procedimiento de descarte de las muestras en caso de no aceptar la donación de los remanentes de estas, posterior al análisis consentimiento informado versión 2 el comité ha decidido aprobar el proyecto para su realización en la Clínica El Rosario con sede en la ciudad de Medellín, bajo la responsabilidad del Miguel Angel Toro Londoño como investigador externo asociado a la Universidad de Antioquia, decisión que consta en acta N° 2021-28-10

En la sesión del 28 de Octubre de 2021 estuvieron presentes los siguientes miembros del Comité de Ética:

Asistente	Cargo
Stella Navarro	Médico experto en Bioética
Leon Dario Jimenez	Representante de los pacientes
Luz Daniela Martinez	Abogada- Miembro
Marcela María Mena Suarez	Química farmacéutica- Miembro
María Fernanda García Guarnizo	Química farmacéutica- Miembro
Yurley María Agudelo Agudelo	Enfermera- Miembro
René Estupiñán	Cuidados paliativos- Miembro
Adriana Helena Posada	Director médico- Tesoro- Presidente (E)
Luz Aída Mejía Cadavid	Enfermera Epidemióloga- Secretaria

El comité de ética en investigación de la Clínica El Rosario se rige por los lineamientos normativos y estándares éticos y científicos que han sido desarrollados y establecidos en guías internacionales, incluyendo la Declaración de Helsinki, las Guías Éticas Internacionales para investigación Biomédica que involucra a humanos, las del CIOMS, las de la OMS, las Guías de la Buena Práctica Clínica de la Conferencia Internacional de Armonización y posteriores actualizaciones y la Resolución 2378 de 2008



del Ministerio de la Protección Social de Colombia por la cual se adoptan las Buenas Prácticas Clínicas para las instituciones que conducen investigación con medicamentos en seres humanos.

De acuerdo a esta normatividad y a las guías operativas del comité, se realizará seguimiento al proceso de investigación aprobado el día 08/08/2022 a las 11 a.m.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los miembros que participaron de la evaluación de la presente notificación declararon no poseer conflictos de interés ni inhabilidades (Esta información se obtuvo de lo expresado por los miembros durante la sesión).

Atentamente,

Dra. Adriana Helena Posada
Presidente
Comité de Ética en Investigación
Clínica El Rosario

Anexo III. Consentimiento informado Clínica El Rosario



CÓDIGO:

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Caracterización de *Blastocystis* sp. y su asociación con factores genéticos de susceptibilidad relacionados con el desarrollo de cáncer colorrectal

Es probable que el presente formulario de consentimiento contenga palabras o conceptos que usted no entienda. Por favor, pídale al personal del estudio que le explique todas las palabras, conceptos o información que no comprenda con claridad. Igualmente, puede realizar todas las preguntas que considere sean necesarias para tomar la decisión, tómese el tiempo que usted considere para pensar y, si es del caso, consulte a familiares u otras personas que le ayuden a comprender mejor las razones para aceptar su inclusión en el estudio

En Colombia el cáncer es un problema de salud pública en aumento con grandes repercusiones psicoafectivas, sociales y económicas, imponiendo un reto para el sistema de salud. El cáncer colorrectal (CCR), también conocido como cáncer de colon y recto (intestino), se ha relacionado con factores de riesgo modificables como los hábitos alimentarios, la dieta rica en grasas, la diabetes (aumento de azúcar en la sangre), la obesidad (mucho peso), la falta de actividad física, bajo consumo de frutas y hortalizas, los hábitos del tabaquismo (fumar) y étílico (licores) y con factores no modificables como los genéticos (herencia), etnia (la raza) y enfermedades, entre ellas las causadas por microorganismos intestinales altamente frecuentes en nuestro medio como el parásito intestinal *Blastocystis* sp.

El Grupo de Parasitología de la Universidad de Antioquia, lo invita a participar en este estudio que busca identificar, en 408 pacientes, si existe relación entre la infección por el parásito *Blastocystis* sp., el cáncer colorrectal y los factores genéticos, lo cual servirá de insumo para ampliar el conocimiento acerca de estas enfermedades y buscar alternativas de tratamiento en un futuro cercano.

Es necesario que usted decida libre y voluntariamente participar en el estudio. Lea cuidadosamente este documento, comente al personal del estudio cualquier inquietud que tenga y tómese el tiempo necesario para decidir. En el caso que usted decida no participar, no afectará la atención de su salud, ni en la actualidad ni en el futuro.

Instituciones que respaldan el estudio: Grupo de Parasitología, Grupo de Bacterias y Cáncer, Grupo de Gastrohepatología y Grupo de Genética Molecular de la Universidad de Antioquia (UdeA), IPS Universitaria, Clínica Medellín S.A y Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III en Majadahonda -España.

Identificación de los responsables del estudio

- Miguel Ángel Toro Londoño. Correo electrónico: miguel.toro@udea.edu.co
- Alejandro Munera Duque. Correo electrónico: alejandro.munera@udea.edu.co
- Camilo Correa Cote. Correo electrónico: jccote@gmail.com
- Camilo Ricaurte Ciro. Correo electrónico: juan.ricaurte@sanvicentefundacion.com
- Diego Rojas Restrepo. Correo electrónico: srojas7@gmail.com
- Antonia Carmina Jiménez. Correo electrónico: dacarmena@isciii.es

De acuerdo a su historia clínica, su médico tratante le ha programado una cirugía de colon y/o recto o le ha enviado una colonoscopia, es decir, un examen que detecta cambios o anomalías en el intestino grueso (colon) y el recto, es por esto que lo invitamos a participar en este estudio el cual le tomará unos minutos de tiempo y si usted acepta participar debe:

1. Leer y firmar el presente documento que corresponde al consentimiento informado.
2. Responder a una encuesta clínico-epidemiológica, en la que se le harán unas preguntas generales sobre usted, sus hábitos alimentarios y los síntomas o enfermedades actuales, dicha encuesta no incluye preguntas sensibles relacionadas con su vida íntima.
3. Entregar la muestra de la cirugía o la colonoscopia; entregar al personal del estudio, la muestra de materia fecal (popó) en el recipiente que le será suministrado.
4. Permitir la toma de muestra de sangre por personal calificado, la cual se hará en la vena de su antebrazo. En total se recolectarán 2 tubos para un total de 10 mililitros (10mL).
5. Entregar una copia de la lectura de su colonoscopia o permitir que el médico nos la entregue, con el fin de poder relacionar los hallazgos encontrados en ésta con los obtenidos en el resto del estudio.

Acepto que les entreguen una copia de los resultados de la colonoscopia: SI ☐ NO ☐



CÓDIGO:

Beneficios

Después de aproximadamente 2 semanas de haber entregado el recipiente plástico con la materia fecal, se le entregará el resultado de laboratorio donde dice si tiene o no parásitos intestinales y un médico de nuestro Grupo de Parasitología, le realizará la fórmula médica y le suministrará el purgante (antiparasitario) en caso de requerirlo, para que elimine dichos parásitos. Otro beneficio muy importante para la comunidad en general es el de aportar al conocimiento del cáncer colorrectal y su posible asociación con factores genéticos y parásitos intestinales.

Riesgos

Los riesgos son mínimos respecto a la toma de las muestras y en general son muy bien aceptados en las personas, sin embargo, después de la toma de muestra de sangre y a pesar de ser realizada por personal calificado y con experiencia, en algunos casos, se puede generar una ligera incomodidad o hematoma (morado) en el lugar donde la aguja ha sido insertada, pero esto no implica ningún riesgo para su salud.

Respecto a los purgantes, en general son muy bien aceptados en las personas, sin embargo, en muy raras ocasiones podrían producir bajo apetito, ganas de vomitar, vómito, alergia, picazón en la piel o diarrea. En caso de que usted requiera el purgante, el médico analizará los riesgos y le explicará que hacer en caso de presentar alguna reacción.

Participación voluntaria

La participación en este estudio es de carácter voluntario, es decir no es obligatoria, no tiene ningún costo para usted ni tampoco usted recibirá dinero por participar y su negativa a ser incluido en el estudio, no afectará la atención de su salud, ni en la actualidad ni en el futuro.

Tenga en cuenta que en cualquier momento usted puede retirar su consentimiento informado si así lo desea, aun posterior a su firma sin tener que explicar los motivos y en caso de que aún se tenga(n) muestra(s) ésta(s) será(n) destruida(s) y los datos asociados a la(s) misma(s) serán retirados de nuestra base de datos.

Confidencialidad

Sus datos personales y los resultados obtenidos serán tratados y almacenados cumpliendo con la protección de datos establecida de acuerdo con la regulación vigente. La identificación de las muestras de materia fecal y sangre serán sometidas a un proceso de codificación, asignando un código de identificación en el que no aparece su nombre ni sus datos y que será el utilizado por el personal del estudio.

Los responsables del estudio se comprometen a:

- Identificar la muestra de materia fecal y de sangre solo con códigos, sin que aparezca el nombre de la persona.
- Suministrar de forma confidencial, la información para efectos de este estudio y guardarla en forma digital (base de datos), sin que aparezca el nombre de la persona.
- Asegurar que, en las publicaciones resultantes de este estudio, ningún dato pueda identificar a la persona.

En el caso que, como resultado del desarrollo o ejecución de este estudio, se obtengan datos o información de su interés, es importante que usted en este consentimiento autorice o no ser recontactado por el personal del estudio.

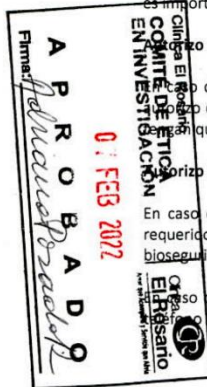
¿Autoriza ser recontactado por el personal del estudio: SI ☐ NO ☐

¿Autoriza que las muestras obtenidas sean de interés científico y haya quedado remanentes (muestra de sobra), para que sean entregadas al Biobanco UdeA-TdeA para que puedan ser utilizadas en otras investigaciones que no tengan que ver con estudios de clonación y que cuenten con una aprobación del comité de ética.

¿Autoriza la donación del remanente de muestras y los datos al Biobanco UdeA-TdeA: SI ☐ NO ☐

En caso contrario (no autoriza donar el remanente de muestra), una vez se hayan realizado los procedimientos requeridos para este estudio, se procederá al descarte (destrucción) completa de las muestras, según las normas de bioseguridad establecidas para dicho procedimiento en la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia.

En caso de dudas o tener algún problema con el estudio, puede llamar al profesor Miguel Ángel Toro Londoño, al teléfono (574)2196056 o escribirle al correo electrónico miguel.toro@udea.edu.co en la Facultad de Medicina de la



CÓDIGO:

Universidad de Antioquia. Si usted tiene preguntas sobre sus derechos como participante de este estudio puede contactar al presidente del comité de bioética de la Facultad de Medicina, el profesor Gabriel Jaime Montoya, al teléfono (574)2196065 o escribirle al correo electrónico bioeticamedicina@udea.edu.co. También se puede comunicar con el Comité de Ética e Investigación de la IPS Universitaria al correo investigacion@ipsuniversitaria.com.co o al Comité de Ética en Investigación de la Clínica Medellín adscrito al Centro Médico Imbanaco de Cali S.A., al teléfono (572) 3821000 Ext. 41275, correo electrónico etica.investigacion@imbanaco.com.co.

Con la firma de este consentimiento, manifiesto que el personal me ha explicado de qué se trata el estudio y de la muestra de materia fecal y de sangre que debo facilitar. Me han dicho y he entendido de manera clara que en cualquier momento puedo decidir si sigo o no en el estudio y que la participación no tiene ninguna influencia en la forma como debe atenderme el personal de salud cuando los necesite.

Manifiesto que me han dado la oportunidad de hacer preguntas sobre el estudio y estas han sido contestadas satisfactoriamente. He leído o me han leído y he comprendido perfectamente lo anterior y todos los espacios en blanco han sido completados antes de mi firma. Manifiesto que no he recibido presiones verbales, escritas y/o gestuales para participar en el estudio; que dicha decisión la tomo en pleno uso de mis facultades mentales, sin encontrarme bajo efectos de medicamentos, drogas o bebidas alcohólicas, de forma consciente, autónoma y libre. Manifiesto que me encuentro en capacidad de expresar mi consentimiento y que me han entregado una copia del presente documento.

Acepto: SI ☐ NO ☐

Yo, _____
con cédula de ciudadanía _____ de _____, otorgo el consentimiento para
participar en este estudio.

Para todos los fines se firma el _____ de _____ del 20____
a las _____:_____ horas.



Huella del adulto participante

Firma de la persona participante en el estudio

Cédula de ciudadanía del participante en el estudio

Teléfono de contacto del participante en el estudio

TESTIGO 1

Nombre: _____

Firma: _____

C.C.: _____

TESTIGO 2

Nombre: _____

Firma: _____

C.C.: _____

Nombre del personal de investigación: _____

Firma: _____

C.C.: _____



Anexo IV. Acta de aprobación del Comité de Ética de la Clínica Las Américas



Medellín, 28 de diciembre de 2021

Doctor
MIGUEL ANGEL TORO
Investigador Principal

Protocolo “**Caracterización de Blastocystis sp. y su asociación con factores genéticos de susceptibilidad relacionados con el desarrollo de cáncer colorrectal**”. Centro de investigación: Instituto de Cancerología

El Comité de Ética en Investigación en la reunión efectuada el día 20 de diciembre de 2021 y como consta en el Acta Nro.178, revisó su comunicación del 13 de diciembre de 2021 e informa que luego de revisar las respuestas y modificaciones al protocolo y al formato de consentimiento informado solicitadas por el CEI en la sesión del 29 de noviembre, APRUEBA la realización del estudio y la documentación enviada:

1. Protocolo del proyecto
2. Consentimiento informado
3. Hojas de vida con respectivos soportes, formatos de declaración de conflictos de interés, y acuerdo ético y de confidencialidad

NOMBRE	PROFESIÓN/ESPECIALIDAD	CARGO EN EL ESTUDIO
Miguel Ángel Toro Londoño	Microbiólogo y Bioanalista	Investigador principal
Sonia del Pilar Agudelo López	Bacteriología y Laboratorio Clínico	Coinvestigadora
Jorge Humberto Botero Garcés	Médico y Cirujano	Coinvestigador
Alonso Martínez	Biólogo	Coinvestigador
María Victoria Parra Marín	Bióloga	Coinvestigadora
Rodrigo Castaño Llano	Cirujano Gastrointestinal	Coinvestigador
Juan Camilo Correa Cote	Cirujano Oncólogo	Coinvestigador
Alejandro Múnera Duque	Cirujano Oncólogo	Coinvestigador
David Antonio Carmena Jiménez	Biólogo	Coinvestigador

Deseo aclarar que actualmente participo en un estudio de Investigación y dedicaré 10 horas semanales al desarrollo de este protocolo.

Clasificación del riesgo del estudio según la Resolución 8430 de 1993: Investigación riesgo mínimo.

Cra. 80 Diagonal 75 B N° 2 A-80 -140
Conmutador: (0574) 342 10 10
Medellín - Colombia - Sur América
Promotora Médica Las Américas
clinicalasamericas@lasamericas.com.co
lasamericas.tv / lasamericas.com.co

El Comité aclara que solo se podrán ingresar al estudio los pacientes que hayan autorizado en el formulario de consentimiento informado institucional el uso de los datos de la historia clínica para hacer investigaciones.

La vigencia de la aprobación de este estudio es por un año a partir de la expedición de la presente carta. Antes de cumplirse dicho período usted deberá enviar una comunicación informando sobre el progreso del estudio para que éste pueda ser re-aprobado.

Conflicto de intereses: ningún miembro del CEI refiere conflicto de interés con este proyecto.

Se verificó el quórum, constatando que se encontraban presentes seis (6) de los siete (7) miembros que integran el CEI:

Presidente: James Samir Díaz Betancur. Cardiólogo clínico, Magíster en epidemiología
 Secretaria y miembro de la comunidad: Sandra Osorio Giraldo. Psicóloga
 Miembro: Stella Navarro Estrada, Anestesióloga, Magíster en Bioética
 Miembro: María Victoria Rivera Gómez. Abogada
 Miembro de la comunidad: Jhon Mauricio Taborda Alzate. Doctor en filosofía
 Miembro: Fabio Ramírez Muñoz. Químico farmacéutico

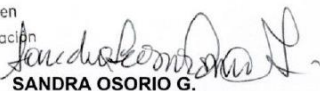
El Comité de Ética en Investigación cumple con las Normas de Buenas Prácticas Clínicas en todas sus actividades.

Atentamente,


JAMES SAMIR DÍAZ B.
 Presidente


 Clínica
 Las Américas

Comité de
 Ética en
 Investigación


SANDRA OSORIO G.
 Secretaria

Contáctenos a través del correo electrónico: cei@lasamericas.com.co
 Dirección: Diagonal 75B 2 A-120 Piso 2, oficina 208, Medellín
 Teléfono: 342 10 10 Ext. 2250

Elaboró: Adriana Patricia Sánchez T.
 Secretaria Operativa CEI

Anexo V. Consentimiento informado Clínica Las Américas



CÓDIGO:

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Caracterización de *Blastocystis* sp. y su asociación con factores genéticos de susceptibilidad relacionados con el desarrollo de cáncer colorrectal

Es probable que el presente formulario de consentimiento contenga palabras o conceptos que usted no entienda. Por favor, pídale al personal del estudio que le explique todas las palabras, conceptos o información que no comprenda con claridad. Igualmente, puede realizar todas las preguntas que considere sean necesarias para tomar la decisión, tómese el tiempo que usted considere para pensar y, si es del caso, consulte a familiares u otras personas que le ayuden a comprender mejor las razones para aceptar su inclusión en el estudio.

En Colombia el cáncer es un problema de salud pública en aumento con grandes repercusiones psicoafectivas, sociales y económicas, imponiendo un reto para el sistema de salud. El cáncer colorrectal (CCR), también conocido como cáncer de colon y recto (intestino), se ha relacionado con factores de riesgo modificables como los hábitos alimentarios, la dieta rica en grasas, la diabetes (aumento de azúcar en la sangre), la obesidad (mucho peso), la falta de actividad física, bajo consumo de frutas y hortalizas, los hábitos del tabaquismo (fumar) y etílico (licores) y con factores no modificables como los genéticos (herencia), etnia (la raza) y enfermedades, entre ellas las causadas por microorganismos intestinales altamente frecuentes en nuestro medio como el parásito intestinal *Blastocystis* sp.

El Grupo de Parasitología de la Universidad de Antioquia, lo invita a participar en este estudio que busca identificar, en 408 pacientes, si existe relación entre la infección por el parásito *Blastocystis* sp., el cáncer colorrectal y los factores genéticos, lo cual servirá de insumo para ampliar el conocimiento acerca de estas enfermedades y buscar alternativas de tratamiento en un futuro cercano.

Es necesario que usted decida libre y voluntariamente participar en el estudio. Lea cuidadosamente este documento, comente al personal del estudio cualquier inquietud que tenga y tómese el tiempo necesario para decidir. En el caso que usted decida no participar, no afectará la atención de su salud, ni en la actualidad ni en el futuro.

Instituciones que respaldan el estudio: Grupo de Parasitología, Grupo de Bacterias y Cáncer, Grupo de Gastrohepatología y Grupo de Genética Molecular de la Universidad de Antioquia (UdeA), IPS Universitaria, Clínica Medellín S.A. y Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III en Majadahonda -España.

Identificación de los responsables del estudio

Miguel Ángel Toro Londoño. Correo electrónico: miguel.toro@udea.edu.co
Alejandro Munera Duque. Correo electrónico: alejandromunera@udea.edu.co
Juan Camilo Correa Cote. Correo electrónico: jcamilo.correa@udea.edu.co
Rodrigo Castaño Llano. Correo electrónico: rodrigo.castano@udea.edu.co
David Antonio Carmena Jiménez. Correo electrónico: dacarmena@isciii.es

Debido a su historia clínica, su médico tratante le ha programado una cirugía de colon y/o recto o le ha enviado una colonoscopia, es decir, un examen que detecta cambios o anomalías en el intestino grueso (colon) y el recto, es por esto que lo invitamos a participar en este estudio el cual le tomará unos minutos de tiempo y si usted acepta participar debe:

1. Leer y firmar el presente documento que corresponde al consentimiento informado.
2. Responder a una encuesta clínico-epidemiológica, en la que se le harán unas preguntas generales sobre usted, sus hábitos alimentarios y los síntomas o enfermedades actuales, dicha encuesta no incluye preguntas sensibles relacionadas con su vida íntima.
3. El día de la cirugía o la colonoscopia, entregar al personal del estudio, la muestra de materia fecal (popó) en el recipiente que le será suministrado.
4. Permitir la toma de muestra de sangre por personal calificado, la cual se hará en la vena de su antebrazo. En total se recolectarán 2 tubos para un total de 10 mililitros (10mL).
5. Entregar una copia de la lectura de su colonoscopia o permitir que el médico nos la entregue, con el fin de poder relacionar los hallazgos encontrados en ésta con los obtenidos en el resto del estudio.

Acepto que les entreguen una copia de los resultados de la colonoscopia: SI ☐ NO ☐

CÓDIGO:

Beneficios

Después de aproximadamente 2 semanas de haber entregado el recipiente plástico con la materia fecal, se le entregará el resultado de laboratorio donde dice si tiene o no parásitos intestinales y un médico de nuestro Grupo de Parasitología, le realizará la fórmula médica y le suministrará el purgante (antiparasitario) en caso de requerirlo, para que elimine dichos parásitos. Otro beneficio muy importante para la comunidad en general es el de aportar al conocimiento del cáncer colorrectal y su posible asociación con factores genéticos y parásitos intestinales.

Riesgos

Los riesgos son mínimos respecto a la toma de las muestras y en general son muy bien aceptados en las personas, sin embargo, después de la toma de muestra de sangre ya pesar de ser realizada por personal calificado y con experiencia, en algunos casos, se puede generar una ligera incomodidad o hematoma (morado) en el lugar donde la aguja ha sido insertada, pero esto no implica ningún riesgo para su salud.

Respecto a los purgantes, en general son muy bien aceptados en las personas, sin embargo, en muy raras ocasiones podrían producir bajo apetito, ganas de vomitar, vómito, alergia, picazón en la piel o diarrea. En caso de que usted requiera el purgante, el médico analizará los riesgos y le explicará que hacer en caso de presentar alguna reacción.

Participación voluntaria

La participación en este estudio es de carácter voluntario, es decir no es obligatoria, no tiene ningún costo para usted ni tampoco usted recibirá dinero por participar y su negativa a ser incluido en el estudio, no afectará la atención de su salud, ni en la actualidad ni en el futuro.

Tenga en cuenta que en cualquier momento usted puede retirar su consentimiento informado si así lo desea, aun posterior a su firma sin tener que explicar los motivos y en caso de que aún se tenga(n) muestra(s) ésta(s) será(n) destruida(s) y los datos asociados a la(s) misma(s) serán retirados de nuestra base de datos.

Confidencialidad

Sus datos personales y los resultados obtenidos serán tratados y almacenados cumpliendo con la protección de datos establecida de acuerdo con la regulación vigente. La identificación de las muestras de materia fecal y sangre serán sometidas a un proceso de codificación, asignando un código de identificación en el que no aparece su nombre ni sus datos y que será el utilizado por el personal del estudio.

Los responsables del estudio se comprometen a:

- Identificar la muestra de materia fecal y de sangre solo con códigos, sin que aparezca el nombre de la persona.
- Suministrar de forma confidencial, la información para efectos de este estudio y guardarla en forma digital (base de datos), sin que aparezca el nombre de la persona.
- Asegurar que, en las publicaciones resultantes de este estudio, ningún dato pueda identificar a la persona.

En el caso que, como resultado del desarrollo o ejecución de este estudio, se obtengan datos o información de su interés, ya sea la presencia de un parásito intestinal que sea necesario tratárselo o algún dato genético que esté relacionado con la salud, es importante que usted en este consentimiento autorice o no ser recontactado por el personal del estudio y así poder darle las indicaciones pertinentes.

Autorizo ser recontactado por el personal del estudio: SI ☐ NO ☐

En caso de que las muestras obtenidas sean de interés científico y haya quedado remanentes (muestra de sobra), autorizo que sean entregadas al Biobanco UdeA-TdeA para que puedan ser utilizadas en otras investigaciones que no tengan que ver con estudios de clonación y que cuenten con una aprobación del comité de ética.

Autorizo la donación del remanente de muestras y los datos al Biobanco UdeA-TdeA: SI ☐ NO ☐

En caso de dudas o tener algún problema con el estudio, puede llamar al profesor Miguel Ángel Toro Londoño, al teléfono (574) 21960560 escribirle al correo electrónico miguel.toro@udea.edu.co en la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia.


 Comité de
Ética en
Investigación
20 DIC 2021


CÓDIGO:

Si usted tiene preguntas sobre sus derechos como participante de este estudio puede contactar al presidente del comité de bioética de la Facultad de Medicina, el profesor Gabriel Jaime Montoya, al teléfono (574)2196065 o escribirle al correo electrónico bioeticamedicina@udea.edu.co. También se puede comunicar con el Comité de Ética e Investigación de la IPS Universitaria al correo investigacion@ipsuniversitaria.com.co o al Comité de Ética en Investigación de la Clínica Medellín adscrito al Centro Médico Imbanaco de Cali S.A., al teléfono (572) 3821000 Ext. 41275, correo electrónico etica.investigacion@imbanaco.com.co, o al Comité de Ética en Investigación de Clínica Las Américas al teléfono (574) 3421010 ext. 2250 o al correo electrónico cei@lasamericas.com.co

Con la firma de este consentimiento, manifiesto que el personal me ha explicado de qué se trata el estudio y de la muestra de materia fecal y de sangre que debo facilitar. Me han dicho y he entendido de manera clara que en cualquier momento puedo decidir si sigo o no en el estudio y que la participación no tiene ninguna influencia en la forma como debe atenderme el personal de salud cuando los necesite.

Manifiesto que me han dado la oportunidad de hacer preguntas sobre el estudio y estas han sido contestadas satisfactoriamente. He leído o me han leído y he comprendido perfectamente lo anterior y todos los espacios en blanco han sido completados antes de mi firma. Manifiesto que no he recibido presiones verbales, escritas y/o gestuales para participar en el estudio; que dicha decisión la tomo en pleno uso de mis facultades mentales, sin encontrarme bajo efectos de medicamentos, drogas o bebidas alcohólicas, de forma consciente, autónoma y libre. Manifiesto que me encuentro en capacidad de expresar mi consentimiento y que me han entregado una copia del presente documento.

Acepto: SI ☐ NO ☐

Yo, _____
con cédula de ciudadanía _____ de _____, otorgo el consentimiento para
participar en este estudio.

Para todos los fines se firma el _____ de _____ del 20____
a las ____:____ horas.



Huella del adulto participante

Firma de la persona participante en el estudio

Cédula de ciudadanía del participante en el estudio

Teléfono de contacto del participante en el estudio

TESTIGO 1

Nombre: _____

Firma: _____

C.C.: _____

TESTIGO 2

Nombre: _____

Firma: _____

C.C.: _____

Nombre del personal del biobanco: _____

Firma: _____

C.C.: _____

Comité de
Ética en
Investigación
Clínica
Las Américas
de
Medellín

20 DIC 2021

Anexo VI. Acta de aprobación del Comité de Ética de la Clínica Medellín de Occidente



Santiago de Cali a 11 agosto 2021

Folio: CEI-000001

Protocolo: N/A

Fecha de sesión: 11 agosto 2021

Sesión: Ordinaria

Sonia del Pilar Agudelo López
Investigador principal
Clínica Medellín S.A.
Carrera 65B No. 30-95, El Poblado, Medellín, Antioquia, CP. 050021
P R E S E N T E

Asunto: **Revisión inicial de estudio clínico - ERPIC**

N/A

Caracterización de Blastocystis sp. y su asociación con factores genéticos de susceptibilidad relacionados con el desarrollo de cáncer colorrectal

Respetado investigador(a):

El **Comité de Ética en Investigación del Centro Médico Imbanaco de Cali S.A. (CEI)** garantiza que se rige por la normatividad local exigida para esta circunstancia Resolución No. 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, la Resolución No. 2378 de 2008 del Ministerio de la Protección Social de Colombia, la Guía de Buenas Prácticas Clínicas (ICH-GCP E6), así como su adherencia a los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en la Declaración de Helsinki de 1964, última revisión en Fortaleza - Brasil, octubre de 2013.

El CEI está conformado por 9 miembros con voz y voto. El número mínimo de miembros requeridos para componer el quórum es de 5 miembros con voz y voto, para la revisión y toma de decisiones respecto a una investigación.

Como se registra en el **Acta No. CEI -2 del 11 de agosto del 2021**, el Comité ha revisado y evaluado los documentos del estudio de la referencia allegados el 29 de julio de 2021, y teniendo en cuenta la información contenida en los mismos, considera que el balance de beneficio/riesgo para los participantes es favorable.

En razón a lo anterior, el Comité **APRUEBA** el estudio de la referencia y los documentos indicados, para su desarrollo en la Clínica Medellín S.A.

Acorde con la normatividad vigente, los lineamientos relacionados con la conducción de los estudios de investigación y en la búsqueda de la protección de los participantes de investigación, tenga en cuenta que usted adquiere una serie de compromisos y obligaciones con el Comité de Ética en Investigación, especificadas en el documento *Compromisos del Investigador Principal* que puede consultar en la plataforma *ekomite* en la sección Comités.

Se **APRUEBA** la siguiente documentación:

- 1.- Protocolo de investigación Versión 1.
- 2.- Formato de Consentimiento Informado versión 1.
- 3.- Material para el participante: Encuesta clínico-epidemiológica.
- 4.- Presupuesto del estudio.
- 5.- Hoja de Vida de Sonia del Pilar Agudelo López - Investigadora Principal.
- 6.- Hoja de Vida de Jorge Humberto Botero Garcés - Sub investigador.
- 7.- Hoja de Vida de Miguel Ángel Toro Londoño - Sub investigador.
- 8.- Hoja de Vida de Alonso Martínez - Sub investigador.
- 9.- Hoja de Vida de María Victoria Parra Marín - Sub investigadora.
- 10.- Hoja de Vida de David Antonio Carmena Jiménez - Sub investigador.
- 11.- Hoja de Vida de Alejandro Munera Duque - Sub investigador.
- 12.- Hoja de Vida de Juan Camilo Correa Cote - Sub investigador.

Siendo el quórum requerido para la validez de este Dictamen, cabe mencionar que los miembros que participaron en la revisión fueron:

Nombre	Profesión Disciplina	Puesto
Carlos José Bello Gándara	Químico Farmacéutico	Presidente
Ana Pastora Otero Motta	Bacterióloga, Doctora en Biología	Miembro activo
Harold Aristizábal Marín	Abogado	Miembro activo
Ingrid Rebolledo Briceño	Médica, Especialista en Auditoría en Salud	Miembro activo
Lina María Ibáñez Correa	Bióloga, Magíster en Epidemiología	Miembro activo
Yuri Vanessa Valencia Ospina	Enfermera, Magíster en Epidemiología	Miembro activo
Raquel Díaz Bustamante	Antropóloga, Magíster en Bioética	Miembro activo
María Mercedes Fajardo San Martín	Médica, Especialista en Anestesiología	Miembro activo
Claudia Bettín Diago	Psicóloga	Representante de la comunidad
José Octavio Lara Pachón	Licenciado en Filosofía	Representante de la comunidad

Registro de Comité: **IRB00008539**

Fecha de expedición: **24-jun-2021**

Vigencia: **3 años**

Así mismo, el **Comité de Ética en Investigación del Centro Médico Imbanaco de Cali S.A.** le recuerda el compromiso adquirido y la importancia de llevar la conducción del estudio clínico antes mencionado con total apego al mismo, las buenas prácticas clínicas y a las regulaciones vigentes.

Sin otro asunto en particular reciba un cordial saludo.

Atentamente



Carlos José Bello Gándara
Presidente del Comité de Ética en Investigación del
Centro Médico Imbanaco de Cali S.A.

Autorización

Carlos José Bello Gándara
13-ago-2021 14:57 Hrs

imbanaconotice.authorization.31.BoTF4w2Lp
oRIGraq130820211457carlollo

Clínica
Imbanaco
Grupo  quirónsalud

Anexo VII. Consentimiento informado Clínica Medellín de Occidente



CÓDIGO:

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Caracterización de *Blastocystis* sp. y su asociación con factores genéticos de susceptibilidad relacionados con el desarrollo de cáncer colorrectal

Es probable que el presente formulario de consentimiento contenga palabras o conceptos que usted no entienda. Por favor, pídale al personal del estudio que le explique todas las palabras, conceptos o información que no comprenda con claridad. Igualmente, puede realizar todas las preguntas que considere sean necesarias para tomar la decisión, tómese el tiempo que usted considere para pensar y, si es del caso, consulte a familiares u otras personas que le ayuden a comprender mejor las razones para aceptar su inclusión en el estudio.

En Colombia el cáncer es un problema de salud pública en aumento con grandes repercusiones psicoafectivas, sociales y económicas, imponiendo un reto para el sistema de salud. El cáncer colorrectal (CCR), también conocido como cáncer de colon y recto (intestino), se ha relacionado con factores de riesgo modificables como los hábitos alimentarios, la dieta rica en grasas, la diabetes (aumento de azúcar en la sangre), la obesidad (mucho peso), la falta de actividad física, bajo consumo de frutas y hortalizas, los hábitos del tabaquismo (fumar) y etílico (licores) y con factores no modificables como los genéticos (herencia), etnia (la raza) y enfermedades, entre ellas las causadas por microorganismos intestinales altamente frecuentes en nuestro medio como el parásito intestinal *Blastocystis* sp.

El Grupo de Parasitología de la Universidad de Antioquia, lo invita a participar en este estudio que busca identificar, en 408 pacientes, si existe relación entre la infección por el parásito *Blastocystis* sp., el cáncer colorrectal y los factores genéticos, lo cual servirá de insumo para ampliar el conocimiento acerca de estas enfermedades y buscar alternativas de tratamiento en un futuro cercano.

Es necesario que usted decida libre y voluntariamente participar en el estudio. Lea cuidadosamente este documento, comente al personal del estudio cualquier inquietud que tenga y tómese el tiempo necesario para decidir. En el caso que usted decida no participar, no afectará la atención de su salud, ni en la actualidad ni en el futuro.

Instituciones que respaldan el estudio: Grupo de Parasitología, Grupo de Bacterias y Cáncer, Grupo de Gastrohepatología y Grupo de Genética Molecular de la Universidad de Antioquia (UdeA), IPS Universitaria, Clínica Medellín S.A y Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III en Majadahonda -España.

Identificación de los responsables del estudio

- Miguel Angel Toro Londoño. Teléfono contacto: (57) 2196056, correo electrónico: miguel.toro@udea.edu.co
- Alejandro Munera Duque. Correo electrónico: alejandro.munera@udea.edu.co
- Juan Camilo Correa Cote. Correo electrónico: jcamilo.correa@udea.edu.co
- David Antonio Carmena Jiménez. Correo electrónico: dacarmena@isciii.es

Debido a su historia clínica, su médico tratante le ha programado una cirugía de colon y/o recto o le ha enviado una colonoscopia, es decir, un examen que detecta cambios o anomalías en el intestino grueso (colon) y el recto, es por esto que lo invitamos a participar en este estudio el cual le tomará unos minutos de tiempo y si usted acepta participar debe:

1. Leer y firmar el presente documento que corresponde al consentimiento informado.
2. Responder a una encuesta clínico-epidemiológica, en la que se le harán unas preguntas generales sobre usted, sus hábitos alimentarios y los síntomas o enfermedades actuales, dicha encuesta no incluye preguntas sensibles relacionadas con su vida íntima.
3. El día de la cirugía o la colonoscopia, entregar al personal del estudio, la muestra de materia fecal (popó) en el recipiente que le será suministrado.
4. Permitir la toma de muestra de sangre por personal calificado, la cual se hará en la vena de su antebrazo. En total se recolectarán 2 tubos para un total de 10 mililitros (10mL).
5. Entregar una copia de la lectura de su colonoscopia o permitir que el médico nos la entregue, con el fin de poder relacionar los hallazgos encontrados en ésta con los obtenidos en el resto del estudio.

Acepto que les entreguen una copia de los resultados de la colonoscopia: SI _____ NO _____



CÓDIGO:

Beneficios

Después de aproximadamente 2 semanas de haber entregado el recipiente plástico con la materia fecal, se le entregará el resultado de laboratorio donde dice si tiene o no parásitos intestinales y un médico de nuestro Grupo de Parasitología, le realizará la fórmula médica y le suministrará el purgante (antiparasitario) en caso de requerirlo, para que elimine dichos parásitos. Otro beneficio muy importante para la comunidad en general es el de aportar al conocimiento del cáncer colorrectal y su posible asociación con factores genéticos y parásitos intestinales.

Riesgos

Los riesgos son mínimos respecto a la toma de las muestras y en general son muy bien aceptados en las personas, sin embargo, después de la toma de muestra de sangre y a pesar de ser realizada por personal calificado y con experiencia, en algunos casos, se puede generar una ligera incomodidad o hematoma (morado) en el lugar donde la aguja ha sido insertada, pero esto no implica ningún riesgo para su salud.

Respecto a los purgantes, en general son muy bien aceptados en las personas, sin embargo, en muy raras ocasiones podrían producir bajo apetito, ganas de vomitar, vómito, alergia, picazón en la piel o diarrea. En caso de que usted requiera el purgante, el médico analizará los riesgos y le explicará que hacer en caso de presentar alguna reacción.

Participación voluntaria

La participación en este estudio es de carácter voluntario, es decir no es obligatoria, no tiene ningún costo para usted ni tampoco usted recibirá dinero por participar y su negativa a ser incluido en el estudio, no afectará la atención de su salud, ni en la actualidad ni en el futuro.

Tenga en cuenta que en cualquier momento usted puede retirar su consentimiento informado si así lo desea, aun posterior a su firma sin tener que explicar los motivos y en caso de que aún se tenga(n) muestra(s) ésta(s) será(n) destruida(s) y los datos asociados a la(s) misma(s) serán retirados de nuestra base de datos.

Confidencialidad

Sus datos personales y los resultados obtenidos serán tratados y almacenados cumpliendo con la protección de datos establecida de acuerdo con la regulación vigente. La identificación de las muestras de materia fecal y sangre serán sometidas a un proceso de codificación, asignando un código de identificación en el que no aparece su nombre ni sus datos y que será el utilizado por el personal del estudio.

Los responsables del estudio se comprometen a:

- Identificar la muestra de materia fecal y de sangre solo con códigos, sin que aparezca el nombre de la persona.
- Suministrar de forma confidencial, la información para efectos de este estudio y guardarla en forma digital (base de datos), sin que aparezca el nombre de la persona.
- Asegurar que, en las publicaciones resultantes de este estudio, ningún dato pueda identificar a la persona.

En el caso que, como resultado del desarrollo o ejecución de este estudio, se obtengan datos o información de su interés, es importante que usted en este consentimiento autorice o no ser recontactado por el personal del estudio.

Autorizo ser recontactado por el personal del estudio: SI _____ NO _____

En caso de que las muestras obtenidas sean de interés científico y haya quedado remanentes (muestra de sobra), autorizo que sean entregadas al Biobanco UdeA-TdeA para que puedan ser utilizada en otras investigaciones que no tengan que ver con estudios de clonación y que cuenten con una aprobación del comité de ética.

Autorizo la donación del remanente de muestras y los datos al Biobanco UdeA-TdeA: SI _____ NO _____

En caso de dudas o tener algún problema con el estudio, puede llamar al profesor Miguel Angel Toro Londoño, al teléfono (574)2196056 o escribirle al correo electrónico miguel.toro@udea.edu.co en la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia.



CÓDIGO:

Si usted tiene preguntas sobre sus derechos como participante de este estudio puede contactar al presidente del comité de bioética de la Facultad de Medicina, el profesor Gabriel Jaime Montoya, al teléfono (574)2196065 o escribirle al correo electrónico bioeticamedicina@udea.edu.co. También se puede comunicar con el Comité de Ética e Investigación de la IPS Universitaria al correo investigacion@ipsuniversitaria.com.co o al Comité de Ética en Investigación de la Clínica Medellín adscrito al Centro Médico Imbanaco de Cali S.A., al teléfono (572) 3821000 Ext. 41275, correo electrónico etica.investigacion@imbanaco.com.co.

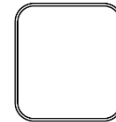
Con la firma de este consentimiento, manifiesto que el personal me ha explicado de qué se trata el estudio y de la muestra de materia fecal y de sangre que debo facilitar. Me han dicho y he entendido de manera clara que en cualquier momento puedo decidir si sigo o no en el estudio y que la participación no tiene ninguna influencia en la forma como debe atenderme el personal de salud cuando los necesite.

Manifiesto que me han dado la oportunidad de hacer preguntas sobre el estudio y estas han sido contestadas satisfactoriamente. He leído o me han leído y he comprendido perfectamente lo anterior y todos los espacios en blanco han sido completados antes de mi firma. Manifiesto que no he recibido presiones verbales, escritas y/o gestuales para participar en el estudio; que dicha decisión la tomo en pleno uso de mis facultades mentales, sin encontrarme bajo efectos de medicamentos, drogas o bebidas alcohólicas, de forma consciente, autónoma y libre. Manifiesto que me encuentro en capacidad de expresar mi consentimiento y que me han entregado una copia del presente documento.

Acepto: SI _____ NO _____

Yo, _____
con cédula de ciudadanía _____ de _____, otorgo el consentimiento para participar en este estudio.

Para todos los fines se firma el _____ de _____ del 20____
a las ____:____ horas.



Huella del adulto participante

Firma de la persona participante en el estudio

Cédula de ciudadanía del participante en el estudio

Teléfono de contacto del participante en el estudio

TESTIGO 1

Nombre: _____

Firma: _____

C.C: _____

TESTIGO 2

Nombre: _____

Firma: _____

C.C: _____

Nombre del personal del biobanco: _____

Firma: _____

C.C: _____



Anexo VIII. Acta de aprobación del Comité de Ética del Hospital Alma Mater

 CONCEPTO COMITÉ TÉCNICO DE INVESTIGACIÓN		Página: 1 de 2 Código: FR-DV-3329 Versión: 05 Fecha de aprobación: 22/05/2018	
1. Fecha de solicitud:	16 ABR 2021	Código:	IN32-2021
2. Fecha de revisión del Comité:	08 JUN 2021	Nº de acta del Comité:	166
3. Concepto del Comité ☒ APROBADO ☐ REQUIERE APROBACION POR EL COMITÉ DE ETICA ☐ RECOMENDACIONES PARA APROBACIÓN ☐ NO APROBADO			
4. Datos General del Proyecto de investigación Título: Caracterización de <i>Blastocystis</i> sp. y su asociación con factores genéticos de susceptibilidad relacionados con el desarrollo de cáncer colorrectal. Investigador Principal: Sonia del Pilar Agudelo López Co-investigador: Carolina Hernández Castro Correo electrónico: sonia.agudelo@udea.edu.co Correo electrónico: carolina.hernandez1@udea.edu.co Líneas de investigación de la IPS UNIVERSITARIA ☒ Investigación clínica ☐ Gestión en Salud ☐ Educación en Salud			
5. Recomendaciones El Comité reconoce la pertinencia de la propuesta de investigación, y se aprueba para su desarrollo. Igualmente, se hacen las siguientes sugerencias: • Se recomienda agregar la cartilla como componente formativo y de beneficio para el participante en el consentimiento informado. • En el consentimiento informado, se sugiere agregar nombre, firma y número de cédula de los testigos. También, sería importante incluir un apartado para autorizar el guardado de muestra donde se aclare que podría ser utilizado en otro tipo de investigación. • Se debe asegurar que quienes tomen el consentimiento informado no sean los médicos tratantes y que no se realice en el mismo día de la intervención (cirugía o colonoscopia), sino en un tiempo anterior a la misma, que podría ser en la consulta pre-anestésica. • Se debe buscar una estrategia para informar los resultados al médico tratante de los pacientes. Es decir, si encuentran la infección por <i>Blastocystis</i> sp. o identifican células tumorales en la muestra que se procese en su laboratorio, no es necesario indicarlo al paciente porque no están haciendo una intervención adicional al manejo usual, pero sí al tratante. Se debe indicar en el acta de inicio como un compromiso con la IPS Universitaria.			
6. Observaciones • Una vez aprobada la realización de la investigación en la "IPS UNIVERSITARIA" se debe diligenciar completamente el Formato de Acta de Inicio con sus respectivas firmas en un plazo no mayor a 30 días calendario. • Los investigadores externos deben realizar la inducción general de la "IPS UNIVERSITARIA", la cual se encuentra disponible en la plataforma virtual http://200.13.243.186:8085/moodle/. • A los investigadores externos y que deban ingresar a la "IPS UNIVERSITARIA" se les entregará			

Calle 69 No.51C-24 PBX: 444 70 85 Ext 32109-32246 Página Web <http://www.ipsuniversitaria.com.co> Medellín – Colombia

Le informamos que la "IPS UNIVERSITARIA" obtiene sus datos de conformidad con las POLÍTICAS DE TRATAMIENTO Y PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES "IPS UNIVERSITARIA", las cuales se encuentran acordes con la Ley 1581 de 2012 y del Decreto 1377 de 2013, pueden ser consultadas en la página web www.ipsuniversitaria.com.co

una escarapela que los identificará como investigadores en la Institución, ésta la deberán portar en todo momento dentro de la institución y deberá ser devuelta en el momento de terminar la recolección de los datos.

- En todos los casos se debe garantizar la seguridad del paciente y la confidencialidad de la información.
- En caso de requerirse se debe obtener consentimiento informado a pacientes y/o al representante legal de éstos, de acuerdo a lo establecido en el procedimiento para la obtención del consentimiento informado de pacientes-sujetos que participan en investigación.
- La aplicación de instrumentos propios de la investigación o la toma de muestras a pacientes en la "IPS UNIVERSITARIA", no debe afectar el normal desarrollo del proceso de prestación del servicio.
- El área coordinadora asignada de la "IPS UNIVERSITARIA", suministrará la información necesaria para el desarrollo de la investigación.
- Una vez finalizada la investigación se deberán socializar los resultados obtenidos en el área de la "IPS UNIVERSITARIA" en la que se ejecutó con la participación del comité de investigación, y hacer entrega del Formato de asistencia de la socialización con el acta de finalización de la investigación.
- Los resultados de la investigación, el acta de finalización y el listado de asistencia a la socialización, deben ser enviados al correo investigación@ipsuniversitaria.com.co
- Los artículos a publicar se deben presentar previamente a la "IPS UNIVERSITARIA" para obtener la aprobación de los respectivos comités. Posterior a la publicación se debe enviar copia del artículo.



Carlos Andrés Tobón Quintero
Responsable del Comité

Calle 69 No.51C-24 PBX: 444 70 85 Ext 32109-32246 Página Web <http://www.ipsuniversitaria.com.co> Medellín – Colombia

Le informamos que la "IPS UNIVERSITARIA" obtiene sus datos de conformidad con las POLÍTICAS DE TRATAMIENTO Y PROTECCION DE DATOS PERSONALES "IPS UNIVERSITARIA", las cuales se encuentran acordes con la Ley 1581 de 2012 y del Decreto 1377 de 2013, pueden ser consultadas en la página web www.ipsuniversitaria.com.co

Anexo IX. Consentimiento informado Hospital Alma Mater



UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA
1803

CÓDIGO:

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Caracterización de *Blastocystis* sp. y su asociación con factores genéticos de susceptibilidad relacionados con el desarrollo de cáncer colorrectal

Es probable que el presente formulario de consentimiento contenga palabras o conceptos que usted no entienda. Por favor, pídale al personal del estudio que le explique todas las palabras, conceptos o información que no comprenda con claridad. Igualmente, puede realizar todas las preguntas que considere sean necesarias para tomar la decisión, tómese el tiempo que usted considere para pensar y, si es del caso, consulte a familiares u otras personas que le ayuden a comprender mejor las razones para aceptar su inclusión en el estudio

En Colombia el cáncer es un problema de salud pública en aumento con grandes efectos sobre las emociones y sentimientos personales y sobre aspectos sociales y económicos, imponiendo un reto importante para el sistema de salud. El cáncer colorrectal (CCR), también conocido como cáncer de colon y recto (intestino), se ha relacionado con factores de riesgo que se pueden modificar como los hábitos alimentarios, la dieta rica en grasas, la diabetes (aumento de azúcar en la sangre), la obesidad (mucho peso), la falta de actividad física, bajo consumo de frutas y hortalizas, los hábitos del tabaquismo (fumar) y etílico (licores) y con factores que no se pueden modificar como los genéticos (herencia), etnia (la raza) y enfermedades, entre ellas las causadas por microorganismos intestinales altamente frecuentes en nuestro medio como el parásito intestinal *Blastocystis* sp.

El Grupo de Parasitología de la Universidad de Antioquia, lo invita a participar en este estudio que busca identificar, en 408 pacientes, si existe relación entre la infección por el parásito *Blastocystis* sp., el cáncer colorrectal y los factores genéticos, lo cual servirá de insumo para ampliar el conocimiento acerca de estas enfermedades y buscar alternativas de tratamiento en un futuro cercano.

Es necesario que usted decida libre y voluntariamente participar en el estudio. Lea cuidadosamente este documento, comente al personal del estudio cualquier inquietud que tenga y tómese el tiempo necesario para decidir. En el caso que usted decida no participar, no afectará la atención de su salud, ni en la actualidad ni en el futuro.

Instituciones que respaldan el estudio: Grupo de Parasitología, Grupo de Bacterias y Cáncer, Grupo de Gastrohepatología y Grupo de Genética Molecular de la Universidad de Antioquia (UdeA). Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) en Majadahonda-España y la IPS Universitaria.

Identificación de los responsables del estudio

- Sonia del Pilar Agudelo López. Teléfono contacto: 2196056, correo electrónico: sonia.agudelo@udea.edu.co
- David Antonio Carmena Jiménez. Teléfono de contacto: (34)918223641, correo electrónico: dacarmena@isciii.es
- Alejandro Munera Duque. alejandromunera@hotmail.com.

Debido a su historia clínica, su médico tratante le ha programado una cirugía de colon y/o recto o le ha enviado a una colonoscopia, es decir, un examen que detecta cambios o anomalías en el intestino grueso (colon) y el recto, es por esto que lo invitamos a participar en este estudio el cual le tomará unos pocos minutos de tiempo, y si usted acepta participar debe:

1. Leer y firmar el presente documento que corresponde al consentimiento informado.
2. Responder a una encuesta clínico-epidemiológica, en la que se le harán unas preguntas generales sobre usted, sus hábitos alimentarios y los síntomas o enfermedades actuales, dicha encuesta no incluye preguntas sensibles relacionadas con su vida íntima.
3. El día de la cirugía o la colonoscopia, entregar al personal del estudio, la muestra de materia fecal (popó) en el recipiente que le será suministrado.
4. Permitir la toma de muestra de sangre por personal calificado, la cual se hará en la vena de su antebrazo. En total se recolectarán 2 tubos para un total de 10 mililitros (10mL).

COMITÉ DE ÉTICA
E INVESTIGACIÓN
IPS UNIVERSITARIA
APROBADO

(Firma)

5. Entregar una copia de la lectura de su colonoscopia o permitir que el médico nos la entregue, con el fin de poder relacionar los hallazgos encontrados en ésta con los obtenidos en el resto del estudio.

Acepto que les entreguen una copia de los resultados de la colonoscopia: SI ____ NO ____

Beneficios

Después de aproximadamente 2 semanas de haber entregado el recipiente plástico con la materia fecal, se le entregará el resultado de laboratorio donde dice si tiene o no parásitos intestinales y un médico, del equipo de investigación, le realizará la fórmula médica y le suministrará el purgante (antiparasitario) en caso de requerirlo, para que elimine dichos parásitos. Otro beneficio muy importante para la comunidad en general es el de aportar al conocimiento del cáncer colorrectal y su posible asociación con factores genéticos y parásitos intestinales.

Riesgos

Los riesgos son mínimos respecto a la toma de las muestras y en general son muy bien aceptados en las personas, sin embargo, después de la toma de muestra de sangre y a pesar de ser realizada por personal calificado y con experiencia, en algunos casos, se puede generar una ligera incomodidad o hematoma (morado) en el lugar donde la aguja ha sido insertada, pero esto no implica ningún riesgo para su salud.

Respecto a los purgantes, en general son muy bien aceptados en las personas, sin embargo, en muy raras ocasiones podrían producir bajo apetito, ganas de vomitar, vómito, alergia, picazón en la piel o diarrea. En caso de que usted requiera el purgante, el médico analizará los riesgos y le explicará que hacer en caso de presentar alguna reacción.

Participación voluntaria

La participación en este estudio es de carácter voluntario, es decir no es obligatoria, no tiene ningún costo para usted ni tampoco usted recibirá dinero por participar y su negativa a ser incluido en el estudio, no afectará la atención de su salud, ni en la actualidad ni en el futuro.

Tenga en cuenta que en cualquier momento usted puede retirar su consentimiento informado si así lo desea, aun posterior a su firma sin tener que explicar los motivos y en caso de que aún se tenga(n) muestra(s) ésta(s) será(n) destruida(s) y los datos asociados a la(s) misma(s) serán retirados de nuestra base de datos.

Confidencialidad

Sus datos personales y los resultados obtenidos serán tratados y almacenados cumpliendo con la protección de datos establecida de acuerdo con la regulación vigente. La identificación de las muestras de materia fecal y sangre serán sometidas a un proceso de codificación, asignando un código de identificación en el que no aparece su nombre ni sus datos y que será el utilizado por el personal del estudio.

Los responsables del estudio se comprometen a:

- Identificar la muestra de materia fecal y de sangre solo con códigos, sin que aparezca el nombre de la persona.
- Suministrar de forma confidencial, la información para efectos de este estudio y guardarla en forma digital (base de datos) sin que aparezca el nombre de la persona.
- Asegurar que en las publicaciones resultantes de este estudio, ningún dato pueda identificar a la persona.

En el caso que, como resultado del desarrollo o ejecución de este estudio, se obtengan datos o información de su interés es importante que usted en este consentimiento autorice o no ser recontactado por el personal del estudio.

Autorizo ser recontactado por el personal del estudio: SI ____ NO ____

En caso de que las muestras obtenidas sean de interés científico y haya quedado remanentes (muestra de sobra), autorizo que sean entregadas al Biobanco UdeA-TdeA con sus datos asociados, para que puedan ser utilizada en otras investigaciones que no tengan que ver con estudios de clonación y que cuenten con una aprobación del comité de ética.

Autorizo la donación del remanente de muestras y los datos al Biobanco UdeA-TdeA: SI ____ NO ____

COMITÉ DE ÉTICA
E INVESTIGACIÓN
IPS UNIVERSITARIA
APROBADO

340

En caso de dudas o tener algún problema con el estudio, puede llamar a la profesora Sonia del Pilar Agudelo López, al teléfono (574)2196056 o escribirle al correo electrónico sonia.agudelo@udea.edu.co o llamar al presidente del comité de bioética de la Facultad de Medicina Gabriel Jaime Montoya, al teléfono (574)2196065 o escribirle al correo electrónico bioeticamedicina@udea.edu.co, ambos profesores de la de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia. También puede comunicarse con la IPS Universitaria al correo investigacion@ipsuniversitaria.com.co

Con la firma de este consentimiento, manifiesto que el personal me ha explicado de qué se trata el estudio y de la muestra de materia fecal y de sangre que debo facilitar. Me han dicho y he entendido de manera clara que en cualquier momento puedo decidir si sigo o no en el estudio y que la participación no tiene ninguna influencia en la forma como debe atenderme el personal de salud cuando los necesite.

Manifiesto que me han dado la oportunidad de hacer preguntas sobre el estudio y estas han sido contestadas satisfactoriamente. He leído o me han leído y he comprendido perfectamente lo anterior y todos los espacios en blanco han sido completados antes de mi firma. Manifiesto que no he recibido presiones verbales, escritas y/o gestuales para participar en el estudio; que dicha decisión la tomo en pleno uso de mis facultades mentales, sin encontrarme bajo efectos de medicamentos, drogas o bebidas alcohólicas, de forma consciente, autónoma y libre. Manifiesto que me encuentro en capacidad de expresar mi consentimiento y que me han entregado una copia del presente documento.

Acepto: SI ____ NO ____

Yo, _____
con cédula de ciudadanía _____ de _____, otorgo el consentimiento para participar en este estudio.

Para todos los fines se firma el ____ de ____ del 20__ a las ____: ____ horas.



Huella del adulto participante

Firma de la persona participante en el estudio

Cédula de ciudadanía del participante en el estudio

Teléfono de contacto del participante en el estudio

Firma Testigo 1

Cedula de ciudadanía Testigo 1

Firma Testigo 2

Cedula de ciudadanía Testigo 2

Nombre del personal del estudio:
C.C:

COMITÉ DE ÉTICA
E INVESTIGACIÓN
IPS UNIVERSITARIA
APROBADO

Anexo X. Acta de aprobación del Comité de Ética del Hospital San Vicente Fundación



COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN

Medellín, 18 de Enero del 2022

Doctores

Miguel Ángel Toro Londoño

Alejandro Munera Duque

Juan Camilo Correa Cote

Juan Camilo Ricaurte Ciro

David Antonio Carmena Jiménez

Investigadores Principales

ASUNTO: Evaluación de protocolo de investigación

Respetados Drs.

Me permito informarle que en la reunión del comité de ética de investigación del 18 de Enero de 2022 según consta en el Acta N° 01-2022, se evaluó y se aprobó el siguiente proyecto:

- **Caracterización de *Blastocystis* sp. y su asociación con factores genéticos de susceptibilidad relacionados con el desarrollo de cáncer colorrectal.**

Atentamente,

Carlos Alberto Cardeño Castro

Presidente Comité de Ética de la Investigación

Fundación Hospitalaria San Vicente Paúl

Dirección: Calle 64 # 51D – 154 Medellín

Bloque 11, piso 1 (Hospital Infantil)

Teléfono 4441333 Ext: 3388

Correo Electrónico: comite_etica_investigacion@sanvicentefundacion.com



COMITÉ DE
ÉTICA DE LA
INVESTIGACIÓN

Anexo XI. Consentimiento informado Hospital San Vicente Fundación



CÓDIGO:

CONSENTIMIENTO INFORMADO Caracterización de *Blastocystis* sp. y su asociación con factores genéticos de susceptibilidad relacionados con el desarrollo de cáncer colorrectal

Es probable que el presente formulario de consentimiento contenga palabras o conceptos que usted no entienda. Por favor, pídale al personal del estudio que le explique todas las palabras, conceptos o información que no comprenda con claridad. Igualmente, puede realizar todas las preguntas que considere sean necesarias para tomar la decisión, tómese el tiempo que usted considere para pensar y, si es del caso, consulte a familiares u otras personas que le ayuden a comprender mejor las razones para aceptar su inclusión en el estudio.

En Colombia el cáncer es un problema de salud pública en aumento con grandes repercusiones psicoafectivas, sociales y económicas, imponiendo un reto para el sistema de salud. El cáncer colorrectal (CCR), también conocido como cáncer de colon y recto (intestino), se ha relacionado con factores de riesgo modificables como los hábitos alimentarios, la dieta rica en grasas, la diabetes (aumento de azúcar en la sangre), la obesidad (mucho peso), la falta de actividad física, bajo consumo de frutas y hortalizas, los hábitos del tabaquismo (fumar) y etílico (licores) y con factores no modificables como los genéticos (herencia), etnia (la raza) y enfermedades, entre ellas las causadas por microorganismos intestinales altamente frecuentes en nuestro medio como el parásito intestinal *Blastocystis* sp.

El Grupo de Parasitología de la Universidad de Antioquia, lo invita a participar en este estudio que busca identificar, en 408 pacientes, si existe relación entre la infección por el parásito *Blastocystis* sp., el cáncer colorrectal y los factores genéticos, lo cual servirá de insumo para ampliar el conocimiento acerca de estas enfermedades y buscar alternativas de tratamiento en un futuro cercano.

Es necesario que usted decida libre y voluntariamente participar en el estudio. Lea cuidadosamente este documento, comente al personal del estudio cualquier inquietud que tenga y tómese el tiempo necesario para decidir. En el caso que usted decida no participar, no afectará la atención de su salud, ni en la actualidad ni en el futuro.

Instituciones que respaldan el estudio: Grupo de Parasitología, Grupo de Bacterias y Cáncer, Grupo de Gastrohepatología y Grupo de Genética Molecular de la Universidad de Antioquia (UdeA), IPS Universitaria, Clínica Medellín S.A y Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III en Majadahonda -España.

Identificación de los responsables del estudio

- Miguel Ángel Toro Londoño. Correo electrónico: miguel.toro@udea.edu.co
- Alejandro Munera Duque. Correo electrónico: alejandro.munera@udea.edu.co
- Juan Camilo Correa Cote. Correo electrónico: jcccote@gmail.com
- Juan Camilo Ricaurte Ciro. Correo electrónico: juan.ricaurte@sanvicentefundacion.com
- David Antonio Carmena Jiménez. Correo electrónico: dacarmena@isciii.es

Debido a su historia clínica, su médico tratante le ha programado una cirugía de colon y/o recto o le ha enviado una colonoscopia, es decir, un examen que detecta cambios o anomalías en el intestino grueso (colon) y el recto, es por esto que lo invitamos a participar en este estudio el cual le tomará unos minutos de tiempo y si usted acepta participar debe:

1. Leer y firmar el presente documento que corresponde al consentimiento informado.
2. Responder a una encuesta clínico-epidemiológica, en la que se le harán unas preguntas generales sobre usted, sus hábitos alimentarios y los síntomas o enfermedades actuales, dicha encuesta no incluye preguntas sensibles relacionadas con su vida íntima.
3. El día de la cirugía o la colonoscopia, entregar al personal del estudio, la muestra de materia fecal (popó) en el recipiente que le será suministrado.
4. Permitir la toma de muestra de sangre por personal calificado, la cual se hará en la vena de su antebrazo. En total se recolectarán 2 tubos para un total de 10 mililitros (10mL).
5. Entregar una copia de la lectura de su colonoscopia o permitir que el médico nos la entregue, con el fin de poder relacionar los hallazgos encontrados en ésta con los obtenidos en el resto del estudio.

APROBADO 18 ENE. 2022
 COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN

CÓDIGO:

Acepto que les entreguen una copia de los resultados de la colonoscopia: SI ☐ NO ☐**Beneficios**

Después de aproximadamente 2 semanas de haber entregado el recipiente plástico con la materia fecal, se le entregará el resultado de laboratorio donde dice si tiene o no parásitos intestinales y un médico de nuestro Grupo de Parasitología, le realizará la fórmula médica y le suministrará el purgante (antiparasitario) en caso de requerirlo, para que elimine dichos parásitos. Otro beneficio muy importante para la comunidad en general es el de aportar al conocimiento del cáncer colorrectal y su posible asociación con factores genéticos y parásitos intestinales.

Riesgos

Los riesgos son mínimos respecto a la toma de las muestras y en general son muy bien aceptados en las personas, sin embargo, después de la toma de muestra de sangre y a pesar de ser realizada por personal calificado y con experiencia, en algunos casos, se puede generar una ligera incomodidad o hematoma (morado) en el lugar donde la aguja ha sido insertada, pero esto no implica ningún riesgo para su salud.

Respecto a los purgantes, en general son muy bien aceptados en las personas, sin embargo, en muy raras ocasiones podrían producir bajo apetito, ganas de vomitar, vómito, alergia, picazón en la piel o diarrea. En caso de que usted requiera el purgante, el médico analizará los riesgos y le explicará que hacer en caso de presentar alguna reacción.

Participación voluntaria

La participación en este estudio es de carácter voluntario, es decir no es obligatoria, no tiene ningún costo para usted ni tampoco usted recibirá dinero por participar y su negativa a ser incluido en el estudio, no afectará la atención de su salud, ni en la actualidad ni en el futuro.

Tenga en cuenta que en cualquier momento usted puede retirar su consentimiento informado si así lo desea, aun posterior a su firma sin tener que explicar los motivos y en caso de que aún se tenga(n) muestra(s) ésta(s) será(n) destruida(s) y los datos asociados a la(s) misma(s) serán retirados de nuestra base de datos.

Confidencialidad

Sus datos personales y los resultados obtenidos serán tratados y almacenados cumpliendo con la protección de datos establecida de acuerdo con la regulación vigente. La identificación de las muestras de materia fecal y sangre serán sometidas a un proceso de codificación, asignando un código de identificación en el que no aparece su nombre ni sus datos y que será el utilizado por el personal del estudio.

Los responsables del estudio se comprometen a:

- Identificar la muestra de materia fecal y de sangre solo con códigos, sin que aparezca el nombre de la persona.
- Suministrar de forma confidencial, la información para efectos de este estudio y guardarla en forma digital (base de datos), sin que aparezca el nombre de la persona.
- Asegurar que, en las publicaciones resultantes de este estudio, ningún dato pueda identificar a la persona.

En el caso que, como resultado del desarrollo o ejecución de este estudio, se obtengan datos o información de su interés, es importante que usted en este consentimiento autorice o no ser recontactado por el personal del estudio.

Autorizo ser recontactado por el personal del estudio: SI ☐ NO ☐

En caso de que las muestras obtenidas sean de interés científico y haya quedado remanentes (muestra de sobra), autorizo que sean entregadas al Biobanco UdeA-TdeA para que puedan ser utilizada en otras investigaciones que no tengan que ver con estudios de clonación y que cuenten con una aprobación del comité de ética.

Autorizo la donación del remanente de muestras y los datos al Biobanco UdeA-TdeA: SI ☐ NO ☐

En caso de dudas o tener algún problema con el estudio, puede llamar al profesor Miguel Ángel Toro Londoño, al teléfono (574)2196056 o escribirle al correo electrónico miguel.toro@udea.edu.co en la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia.

COMITÉ DE
ÉTICA DE LA
INVESTIGACIÓN
18 ENE. 2022



CÓDIGO:

Si usted tiene preguntas sobre sus derechos como participante de este estudio puede contactar al presidente del comité de bioética de la Facultad de Medicina, el profesor Gabriel Jaime Montoya, al teléfono (574)2196065 o escribirle al correo electrónico bioeticamedicina@udea.edu.co. También se puede comunicar con el Comité de Ética e Investigación de la IPS Universitaria al correo investigacion@ipsuniversitaria.com.co o al Comité de Ética e Investigación de la Clínica Medellín adscrito al Centro Médico Imbanaco de Cali S.A., al teléfono (572) 3821000 Ext. 41275, correo electrónico etica.investigacion@imbanaco.com.co.

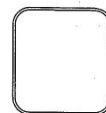
Con la firma de este consentimiento, manifiesto que el personal me ha explicado de qué se trata el estudio y de la muestra de materia fecal y de sangre que debo facilitar. Me han dicho y he entendido de manera clara que en cualquier momento puedo decidir si sigo o no en el estudio y que la participación no tiene ninguna influencia en la forma como debe atenderme el personal de salud cuando los necesite.

Manifiesto que me han dado la oportunidad de hacer preguntas sobre el estudio y estas han sido contestadas satisfactoriamente. He leído o me han leído y he comprendido perfectamente lo anterior y todos los espacios en blanco han sido completados antes de mi firma. Manifiesto que no he recibido presiones verbales, escritas y/o gestuales para participar en el estudio; que dicha decisión la tomo en pleno uso de mis facultades mentales, sin encontrarme bajo efectos de medicamentos, drogas o bebidas alcohólicas, de forma consciente, autónoma y libre. Manifiesto que me encuentro en capacidad de expresar mi consentimiento y que me han entregado una copia del presente documento.

Acepto: SI ☐ NO ☐

Yo, _____
con cédula de ciudadanía _____ de _____, otorgo el consentimiento para
participar en este estudio.

Para todos los fines se firma el _____ de _____ del 20____
a las _____ horas.



Huella del adulto participante

Firma de la persona participante en el estudio

Cédula de ciudadanía del participante en el estudio

Teléfono de contacto del participante en el estudio

TESTIGO 1

Nombre: _____

Firma: _____

C.C: _____

TESTIGO 2

Nombre: _____

Firma: _____

C.C: _____

Nombre del personal del biobanco: _____

Firma: _____

C.C: _____

COMITÉ DE
ÉTICA DE LA
INVESTIGACIÓN
APROBADO 18 ENE. 2022



Anexo XII. Encuesta clínico-epidemiológica estructurada



Caracterización de *Blastocystis* sp. y su asociación con factores genéticos de susceptibilidad relacionados con el desarrollo de cáncer colorrectal

Fecha de diligenciamiento dd ____ mm ____ aa ____ Código ____

IDENTIFICACIÓN

1 Documento de identidad _____

3 Fecha de nacimiento dd ____ mm ____ aa ____

5 Sexo ☐ 1 Hombre ☐ 2 Mujer

7 Grupo étnico
☐ 1 Indígena
☐ 2 Negro o afrocolombiano
☐ 3 Raízal
☐ 4 Palenquero
☐ 5 Gitano
☐ 6 Ninguno

2 IPS o Centro de Atención Médica

4 Edad (años) _____

6 Lugar de nacimiento

DEMOGRÁFICOS

8 ¿Tiene hijos? (no incluya adoptados)
☐ 1 Si Número _____
☐ 2 No

9 ¿Tiene hermano(a) con un padre o madre biológica en común?

	Número hermanos	Número hermanas
Si		
No		
No sabe		

TRABAJO

10 Indique su situación laboral habitual
☐ 1 Estudiante
☐ 2 Ama de casa
☐ 3 Trabajador independiente
☐ 4 Empleado
☐ 5 Empleador

11 Especifique lo mejor posible su profesión u oficio
 (para respuesta 3, 4 o 5 en pregunta 10)

HABITOS ALIMENTICIOS

12 ¿Con qué frecuencia comió usted la semana pasada los alimentos que figuran a continuación?

	0 días	1-2 días	3-4 días	5-6 días	7 días
1. Fruta fresca					
2. Carne roja					
3. Pollo o pescado					
4. Carbohidratos					
5. Verduras o legumbres					
6. Ultraprocesados					
7. Lácteos					
8. Huevos					

13 ¿Cuántas tazas de café o té toma normalmente al día? (número) _____

HÁBITOS TABAQUISMO

14 ¿Fuma o ha fumado alguna vez en su vida?

- 1 Si
2 No

15 A qué edad empezó a fumar?
(Edad en años)

16 ¿Cómo ha sido su consumo de tabaco?

- 1 Siempre ha fumado igual
2 Antes fumaba menos y ahora más
3 Antes fumaba mas y ahora menos
4 Fumaba en el pasado y ahora no

17 ¿Con qué frecuencia fuma o fumaba? (Opción múltiple)

Actual diario	Actual ocasional	Pasado diario	Pasado ocasional
res:20	res: 20 y 21	res: 20 y 22	res: 20, 21 y 22

18 ¿Cuántos cigarrillos fuma o fumaba en un día de consumo?
(número de cigarrillos)

19 ¿A qué edad cesó o cambió el cons? (preg 17 opcion 2, 3 y 4)
(Edad en años)

20 Del mes (30 días), ¿cuántos días fuma o fumaba?
(número en días)

21 Índice paquete año
(Cigarrillos día*años de consumo)/20)

HÁBITOS ETÍlicos

22 ¿Consume o ha consumido bebidas alcohólicas con regularidad?

- 1 Diariamente
2 1-3 veces a la semana
3 4-6 veces a la semana
4 1-3 veces al mes
5 4-6 veces al mes
6 Sólo en ocasiones puntuales
7 No, jamas he probado alcohol

23 A qué edad empezó a beber alcohol?
(Edad en años)

24 ¿Cómo ha sido su consumo de alcohol? (solo para rta 1 a 5 de pregunta 2425)

- 1 Siempre ha bebido igual
2 Antes bebía menos y ahora más
3 Antes bebía mas y ahora menos
4 Bebía en el pasado y ahora no

¿Con qué frecuencia consume o consumía alcohol? (Opción múlt.)

Actual diario	Actual ocasional	Pasado diario	Pasado ocasional

26 ¿Cuántas copas, latas o vasos del alcohol consume o consumía
en una semana? (ver tabla de bebida estandar)

Cerveza	200ml (1UBE)	330ml (1.5UBE)	750ml (3.75UBE)
Vino (copa)	100ml (1UBE)	500ml (5UBE)	750ml (7.5UBE)
Aguardiente/Ron/Tequila	50ml (2UBE)	375ml (15UBE)	750ml (30UBE)
Whiskey	50ml (2UBE)	375ml (15UBE)	750ml (30UBE)

27 Calculo unidades bebida estandar por semana

	1 a 28	29 a 40	>40
Hombres			
Mujeres	1 a 16	17 a 28	>28

28 ¿A qué edad cesó o cambió el consumo de bebidas alcohólicas? (preg 26 opcion 2, 3 y 4)
(Edad en años)

VIVIENDA

29 Ubicación de la vivienda actual

- 1 Urbana
2 Rural

30 Especifique el lugar de
su vivienda actualMunicipio
Departamento31 Estrato socio-económico
de la vivienda actual

No sabe _____

32 El piso que predomina en la vivienda es de:

- 1 Tierra
2 Madera
3 Cemento
4 Baldosa/cerámica
5 Otro Cuál: _____

33 ¿Convive con animales?

1	Si
2	No

34 Los animales con que convive son:

1	Perro
2	Gato
3	Gallinas y otras aves
4	Vacas y otros bovinos
5	Cerdos
6	Otro Cuál:

ASPECTOS HIGIÉNICO-SANITARIOS

35 ¿De donde proviene principalmente el agua con que cocina?

1	Acueducto
2	Carros tanque
3	Agua lluvia
4	Rio/quebrada
5	Pozo con bomba
6	Otro Cuál:

36 ¿Como realiza la eliminación final de las excretas?

1	Inodoro conectado a alcantarillado
2	Inodoro conectado a pozo séptico
3	Inodoro sin conexión
4	Letrina (hoyo seco)
5	Campo abierto
6	Rio o quebrada
7	Otro Cuál:

37 La mayor parte del tiempo usted ¿consume alimentos preparados en casa o come por fuera de casa?

	SI
En casa	
Por fuera de casa	

38 La persona que cocina en casa

¿Le adiciona limpiado o vinagre a las frutas y verduras?

1	Siempre
2	Casi siempre
3	Casi nunca
4	Nunca
5	No sabe

39 La persona que cocina en casa

¿Sé lava las manos antes de preparar los alimentos?

1	Siempre
2	Casi siempre
3	Casi nunca
4	Nunca
5	No sabe

40 La persona que cocina en casa

¿Sé lava las manos después de ir al baño?

1	Siempre
2	Casi siempre
3	Casi nunca
4	Nunca
5	No sabe

41 ¿Usted permanece la mayor parte del tiempo con zapatos?

1	Siempre
2	Casi siempre
3	Casi nunca
4	Nunca
5	No sabe

DATOS CLÍNICOS

42 En las últimas dos semanas ¿usted ha tenido alguno de los siguientes síntomas?

	SI	NO
1. Diarrea		
2. Estreñimiento		
3. Vómito		
4. Dolor abdominal		
5. Fiebre		
6. Pérdida de peso		

43 Antecedentes personales o diagnósticos previos

	SI	NO
1. Cáncer colorrectal		
2. Pólipos adenomatosos		
3. Síndrome de intestino irritable		
4. Colitis		
5. Enfermedad de Crohn		
6. Anemia		
Otro Cuál:		

7. Sangre en heces		

44 Antecedentes familiares

	SI	NO	NO SABE
1. Cáncer colorrectal			
2. Pólipos adenomatosos			
3. Diarrea en las últimas 2 semanas			
3. Síndrome de intestino irritable			
3. Colitis			

Otro Cuál:

46 ¿Qué tipo de purgante utilizó la última vez?

1	Medicado
2	Automedicado
3	Casero

¿Recuerda el nombre?

45 En los últimos 3 meses ¿usted se ha purgado?

1	Si	¿Hace cuánto? 	meses
2	No		

OBSERVACIONES:

.....

.....

.....

.....

MATERIAL SUPLEMENTARIO

9 MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla suplementaria 1. Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa convencional y de un polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción empleadas para la determinación del componente genético ancestral.

Marcador	Enzima	Tamaño de la inserción (bp)	Tamaño alélico (bp)	Secuencias	Ciclos PCR
MID1752	NA	35	139, 104	TGTTGTACCTTCCAAGTCTCT AGATTGACATTCTCTCCACA	94 °C/5 min, 30 ciclos (94 °C/30 s, 59.5 °C/45 s, 72 °C/1 min) y 72 °C/10 min
FY-NULL	RsaI	NA	172, (152/20)	AGGCTTGTGCAGGCAGTG GGCATAGGGATAAGGGACT	94 °C/5 min, 35 ciclos (94 °C/30 s, 58.5 °C/45 s, 72 °C/1 min) y 72 °C/10 min
AT3	NA	68	572, 504	CCACAGGTGTAACATTGTGT GAGATAGTGTGATCTGAGGC	94 °C/5 min, 35 ciclos (94 °C/30 s, 57 °C/45 s, 72 °C/1 min) y 72 °C/10 min
MID1386	NA	21	110, 89	AGAACACATGAGCTGAGAGG GGATTGATGTTCCAAGTCAG	94 °C/5 min, 30 ciclos (94 °C/30 s, 57.5 °C/45 s, 72 °C/1 min) y 72 °C/10 min
GCH	HaeIII	NA	200, (121/79)	AGATCTGAATGGCTATTATTTGC GGAGGTGAGTTTATGGAACAGC	94 °C/5 min, 35 ciclos (94 °C/30 s, 57.5 °C/45 s, 72 °C/1 min) y 72 °C/10 min
GCS	StyI	NA	200, (128,72)	AGATCTGAATGGCTATTATTTGC GGAGGTGAGTTTATGGAACAGC	94 °C/5 min, 35 ciclos (94 °C/30 s, 57.5 °C/45 s, 72 °C/1 min) y 72 °C/10 min
MID817	NA	23	140, 117	ATTACCGGAACACATCTCTGA CCTACATCCAACAGAGAAGGTG	94 °C/5 min, 30 ciclos (94 °C/30 s, 57.5 °C/45 s, 72 °C/1 min) y 72 °C/10 min
MID-1039	NA	40	128, 88	CGTTTCATCTCTTTGGGTTA GCTTCTTCATTCCTTCACA	94 °C/5 min, 30 ciclos (94 °C/30 s, 57.5 °C/45 s, 72 °C/1 min) y 72 °C/10 min
MID1358	NA	17	125, 108	GTTTTGGGAATTTAGGTTTGG AGACGCCAGGAATTTCTAT	94 °C/5 min, 35 ciclos (94 °C/30 s, 57.5 °C/45 s, 72 °C/1 min) y 72 °C/10 min
MID856	NA	26	138, 112	AACATGGGAACAGCTCATTA TATTGTGCTCATTTCTGGG	94 °C/5 min, 30 ciclos (94 °C/30 s, 57.5 °C/45 s, 72 °C/1 min) y 72 °C/10 min
MID944	NA	30	140, 110	TCAGTAAAGGGTTTCCTTGT GTAAGCAGCCTGGATTACAA	94 °C/5 min, 30 ciclos (94 °C/30 s, 57.5 °C/45 s, 72 °C/1 min) y 72 °C/10 min

Marcador	Enzima	Tamaño de la inserción (bp)	Tamaño alélico (bp)	Secuencias	Ciclos PCR
MID2062	NA	21	141, 120	GGCCTGCATGATAAATAGAA GAAGCCAGAACAAATGAAAGA	94 °C/5 min, 30 ciclos (94 °C/30 s, 57.5 °C/45 s, 72 °C/1 min) y 72 °C/10 min
MID1066	NA	19	103, 84	TCTTGGGACTCAGAGTTTCAG CAGAAAACCAAGGTGAAAGTG	94 °C/5 min, 30 ciclos (94 °C/30 s, 57.5 °C/45 s, 72 °C/1 min) y 72 °C/10 min
LPL	<i>PvuII</i>	NA	319 (161/158)	AGGCTTCACTCATCCGTGCCTCC TTATGCTGCTTTAGACTCTTGTC	94 °C/5 min, 35 ciclos (94 °C/30 s, 57.5 °C/45 s, 72 °C/1 min) y 72 °C/10 min
DRD2	<i>TaqI</i>	NA	300 (211/89)	CCTCTGAGGCTTACTGTCTG AAACTAGGGAGGGTCAGAG	94 °C/5 min, 35 ciclos (94 °C/30 s, 56 °C/45 s, 72 °C/1 min) y 72 °C/10 min
APOA1	NA	301	409, 108	AAGTGCTGTAGGCCATTAGATTAG AGTCTTCGATGACAGCGTATACAGA	94 °C/5 min, 35 ciclos (94 °C/30 s, 50 °C/45 s, 72 °C/1 min) y 72 °C/10 min
RB2300	<i>BamHI</i>	NA	196 (119/77)	CAGGACAGCGGCCCGGAG CTGCAGACGCTCCGCCGT	94 °C/5 min, 35 ciclos (94 °C/30 s, 60 °C/45 s, 72 °C/1 min) y 72 °C/10 min
OCA2	<i>HaeIII</i>	NA	275 (191/84)	CTTTCGTGTGTGCTAACTCC ACCTCTAGCATGGTTCTTGGGC	94 °C/5 min, 35 ciclos (94 °C/30 s, 65 °C/45 s, 72 °C/1 min) y 72 °C/10 min
MID818	NA	24	143, 119	TAGAGCCAGTTAGAGGGAGG ACTTCAGTCGTCACCTCCATC	94 °C/5 min, 30 ciclos (94 °C/30 s, 57.5 °C/45 s, 72 °C/1 min) y 72 °C/10 min
PV92	NA	300	716, 416	GGATCTCAGGGTGGGTGGCAATGCT GAAAGGCAAGCTACCAGAAAGCCCCAA	94 °C/5 min, 35 ciclos (94 °C/30 s, 65 °C/45 s, 72 °C/1 min) y 72 °C/10 min
Sb19.3	NA	311	767, 456	TCTAGCCCCAGATTTATGGTAACTG AAGCACAAATTGGTTATTTCTGAC	94 °C/5 min, 35 ciclos (94 °C/30 s, 60 °C/45 s, 72 °C/1 min) y 72 °C/10 min

°C, grado Celsius; bp, pares de bases; min, minutos; MID, marcador de inserción o delección; NA, no aplica; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; s, segundos.

Tabla suplementaria 2. Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa convencional y en tiempo real empleadas para la detección y caracterización molecular de agentes parasitarios y bacterianos.

Detección	Diana	Tamaño del fragmento bp	Oligo nucleótido	Secuencias	Ciclos del ensayo de PCR
<i>Blastocystis</i> sp.	ssu-rRNA	≈ 600	RD5	ATCTGTTGATCCTGCCAGT	95 °C/3 min, 30 ciclos (94 °C/1 min, 59 °C/1 min, 72 °C/1 min) y 72 °C/2 min
			BhRDr	GAGCTTTTAACTGCAACAACG	
<i>Cryptosporidium</i> spp.	ssu-rRNA	587	CR-P1	CAGGGAGGTAAGTGACAAAGAA	93 °C/5 min, 35 ciclos (94 °C/40 s, 50 °C/40 s, 72 °C/1 min) y 72 °C/10 min
			CR-P2	TCAGCCTTGGACCATACTC	
			CR-P3	ATTGAGGGCAAGTCTGGTG	
			CPB-DIAGR	TAAGGTGCTGAAGGAGTAAGG	
			AL3531	ATAGTCTCCGCTGTATTC	
			AL3535	GGAAGGAACGATGTATCT	
<i>Dientamoeba fragilis</i>	ssu-rRNA	850	AL3532	TCCGCTGTATTCTCAGCC	94 °C/5 min, 35 ciclos (94 °C/45 s, 59 °C/45 s, 72 °C/1 min) y 72 °C/10 min
			AL3534	GCAGAGGAACCAGCATC	
			DF400	TATCGGAGGTGGTAATGACC	
			DF1250	CATCTTCTCTGCTTAGACG	
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	ssu-rRNA	NA	Ehd-239F	ATTGTCGTGGCATCCTAACTCA	94 °C/3 min, 30 ciclos (94 °C/1 min, 57 °C/90 s, 72 °C/2 min) y 72 °C/7 min
			Ehd-88R	GCGGACGGCTCATTATAACA	
			Sonda Eh	FAM-TCAATTGAATGAATTGGCCATTT-MGB	
			Sonda Ed	VIC-TTACTTACATAAAATTGGCCACTTTG-MGB	

Detección	Diana	Tamaño del fragmento bp	Oligo nucleótido	Secuencias	Ciclos del ensayo de PCR
<i>Enterocytozoon bienewisi</i>	ITS	≈ 390	EBITS3	GGTCATAGGGATGAAGAG	94 °C/3 min, 35 ciclos (94 °C/30 s, 57 °C/30 s, 72 °C/40 s) y 72 °C/10 min
			EBITS4	TTCGAGTTCCTTCGGGCTC	
			EBITS1	GCTCTGAATATCTATGGCT	94 °C/3 min, 30 ciclos (94 °C/30 s, 55 °C/30 s, 72 °C/40 s) y 72 °C/10 min
			EBITS2.4	ATCGCCGACGGATCCAAGTG	
<i>Giardia duodenalis</i>	ssu-rRNA	NA	Gd-80F	GACGGCTCAGGACAACGGTT	50 °C/2 min, 45 ciclos (95 °C/15 s y 60 °C/1 min)
			Gd-127R	TTGCCAGCGGTGTCCG	
			Sonda G	FAM-CCCGGGCGGTCCCTGCTAG-BHQ1	
	ssu-rRNA	≈ 300	GiaF	AAGTGTGGTGCAGACGGACTC	95 °C/2 min, 35 ciclos (95 °C/45 s, 58 °C/30 s, 72 °C/45 s) y 72 °C/4 min
			GiaR	CTGCTGCCGTCTTGGATGT	
			RH 11	CATCCGGTCGATCCTGCC	95 °C/2 min, 35 ciclos (95 °C/45 s, 55 °C/30 s, 72 °C/45 s) y 72 °C/4 min
			RH 4	AGTCGAACCCTGATTCTCCGCCAGG	
	bg	511	G7_F	AAGCCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC	95 °C/7 min, 35 ciclos (95 °C/30 s, 65 °C/30 s, 72 °C/1 min) y 72 °C/7 min
			G759_R	GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC	
			G99_F	GAACGAACGAGATCGAGGTCCG	95 °C/7 min, 35 ciclos (95 °C/30 s, 55 °C/30 s, 72 °C/1 min) y 72 °C/7 min
			G609_R	CTCGACGAGCTTCGTGTT	
	gdh	432	GDHeF	TCAACGTAAAYCGYGGYTTCGGT	95 °C/3 min, 35 ciclos (95 °C/30 s, 55 °C/30 s, 72 °C/1 min) y 72 °C/7 min
			GDHiF	CAGTACACCTCYGCTCTCGG	

Detección	Diana	Tamaño del fragmento bp	Oligo nucleótido	Secuencias	Ciclos del ensayo de PCR
<i>Giardia duodenalis</i>			GDHIR	GTTRTCCTTGCACATCTCC	95 °C/3 min, 35 ciclos (95 °C/30 s, 55 °C/30 s, 72 °C/1 min) y 72 °C/7 min
	<i>tpi</i>	530	AL3543	AAATATGCCTGCTCGTCG	94 °C/5 min, 35 ciclos (94 °C/45 s, 50 °C/45 s, 72 °C/1 min) y 72 °C/10 min
			AL3546	CAAACCTTITCCGCAAACC	
			AL3544	CCCTTCATCGGIGGTAACCT	
			AL3545	GTGGCCACCACICCCGTGCC	
Microsporidios	<i>ssu-rRNA</i>	250-280	Micro_F	CACCAGGTTGATTCTGCCTGA	94 °C/10 min, 35 ciclos (94 °C/30 s, 60 °C/30 s, 72 °C/30 s) y 72 °C/10 min
			Micro_R	CCTCTCCGGAACCAAAACCCTG	
Ciclomodulinas	<i>cdt</i>	466	CDT-s1	GAAAGTAAATGGAATATATAATGTCCG	94 °C/5 min, 30 ciclos (94 °C/1 min, 55 °C/1 min, 72 °C/1 min) y 72 °C/10 min
			CDT-s2	GAAAAATAAATGGAACACACATGTCCG	
			CDT-as1	AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA	
			CDT-as2	AAATCTCCTGCAATCATCCAGTTA	
	<i>cif</i>	383	cif-int-s	AACAGATGGCAACAGACTGG	94 °C/5 min, 30 ciclos (94 °C/1 min, 55 °C/1 min, 72 °C/1 min) y 72 °C/10 min
			cif-int-as	AGTCAATGCTTTATGCGTCAT	
	<i>cnf</i>	633	CNF-s	TTATATAGTCGTCAAGATGGA	94 °C/5 min, 30 ciclos (94 °C/1 min, 55 °C/1 min, 72 °C/1 min) y 72 °C/10 min
			CNF-as	CACTAAGCTTTACAATATTGAC	
	<i>pks</i>	≈ 280	clbB-F	GCGCATCCTCAAGAGTAAATA	94 °C/5 min, 30 ciclos (94 °C/1 min, 55 °C/1 min, 72 °C/1 min) y 72 °C/10 min
			clbB-R	GCGCTCTATGCTCATCAACC	

Detección	Diana	Tamaño del fragmento bp	Oligo nucleótido	Secuencias	Ciclos del ensayo de PCR
Control interno de amplificación	IAC	NA	IAC_F	GCAGCCACTGGTAACAGGAT	95 °C/15 min y 40 ciclos (95 °C/15 s y 60 °C/1 min)
			IAC_R	GCAGAGCGCAGATACCAAT	
			Sonda IAC	Cy5-AGAGCGAGGTATGTAGCGG-BHQ3	
<i>Escherichia coli</i> con adherencia difusa	<i>afaC</i>	672	afa_F	CGGCTTTTCTGCTGAACTGGCAGGC	94 °C/5 min, 25 ciclos (94 °C/1 min, 65 °C/1 min, 72 °C/2 min) y 72 °C/7 min
			afa_R	CCGTCAGCCCCCAGGCAGACC	
			aatA_F	CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	
<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa	<i>aatA</i>	NA	aatA_R	CTGTCAGATAAAATCTCGAGAGAA	95 °C/15 min y 40 ciclos (95 °C/15 s y 60 °C/1 min)
			Sonda aatA	6FAM-CATGTTCTGAGAGTGCAATCCCAG-BHQ1	
			aaiC_F	CATTTACGCTTTTTCAGGAAT	
	<i>aaiC</i>	NA	aaiC_R	CCTGATTAGTTGATTCCCTACG	95 °C/15 min y 40 ciclos (95 °C/15 s y 60 °C/1 min)
			Sonda aaiC	HEX-CACATACAAGACCTTCTGGAGAA-BHQ1	
			aggR_F	GAATCGTCAGCATCAGCTACA	
<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva	<i>aggR</i>	NA	aggR_R	CCTAAAGGATGCCCTGATGA	95 °C/15 min y 40 ciclos (95 °C/15 s y 60 °C/1 min)
			Sonda aggR	ROX-CGGACAACTGCAAGCATCTA-BHQ2	
			ipaH_F	CCTTTCCGGTTCCTTGA	
	<i>ipaH</i>	NA	ipaH_R	CGGAATCCGGAGGTATTGC	95 °C/15 min y 40 ciclos (95 °C/15 s y 60 °C/1 min)
			Sonda ipaH	6FAM-CGCCTTCCGATACCGTCTCTGCA-BHQ1	
			bfpA_F	TGGTGCTTGGCGCTTGCT	
<i>Escherichia coli</i> enteropatogénica	<i>bfpA</i>	NA	bfpA_R	CGTTGCGCTCATTACTTCTG	95 °C/15 min y 40 ciclos (95 °C/15 s y 60 °C/1 min)
			Sonda bfpA	HEX-CAGTCTGCGTCTGATTCCAA-BHQ1	
			eae_F	CATTGATCAGGATTTTCTGGTGATA	
	<i>eae</i>	NA	eae_R	CTCATGCGGAAATAGCCGTTA	95 °C/15 min y 40 ciclos (95 °C/15 s y 60 °C/1 min)
			Sonda eae	ROX-ATAGTCTCGCCAGTATTCGCCACCAATACC-BHQ2	

Detección	Diana	Tamaño del fragmento bp	Oligo nucleótido	Secuencias	Ciclos del ensayo de PCR
Escherichia coli enterotoxigénica	<i>lt</i>	NA	LT_F	TCCCCACCGGATCACCAA	95 °C/15 min y 40 ciclos (95 °C/15 s y 60 °C/1 min)
			LT_R	CAACCTTGTGTGCATGATGA	
			Sonda LT	6FAM-CTTGGAGAGAGAAACCCT-BHQ1	
	<i>sth</i>	NA	STh_F	GCTAAACCAGYAGRGTTCTTCAAAA	95 °C/15 min y 40 ciclos (95 °C/15 s y 60 °C/1 min)
			STh_R	CCCGGTACARGCAGGATTACAACA	
			Sonda STh	HEX-TGGTCTGAAAGCATGAA-BHQ1	
Escherichia coli productora de toxina Shiga	<i>stp</i>	NA	STp_F	TGAATCACTTGACTCTTCAAAA	95 °C/15 min y 40 ciclos (95 °C/15 s y 60 °C/1 min)
			STp_R	GGCAGGATTACAACAAAGTT	
			Sonda STp	ROX-TGAACAACACATTTTACTGCT-BHQ2	
	<i>stx1</i>	NA	Stx_F	TTTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG	95 °C/15 min y 40 ciclos (95 °C/15 s y 60 °C/1 min)
			Stx_R	CCCCAGTTTCARWGTRAGRTCMACRTC	
			Sonda Stx2	6FAM-TCGTCAGGCACGTCTGAAACTGCTCC-BHQ1	
	<i>stx2</i>	NA	Stx_F	TTTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG	95 °C/15 min y 40 ciclos (95 °C/15 s y 60 °C/1 min)
			Stx_R	CCCCAGTTTCARWGTRAGRTCMACRTC	
			Sonda Stx1	HEX-CTGGATGATCTCAGTGGCGGTTCTTATGTAA-BHQ1	
	<i>stx2f</i>	NA	Stx2f_F	ATTCTCGGAAGTGTGCGGT	95 °C/15 min y 40 ciclos (95 °C/15 s y 60 °C/1 min)
			Stx2f_R	CGCCCTGTCTCCAACAATCT	
			Sonda VT2f	ROX-ATTCAAGTTCGTTCCGTGAGC-BHQ2	

°C, grado Celsius; *aaIC*, type VI secretion protein (gene); *aatA*, dispersin transporter protein (gene); *afaC*, *afimbrial adhesin C* (gene); *aggR*, *AraC* transcriptional activator (gene); *bfpA*, bundle-forming pilus (gene); *bg*, beta-giardina; bp, pares de bases; *cdt*, *cytolethal distending toxin* (gene); *cif*, *cycle-inhibiting factor* (gene); *cnf*, *cytotoxic necrotizing factor* (gene); *eae*, *intimin* (gene); *gdh*, glutamato deshidrogenasa; *gp60*, glicoproteína de 60 kDa; IAC, control interno de amplificación; *ipaH*, *invasion plasmid antigen* (gene); ITS, espaciador transcrito interno; *lt*, *heat-labile enterotoxin* (gene); min, minutos; NA, no aplica; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; *pks*, *polyketide synthase* (gene); s, segundos; *ssu-rRNA*; subunidad menor del RNA ribosómico; *sth*, *heat-stable enterotoxin human variant* (gene); *stp*, *heat-stable enterotoxin porcine variant* (gene); *stx1*, *Shiga toxin 1* (gene); *stx2*, *Shiga toxin 2* (gene); *stx2f*, *Shiga toxin 2f variant* (gene); *tpi*, triosa fosfato isomerasa.

	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST8	ST9	ST10	ST11	ST12	ST13	ST14	ST15	ST16	ST17	ST21	ST23	ST24	ST25	ST26	ST27	ST28	ST29	ST30	ST31	ST32	ST33	ST34	ST35	ST36	ST37	ST38	ST39	ST40
ST1																																				
ST2	0,07																																			
ST3	0,14	0,13																																		
ST4	0,13	0,13	0,09																																	
ST5	0,11	0,11	0,13	0,13																																
ST6	0,14	0,14	0,15	0,15	0,13																															
ST7	0,16	0,16	0,18	0,18	0,16	0,11																														
ST8	0,13	0,13	0,10	0,06	0,12	0,15	0,19																													
ST9	0,14	0,14	0,14	0,14	0,12	0,03	0,11	0,14																												
ST10	0,13	0,14	0,11	0,08	0,11	0,15	0,17	0,08	0,15																											
ST11	0,06	0,08	0,14	0,12	0,11	0,14	0,16	0,12	0,13	0,12																										
ST12	0,11	0,11	0,13	0,13	0,05	0,13	0,15	0,13	0,12	0,12	0,10																									
ST13	0,11	0,11	0,14	0,13	0,07	0,13	0,16	0,12	0,12	0,12	0,11	0,06																								
ST14	0,10	0,11	0,13	0,13	0,06	0,13	0,16	0,12	0,13	0,12	0,10	0,05	0,06																							
ST15	0,21	0,20	0,18	0,19	0,17	0,18	0,20	0,19	0,18	0,18	0,20	0,17	0,19	0,17	0,18																					
ST16	0,15	0,15	0,13	0,13	0,13	0,16	0,19	0,13	0,15	0,14	0,15	0,14	0,15	0,14	0,18																					
ST17	0,18	0,19	0,17	0,19	0,17	0,17	0,21	0,18	0,16	0,19	0,18	0,18	0,19	0,18	0,20	0,18																				
ST21	0,11	0,11	0,14	0,13	0,07	0,12	0,15	0,13	0,12	0,12	0,11	0,06	0,07	0,06	0,17	0,15	0,17																			
ST23	0,13	0,13	0,11	0,08	0,11	0,15	0,18	0,08	0,14	0,03	0,12	0,12	0,12	0,12	0,18	0,14	0,19	0,12																		
ST24	0,10	0,11	0,13	0,13	0,06	0,13	0,16	0,12	0,12	0,11	0,10	0,05	0,06	0,02	0,17	0,14	0,18	0,06	0,11																	
ST25	0,10	0,11	0,13	0,12	0,06	0,13	0,16	0,12	0,12	0,11	0,10	0,05	0,06	0,02	0,18	0,14	0,18	0,06	0,11	0,02																
ST26	0,10	0,11	0,14	0,13	0,07	0,13	0,16	0,12	0,12	0,12	0,11	0,06	0,06	0,06	0,18	0,14	0,17	0,04	0,11	0,06	0,05															
ST27	0,14	0,14	0,16	0,15	0,14	0,05	0,12	0,16	0,05	0,15	0,14	0,14	0,13	0,13	0,19	0,16	0,17	0,13	0,15	0,13	0,14															
ST28	0,20	0,19	0,17	0,19	0,17	0,19	0,20	0,20	0,18	0,18	0,19	0,17	0,19	0,18	0,07	0,17	0,18	0,17	0,19	0,17	0,17	0,19														
ST29	0,17	0,17	0,18	0,18	0,18	0,16	0,17	0,18	0,15	0,18	0,17	0,17	0,16	0,16	0,21	0,18	0,21	0,16	0,18	0,16	0,16	0,17	0,16	0,20												
ST30	0,11	0,11	0,14	0,14	0,07	0,13	0,15	0,13	0,12	0,13	0,11	0,06	0,07	0,06	0,18	0,14	0,18	0,03	0,12	0,06	0,06	0,03	0,13	0,18	0,16											
ST31	0,10	0,11	0,13	0,13	0,07	0,12	0,16	0,13	0,12	0,12	0,10	0,04	0,05	0,05	0,18	0,15	0,18	0,06	0,12	0,05	0,05	0,06	0,14	0,18	0,16	0,06										
ST32	0,11	0,11	0,14	0,14	0,07	0,13	0,15	0,13	0,12	0,12	0,11	0,06	0,07	0,06	0,18	0,14	0,18	0,04	0,12	0,06	0,05	0,04	0,13	0,17	0,17	0,04	0,06									
ST33	0,16	0,17	0,16	0,16	0,15	0,16	0,17	0,15	0,16	0,16	0,15	0,15	0,16	0,15	0,18	0,16	0,19	0,15	0,16	0,15	0,15	0,15	0,17	0,18	0,18	0,15	0,15	0,15								
ST34	0,16	0,16	0,16	0,16	0,15	0,16	0,18	0,15	0,16	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,18	0,16	0,18	0,15	0,16	0,15	0,15	0,15	0,17	0,18	0,18	0,15	0,15	0,15	0,05							
ST35	0,17	0,17	0,15	0,16	0,14	0,16	0,20	0,15	0,16	0,15	0,16	0,14	0,16	0,15	0,19	0,13	0,19	0,15	0,16	0,14	0,15	0,14	0,17	0,18	0,19	0,15	0,15	0,15	0,18	0,16						
ST36	0,17	0,17	0,16	0,16	0,14	0,16	0,20	0,16	0,16	0,16	0,15	0,14	0,15	0,15	0,19	0,14	0,20	0,15	0,16	0,15	0,15	0,14	0,17	0,19	0,19	0,15	0,15	0,15	0,18	0,17	0,03					
ST37	0,17	0,17	0,16	0,17	0,15	0,16	0,20	0,16	0,16	0,17	0,16	0,16	0,17	0,16	0,19	0,15	0,21	0,16	0,17	0,16	0,15	0,15	0,17	0,19	0,19	0,16	0,16	0,16	0,18	0,17	0,05	0,05				
ST38	0,17	0,18	0,16	0,17	0,15	0,16	0,20	0,17	0,16	0,16	0,16	0,15	0,16	0,15	0,19	0,14	0,20	0,16	0,17	0,15	0,14	0,17	0,19	0,19	0,15	0,16	0,16	0,15	0,18	0,17	0,05	0,06	0,06			
ST39	0,05	0,07	0,14	0,13	0,11	0,14	0,16	0,13	0,13	0,13	0,07	0,10	0,10	0,10	0,21	0,15	0,18	0,11	0,13	0,10	0,10	0,11	0,14	0,20	0,17	0,11	0,10	0,11	0,15	0,15	0,16	0,17	0,17	0,17		
ST40	0,10	0,11	0,15	0,14	0,07	0,13	0,16	0,13	0,12	0,13	0,11	0,06	0,07	0,06	0,18	0,15	0,18	0,03	0,12	0,06	0,06	0,03	0,14	0,17	0,16	0,02	0,06	0,04	0,15	0,15	0,15	0,15	0,16	0,15	0,10	
ST41	0,18	0,19	0,17	0,19	0,17	0,17	0,21	0,18	0,16	0,19	0,17	0,18	0,19	0,18	0,20	0,17	0,02	0,17	0,19	0,18	0,18	0,17	0,17	0,18	0,21	0,18	0,17	0,18	0,18	0,18	0,19	0,20	0,20	0,20	0,18	0,18

Figura suplementaria 1. Análisis de distancias por pares entre las secuencias nucleotídicas completas del gen de la subunidad menor del RNA ribosómico (ssu-rRNA) de los 36 subtipos de *Blastocystis* descritos hasta el momento y el nuevo subtipo ST41 descrito en esta tesis doctoral. Se muestra el número promedio de sustituciones de bases por sitio. ST, subtipo.

Tabla suplementaria 3. Genomas de *Morganella morganii* procedentes de estudios previos disponibles en GenBank empleados en este estudio con fines comparativos.

Cepa	Número de acceso a GenBank	Muestra de procedencia
11759	GCA_018141465.1	Orina
12304	GCA_018802585.1	Desconocido
81703	GCA_018802525.1	Desconocido
229813	GCA_011465095.1	Sangre
516602	GCA_018802405.1	Desconocido
621164	GCA_018802565.1	Desconocido
715394	GCA_018802545.1	Desconocido
AR_0057	GCA_002968775.1	Desconocido
AR_0133	GCA_003071325.1	Desconocido
ATCC 25830	GCA_006094455.1	Desconocido
CTX51T	CP076623.1	Adenocarcinoma cecal
DG56-16	GCA_003573445.1	Hígado
FDAARGOS_1085	GCA_016727445.1	Desconocido
FDAARGOS_172	GCA_001558895.2	Orina
FDAARGOS_365	GCA_002386305.1	Heces
FDAARGOS_63	GCA_000783955.2	Herida
GDMM86	GCA_016618235.1	Ambiental
GN28	GCA_018802425.1	Desconocido
Jiangxi	GCA_013378135.1	Desconocido
KC-Tt-01	GCA_002891475.1	Fluido pericárdico
KT	GCA_000286435.2	Sangre
L241	GCA_003955965.1	Heces
MGYG-HGUT-02512	GCA_902387845.1	Intestino
MM46903	GCA_016939515.1	Úlcera por presión
MM48659	GCA_016939575.1	Orina
MM50821	GCA_016939635.1	Espujo
MP63	GCA_010748915.1	Aguas residuales
N18-00103	GCA_010365245.1	Espujo
NCTC12028	GCA_900478755.1	Heces
NCTC235	GCA_900635025.1	Desconocido
SMM01	GCA_015698325.1	Orina
ZJC25	GCA_018802505.1	Desconocido
ZJD581	GCA_018802485.1	Desconocido
ZJG812	GCA_018802465.1	Desconocido
ZJG944	GCA_018802445.1	Desconocido

ARTÍCULOS PUBLICADOS

10 ARTÍCULOS PUBLICADOS

Received: 29 March 2023 | Revised: 12 May 2023 | Accepted: 13 May 2023

DOI: 10.1111/jeu.12978

SHORT COMMUNICATION



Identification and validation of novel *Blastocystis* subtype ST41 in a Colombian patient undergoing colorectal cancer screening

Carolina Hernández-Castro^{1,2} | Jenny G. Maloney³ | Sonia P. Agudelo-López² | Miguel A. Toro-Londoño² | Jorge H. Botero-Garcés² | María C. Orozco² | Yulieth C. Quintero-Quinchia² | Juan C. Correa-Cote⁴ | Alejandro Múnera-Duque⁴ | Juan C. Ricaurte-Ciro⁴ | Luis I. Londoño-Álvarez⁴ | René M. Escobar⁴ | Pamela C. Köster¹ | Sergio Sánchez⁵ | David Carmena^{1,6} | Mónica Santín³

¹Parasitology Reference and Research Laboratory, Spanish National Centre for Microbiology, Health Institute Carlos III, Madrid, Spain

²Parasitology Group, Faculty of Medicine, Academic Corporation for the Study of Tropical Pathologies, University of Antioquia, Medellín, Colombia

³Environmental Microbial and Food Safety Laboratory, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Beltsville, Maryland, USA

⁴Clinica Medellín, Grupo Quironsalud, Medellín, Colombia

⁵Food and Waterborne Bacterial Infections Reference and Research Laboratory, National Centre for Microbiology, Health Institute Carlos III, Madrid, Spain

⁶Center for Biomedical Research Network (CIBER) in Infectious Diseases, Health Institute Carlos III, Madrid, Spain

Correspondence

David Carmena, Parasitology Reference and Research Laboratory, Spanish National Centre for Microbiology, Health Institute Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo km, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain.
Email: dacarmena@isciii.es

Mónica Santín, Environmental Microbial and Food Safety Laboratory, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Beltsville, MD 20705, USA.
Email: monica.santin-duran@usda.gov

Funding information

Instituto de Salud Carlos III, Grant/Award Number: PI19CIII/00029

Abstract

Blastocystis sp. is among the most frequent intestinal protists identified in humans globally. However, characterization of *Blastocystis* subtype diversity in humans is ongoing. We report here the identification of novel *Blastocystis* subtype ST41 in a Colombian patient undergoing colorectal cancer screening involving colonoscopy and fecal testing (microscopy, culture, PCR). The full-length *ssu* rRNA gene sequence of the protist was generated using MinION long-read sequencing technology. The validity of the novel subtype was confirmed via phylogenetic and pairwise distance analyses of the full-length ST41 sequence and all other valid subtypes. The study provides reference material essential for conducting subsequent experimental studies.

KEYWORDS

human, MinION, molecular epidemiology, small subunit ribosomal RNA gene, ST41, subtype

INTRODUCTION

BLASTOCYSTIS sp. is a common anaerobic protist in humans, yet its role in health and disease remains controversial. *Blastocystis* colonization/infection has been associated with acute or chronic intestinal (diarrhea and irritable bowel syndrome) and extraintestinal (urticaria and reactive arthritis) disorders and is often nonresponsive to conventional antibiotics (Tan, 2008). *Blastocystis* could also exacerbate colon carcinogenesis via alteration of host immune response and increased oxidative damage (Kumarasamy et al., 2017, 2022; Sulżyc-Bielicka et al., 2021). The parasite encompasses at least 36 subtypes (ST; ST1–ST17, ST21, and ST23–ST40) identified based on sequence analyses of the small subunit ribosomal RNA (*ssu* rRNA) gene (Maloney et al., 2023; Stensvold et al., 2023; Stensvold & Clark, 2020; Yu et al., 2023). Of those 36 STs, 15 have been identified in humans, including ST1–ST10, ST12, ST14, ST16, ST23, and ST35 (Alfellani, Stensvold, et al., 2013; Alfellani, Taner-Mulla, et al., 2013; Jinatham et al., 2021; Khaled et al., 2020; Osorio-Pulgarin et al., 2021; Maloney et al., 2023; Ramirez et al., 2016). Among STs identified in humans, ST1–ST4 represent nearly 90% of subtyped human isolates (Popruk et al., 2021) although with varying prevalence across populations and geographical areas (Alfellani, Stensvold, et al., 2013; Alfellani, Taner-Mulla, et al., 2013; Jimenez et al., 2023; Nemati et al., 2021). *Blastocystis* subtypes exhibit substantial variation in gene repertoire, so its pathogenicity may be dependent on genetic differences affecting virulence factors and its association with gut microbiome profile (Beghini et al., 2017; Deng et al., 2022). Notably, no clear link between a particular *Blastocystis* subtype and the occurrence of clinical manifestations has been proven so far. Subtype and strain level analyses are needed to elucidate the pathogenic potential of *Blastocystis* subtypes or intrasubtype strains (Tito et al., 2019).

MATERIALS AND METHODS

Case

A 69-year-old male with blood in the stool secondary to radiation proctitis after prostate cancer treatment attended an outpatient gastroenterology clinic in Medellín (Colombia) for a colonoscopy. The patient suffered from type 2 diabetes and hypertension and had a previous history of intestinal polyps, iron-deficiency anemia, a resolved prostate cancer episode, and smoking in the past 15 years. The initial physical examination was unremarkable. The patient was afebrile, and vital signs were within normal limits. Digital rectal examination revealed normal sphincter function and no hard masses/

nodules. A fecal specimen was collected from the patient as part of the routine medical visit.

Approval of the study protocol was obtained from the ethics committees of Medical Research Institute, Faculty of Medicine, University of Antioquia (Ref. 006 13.05.2021) and of the Imbanaco Medical Centre in Cali (Ref. CEI-2 11.08.2021).

Microscopy examination

Detection of parasitic forms (trophozoites, cysts, oocysts, eggs, and larvae) was performed by direct microscopic examination of both fresh smears and concentrated fecal material using MiniParasep® SF devices (Apacor) in saline and iodine solutions. Thin smears were also prepared and stained by Ziehl-Neelsen technique for the specific identification of Apicomplexan parasites including *Cryptosporidium* spp. Examination was conducted at 100× and 400× magnification (fresh smears) or 1000× (stained slides).

In vitro culture

Approximately 1 g of fresh fecal material was inoculated into 10 mL of modified Jones medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Clark & Stensvold, 2016). The culture was incubated at 37°C for 48–72 h and microscopically examined at 100× and 400× magnification for the presence of especially vacuolar but also other stages of *Blastocystis*. The positive sample was sequentially subcultured three times in fresh medium to increase the amount of *Blastocystis* cells. Then, *Blastocystis* suspensions were centrifuged at 2500 g for 1 min and the obtained pellet was cryopreserved at –80°C.

Molecular detection and characterization of *Blastocystis* using Sanger sequencing

Blastocystis DNA was amplified by a direct PCR protocol targeting a 600-bp fragment of the *ssu* rRNA gene using the pan-*Blastocystis*, barcode primer pair BhRDr (5'-GAGCTTTTAACTGCAACAACG-3') and RD5 (5'-ATCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'; Scicluna et al., 2006). Amplicons of the expected size were sequenced in both directions by capillary DNA sequencing electrophoresis using BigDye® Terminator chemistry on an ABI PRISM 3130 automated DNA sequencer (Applied Biosystems). Obtained consensus sequence was aligned to appropriate reference sequences using the MEGA version 11 software (Tamura et al., 2021) to identify the *Blastocystis* subtypes. The nucleotide sequence generated was deposited in GenBank under the accession number OQ703059.

Subtype identification using next-generation amplicon sequencing

A next-generation amplicon sequencing strategy was used to detect and subtype *Blastocystis*, as described previously (Maloney, Lombard, et al., 2019; Maloney, Molokin, & Santin, 2019). Briefly, a PCR using primers ILMN_Blast505_532F (5'-TCGTCGGCAGC GTCAGATGTGTATAAGAGACAGG GAG GTA GTGACAATAAATC-3') and ILMN_Blast998_1017R (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGA GACAGTGCCTTTCGCACTTGTTCATC-3'; adapter sequences underlined) was used to amplify a fragment of the *ssu* rRNA gene (ca. 500 bp). These primers were identical to Blast505_532F/Blast998_1017R (Santin et al., 2011), with the exception of containing Illumina overhang adapter sequences on the 5' end. Final libraries were quantified by Qubit fluorometric quantitation (Invitrogen) prior to normalization. A final pooled library concentration of 8 pM with 20% PhiX control was sequenced using an Illumina MiSeq and a 600-cycle v3 kit (Illumina). Paired-end reads were processed and analyzed with an in-house pipeline as previously described (Maloney, Lombard, et al., 2019; Maloney, Molokin, & Santin, 2019). The nucleotide sequence generated was deposited in GenBank under the accession number OQ703045.

PCR amplification and sequencing of the full-length *ssu* rRNA gene

To obtain the full-length nucleotide sequence of the *ssu* rRNA gene of the *Blastocystis* isolate, a previously described PCR and Nanopore sequencing strategy was used (Maloney et al., 2020). Amplification reactions were carried out using the MinION-tailed primers forward (5'-TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCAACCTG GTTGATCCTGCCAGTAGTC-3') and reverse (5'-ACT TGCCTGTCGCTCTATCTTCTGTCCTTCTGCA GGTTCACCTACG-3'; MinION adapter nucleotide sequences underlined). Purified PCR amplicons were quantified on a Qubit fluorometer (Invitrogen). To prepare the Nanopore sequencing libraries, the Oxford Nanopore Technologies (ONT) SQK-LSK112 Ligation kit combined with EXP-PBC001 PCR Barcoding Expansion (ONT) were used following the manufacturer's protocol for Ligation Sequencing amplicons—PCR Barcoding Amplicons (PBA12_9151_v112_revD_09Feb2022) and loading guidelines for R10.4 flow cells (FLO-MIN112). Basecalling was performed using the "ont_guppy_duplex_pipeline" v1.0.1 and Guppy v6.1.2 with the flags --call_non_duplex_reads and --do_read_splitting. Briefly, the pipeline first performed simplex basecalling using the FAST model to identify duplex read pairs. Next, duplex basecalling was performed on the pairs using the SUP model. And lastly, nonduplex reads were called

using the SUP model. The config file used by the SUP model was dna_r10.4_c8.1_sup.cfg, and the default minimum qscore of 10 was used to filter reads. Basecalled reads were demultiplexed using the guppy_barcode tool. FASTQ reads were then length filtered to include only reads between 1700 and 2100 nucleotides. Read processing and consensus building were performed as described previously (Maloney et al., 2020). The nucleotide sequence generated was deposited in GenBank under the accession number OQ703608.

Phylogenetic analyses

The full-length *ssu* rRNA gene nucleotide sequences obtained in this study and *Blastocystis* reference nucleotide sequences for all currently accepted subtypes were included to generate a phylogenetic tree artificially rooted using *Proteromonas lacertae* as an outgroup. Phylogenetic analyses using the neighbor-joining (NJ) method and pairwise distances were performed with the Kimura 2-parameter model after alignment with the Clustal W algorithm using MEGA version 11 (Kimura, 1980; Tamura et al., 2021). Bootstrapping with 1000 replicates was used to determine support for the clades generated.

RESULTS AND DISCUSSION

Colonoscopy yielded normal results with no evidence of mass, polyps, or diverticulum. Direct microscopy examination of fresh fecal smears revealed the presence of forms compatible with *Blastocystis*. Additionally, commensal *Endolimax nana* and *Entamoeba coli* cysts were identified. Jones medium culture confirmed the presence of *Blastocystis* with observation of vacuolar forms (mean diameter: 12.5 µm; range: 10–15 µm; standard deviation: 2.0; n=4). Observed vacuolar forms did not show distinctive morphological features compared with other *Blastocystis* subtypes for which those measurements are currently available (Figure S1).

PCR using the barcoding primers confirmed the presence of *Blastocystis*. The nucleotide sequence of the barcoding region, a fragment of approximately 600 bp of the *ssu* rRNA gene, had ST17 as the most similar nucleotide sequence available in the GenBank database at 99% with GenBank Accession Numbers KC148208 (601/607), OP866807 (600/606), and MK251248 (598/604), MW785820 (598/604), MW785821 (598/604), and MK251247 (597/604). Those nucleotide sequences were obtained from mammalian hosts (rabbits and rodents). Additionally, there were three other *Blastocystis* nucleotide sequences with a 99% similarity from samples obtained from two central bearded dragons (OM185566 and OM185567; 591/594) and one leopard gecko (OM185565; 590/594). Barcoding region sequences have previously

shown higher sequence similarity than the Santin region and full-length of the *ssu* RNA gene with up to 99% sequence similarity observed between currently established subtype pairs such as ST24/ST25, ST14/ST24, ST14/ST25, ST10/ST23, and ST21/ST26 (Maloney & Santin, 2021). To confirm the finding and accurately subtype the isolate, a DNA sample was sent to the Environmental Microbial and Food Safety Laboratory of USDA, ARS. A nucleotide sequence for a fragment of the *ssu* RNA gene (Santin region; ca. 500bp) generated by Illumina sequencing also identified ST17 nucleotide sequences as the most similar match to nucleotide sequences available in the GenBank database, but with a lower percentage of similarity (97%), with GenBank Accession Numbers MK244933 (545/562), MH634458 (544/562), KC148208 (544/562), MH634460 (543/562), and MH634459 (543/562). Those nucleotide sequences were obtained from mammalian hosts (cattle and a rodent). When a consensus nucleotide sequence was generated (1007bp) using the Sanger (barcoding region) and the MiSeq (Santin region) sequences, the most similar nucleotide sequence available in the GenBank database was KC148208 (986/1010) at 98%.

The sequence was suspected of being a novel subtype based on the percentage of similarity when compared to nucleotide sequences available in the GenBank database. To confirm the status of this isolate as either a new subtype or as ST17, long-read sequencing using Oxford Nanopore Technology's MinION was used to obtain the full-length *ssu* rRNA gene for this isolate. A nucleotide sequence of 1999bp was generated, and when compared to available sequences in GenBank, the most similar nucleotide sequence was KC148208 at 98% (1956/1999).

The validity of the novel subtype was confirmed via phylogenetic and pairwise distance analyses using the full-length *ssu* rRNA gene sequence obtained in this study and reference sequences for all currently valid subtypes. The percentage of sequence similarity between the novel subtype and known subtypes was assessed using pairwise distance comparisons (Figure S2). Similarity was 98% with ST17 and less with all other valid STs. As the full-length *ssu* rRNA gene sequence of this isolate varies from any valid subtype by at least 98%, the subtype designation of ST41 will be given to this ST. Phylogenetic analysis of full-length sequences using the NJ method showed ST41 and ST17 form a cluster and branch with bootstrap support of 100 (Figure 1).

The novel subtype ST41 is most similar to ST17. ST17 has previously been reported in few studies mostly involving rodent species (captive, pet, and wild; AbuOdeh et al., 2019; Alfellani, Stensvold, et al., 2013; Alfellani, Taner-Mulla, et al., 2013; Chai et al., 2020; Deng et al., 2021; Helenbrook & Whipps, 2021; Martinez-Hernandez et al., 2020). These findings suggest that rodents may be the primary hosts of *Blastocystis* ST17.

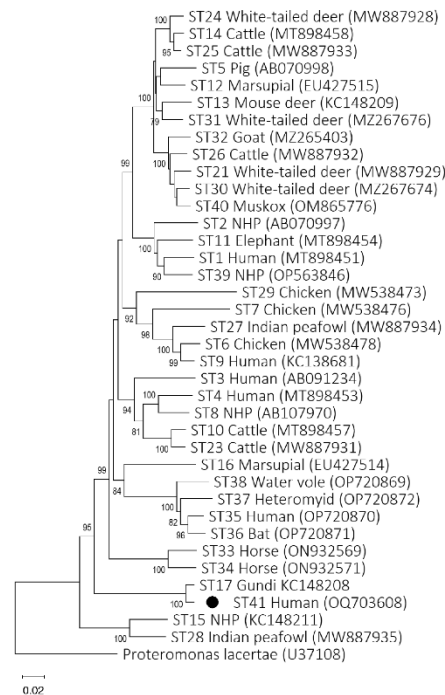


FIGURE 1 Phylogenetic relationships among *Blastocystis* full-length *ssu* rRNA gene nucleotide sequence generated in this study (represented with a black filled circle) and reference nucleotide sequences for all currently accepted subtypes. *Proteromonas lacertae* was used as outgroup to artificially root the tree. Analysis was conducted using the neighbor-joining method with genetic distances calculated using the Kimura two-parameter model. This analysis involved 38 nucleotide sequences, and there was a total of 1951 positions in the final dataset. Bootstrap values lower than 75% are not displayed.

However, sporadic cases of ST17 have been reported in cattle (Maloney, Lombard, et al., 2019; Maloney, Molokin, & Santin, 2019), captive animals including a squirrel monkey and a black bear (Deng et al., 2021), rabbits (unpublished; OP866807), and even in reptiles (unpublished; OM185565, OM185566, and OM185567). More studies that include full-length sequences from isolates belonging to this clade will be necessary to fully understand host range and specificity of ST17 and novel ST41.

As the patient sampled in this study declared no regular contact with domestic or wild animals, the origin of this colonization/infection remains unclear. Cultured *Blastocystis* cells have been demonstrated to be resistant to drinking water disinfectants including chlorine and hydrogen peroxide (Martin-Escolano

et al., 2023). Drinking of either untreated or chlorinated water contaminated with fecal material from rodents is, therefore, a potential source of *Blastocystis* ST41. Following the same line of reasoning, foodborne transmission (e.g. ingestion of fresh produce) cannot be ruled out either (Caradonna et al., 2017; Rodrigues et al., 2020).

Despite the research conducted in recent years, the clinical significance and pathogenic potential of *Blastocystis* remains elusive (Stensvold et al., 2009). Several surveys have suggested a subtype-dependent variation in the pathogenicity of the protist. The strongest evidence comes from ST4, which has been linked with diarrhea in clinical populations in Denmark (Stensvold et al., 2011), Italy (Mattiucci et al., 2016), and Spain (Dominguez-Márquez et al., 2009). In humans, *Blastocystis* ST4 has a clonal population structure and is more commonly found in Europe. These features suggest that ST4 may have entered the human population relatively recently in evolutionary terms (Stensvold et al., 2012). If this is true, limited co-evolution with humans can explain, at least partially, the link of ST4 with gastrointestinal manifestations. Under this argumentative line, other poorly human-adapted *Blastocystis* subtypes might have also an increased role in pathogenicity. For example, ST6 isolated from an Iranian patient with gastrointestinal disorder was associated with higher protease activity than ST1, ST2, and ST3 isolated from either symptomatic or asymptomatic Iranian subjects (Karamati et al., 2021). Similarly, cysteine proteases including cathepsin B and a legumain have been isolated in the supernatant of an axenic cultured ST7 isolate obtained from a Singaporean patient with intestinal disorder (Wawrzyniak et al., 2012). Indeed, *Blastocystis* ST7 has been demonstrated to cause epithelial barrier disruption and was associated with metronidazole resistance in in vitro cell culture assays (Wu et al., 2014). Despite the fact that *Blastocystis* ST41 carriage in humans seems infrequent, it would be interesting to conduct similar studies in order to assess its potential clinical relevance.

In conclusion, we report here the description of novel *Blastocystis* ST41 in humans. It is advised that when a sequence using the barcoding region shows a similarity of 99% or less with a previously reported subtype, to properly assign a subtype to that *Blastocystis* isolate, other regions of the *ssu* RNA gene should be sequenced. Due to the conserved nature of the barcoding region, differentiating all subtypes is not achievable using this segment of the gene. Our case suggests that further clinical observations and investigations are needed to identify subtypes and to explore whether *Blastocystis* subtypes may display pathogenic properties or whether they are commensal organisms. This *Blastocystis* human isolate has been successfully cultured and cryopreserved, making this biological material available either as reference material or for subsequent molecular or biological testing.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Aleksey Molokin and Nadja S. George for technical assistance. C.H.-C. is the recipient of a PhD fellowship granted by Fundación Carolina and the University of Antioquia, Medellín (Colombia). This article is based upon work from COST Action *Blastocystis* under One Health, CA21105, supported by COST (European Cooperation in Science and Technology).

ORCID

Carolina Hernández-Castro  <https://orcid.org/0000-0003-0731-6078>

Jenny G. Maloney  <https://orcid.org/0000-0002-6405-883X>

Sonia P. Agudelo-López  <https://orcid.org/0000-0003-4558-9341>

Miguel A. Toro-Londoño  <https://orcid.org/0000-0002-7607-5151>

Jorge H. Botero-Garcés  <https://orcid.org/0000-0002-3478-0194>

Juan C. Correa-Cote  <https://orcid.org/0000-0001-5228-4007>

Alejandro Múnera-Duque  <https://orcid.org/0000-0001-5748-6847>

Juan C. Ricaurte-Ciro  <https://orcid.org/0000-0002-2351-7374>

Pamela C. Köster  <https://orcid.org/0000-0001-5963-8824>

Sergio Sánchez  <https://orcid.org/0000-0001-9903-6203>

David Carmena  <https://orcid.org/0000-0002-4015-8553>

Mónica Santín  <https://orcid.org/0000-0002-1386-6255>

REFERENCES

- AbuOdeh, R., Ezzedine, S., Madkour, M., Stensvold, C.R., Samie, A., Nasrallah, G. et al. (2019) Molecular subtyping of *Blastocystis* from diverse animals in The United Arab Emirates. *Protist*, 170, 125679.
- Alfellani, M.A., Stensvold, C.R., Vidal-Lapiedra, A., Onuoha, E.S., Fagbenro-Beyioku, A.F. & Clark, C.G. (2013) Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Tropica*, 126, 11–18.
- Alfellani, M.A., Taner-Mulla, D., Jacob, A.S., Imeede, C.A., Yoshikawa, H., Stensvold, C.R. et al. (2013) Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. *Protist*, 164, 497–509.
- Beghini, F., Pasolli, E., Truong, T.D., Putignani, L., Cacciò, S.M. & Segata, N. (2017) Large-scale comparative metagenomics of *Blastocystis*, a common member of the human gut microbiome. *ISME Journal*, 11, 2848–2863.
- Caradonna, T., Marangi, M., Del Chierico, F., Ferrari, N., Reddel, S. & Bracaglia, G. (2017) Detection and prevalence of protozoan parasites in ready-to-eat packaged salads on sale in Italy. *Food Microbiology*, 67, 67–75.
- Chai, Y., Deng, L., Liu, H., Yao, J., Zhong, Z., Fu, H. et al. (2020) First subtyping of *Blastocystis* sp. from pet rodents in southwestern China. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 11, 143–148.
- Clark, C.G. & Stensvold, C.R. (2016) *Blastocystis*: isolation, xenocultivation, and cryopreservation. *Current Protocols in Microbiology*, 43, 20A.1.1–20A.1.8.

- Deng, L., Lee, J.W.J. & Tan, K.S.W. (2022) Infection with pathogenic *Blastocystis* ST7 is associated with decreased bacterial diversity and altered gut microbiome profiles in diarrheal patients. *Parasites & Vectors*, 15, 312.
- Deng, L., Yao, J., Chen, S., He, T., Chai, Y., Zhou, Z. et al. (2021) First identification and molecular subtyping of *Blastocystis* sp. in zoo animals in southwestern China. *Parasites & Vectors*, 14, 11.
- Dominguez-Márquez, M.V., Guna, R., Muñoz, C., Gómez-Muñoz, M.T. & Borrás, R. (2009) High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). *Parasitology Research*, 105, 949–955.
- Helenbrook, W.D. & Whipps, C.M. (2021) Molecular characterization of *Blastocystis* in captive and free-ranging new world primates, Platyrrhini. *Acta Parasitologica*, 66, 1267–1273.
- Jimenez, P., Munoz, M. & Ramirez, J.D. (2023) An update on the distribution of *Blastocystis* subtypes in the Americas. *Helyon*, 8, e12592.
- Jinatham, V., Maxamhud, S., Popluechai, S., Tsaousis, A.D. & Gentekaki, E. (2021) *Blastocystis* one health approach in a rural community of northern Thailand: Prevalence, subtypes and novel transmission routes. *Frontiers in Microbiology*, 12, 746340.
- Karamati, S.A., Mirjalali, H., Niyyati, M., Yadegar, A., Asadzadeh Aghdaei, H., Haghighi, A. et al. (2021) Association of *Blastocystis* ST6 with higher protease activity among symptomatic subjects. *BMC Microbiology*, 21, 285.
- Khaled, S., Gantois, N., Ly, A.T., Senghor, S., Even, G., Dautel, E. et al. (2020) Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in Senegalese school children. *Microorganisms*, 8(9), 1408. Available from: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091408>
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111–120.
- Kumarasamy, V., Atroosh, W.M., Anbazhagan, D., Abdalla, M.M.I. & Azzani, M. (2022) Association of *Blastocystis hominis* with colorectal cancer: a systematic review of *in vitro* and *in vivo* evidences. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 14, 734–745.
- Kumarasamy, V., Kuppusamy, U.R., Jayalakshmi, P., Samudi, C., Ragavan, N.D. & Kumar, S. (2017) Exacerbation of colon carcinogenesis by *Blastocystis* sp. *PLoS One*, 12, e0183097.
- Maloney, J.G., Lombard, J.E., Urie, N.J., Shivley, C.B. & Santin, M. (2019) Zoonotic and genetically diverse subtypes of *Blastocystis* in US pre-weaned dairy heifer calves. *Parasitology Research*, 118, 575–582.
- Maloney, J.G., Molokin, A. & Santin, M. (2019) Next generation amplicon sequencing improves detection of *Blastocystis* mixed subtype infections. *Infection, Genetics and Evolution*, 73, 119–125.
- Maloney, J.G., Molokin, A., Seguí, R., Maravilla, P., Martínez-Hernández, F., Villalobos, G. et al. (2023) Identification and molecular characterization of four new *Blastocystis* subtypes designated ST35–ST38. *Microorganisms*, 11, 46.
- Maloney, J.G. & Santin, M. (2021) Mind the gap: new full-length sequences of *Blastocystis* subtypes generated via Oxford Nanopore MinION sequencing allow for comparisons between full-length and partial sequences of the small subunit of the ribosomal RNA gene. *Microorganisms*, 9, 997.
- Maloney, J.G., Molokin, A. & Santin, M. (2020) Use of Oxford Nanopore MinION to generate full-length sequences of the *Blastocystis* small subunit (SSU) rRNA gene. *Parasites & Vectors*, 13, 595.
- Martín-Escobano, R., Ng, G.C., Tan, K.S.W., Stensvold, C.R., Gentekaki, E. & Tsaousis, A.D. (2023) Resistance of *Blastocystis* to chlorine and hydrogen peroxide. *Parasitology Research*, 122, 167–176.
- Martínez-Hernández, F., Martínez-Ibarra, J.A., López-Escamilla, E., Villanueva-García, C., Muñoz-García, C.I., Rendon-Franco, E. et al. (2020) Molecular genotyping of *Blastocystis* spp. in wild mammals from Mexico. *Parasitology Research*, 119, 97–104.
- Mattiucci, S., Crisafi, B., Gabrielli, S., Paoletti, M. & Cancrini, G. (2016) Molecular epidemiology and genetic diversity of *Blastocystis* infection in humans in Italy. *Epidemiology and Infection*, 144, 635–646.
- Nemati, S., Reza Zali, M., Johnson, P., Mirjalali, H. & Karanis, P. (2021) Molecular prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in Asia and Australia. *Journal of Water Health*, 19, 687–704.
- Osorio-Pulgarín, M.I., Higuera, A., Beltrán-Álzar, J.C., Sánchez-Jiménez, M. & Ramírez, J.D. (2021) Epidemiological and molecular characterization of *Blastocystis* infection in children attending daycare centers in Medellín, Colombia. *Biology (Basel)*, 10, 669.
- Popruk, S., Adao, D.E.V. & Rivera, W.L. (2021) Epidemiology and subtype distribution of *Blastocystis* in humans: a review. *Infection, Genetics and Evolution*, 95, 105085.
- Ramírez, J.D., Sánchez, A., Hernández, C., Flórez, C., Bernal, M.C., Giraldo, J.C. et al. (2016) Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. *Infection, Genetics and Evolution*, 41, 32–35.
- Rodrigues, A.C., da Silva, M.D.C., Pereira, R.Â.S. & Pinto, L.C. (2020) Prevalence of contamination by intestinal parasites in vegetables (*Lactuca sativa* L. and *Coriandrum sativum* L.) sold in markets in Belém, northern Brazil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100, 2859–2865.
- Santin, M., Gómez-Muñoz, M.T., Solano-Aguilar, G. & Fayer, R. (2011) Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitology Research*, 109, 205–212.
- Scicluna, S.M., Tawari, B. & Clark, C.G. (2006) DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist*, 157, 77–85.
- Stensvold, C.R., Alfellani, M. & Clark, C.G. (2012) Levels of genetic diversity vary dramatically between *Blastocystis* subtypes. *Infection, Genetics and Evolution*, 12, 263–273.
- Stensvold, C.R., Berg, R.P.K.D., Maloney, J.G., Molokin, A. & Santin, M. (2023) Molecular characterization of *Blastocystis* and *Entamoeba* of muskoxen and sheep in Greenland. *International Journal for Parasitology* (in press).
- Stensvold, C.R., Christiansen, D.B., Olsen, K.E. & Nielsen, H.V. (2011) *Blastocystis* sp. subtype 4 is common in Danish *Blastocystis*-positive patients presenting with acute diarrhea. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84, 883–885.
- Stensvold, C.R. & Clark, C.G. (2020) Pre-empting Pandora's box: *Blastocystis* subtypes revisited. *Trends in Parasitology*, 36, 229–232.
- Stensvold, C.R., Lewis, H.C., Hammerum, A.M., Porsbo, L.J., Nielsen, S.S., Olsen, K.E. et al. (2009) *Blastocystis*: unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite. *Epidemiology and Infection*, 137, 1655–1663.
- Sulżyc-Bielicka, V., Kołodziejczyk, L., Adamska, M., Skotarczak, B., Jaczewska, S., Safranow, K. et al. (2021) Colorectal cancer and *Blastocystis* sp. infection. *Parasites & Vectors*, 14, 200.
- Tamura, K., Stecher, G. & Kumar, S. (2021) MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38, 3022–3027.
- Tan, K.S. (2008) New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clinical Microbiology Reviews*, 21, 639–665.
- Tito, R.Y., Chaffron, S., Caenepeel, C., Lima-Mendez, G., Wang, J., Vieira-Silva, S. et al. (2019) Population-level analysis of *Blastocystis* subtype prevalence and variation in the human gut microbiota. *Gut*, 68, 1180–1189.
- Wawrzyniak, I., Texier, C., Poirier, P., Viscogliosi, E., Tan, K.S., Delbac, F. et al. (2012) Characterization of two cysteine proteases secreted by *Blastocystis* ST7, a human intestinal parasite. *Parasitology International*, 61, 437–442.
- Wu, Z., Mirza, H. & Tan, K.S. (2014) Intra-subtype variation in enteroadhesion accounts for differences in epithelial barrier disruption and is associated with metronidazole resistance in

Blastocystis subtype-7. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8, e2885.

Yu, M., Yao, Y., Xiao, H., Xie, M., Xiong, Y., Yang, S. et al. (2023) Extensive prevalence and significant genetic differentiation of *Blastocystis* in high- and low-altitude populations of wild rhesus macaques in China. *Parasites & Vectors*, 16, 107.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Hernández-Castro, C., Maloney, J.G., Agudelo-López, S.P., Toro-Londoño, M.A., Botero-Garcés, J.H., Orozco, M.C. et al. (2023) Identification and validation of novel *Blastocystis* subtype ST41 in a Colombian patient undergoing colorectal cancer screening. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 00, e12978. Available from: <https://doi.org/10.1111/jeu.12978>



8 | Microbial Genetics | Announcement

Draft genome sequences of four *Morganella morganii* strains isolated from Colombian colorectal cancer patient stool specimens

Carolina Hernández-Castro,^{1,2} Alejandro Múnera Duque,^{3,4} Juan Pablo Hoyos Burgos,⁴ Miguel Ángel Toro Londoño,¹ Sonia del Pilar Agudelo López,¹ David Carmena,^{2,5} Sergio Sánchez⁶

AUTHOR AFFILIATIONS See affiliation list on p. 2.

ABSTRACT We report the draft genome sequences of four *Morganella morganii* strains isolated from the stools of four patients diagnosed with colorectal cancer (CRC) in Medellín, Colombia. These genomes represent an important addition to the limited number of genomes of *M. morganii* strains originating from CRC patients currently available.

KEYWORDS *Morganella morganii*, colorectal cancer

Morganella morganii is a Gram-negative, facultative anaerobic commensal bacterium of the human intestinal tract recognized as an important opportunistic pathogen (1) in a wide range of nosocomial and community-acquired infections (2–4). In addition, it has been shown that *M. morganii* is enriched in the gut microbiota of inflammatory bowel disease and colorectal cancer (CRC) patients and it has even been shown to produce a previously undescribed family of genotoxins, termed the indolimines, and causing increased intestinal permeability and exacerbated colon tumorigenesis in gnotobiotic mice (5). However, to the best of our knowledge, only one *M. morganii* strain isolated from CRC patient stool specimens has been sequenced so far (6); hence, additional genomes are needed to facilitate comparative genomic analyses and to elucidate the potential role of *M. morganii* in the development of CRC.

Strains were isolated in 2022 from the stools of four adult males diagnosed with CRC and hospitalized after colonoscopy in Medellín, Colombia. Real-time PCR based on the 16S rRNA gene was used to detect *M. morganii* from stool specimens (7). Positive specimens were plated onto MacConkey agar (Becton Dickinson, USA) and, following overnight incubation at 37°C, a maximum of ten lactose-negative (colorless) colonies per plate were randomly chosen and identified by biochemical methods (API 20E, BioMérieux, France). Definitive identification of the presumptive *M. morganii* colonies was based on 16S rRNA gene PCR and sequencing (8). According to NCBI BLASTN results, the best match accession numbers were MN807694 (strains IPS008 and IPS040), KM269029 (IPS012), and MN006020 (IPS030).

Morganella morganii strains from our laboratory stocks were overnight cultivated in tryptic soy agar (Becton Dickinson) at 37°C. Genomic DNA was extracted and purified using the NZY Tissue gDNA Isolation Kit (NZYTech, Portugal), according to the manufacturer's instructions. A DNA library was generated using the Illumina DNA Prep Kit (Illumina, USA), according to the manufacturer's instructions, and whole-genome sequencing (WGS) was performed with the Illumina NextSeq 500 platform (Illumina) using 300 cycles and generating 150 bp paired-end reads. The reads were trimmed and filtered according to quality criteria using FastP v0.23.2 and FastQC v0.11.9, respectively (9). The quality-filtered reads were assembled using Unicycler v0.4.8 (10) with *Morganella*

Editor Julie C. Dunning Hotopp, University of Maryland School of Medicine, USA

Address correspondence to Carolina Hernández-Castro, carolina.hernandez1@udea.edu.co.

The authors declare no conflict of interest.

See the funding table on p. 3.

Received 13 November 2023

Accepted 9 January 2024

Published 24 January 2024

Copyright © 2024 Hernández-Castro et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

TABLE 1 Whole-genome characteristics of the sequenced *Morganella morganii* strains^a

	<i>Morganella morganii</i> strain			
	IPS008	IPS012	IPS030	IPS040
No. of reads	5,492,226	5,927,468	5,012,278	5,871,056
Depth of coverage	155×	170×	131×	160×
GC content (%)	51.00	51.14	51.14	50.93
Total length (bp)	3,830,508	3,848,985	3,910,626	3,912,298
Genome fraction (%)	81.06	86.07	85.66	81.31
Number of contigs	18	23	24	22
Contig N50	473,353	402,904	378,793	682,475
Contig L50	2	4	3	2
No. of predicted genes	3,669	3,705	3,744	3,795
No. of RNA genes	77	82	79	78
No. of pseudogenes	44	34	38	47
BioSample number	SAMN37692576	SAMN37692577	SAMN37692578	SAMN37692579

^aAll statistics are based on contigs of size ≥ 500 bp.

morganii strain AR_0057 as the reference genome (accession number NZ_CP027177.1). Contigs shorter than 200 bp were removed to ensure sequencing quality and to meet the requirements for uploading to the NCBI Genome Database. All software was used with default settings unless otherwise specified. Complete genome sequences were obtained for all four *M. morganii* strains and genomes were annotated using the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline v6.6. Detailed information about WGS parameters, assembly, and genome characteristics for individual strains is shown in Table 1.

Approval of the study protocol was obtained from the Ethics Committee of the Medical Research Institute [Faculty of Medicine, University of Antioquia (Ref. 00613.05.2021)], and the Technical Research Committee of the Hospital Alma Máter de Antioquia (Ref. IN32-2021).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank E. Ramírez-Arellano (Reference and Research Laboratory on Resistance to Antibiotics and Infections Related to Healthcare, Health Institute Carlos III) for her skillful technical assistance for generating DNA libraries, A. Zaballos and M. P. Jiménez (Genomic Unit, Health Institute Carlos III) for technical support in the whole-genome sequencing, and I. Cuesta and S. Monzón (Bioinformatics Unit, Health Institute Carlos III) for quality assessment and pre-processing of raw sequencing reads and assembly. C.H.-C. is the recipient of a Ph.D. fellowship granted by Fundación Carolina and the University of Antioquia.

AUTHOR AFFILIATIONS

- ¹Parasitology Group, Faculty of Medicine, Academic Corporation for the Study of Tropical Pathologies, University of Antioquia, Medellín, Colombia
- ²Reference and Research Laboratory on Parasitology, Spanish National Centre for Microbiology, Health Institute Carlos III, Madrid, Spain
- ³Department of Surgery, Faculty of Medicine, University of Antioquia, Medellín, Colombia
- ⁴Hospital Alma Máter de Antioquia, Medellín, Colombia
- ⁵CIBERINFEC, ISCIII - CIBER Infectious Diseases, Health Institute Carlos III, Madrid, Spain
- ⁶Reference and Research Laboratory on Food and Waterborne Bacterial Infections, Spanish National Centre for Microbiology, Health Institute Carlos III, Madrid, Spain

AUTHOR ORCIDs

Carolina Hernández-Castro  <http://orcid.org/0000-0003-0731-6078>
Miguel Ángel Toro Londoño  <http://orcid.org/0000-0002-7607-5151>

Sonia del Pilar Agudelo López  <http://orcid.org/0000-0003-4558-9341>
David Carmena  <http://orcid.org/0000-0002-4015-8553>
Sergio Sánchez  <http://orcid.org/0000-0001-9903-6203>

FUNDING

Funder	Grant(s)	Author(s)
Fundación Carolina (FC)		Carolina Hernández-Castro
Universidad de Antioquia (UdeA)		Carolina Hernández-Castro

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Carolina Hernández-Castro, Investigation, Methodology, Writing – review and editing | Alejandro Múnera Duque, Investigation, Methodology | Juan Pablo Hoyos Burgos, Investigation, Methodology | Miguel Ángel Toro Londoño, Conceptualization, Supervision | Sonia del Pilar Agudelo López, Project administration, Supervision | David Carmena, Conceptualization, Supervision, Writing – review and editing | Sergio Sánchez, Conceptualization, Investigation, Writing – original draft

DATA AVAILABILITY

This whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank as BioProject [PRJNA1024498](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA1024498) under the accession numbers [JAWLLN000000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JAWLLN000000000) (strain IPS008), [JAWLLO000000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JAWLLO000000000) (strain IPS012), [JAWLLP000000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JAWLLP000000000) (strain IPS030), and [JAWLLQ000000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JAWLLQ000000000) (strain IPS040). The versions described in this paper are [JAWLLN010000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JAWLLN010000000), [JAWLLO010000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JAWLLO010000000), [JAWLLP010000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JAWLLP010000000), and [JAWLLQ010000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JAWLLQ010000000), respectively. Corresponding SRA data were deposited under accession numbers [SRR26288169](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRR26288169), [SRR26288168](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRR26288168), [SRR26288167](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRR26288167), and [SRR26288166](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRR26288166).

REFERENCES

1. Liu H, Zhu J, Hu Q, Rao X. 2016. *Morganella morganii*, a non-negligent opportunistic pathogen. *Int J Infect Dis* 50:10–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.07.006>
2. Learman BS, Brauer AL, Eaton KA, Armbruster CE. 2019. A rare opportunist, *Morganella morganii*, decreases severity of polymicrobial catheter-associated urinary tract infection. *Infect Immun* 88:e00691-19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00691-19>
3. Lin TY, Chan MC, Yang YS, Lee Y, Yeh KM, Lin JC, Chang FY. 2015. Clinical manifestations and prognostic factors of *Morganella morganii* bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 34:231–236. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2222-8>
4. Chang HY, Wang SM, Chiu NC, Chung HY, Wang HK. 2011. Neonatal *Morganella morganii* sepsis: a case report and review of the literature. *Pediatr Int* 53:121–123. <https://doi.org/10.1111/j.1442-200X.2010.03241.x>
5. Cao Y, Oh J, Xue M, Huh WJ, Wang J, Gonzalez-Hernandez JA, Rice TA, Martin AL, Song D, Crawford JM, et al. 2022. Commensal microbiota from patients with inflammatory bowel disease produce genotoxic metabolites. *Science* 378:eabm3233. <https://doi.org/10.1126/science.abm3233>
6. Stepanovica M, Zepeda-Rivera MA, McGlinchey AS, Baryames AA, Jones DS, LaCourse KD, Bullman S, Johnston CD. 2022. Complete genome sequence of *Morganella morganii* CTX51T, isolated from a human cecal adenocarcinoma. *Microbiol Resour Announc* 11:e0006622. <https://doi.org/10.1128/mra.00066-22>
7. Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Saeki H, Katano H. 2015. Development of a new real-time PCR system for simultaneous detection of bacteria and fungi in pathological samples. *Int J Clin Exp Pathol* 8:15479–15488.
8. Marin M, García-Lechuz JM, Alonso P, Villanueva M, Alcalá L, Gimeno M, Cercenado E, Sánchez-Somolinos M, Radice C, Bouza E. 2012. Role of universal 16S rRNA gene PCR and sequencing in diagnosis of prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol* 50:583–589. <https://doi.org/10.1128/JCM.00170-11>
9. Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. 2018. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* 34:i884–i890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>
10. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. 2017. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol* 13:e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>

