



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
SECRETARIA DE SALUD

**Benemérito Hospital General con Especialidades
“Juan María De Salvatierra”**

**IDENTIFICACIÓN DE ESCHERICHIA COLI PKS+ Y
BACTEROIDES FRAGILIS ENTEROTOXÍGENA EN
PACIENTES CON CANCER COLORRECTAL.**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN CIRUGIA GENERAL

PRESENTA

DR. JOSÉ HUMBERTO ESPINOZA VELIZ

ASESORES DE TESIS

ASESOR GENERAL:

DR. BENJAMIN CAPIZ CORREA

ASESORES METODOLÓGICOS:

DRA. ANDREA SOCORRO ÁLVAREZ VILLASEÑOR

DRA. MARÍA ANDREA MURILLO GALLO

LA PAZ, BAJA CALIFORNIA SUR

AGOSTO-2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**BENÉMERITO HOSPITAL GENERAL CON ESPECIALIDADES
“JUAN MARIA DE SALVATIERRA”.**

**TESIS DE POSGRADO
IDENTIFICACIÓN DE ESCHERICHIA COLI PKS+ Y BACTEROIDES FRAGILIS
ENTEROTOXÍGENA EN PACIENTES CON CANCER COLORRECTAL.**

PRESENTA

DR. JOSÉ HUMBERTO ESPINOZA VELIZ
R4 DE CIRUGIA GENERAL

DR. BENJAMIN CAPIZ CORREA
ASESOR GENERAL

DRA. ANDREA SOCORRO ÁLVAREZ VILLASEÑOR
ASESOR METODOLÓGICO

DRA. MARÍA ANDREA MURILLO GALLO
ASESOR METODOLOGICO

DR. FRANCISCO CARDOZA MACIAS
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACIÓN
EN CIRUGÍA GENERAL

DR. EDUARDO ALTAMIRANO ÁLVAREZ
SUBDIRECTOR DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN,
CALIDAD Y CAPACITACIÓN

DR. ABRAHAM OSBALDO ARVIZU MONTIJO
SUBDIRECTOR DE ENSEÑANZA Y CALIDAD ESTATAL

Dedicatoria.

A mis padres, Humberto y Edna quienes desde siempre me han dado su amor y apoyo incondicional, me educaron y guiaron por el buen camino, han sido un ejemplo a seguir e hicieron posible que estudiara esta hermosa carrera.

A mis hermanos, Carlos e Izael por su apoyo durante este proceso y ser mis mejores amigos.

A mi esposa María Fernanda y a mi hijo José Humberto, que fue motor el cual me impulso para seguir superándome, sacando todas mis fuerzas para tener bases con las cuales le pueda brindar una buena calidad de vida y una educación como la que tengo.

Agradecimientos.

Al laboratorio de Biotechnologika A2, parte fundamental de este trabajo. A mis maestros que transmitieron conocimientos, habilidades y confianza para poder ejercer esta hermosa profesión, recalcando siempre el humanismo y la humildad ante todos los actos que realice. A mis compañeros residentes los cuales son mis amigos y siempre contarán con mígo en lo que les pueda servir.

Glosario

- CCR. Cáncer colorrectal
- ETBF. *Bacteroides fragilis* enterotoxígena
- BFT. Frangilisina
- Clb. Colibactina
- IL-17. Interleucina 17
- PCR. Reacción en cadena de la polimerasa

índice

Resumen.....	7
Abstract.....	8
Antecedentes.....	10
Marco teórico.....	14
Planteamiento del problema.....	21
Justificación.....	22
Pregunta de investigación.....	23
Hipótesis.....	23
Objetivo.....	23
Material y métodos.....	24
Descripción general del estudio.....	28
Plan de análisis de datos.....	31
Aspectos éticos.....	32
Resultados.....	33
Discusión.....	41
Conclusión.....	43
Bibliografía.....	44
Cronograma	54
Consideraciones éticas.....	55
Comité de bioseguridad.....	59
Anexos.....	64

Índice de tablas y figuras

Tabla 1	Operacionalización de las variables.....	26
Tabla 2	Secuencia de los oligonucleótidos (primers).....	30
Tabla 3	Características demográficas de casos y controles.....	33
Tabla 4	Características de los casos.....	34
Tabla 5	Cuantificación de ADN.....	35
Tabla 6	Cuantificación de ARN.....	35
Tabla 7	Prueba t de casos vs controles de niveles de expresión de clb...	38
Tabla 8	Prueba t de casos vs controles de IL-17.....	40
	Curvas de amplificación para los genes clb (<i>E. coli</i> pks) y bft	
Figura 1	(<i>Bacteroides fragilis</i> enterotoxígena).....	36
Figura 2	Curvas de amplificación para el gen 16S.....	37
Figura 3	Expresión diferencial (qPCR) de los genes 16S y clb (<i>E. coli</i>)...	38
Figura 4	Niveles de expresión de IL-17 en muestras de biopsia de colon..	39

Resumen.

Introducción: El cáncer colorrectal (CCR) es el tercer cáncer más común con 1.36 millones de casos nuevos y 700,000 muertes por año.

La estirpe histológica más frecuente es el adenocarcinoma epitelial. Las posibles etiologías son por factores genéticos y externos. Actualmente se habla sobre etiología bacteriana, identificando dos bacterias: *Escherichia coli* con la isla genotóxica policetida sintasa positiva (pks+) y *Bacteroides fragilis* enterotoxígena (ETBF). El ETBF induce una respuesta inflamatoria con la subsecuente secreción de la citocina proinflamatoria IL-17, la cual se dirige a las células epiteliales del colon para promover la carcinogénesis mediada por ETBF.

Objetivo: Identificar la presencia en heces, por medio de PCR en tiempo real las bacterias *Escherichia coli* pks+ y *Bacteroides fragilis* enterotoxígena en pacientes con cáncer colorrectal.

Material y métodos: Estudio comparativo de 5 casos (pacientes con CCR con diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma colorrectal) y 5 controles (pacientes sanos con colonoscopia electiva, sin tumor macroscópico visible). Se realizó búsqueda intencionada por medio de PCR en tiempo real, de los genes de *Escherichia coli* pks+ y *Bacteroides fragilis* enterotoxígena (ETBF) en muestras de heces de ambos grupos. Y búsqueda de la expresión del gen de la IL-17 en la mucosa del colon macroscópicamente sano de los 2 grupos. Estudio con riesgo mayor al mínimo, requirió consentimiento informado de los participantes. Fue aceptado por el comité de ética con el número 055-055-2020.

Resultados: El 100% de los casos y controles fueron positivos a *E. coli* pks+, con diferencia en la carga bacteriana: 14.1 y 335.5 veces más *E. coli* pks+ en los casos vs los controles. La ETBF fue positiva en el 100% de los casos y negativa en los 100% de los controles. Se demostró sobre expresión de la IL-17 en el 100% de los casos vs los controles.

Conclusiones: Se demostró que existe mayor carga bacteriana de *E. coli pks+* en los casos, en comparación con los controles. El 100% de los casos tienen ETBF y sobre expresión de la IL-17, en comparación con los controles.

Palabras clave: Microbiota intestinal, Cáncer colorrectal, *E. coli* PKS+, *Bacteroides fragilis* enterotoxígena, adenocarcinoma, IL-17.

Abstract.

Introduction: Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer with 1.36 million new cases and 700,000 deaths per year.

The most common histological lineage is epithelial adenocarcinoma. Possible etiologies are due to genetic and external factors. Currently there is talk about bacterial etiology, identifying two bacteria: *Escherichia coli* with the genotoxic island polyketide synthase positive (pks +) and *Bacteroides fragilis* enterotoxigenic (ETBF). ETBF induces an inflammatory response with subsequent secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-17, which targets colon epithelial cells to promote ETBF-mediated carcinogenesis.

Objective: To identify the presence of enterotoxigenic bacteria *Escherichia coli* pks + and *Bacteroides fragilis* in patients with colorectal cancer by means of real-time PCR.

Material and methods: Comparative study of 5 cases (patients with CRC with histopathological diagnosis of colorectal adenocarcinoma) and 5 controls (healthy patients with elective colonoscopy, without visible macroscopic tumor). An intentional search was carried out by means of real-time PCR, of the genes of *Escherichia coli* pks + and *Bacteroides fragilis* enterotoxigenic (ETBF) in stool samples of both groups. And search for the expression of the IL-17 gene in the macroscopically healthy colon mucosa of the 2 groups. Study with risk greater than

the minimum, required informed consent of the participants. It was accepted by the ethics committee under the number **055-055-2020**.

Results: 100% of the cases and controls were positive for *E. coli* pks +, with a difference in the bacterial load: 14.1 and 335.5 times more *E. coli* pks + in the cases vs. the controls. The ETBF was positive in 100% of the cases and negative in 100% of the controls. Over expression of IL-17 was demonstrated in 100% of cases vs. controls.

Conclusions: It was shown that there is a higher bacterial load of *E. coli* pks + in the cases, compared to the controls. 100% of cases have ETBF and IL-17 overexpression, compared to controls.

Key words: Gut microbiota, Colorectal cancer, *E. coli* PKS +, *Bacteroides fragilis* enterotoxigenic, adenocarcinoma, IL-17.

Antecedentes.

El cáncer colorrectal (CCR) es una de las principales causas de cáncer relacionado con muertes en todo el mundo. Es el tercer cáncer más común tanto en hombres como en mujeres con aproximadamente 1.36 millones de casos nuevos por año y la cuarta causa principal de muertes relacionadas con el cáncer en todo el mundo con 700,000 muertes por año **(Ferlay et al., 2015)**.

Fisiopatología

La formación de CCR comienza con la transformación de la mucosa del epitelio normal en epitelio hiperproliferativo. Estas células epiteliales intestinales hiperproliferativas (IEC) pierden su organización y estructura y tienen la capacidad de formar adenomas. Los adenomas pueden crecer e invadir la submucosa y volverse cancerosos con la capacidad de diseminarse hacia el colon **(Terzic, 2010)**. Esta serie de eventos, llamada "secuencia de adenoma-carcinoma", que conduce a CCR, es heterogénea y dependiendo de las alteraciones moleculares durante esta secuencia, se han descrito diferentes subtipos de CCR.

Etiología

La etiología de CCR es multifactorial y se ha relacionado con mutaciones genéticas, dieta, procesos inflamatorios y, más recientemente, la microbiota intestinal **(Rustgi, 2007)**. Alrededor del 10% de los casos de CCR son hereditarios y hasta el 90% son esporádicos (sin antecedentes familiares o predisposición genética).

Las dos formas principales de CCR hereditario son el síndrome de Lynch o el cáncer de colon sin poliposis, que implica mutaciones en el sistema de reparación de desajuste de ADN y la poliposis adenomatosa familiar (PAF), que es causada por mutaciones de la línea germinal en el gen supresor tumoral de la poliposis adenomatosa del colon **(Jasperson, 2010)**.

En el marco del CCR esporádico se han descrito tres mecanismos principales de inestabilidad genética: inestabilidad cromosómica (CIN), inestabilidad de microsatélites (MSI) y fenotipo de metilador de isla CpG (CIMP). Estos mecanismos tienen un impacto en las principales vías de señalización y conducen a la pérdida

de control de la proliferación celular, el crecimiento celular ilimitado y el desarrollo de tumores **(Ferlay, 2015)**.

Además del factor genético incontrolable, varios factores del estilo de vida juegan un papel importante y son responsables de aproximadamente el 90% de la aparición de CCR esporádico. De hecho, la incidencia de CCR es muy inconsistente en todo el mundo, con las tasas más altas en Europa, Nueva Zelanda, Estados Unidos y Australia, y las tasas más bajas en África y Asia del Sur **(Ferlay, 2015)**. En 2012, un estudio mostró una gran disparidad de ocurrencia de CCR dependiendo del estado socioeconómico con un mayor riesgo para el estado socioeconómico más bajo, en comparación con el más alto debido a la mayor prevalencia de comportamientos adversos para la salud, como dieta poco saludable, consumo de alcohol, tabaquismo, obesidad y ausencia de actividad física **(Doubeni, 2012)**. De hecho, la dieta juega un papel importante en la aparición de CCR y se estima que está involucrada en el 30% al 50% del CCR en todo el mundo. Los estudios han demostrado que el consumo de carne roja, la dieta baja en fibra, calcio, ácido fólico y vitamina D podría aumentar el riesgo de desarrollar CCR **(Ryan, 2007)**.

Se sospecha que el consumo de alcohol está implicado en el desarrollo de CCR, ya que el compuesto resultante del metabolismo del alcohol, el acetaldehído, tiene actividades mutagénicas y pro-cancerígenas **(Boffetta, 2006)**. Fumar cigarrillos también aumenta el riesgo de desarrollar CCR de una manera dependiente del tiempo y de la dosis. En 2008, un metanálisis mostró que los fumadores tienen un 18% más de riesgo de desarrollar CCR en comparación con los que nunca fumaron **(Botteri, 2008)**.

La obesidad es un factor de riesgo de varios tipos de cáncer, incluidos el cáncer de páncreas, riñón, hígado, mama, esófago, gástrico y colorrectal, y se estima que representa el 14% de las muertes por cáncer en hombres y el 20% de las muertes por cáncer en mujeres **(Berger, 2014)**. Recientemente, un metanálisis de 9,000,000 de participantes de diferentes países mostró que la categoría de obesos tiene un

riesgo de desarrollar CCR 1.3 veces mayor que la categoría normal **(May, 2013)**. Más tarde, los estudios han tratado de revelar el vínculo molecular entre la obesidad y el CCR. Lin y sus colegas (2016), demostraron que la obesidad inducida por la dieta conduce al silenciamiento del receptor de la superficie celular del colon, la guanilil ciclasa C, debido a la pérdida de expresión de su ligando de la hormona paracrina guanilina. Los autores mostraron que la pérdida de guanilina se asocia con disfunción epitelial, estrés del retículo endoplásmico de colon y promueve la tumorigénesis en ratones tratados con el agente cancerígeno azoximetano (OMA). Otros estudios han relacionado la hormona leptina asociada a la obesidad con la aparición de CCR, ya que su expresión aumenta en CCR en comparación con el epitelio colorrectal normal y los adenomas colorrectales **(Koda, 2007)**. En estudios *In vitro*, esta adipocina es capaz de activar la fosfoinositida 3-quinasa (PI3K) / proteína quinasa B (PKB / AKT) / blanco de señalización de rapamicina (mTOR) en mamíferos y, por lo tanto, mejorar la proliferación e inhibir la apoptosis de las células de cáncer de colon HCT116 humano **(Wang, 2012)**.

El riesgo de desarrollar CCR disminuye con la práctica de actividad física **(Walter, 2017)**. De hecho, las personas sin actividad física o con poca actividad física tienen un 27% más de riesgo de desarrollar CCR en comparación con las personas con actividad física **(Golshiri, 2016)**. En las personas con alta actividad física, la incidencia de CCR se reduce en un 40-50% en comparación con aquellos con poca o ninguna actividad física **(Ghafari, 2016)**. Se ha propuesto que la actividad física puede disminuir el riesgo de desarrollar varios tipos de cáncer, incluido el CCR, al disminuir la adiposidad central, influir en los niveles de hormonas sexuales y metabólicas, reducir la inflamación y mejorar la función inmune **(Kruk, 2016)**.

La inflamación crónica es uno de los principales riesgos de CCR. Los pacientes con enfermedades intestinales inflamatorias, incluida la colitis ulcerosa crónica inespecífica y la enfermedad de Crohn, tienen un mayor riesgo de desarrollar CCR asociado a la colitis en comparación con la población general **(Farraye, 2010; Jess, 2012)**. Se demostró que el consumo de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos, como la aspirina, reduce la aparición de CCR y disminuye el crecimiento tumoral en varios modelos animales de CCR **(Gupta, 2001)**. Es bien

sabido que la inflamación crónica induce displasia mediante la inducción de modificaciones de ADN en las células epiteliales, como las reacciones de nitración, oxidación, metilación y desaminación, que pueden contribuir al inicio o progresión del CCR **(Bayarsaihan, 2011)**. Durante la inflamación, el reclutamiento de células inmunes innatas como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas y células inmunes adaptativas como las células T y B, conduce a la secreción de especies reactivas al oxígeno / nitrógeno, que son altamente genotóxicas **(Meira, 2008)**, citocinas proinflamatorias como la interleucina (IL) -6, IL-8, IL-1 β y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), así como factores de crecimiento **(Francescone, 2015)**.

Este ambiente inflamatorio tiene muchas similitudes con el microambiente tumoral, lo que sugiere la implicación de los mismos mediadores en la inflamación intestinal crónica y la carcinogénesis colorrectal **(Francescone, 2015)**. De hecho, muchos mediadores inflamatorios se han encontrado positivamente asociados con la prevalencia de adenomas colorrectales **(Kim, 2008; Basavaraju, 2015; Song, 2016)**. Por ejemplo, los niveles de IL-6 son más altos en el suero de pacientes con CCR en comparación con los controles sanos **(Knüpfner, 2010)**. *In vitro*, se demostró que IL-6 estimula la invasión de las células de carcinoma colorrectal humano **(Hsu, 2006)**. Ratones deficientes para la citocina antiinflamatoria IL-10 (ratones *il10*^{-/-}), que desarrollan colitis crónica espontánea **(Kühn, 1993)**, han aumentado la carcinogénesis con mayor grado e invasividad cuando se trata con azoximetano (AOM) en comparación con los ratones de tipo salvaje **(Uronis, 2009)**. Además, la deficiencia de IL-10 conduce a un aumento en el número de tumores de colon en el modelo de ratón *APC*^{Min} / + de CRC **(Tomkovich, 2017)**. Curiosamente, en condiciones libres de gérmenes, los ratones *il10*^{-/-} desarrollan colitis reducida, y esto se asocia con un desarrollo reducido de CCR inducido por AOM **(Uronis, 2009)**. Además, la composición de la microbiota intestinal es diferente en ratones *il10*^{-/-} tratados con AOM en comparación con los ratones de tipo salvaje tratados con AOM **(Arthur, 2012)**.

Marco teórico.

CCR en México y Baja California Sur

En el 2020 en México, hubo 195,499 casos nuevos con un diagnóstico histopatológico de cáncer, de los cuales 14,901 (7.6%) fueron a causa de CCR, por lo que esta neoplasia se ubica en el 4to lugar de las neoplasias malignas en México. Es la 6ta. causa de muerte por neoplasia maligna con un total de 6,245 muertes por CCR en el año 2020 (**GLOBOCAN, 2020**).

El estado de Baja California Sur, tiene una de las mayores tasas de mortalidad por CCR del país, con una tasa de mortalidad reportada en el año 2011 de 7.7% (**Sánchez, 2017**). Los factores asociados para dicha región podrían ser el sexo masculino, un historial familiar de CCR, diabetes, obesidad, inactividad física, tabaquismo, consumo alto de alcohol, dieta alta en carnes rojas y procesadas, y una ingestión inadecuada de frutas y vegetales.

Microbiota intestinal y CCR

Se ha propuesto que la presencia de CCR también puede verse influenciada por la microbiota intestinal con la que el intestino está en exposición constante. El CCR afecta al intestino grueso, donde la densidad bacteriana es mayor (10^{12} células por ml frente a $\sim 10^2$ células por ml en el intestino delgado) (**Tjalsma, 2012**). Varios estudios han relacionado una modificación de la composición de microbiota asociada a la mucosa intestinal en pacientes con CCR en comparación con los sujetos control (**Chen, 2012; Gao, 2015; Lu, 2016**). Además, en los modelos animales de CCR (genético o inducido por químicos), aquellos que portan la microbiota intestinal normal (animales convencionales) desarrollan más tumores que los privados de la microbiota intestinal (animales libres de gérmenes). Estas observaciones sugieren que la microbiota intestinal es un jugador nuevo en el desarrollo de CCR. En las últimas décadas, se han realizado muchos descubrimientos para comprender los mecanismos por los cuales la microbiota intestinal actúa sobre el desarrollo de CCR.

El modelo aceptado de carcinogenesis inducido por bacterias se basa en la liberación mejorada de toxinas producidas por bacterias, la disminución de metabolitos beneficiosos derivados de bacterias, la interrupción de la barrera epitelial, la producción de compuestos pro-cancerígenos y alteraciones en la microbiota intestinal o disbiosis (**Schwabe, 2013**). Este modelo de interacción bacteria-huésped en el CCR ha ayudado a allanar el camino hacia nuevas estrategias terapéuticas como la suplementación de productos de fermentación microbiana como los ácidos grasos de cadena corta (SCFA), que tienen efectos antiinflamatorios y anticancerígenos (**Van der Beek, 2017**); supresión directa del daño del ADN inducido por toxinas bacterianas y la tumorigénesis utilizando pequeñas moléculas inhibitoras (**Cougnoux, 2016**); uso de prebióticos que se ha demostrado que disminuye el número de focos de criptas aberrantes inducidas por carcinógenos *in vivo* (**Qamar, 2016**); consumo de probióticos que contienen bacterias del ácido láctico, que pueden prevenir el daño del ADN inducido por las aminas heterocíclicas mutagénicas y cancerígenas (**Zsivkovits, 2003**); y el uso de bacterias como *Bifidobacterium* y *Bacteroides* para mejorar la eficacia de la terapia inmune antitumoral y, por lo tanto, mejorar el control del tumor (**Sivan, 2015**; **Vétizou, 2015**). A continuación, se describen dos bacterias las cuales tienen estrecha relación con el CCR.

***Bacteroides fragilis* enterotoxigena (ETBF)**

El estricto anaerobio *B. fragilis* es un simbiote humano común que coloniza toda la longitud del colon y representa solo una pequeña proporción de la microbiota intestinal. Hay dos subtipos de *B. fragilis*, el *B. fragilis* no toxigénico (NTBF) y la *B. fragilis* enterotoxígena (ETBF). El último, que se ha asociado a la diarrea en humanos (**Zhang, 1999**), exhibe una isla patogénica, llamada isla de patogenicidad de *B. fragilis* (BfPAI), que les permite producir una enterotoxina llamada "fragilisina" o BFT codificada por el gen *bft* (**Sears, 2001**). Varios estudios han relacionado *B. fragilis* con CCR ya que se ha encontrado enriquecido en heces de pacientes con CCR en comparación con individuos sanos (**Sobhani, 2011**; **Wang, 2012**). El ETBF se asocia con CCR en estadio tardío, ya que el 100% de los tumores en estadio

tardío son positivos para BFT en comparación con el 72% de los tumores en estadio temprano (**Boleij, 2015**). Sin embargo, Purcell y sus colegas (2017), demostraron que *B. fragilis* está asociado con lesiones carcinogénicas en etapa temprana.

Los estudios *in vitro* han puesto de relieve la actividad proteolítica de la fragilisina, que es responsable de la degradación de las proteínas de unión estrecha, como la zonula occludens-1 (**Obiso, 1997**) y, por lo tanto, conduce a una disfunción de la barrera epitelial intestinal con permeabilidad epitelial mejorada y criptas intestinales dañadas y colonocitos (Wells, 1998; Riegler, 1999). En 2003, Wu y sus colegas demostraron que ETBF es capaz de degradar la molécula de adhesión celular E-cadherina en las células HT29, desencadenando la translocación de β -catenina en el núcleo y la transcripción del oncogén c-myc, lo que lleva a un aumento y persistencia de la proliferación celular que podría influir positivamente en el desarrollo de CCR (**Wu, 2009**). En *APC^{Min/+}* ratones la colonización ETBF conduce a un aumento en el grosor del colon, inflamación y tumores colónicos visibles, que no se observaron con la infección por NTBF (**Wu, 2009**).

El ETBF media sus efectos a través de la activación de STAT3 en las células epiteliales del colon y, por lo tanto, induce la respuesta inflamatoria con la subsecuente secreción de la citocina proinflamatoria IL-17, la cual se dirige a las células epiteliales del colon (CEC) para promover la carcinogénesis mediada por ETBF (**Chung, 2018**). Al bloquear la secreción de IL-17 con anticuerpos neutralizantes de IL-17, los tumores de colon inducidos por ETBF se reducen significativamente sin afectar la activación de STAT3, mostrando el papel preponderante de la inflamación inducida por ETBF en la promoción de la carcinogénesis de colon (**Wu, 2009**).

Interleucina-17 (IL-17)

Después de la formación de un tumor en el colon, el sistema inmunológico reacciona contra las células neoplásicas. Las respuestas inmunitarias incluyen la proliferación de células inmunitarias, la alteración del fenotipo, la síntesis y liberación de citocinas (Cui, 2015) como la interleucina-17 (IL-17). La IL-17 es una citocina proinflamatoria, que se asocia con la progresión del cáncer. La principal fuente de

IL-17 es una subpoblación de células T CD4 conocidas como células T-helper17 (Th17) **(Awasthi, 2008)**. Se encontraron células Th17 que infiltraban tumores en muchos tipos de cánceres **(Zhu, 2017)**. Se requieren varios agentes para la diferenciación y estabilización de las células Th17, tales como: factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), interleucina-6 (IL-6), IL-21, IL-23 e IL-1b. Además, el receptor y huérfano retinoico (ROR γ) y el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) son los factores de transcripción responsables de la diferenciación y estabilización de Th17 **(Awasthi, 2008)**.

Aunque el nombre de las células Th17 proviene de su capacidad para producir IL-17, también liberan otras citocinas como IL-21, IL-22 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) **(Korn, 2009)**. Cabe señalar que la IL-17 también es producida por otras fuentes como las células asesinas naturales (NK), células T CD8, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células dendríticas y células T gamma delta. Las células T reguladoras (Treg), generalmente conocidas como inmunosupresores, también producen IL-17.

La progresión del CCR es un proceso que implica interacciones entre el tumor y la inmunidad celular del huésped en el microambiente del tumor. Las células neoplásicas secretan mediadores proinflamatorios y las células inmunes producen citocinas que conducen al desarrollo de tumores **(Zhong, 2017)**. Los estudios han demostrado que el número de células Th-17 es significativamente mayor en los tejidos del CCR **(Liu, 2011)**. Las células Th17 inducen mediadores inmunosupresores como TGF- β , CXCR3, receptor de quimiocinas CC 6 (CCR6) e IL-6. También suprimen las células T CD8 que tienen actividad antitumoral **(Ma, 2011)**. Además, se ha demostrado que el número de células T CD8 + productoras de IFN- γ aumenta en los ratones deficientes en IL-17 **(Yan, 2014)**.

Los datos publicados demostraron que el nivel de IL-17 era significativamente mayor en los tejidos del CCR **(Cui, 2015)**. Cui y col. (2015) han demostrado que la regulación positiva de IL-17 comienza en la etapa de adenoma y su nivel es más alto en la etapa de cáncer, pero no está asociado con los parámetros TNM del

tumor. Por tanto, la IL-17 participa en la tumorigénesis del CCR a través de varias vías.

***Escherichia coli* pks+**

E. coli es una bacteria gramnegativa, anaeróbica, comensal que coloniza el intestino humano poco después del nacimiento. *E. coli* tiene una relación simbiótica con el huésped y normalmente no está implicada en enfermedades. Sin embargo, algunas cepas virulentas de *E. coli* han adquirido características patogénicas que les permiten colonizar el intestino humano y promover la aparición de enfermedades intra y extra intestinales. Estas cepas de *E. coli* se pueden dividir en ocho patotipos según sus perfiles patogénicos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* difusamente adherente (DAEC), *E. coli* invasiva adherente (AIEC) y *E. coli* enteroagregativa productora de toxina Shiga (STEAEC) **(Sousa, 2006)**. Las cepas de *E. coli* se dividen en cuatro grupos filogenéticos principales A, B1, B2 y D, con las cepas fecales a menudo pertenecen a los grupos A y B1, mientras que las cepas patógenas que portan los factores de virulencia con mayor frecuencia pertenecen a los grupos B2 y D **(Escobar-Páramo, 2004)**. Algunas cepas de los grupos B2 y D están asociadas con enfermedades intestinales inflamatorias crónicas que se sabe que son factores de riesgo para CCR **(Darfeuille-Michaud 1998; Darfeuille-Michaud 2004)**.

En muestras de CCR, los estudios han demostrado una alta prevalencia de cepas de *E. coli* que albergan factores de virulencia y producen toxinas llamadas ciclodulinas capaces de inducir daño en el ADN y / o influir en el ciclo celular de las células eucariotas y, por lo tanto, afectan la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis **(Maddocks, 2009; Buc, 2013; Raisch, 2014)**. Además, existe una correlación entre los factores de mal pronóstico para el CCR (estadio de metástasis de ganglios tumorales) y la colonización de la mucosa con *E. coli* **(Bonnet, 2014)**. Las cepas de *E. coli* productoras de ciclodulina son más prevalentes en la mucosa de pacientes con CCR en estadio III / IV avanzado en comparación con

aquellos con CCR en estadio I, lo que sugiere que la colonización patógena por *E. coli* podría usarse como un marcador pronóstico nuevo y crucial **(Bonnet, 2014)**.

Se han estudiado ampliamente cuatro toxinas por sus efectos sobre el CCR: CIF (factor inhibidor del ciclo), CNF (factor de necrosamiento citotóxico), CDT (toxina distensión del citoletal) y colibactina. CIF es producido por ciertas cepas de EPEC, promueve el reordenamiento del citoesqueleto de actina y media la detención del ciclo celular G2 / M caracterizada por la fosforilación inactiva de la quinasa 1 dependiente de ciclina, un jugador clave en la regulación del ciclo celular **(Marchés, 2003)**. CNF induce una activación transitoria de COX-2 y las Rho GTPasas como Rac, RhoA y Cdc42. Como las Rho GTPasas se han caracterizado como reguladores del citoesqueleto de actina, su desregulación conduce a alteraciones del citoesqueleto y, por lo tanto, afecta el ciclo celular **(Flatau, 1997; Taieb, 2016)**. CDT se identificó por primera vez en 1988 en el cultivo de cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con diarrea. Esta toxina se ha encontrado en varias especies bacterianas gramnegativas y se sabe que tiene actividad de ADNsa y, por lo tanto, induce roturas de la doble cadena de ADN, detención del ciclo celular y apoptosis celular si las roturas de doble cadena de ADN exceden la capacidad de reparación de la célula **(Taieb, 2016)**.

La colibactina es otra genotoxina derivada de bacterias descrita por primera vez en 2006 **(Nougayréde, 2006)** y no se ha aislado ni purificado hasta la fecha. La colibactina es un compuesto de péptido híbrido poliquétido no ribosómico producido por una compleja maquinaria biosintética codificada por la isla de patogenicidad de poliquétido sintasa (*pks*) **(Nougayréde, 2006)**. La alta prevalencia de cepas de *E. coli* que albergan la isla *pks* (*E. coli pks+*) se ha asociado con CCR **(Arthur, 2012; Buc, 2013)**. Análisis *In vitro*, han demostrado que la colibactina induce roturas de doble cadena de ADN en las células eucariotas con la activación de la cascada de señalización de daño del ADN y la detención del ciclo celular **(Nougayréde, 2006)**. Además, la colibactina puede inducir inestabilidad cromosómica con signos de aberración cromosómica **(Cuevas-Ramos, 2010)**.

Utilizando macrófagos, que son una de las células inmunes predominantes que infiltran el tumor, Raisch y sus colegas (2015) demostraron que las cepas de *E. coli*

pk^s+ pueden sobrevivir en los macrófagos e inducen mediadores proinflamatorios y procarcinógenos como COX-2 y PGE2. Esto sugiere que *E. coli* pk^s+ podría influir en la progresión del CCR al persistir en las células inmunes y controlar la secreción de mediadores pro-tumorales **(Raisch, 2015)**. Utilizando un modelo de ratón genéticamente modificado, se demostró que la cepa 11G5 de *E. coli* pk^s+ aislada del CCR persiste en gran medida en el intestino, induce inflamación del colon, daños epiteliales y proliferación celular **(Arpaia, 2013)**. Usando el modelo CCR inducido por inflamación (ratones *il10*^{-/-} tratados con AOM), la monocolonización con cepas de *E. coli* pk^s+ conduce a una mayor multiplicidad e invasión tumoral en comparación con los ratones colonizados con el mutante isogénico defectuoso para la isla pk^s y, por lo tanto, no puede producir colibactina, o en comparación con ratones no infectados **(Arthur, 2012)**.

Debido a lo anterior, en este estudio se realizó la búsqueda de la *Escherichia coli* pk^s+ y *Bacteroides fragilis* enterotoxígena en pacientes con cáncer colorrectal del estado de Baja California Sur, con el fin de poder establecer las bases para la creación de un estudio de cribado no invasivo para identificación temprana del cáncer colorrectal.

Planteamiento del problema.

El cáncer colorrectal es una entidad patológica que afecta significativamente a la humanidad, es uno de los principales motivos de consulta oncológica en México, así mismo, en nuestro estado se registran aproximadamente de 100 a 150 casos nuevos de CCR según el Centro Estatal de Oncología “Dr. Rubén Cardoza Macías” de la Cd. de La Paz, Baja California Sur.

Según **Sánchez et. al.**, (2017) menciona que el estado de Baja California Sur ocupa el 2do lugar de mayor mortalidad en pacientes con CCR, exponiendo como factores de riesgo la obesidad, consumo de carnes rojas ahumadas y tabaquismo.

A pesar de que el CCR es de etiología multifactorial, se ha descrito que la bacteria *Bacteroides fragilis* enterotoxígena (ETBF) produce una toxina llamada fragilisina, la cual condiciona a roturas de las uniones intracelulares del epitelio del colon, que en conjunto con la IL-17 se dirige a las células epiteliales del colon para promover la carcinogénesis mediada por ETBF. Por otro lado, la *Escherichia coli* pks+ produce la toxina colibactina, la cual induce roturas de doble cadena de ADN en las células eucariotas con la activación de la cascada de señalización de daño del ADN y la detención del ciclo celular condicionando la producción de CCR.

De acuerdo a lo previamente descrito, identificar estas dos bacterias en pacientes con CCR, y excluirlas en pacientes controles serviría para correlacionar un posible factor de riesgo para padecer CCR.

Para poder lograr una adecuada identificación de estas dos bacterias específicamente, se requiere de un estudio molecular de identificación por medio de PCR en tiempo real de los genes indicativos de dichas bacterias, ya que por medio de cultivos no es posible su identificación. Así mismo, solo estas bacterias específicamente, son las creadoras de las toxinas causantes del daño celular previamente descrito.

Justificación.

Al igual que en los demás centros oncológicos del país, en el centro oncológico del estado de Baja California Sur, el CCR se encuentra dentro de las primeras causas de motivo de atención y mortalidad.

Una de las características del centro oncológico del estado, es un centro de referencia sectorial al recibir paciente de cualquier derechohabiencia, cuenta con la infraestructura necesaria para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad, así como el recurso humano especializado. Esto permite que sea factible haber realizado el presente estudio con la finalidad de identificar las bacterias *Escheria coli* pks+ y *Bacteroides fragilis* enterotoxígena en pacientes con CCR.

La identificación de estas 2 bacterias en el CCR sería hincapié para nuevas propuestas sobre estudios de microbiota intestinal y otras enfermedades, se podrían formar estudios de cribado no invasivos para la detección de *E. coli* pks+ y de *Bacteroides fragilis* enterotoxígena (ETBF) como factor asociado a la presencia de CCR, estudios para valorar la prevención del CCR con anticuerpos en contra de colibactina, fragilisina o IL-17 y proponer medidas terapéuticas en contra del CCR.

Pregunta de investigación.

Planteamiento 1

¿Existe la presencia de las bacterias *Escherichia coli* pks+ y *Bacteroides fragilis* enterotoxígena en pacientes con cáncer colorrectal?

Planteamiento 2

¿Hay diferencias entre la cantidad de gen **clb** entre los pacientes sanos y pacientes CCR?

Hipótesis.

Las bacterias *Escherichia coli* pks+ y *Bacteroides fragilis* enterotoxígena están presentes en los pacientes con CCR.

Hipótesis estadísticas

Ho: **NO HAY DIFERENCIAS** entre la cantidad de gen **clb** entre los pacientes sanos y pacientes CCR

H1: **HAY DIFERENCIAS** entre la cantidad de gen **clb** entre los pacientes sanos y pacientes CCR

Objetivo.

Identificar la presencia en heces, por medio de PCR en tiempo real las bacterias *Escherichia coli* pks+ y *Bacteroides fragilis* enterotoxígena en pacientes con cáncer colorrectal.

Objetivos específicos

1. Contrastar la carga bacteriana de colon en muestras de heces entre pacientes sanos y pacientes con CCR.
2. Determinar la presencia en heces de *E. coli* pks+ en pacientes sanos y pacientes con CCR.
3. Determinar la presencia en heces de *B. fragilis* enterotoxígena en pacientes sanos y pacientes con CCR.
4. Determinar la expresión en mucosa de colon del gen IL-17 en pacientes CCR.

Material y métodos.

Nivel, tipo y diseño.

El presente trabajo es un estudio de nivel relacional tipo observacional, prospectivo, transversal y analítico, de diseño comparativo de casos y controles, en donde se buscaron por PCR en tiempo real, los genes indicativos de las bacterias *Escherichia coli* pks+ y *Bacteroides fragilis* enterotoxígena (ETBF) en muestras de heces de los grupos casos y controles. Así mismo, se buscó la expresión del gen de la IL-17 con análisis de muestras de la mucosa del colon macroscópicamente sano de los 2 grupos.

Área de estudio.

Se realizó el estudio con pacientes habitantes del estado de Baja California Sur de cualquier derechohabencia que son atendidos en el centro oncológico estatal “Rubén Cardoza Macías” y en el Benemérito Hospital General con Especialidades “Juan María de Salvatierra”, en la ciudad de La Paz, Baja California Sur.

Universo y población.

Universo: Habitantes del estado de Baja California Sur.

Población: Pacientes con tumor colorrectal con el diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma epitelial. Pacientes sanos sin tumor colorrectal demostrado por colonoscopia electiva.

Muestra: Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia entre 5 pacientes que asistieron a la consulta de cirugía oncológica con el diagnóstico de CCR y 5 pacientes que acudieron a consulta por cualquier otro motivo y se solicitó colonoscopia en el periodo de enero del 2019 a diciembre del 2020.

Casos y controles.

- Se denominó caso: pacientes con CCR con diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma epitelial.

- Se denominó control: pacientes con características demográficas parecidas, sin tumor macroscópico colorrectal, demostrado por colonoscopia electiva solicitada por médico tratante.

Criterios de inclusión de los casos.

- Diagnóstico reciente de CCR con estudio histopatológico que demuestre ser adenocarcinoma epitelial.
- Que cuente con expediente clínico

Criterios de exclusión de los casos.

- Haber recibido tratamiento adyuvante (quimioterapia, radioterapia o inmunoterapia)
- Antecedente quirúrgico de resección de tumor de colon o derivación intestinal.

Criterios de inclusión de los controles.

- Habitante del estado de Baja California Sur.
- Colonoscopia sin evidencia de tumor de colon.

Criterios de exclusión de los controles.

- Padecer diabetes mellitus tipo 2.
- Padecer enfermedad de Chron, CUCI o enfermedad celiaca.
- Antecedentes de cáncer colorrectal por familiares de primer grado.

Tabla 1. Operacionalización de las variables.

VARIABLES	DEFINICION CONCEPTUAL	DIMENSIONES	INDICADORES
Edad	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento de un individuo	Establecer a los pacientes en su respectivo grupo de edad	Edad en años
Sexo	Variable biológica y genética que divide a los seres humanos en hombre y mujer	Sexo identificado en los pacientes del estudio	Masculino / Femenino
Comorbilidad agregada	Enfermedades cronicodegerativas	Presencia de comorbilidades en el paciente	Diabetes mellitus, hipertensión arterial sistémica
Estadios de cáncer colorrectal	Estatificación del cáncer colorrectal de acuerdo a TNM	Establecer la estatificación de los pacientes con CCR	Estadio 0, I, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC y IV
<i>Escherichia coli</i> pks+	Bacteria bacilo gram – con la isla genotóxica poliketida sintasa positiva (pks+) que produce colibactina, encargada de las alteraciones en el ADN de la célula epitelial del colon	Presencia en heces de esta bacteria en personas con diagnóstico reciente de CCR	Determinación por PCR en tiempo real de los genes indicativos de la presencia de la bacteria (positiva o negativa)
<i>Bacteroides fragilis</i> enterotoxígena	Bacilo gram – anaerobio obligado que produce la	Presencia en heces de esta bacteria en personas con	Determinación por PCR en tiempo real de

	toxina fragilisina, la cual promueve la adherencia de esta bacteria en las células colonicas, así como la producción de IL-17 conduciendo a una inflamación crónica y al CCR.	diagnóstico reciente de CCR	los genes indicativos de la presencia de la bacteria (positiva o negativa)
IL-17	Interleucina pro-inflamatoria estimulada por la <i>bacteroides fragilis</i> enterotoxígena que conduce a un estado de inflamación crónica en los colonocitos y mayor adhesión de esta bacteria	Evaluar su presencia en muestras de mucosa de colon macroscópicamente sana en los dos grupos de personas	Determinación por PCR en tiempo real de los genes indicativos de la presencia de la IL (positiva o negativa)

Descripción general del estudio.

Previa autorización del comité de enseñanza e investigación del Benemérito Hospital General Con Especialidades “Juan María de Salvatierra” se realizó un estudio comparativo de casos y controles para identificar la presencia en heces por medio de PCR en tiempo real de las bacterias *Escherichia coli* pks+ y *Bacteroides fragilis* enterotoxígena en pacientes con y sin cáncer colorrectal.

Una vez detectado el grupo de casos, se les invito participar en el presente estudio y se explicó lo que se pretende realizar, elaboración de historia clínica completa y, llenado y firma de hoja de consentimiento informado.

Se solicitó al paciente una muestra de heces (otorgando previamente frasco estéril transparente) con un peso mínimo de muestra de 5 g, no haber consumido antibióticos 4 semanas previas y tener como mínimo 2 semanas de haberse realizado la colonoscopia diagnóstica.

Se pidió al paciente llevarla al Benemérito Hospital General con Especialidades “Juan María de Salvatierra” a la oficina de residentes médicos del servicio de cirugía general donde se recibió por médico residente y se colocó la muestra en hielera a 4 C° para su traslado a laboratorio de biología molecular “Bio Technologika A2” en la Cd. De La Paz, Baja California Sur, por parte de personal de dicho establecimiento.

Una vez obtenida la muestra de heces de los pacientes controles, se realizó resección quirúrgica del CCR. Durante dicha intervención, se realizó la toma de muestra de mucosa de colon macroscópicamente sano de forma proximal sobre margen libre del tumor para el análisis de IL-17.

El grupo de controles fueron detectados dentro de la programación diaria de eventos quirúrgicos electivos del servicio de endoscopia del Benemérito Hospital General Con especialidades “Juan María de Salvatierra”. Previa realización de colonoscopia (indicada por su médico por otra situación independiente al CCR) se le explico al

paciente el estudio, cumpliendo con los criterios de caso control (sin tumor macroscópico visible), se tomó una muestra de mucosa de colon para su estudio. Posteriormente se le solicitó al paciente muestra de heces (con las características previamente descritas) 2 semanas después de la realización de la colonoscopia, y se recolectó de la misma forma que con los pacientes del grupo de casos.

La muestra de heces al llegar a su destino se congeló a -20 C°. Se realizó la extracción y purificación del ADN de las muestras, la cual se utilizó para determinar por PCR en tiempo real la presencia de ***E. coli pks+*** y ***Bacteroides fragilis enterotoxígena*** utilizando cebadores (primers) específicos. La muestra de mucosa de colon se realizó el mismo procedimiento, pero con la búsqueda de la IL-17.

Extracción de ADN

A partir de las muestras de heces se realizó la extracción de ADN con el kit Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit (ZYMO) según las instrucciones del fabricante. Se obtuvo 50 ul de ADN por muestra y se almacenaron a -20 °C hasta reunir todas las extracciones e iniciar los análisis por qPCR.

Extracción de ARN

A partir de las muestras de mucosa de colon macroscópicamente sano se realizó la extracción de ARN con el kit Quick-RNA™ Miniprep Kit (ZYMO) según las instrucciones del fabricante. Se obtuvo 50 ul de ARN por muestra y se almacenaron a -20 °C hasta reunir todas las extracciones e iniciar los análisis por qPCR.

PCR en tiempo real qPCR

El PCR cuantitativo (qRT-PCR) se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del kit LUNA® (NEB New England Biolabs) en el termociclador CFX96 BioRad. Los oligonucleótidos usados para amplificar el gen celular IL-17 y los genes bacterianos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos (primers).

Gen	Primer forward	Primer reverse	Referencia
clbB	GATTGGATACTGGCGATAACCG	CCA TTCCCGTTGAGCACAC	Sarshar et al., 2017
Bft	GGATAAGCGTACTAAAATACAGCTGGAT	CTGCGAACTCATCTCCCAGTATAAA	Purcell et al., 2017
IL-17	AACATGAGTCCAGGGAGAGC	CTGCCTGGCGACAATCGAG	Petanidis et al., 2013
GAPDH	ACCTGACCTGCCGCTAGAAA	CCTGCTTACCACCTTCTTGAT	

Para determinar la expresión diferencial de los genes colibactina y BFE (*B. fragilis* enterotoxígena) se determinó su expresión en los pacientes CCR y sanos. Los cambios relativos de expresión se calcularon por el método delta Ct (Δ Ct) donde CT es el ciclo de corte (Livak et al., 2001).

Para la determinación de la expresión del gen IL-17 se realizó el qPCR para este gen y para el gen constitutivo GAPDH tanto en pacientes CCR como sanos. Los cambios relativos de expresión se calcularon con el método delta-delta CT ($2^{-\Delta\Delta$ CT) donde CT es el ciclo de corte (Livak et al., 2001).

Adicionalmente para determinar la carga bacteriana total en el colon, se realizó qPCR para el gen 16S en las muestras de heces de pacientes sanos y CCR, los cambios relativos de expresión se calcularon por el método delta Ct (Δ Ct) donde CT es el ciclo de corte (Livak et al., 2001).

Plan de análisis de datos.

Como primera fase se realizó estadística descriptiva, para variables cualitativas se utilizaron frecuencias y porcentajes, para variables cuantitativas se utilizaron medias y desviaciones estándar.

La significancia estadística de los datos de expresión de los genes evaluados se determinó por medio de la prueba t-Student no pareada con distribución de dos colas. Se utilizó prueba exacta de Fisher en caso de ser necesario.

La posible relación entre los cuadros clínicos de las personas enfermas y la presencia de las bacterias evaluadas se determinó por medio de la prueba exacta de Fisher.

Se utilizó un valor de α de 5% con un nivel de significancia estadística del 0.05 con un intervalo de confianza al 95% (IC 95%).

Con una probabilidad de error del 0.1% para las diferencias entre ambos grupos entre la cantidad de gen *clb* entre los pacientes sanos y pacientes CCR. Se interpreta con un valor de $p=0.001$.

Los datos se analizaron en el programa GraphPad Prism y los resultados se integraron a las figuras correspondientes.

Aspectos éticos.

El presente estudio se apegó a los principios de Belmont de beneficencia, no maleficencia, justicia y respeto a las personas.

De acuerdo a la declaración de Helsinki este estudio cuenta con la evaluación de un comité independiente para su aprobación, respeta la confidencialidad de los datos de las personas y la participación de los sujetos fue totalmente voluntaria, respetando el momento si se decidían retirarse del estudio. Todos los participantes firmaron consentimiento informado por escrito, y este describe las riesgos y beneficios de su realización.

De acuerdo a la ley general de salud y a su reglamento, en el artículo 17 se trata de un estudio de riesgo mayor al mínimo, debido a que se utilizó procedimientos invasivos como la colonoscopia, haciéndose cargo la institución sobre cualquier evento adverso que se haya presentado. Además, para finalizar, se declara que el presente estudio fue evaluado por los comités de ética e investigación del Benemérito Hospital General “Juan María de Salvatierra” con número de registro **055-055-2020**.

Aspecto de bioseguridad.

La toma de muestras se realizó bajo las normas de bioseguridad hospitalaria, tanto el tejido como las muestras de heces de los casos y de los controles, se obtuvieron en un ambiente bajo las normas de seguridad (quirófano). El transporte de las muestras se realiza con doble embalaje de criotubos al laboratorio donde se realiza la extracción de DNA. Este laboratorio cuenta con los siguientes manuales actualizados:

- Prácticas de laboratorio.
- Recepción y transporte de material biológico.
- Mantenimiento y manejo de instalaciones.
- Seguridad del personal.
- Manual de manejo de residuos (RPBI)

Resultados.

Se realizó un estudio comparativo de casos y controles con 5 casos con el diagnóstico histopatológico de CCR y 5 controles sanos sin tumor demostrable por colonoscopia.

Datos demográficos

Dentro de los casos, 3 fueron del sexo masculino (60%) y 2 del sexo femenino (40%).

Dentro de los controles 3 fueron del sexo masculino (60%) y 2 del sexo femenino (40%).

Tabla 3. Características demográficas de casos y controles.

Genero	Casos	Controles
1.- Masculino	3 (60%)	3 (60%)
2.- Femenino	2 (40%)	2 (40%)

La edad promedio de los casos fue de 63.2 años y de los controles fue de 38.8 años.

Dentro de las comorbilidades de los casos, solo 1 (20%) con diabetes mellitus tipo 2 y 1 (20%) con hipertensión arterial sistémica. Los controles no tuvieron enfermedades cronicodegenerativas.

En el índice de masa corporal (IMC), el promedio de los casos fue de 26.7 kg/m². El promedio de los controles fue de 28.16 kg/m².

Casos y controles

Casos

A continuación, se describen las principales características de los casos sobre sus datos demográficos y las características principales del CCR (tabla 4).

Tabla 4. Características de los casos.

No. De caso	Sexo	Edad	Localización del tumor	Estirpe histológica	ESTADIO	% de obstrucción de la luz intestinal
1	Masculino	39	Sigmoides	Adenocarcinoma	I	70%
2	Masculino	73	Trasverso	Adenocarcinoma	IIA	80%
3	Masculino	60	Recto	Adenocarcinoma	IIB	90%
4	Femenino	67	Descendente	Adenocarcinoma	I	80%
5	Femenino	77	Sigmoides	Adenocarcinoma	IIA	80%

Los datos relevantes de la tabla 4 son que los 5 tumores obstruían entre el 70 y 90% de la luz intestinal de los pacientes, así mismo, el colon sigmoides fue la localización más común (20%). El estadio más avanzado fue IIB.

Extracción de ácido nucleicos

La extracción y purificación de ADN se realizó a partir de las muestras de heces de los pacientes casos y controles. Se utilizó el kit Quick DNA Miniprep (Zymo) y según las indicaciones del kit se obtuvo 50 ul de ADN, su pureza y concentración se determinó en el fluorómetro Qubit (Thermofisher) (Tabla 5).

Tabla 5. Cuantificación de ADN

Muestra	Grupo	Concentración ADN (ng/ul)
1	Sanos	110.0
2	Sanos	175.0
3	Sanos	55.6
4	Sanos	380.0
5	Sanos	82.2
1	Cáncer colon	225.0
2	Cáncer colon	301.0
3	Cáncer colon	85.3
4	Cáncer colon	402.8
5	Cáncer colon	222.1

Adicionalmente, se realizó la extracción de ARN a partir de las muestras de biopsia del intestino de los pacientes casos y controles. Se utilizó el kit Quick RNA Miniare (Zymo) y según las indicaciones del kit se obtuvo 50 ul de ARN, su pureza y concentración se determinó en el fluorómetro Qubit (Thermofisher) (Tabla 6).

Tabla 6. Cuantificación de ARN.

Muestra	Grupo	Concentración ARN (ng/ul)
1	Sanos	11.0
2	Sanos	5.3
3	Sanos	12.3
4	Sanos	57.0
5	Sanos	9.1
1	Cáncer colon	18.3
2	Cáncer colon	6.5
3	Cáncer colon	20.1
4	Cáncer colon	81.1
5	Cáncer colon	14.5

Detección de *Escherichia coli* PKS+ y *Bacteroides fragilis* enterotoxígena en pacientes con cáncer colorrectal

La presencia de *Escherichia coli* pks+ y *Bacteroides fragilis* enterotoxígena en los pacientes con cáncer colorrectal se realizó por medio de qPCR amplificando el gen colibactina *clbB* el cual hace parte de la isla de genes *pks* de *E. Coli*, y el gen *bft* que codifica para la toxina (nombre de la toxina) de *Bacteroides fragilis* enterotoxígena.

Los resultados mostraron diferencias entre los pacientes sanos y con cáncer colorrectal. Los pacientes con cáncer colorrectal fueron positivos para *bft* (Figura 1B), mientras que los pacientes sanos fueron negativos (Figura 1A). Por otro lado, tanto los pacientes sanos como con cáncer colorrectal fueron positivos para el gen *clbB* (Figura 1), aunque con diferencias cuantitativas significativas entre ambos grupos ($p=0.001$).

Adicionalmente se determinó la presencia de bacterias (en general) por medio de qPCR usando primers dirigidos al gen 16S, el cual codifica para el gen de RNA ribosomal 16S presente en todas las bacterias. Como era de esperarse, la presencia de bacterias en muestras de heces fue positiva para los pacientes tanto sanos como con cáncer (Figura 2).

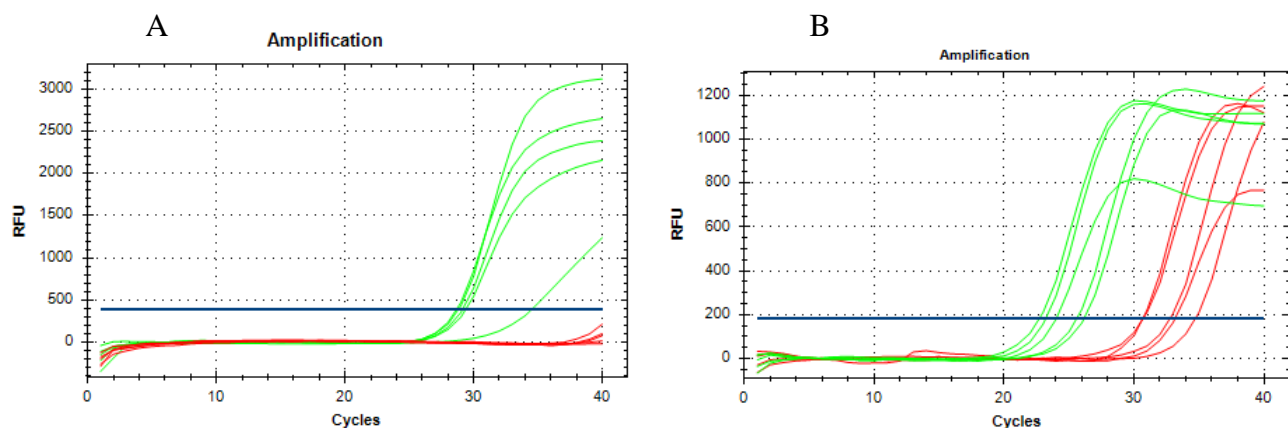


Figura 1. Curvas de amplificación para los genes *clb* (*E. Coli pks*) y *bft* (*Bacteroides fragilis*). A partir del ADN purificado de muestras de heces se determinó la expresión

de los genes *clb* (líneas verdes) y *bft* (líneas rojas) para los pacientes A) sanos y B) con cáncer colorrectal por qPCR. RFU: Unidades relativas de fluorescencia.

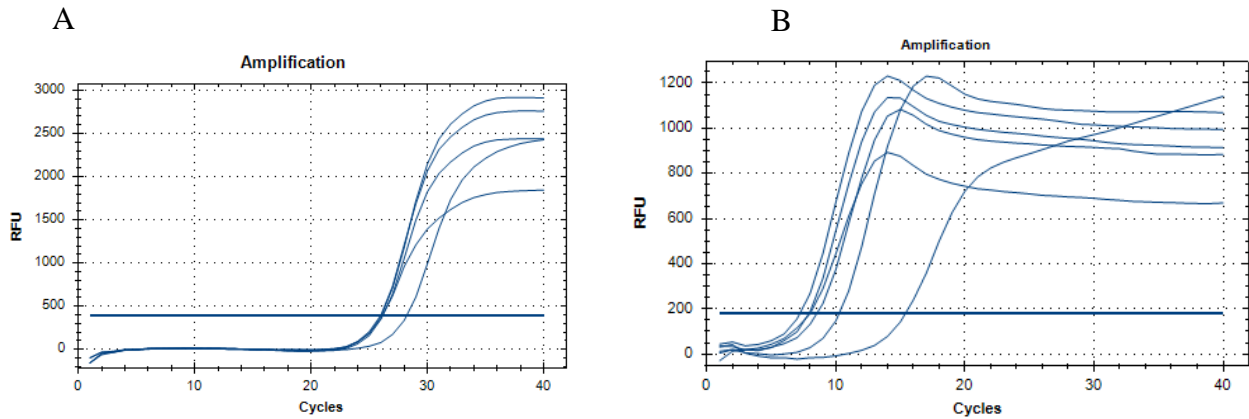


Figura 2. Curvas de amplificación para el gen 16S. A partir del ADN purificado de muestras de heces se determinó la expresión del gen 16S para los pacientes A) sanos y B) con cáncer colorrectal por qPCR. RFU: Unidades relativas de fluorescencia.

Diferencias en la carga bacteriana intestinal

Una vez se estableció la presencia de los genes 16S, *clb* y *bft*, se realizó el análisis cuantitativo de la carga bacteriana. El gen 16S está presente en todas las bacterias y su cuantificación se utiliza para determinar la carga bacteriana. El análisis de delta Ct mostró un aumento de 5 logaritmos (en promedio) de la carga bacteriana total en colon en los pacientes con cáncer respecto a los pacientes sanos (Figura 3A); esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p=0.0019$).

Además, se cuantificó la diferencia de la presencia de *E. coli* (**Figura 1**) entre pacientes con cáncer y pacientes sanos. El análisis de delta Ct mostró un aumento significativo de *E.coli* para todos los pacientes con cáncer ($p=.0.001$) Además, se observó una amplia diferencia entre los cinco pacientes con un rango de aumento que va desde 14 veces hasta 355 veces respecto a los pacientes sanos (Figura 3B).

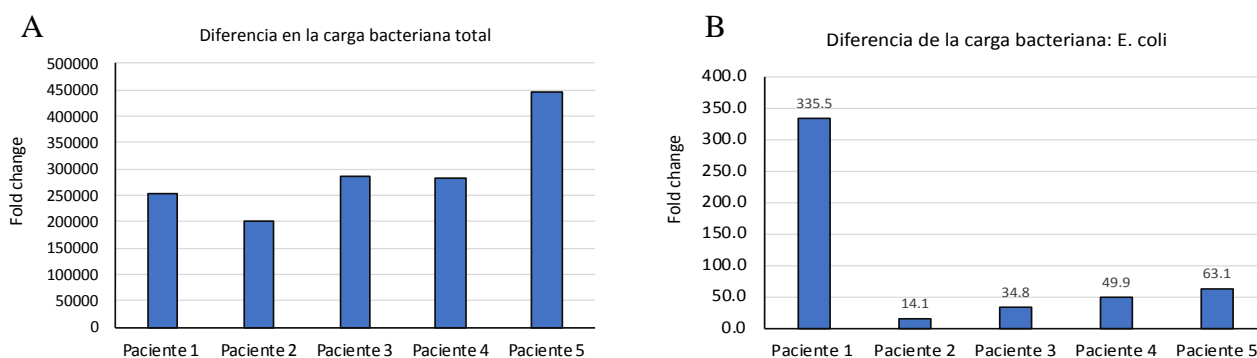


Figura 3. Expresión diferencial (qPCR) de los genes 16S y *clb* (*E. coli*). La carga bacteriana total **(A)** o para *Escherichia coli* **(B)** se determinó por el método delta Ct entre los valores de expresión de los genes 16S y *clb* de los pacientes con cáncer de colón respecto a los pacientes sanos.

Tabla 7. Prueba t de casos vs controles de niveles de expresión de *clb*.

Prueba de muestras emparejadas								
Diferencias emparejadas								
	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio	95% de intervalo de confianza de la diferencia		t	gl	Sig. (bilateral)
				Inferior	Superior			
Par CCR - 1 Sanos	- 5,79000	1,66946	,74661	- 7,86291	- 3,71709	- 7,755	4	,001

De acuerdo a lo anterior, se observa que, si **hay diferencias** entre la cantidad de gen *clb* entre los 5 pacientes sanos y los 5 pacientes con CCR, con una significancia estadística del 0.001.

Evaluación de la expresión de IL-17

Se ha descrito que la IL-17 secretada por Th17 en el intestino aumenta en pacientes con cáncer colorrectal, así como la relación de la secreción diferencial dependiendo del estado de desarrollo del cáncer (Zhu, 2017).

Para determinar el nivel de expresión del gen *IL-17* se extrajo el ARN de las muestras de biopsia de la mucosa del colon y se realizó RT-qPCR para los genes *IL-17* y *GAPDH* (gliceraldehido fosfato deshidrogenasa) como gen constitutivo o “house keeping”. El análisis mostró sobre expresión para el gen *IL-17* en los 5 pacientes con cáncer colorrectal aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0.06$) (Figura 4).

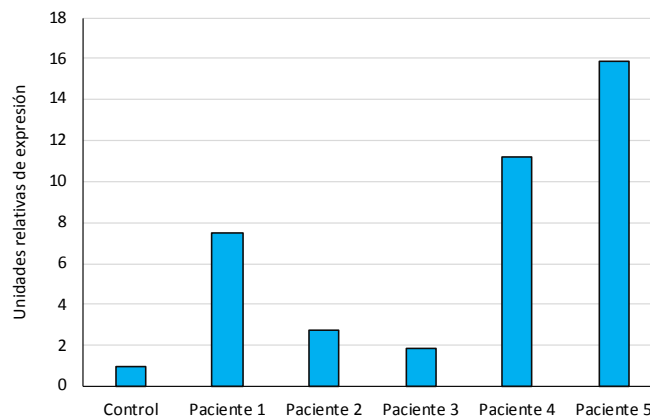


Figura 4. Niveles de expresión de *IL-17* en muestras de biopsia de colon. A partir de las biopsias de colon de los pacientes sanos y pacientes con cáncer colorrectal se obtuvo el ARN y se realizó RT-qPCR para los genes *IL-17* y *GAPDH*. Se determinó el nivel de expresión de *IL-17* en pacientes con cáncer de colon por el cálculo de delta-delta Ct (método $2^{-\Delta\Delta Ct}$) normalizado con la expresión de *GAPDH* como gen de referencia.

Tabla 8. Prueba t de casos vs controles de niveles de IL-17.

		Prueba de muestras emparejadas								
		Diferencias emparejadas								
		Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio	95% de intervalo de confianza de la diferencia		t	gl	Sig. (bilateral)	
					Inferior	Superior				
Par 1	Control - ExpII17	- 6,69800	6,05047	2,70585	- 14,21065	,81465	- 2,475	4	,069	

De acuerdo a lo anterior, no hay significancia estadística ($p=0.6$) para la expresión de la IL-17 entre los 5 pacientes sanos y los 5 pacientes con CCR, lo cual nos puede hacer alusión que la expresión de la IL-17 no guarda relación con al CCR.

Discusión.

Existe una evidencia creciente del efecto de la disbiosis microbiana en el intestino, el inicio y el desarrollo del CCR (**Sears, 2014**). Algunas investigaciones han sugerido que ciertas especies bacterianas (e.g., *Bacteroides fragilis* enterotoxígena) pueden operar como bacterias patógenas que aclaran el desarrollo de disbiosis en la comunidad microbiana del intestino y desencadenan el CCR (**Hajishengallis et al., 2012 ; Hajishengallis y Lamont, 2016**). Se ha descrito que la tumorigénesis colorrectal es inducida por respuestas inmunes y activación de citocinas proinflamatorias debido a la fragilisina (BFT) (**Wu et al., 2004 , 2009**).

Los hallazgos de este estudio indicaron que la bacteria *Bacteroides fragilis* enterotoxígena se asoció significativamente con los pacientes con CCR, el 100% de los casos fueron positivos a ETBF en comparación con el grupo control (0%). Esto apoya la hipótesis de que las cepas productoras de BFT pueden tener un papel importante en el desencadenamiento de la inflamación y la respuesta inmunológica en personas genéticamente susceptibles y pueden conducir al CCR.

El primer estudio que demostró una mayor prevalencia de ETBF en las muestras de heces de pacientes con cáncer colorrectal (38%) en comparación con el grupo de control (12%) fue realizado por **Ulger Toprak et al. (2006)**. Además, algunos informes anteriores han mostrado una asociación entre el gen *bft* y el CCR, particularmente en la etapa tardía del CCR (**Dejea et al., 2014 ; Boleij et al., 2015 ; Viljoen et al., 2015**). En nuestro estudio el estadio más elevado fue IIB según la clasificación TNM de cáncer de colon, así mismo, una relación significativa fue el grado de obstrucción de la luz intestinal, ya que en los 5 casos fue más del 70% de la luz del colon, lo que nos indica que la BTBF puede tener relación con el crecimiento rápido del tumor y esto conlleva a una oclusión intestinal baja completa.

La ETBF media sus efectos a través de la activación de STAT3 en las células epiteliales del colon y, por lo tanto, induce la respuesta inflamatoria con la subsecuente secreción de la citocina proinflamatoria IL-17, la cual se dirige a las

células epiteliales del colon (CEC) para promover la carcinogénesis mediada por ETBF (**Chung, 2018**). En este estudio, se mostró una sobre expresión de IL-17 en el 100% de los casos en comparación con los controles, los cuales no mostraron una sobreexpresión de la IL-17, demostrando lo que la literatura anterior menciona que la ETBF guarda relación directa con la IL-17.

Respecto a la *Escherichia coli*, puede portar la isla de patogenicidad *pks*, que codifica un conjunto de enzimas que sintetizan colibactina. Se cree que este compuesto alquila el ADN de los residuos de adenina e induce roturas de doble cadena en las células del colon, condicionando a una posible carcinogénesis (**Nougayréde, 2006**). En este estudio, el 100% de los casos y controles dieron positivos para *E. coli pks+*, el dato relevante es que hubo una significativa diferencia entre la carga bacteriana de *E. coli pks+* entre los casos y controles. Mediante el método de delta Ct entre los valores de expresión relativa de los genes 16S y *clb* se determinó que los casos tienen entre 14.1 y 335.5 veces más *E. coli pks+* respecto a los controles.

Otro dato interesante en este estudio sobre la *E. coli pks+*, es que los 2 pacientes que presentaron el tumor en el colon sigmoides, fueron los que tuvieron los valores mayores de expresión de *clb* (335.5 y 63.1). Esto podría darnos la idea que la *E. coli pks+* puede ser un factor asociado para la tumorigenesis en el colon sigmoides.

A pesar de que la *E. coli pks+* esté presente en todos los pacientes, la carga bacteriana no es igual, guardando relación esta misma como factor de riesgo a CCR, o así mismo, como la ETBF, guarde relación con el crecimiento rápido del tumor que conlleve una obstrucción del 100% de la luz intestinal en estadios iniciales del cáncer.

Respecto al costo unitario de cada prueba para la identificación de estas dos bacterias en muestras de heces, fue de \$800.00 pesos mexicanos, el cual es un precio accesible para la población o para alguna institución de salud.

Conclusión.

Los resultados de este estudio sugieren que ETBF podría estar presente en la microbiota intestinal de los pacientes con CCR y no estar presente en los pacientes sanos. Así mismo, llevar una relación directa con la IL-17 condicionando un estado inflamatorio colónico que podría condicionar un estado de carcinogénesis, ya que se demostró que el 100% de los casos tienen ETBF y sobre expresión de la IL-17, en comparación con los controles, que de estos ninguno dio positivo a ETBF y no se demostró una sobre expresión de la IL-17.

También se necesita investigación adicional para determinar si la edad, el sexo, la dieta y otros factores ambientales afectan el diagnóstico de ETBF en humanos a lo largo del tiempo.

La *E. Coli* pks+, a pesar de estar presente en todos los casos y controles, se demostró que en los casos existe una carga bacteriana mucho mayor de esta especie en comparación con los controles, lo que lleva a pensar que la carga bacteriana elevada podría ser un condicionante ya sea a la carcinogénesis, crecimiento rápido del tumor o mal pronóstico de la enfermedad. Esto podría conllevar a utilizar tratamientos antimicrobianos de amplio espectro para disminuir la carga bacteriana y buscar un resultado favorable para la enfermedad, aún faltan estudios para determinar esta cuestión.

De acuerdo a lo anterior, este estudio no apoyaría para factores pronósticos de la enfermedad, pero si una muy buena propuesta es la realización de un estudio de cribado no invasivo para CCR. Actualmente no existen este tipo de pruebas y dicha información sería la base para la creación de una. Con el solo hecho de identificar la bacteria *Bacteroides fragilis* enterotoxígena en heces de una persona al azar, se tomaría como un factor de riesgo alto para padecer CCR, por lo que dicha prueba, puede ser una herramienta útil para el médico clínico, para solicitar una colonoscopia diagnóstica.

Bibliografía.

1. Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D.M., Forman D., Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer*. 2015; 136:E359–E386.
2. Terzić J., Grivennikov S., Karin E., Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*. 2010; 138:2101–2114.
3. Tjalsma H., Boleij A., Marchesi J.R., Dutilh B.E. A bacterial driver–passenger model for colorectal cancer: Beyond the usual suspects. *Nat. Rev. Microbiol.* 2012; 10:575–582.
4. Chen W., Liu F., Ling Z., Tong X., Xiang C. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PLoS ONE*. 2012; 7: e39743.
5. Lu Y., Chen J., Zheng J., Hu G., Wang J., Huang C., Lou L., Wang X., Zeng Y. Mucosal adherent bacterial dysbiosis in patients with colorectal adenomas. *Sci. Rep.* 2016; 6:26337.
6. Gao Z., Guo B., Gao R., Zhu Q., Qin H. Microbiota disbiosis is associated with colorectal cancer. *Front. Microbiol.* 2015
7. Schwabe R.F., Jobin C. The microbiome and cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2013; 13:800–812.

8. Van der Beek C.M., Dejong C.H.C., Troost F.J., Masclee A.A.M., Lenaerts K. Role of short-chain fatty acids in colonic inflammation, carcinogenesis, and mucosal protection and healing. *Nutr. Rev.* 2017; 75:286–305.
9. Cougnoux A., Delmas J., Gibold L., Faïs T., Romagnoli C., Robin F., Cuevas-Ramos G., Oswald E., Darfeuille-Michaud A., Prati F., et al. Small-molecule inhibitors prevent the genotoxic and protumoural effects induced by colibactin-producing bacteria. *Gut.* 2016; 65:278–285.
10. Qamar T.R., Syed F., Nasir M., Rehman H., Zahid M.N., Liu R.H., Iqbal S. Novel Combination of Prebiotics Galacto-Oligosaccharides and Inulin-Inhibited Aberrant Crypt Foci Formation and Biomarkers of Colon Cancer in Wistar Rats. *Nutrients.* 2016; 8:465.
11. Zsivkovits M., Fekadu K., Sontag G., Nabinger U., Huber W.W., Kundi M., Chakraborty A., Foissy H., Knasmüller S. Prevention of heterocyclic amine-induced DNA damage in colon and liver of rats by different lactobacillus strains. *Carcinogenesis.* 2003; 24:1913–1918.
12. Sivan A., Corrales L., Hubert N., Williams J.B., Aquino-Michaels K., Earley Z.M., Benyamin F.W., Lei Y.M., Jabri B., Alegre M.-L., et al. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science.* 2015; 350:1084–1089.
13. Vétizou M., Pitt J.M., Daillère R., Lepage P., Waldschmitt N., Flament C., Rusakiewicz S., Routy B., Roberti M.P., Duong C.P.M., et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science.* 2015; 350:1079–1084.

14. Jasperson K.W., Tuohy T.M., Neklason D.W., Burt R.W. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*. 2010; 138:2044–2058.
15. Doubeni C.A., Laiyemo A.O., Major J.M., Schootman M., Lian M., Park Y., Graubard B.I., Hollenbeck A.R., Sinha R. Socioeconomic status and the risk of colorectal cancer: An analysis of over one-half million
16. Ryan-Harshman M., Aldoori W. Diet and colorectal cancer. *Can. Fam. Physician*. 2007; 53:1913–1920.
17. Boffetta P., Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol*. 2006; 7:149–156.]
18. Botteri E., Iodice S., Bagnardi V., Raimondi S., Lowenfels A.B., Maisonneuve P. Smoking and colorectal cancer: A meta-analysis. *JAMA*. 2008; 300:2765–2778.
19. Berger N.A. Obesity and cancer pathogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 2014; 1311:57–76.
20. Ma Y., Yang Y., Wang F., Zhang P., Shi C., Zou Y., Qin H. Obesity and Risk of Colorectal Cancer: A Systematic Review of Prospective Studies. *PLoS ONE*. 2013; 8:e53916.
21. Lin J.E., Colon-Gonzalez F., Blomain E., Kim G.W., Aing A., Stoecker B., Rock J., Snook A.E., Zhan T., Hyslop T.M., et al. Obesity-induced colorectal cancer is driven by caloric silencing of the guanylin-GUCY2C paracrine signaling axis. *Cancer Res*. 2016; 76:339–346.

22. Koda M., Sulkowska M., Kanczuga-Koda L., Surmacz E., Sulkowski S. Overexpression of the obesity hormone leptin in human colorectal cancer. *J. Clin. Pathol.* 2007; 60:902–906.
23. Wang D., Chen J., Chen H., Duan Z., Xu Q., Wei M., Wang L., Zhong M. Leptin regulates proliferation and apoptosis of colorectal carcinoma through PI3K/Akt/mTOR signalling pathway. *J. Biosci.* 2012; 37:91–101.
24. Walter V., Jansen L., Knebel P., Chang-Claude J., Hoffmeister M., Brenner H. Physical activity and survival of colorectal cancer patients: Population-based study from Germany. *Int. J. Cancer.* 2017; 140:1985–1997.
25. Golshiri P., Rasooli S., Emami M., Najimi A. Effects of Physical Activity on Risk of Colorectal Cancer: A Case-control Study. *Int. J. Prev. Med.* 2016; 7:32.
26. Ghafari M., Mohammadian M., Valipour A.A., Mohammadian-Hafshejani A. Physical Activity and Colorectal Cancer. *Iran. J. Public Health.* 2016; 45:1673–1674.
27. Kruk J., Czerniak U. Physical activity and its relation to cancer risk: Updating the evidence. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2013; 14:3993–4003.
28. Jess T., Rungoe C., Peyrin-Biroulet L. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: A meta-analysis of population-based cohort studies. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2012; 10:639–645.

29. Farraye F.A., Odze R.D., Eaden J., Itzkowitz S.H. AGA Medical Position Statement on the Diagnosis and Management of Colorectal Neoplasia in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2010; 138:738–745.
30. Gupta R.A., Dubois R.N. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat. Rev. Cancer*. 2001; 1:11–21.
31. Bayarsaihan D. Epigenetic Mechanisms in Inflammation. *J. Dent. Res.* 2011; 90:9–17.
32. Meira L.B., Bugni J.M., Green S.L., Lee C.-W., Pang B., Borenshtein D., Rickman B.H., Rogers A.B., Moroski-Erkul C.A., McFaline J.L., et al. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *J. Clin. Investig.* 2008; 118:2516–2525.
33. Francescone R., Hou V., Grivennikov S.I. Cytokines, IBD and colitis-associated cancer. *Inflamm. Bowel Dis.* 2015; 21:409–418.
34. Basavaraju U., Shebl F.M., Palmer A.J., Berry S., Hold G.L., El-Omar E.M., Rabkin C.S. Cytokine gene polymorphisms, cytokine levels and the risk of colorectal neoplasia in a screened population of Northeast Scotland. *Eur. J. Cancer Prev.* 2015; 24:296–304.
35. Kim S., Keku T.O., Martin C., Galanko J., Woosley J.T., Schroeder J.C., Satia J.A., Halabi S., Sandler R.S. Circulating levels of inflammatory cytokines and risk of colorectal adenomas. *Cancer Res.* 2008; 68:323–328.

36. Song M., Mehta R.S., Wu K., Fuchs C.S., Ogino S., Giovannucci E.L., Chan A.T. Plasma Inflammatory Markers and Risk of Advanced Colorectal Adenoma in Women. *Cancer Prev. Res.* 2016; 9:27–34.
37. Knüpfer H., Preiss R. Serum interleukin-6 levels in colorectal cancer patients—A summary of published results. *Int. J. Colorectal Dis.* 2010; 25:135–140.
38. Hsu C.-P., Chung Y.-C. Influence of interleukin-6 on the invasiveness of human colorectal carcinoma. *Anticancer Res.* 2006; 26:4607–4614.
39. Kühn R., Löhler J., Rennick D., Rajewsky K., Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell.* 1993; 75:263–274.
40. Uronis J.M., Mühlbauer M., Herfarth H.H., Rubinas T.C., Jones G.S., Jobin C. Modulation of the Intestinal Microbiota Alters Colitis-Associated Colorectal Cancer Susceptibility. *PLoS ONE.* 2009
41. Tomkovich S., Yang Y., Winglee K., Gauthier J., Mühlbauer M., Sun X., Mohamadzadeh M., Liu X., Martin P., Wang G.P., et al. Locoregional Effects of Microbiota in a Preclinical Model of Colon Carcinogenesis. *Cancer Res.* 2017; 77:2620–2632.
42. 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., et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science.* 2012; 338:120–123.

43. Wang T., Cai G., Qiu Y., Fei N., Zhang M., Pang X., Jia W., Cai S., Zhao L. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J.* 2012; 6:320–329.
44. Sobhani I., Tap J., Roudot-Thoraval F., Roperch J.P., Letulle S., Langella P., Corthier G., Tran Van Nhieu J., Furet J.P. Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS ONE.* 2011]
45. Zhang G., Svenungsson B., Kärnell A., Weintraub A. Prevalence of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in adult patients with diarrhea and healthy controls. *Clin. Infect. Dis.* 1999;29:590–594.
46. Sears C.L. The toxins of *Bacteroides fragilis*. *Toxicon.* 2001;39:1737–1746.
47. Boleij A., Hechenbleikner E.M., Goodwin A.C., Badani R., Stein E.M., Lazarev M.G., Ellis B., Carroll K.C., Albesiano E., Wick E.C., et al. The *Bacteroides fragilis* toxin gene is prevalent in the colon mucosa of colorectal cancer patients. *Clin. Infect. Dis.* 2015; 60:208–215.
48. Purcell R.V., Pearson J., Aitchison A., Dixon L., Frizelle F.A., Keenan J.I. Colonization with enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* is associated with early-stage colorectal neoplasia. *PLoS ONE.* 2017
49. Obiso R.J., Azghani A.O., Wilkins T.D. The *Bacteroides fragilis* toxin fragilysin disrupts the paracellular barrier of epithelial cells. *Infect. Immun.* 1997; 65:1431–1439.
50. Wells C., van de Westerlo E., Jechorek R., Feltis B., Wilkins T., Erlandsen S. *Bacteroides fragilis* enterotoxin modulates epithelial permeability and

- bacterial internalization by HT-29 enterocytes. *Gastroenterology*. 1996; 110:1429–1437.
51. Riegler M., Lotz M., Sears C., Pothoulakis C., Castagliuolo I., Wang C.C., Sedivy R., Sogukoglu T., Cosentini E., Bischof G., et al. *Bacteroides fragilis* toxin 2 damages human colonic mucosa in vitro. *Gut*. 1999; 44:504–510.
52. Wu S., Morin P.J., Maouyo D., Sears C.L. *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces c-Myc expression and cellular proliferation. *Gastroenterology*. 2003; 124:392–400.
53. Wu S., Rhee K.-J., Albesiano E., Rabizadeh S., Wu X., Yen H.-R., Huso D.L., Brancati F.L., Wick E., McAllister F., et al. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat. Med.* 2009; 15:1016–1022.
54. Sousa C.P. The versatile strategies of *Escherichia coli* pathotypes: A mini review. *J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis.* 2006; 12:363–373.
55. Escobar-Páramo P., Grenet K., Le Menac'h A., Rode L., Salgado E., Amorin C., Gouriou S., Picard B., Rahimy M.C., Andremont A., et al. Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70:5698–5700.
56. Darfeuille-Michaud A., Neut C., Barnich N., Lederman E., Di Martino P., Desreumaux P., Gambiez L., Joly B., Cortot A., Colombel J.F. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1998; 115:1405–1413.

57. Darfeuille-Michaud A., Boudeau J., Bulois P., Neut C., Glasser A.-L., Barnich N., Bringer M.-A., Swidsinski A., Beaugerie L., Colombel J.-F. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2004; 127:412–421.
58. Maddocks O.D.K., Short A.J., Sonnenberg M.S., Bader S., Harrison D.J. Attaching and effacing *Escherichia coli* downregulate DNA mismatch repair protein in vitro and are associated with colorectal adenocarcinomas in humans. *PLoS ONE*. 2009
59. Raisch J., Buc E., Bonnet M., Sauvanet P., Vazeille E., de Vallée A., Déchelotte P., Darcha C., Pezet D., Bonnet R., et al. Colon cancer-associated B2 *Escherichia coli* colonize gut mucosa and promote cell proliferation. *World J. Gastroenterol*. 2014; 20:6560–6572.
60. Flatau G., Lemichez E., Gauthier M., Chardin P., Paris S., Fiorentini C., Boquet P. Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. *Nature*. 1997; 387:729–733.
61. Taieb F., Petit C., Nougayrède J.-P., Oswald E. The Enterobacterial Genotoxins: Cytotoxic Distending Toxin and Colibactin. *EcoSal Plus*. 2016
62. Nougayrède J.-P., Homburg S., Taieb F., Boury M., Brzuszkiewicz E., Gottschalk G., Buchrieser C., Hacker J., Dobrindt U., Oswald E. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science*. 2006; 313:848–851.
63. Cuevas-Ramos G., Petit C.R., Marcq I., Boury M., Oswald E., Nougayrède J.-P. *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic

instability in mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010; 107:11537–11542.

64. Raisch J., Rolhion N., Dubois A., Darfeuille-Michaud A., Bringer M.-A. Intracellular colon cancer-associated *Escherichia coli* promote protumoral activities of human macrophages by inducing sustained COX-2 expression. Lab. Investig. 2015; 95:296–307.
65. G. Cui, H. Yang, J. Zhao, A. Yuan, J. Florholmen. Citocina proinflamatoria IL-17A elevada en los tejidos adyacentes a lo largo de la secuencia adenoma-carcinoma. Pathol. Oncol. Res. : POR, 21 (1) (2015), págs.139 - 146
66. A. Awasthi, G. Murugaiyan, VK Kuchroo. Interacción entre el efector Th17 y las células T reguladoras. J. Clin. Immunol., 28 (6) (2008), págs. 660 – 670
67. Q. Zhu, X. Wu, X. Wang. Distribución diferencial de macrófagos asociados a tumores y células Treg / Th17 en la progresión de tumores de ovario epiteliales malignos y benignos. Oncol. Letón., 13 (1) (2017), págs.159 - 166
68. T. Korn, E. Bettelli, M. Oukka, VK Kuchroo. Células IL-17 y Th17. Annu. Rev. Immunol., 27 (2009), págs. 485 - 517
69. W. Zhong, ZY Jiang, L. Zhang, JH Huang, SJ Wang, C. Liao, *et al.* Papel de las células T LAP (+) CD4 (+) en el microambiente tumoral del cáncer colorrectal World J. Gastroenterol., 23 (3) (2017), págs. 455 - 463

Cronograma.

Registro de Protocolo: HGEJMS 01/02/2020

Título de la tesis: **IDENTIFICACIÓN DE ESCHERICHIA COLI PKS+ Y BACTEROIDES FRAGILIS ENTEROTOXIGENA EN PACIENTES CON CANCER COLORRECTAL.**

Investigador Principal: Dr. José Humberto Espinoza Veliz.

Fecha de sometimiento del proyecto: lunes 01 de julio del 2019.

Fecha de aprobación por las comisiones: jueves, 03 de diciembre del 2019.

Fecha aproximada de término: lunes 11 de agosto del 2021.

Instrucciones: Favor de anotar en los encabezados de las columnas los meses y año del bimestre a planificar. En el renglón que corresponda marcar con una X para la actividad correspondiente si aplica en el protocolo.

Fecha de inicio: Febrero 2019	BIMESTRE											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	F- M 19	A- M 19	J-J 19	A- S 19	O- N 19	D- E 20	F- M 20	A- M 20	J-L 20	A- S 20	O-N 20	D-E 21
ACTIVIDAD												
Registro, consentimientos informados y elaboración de HC	x	x	x	x	x	x	x	x				
Recolección de muestras	x	x	x	x	x	x	x	x				
Análisis de muestras	x	x	x	x	x	x	x	x				
Análisis de los estudios									x			
Presentación de resultados										x		
Elaboración de manuscritos										x		
Publicación											x	
OTRAS ACTIVIDADES (ESPECIFICAR)												

Dr. José Humberto Espinoza Veliz
Nombre y firma del investigador principal

Consideraciones éticas.

1. El protocolo corresponde a:

a) Investigación sin riesgo ¹

SI NO

1. Técnicas y métodos de investigación documental, no se realiza intervención o modificación relacionada con variables fisiológicas, psicológicas o sociales, es decir, sólo entrevistas, revisión de expedientes clínicos, cuestionarios en los que no se traten aspectos sensitivos de su conducta.

b) Investigación con riesgo mínimo ²

SI NO

2. Estudios prospectivos que emplean el registro de datos a través de procedimientos comunes en exámenes físicos o psicológicos para diagnóstico o tratamiento rutinarios, entre los que se consideran: somatometría, pruebas de agudeza auditiva, electrocardiograma, colección de excretas y secreciones externas, obtención de placenta durante el parto, colección de líquido amniótico al romperse las membranas, obtención de saliva, dientes deciduales y dientes permanentes extraídos por indicación terapéutica, placa dental y cálculos removidos por procedimientos profilácticos no invasores, corte de pelo y uñas sin causar desfiguración, extracción de sangre por punción venosa en adultos en buen estado de salud con frecuencia máxima de dos veces a la semana y volumen máximo de 40 ml en dos meses, excepto durante el embarazo, ejercicio moderado en voluntarios sanos, pruebas psicológicas a individuos o grupos en los que no se manipulará la conducta del sujeto, investigación con medicamentos de uso común, amplio margen terapéutico, autorizados para su venta, empleando las indicaciones, dosis y vías de administración establecidas y que no sean medicamentos de investigación no registrados por la Secretaría de Salud (SS).

c) Investigación con riesgo mayor que el mínimo ³

SI NO

3. Aquel estudio en que las probabilidades de afectar al sujeto son significativas entre las que se consideran: estudios con exposición a radiaciones, ensayos clínicos para estudios farmacológicos en fases II a IV para medicamentos que no son considerados de uso común o con modalidades en sus indicaciones o vías de administración diferentes a los establecidos; ensayos clínicos con nuevos dispositivos o procedimientos quirúrgicos extracción de sangre mayor del 2 % de volumen circulantes en neonatos, amniocentesis y otras técnicas invasoras o procedimientos mayores, los que empleen métodos aleatorios de asignación a esquemas terapéuticos y los que tengan control con placebos, entre otros.

2. ¿Se incluye formato de consentimiento informado? ⁴ SI NO

4. *Deberá incluirse en todos los protocolos que corresponden a riesgo mayor al mínimo y con riesgo mínimo. Tratándose de investigaciones sin riesgo, podrá dispensarse al investigador la obtención del consentimiento informado por escrito*

3. En el caso de incluir el Formato de **Consentimiento Informado**, señalar si están integrados los siguientes aspectos:

- | | | | | |
|---|----|-------------------------------------|----|-------------------------------------|
| a) Justificación y objetivos de la investigación | SI | <input checked="" type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> |
| b) Descripción de procedimientos a realizar y su propósito | SI | <input checked="" type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> |
| c) Molestias y riesgos esperados | SI | <input type="checkbox"/> | NO | <input checked="" type="checkbox"/> |
| d) Beneficios que pudieran obtenerse | SI | <input checked="" type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> |
| e) Posibles contribuciones y beneficios para participantes y sociedad | SI | <input checked="" type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> |
| f) Procedimientos alternativos que pudieran ser ventajosos para el sujeto | SI | <input type="checkbox"/> | NO | <input checked="" type="checkbox"/> |
| g) Garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento del sujeto | SI | <input type="checkbox"/> | NO | <input checked="" type="checkbox"/> |
| h) Menciona la libertad de retirar su consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio, sin que por ello se creen perjuicios para continuar su cuidado y tratamiento | SI | <input checked="" type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> |
| i) La seguridad de que no se identificará al sujeto y que se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con su privacidad | SI | <input checked="" type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> |
| j) El compromiso de proporcionarle información actualizada obtenida durante el estudio, aunque ésta pudiera afectar la voluntad del sujeto para continuar participando | SI | <input checked="" type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> |
| k) La disponibilidad de tratamiento médico y la indemnización a que legalmente tendrá derecho, por parte de la institución de atención a la salud, en el caso de daños que la ameriten, directamente causadas por la investigación y, | SI | <input type="checkbox"/> | NO | <input checked="" type="checkbox"/> |

que si existen gastos adicionales, éstos serán absorbidos por el presupuesto de la investigación

- l) Indica los nombres y direcciones de dos testigos y la relación que éstos tengan con el sujeto de investigación SI NO
- m) Deberá ser firmado por dos testigos y por el sujeto de investigación o su representante legal, en su caso. Si el sujeto de investigación no supiere firmar, imprimirá su huella digital y en su nombre firmará otra persona que él designe SI NO
- n) El nombre y teléfono a la que el sujeto de investigación podrá dirigirse en caso de duda SI NO
- ñ) La seguridad de que el paciente se referiría para atención médica apropiada en caso necesario SI NO

4. Si el proyecto comprende investigación en menores de edad o incapaces
NO PROCEDE

- a) El investigador debe asegurarse previamente de que se han hecho estudios semejantes en personas de mayor edad y en animales inmaduros, excepto cuando se trate de estudiar condiciones que son propias de la etapa neonatal o padecimientos específicos de ciertas edades SI NO
- b) Se obtiene el escrito de consentimiento informado de quienes ejercen la patria potestad o la representación legal del menor o incapaz de que se trate. SI NO
- c) Cuando la incapacidad mental y estado psicológico del menor o incapaz lo permitan, el investigador obtiene además la aceptación del sujeto de investigación, después de explicar lo que se pretende hacer. SI NO

5. Si el proyecto comprende investigación en mujeres de edad fértil, embarazadas, durante el trabajo de parto, puerperio, lactancia y en recién nacidos.
NO PROCEDE

- a) ¿Se aseguró el investigador que existen investigaciones realizadas en mujeres no embarazadas que demuestren su seguridad, a excepción de estudios específicos que requieran de dicha condición? SI NO

- b) Si es investigación de riesgo mayor al mínimo, se asegura que existe beneficio terapéutico (las investigaciones sin beneficio terapéutico sobre el embarazo en mujeres embarazadas, no deberán representar un riesgo mayor al mínimo para la mujer, el embrión o el feto) **SI** **NO**
- c) Que las mujeres no están embarazadas, previamente a su aceptación como sujetos de investigación **SI** **NO**
- d) Que se procura disminuir las posibilidades de embarazo durante el desarrollo de la investigación **SI** **NO**
- e) Se planea obtener la carta de consentimiento informado de la mujer y de su cónyuge o concubinario, previa información de los riesgos posibles para el embrión, feto o recién nacido en su caso (el consentimiento del cónyuge o concubinario sólo podrá dispensarse en caso de incapacidad o imposibilidad fehaciente o manifiesta para proporcionarlo, porque el concubinario no se haga cargo de la mujer, o bien cuando exista riesgo inminente para la salud o la vida de la mujer, embrión, feto o recién nacido) **SI** **NO**
- f) La descripción del Proceso para obtener el consentimiento de participación en el estudio **SI** **NO**
- g) Se entrega de una copia del consentimiento a los responsables del cuidado del paciente **SI** **NO**
- h) La descripción de las medidas que se piensan seguir para mantener la confidencialidad de la información **SI** **NO**
- i) La experiencia del investigador principal y co-investigadores en este tipo de investigación **SI** **NO**
- j) Las posibles contribuciones y beneficios de este estudio para los participantes y para la sociedad **SI** **NO**

Comité de Bioseguridad.

Hospital General Juan María de Salvatierra

FECHA		DIA	MES	AÑO
		11	08	2021

NÚMERO ASIGNADO POR LA DIRECCION DE INVESTIGACIÓN A SU PROYECTO:

055-055-2020

TÍTULO COMPLETO DE SU PROYECTO:

IDENTIFICACIÓN DE ESCHERICHIA COLI PKS+ Y BACTEROIDES FRAGILIS
ENTEROTOXÍGENA EN PACIENTES CON CANCER COLORRECTAL.

Evaluación

A. Indique el nivel de Bioseguridad de este estudio.

BSL1, BSL2, BSL3 o BSL4	
No aplica	

B. En el desarrollo de este protocolo trabajarán con muestras biológicas de pacientes, modelos animales, microorganismos, plásmidos, organismos genéticamente modificados y/o utilizará material radioactivo, fuentes radiactivas no encapsuladas o agente(s) corrosivos, reactivos, explosivos, tóxicos o inflamables?

SI NO

Si la respuesta es "NO aplica" a las preguntas anteriores lea el siguiente párrafo, firme y entregue únicamente esta hoja.

Como investigador responsable del protocolo de investigación sometido a revisión por el Comité de Bioseguridad CERTIFICO, bajo protesta de decir verdad, que la información proporcionada es verdad.

Nombre y firma del(los) investigador(es) responsable(s)

En caso de que la respuesta sea “SI” a la pregunta 2 continúe proporcionando toda la información que se solicita a continuación:

1. Durante el desarrollo del protocolo utilizará y/o generará materiales o Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI) como son muestras clínicas, tejidos humanos, modelos animales o microorganismos?

SI	NO
----	----

1a. Anote en cada renglón el nombre del **RPBI**, los lugares específicos en donde se obtendrán y donde se llevará a cabo el análisis de las muestras biológicas.

MATERIAL	LUGAR DE TOMA DE MUESTRA	LUGAR DE ANÁLISIS DE LA MUESTRA
a) Heces	BHGEJMS	Lab. Bio Technologika A2
b) Mucosa de colon	BHGEJMS	Lab. Bio Technologika A2
c)		
d)		
e)		
f)		

1b. Describa los procedimientos que utilizará para inactivarlos, manejarlos y desecharlos. Especifique claramente el color de los envases en que los deposita.

MATERIAL	PROCEDIMIENTO	COLOR DE ENVASE
a) Heces	Solución de hipoclorito de sodio	Transparente
b) Mucosa de colon	Solución de hipoclorito de sodio	Transparente
c)		
d)		
e)		
f)		

2.- Si en su proyecto utilizarán metodologías que involucren **DNA recombinante (DNAr)**, llene la siguiente tabla. Si es necesario anexe líneas.

NO APLICA

ORIGEN DEL DNA	HUÉSPED	VECTOR	GRUPO DE RIESGO	USO EXPERIMENTAL

2a. Mencione las medidas de confinamiento para el manejo de riesgo, que utilizará en las actividades que involucren DNA recombinante.

NO APLICA

2b. Describa el procedimiento para el posible tratamiento y medidas para la eliminación de residuos que involucren DNA recombinante o fragmentos de ácidos nucleicos de cualquier origen generados en la realización del proyecto.

Los productos de PCR son inocuos para la salud humana, el manejo de estos desechos se realizará en el laboratorio de Biotechnologika A2.

2c. Si en su protocolo se expondrá a animales vivos a DNAr, células con DNAr o virus recombinantes, describa su procedimiento de emergencia en caso de liberación accidental de algún animal expuesto a DNAr.

NO APLICA

3- En su proyecto, ¿utilizará y/o generará materiales o Residuos Químicos Peligrosos (RQP) con características CRETI (corrosivo, reactivo, explosivo, tóxico, inflamable)?

SI NO

3a.- Anote en cada fila el nombre de los materiales peligrosos o RQP, su código CRETI, el procedimiento para desecharlos y lineamientos para atender emergencias en caso de ruptura del envase, derrame, ingestión o inhalación accidental.

NO APLICA

MATERIAL	CODIGO CRETI	PROCEDIMIENTO PARA DESECHARLO	LINEAMIENTOS DE EMERGENCIA
a)			
b)			
c)			
d)			
e)			

4.- ¿En el proyecto se utilizará cualquier fuente de radiaciones ionizantes (rayos X, rayos gamma, partículas alfa, beta, neutrones o cualquier material radiactivo) o fuentes radiactivas no encapsuladas?

SI No

4a. Señale el tipo de radiación que utilizará.

NO APLICA

4b. Indique cuanta radiación recibirá el paciente por día y/o experimento, estudio, etc

NO APLICA

4c. Lugar donde se realizará la manipulación del material radiactivo

NO APLICA

4d. Describa el procedimiento que usará para el desecho de los residuos radiactivos

NO APLICA

4e. Indique el número de licencia de la CNSNS y nombre del encargado de seguridad radiológica autorizado para uso de dichas fuentes y lugar (ej. nombre del laboratorio, dirección, teléfono, etc.) de asignación.

NO APLICA

5. Si las muestras (desechos o cualquier producto o sustancia de origen humano, animal o microorganismos) tuvieran que ser transportadas entre las diferentes áreas del hospital, de otra institución al HGEJMS o fuera de nuestra Institución, especifique:

-CÓMO: Frasco estéril de plástico sellado con parafilm, en hielera a 4GC

-QUIÉN: Persona autorizada por laboratorio Biotechnologica A2.

-PERIODICIDAD: 2 veces al mes

6. Describa brevemente la infraestructura y condiciones de trabajo con que cuenta para la realización de su proyecto, en relación con los puntos anteriores.

- Se cuenta con espacio apropiado para el manejo de las muestras.
- Se cuenta con espacio apropiado para la manipulación de las muestras y la extracción de DNA total de las mismas.
- Se cuenta con el equipamiento y protocolos establecidos para la extracción, manipulación y procesamiento de ácidos nucleicos (DNA y RNA).
- Se cuenta con material de laboratorio y reactivos grado biología molecular certificados para la manipulación, extracción y procesamiento de ácidos nucleicos (DNA y RNA).
- Se cuenta con equipo de termociclador de PCR en tiempo real, para la realización de PCR cuantitativos y PCR punto final.

7. Si tiene algún comentario adicional, por favor, escríbalo abajo

El personal de Biotechnologica A2 cuenta con más de 15 años de experiencia trabajando en biología molecular, además de contar con formación a nivel de Doctorado en Ciencias por parte del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM).

NOTA: Cuando el protocolo se realice en colaboración con otras instituciones e incluya el manejo de cualquier muestra de origen humano, animal o de algún microorganismo, así como el manejo de algún reactivo peligroso (CRETI), se requiere anexar el formato de aprobación por parte de la Comisión de Bioseguridad de la o las instituciones que se responsabilizaran de tomar, procesar, transportar y/o desechar las muestras o reactivos; así mismo, en estos proyectos se deberá anexar un apartado de bioseguridad detallando como se manejarán y desecharán los RPBI o CRETÍ.

Se deberá anexar el comprobante de asistencia a cursos de manejo de residuos peligrosos, productos y/o materiales infectocontagiosos de algún participante del proyecto de investigación.

Dr. José Humberto Espinoza Veliz
Nombre y firma del investigador
responsable

Nombre y firma del técnico responsable

Anexos.



BENEMERITO HOSPITAL GENERAL CON ESPECIALIDADES "JUAN MARIA DE SALVATIERRA"

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE MEDICINA
FACULTAD DE MEDICINA
SERVICIO DE CIRUGIA GENERAL

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN INVESTIGACIONES

INVESTIGACIÓN:

IDENTIFICACIÓN DE ESCHERICHIA COLI PKS+ Y BACTEROIDES FRAGILIS ENTEROTOXÍGENA EN PACIENTES CON CANCER COLORRECTAL.

Ciudad y fecha: _____

Yo, _____
una vez informado sobre los propósitos, objetivos, procedimientos de intervención y evaluación que se llevarán a cabo en esta investigación y los posibles riesgos que se puedan generar de ella, autorizo a Dr. José Humberto Espinoza Veliz, médico residente del servicio de cirugía general del hospital general con especialidades "Juan María de Salvatierra" para la realización de las siguientes procedimientos:

1.- Toma de muestra de heces.

2.- Análisis de la muestra de heces en laboratorio BioTechnologika A2 en la Cd. De La Paz, Baja California Sur.

Adicionalmente se me informó que: • Mi participación en esta investigación es completamente libre y voluntaria, estoy en libertad de retirarme de ella en cualquier momento. • No recibiré beneficio personal de ninguna clase por la participación en este proyecto de investigación. Sin embargo, se espera que los resultados obtenidos permitirán mejorar los procesos de evaluación de pacientes con

condiciones clínicas similares a las mías. • Toda la información obtenida y los resultados de la investigación serán tratados confidencialmente. Esta información será archivada en papel y medio electrónico. El archivo del estudio se guardará en la base de datos del investigador y del laboratorio de investigación molecular Bio Technologika A2 bajo la responsabilidad de los investigadores. • Puesto que toda la información en este proyecto de investigación es llevada al anonimato, los resultados personales no pueden estar disponibles para terceras personas como empleadores, organizaciones gubernamentales, compañías de seguros u otras instituciones educativas. Esto también se aplica a mi cónyuge, a otros miembros de mi familia y a mis médicos.

Hago constar que el presente documento ha sido leído y entendido por mí en su integridad de manera libre y espontánea.

Nombre y firma

Documento de identidad _____ No. _____ de _____
Huella: