



Universitat de Girona

DESCRIPCIÓ I QUANTIFICACIÓ DE LA MICROBIOTA INTESTINAL ASSOCIADA AL CÀNCER COLORECTAL

Teresa MAS DE XAXARS RIVERO

Dipòsit legal: GI. 1664-2012

<http://hdl.handle.net/10803/94513>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



TESI DOCTORAL

***DESCRIPCIÓ I QUANTIFICACIÓ DE LA
MICROBIOTA INTESTINAL
ASSOCIADA AL CÀNCER
COLORECTAL***

TERESA MAS DE XAXARS RIVERO

2012

PROGRAMA DE CIÈNCIES EXPERIMENTALS I SOSTENIBILITAT

Dirigida per:

Prof. Dr. L. J. Garcia-Gil

Memòria presentada per optar al títol de doctora per la Universitat de Girona



Universitat de Girona

Jesús Garcia Gil, catedràtic del Departament de Biologia de la Universitat de Girona,

CERTIFICO:

Que aquest treball titulat "Descripció i quantificació de la microbiota intestinal associada al càncer colorectal", que presenta Teresa Mas de Xaxars Rivero per a l'obtenció del títol de Doctora, ha estat realitzat sota la meva direcció, i considerant aquesta acabada, autoritzo la seva presentació perquè sigui jutjada per la Comissió corresponent.

Signatura,

Girona, Març 2012



Universitat de Girona, Àrea de Microbiologia

Tesi Doctoral

***DESCRIPCIÓ I QUANTIFICACIÓ DE LA
MICROBIOTA INTESTINAL
ASSOCIADA AL CÀNCER
COLORECTAL***

Memòria presentada per Teresa Mas de Xaxars Rivero, inscrita en el programa de doctorat en Ciències Experimentals i Sostenibilitat de la Universitat de Girona per optar al grau de Doctor en Biologia per la Universitat de Girona.

Vist –i-plau

Autora

El Director de la Tesi

Prof. Dr. L.J. Garcia-Gil
Catedràtic de Microbiologia

Teresa Mas de Xaxars Rivero

Girona, Març de 2012

A la meva mare, allà on descansi

Agraïments

Aquest treball s'ha finançat amb el projecte del Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2006-00414/; 2006). La Generalitat de Catalunya va finançar també la realització d'aquesta tesi amb una beca FI (2009-2011).



Han passat molts dies, moltes setmanes, molts mesos i uns quants anys per l'elaboració d'aquesta tesi, i durant tot aquest temps sempre he estat acompanyada, aconsellada i ajudada per un gran equip i una gran família que han remat en la mateixa direcció. Però el camí no s'acaba aquí, el coneixement, l'aprenentatge i el treball en equip permetran seguir avançant. Per aquest motiu vull agrair-vos personalment la vostra col·laboració:

Primer de tot, agrair al meu director de tesi, en **Jesús**, per confiar en mi i donar-me l'oportunitat d'entrar en el món de la recerca i guiar aquesta tesi.

A tots els membres de l'àrea de Microbiologia que em van obrir les portes de la casa i em van atendre sempre que els vaig preguntar.

Als metges de l'Hospital Josep Trueta, en **Xavier Aldeguer** i en **David Busquets**, així com els metges de l'Hospital Santa Caterina, la **Míriam Sabat**, en **Carlos López-Oliu** i en **Xavier Pamplona** i les infermeres. Sense la seva col·laboració aquest treball no s'hauria pogut realitzar.

A la **Marga**, la **Núria** i la **Mireia**, que em van ensenyar com endinsar-me en el món de la recerca, del funcionament del laboratori i dels softwares! Per fer-me un lloc en el nostre petit 303 i ajudar-me en tot el que els va ser possible. Treballar amb vosaltres és continuar aprenent. I per

circumstàncies, Mireia, moltes gràcies pel suport que m'has donat i la paciència amb els meus entrenaments!

A tots els **pekemicros**, sempre disposats a donar un cop de mà: Marc, Àlex, Joan, Olaya, Rosalia, Arantxa, Ariadna, Mireia, Annes, Sara, Imma, Olga, i la Ferhesteh. I **als no tan pekes**: Catxo, Bo, Gich, Xavi V, Xavi T, Geno, Laia C.

A la nostra tècnic, la **Laia M**, disposada a escoltar, preparar medis, comandes, tot el que fes falta!

A l'**Adriana L**. pel gran suport amb l'estadística.

A la meva **família**, amb totes les bromes i preguntes que m'han fet els meus germans, amics i amigues per sentir-me parlar sobre bacteris.

Al **Rem**, que malgrat treure'm moltes hores i dies m'han ensenyat ordre, disciplina, organització i perseverança per obtenir uns resultats. A en **Bienve**, que tot i les queixes m'ha fet costat per poder compaginar-ho tot.

I finalment, i de manera molt especial, a en **Dani**. Des del primer dia me has apoyado y motivado para hacer lo que me gusta y me has animado a seguir adelante aun en momentos difíciles.

A tots, sempre vostra.

Taula de continguts

Agraïments	i
Taula de continguts	iii
Taula d'abreviacions	viii
Índex de taules i figures	ix
Resum	xiii
<i>Summary</i>	xvi

INTRODUCCIÓ

1. Anatomia i fisiologia del Còlon i el Recte.....	29
1.1 Fisiologia de les cèl·lules epitelials intestinals.....	32
2. El càncer colorectal.....	34
2.1 Concepte.....	34
2.2 Tipus de CCR.....	35
2.2.1 CCR esporàdic	35
2.2.2 CCR familiar	37
2.3 Estadis del tumor.....	38
2.4 Etiologia	41
2.5 Epidemiologia	42
2.5.1 Incidència.....	42
2.5.2 Mortalitat.....	43
2.5.3 Factors de risc	44
2.6 Manifestacions clíniques.....	51
2.7 Cribatge	52
2.8 Teràpies actuals	54
2.9 Genètica del càncer colorectal.....	54
3. La microbiota del còlon i el recte	59
3.1 Composició de la microbiota.....	59
3.2 La colonització bacteriana en el TGI	61
3.3 Funcions principals de la microbiota	64
3.3.1 Funcions metabòliques:	65

3.3.2	Funcions estructurals	66
3.3.3	Funcions protectores	69
4.	La microbiota en el càncer colorectal esporàdic.....	70
4.1	Evidències de l'associació del CCR amb la microbiota.....	70
4.2	Espècies bacterianes associades al càncer colorectal.....	74
5.	Els estreptococs.....	77
5.1	Morfologia i metabolisme	77
5.2	Filogènia i taxonomia del gènere <i>Streptococcus</i>	77
5.3	Patogenicitat i prevalença.....	79
5.3.1	Estreptococs del grup A.....	79
5.3.2	Estreptococs del grup B.....	81
5.3.3	Estreptococs del grup C	81
5.3.4	Estreptococs del grup D.....	81
5.3.5	Estreptococs del grup E i F	81
5.3.6	Estreptococs del grup G.....	82
5.3.7	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	82
5.3.8	Altres estreptococs	82
5.4	Detecció de <i>Streptococcus</i> per mètodes moleculars	83
5.5	<i>Streptococcus bovis</i> i el càncer colorectal.....	84
6.	La biologia molecular en l'estudi de la microbiota intestinal.....	85
	Capítol 1: Determinació de l'abundància de bacteris específics associats al CCR respecte individus control i relació amb les dades clíniques dels pacients.	89
	Capítol 2: Diversitat i composició de la comunitat bacteriana en pacients amb càncer colorectal. Diferències entre teixits tumoral i mucós i cerca de bacteris rellevants	89
	Capítol 3: Desenvolupament d'una eina molecular basada en la PCR-DGGE específica pel gènere <i>Streptococcus</i> per analitzar les poblacions naturals d'estreptococs en pacients amb càncer colorectal.....	90
	Capítol 4: Cas clínic: Diagnòstic de càncer colorectal en un pacient amb una infecció causada per <i>Enterococcus faecalis</i>	91

MATERIALS I MÈTODES

1.	Patients.....	95
----	---------------	----

2.	Bowel preparation and sampling	95
3.	Sample treatment and DNA extraction	96
4.	Eubacterial 16S rRNA gene amplification and DGGE.....	96
5.	Sequencing and analysis of individual DGGE bands	97
6.	Streptococcal 16S rRNA gene amplification and DGGE	98
6.1	Primer design.....	98
6.2	PCR conditions.....	99
6.3	Microorganisms.....	100
6.4	DGGE.....	102
6.5	Isolation of streptococci from colonic biopsies.....	102
7.	Quantification of bacteria by Real Time PCR.	103
8.	GenBank Accession Numbers	105
9.	Statistical Analysis.....	105
9.1	DGGE analysis.....	105
9.2	Interbacterial relationships	106
9.3	qPCR	106

RESULTATS

CAPÍTOL 1

1.1	Introduction	111
1.2	Patients data.....	112
1.3	Quantification of bacteria in Colorectal Cancer Patients and Control Subjects.....	113
1.4	Patients features.....	115

CAPÍTOL 2

2.1	Introduction	121
2.2	Fingerprinting and abundance of colonic mucosal microbiota from patients of Colorectal Cancer and Polyposis.....	121
2.2.1	Patients data	121
2.2.2	Sequence analysis and bacterial composition.....	122
2.2.3	DGGE fingerprints of CRC and PP patients.....	125
2.2.4	Bacterial DNA quantification	127

2.3	Diversity of Eubacteria in the colonic mucosa of Colorectal Cancer patients, and comparison with healthy control subjects.	131
2.3.1	Patients data	132
2.3.2	DGGE fingerprint	132
2.3.3	Sequence and bacterial composition analyses	135
2.3.4	Bacterial indexes	142
 CAPÍTOL 3		
3.1	Introduction	147
3.2	Development of a molecular approach to detect and identify members of the <i>Streptococcus</i> genus in clinical samples.	148
3.2.1	<i>Streptococcus</i> -specific PCR.....	148
3.2.2	Use of primers 1043f-1492r on clinical samples	150
3.3	Streptococcal populations of mucosal samples in CRC and IBD patients determined by PCR-DGGE	151
3.3.1	Patients data	151
3.3.2	Streptococci isolation.....	154
3.3.3	Streptococcal diversity by PCR-DGGE.....	155
3.3.4	Comparison between culturing and PCR-DGGE approaches	166
 CAPÍTOL 4		
4.1	Introduction	171
4.2	Case report.....	171
4.3	Discussion	175
DISCUSSIÓ.....		181
1.	Composició Microbiana.....	182
1.1	Teixit tumoral vs. teixit mucós.....	183
1.2	Diversitat microbiana en la mucosa intestinal de malalts de CCR vs. controls sans i associació amb factors de risc del CCR.....	184
1.3	Diversitat del gènere <i>Streptococcus</i> en malalts de CCR i individus control	187
2.	Estudi quantitatiu per qPCR.....	189
3.	Disbiosi bacteriana i el càncer colorectal.....	194

4. Efecte dels bacteris sobre el càncer colorectal.....	197
<i>Escherichia coli</i>	197
<i>Enterococcus faecalis</i>	198
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	198
CONCLUSIONS.....	203
BIBLIOGRAFIA	207

Taula d'abreviacions

APC	Adenomatous polyposi coli
CD	Crohn's Disease
CIN	Chromosomal instability
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRC/CCR	Colorectal Cancer/Càncer colorectal
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis
FAP	Familial adenomatous polyposis
GIT	Gastrointestinal tract
HMPS	Hamartomatous polyposis syndrome
HNPCC	Hereditary non-polyposis colorectal cancer
HPS	Hyperplastic polyposis syndrome
IC	Ischemic Colitis
IL	Interleukin
MAP	MUTYH-associated adenomatous polyposis
MMR	Mismatch repair genes
MSI	Microsatellite instability
PCR	Polymerase chain reaction
PP	Polyposi patients
PPR	Pattern recognition receptor
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
RT-PCR	Real time polymerase chain reaction
SCFAs	Short chain fatty acids
SCs	Stem cells
TLR	Toll-like receptor
UC	Ulcerative Colitis

Índex de taules i figures

Taula 1. Diferències entre els tres subgrups de càncer colorectal [1].	30
Taula 2. Combinació de les diferents categories T, N i M per a definir l'estadi d'un tumor.	40
Taula 3. Síndromes familiars de càncer colorectal i gens implicats en estadis inicials	56
Taula 4. Gens mutats implicats en la via canònica o supressora en el CCR esporàdic.	58
Taula 5. Gens amb MSI i la seva funció en el CCR esporàdic.	58
Taula 6. Factors que modulen la composició microbiana en l'hoste.	63
Taula 7. Mecanismes de defensa antimicrobiana del tracte intestinal.	64
Taula 8. Lligands produïts per diferents bacteris que són reconeguts per diferents tipus de TLRs.	68
Taula 9. Evidències del rol etiològic de la microbiota en el CCR.	71
Taula 10. Compostos generats pels bacteris carcinogènics i l'acció que causen en la carcinogènesis.	73
Taula 11. Estudis moleculars que associen la microbiota al CCR.	75
Taula 12. Grups d'estreptococs segons el tipus d'hemòlisi i el grup de Lancefield.	80
Taula 13. Clústers filogenètics obtinguts amb l'anàlisi del gen tuf i del 16S rRNA [184].	83
Table 14. Primers used and designed for streptococcal specificity.	89
Table 15. Species used to design specific-Streptococcus set of primers.	101
Table 16. Primer sets used to quantify bacteria in CRC, PP and control subjects.	103
Table 17. Clinical features from patients included in chapter 1.	112
Table 18. Media quantitation of specific bacterium and all Eubacteria (Log10 CFU Equivalent/106 human cells) and significance level expressed as * (P values <0.05).	113
Table 19. Abundance expressed as the media and significance (P value, significant is denoted as *) of different species and Eubacteria (Log10 CFU Equivalent/106 human cells) against subect features.	115
Table 20. Abundance expressed as the media and significance (P value, significant is denoted as *) of different species and Eubacteria (Log10 CFU Equivalent/106 human cells) against risk factors	116
Table 21. Relative abundance of specific bacteria per Eubacteria. Significance (P value) is denoted as *. Eub, Eubacteria.	116
Table 22. Abundance ratios between specific bacteria. Significance (P value) is denoted as *.	117
Table 23. Relative abundance ratios and ratios between specific bacteria. Significance (P value <0.05) is denoted as *.	118
Table 24. Clinical data of patients included in chapter 2.	122
Table 25. Description of the different phylotypes found from the total of DGGE bands identified.	123
Table 26. Quantification of bacteria in colonic biopsy samples (Log10 EN/106 human cells) and comparison between groups. Significance value is denoted as * (P<0.05).	127
Table 27. Quantification mean and standard deviation of bacteria in colonic	129

biopsy samples (Log10 CFU Equivalent/106 human cells). Significance value * (p<0.05) was used to compare different tissues.	
Table 28. Mean quantity and standard deviation of bacteria in mucosal samples (Log10 CFU Equivalent/106 human cells). Significance value * (p<0.05).	131
Table 29. Sampling size and main characteristics of patients and healthy control subjects analyzed.	132
Table 30. Association of risk factors analyzed with the different bacterial pattern clusters identified in this study by the P value (denoted as *). N.S., non significant.	135
Table 31. Description of the different phlotypes found from the total of DGGE bands identified.	136
Table 32. Phlotypes showing significant prevalence in CRC and control samples. Percentages indicate the proportion of samples of either type containing this phlotype.	142
Table 33. Relationship of the different phlotypes showing the highest relatedness with CRC risk according to the logistic regression model performed in this work. OR, Odds Ratio, CI, confidence interval at 95% precision.	143
Table 34. Primer sets used in this work.	148
Table 35. Specificity test assay for primers 1043F-1492R on bacterial species from the genus Streptococcus and other phylogenetic groups.	149
Table 36. Sequence identification from DGGE bands in GenBank and RDP-II.	151
Table 37. Characteristics and Clinical Data from CRC patients and Healthy controls subjects Analysed	152
Table 38. Bacterial isolates identified by culturing methods. Table 39. Sequence identification of DGGE bands in GenBank and RDP-II.	153
Table 39. Sequence identification of DGGE bands in GenBank and RDP-II.	159
Table 40. Streptococcal species identified by culturing and DGGE. Abundance of the species in relation to the subjects.	167
Figura 1. Parts de l'intestí gruixut	29
Figura 2. Esquema d'una secció transversal del còlon amb l'estructura de les diferents capes que el conformen.	31
Figura 3. Estructura de les criptes de Lieberkuhn. Les SCs es situen a la part baixa de la cripta mentre que a la part mitja es troben les cèl·lules progenitores i a la part superficial les cèl·lules diferenciades [13].	33
Figura 4. Progressió dels diferents estadis de desenvolupament d'un tumor (Johns Hopkins Colon Cancer Center).	34
Figura 5. Alteracions moleculars de la via supressora o canònica [16].	36
Figura 6. Progressió dels diferents estadis de l'extensió d'un tumor.	41
Figura 7. Incidència del CCR al món [26]. Països amb elevada incidència de CCR (casos per 100,000 habitants) estan indicats en blau; països amb una incidència moderada de casos s'indiquen amb rosa o vermell; i països amb una baixa incidència en verd.	42
Figura 8. Evolució de la incidència i de la mortalitat de CCR en homes i dones des del 1975 fins el 2006 [27].	43
Figura 9. Incidència respecte l'edat e patir un CCR per cada 100000 habitants d'acord amb els factors modificables de risc [31].	45

Figura 10. Factors familiars i genètics en CCR [32].	45
Figura 11. Proposta de mecanisme d'associació de la dieta, l'obesitat i l'activitat física amb la insulina, i la seva relació amb el càncer colorectal [44].	47
Figura 12. Esquema descriptiu d'un enema de doble contrast.	53
Figura 13. Contribució genètica al CCR. FAP, familiar adenomatous polyposis; MMR, mismatch repair genes; APC, adenomatous polyposis coli; BLM, Bloom syndrome; TGFβR2, transforming growth factor-β receptor 2.	55
Figura 14. Tipus de gens implicats en el càncer colorectal esporàdic	57
Figura 15. Distribució gastrointestinal dels filotips segons el tipus d'estudi (dependent o independent de cultiu) [69].	61
Figura 16. Arbre filogenètic del gen 16S rRNA de les seqüències obtingudes de les mostres intestinals. Entre parèntesi s'indica el nombre total de seqüències obtingudes, els filotips i els nous filotips [61].	63
Figura 17. Mecanisme d'emmagatzematge del greix en els adipòcits promogut per la microbiota mitjançant l'increment de l'activitat de les lipases (LPL) pel segrest de Fiaf (fasting-induced adipocyte factor) o per increment de triglicèrids (TG) per l'augment de la lipogènesis i de ChREBP (carbohydrate response element binding protein) i SREBP1 (sterol regulatory element binding protein 1) [59].	66
Figura 18. Grups d'estreptococs d'acord a la seva filogènia, segons l'anàlisi de les seqüències del gen 16S rRNA[181].	78
Figure 19. Biopsy-associated bacteria quantification by qPCR. On average the media is represented plus the standard deviation. Significance is denoted as *. <i>Eco</i> , <i>E. coli</i> ; <i>Fpra</i> , <i>F. prausnitzii</i> ; <i>Efae</i> , <i>E. faecalis</i> ; <i>Dsf</i> , <i>Desulfovibrio sp.</i> ; <i>Eub</i> , <i>Eubacteria</i> . EN, equivalent numbers; HC, human cells.	114
Figure 20. PCR-DGGE bacterial fingerprints from colonic mucosal samples: a) CRC patients. T, tumour tissue; M, mucosa tissue and b) Polyposi patients. P, polyp tissue; M, mucosa tissue; S, standard used to know the relative positions of the bands for further comparison. Each band corresponded to a specific phylotype or bacterial specie. Vertical denaturing gradient gel ranged from 30 to 70% urea/formamide.	125
Figure 21. Cluster analysis of DGGE profiles according to the band pattern similarity. Hierarchical distance clustering of biopsy DGGE profiles. Scale bar describes DGGE similarity between profiles. CRC, colorectal cancer patients; PP, polyposi patients. Type of sample is described as mucosa, polyp or tumor.	126
Figure 22. Biopsy-associated bacteria quantification by qPCR. On average the media is represented plus the standard deviation. Statistical significance is denoted as: * P<0.05.	128
Figure 23. Abundance of 16S rRNA gene copies of bacterial species in relation to the media of bacterial 16S rRNA gene copies/ million human cells. On average the media is represented plus the standard deviation. Statistical significance is denoted as: * P<0.05.	130
Figure 24. Example of DGGE gel image of CRC patients. Each lane corresponded to the bacterial fingerprint of one sample. The later lane (M) corresponded to the standard used to know the relative positions of the bands for further comparison. Each band corresponded to a specific phylotype or bacterial specie, and selected bands were excised, reamplified and sequenced for analysis identification and comparison. Vertical denaturing gradient gel ranged from 70 to 30% urea/formamide.	133

Figure 25. Cluster analysis of DGGE profiles. Hierarchical distance clustering of biopsy DGGE profiles. Scale bar describes DGGE similarity between profiles. White dots indicate control subjects. Black dots indicate CRC subjects.	134
Figure 26. DGGE profiles representing 16S rRNA gene fragments from <i>Streptococcus sp.</i> from A (colon biopsies) and B (bronchoalveolar lavages). White dots indicate the main bands subjected to reamplification and sequencing.	150
Figure 27. Example of a DGGE gel using <i>Streptococcus</i> -genus specific primer set. Each lane corresponded to the bacterial fingerprint of one CRC sample. Standard lane (S) corresponded to the standard used to know the relative positions of the bands for further comparison in gel analysis software. DGGE gel ranged from 40% to 70% urea/formamide.	155
Figure 28. Hierarchical distance clustering of biopsy DGGE profiles. Scale bar describes DGGE similarity between profiles. CRC, colorectal patients; CTRL, control subjects.	156
Figure 29. N-J tree with 1000 bootstrap of the DGGE sequenced bands. Branch 1 corresponded to uncultured bacteria related to the ruminococcaceae family.	158
Figure 30. Contribution of culturing and molecular approaches to identify streptococcal species in a given sample. PCR-DGGE identifies 95.6% of all streptococci, which 43.6% are uniquely detected by molecular methods.	166
Figure 31. Colonoscopy images from the tumour at 60-70cm (1 and 2) and from the ischemic colitis along the right colon (3, 4 and 5).	173
Figure 32. DGGE gel profile of CRC patients. Lane 1, bacterial fingerprint of the case patient. Faint bands were observed in the upper part and a dense band was observed in the lower part of the gel, which corresponded to <i>E. faecalis</i> . Lanes 2, 3 and 4 belonged to CRC patients with normal bacterial profile	175
Figure 33. (a) Healthy epithelial surface.(b) Key features of <i>S. typhimurium</i> infected epithelium. Chemoattractants are secreted by the epithelial surface that leads to PMN influx. SCV: Salmonella containing vacuole (c) Intestinal epithelial surface of an antibiotic-treated patient showing enrichment of a set of antibiotic resistant members of the commensal microbiota such as <i>C. difficile</i> and <i>E. faecalis</i> . [267].	177
Figura 34. Potencials mecanismes d'interacció entre factors externs, la microbiota i l'hoste [300].	194
Figura 35. Promoció de la inflamació per part de la microbiota intestinal mitjançant TLRs, els quals promouen l'expressió de gens que codifiquen per factors de creixement o mediadors de la inflamació, que alhora promouen la neoplàsia. Independentment de la inflamació, la microbiota pot metabolitzar productes de la dieta o sals biliars generant procarcinògens que activen canvis neoplàsics [304].	195

Resum

El càncer colorectal és el tipus de càncer més abundant a Espanya. Es detecten fins a 65000 casos nous anuals, però la supervivència és elevada (90%) quan es detecta en estadis inicials i d'un 70% en estadis més avançats. Afecta a homes i dones per igual en una edat mitja de 70 anys. La simptomatologia pot ésser diversa, fins i tot ser asimptomàtic, i la millor prevenció és la detecció precoç. Les bases genètiques del càncer colorectal estan ben definides, tot i que al voltant del 90% dels casos són d'origen espontani. L'etiologia d'aquesta malaltia és encara desconeguda. Tanmateix, es pensa que es tracta d'una malaltia multifactorial, on factors endògens i exògens participen activament en el desenvolupament tumoral. Aquests factors són: l'edat, haver patit altres malalties intestinals, la dieta, el consum d'alcohol, el tabac, l'estil de vida, i més recentment la microbiota.

L'objectiu principal d'aquest treball és la descripció i quantificació de la comunitat microbiana de la mucosa intestinal associada a malalts de càncer colorectal, utilitzant tècniques moleculars de PCR-DGGE i qPCR per tal d'identificar potencials agents etiològics.

Primerament s'ha determinat l'abundància de bacteris específics en mostres de mucosa intestinal. *Escherichia coli* s'associa a malalts de CCR així com un major nombre d'eubacteris, i *Faecalibacterium prausnitzii* a controls sans. Per la seva part, les abundàncies de *Enterococcus faecalis* i *Desulfovibrio sp.* no han presentat diferències entre ambdós grups. Variables com el gènere, la localització del tumor o la diabetis no es relacionen amb cap bacteri. No obstant, sí s'ha pogut associar el consum de tabac a una disminució d'*E. coli*, *F. prausnitzii* i d'eubacteris. D'altra banda, malgrat que s'ha obtingut el mateix patró microbià en mostres

tumorals i de mucosa, l'abundància de bacteris com *E. faecalis* ha resultat major en les primeres. Amb tot, s'ha procedit, per a l'estudi comparatiu, a l'anàlisi de la diversitat microbiana en mostres de mucosa intestinal. Fins a 6 filotips s'han trobat més freqüentment en CCR (*Faecalibacterium prausnitzii*, *Parabacteroides merdae*, *Coriobacterium sp.*, *Clostridium sp.*, bacteri productor de butirat, uncultured bacterium) i 2 en controls sans (*Roseburia faecalis* i *Clostridium nexile*). L'anàlisi de clúster a partir de la presència/absència de filotips ha permès diferenciar 5 grups, dels quals un està clarament associat a controls sans i dos a CCR. Aquests darrers se'ls pot associar també la diabetis i a un d'ells s'ha trobat més freqüentment en exfumadors.

Un segon objectiu ha estat l'estudi de les poblacions d'estreptococs en malalts de càncer colorectal, atès que un gran nombre de publicacions relacionen certes endocarditis causades per *Streptococcus bovis* amb el CCR. Per tal d'assolir aquest objectiu s'ha dissenyat i desenvolupat un joc d'encebadors específics per al gènere *Streptococcus* i s'ha combinat amb la DGGE per identificar tots els filotips d'aquest gènere bacterià. La inclusivitat del sistema de PCR dissenyat ha incorporat alguns filotips propers a *Enterococcus faecalis*. L'anàlisi de diversitat no ha mostrat diferències entre els estreptococs de malalts de CCR i els de controls sans.

L'anàlisi de seqüències ha mostrat l'existència d'un filotip particularment proper a la família Clostridiaceae i diferenciat filogenèticament de la resta que han estat més freqüentment trobades en mostres de CCR (82%) que en controls sans (17%). D'altra banda, s'han comparat aquests resultats amb els obtinguts mitjançant la identificació per cultius clàssics. L'aproximació molecular permet reconèixer fins a un 95% dels estreptococs, mentre que la metodologia clàssica basada en el cultiu permet identificar el 66%.

Finalment, es presenta un cas clínic d'un pacient amb CCR que presentava una infecció causada per *Enterococcus faecalis*. Aquest bacteri ha estat relacionat amb el CCR, malgrat que els resultats obtinguts al capítol 1 no mostrin diferències significatives amb els controls en relació a aquesta espècie. L'estudi de les causes d'aquesta infecció i el rol potencial que pot presentar *E. faecalis* en el càncer colorectal es discuteixen en aquest apartat.

Els resultats d'aquest treball evidencien l'existència d'una disbiosi bacteriana en malalts de càncer colorectal, coincident amb altres investigacions prèvies. D'aquesta manera s'ha determinat la importància de *E. coli*, *E. faecalis* i *F. prausnitzii* en el CCR, tota vegada que es presenten nous filotips associats a aquesta malaltia. A partir d'aquí, treballs futurs han d'anar orientats a conèixer aspectes més específics de la microbiota intestinal que tinguin a veure amb la seva relació l'hoste així com explorar possibles mecanismes induïts per bacteris que ajudin a comprendre alguns aspectes de la carcinogènesi colorectal.

Summary

Colorectal cancer is the main type of cancer in Spain, affecting men and women alike at the average age of 70. Up to 65000 new cases are detected every year. However, survivor is higher in the firsts stages of the disease (90%) decreasing in the later stages (70%). The symptomatology can be diverse, even asymptomatic, and the best protection is early detection. Although the genetic basis are well-defined, up to 90% of the cases are sporadic in nature and its aetiology is still unclear. It is supposed to be a multi-factorial disease, where exogenous and endogenous factors play an important role in the tumor onset and development. These factors are: age, diet, other intestinal diseases, alcohol consumption, tobacco, life's style and more recently, the intestinal microbiota

The main goal of this study was to describe and quantify the bacterial community of the intestinal mucosa associated to colorectal cancer patients. Molecular approaches as PCR-DGGE fingerprinting and qPCR were used to identify potential etiologic agents.

First, abundance of specific bacteria in intestinal mucosal samples was determined. Escherichia coli and a higher numbers of Eubacteria were associated to CRC patients whereas Faecalibacterium prausnitzii was linked to healthy controls. Enterococcus faecalis and Desulfovibrio sp. did not present different abundances among both groups. Variables as gender, tumor localization and diabetis did not correlate with bacterial abundance. However, tobacco consumption was associated to a decrease of E. coli, F. prausnitzii and Eubacteria numbers. Besides, despite microbial fingerprints from tumoral and mucosal biopsies were highly similar, abundance of E. faecalis was found to be higher on tumoral samples. After the comparative analysis performed with intestinal mucosal biopsies, up to six phylotypes were more frequently found in CRC subjects

(*Faecalibacterium prausnitzii*, *Parabacteroides merdae*, *Coriobacterium* sp., *Clostridium* sp., *a butyrate-producing bacterium and an uncultured bacterium*) and two to control subjects (*Roseburia faecalis* and *Clostridium nexile*). Cluster analysis based on a presence/absence band matrix resulted into five groups, of which one was associated to control subjects and two to CRC subjects. Diabetes was related to these CRC groups, and one of them were more frequent in exsmokers.

A secondary goal was to study the streptococcal population in CRC subjects, due to the amount of publications that connected endocarditis caused by *Streptococcus bovis* and CRC. To study the ecology of Streptococcal populations a genus-specific primer set was designed, developed and used in PCR-DGGE to identify all streptococcal phylotypes in a given sample. Inclusivity ofn this new primer set allowed the detection of members close to *Enterococcus faecalis*. Diversity analysis did not show differences between the streptococcal populations of CRC and control subjects. Sequence analysis showed the existence of a particular phylogroup closed to *Clostridiaceae* family and phylogenetically separated from the rest. This phylogroup was more frequently found in CRC subjects (82%) than in control subjects (17%). Moreover, these results were compared with those obtained by classic culturing technique. Molecular approach identified up to 95% of streptococcal phylotypes, while identification by classical plate culture was about 66%.

Finally, a case report is presented. A CRC patient who had an infection caused by *Enterococcus faecalis*. This bacterium has been related with CRC, although results obtained in chapter 1 does not agree with this point. The causes of this infection, together with the potential role of this bacterium in colorectal cancer development were discussed in this section.

This work has revealed the existence of a bacterial dysbiosis in colorectal cancer patients, which is in agreement with previous research. The importance of E. coli, E. faecalis and F. prausnitzii in CRC has been established and new phylotypes associated with this disease are presented. Future research should focus on specific aspects of intestinal microbiota such as its interaction with the host, together with the mechanisms by which bacteria can affect on the onset of tumor in the colon.

INTRODUCCIÓ

1. Anatomia i fisiologia del Còlon i el Recte

Dins el sistema digestiu, el còlon i el recte es troben en l'últim tram de l'intestí gruixut (Figura 1). Les funcions principals del còlon i el recte són la absorció d'aigua i de nutrients, així com l'emmagatzematge de femtes. L'intestí gruixut té una longitud aproximada de 1.5m i està format pel cec, l'apèndix, el còlon, el recte i el conducte anal. El còlon es subdivideix en quatre parts: còlon ascendent, còlon transvers, còlon descendent i el sigmoide. Seguidament es troba el recte.

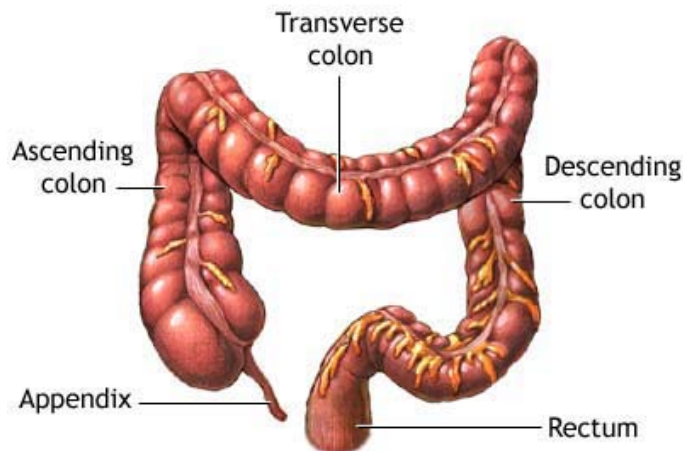


Figura 1. Parts de l'intestí gruixut

Malgrat les diferents parts que formen l'intestí gruixut, en termes anatòmics, embrionaris i fisiològics s'han proposat tres segments per tal d'entendre els mecanismes de càncer colorectal (CCR) (Taula 1). Aquests tres subgrups són: Colon proximal, el Colon distal i el Recte. Les diferències entre aquests tres grups han estat definides segons les característiques observades

Taula 1. Diferències entre els tres subgrups de càncer colorectal [1].

Característiques	Còlon proximal	Còlon distal	Recte
Fisiologia			
Origen embrionari	Intestí mig	Intestí gruixut	Intestí gruixut
Subministració artèries	Branques de l'artèria mesentèrica superior	Afluents de l'artèria mesentèrica inferior	Afluents de l'artèria mesentèrica inferior
Innervació	Nervi vague	S2, S3, S4	S2, S3, S4
Histologia	Densitat de les vesícules mucoses apicals	Major proporció de les cèl·lules gobet	Ric en cèl·lules endocrines
Principal funció física	Absorció d'aigua i nutrients	Absorció d'aigua i nutrients	Emmagatzematge fecal
Altres característiques físiques	Fermentació d'etanol i àcids grassos de cadena curta (SCFAs)	Fermentació protèica, predominància neutral dels mucopolisacàrids	Predominància de la mucina àcida
Carginogènesis			
Mecanismes moleculars	MSI	CIN	MSS; CIN; major contribució de TP53, via APC/ β -catenin; sobreexpressió de COX2; disminució mutació en K-ras
Predominància hereditària a la malaltia	HNPCC	FAP	-
Factors de risc			
Fibra provinent de la dieta	Major efecte protector	Efecte protector	Poc o nul efecte protector
Consum de carn	Carn rostida	Carn processada	Carn vermella
Calci i vitamina D	Poc efecte protector	Major efecte protector	Major efecte protector
Activitat física	Efecte protector	Efecte protector	Sense efecte protector

CIN: chromosomal instability; MSI: microsatellite instability; MSS: microsatellite stability; HNPCC: hereditary nonpolyposis colorectal cancer; FAP: familial adenomatous polyposis; TP53: tumor protein P53; APC: adenomatous polyposis coli; COX2: cyclooxygenase-2

És un òrgan buit cobert, de dins cap a fora, per una membrana mucosa, que conté l'epiteli, la làmina pròpia i una capa muscular de la mucosa, una submucosa, dues capes musculars (una circular i una altra longitudinal) i una capa serosa (Figura 2).

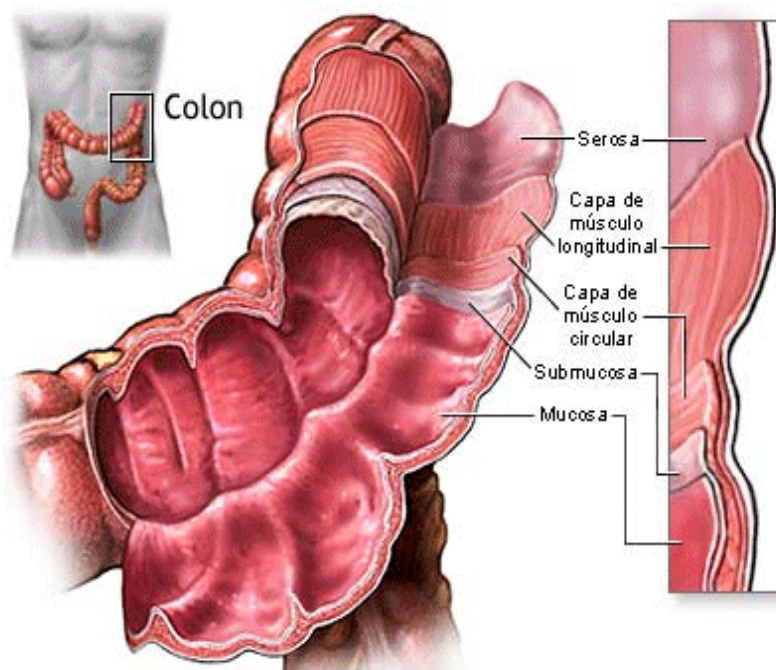


Figura 2. Esquema d'una secció transversal del còlon amb l'estructura de les diferents capes que el conformen.

Les condicions fisiològiques del còlon varien al llarg d'aquest. Quant al pH, trobem que a l'ili és de 5,7. Aquest valor tan baix s'atribueix a la ràpida fermentació dels àcids grassos de cadena curta (SCFAs, de l'anglès *Short-Chain Fatty Acids*), el qual es manté més o menys estable al llarg del còlon ascendent (pH=5,6) i del còlon transvers (pH=5,7). Al còlon descendent i el sigmoid així com al recte el pH augmenta fins a 6,6 i entre 6,6 i 6,8 respectivament degut a l'absorció dels SCFAs i la secreció de bicarbonat per la mucosa. El potencial redox del còlon varia des de -

200mV fins els -300mV i la pressió d'oxigen en el lumen es situa entre 299 i 39 mmHg, és a dir, la quantitat d'oxigen present en el lumen representa del 18-25%.

1.1 Fisiologia de les cèl·lules epitelials intestinals

Els càncers colorectals es desenvolupen en les cèl·lules epitelials [2]. Per entendre com s'inicia aquest procés és important conèixer el funcionament de les cèl·lules epitelials del tracte intestinals (TGI, tracte gastrointestinal) i les cèl·lules encarregades de la regeneració cel·lular (SCs, *stem cells*) [3]. El còlon i recte són òrgans que canvien el seu epiteli aproximadament cada cinc dies [4]. Histològicament, l'epiteli s'estructura uniformement en les criptes de Lieberkuhn (Figura 3), que contenen entre 2000 i 3000 cèl·lules i que són la unitat funcional. A més s'estima que hi ha fins a 14000 criptes/cm², per tant parlem de 1011 cèl·lules [5]. Existeixen tres tipus de cèl·lules diferents que formen la cripta: i) colonòcits o cèl·lules columnars, ii) cèl·lules secretores de mucina i, iii) cèl·lules endocrines. La renovació d'aquestes cèl·lules és cada 2-7 dies i les SCs són les encarregades de regular aquest complex procés. A cada cripta hi ha fins a 20 SCs responsables de la renovació de les cèl·lules de la cripta. Es poden diferenciar tres tipus de SCs segons la seva habilitat per diferenciar-se [6], que depèn de l'estadi de desenvolupament: i) cèl·lules totipotents, ii) cèl·lules pluripotents i, iii) cèl·lules multipotents. Una altra funció de les SCs és ajudar a mantenir l'homeòstasi, i també participar en la reparació del teixit quan es produeix una lesió [7]. Les SCs es localitzen a la part més basal de la cripta [4] i quan es reproduïxen, una cèl·lula filla manté les característiques de SCs i l'altra es diferencia en els diferents tipus i va pujant fins a arribar a la part superior de la cripta a la llum del còlon/recte. Existeixen evidències, doncs, que suporten que les SCs són l'origen dels tumors intestinals [3]. Com ja s'ha comentat anteriorment, els tumors

necessiten anys per desenvolupar-se i els colonòcits tenen una vida mitja molt curta per poder-ne ser l'origen. En canvi, les SCs tenen una vida molt llarga i poden acumular mutacions associades a un tumor al llarg dels anys. Les SCs multipotents serien les que originarien el tumor, donat que són capaces de diferenciar-se en altres tipus cel·lulars incloent-ne les cèl·lules tumorals [8]. Estudis recents corroboren aquesta hipòtesi [2, 9-12].

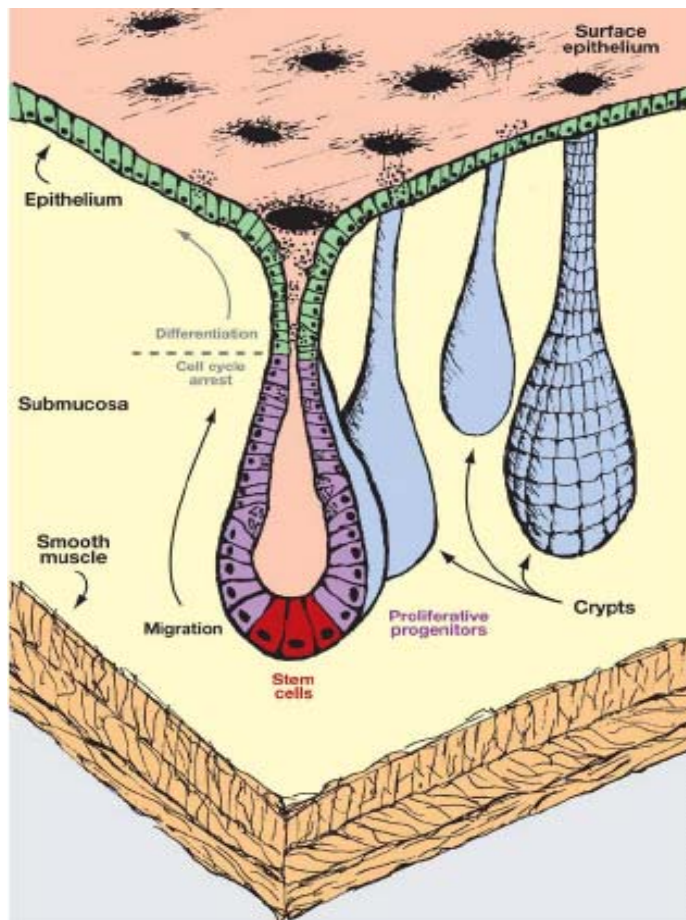


Figura 3. Estructura de les criptes de Lieberkuhn. Les SCs es situen a la part baixa de la cripta mentre que a la part mitja es troben les cèl·lules progenitores i a la part superficial les cèl·lules diferenciades [13].

2. El càncer colorectal

2.1 Concepte

El càncer es pot definir com el creixement no controlat i disseminació de les cèl·lules alterades de l'organisme causant invasió i danys en els teixits i òrgans. Aquest descontrol és degut a mutacions de gens que controlen la proliferació i localització cel·lular que originen les cèl·lules canceroses o tumorals. El càncer colorectal és un tipus de càncer que, com el seu nom indica, es desenvolupa en el còlon o el recte. Consisteix en un creixement incontrolat de les cèl·lules del còlon i/o recte i es poden originar en cada una de les tres capes que els formen: mucosa, muscular i serosa. Progressa mitjançant canvis clínics i histopatològics des d'estadis d'una lesió a la cripta fins a petits tumors benignes (pòlips adenomatosos) o fins a càncers malignes (carcinomes) [14].

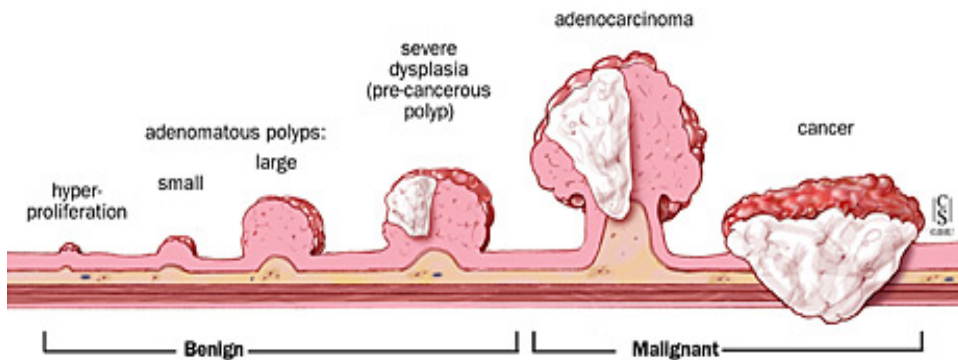


Figura 4. Progressió dels diferents estadis de desenvolupament d'un tumor (Johns Hopkins Colon Cancer Center).

Els CCR es desenvolupen generalment al llarg d'un període de temps que pot durar varis anys. Primerament sorgeix del teixit glandular del còlon o recte el pòlip no cancerigen, el qual evolucionarà fins a adenoma cancerigen (Figura 4). L'adenocarcinoma és el tipus més freqüent

significant fins a un 90% dels CCR. En canvi, els limfomes, sarcomes i melanomes són més infreqüents.

2.2 Tipus de CCR

El CCR es divideix tradicionalment en esporàdic i familiar (hereditari). Els CCR familiars es poden dividir en diferents síndromes: HNPCC (*Hereditary non-polyposis colorectal cancer*), FAP (*Familial adenomatous polyposis*), HPS (*Hamartomatous polyposis syndromes*), HMPS (*Hereditary mixed polyposis syndrome*), MAP (*MUTYH-associated adenomatous polyposis*) i *Hyperplastic/serrated polyposis syndrome*.

2.2.1 CCR esporàdic

És el tipus més abundant de CCR, donat que aproximadament el 80-90% dels casos són d'origen espontani. La majoria dels tumors es troben al costat esquerre del còlon distal fins l'angle esplènic (incloent el recte i el sigmoid) [15]. Està establert que existeixen dues vies principals pel desenvolupament del CCR esporàdic:

i) Via supressora o canònica

S'anomena supressora perquè implica inestabilitat cromosòmica (CIN) o canònica ja que segueix la seqüència adenoma-carcinoma [16](Figura 5). Està implicada en el 80-85% dels CCR esporàdics. Es basa en el model de Fearon i Vogelstein [17], els quals van proposar un model de carcinogènesis que correlacionava canvis específics genètics amb els canvis morfològics del teixit des d'adenoma fins a carcinoma. Aquests canvis genètics són un conjunt de mutacions somàtiques que provoquen la inactivació dels gens supressors de tumors APC, DCC, DPC4 O p53, juntament amb

l'activació d'oncogens com els de la família ras (la més descrita en la literatura) [14]. Els tumors amb CIN estan caracteritzats per l'elevada freqüència de descompensació al·lèlica (especialment els braços dels cromosomes 5q, 8p, 17p i 18q), amplificacions cromosòmiques i translocacions.

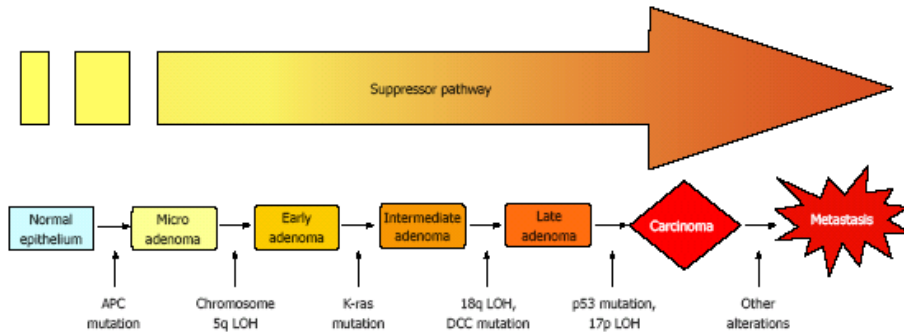


Figura 5. Alteracions moleculars de la via supressora o canònica [16].

ii) Via MSI (*microsatellite instability*)

És la via “mutadora” i està present en el 15-20% dels CCR esporàdics. Els tumors MSI estan caracteritzats per una elevada acumulació de mutacions en les seqüències dels microsatèl·lits (seqüències curtes de DNA repetides en tàndem al llarg del genoma). Es poden diferenciar els MSI-H (*High microsatellite instability*) i els MSI-L (*Low microsatellite instability*). Els MSI-H agrupa els gens de reparació del DNA (MMR, *mismatch repair genes*) que queden inactivats per l'elevada acumulació de mutacions en aquests i presenten inestabilitat en dos o més marcadors. Els MSI-L presenten inestabilitat només en un marcador.

2.2.2 CCR familiar

Les síndromes del CCR estan definides clínica, histològica, patològica i genèticament. Per tant, tenir predisposició per al desenvolupament d'un tumor a causa de la mutació d'un sol al·lel és heretable. Generalment hi ha menys predisposició de patir un CCR familiar que esporàdic arribant fins el 20% dels casos de CCR. Respecte el CCR esporàdic, els familiars acostumen a desenvolupar-se en edats més joves (<50 anys). Només en aproximadament el 10% dels casos es coneix la genètica de la malaltia, però existeix una altra part important de CCR familiars (fins el 20%) en què la predisposició genètica és encara desconeguda [18].

Els dos principals tipus de CCR familiar són:

- i) HNPCC, *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer* o Síndrome de Lynch.

La principal característica d'aquest tipus de càncer és que es desenvolupa sense la presència de pòlips. Afecta entre el 1-6% dels casos de CCR al món, s'inicia a edats més joves i generalment es localitza al còlon proximal essent més agressiu i produint un elevat risc de tumors extra-colònics. L'herència és autosòmica dominant. Es dona per mutacions durant la reparació del DNA dels gens MMR com MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS1 i PMS2. La deficiència d'aquests gens provoca inestabilitat genètica, i per tant, i els MSI es veuen afectats, generalment els MSI-H.

- ii) FAP, *Familial adenomatous polyposis*

És una síndrome autosòmica dominant que constitueix fins l'1% dels casos de CCR. Generalment sorgeixen centenars de

pòlips a la paret del còlon/recte durant la segona o tercera dècada de la vida del pacient. Aquests pòlips no són malignes, però amb el temps algun d'ells esdevé carcinoma. Malgrat la poca prevalença d'aquest tipus de tumors i donada la facilitat d'obtenir pòlips, s'utilitza com a model d'estudi de la carcinogènesis. L'origen és degut a la mutació dels gens supressors de tumors APC. La mutació de l'APC genera una proteïna truncada i condueix a la formació constitutiva de complexos β -catenina/TCF nuclear i activa. S'altera la via de WNT, ja sigui del gen APC, GSK3B, i d'altres, són suficients per formar lesions premalignes de l'intestí com les criptes aberrants o pòlips petits [19].

Altres síndromes familiars com *Hamartomatous polyposis syndromes*, HMPS (*Hereditay mixed polyposis syndrome*), la MAP (*MUTYH-associated adenomatous polyposis*) o la síndrome de poliposi hiperplàsica/serràtica es troben en menys de l'1% dels casos de CCR, són autosòmics dominants, excepte per MAP i contenen mutacions de diferents vies de transducció del senyal.

2.3 Estadis del tumor

Existeixen diferents classificacions per determinar l'estadi d'un tumor. El primer de tots el va crear Dukes el 1932 [20] i posteriorment en varen sortir diferents adaptacions. En funció del grau de desenvolupament de l'estadi d'un tumor i de l'espai que ocupa aquest dins les diferents capes que formen el còlon i/o recte, existeixen diferents classificacions segons l'espai que ocupa i la disseminació.

La classificació de Dukes es basa en l'extensió que ocupa el tumor primari a través de les diverses capes de la paret intestinal i l'afectació d'òrgans veïns. Els diferents estadis que contempla aquesta classificació són:

Dukes A- Localització del tumor a la mucosa i submucosa.

Dukes B- Invasió del tumor a la capa muscular fins a la serosa sense afectació dels ganglis limfàtics.

Dukes C-Invasió del tumor fins als ganglis limfàtics penetrant a través de la capa serosa. Es distingeixen dos tipus diferents: **C1**, afectació només nòduls perirectals; i **C2**, afectació dels nòduls a l'alçada de la lligadura del vas mesentèric.

Dukes D- Invasió a altres òrgans (metàstasi)

El sistema de classificació d'Astler-Coller va ser proposat l'any 1954 [21]. Utilitza el mateix tipus de nomenclatura que Dukes, cosa que va provocar certa confusió dins l'àmbit mèdic, i va incorporar dues categories més:

A- Localització del tumor a la mucosa.

B1- Invasió del tumor fins la capa muscular.

B2- Invasió el tumor fins la capa muscularis pròpia.

C1- Invasió del tumor fins la capa muscular amb metàstasi en els nòduls limfàtics.

C2- Invasió del tumor fins la capa muscularis pròpia amb metàstasi en els nòduls limfàtics.

D- Inclou els tumors que presenten metàstasi.

Posteriorment, el 1986 l'*American Joint Committee on Cancer* va establir un nou sistema de classificació [22] més complert i també per evitar les confusions entre els dos altres sistemes de classificació, a més de les modificacions que s'havien anat fent al llarg dels anys. Es va crear el sistema TNM, on T es refereix a l'espai que ocupa el tumor primari, N a l'absència o no de metàstasi en nòduls limfàtics i M a l'absència o no de metàstasi a distància. Aquestes tres categories es subdivideixen en els següents estadis:

Categories de la T

Tx- No es pot definir l'extensió que ocupa el tumor perquè la informació és incompleta.

Tis- Estadi inicial on el tumor no ha crescut més enllà de la capa mucosa.

T1- Extensió del tumor fins la capa submucosa.

T2- Extensió del tumor fins la muscularis pròpia.

T3- Extensió del tumor fins la capa serosa sense arribar a cap altre teixit.

T4- Extensió del tumor per tot el còlon o recte invaint teixits o òrgans contigus.

Categories de la N

Nx- No es pot definir l'afectació dels nòduls limfàtics per falta d'informació.

N0- Sense afectació als nòduls.

N1- Presència de cèl·lules tumorals a 1-3 nòduls.

N2- Presència de cèl·lules tumorals a 4 o més nòduls.

Categories de la M

Mx- Sense descripció de la metàstasi per falta d'informació

M0- No hi ha metàstasi.

M1- Presència de metàstasi a distància.

Aquestes categories es combinen i defineixen fins a vint-i-quatre estadis diferents d'un tumor (Taula 2):

Taula 2. Combinació de les diferents categories T, N i M per a definir l'estadi d'un tumor.

Estadi	T	N	M
Estadi 0	Tis	N0	M0
Estadi I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
Estadi II	T3	N0	M0
	T4	N0	M0
Estadi III	T1, T2	N1 o N2	M0
	T3, T3	N1 o N2	M0
Estadi IV	Qualsevol T	Qualsevol N	M1

Depenent del tipus d'estadi (Figura 6) en què es troba el tumor s'opta per un tipus de tractament o un altre. En el cas de diagnosticar un tumor en

estadis inicials el tractament generalment sol ser la cirurgia, en canvi, estadis més avançats requereixen tractaments complementaris com la quimioteràpia o la radioteràpia. Per això és important que el col·lectiu de metges utilitzi el mateix sistema per tal d'evitar errors en l'atenció d'un pacients amb CCR.

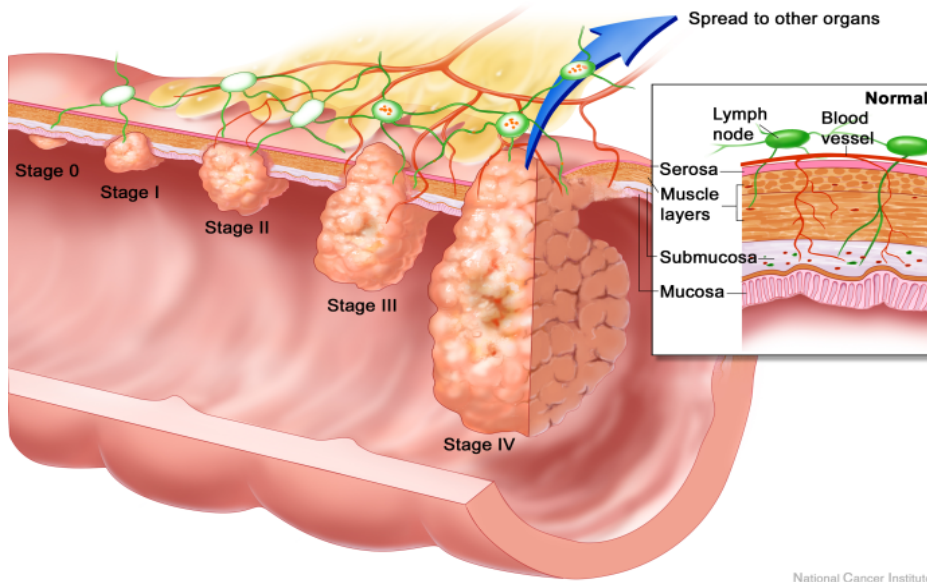


Figura 6. Progressió dels diferents estadis de l'extensió d'un tumor.

2.4 Etiologia

El càncer colorectal és una malaltia amb un origen desconegut. Fins el moment no s'ha trobat quin és el desencadenant per a què comenci el desenvolupament tumoral, malgrat que s'hagin descrit diversos factors de risc que poden afavorir l'aparició d'un tumor. A més, les malalties associades al còlon són diverses i poden estar relacionades amb el càncer colorectal. Aquestes malalties són: Pòlips, Carcinoma, Colitis ulcerosa, Malaltia de Crohn, Colitis Isquèmica, Malaltia celíaca, Diverticulosi, Apendicitis i Còlon irritable. Per tant, el CCR es podria considerar com a

una malaltia multifactorial on l'ambient pot modificar el comportament genètic de les cèl·lules normals de l'epiteli iniciant el desenvolupament tumoral.

2.5 Epidemiologia

2.5.1 Incidència

La incidència del càncer colorectal representa a nivell mundial un 9.4% dels càncers en homes i un 10.1% en les dones [23]. Malgrat l'elevat nombre de casos anuals, aquests no es reparteixen de manera uniforme en el món [24](Figura 7). El CCR es considera una malaltia dels països desenvolupats i s'estima una relació inversa entre el nombre de casos de CCR i el nivell de desenvolupament d'un país [25].

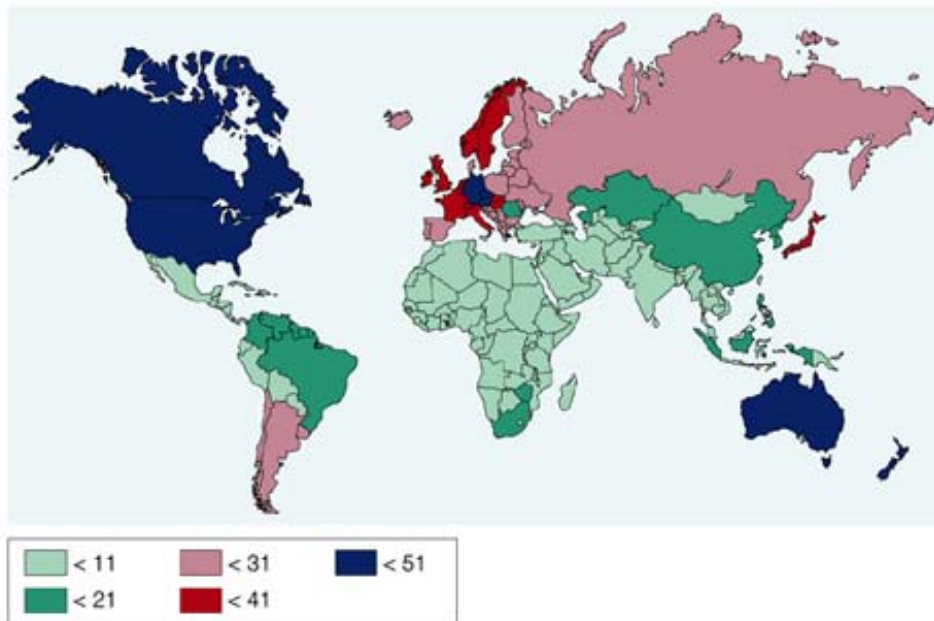


Figura 7. Incidència del CCR al món [26]. Països amb elevada incidència de CCR (casos per 100,000 habitants) estan indicats en blau; països amb una incidència moderada de casos s'indiquen amb rosa o vermell; i països amb una baixa incidència en verd.

A Espanya la incidència és aproximadament de 65.000 casos nous anuals, els quals un 57,4% són d'homes i un 42,5% de dones [27](Figura 8).

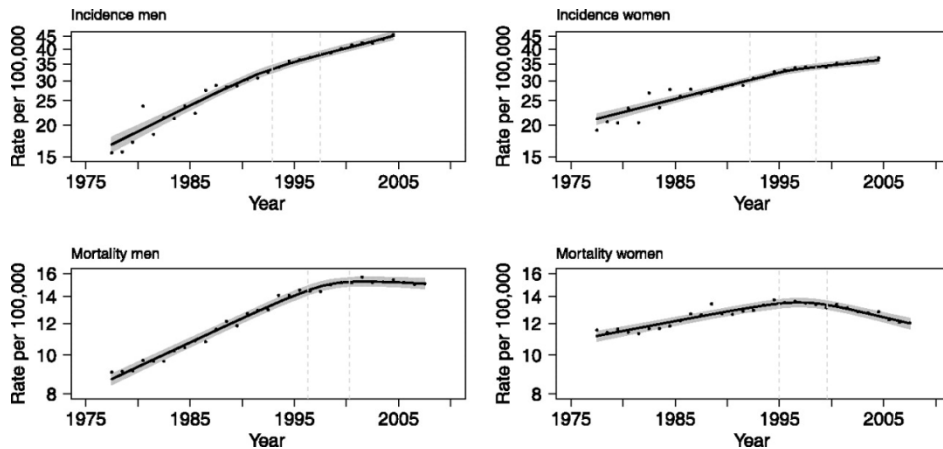


Figura 8. Evolució de la incidència i de la mortalitat de CCR en homes i dones des del 1975 fins el 2006 [27].

2.5.2 Mortalitat

La supervivència a un CCR depèn directament de l'estat en què es detecti el tumor. En general, quan es detecta un CCR en estadis inicials, la supervivència és més elevada que quan es detecta en estadis avançats de la malaltia. S'ha estimat que quan es detecta un CCR en estadis inicials sobreviuen fins el 90% dels pacients, un 70% en casos de tumors avançats però regionals i de fins a un 10% en tumors ja metastàtics [28].

La mortalitat és un bon indicador de l'impacte global dels tumors en la població en termes de gravetat i freqüència, malgrat que no reflecteixi adequadament la importància dels tumors amb una elevada supervivència. Des de l'any 2005 els tumors són la primera causa de mortalitat en homes i la segona en dones. Concretament les darreres dades publicades (*Mortalidad por cáncer y otras causas*, Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer. Centro Nacional de Epidemiología. ISCIII, 2008) augmenten

fins a 14.000 les defuncions per CCR. Concretament en homes és de 7.972 i en dones de 6.034. Tanmateix, en el període 1997-2006 la taxa ajustada de mortalitat (població europea per 100.000 habitants) va disminuir un 0,39% en homes i un 1,51% en dones. La taxa de supervivència s'estima en 53,6% en 5 anys i en el 70,7% en 5 anys en pacients que han sobreviscut el primer any de la malaltia [29].

2.5.3 Factors de risc

El CCR, a part de ser una malaltia genètica, és també una malaltia modulada per factors ambientals, incloent-hi l'estil de vida, la cultura i la societat. Existeixen un gran nombre de factors de risc que poden incidir en el CCR. Alguns d'aquests factors com l'edat o la predisposició genètica són factors no modificables, és a dir, l'individu no els pot controlar, mentre que d'altres com els factors ambientals són factors controlables, i per tant, modificables.

2.5.3.1 Factors no modificables

a) Edat.

Dades epidemiològiques i experimentals demostren que el CCR és una malaltia associada a edats adultes. Generalment apareix en edats posteriors als 50 anys, i quan es donen casos en menors de 50 anys, es solen associar a CCRs familiars [30]. L'edat mitja dels pacients amb CCR és de 71 anys [27], per tant, es pot considerar com a una malaltia associada a la vellesa.

a) Herència genètica.

Fins a un 20% dels casos de CCR estan associats a la genètica del pacient (Figura 10). Els més comuns són la FAP i HNPCC descrits anteriorment.

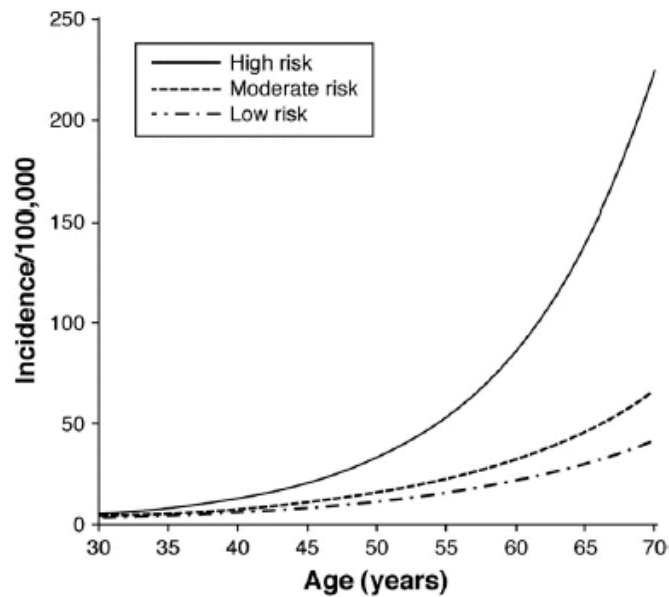


Figura 9. Incidència respecte l'edat e patir un CCR per cada 100000 habitants d'acord amb els factors modificables de risc [31].

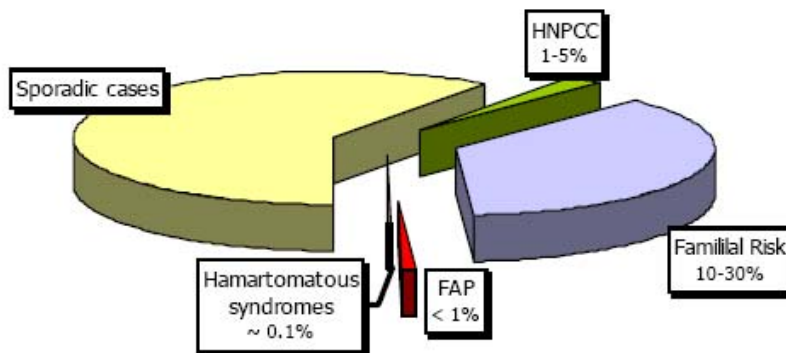


Figura 10. Factors familiars i genètics en CCR [32].

c) Malalties Inflamatòries intestinals (MII).

La connexió entre la inflamació i la tumorigènesis ha estat ben establerta en la darrera dècada [12, 33-35]. Entre l'1 i el 2% dels casos de CCR estan associats a MII. Els mecanismes moleculars pels quals la inflamació

promou el desenvolupament d'un tumor encara no són del tot coneguts, però estudis recents inclouen les cèl·lules immunitàries, les citoquines i altres mediadors del sistema immunitari en diferents etapes del desenvolupament tumoral. El càncer associat a colitis (CAC) és el subtipus de CCR associat a les MII. Més d'un 20% de malalts amb MII desenvolupen un CAC 30 anys després de l'inici de la malaltia, i fins un 50% no sobreviuen al CAC [36]. Els tumors sorgeixen de lesions epitelials amb displàsia. A diferència del CCR esporàdic, la disfunció de l'APC és infreqüent, en canvi la pèrdua o mutació de p53 s'observa en estadis inicials de CAC. Seguidament intervenen les mutacions o alteracions de MSI, MMR així com la via k-ras. Complementàriament, augment local de citoquines i prostaglandines inhibeixen l'apoptosis afavorint la proliferació cel·lular i conseqüentment la carcinogènesis [35]. A més, s'ha descrit alguns mediadors que poden tenir un paper important en la supressió de gens, com el factor MIF (*macrophage migration inhibitory factor*, factor d'inhibició migratòria de macròfags) i el factor TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*, factor de necrosi tumoral alfa).

2.5.3.2 Factors modificables-ambientals

S'ha estudiat alguns factors ambientals que poden influir en el CCR. El control sobre aquests factors poden prevenir l'aparició d'un tumor. Depenent del factor, el risc pot ser més o menys elevat i la intervenció sobre el procés tumoral pot variar.

a) La dieta.

Nutrició i salut són dos conceptes estretament relacionats. És ben sabut que la desnutrició resultant d'una manca de vitamines, elements essencials i nutrient suficient perjudiquen seriosament la salut, com també la sobrenutrició i la malnutrició caracteritzades per una elevada ingesta

d'aliments o un desequilibri nutricional (dieta dels països occidentals). La mala nutrició augmenta el risc de desenvolupar malalties degeneratives com l'arteriosclerosi, tumors, obesitat o diabetis. El menjar pot causar alteracions genètiques o modular processos en el desenvolupament d'un càncer intervenint en la iniciació, la promoció o la progressió d'aquest (Figura 11). En els darrers anys s'han identificat hàbits nutricionals, menjars, i metabòlits que podrien augmentar el risc de càncer.

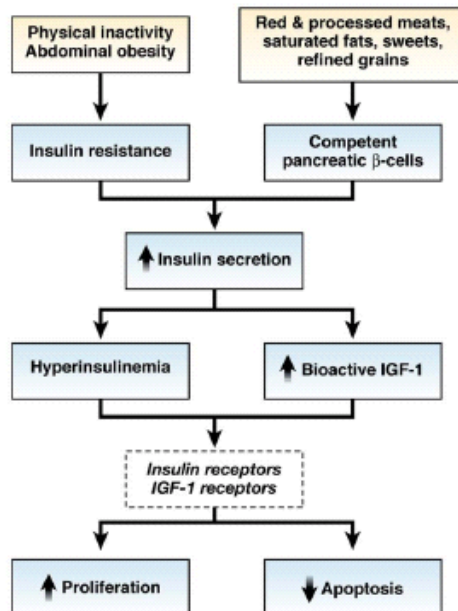


Figura 11. Proposta de mecanisme d'associació de la dieta, l'obesitat i l'activitat física amb la insulina, i la seva relació amb el càncer colorectal [44].

Fibra: El rol de la fibra, especialment provinent de fruites i vegetals, genera opinions oposades en la literatura. Es creu que la fibra actua com a diluent o absorbeix carcinògens fecals, modula el trànsit colònic, altera el metabolisme dels àcids biliars, redueix el pH o augmenta la producció d'àcids grassos de cadena curta (SCFAs, *short chain fatty acids*). Tanmateix, nombrosos estudis prospectius de cohorts conclouen que els

efectes de la fibra sobre el risc de patir un CCR no són significatius si es comparen amb el grup control. Tot i així, cal remarcar que alguns estudis donen suport a aquesta hipòtesi tot suggerint que la ingesta addicional de folat, a diferència dels països europeus que no en prenen addicionalment, afavoreix aquest resultat [37, 38].

Carn vermella: La carn vermella està catalogada com un risc pel CCR, així com les carns processades. Existeixen diferents hipòtesis del mecanisme que es produeix en la carn vermella per ser un risc. Els supòsits són diferents, es pensa que la carn vermella estimula la secreció d'insulina endògena, que és un mitogen, o que és una font de greixos saturats, hemoferro o amines heterocícliques carcinogèniques. Quant als greixos, estudis cas-control o estudis prospectius descarten una relació amb el CCR. Algunes evidències indiquen que l'associació entre la carn vermella i el CCR es deu als processos de cocció d'aquesta generant amines heterocícliques mutagèniques. La interacció entre carn vermella, mètodes de cocció i polimorfismes genètics que modulen el metabolisme de les amines heterocícliques suporten la relació d'aquests carcinògens amb el CCR.

Vitamina D i Calci: La vitamina D intervé en diferents mecanismes cel·lulars com la regulació de la proliferació cel·lular i diferenciació, la inducció a l'apoptosis, la inhibició de l'angiogènesi, i per tant, té un paper protector contra el CCR. El paper de la vitamina D el van descobrir Garland i Garland observant que la incidència de CCR en regions amb poca radiació solar era més elevada que en regions amb major radiació solar. La vitamina D controla el metabolisme del calci, per tant, l'efecte d'aquest depèn de l'estat de la vitamina D. El calci és un mineral necessari en la vida. Joga un paper clau com a mediador cel·lular, intervé en la contracció muscular, regula algunes quinases i pot realitzar funcions de

transferència de fosfat. Dades experimentals [38, 39] han demostrat que el calci té un efecte anticarcinogènic en el còlon i el recte. Malgrat que durant molts anys no es va considerar important en la reducció del risc a patir un CCR, des dels anys 1990 s'ha fet palès la importància del calci com a protector contra el CCR [40, 40-43].

b) Tabac

El tabac es va establir com a factor de risc cap el 1930 quan es va observar que el càncer de pulmó era més elevat en persones fumadores que en no fumadores [45]. Des de llavors s'ha evidenciat la relació amb diferents tipus de càncers, incloent-hi el colorectal. La relació entre el tabac i el CCR ha estat ben establerta i afecta més al recte que al còlon, més en el proximal que en el distal [46-48]. Curiosament, alguns estudis apunten a una major incidència de CCR en ex-fumadors que en fumadors actius [49]. S'estima que fins el 12% de les defuncions per CCR són degudes al tabac [50]. La combustió del tabac genera productes genotòxics com hidrocarburs aromàtics, amines heterocícliques, nitrosamines o amines aromàtiques que arriben a la mucosa intestinal pel sistema circulatori o per ingesta directa. Aquests carcinògens causen danys irreversibles a la mucosa colorectal, de manera que intervenen en la formació i creixement de pòlips adenomatosos, els quals són precursors del CCR [51]. Tanmateix, és necessari un període de temps suficientment llarg (30-35 anys) de consum de tabac perquè existeixi un major risc de desenvolupar CCR [52]. Algunes investigacions s'han centrat en les vies on intervenen els carcinògens productes del tabac que apunten cap a la mutació de p53 [53] i també a la inestabilitat dels microsatèl·lits (MSI) [54], però es necessiten estudis més profunds per corroborar aquestes suposicions.

c) Consum d'alcohol etílic

La relació entre l'alcohol etílic i el CCR ha estat controvertida, però moltes evidències indiquen que l'elevat consum d'alcohol etílic (>30gr/dia) és un factor de risc pel CCR. La majoria d'estudis de cohorts donen suport a aquest supòsit. Generalment afecta més a tumors amb localització al còlon distal però també en el recte i també afecta més en edats joves [48]. Es creu que l'alcohol etílic funciona com a solvent afavorint la penetració de substàncies carcinogèniques dins la capa mucosa com l'acetaldehid, que és un producte resultant de la catàlisi de l'alcohol. Altres efectes mediatos per l'alcohol són la producció de prostaglandines, la peroxidació de lípids i la generació de radicals lliures [55]. A més, l'alcohol contribueix a la metilació anormal del DNA antagonitzant el metabolisme dels grups metil, suprimir la supervivència immune del tumor, alentir la reparació del DNA, alterar la composició de les sals biliars o induir el citocrom p450 per activar carcinògens.

d) Activitat física i obesitat

Dels factors relacionats amb l'estil de vida, l'activitat física i l'obesitat estan directament relacionats. La manca d'exercici físic juntament amb el sobrepès s'associen a d'entre un 25-33% dels CCRs. Malgrat que l'obesitat i la manca d'exercici està més relacionada amb el càncer de còlon que de recte [50], l'exercici regular amb una dieta equilibrada disminueixen el risc de càncer. Els mecanismes biològics emprats en la reducció/augment del risc de patir un CCR no han estat descoberts; però es postula que llargs períodes de temps fent exercici augmenten l'eficiència metabòlica i la capacitat del cos, així com es redueix la pressió sanguínia i la resistència a la insulina [56] així com de la inflamació sistèmica. A més, l'exercici físic augmenta la motilitat intestinal [32]. Referent a l'obesitat,

diferents estudis utilitzen l'índex de massa corporal (BMI, *body mass index*) per a l'anàlisi de la influència d'aquest factor. Chan i col·laboradors [57] varen observar que individus amb un BMI<23 tenien menys risc de patir un CCR. Individus amb BMI>30 presentaven un 41% de risc i quan BMI estava entre 23 i 25 el percentatge de risc s'establia al voltant del 23%. Aquesta afectació es va observar més en el còlon que en el recte. Els mecanismes pels quals l'obesitat incrementa el risc de CCR no estan ben establerts, però es creu que la resistència a la insulina relacionada amb l'obesitat i la hiperinsulinèmia poden estar implicats en la patogènia de la malaltia. Els individus amb diabetis *mellitus* també mostren un major risc de patir CCR, no només pels problemes metabòlics descrits anteriorment, sinó també la hiperglicèmia associada a la diabetis augmenta el risc. Tot i així, diferents estudis contradiuen la hipòtesis de la implicació de la hiperglicèmia en el CCR.

2.6 Manifestacions clíniques

Generalment els CCR que es troben en estadis poc avançats no solen anar acompanyats de cap tipus de simptomatologia, però en estadis més avançats del tumor, i per tant, més perillosos perquè poden no ser curables, la simptomatologia pot ser diversa. Els símptomes més freqüents són:

- Detecció de sang en femtes
- Canvis d'hàbits intestinals (diarrees o restrenyiment)
- Dolor abdominal o/i rectal
- Icterícia
- Anèmia
- Pèrdua de pes sense motiu aparent
- Síntomes donats per la metàstasi

D'altra banda, segons si el tumor es troba en el còlon distal, el proximal o en el recte-sigma es poden detectar símptomes més específics i que permetin una localització més ràpida del tumor previ a una colonoscòpia.

2.7 Cribatge

La detecció precoç del càncer colorectal és la millor manera de prevenir un mal pronòstic. Per aquest motiu, és necessària una bona estratègia de control per evitar nous casos. Habitualment, els exàmens de còlon es realitzen als pacients segons l'edat, l'historial familiar i l'historial mèdic per tal de trobar indicis d'un possible tumor. La intervenció quirúrgica de pacients que presenten pòlips és una altra opció per evitar la possible aparició d'un tumor ja que generalment els adenocarcinomes són el tipus de tumor més habitual. No obstant, no tots els pòlips esdevenen adenocarcinomes i no hi ha cap manera simptomàtica per saber si un pacient té o no un adenoma. El pas d'adenoma fins a carcinoma pot trigar fins a 10 anys, fet que dóna un marge per poder realitzar proves diagnòstiques endoscòpiques (sigmoidoscòpia i colonoscòpia).

Els mètodes més emprats per a la detecció de la presència d'un tumor són:

Test de sang oculta en femtes (FOBT, en anglès *Fecal occult blood test*): Es realitza una reacció química per detectar restes de sang en les femtes. El resultat positiu d'aquest test ha d'anar acompanyat d'una colonoscòpia per tal de descartar altres motius pels quals hi pot haver pèrdua de sang com la diverticulitis, les hemorroides o les malalties inflamatòries intestinals (MII). Però cal tenir en compte també que molts adenomes no sagnen, i per tant no són detectables per aquest mètode.

Colonoscòpia: Es realitza una endoscòpia de tot l'intestí gruixut, fet que comporta l'administració de medicació al pacient i un risc per aquest per

perforació del budell i en conseqüència una cirurgia major. Permet l'escissió d'adenomes petits i grans.

Sigmoidoscòpia: Es realitza una endoscòpia al tram final del còlon i permet la recol·lecció de biòpsies de pòlips. Els pacients amb una sigmoidoscòpia positiva sovint són enviats a fer una colonoscòpia per descartar possibilitats.

Els darrers dos mètodes poden resultar invasius pels pacients, i per tant el seu ús és qüestionat. Tot i així, existeixen diferents plans d'actuació per a la prevenció del CCR com el pla que presenta la *American Cancer Society* [58].

Enema de doble contrast: És un procediment mitjançant el qual s'obté una radiografia del còlon i recte (Figura 12) després d'haver introduït en aquests una solució líquida que conté bari. El contrast que ofereix el bari permet l'observació d'anomalies .

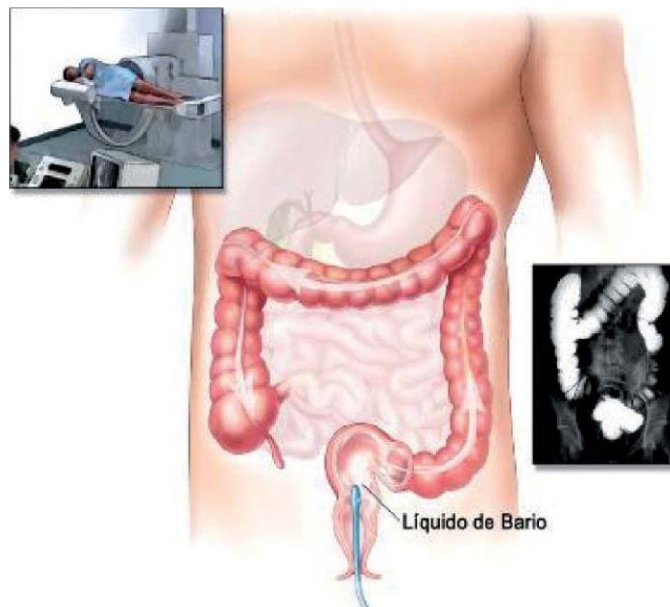


Figura 12. Esquema descriptiu d'un enema de doble contrast.

2.8 Teràpies actuals

Actualment existeixen diverses teràpies per combatre el CCR, des de teràpies estàndard fins a tractaments que estan en procés d'assaig clínic per introduir-se en el ventall d'opcions pel seu tractament. Les teràpies estàndard amb les quals es treballa més habitualment són:

- i. Cirurgia: Consisteix en l'extirpació del tumor mitjançant una operació que es pot realitzar a nivell local (escissió) o a nivell més general donada la magnitud del tumor (resecció), la qual pot estar acompanyada per una colostomia. Aquest procediment es pot realitzar a qualsevol estadi del tumor. Altres tipus de cirurgia inclouen l'ablació per radiofreqüència i la crioteràpia.
- ii. Quimioteràpia: És un tractament que utilitza medicaments que interromp el creixement de cèl·lules canceroses, ja sigui mitjançant la destrucció d'aquestes o l'impediment de multiplicar-se.
- iii. Radioteràpia: És un tractament que utilitza raigs X d'elevada energia i altres tipus de radiació per destruir cèl·lules canceroses o impedir que creixin. Existeixen dos tipus de radioteràpia, l'externa (mitjançant l'ús d'una màquina de radiació) i l'interna (mitjançant la introducció d'una substància radioactiva sobre el tumor o al voltant) i que s'empren segons el tipus i l'estadi del tumor.

2.9 Genètica del càncer colorectal

El càncer és una malaltia on la implicació dels gens en el seu desenvolupament és essencial. Com ja s'ha vist en apartats anteriors (veure 2.2) existeixen diferents gens implicats, però que no es necessita la seva implicació alhora. La fàcil disponibilitat de mostres tumorals, així com l'observació de les diferents etapes de desenvolupament del tumor,

han permès conèixer de manera exhaustiva els mecanismes moleculars de la patologia d'aquest tipus de càncer. La contribució genètica en el càncer colorectal així com la contribució de l'efecte de l'ambient condicionen si el càncer sorgeix de manera esporàdica o familiar en una relació inversa d'ambdós factors (Figura 13). Les mutacions en gens amb elevada penetració tenen un component hereditari important i amb poca influència de l'ambient, mentre que gens amb una baixa penetració que muten contribueixen a la susceptibilitat de desenvolupar un tumor quan aquests interaccionen fortament amb l'ambient.

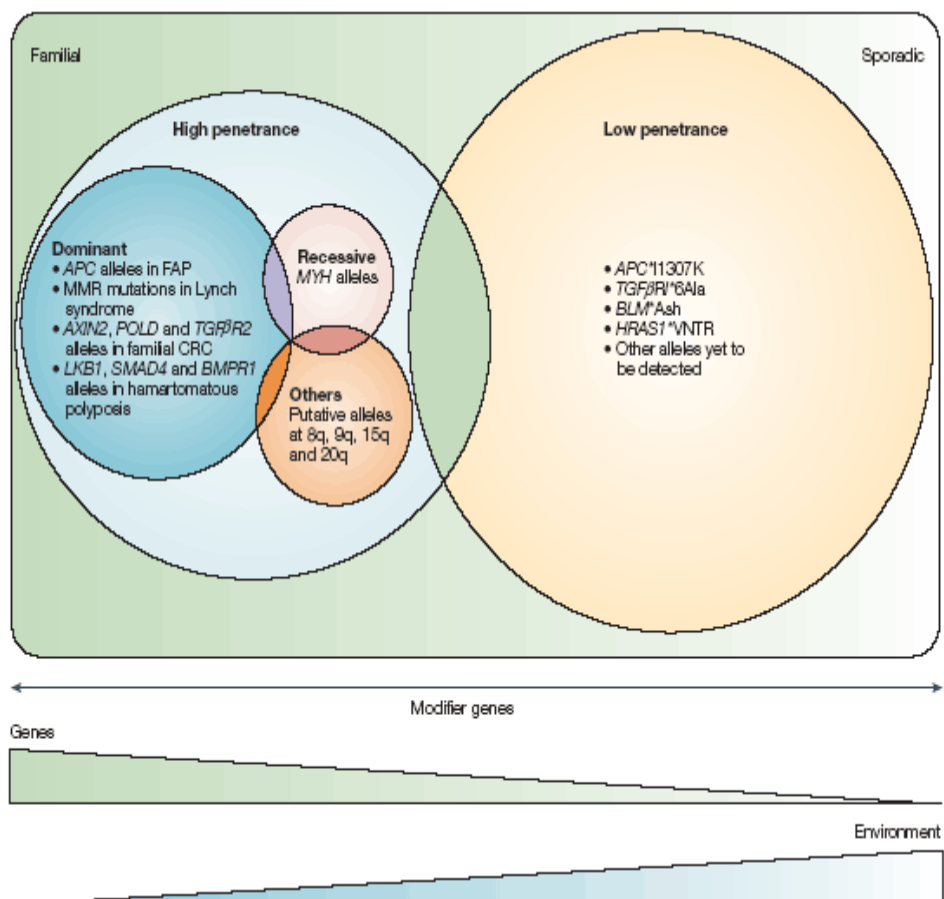


Figura 13. Contribució genètica al CCR. FAP, familiar adenomatous polyposis; MMR, mismatch repair genes; APC, adenomatous polyposis coli; BLM, Bloom syndrome; TGFβR2, transforming growth factor-β receptor 2.

Els CCR familiars han estat estudiats exhaustivament, malgrat que en el cas de la Poliposi hiperplàsica els gens implicats no es coneixen, les altres síndromes tenen descrites els principals gens que actuen en el procés inicial del desenvolupament del tumor (Taula 3).

Quant al CCR esporàdic, els gens implicats en el procés de formació del tumor depenen de la via que s'activi per iniciar el procés de la carcinogènesis. Les mutacions somàtiques que causen el CCR esporàdic es produeixen en diferents oncogens, gens supressors de tumors o els MMR (Figura 13).

Taula 3. Síndromes familiars de càncer colorectal i gens implicats en estadis inicials

Gens	Malaltia	Característiques	Herència	Estat dels MS
hMLH1, MSH2, MSH3, MSH6, PSM1, PSM2	HNPCC	Adenoma/carcinoma	Autosòmic dominant	MSI-H/L
APC	FAP	Adenomes colorectals	Autosòmic dominant	MSS
APC	FAP atenuat (AFAP)	Adenomes colònics	Autosòmic dominant	MSS
MUYTH, STK11	MUYTH-associated polyposis (MAP)	Fenotip similiar a AFAP	Autosòmic recessiu	MSS
SMAD4, BMPR1A, PTEN	Síndrome poliposis juvenil	Pòlips hamartomatosos, defectes congènits	Autosòmic dominant	MSS
?	Poliposis hiperplàstica	Pòlips hiperplàstics, pòlips sèssils serrats, adenomes mixtes	?	MSS/MSI-L

El desconeixement dels gen o gen implicats està marcat com a ?.

L'acumulació de mutacions severes en aquests gens augmenten el risc de formació de tumors des d'adenoma fins a un carcinoma metastàtic.

Pels casos de CRC que s'activi la via supressora o canònica els gens implicats es troben descrits a la taula 4.

En el cas que la via que quedi activada sigui la *MSI*, generalment es produeix un silenciament per metilació dels gens reparadors del DNA, els MMR, que pot ser elevada, *MSI-H*, o lleugera, *MSI-L*; la diferència entre ambdós tipus és que en el cas de *MSI-H* dos o més marcadors presenten inestabilitat i que és una via més abundant i amb millor prognòs. S'han descrit fins a set *MMR* gens que poden mutar: *hMLH1*, *hMLH3*, *hMSH2*, *hMSH3*, *hMSH6*, *hPMS1* i *hPMS2*, on *hMLH1* i *hMSH2* són els més comuns. Però també existeixen altres gens que presenten *MSI* com els que es descriuen en la taula 5.

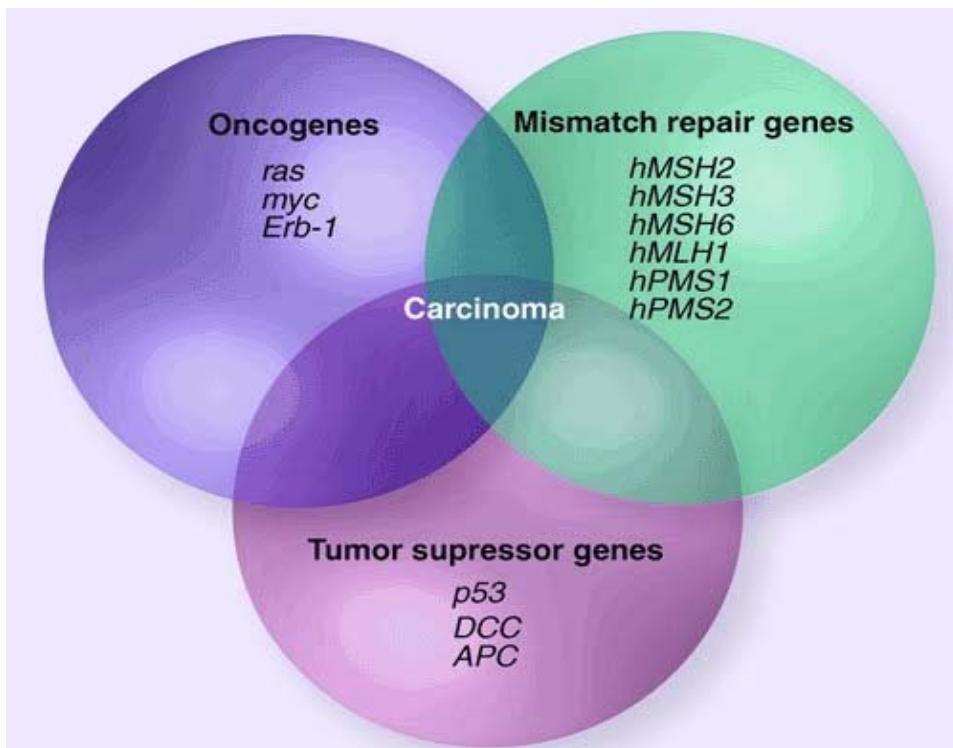


Figura 14. Tipus de gens implicats en el càncer colorectal esporàdic.

Taula 4. Gens mutats implicats en la via canònica o supressora en el CCR esporàdic.

Gen	Locus	Tipus gen	% mutació	Funció alterada	Via d'actuació
APC	5q21	Supressor de tumors	60-82	No es destrueix la β -cateïna, la qual es transloca al nucli i co-transcriu gens reguladors del cicle (cyclin-D, c-Myc) o gens de progressió del tumor (MMP-7, MMP-26)	Wnt
P53	17p13.1	Supressor de tumors	>50	Acumulació de mutacions en el DNA, proliferació cel·lular augmentant la lesió	Reparació DNA, inducció a l'apoptosi
DCC/SMAD4	18q21.1	Supressor de tumors	70	Inactiva l'apoptosi, activa diferenciació de l'epiteli	Proteïna transmembrana receptora de la superfamília de Ig, indueix l'apoptosi
k-ras	12p12.1	Oncogen	35-42	Inactiva la via MAPK i activa la via MEK, que promou el creixement hiperplàsic	MAPK

Taula 5. Gens amb MSI i la seva funció en el CCR esporàdic.

Gen	Funció
<i>ACTR11</i>	Receptor de factor del/de la creixement/diferenciació
<i>AIM2</i>	Indueix IFN
<i>AXIN-2</i>	Via Wnt
<i>BAX</i>	Factor proapoptòtic
<i>BLM</i>	Responsable del dany del DNA
<i>Capsasa-5</i>	Factor proapoptòtic
<i>CHEK1</i>	Responsable del dany del DNA
<i>FAS</i>	Factor proapoptòtic
<i>hG4-1</i>	Cicle cel·lular
<i>IGFIIR</i>	Receptor factor de creixement
<i>PTEN</i>	Cicle cel·lular
<i>RHAMM</i>	Motilitat cel·lular
<i>RIZ</i>	Proteïna del cicle cel·lular i apoptòtica
<i>SEC63</i>	Proteïna de membrana ER
<i>TCF-4</i>	Factor transcripció (via Wnt)
<i>TGFβR11</i>	Receptor factor de creixement
<i>WISP-3</i>	Factor creixement (via Wnt)

3. La microbiota del còlon i el recte

3.1 Composició de la microbiota

El còlon és l'òrgan amb major densitat microbiana de tot el cos humà [59] contenint fins a cent vegades més cèl·lules procariotes que cèl·lules eucariotes humanes totals. El complex, divers i dinàmic ecosistema microbià que alberga el còlon arriba a concentracions de 10^{12} - 10^{14} cèl·lules/g de contingut luminal [60].

La microbiota intestinal conté entre 300-500 espècies diferents. En les bases de dades (GenBank) es troben fins a 16000 filotips diferents aïllats de mostres intestinals, dels quals aproximadament 13000 van ser descrits l'any 2005[61, 62].

Diversos estudis van revelar que la microbiota era específica de cada hoste encara que compartint trets similars entre individus i que estava caracteritzada per la dominància de bacteris no cultivables i no caracteritzats [63-65]. Els procariotes es veuen representats per tres dominis en el TGI: Bacteria, Archaea i Eukarya. El domini *Bacteria* és el predominant i majoritari. En general, els bacteris representatius de la microbiota (>99%) pertanyen a cinc fila diferents [66]: Firmicutes (65%), Bacteroides (25%), Actinobacteria (5%), Proteobacteria (8%) i Fusobacteria (1%). Altres filums detectats són *Verrucomicrobia*, *Spirochaetes*, *Lentisphaerae* i *Cyanobacteria* [61]. Del filum Firmicutes, al voltant del 90% dels filotips pertanyen a la classe Clostridials, sobretot dels clústers IV, XIV i XVI. Tot i així, existeix un gran buit en el coneixement profund de la composició, abundància i la caracterització de la microbiota intestinal [67-69]. Els principals problemes amb què es troba la microbiologia del tracte intestinal en l'estudi de l'ecosistema que hi habita són:

1. La manca de mostres representatives. El tipus de mostra a analitzar (biòpsies vs. femtes) així com les complicacions per accedir al llarg del tracte intestinal dificulten l'obtenció de mostres.
2. La complexitat de la comunitat bacteriana en el tracte intestinal, la qual engloba la formació de nínxols específics de petites comunitats bacterianes que no queden ben representades o bé queden omeses.
3. La metodologia. Les tècniques de cultiu i moleculars emprades són limitades i no aprofundeixen en la composició específica de la microbiota.

La descripció de la comunitat microbiana a partir de mètodes microbiològics clàssics basats en cultius és ben diferent de l'obtinguda per tècniques moleculars [61, 64, 69], les quals ofereixen una imatge de la microbiota notablement més complexa, i de la qual s'estima que es pot cultivar al voltant del 20-40% [70, 71]. Aquests dos estudis es varen realitzar amb mostres fecals, més fàcils d'obtenir però menys representatives. Estudis posteriors amb mostres de mucosa intestinal varen evidenciar la diferència en la composició i abundància respecte les mostres fecals [72, 73]. La importància de les tècniques emprades en aquests estudis va portar Rajilic-Stojanovic i col·laboradors a resumir en un estudi de meta-anàlisi [69] la distribució dels filotips identificats mitjançant mètodes dependents de cultius i independents de cultiu en deu fil·la procariotes diferents i un filum eucariota. Només un 12% dels filotips es varen poder identificar mitjançant ambdós metodologies i corrobora la dominància de Firmicutes en el tracte intestinal.

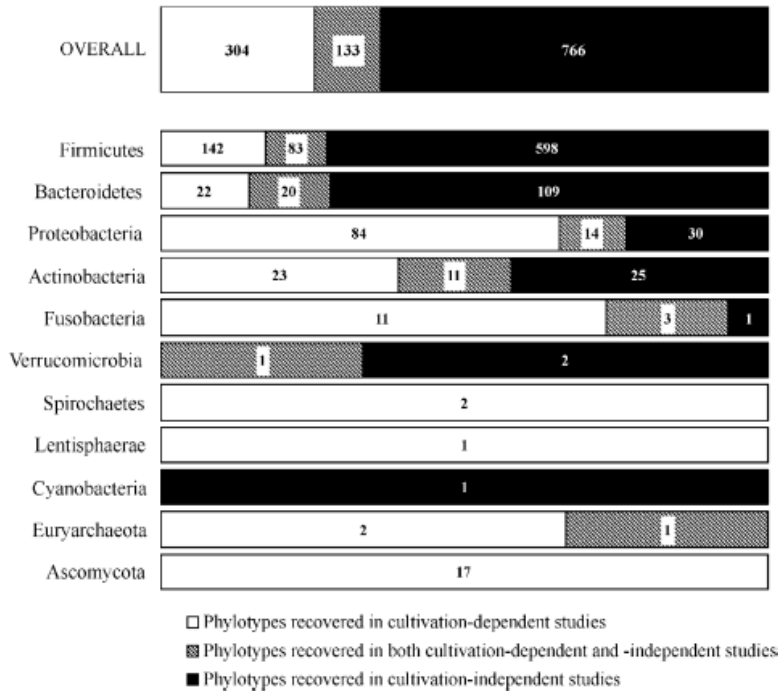


Figura 15. Distribució gastrointestinal dels filotips segons el tipus d'estudi (dependent o independent de cultiu) [69]

3.2 La colonització bacteriana en el TGI

El còlon fetal és estèril i en el moment del naixement es comença a colonitzar. Malgrat que existeixen algunes diferències segons si l'aliment és llet materna o llet sintètica, els primers bacteris que colonitzen pertanyen als gèneres *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* i *Ruminococcus*, mentre que els gèneres *Escherichia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Klebsiella* o *Proteus* són anaerobis facultatius subdominants. Aquests bacteris més pioners podrien modular l'expressió gènica en l'hoste per crear un ambient favorable per ells i prevenir el creixement d'altres bacteris introduïts posteriorment en l'ecosistema [74]. El pas d'una dieta basada en llet a dietes sòlides juntament amb la maduració del TGI produeix canvis en la microbiota intestinal inicial que passarà a una microbiota amb major diversitat bacteriana i que serà característica en

l'estat adult [75, 76]. Així doncs, l'estructura i composició de la microbiota reflecteix la selecció natural a ambdós nivells, microbià i de l'hoste, els quals promouen una cooperació mútua amb una estabilitat funcional d'aquest complex ecosistema. L'estudi realitzat per Eckburg i col·laboradors [61] sobre la composició de la microbiota intestinal adherida a la mucosa en les diferents localitzacions (cec, còlon ascendent, transvers i descendent, sigmoide i recte) en tres individus va concloure que, malgrat entre individus la flora intestinal era heterogènia, els resultats obtinguts dins d'un mateix individu la microbiota es manté notablement homogènia al llarg del còlon i el recte, com també va observar Green i col·laboradors el 2006 [77] i d'altres [70, 78]. El nombre de filotips identificats era més ampli del que s'havia descrit anteriorment, 395 filotips dels quals un 62% eren nous filotips i un 80% no encara no s'havien cultivat. L'arbre filogenètic de les seqüències obtingudes en aquest estudi queda representat en la figura 16. D'altra banda, i corroborat també per altres autors [73, 79], va descriure la microbiota adherida a la mucosa intestinal amb una composició diferent de la que s'obté amb femtes.

La composició microbiana pot variar en funció de diferents factors relacionats amb l'hoste [80], els quals influencien l'estructura i la composició bacteriana de la mucosa intestinal, que han estat àmpliament estudiats en diferents situacions i utilitzats tant en estudis epidemiològics com estudis metodològics moleculars; aquests factors es descriuen a la taula 6.

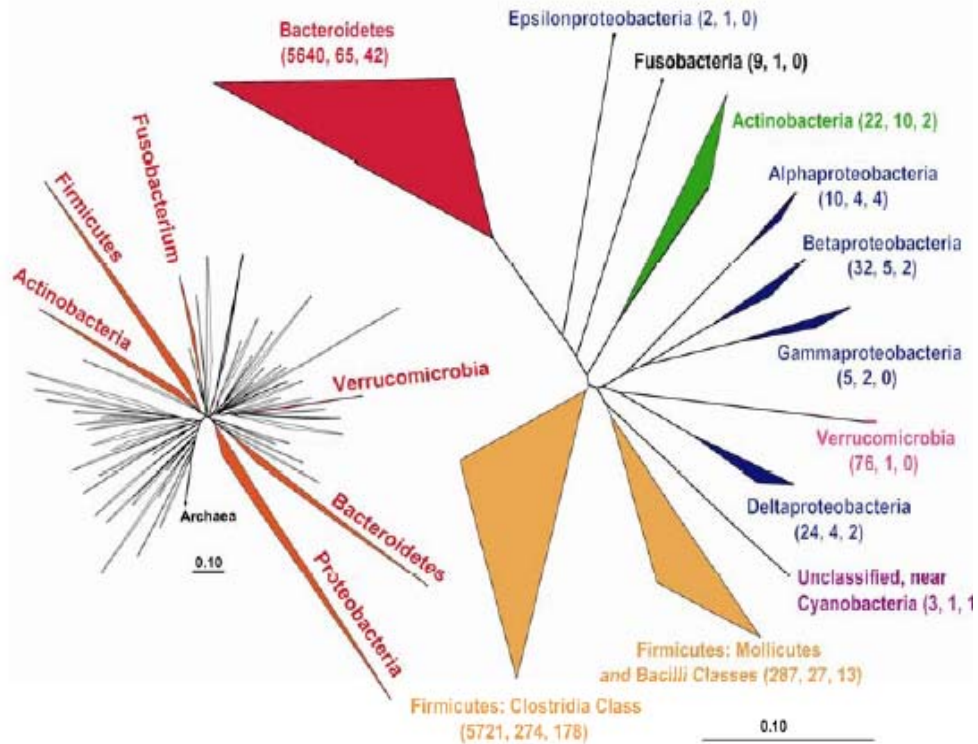


Figura 16. Arbre filogenètic del gen 16S rRNA de les seqüències obtingudes de les mostres intestinals. Entre parèntesi s'indica el nombre total de seqüències obtingudes, els filotips i els nous filotips [61].

Taula 6. Factors que modulen la composició microbiana en l'hoste.

Factor	Referència
Edat	[81, 82]
Localització geogràfica o ètnia	[80, 83]
pH	[84]
Potencial redox	[75, 85, 86]
Malalties autoimmunes	[87-92]
Malalties associades a la diarrea	[93, 94]
Ús d'antibiòtics	[59, 95]
Diabetis	[96]
Obesitat	[96-99]
Dieta	[100, 101]

Els mecanismes de defensa antimicrobiana que desenvolupa el TGI inclouen respostes immunitàries de l'hoste que es regulen segons l'estat en què es trobi l'hoste. Es veuen resumits a la taula 7.

Taula 7. Mecanismes de defensa antimicrobiana del tracte intestinal.

Mecanismes	Efecte
Mucus	Facilita moviment del TGI, prevenció adhesió de bacteris a les cèl·lules epitelials, proveeix de receptors per adhesió a bacteris de la microbiota endògena
Trànsit intestinal ràpid en determinades regions	Dificultar la colonització
Antimicrobians	Maten o inhibeixen bacteris
H1 de cèl. apoptòtiques de l'epiteli	Maten o inhibeixen bacteris
Citocines	Antimicrobians Gram + més susceptibles
Baix pH	Maten o inhibeixen un ventall ampli de bacteris
Àcids biliars	Antimicrobians Gram + més susceptibles
Enzims proteolítics	Microbicida
Estimulació de la secreció excessiva de fluids	Expulsió de bacteris a l'exterior
Producció IgA	Bloqueja adhesió dels bacteris a les cèl·lules epitelials

3.3 Funcions principals de la microbiota

Des de fa dècades, s'han realitzat estudis amb animals de laboratori en condicions *germ-free* [98, 102, 103] que han anat aportant molta informació sobre l'efecte de la microbiota intestinal en la fisiologia i patologia de l'hoste. Fisiològicament, un animal *germ-free* té reduïts el *turn over* de la mucosa, l'activitat dels enzims digestius, la producció local de citocines, el teixit limfàtic associat a la mucosa, la cel·lularitat de la làmina pròpia, la vascularització, el gruix de la paret muscular i la motilitat, mentre que es veu com s'augmenten l'àrea cel·lular enterocromafínica i la ingesta calòrica per sustentar la massa corporal [86]. Així doncs, la microbiota entèrica forma una barrera natural i exerceix un gran nombre d'efectes protectors, estructurals i metabòlics

sobre l'epiteli. Les principals funcions, però, són les relacionades amb la degradació de substrats provinents de la dieta, la defensa enfront a patògens i la influència en el desenvolupament del sistema immunitari.

3.3.1 Funcions metabòliques:

- Fermentació de residus de la dieta, majoritàriament polisacàrids d'on s'obtenen SCFAs com el butirat, l'acetat o propionat. El butirat està àmpliament estudiat per l'efecte que té sobre l'hoste en tant que protegeix del càncer de còlon [104, 105]. També es catabolitzen proteïnes obtenint productes com les amines, amoni, àcids fenòlics o tiols que s'han vist relacionats amb un augment del risc de CCR [106].
- Degradació del mucus epitelial. S'ha descrit que *Ruminococcus torques* i *R. gnavus* així com *Bifidobacterium sp.* Degraden la mucina directament. Altres bacteris contribueixen a la degradació de la mucina produint sialidasa (*Bacteroides spp.*, *Clostridium spp.*, *E. coli*, *E. faecalis* o *Prevotella spp.*) o glicosidases (*Lactobacillus spp.*, *Bacteroides spp.*, *Clostridium spp.*, *E. coli*, *E. faecalis* o *Prevotella spp.*).
- Absorció de ions (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+}).
- Síntesi de vitamines (folat, biotina, vitamina K).
- Metabolització de carcinògens. Recuperació d'energia calòrica (modulen l'emmagatzematge de greix a l'hoste) (Figura 17).

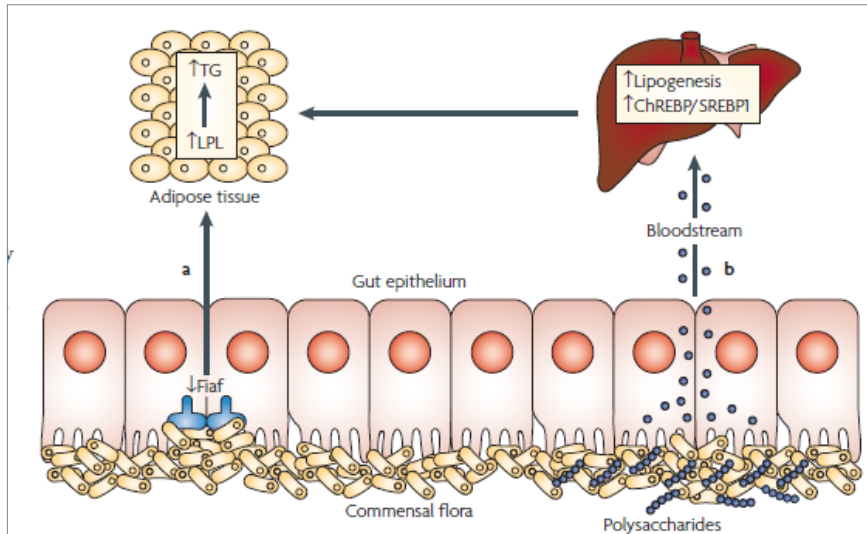


Figura 17. Mecanisme d'emmagatzematge del greix en els adipòcits promogut per la microbiota mitjançant l'increment de l'activitat de les lipases (LPL) pel segrest de Fiaf (fasting-induced adipocyte factor) o per increment de triglicèrids (TG) per l'augment de la lipogènesi i de ChREBP (carbohydrate response element binding protein) i SREBP1 (sterol regulatory element binding protein 1) [59].

3.3.2 Funcions estructurals

- i) Control de la diferenciació i proliferació cel·lular de l'epiteli mitjançant productes metabòlics com els SCFAs. La formació d'agents protectors durant la fermentació al còlon es produeix mitjançant la hidròlisi de carbohidrats provinents de la dieta o endògens produint àcids grassos de cadena curta com l'acetat, el propionat i el butirat, els quals es va observar que estimulen el creixement i diferenciació cel·lular en els intestins prim i gruixut *in vivo* [107]. No obstant, el rol del butirat comença a ésser controvertit. Durant molts anys el butirat s'ha considerat un compost protector per a l'hoste [108-110], però s'ha observat que inhibeix la proliferació cel·lular i estimula la diferenciació cel·lular en línies cel·lulars neoplàsiques *in vitro* [111].

ii) Intervé en el desenvolupament del sistema immunitari. Tenint en compte que la mucosa intestinal és la principal superfície de contacte amb el medi, que els teixits limfàtics associats a TGI, GALT, *gut associated lymphoid tissue*) contenen el major *pool* de cèl·lules immunocompetents, i que és on es produeix la major quantitat d'immunoglobulina A (IgA) [112], és evident la interacció de la microbiota intestinal i el sistema immunitari [87, 113]. Animals *germ-free* tenen menor densitat de cèl·lules limfòcits en el TGI, estructures especialitzades dels fol·licles petites i la concentració en sang d'immunoglobulines baixa [114]. Durant el procés de colonització, després del naixement, es produeix una maduració en el sistema immunitari i es tolera la presència de la microbiota comensal. Els mecanismes de defensa de l'hoste necessiten una interpretació molt acurada per tal de poder distingir membres de la microbiota comensal i patògens externs. Aquesta mediació es fa principalment per dues vies de sistemes [115] de receptors de reconeixement (PRR, *pattern recognition receptor*): la família dels *toll-like receptors* (TLRs) i per la via NOD/CARD (*nucleotide-binding oligomerization domain/capsase recruitment domain isoforms*). TLRs i NOD són proteïnes que s'expressen a la superfície dels enteròcits i de les cèl·lules dendrítiques [115] i són essencials per la comunicació bacteri-hoste. A més, els perfils d'expressió dels TLRs contribueixen a l'homeostasi. La microbiota comensal expressa alguns lligands dels PRR evitant així la resposta inflamatòria cap aquests bacteris. Alguns dels lligands produïts per bacteris que s'associen a TLRs estan descrits a la taula 8 [116].

Taula 8. Lligands produïts per diferents bacteris que són reconeguts per diferents tipus de TLRs.

Receptor	Lligand	Origen del lligand
TLR1	Lipopèptids de triacil	Bacteris i micobacteris
	Factors solubles	<i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2	Lipoproteïnes/lipopèptids	Patògens varis
	Peptiglicà	Bacteris Gram positius
	Àcid lipoteicoic	Bacteris Gram positius
	Lipoarabinomanan	Micobacteris
	Modulina soluble en fenol	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
	Glicinositol-fosfolípids	<i>Trypanosoma cruzi</i>
	Glicolípid	<i>Treponema maltophilum</i>
	Porines	<i>Neisseria</i>
	Lipopolisacàrid atípic	<i>Leptospira interrogans</i>
	Lipopolisacàrid atípic	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Zimosan	Fongs	
Proteïnes <i>heat-shock</i> 70°C	Hoste	
TLR3	dsRNA	Virus
TLR4	Lipopolisacàrids	Bacteris Gram negatius
	Taxol	Plantes
	Proteïnes de fusió	Virus respiratoris sincitials
	Proteïna Envelope	Virus de ratolins de tumor mamari
	Proteïnes <i>heat-shock</i> 60°C	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
	Proteïnes <i>heat-shock</i> 70°C	Hoste
	Domini A tipus III repetit de fibronectina	Hoste
	Oligosacàrids d'àcid hialurònic	Hoste
	Fragments de polisacàrid de sulfat d'heparan	Hoste
Fibrinogen	Hoste	
TLR5	Flagelina	Bacteria
TLR6	Lipopèptids de diacil	Mycoplasma
	Àcid lipoteicoic	Bacteris Gram positius
TLR7	Zimosan	Fongs
	Imidazoloquinola	Compostos sintètics
	Loxicribina	Compostos sintètics
	Bropimina	Compostos sintètics
TLR8	sdRNA	Compostos sintètics
	sdRNA	Virus
TLR9	CpG-conenint DNA	Compostos vírics sintètics
TLR10	Desconegut	Desconegut
TLR11	Desconegut	Bacteris uropatogènics

3.3.3 Funcions protectores

Exerceix de barrera funcional contra patògens potencials. La microbiota comensal exerceix una forta resistència enfront de la colonització de bacteris exògens prevenint la invasió dels teixits. Els mecanismes que utilitzen per prevenir la colonització exògena són:

- i) ocupar llocs d'adhesió
- ii) alterar les condicions fisico-químiques del medi
- iii) produir substàncies antagonistes com les bacteriocines que es produeixen a nivell de nínxol ecològic
- iv) utilitzar tots els nutrients disponibles en el medi.

4. La microbiota en el càncer colorectal esporàdic

4.1 Evidències de l'associació del CCR amb la microbiota

La microbiota intestinal té funcions homeostàtiques, immunitàries i metabòliques que afecten la proliferació i supervivència de les cèl·lules epitelials. Tenint en compte la complexitat i diversitat microbiana existent en el còlon i el recte, si els bacteris poden intervenir en qualsevol càncer, el còlon i el recte serien els llocs d'actuació idonis donada l'abundància bacteriana que hi habita. Les evidències del rol de la microbiota són diverses (Taula 9), però la participació de la microbiota en la carcinogènesis continua essent controvertida donada la manca d'acord sobre els mecanismes moleculars involucrats en el desenvolupament de la malaltia [117]. Existeixen diferents vies moleculars que poden contribuir en l'inici del procés tumoral; com a mínim hi ha d'haver entre 5 i 7 alteracions genètiques en les cèl·lules epitelials per iniciar la carcinogènesis. Des de fa més de cinquanta anys que s'ha relacionat la microbiota intestinal amb el desenvolupament del CCR en estudis realitzats amb femtes [118-120] i posteriorment nombrosos i diferents assajos han seguit demostrant la relació existent entre la microbiota i el CCR (apartat 4.2).

Els ratolins *knockout* i els *germ-free* són dos models animals molt utilitzats en estudis de desenvolupament tumoral, incloent-hi el CCR. Els ratolins *germ-free* o axènics es caracteritzen per no tenir cap microorganisme vivent detectable, mentre que els *knockout* no expressen un gen diana específic, ja sigui en un teixit concret o en tot l'organisme.

Taula 9. Evidències del rol etiològic de la microbiota en el CCR.

Evidències del rol de la microbiota en l'etiologia del CCR
S'han trobat femtes mutagèniques, d'on s'han aïllat substàncies genotòxiques d'origen bacterià
La microbiota pot produir, a partir dels compostos de la dieta, substàncies genotòxiques, carcinogèniques i promotores de l'activitat tumoral
La microbiota pot activar procarcinògens a agents reactius del DNA
Animals <i>germ-free</i> alimentats amb dieta humana tenen menor nivell d'errors en el DNA que ratolins convencionals
<i>Germ-free</i> tractats amb el carcinogen 1,2-dimethylhydrazine tenen menor incidència de tumors que ratolins amb el mateix tractament però amb una microbiota normal
Ratolins <i>T-cell receptor chain double-knockout</i> (TCR $\beta^{-/-}$ p53 $^{-/-}$) no desenvolupen adenocarcinoma als 4 mesos de vida. En ratolins convencionals (TCR $\beta^{-/-}$ p53 $^{-/-}$)

Assajos realitzats amb models animals varen mostrar que en absència de microbiota intestinal disminuïa la freqüència de mutacions oncogèniques i la formació de tumor [86, 121-123]. Kado i col·laboradors varen demostrar que es necessitava la presència de la microbiota pel desenvolupament d'un adenocarcinoma en ratolins *T-cell receptor chain double-knockout* (TCR $\beta^{-/-}$ p53 $^{-/-}$) [121]. Posteriorment, i entre altres assajos, l'any 2007 Wang i Huycke [124] varen utilitzar una línia cel·lular híbrida de hámster (ALN) per demostrar que el superòxid produït per *Enterococcus faecalis*, un bacteri gram-positiu que és l'únic capaç de produir superòxid ($\cdot\text{O}_2^-$) extracel·lular, promou inestabilitat cromosòmica (CIN) que pot iniciar la carcinogènesis. *Streptococcus bovis* també s'ha associat al CCR després de diversos estudis on es va observar que després d'una bacterièmia i endocarditis causada per aquest bacteri, s'incrementava la incidència de CCR en els pacients fins al 10% de casos de CCR [125-128]. Es creu que el possible paper etiològic en aquesta malaltia rau en l'efecte que tenen les proteïnes de *S. bovis*, les WEA (*wall-*

extracted antigens) induint la inflamació i els processos carcinogènics. El mode d'activació es suposa que és degut a l'augment de la formació de radicals d'oxigen i d'òxid nítric els quals produeixen mutagènesi en les cèl·lules de la mucosa intestinal [129].

La implicació de la microbiota en el càncer s'associa a dues vies:

1- Promoció de la inflamació crònica seguida d'infecció.

Existeixen moltes evidències que impliquen la microbiota intestinal en l'inici i l'amplificació dels estadis de malalties inflamatòries intestinals (MII) [91, 130-134]. El desequilibri en el balanç de bacteris protectors i perjudicials, disbiosi, que habiten el còlon i/o recte promou la inflamació en l'hoste. Uronis i col·laboradors [135] varen establir un nou model de CAC (colitis-associated cancer) utilitzant ratolins *azoxymethane (AOM)-exposed, conventionalized-III07* en el qual van observar que la modulació del sistema dependent del reconeixement microbià TLR/MyD88 (*Toll-like receptors/Myeloid differentiation factor 88*), promou el desenvolupament tumoral. Un altre estudi va concloure que quan *S. bovis* colonitza el còlon i el recte s'indueix l'expressió de mRNAs de les interleuquines (IL) IL-1, IL-8 i Cox-2 promovent la carcinogènesi en el teixit epitelial [125]. Membres de la família Enterobacteriaceae així com *C. difficile* són candidats a estar implicats en el desenvolupament d'un CCR mitjançant la inducció crònica de la inflamació en el tracte intestinal [136, 137].

2- Producció de metabòlits carcinogènics.

Existeixen substàncies que poden danyar la mucosa intestinal afavorint el desenvolupament tumoral (Taula 10). Aquestes substàncies es creu que s'uneixen a receptors de membrana específics modificant els mecanismes de transducció de senyals. Tanmateix, l'estimació quantitativa del risc que

poden comportar aquestes substàncies és difícil d'obtenir per la manca d'estudis epidemiològics i la complexitat de l'obtenció de mostres. Aquests compostos poden provenir per dues vies diferents:

- Compostos incorporats amb la dieta (amines heterocícliques, hidrocarburs aromàtics policíclics)

La transformació de compostos provinents de la dieta per part de la microbiota genera diferents metabòlits, alguns dels quals són potencialment carcinogènics.

Taula 10. Compostos generats pels bacteris carcinogènics i l'acció que causen en la carcinogènesis.

Compost	Bacteri	Acció	Referència
Etolol	Tots	Intervé en la disponibilitat del folat i genera acetaldehid	[23, 55]
Folat	Tots	Dany DNA	[37, 38]
Amines heterocícliques	Anaerobis <i>Eubacterium</i> spp	Dany DNA	[138-140]
Fecapentases	<i>Bacteroides</i> spp	Desconegut	
Radicals d'oxigen	<i>E. faecalis</i>	Dany DNA	[124, 141]
Sulfit d'hidrogen	SRB (<i>sulfat-reducing-bacteria</i>)	Interromp l'equilibri entre l'apoptosi, la proliferació i diferenciació de l'epiteli	[140, 142]

- Compostos endògens típics del tracte digestiu (sals biliars) o derivats del metabolisme enzimàtic (nitrosamines).

El metabolisme bacterià de les sals biliars consisteix principalment en la deconjugació i l'oxidació del grup hidroxil donant lloc a àcids biliars secundaris, principalment àcid deoxicòlic (DCA) i àcid litocòlic (LCA), implicats com a co-carcinògens o promotors en el CCR [143]. Assajos realitzats in vivo i in vitro han observat alguns dels efectes que provoquen com és la necrosi, la hiperplàsia, la promoció tumoral en el còlon, la inducció del dany del DNA o

l'apoptosi [144]. Així doncs, s'ha observat que l'àcid deoxicòlic danya la mucosa intestinal augmentant la proliferació cel·lular, que és probablement el mecanisme mitjançant el qual els àcids biliars intervenen en la carcinogènesis [145]. A més, estudis epidemiològics indiquen que en poblacions amb risc de CCR les concentracions d'àcids biliars fecals són més altes que en poblacions control [146].

4.2 Espècies bacterianes associades al càncer colorectal

La relació entre la microbiota i el CCR s'ha evidenciat en nombrosos estudis i la implicació d'aquesta en el CCR és ben reconeguda. Tanmateix, el nombre d'estudis que han determinat espècies concretes associades al CCR és baix, obtenint així poca informació sobre quins bacteris en concret poden/estan més involucrats en la carcinogènesis, malgrat que en el CCR el desenvolupament tumoral sigui conseqüència de varis factors que afecten com la susceptibilitat genètica, l'edat, la dieta, etc. El fet que la microbiota intestinal sigui bàsicament anaeròbia i que fins els darrers 15 anys les tècniques emprades havien estat bàsicament de cultiu, produint-se un biaix molt elevat la realitat que habita en l'intestí, les primeres aproximacions utilitzant tècniques moleculars es van realitzar el 1995 per Moore i col·laboradors [147] on va descriure, a partir de mostres fecals, espècies bacterianes associades a un alt risc de patir un CCR: *B. vulgatus*, *B. stercoris*, *B. longum* o *B. angulatum*, i també espècies protectores contra el CCR: *Lactobacillus* S06, *Fusobacterium* AB, *E. aerofaciens* 1 i 2, *Eubacterium* BN o *Peptostreptococcus* DZ2. Posteriorment, i més concretament en els darrers dos anys, diversos anàlisis de la microbiota en el CCR han sumat en el coneixement d'aquesta relació (Taula 11).

Tanmateix, existeixen altres estudis que associen determinats bacteris amb el CCR com són *B. vulgatus*, *E. rectale*, *R. torques*, *S. hansenii*, *B. longum*, *R. albus*, *P. productus*, *B. stercoris*, *B. angulatum*, *E. eligens*, *R. gnavus* i *F. prausnitzii* [33, 155], *B. vulgatus* i *B. stercoris* [75], Clostridia [85], *E. coli* [156] o Bacteroides [157].

Taula 11. Estudis moleculars que associen la microbiota al CCR.

Any	Tipus mostra i mida mostral	Taxó bacterià	Referència
1995	Femtes, 18 PP	<i>B. vulgatus</i> , <i>B. stercoris</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. angulatum</i>	[147]
1996	Cultiu cel·lular	Bacteris reductors del sulfat	[148]
2000	Cultiu cel·lular	<i>S. bovis</i>	[149]
2002	Cultiu cel·lular	<i>E. faecalis</i>	[141]
2007	Cultiu cel·lular	<i>E. faecalis</i>	[124]
2008	Femtes, 20CCR, 10 PP	<i>C. coccoides</i> grup, <i>C. leptum</i>	[150]
2009	Femtes, 27CCR, 27PP, 44C	<i>Desulfovibrio</i> sp.	[151]
2010	Biopsies, 21AD, 23 no AD	<i>Dorea</i> spp, <i>F. prausnitzii</i>	[152]
2011	Biopsies, 41CCR, 18C	<i>Corinebacterium</i> sp., <i>F. prausnitzii</i> , <i>P. merdae</i> , <i>Clostridium</i> sp., bacteris proudctor de sulfat	Aquest treball
2011	Femtes, 60CCR, 119C	<i>Bacteroides</i> sp, <i>Prevotella</i> sp.	[153]}
2011	Biopsies, 6CCR	<i>Coriobacteriadae</i>	[154]
2011	Biopsies, 77CCR, 45C	<i>E. coli</i>	Aquest treball

La idea que certs bacteris poden causar càncer colorectal després d'una infecció crònica es va observar amb *H. hepaticus*, que és capaç de promoure càncer de còlon en ratolins genèticament modificats quan aquest causa una infecció [158, 159]. *Citrobacter rodentium*, que és un patogen similar a l'enteropatogènica *E. coli* poden promoure la carcinogènesis després d'una infecció crònica [156, 160, 161]. L'existència de la relació de soques toxigèniques de *B. fragilis* i la progressió del CCR va ésser

suggerida per Toprak i col·laboradors [162], els quals van observar una major proporció de soques toxigèniques respecte no toxigèniques en malalts de CCR. Altres oportunistes patògens com membres d'Enterobacteriaceae així com *C. difficile* podrien estar involucrats en la progressió del CCR mitjançant la inducció de la inflamació crònica al llarg del TGI [136, 137].

No obstant, la relació entre *S. bovis* i el CCR es va proposar durant la segona meitat dels anys 1970 [128, 163] i fins l'actualitat [125, 164] però sense arribar a concloure si és causa o conseqüència del tumor [127, 165]. *S. bovis* està present a fins un 15% dels malalts de CCR [166]. La bacterièmia o l'endocarditis que pot causar *S. bovis* estan relacionats amb la presència d'inflamació o lesions neoplàsiques en l'intestí llarg [167] i s'ha observat que la prevalença en mostres fecals és més elevada en pacients amb CCR que en persones control [128]. Altres estudis utilitzant cultius cel·lulars han posat de manifest també la inducció de la carcinogènesi en presència de *S. bovis* [125, 129, 168].

5. Els estreptococs

5.1 Morfologia i metabolisme

Els estreptococs són bacteris gram positius, sense motilitat, que no formen espores, catalasa negatius, amb morfologia esfèrica o ovoïdal de menys de 2µm de diàmetre que es poden disposar en parells o en cadenes [177]. El contingut molar de G+C en el DNA dels membres d'aquest gènere està entre el 34 i 46%. La majoria són anaerobis facultatius, encara que alguns són anaerobis obligats. Però encara que són capaços de viure en presència d'oxigen, no poden sintetitzar compostos propis del metabolisme de la respiració. Nutricionalment són organismes que requereixen de medis complexos, presentant requeriments molt variables. Normalment, els medis que s'utilitzen per al creixement estan complementats amb sang o sèrum. La glucosa i altres carbohidrats són metabolitzats per fermentació i com a producte principal s'obté àcid làctic. A diferència d'altres gèneres, la fermentació de la glucosa no produeix gas.

5.2 Filogènia i taxonomia del gènere *Streptococcus*

Els estreptococs són un grup molt heterogeni de bacteris gram positius anaerobis facultatius format per més de 30 espècies diferents, la majoria de les quals es troben en diferents zones del cos humà com la pell, mucoses, teixits tous, la vagina, i com a membres de la microbiota gastrointestinal [63, 169], o poden ésser aïllats d'altres animals. Algunes espècies són potencialment patògenes com *S. pyogenes*, *S. agalactiae* o *S. pneumoniae* causant greus infeccions que poden derivar en septicèmies [170-173]. Afegit a aquestes espècies, *S. bovis* és ocasionalment l'agent causant de greus endocarditis [174], septicèmies neonatals [175], meningitis i aproximadament un 15% dels casos de CCR estan associats a bacterièmia per *S. bovis* [125, 126, 164, 176].

Formen part del regne *Bacteria*, filus *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordre *Lactobacillales* i família *Streptococcaceae*. Comparteixen una filogènia comuna i una estructura de paret cel·lular similar amb *Bacillus*, *Clostridium*, *Streptomyces* i *Lactobacillus* [177, 178].

Els estreptococs es classifiquen en base a la morfologia de les seves colònies, les reaccions bioquímiques i l'especificitat serològica [172]. Es divideix en tres grups les espècies segons el tipus d'hemòlisi en agar sang: β -hemòlisi (lisi completa dels eritròcits), α -hemòlisi (lisi incompleta dels eritròcits) i no hemolítiques (Taula 12).

L'especificitat serològica de Lancefield es basa en diferències antigèniques dels carbohidrats de la paret cel·lular, obtenint diferents grups: A, B, C, D, E i F.

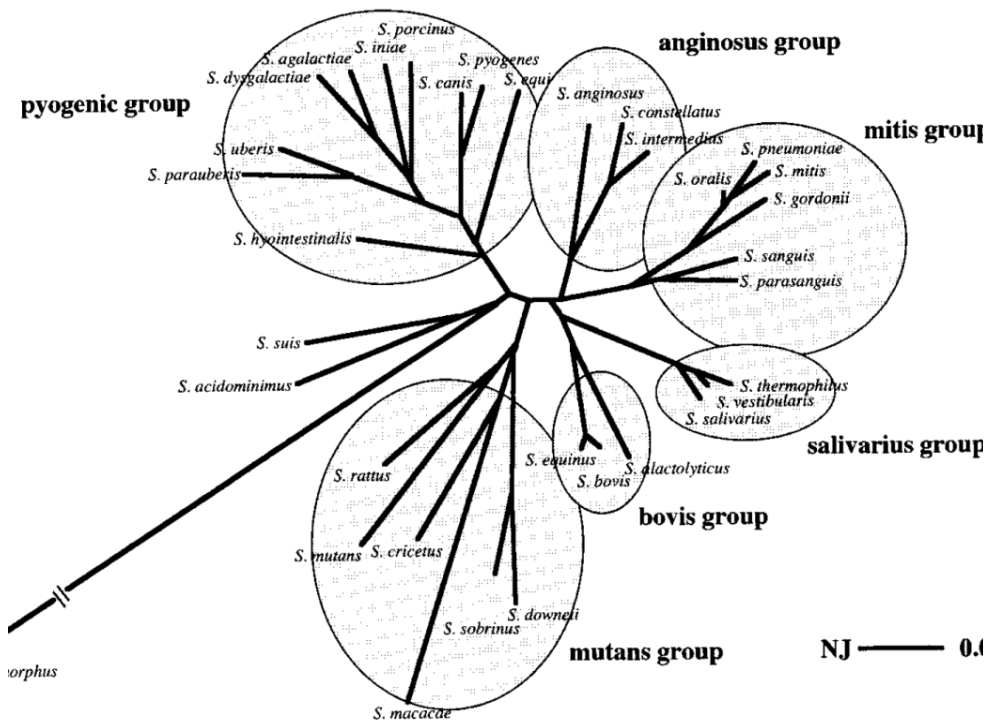


Figura 18. Grups d'estreptococs d'acord a la seva filogènia, segons l'anàlisi de les seqüències del gen 16S rRNA[181].

A més de tècniques de la microbiologia clàssica, des de fa uns vint anys nous mètodes moleculars han permès fer un estudi més profund de la taxonomia d'aquest i d'altres gèneres. Les proves moleculars més abundants per a la classificació del gènere *Streptococcus* és l'anàlisi del gen 16S rRNA [179-183], el qual està molt conservat dins dels Eubacteris i serveix com a eina a l'hora de diferenciar les diferents espècies. També, d'altres gens, com és el gen que codifica pel factor d'elongació Tu, el gen *tuf*, permet la identificació de les espècies [184-186] i la realització d'un arbre que relaciona filogenèticament els microorganismes d'aquest gènere de manera molt similar que l'obtingut mitjançant l'estudi del gen 16S rRNA [184].

5.3 Patogenicitat i prevalença

Per tal de fer referència a aquestes dues característiques, s'agrupen les diferents espècies segons el grup serològic de Lancefield.

5.3.1 Estreptococs del grup A

S. pyogenes és β -hemolític del grup A de Lancefield (GAS) i és l'únic membre d'aquest primer grup d'estreptococs essent el més patogènic de tots els estreptococs [170, 178]. És responsable de molts problemes respiratoris, de la pell i d'infeccions invasives com: faringitis, tonsil·litis, endocarditis, impetigo, síndrome de xoc tòxic per estreptococs (STSS), meningitis, febre escarlatina, limfadenitis, pneumònia i sèpsies en nadons. El factor de virulència associat a *S. pyogenes* és l'antigen de la proteïna M, que evita la fagocitosi i sobreviu dins l'hoste. La prevalença d'aquest microorganisme ha anat augmentant al llarg les darrers vint anys.

Taula 12. Grups d'estreptococs segons el tipus d'hemòlisi i el grup de Lancefield.

CLASSE	GRUP LANCEFIELD	ESPÈCIE
β-HEMOLÍTICS	A	<i>S. pyogenes</i>
	B	<i>S. agalactiae</i>
	C	<i>S. dysgalactiae subsp. dysgalactiae</i>
	A,C,G,L	<i>S. dysgalactiae subsp. Equisimilis</i>
	C	<i>S. equi subsp. Equi</i>
	C	<i>S. equi subsp. Zooepidemicus</i>
	G	<i>S. canis</i>
	A,C,G,F, -	<i>S. anginosus Group</i>
	C	<i>S. constellatus subsp. Pharyngis</i>
	E,P,U,V	<i>S. porcinus</i>
	-	<i>S. iniae</i>
	?	<i>S. phocae and sp. didelphis</i>
NO β-HEMOLÍTICS	pn	<i>S. pneumoniae</i>
	D	<i>S. bovis</i>
	D	<i>S. equinus</i>
	D	<i>S. gallolyticus</i>
	D	<i>S. infantarius</i>
	D	<i>S. pasteurianus</i>
	D	<i>S. lutetiensis</i>
	R,S,T	<i>S. suis</i>
		<i>S. mutans</i>
	D	<i>S. salivarius</i>
		<i>S. anginosus</i>
		<i>S. sanguinis</i>
		<i>S. mitis</i>
		<i>S. acidominimis</i>
		<i>S. pluranimalium</i>
		<i>S. thoraltensis</i>
		<i>S. uberis and S. parauberis</i>
		<i>S. urinalis</i>
		<i>Dolosicoccus paucivorans</i>
	<i>Facklamia species i Ignavigramun ruoffiae</i>	
	<i>Globicatella sanguinis</i>	

5.3.2 Estreptococs del grup B

Els membres del grup B normalment formen part de la flora intestinal, de la vagina i la uretra. L'espècie amb més rellevància d'aquest grup és *S. agalactiae*, aïllat per primer cop de les mastitis de les vaques [187]. La seva patogenicitat es centra, fonamentalment, en què la infecció per aquest bacteri és la causa més comuna en la sepsis neonatal [188]. En adults, les infeccions causades per *S. agalactiae* inclouen bacterièmia, endocarditis, infeccions de pell i teixits tous, pneumònia i osteomelitis.

5.3.3 Estreptococs del grup C

Estan associats bàsicament a animals, particularment èquids. Les espècies incloses en aquest grup serològic són: *S. equi*, *S. zooepidemicus*, *S. equisimilis* i *S. dysgalactiae*. Ocasionalment es poden aïllar estreptococs del grup C en humans associats a pneumònies, infeccions del tracte urinari, endocarditis, meningitis, sepsis puerperal i erisipelles [189].

5.3.4 Estreptococs del grup D

Aquests grup d'estreptococs ha patit molts canvis en la taxonomia i classificació en els darrers anys. El grup es coneix com a grup *S. bovis* i contempla diferents espècies, d'entre les quals *S. gallolyticus* (*S.bovis* I) i *S. pasteurianus* (*S.bovis* II.2) es relacionen amb càncer colorectal [125, 128, 164]. A més, aïllats de *S. bovis*, particularment del biotipus I, poden causar bacterièmia i estan associats a malalties del tracte intestinal. [174], endocarditis i meningitis [128, 149, 190].

5.3.5 Estreptococs del grup E i F

Els estreptococs del grup E rarament es troben en humans, i si ho fan, s'aïllen amb més probabilitat del tracte respiratori. Generalment causen infeccions en vaques i porcs [191].

Els estreptococs del grup F es poden trobar en ferides infectades i també causant tonsil·litis, infeccions de coll, del tracte urinari i abscessos bucals.

5.3.6 Estreptococs del grup G

Dins d'aquest grup, *S. anginosus* [183, 192] es troba associat a gossos i humans. En ocasions, pot causar infeccions en humans com la tonsil·litis, infeccions de coll i del tracte respiratori en general.

5.3.7 *Streptococcus pneumoniae*

No pertany a cap grup serològic de Lancefield, però es troba dins del grup “mitis”, i generalment es tracta a part dels altres membres d'aquest grup. Utilitzant mètodes de cultiu encara és difícil d'aïllar i identificar, fenotípicament es pot confondre amb altres membres del grup mitis i, a part de proves d'aglutinació del sèrum i proves serològiques, les tècniques moleculars han ajudat a la seva ràpida identificació. La prevalença de *S. pneumoniae* continua creixent degut a l'adquisició de resistència als nous fàrmacs[193]. Malgrat que algunes persones tenen aquest bacteri de forma natural en la seva flora bucofàríngea, sol aïllar-se en casos de pneumònia, bacterièmia, otitis mitja, meningitis, sinusitis, peritonitis i artritis [194].

5.3.8 Altres estreptococs

Estreptococs dels grups serològics H, K, L, M, O i R són infreqüents en infeccions humanes [178]. Els estreptococs no agrupables dins dels diferents grups serològics esmentats anteriorment generalment no es troben en humans, excepte *S. iniae*, que és un patògen dels peixos però que s'ha aïllat en humans essent responsable de causar infeccions com d'endocarditis, de meningitis i septicèmia.

5.4 Detecció de *Streptococcus* per mètodes moleculars

En la darrera dècada s’ha desenvolupat diferents assajos per detectar, identificar o quantificar determinades espècies d’aquest gènere. Així trobem mètodes basats en la PCR per detectar específicament *S. bovis* [195, 196], *S. agalactiae* [197], *S. mutans* [198] i *S. pneumoniae* [199]. La detecció específica del gènere *Streptococcus* es va obtenir el 2004 mitjançant l’anàlisi filogenètica del gen *tuf*, el qual codifica pel factor d’elongació TU per Picard i col·laboradors [184]. Aquest gen ja va ésser utilitzat prèviament per a la detecció gènere-específica d’*Enterococcus* [185] i *Staphylococcus* [186].

Taula 13. Clústers filogenètics obtinguts amb l’anàlisi del gen *tuf* i del 16S rRNA [184].

Phenotypic species group	16S rDNA ^a	<i>tuf</i> ^b		
Viridans streptococci	Pyogenes	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. agalactiae</i>	
		<i>S. dysgalactiae</i>		
		<i>S. pyogenes</i>	<i>S. dysgalactiae</i> <i>S. pyogenes</i>	
		<i>S. equi</i> <i>S. uberis</i>	<i>S. equi</i>	
	Bovis	<i>S. parauberis</i>	<i>S. parauberis</i>	
			<i>S. uberis</i>	
	Viridans streptococci	Bovis	<i>S. bovis</i> ^c	<i>S. bovis</i>
			<i>S. criceti</i>	
		Mutans	<i>S. downei</i> <i>S. sobrinus</i>	<i>S. criceti</i> <i>S. downei</i> <i>S. sobrinus</i>
			<i>S. ferus</i> <i>S. macacae</i>	<i>S. macacae</i> <i>S. mutans</i> <i>S. ratti</i>
<i>S. ratti</i>				
<i>S. mutans</i>				
Salivarius		<i>S. salivarius</i> <i>S. vestibularis</i>	<i>S. salivarius</i> <i>S. vestibularis</i> <i>S. suis</i> ^d	
		Anginosus	<i>S. anginosus</i> <i>S. constellatus</i> <i>S. intermedius</i>	<i>S. anginosus</i> <i>S. constellatus</i> <i>S. intermedius</i>
<i>S. cristatus</i>				
<i>S. gordonii</i>			<i>S. gordonii</i> <i>S. sanguinis</i> <i>S. cristatus</i>	
Mitis	<i>S. sanguinis</i>			
	<i>S. mitis</i> <i>S. oralis</i> <i>S. pneumoniae</i>	<i>S. mitis</i> <i>S. oralis</i> <i>S. pneumoniae</i>		
	<i>S. parasanguinis</i>	<i>S. parasanguinis</i>		
	<i>S. acidominimus</i> ^d <i>S. bovis</i> ^c <i>S. suis</i> ^d	<i>S. acidominimus</i> ^d <i>S. ferus</i>		

L’anàlisi de les seqüències de nucleòtids va revelar que el gen *tuf* en estreptococs era generalment més variable que el 16S rRNA observant que la identitat de les seqüències entre espècies variava des del 90.3 fins

el 98,6% pel gen *tuf* i del 94,5 al 97,1% pel 16S rRNA oferint més discriminació entre espècies. El fragment generat amb els encebadors dissenyats va resultar ser de 153pb amb una variació en les seqüències entre espècies del 0 al 2,6%. Tanmateix, els encebadors també detectaven *E. durans* i *L. lactis* i presentava diferències en els clústers obtinguts comparant ambdós gens d'algunes espècies molt properes filogenèticament (Taula 13).

5.5 *Streptococcus bovis* i el càncer colorectal

La primera associació entre *S. bovis* i el CCR va ser descrita el 1977 per Klein i col·laboradors [128] quan varen observar dos pacients amb un carcinoma colònic i la coexistència d'endocarditis per *S. bovis*. També van observar que l'aïllament per cultiu d'aquest en mostres fecals era més elevat ($p < 0,001$) que en individus controls. Des de llavors durant els anys 1979-1989 es varen descriure nombrosos casos relacionant *S. bovis* amb neoplàsia colònica i endocarditis [174, 200-202]. Aquest darrer any Ruoff va diferenciar *S. bovis* en tres biotipus diferents: I, II/1 i II/2 [174], els quals van permetre identificar el biotipus I com el biotipus relacionat amb el CCR [196, 203]. Recentment es va revisar la taxonomia proposant reemplaçar aquests biotipus per *S. gallolyticus* pel biotipus I, *S. infantarius* pel biotipus I/1 i *S. pasteurianus* pel biotipus II [196, 203]. Múltiples estudis han mostrat que fins el 60% dels casos d'endocarditis o bacterièmia causada per *S. bovis* es detecta un tumor després d'un examen mèdic del tracte intestinal [176]. Biarc i col·laboradors [129] van caracteritzar les proteïnes de *S. bovis* que promouen els processos d'inflamació i carcinogènesi, les WEA (*well-extracted antigen*) en lesions induïdes precancerígenes. El mode d'actuació es va creure degut a la producció de radicals d'oxigen i òxid nítric els quals produeixen mutagènesi en cèl·lules de la mucosa intestinal.

6. La biologia molecular en l'estudi de la microbiota intestinal.

L'estudi molecular de la microbiota intestinal engloba diferents metodologies que van construir el mapa microbià malgrat encara no s'ha completat. Aquests mètodes moleculars, que es basen majoritàriament en el DNA i la subunitat petita de l'rRNA (SS rRNA), inclouen la hibridació in situ per fluorescència (FISH) [204-206], hibridació dot-blot [207], clonació [61, 208], DGGE o TGGE (*denaturing/temperature gradient gel electrophoresis*) [63, 77, 209], quantificació mitjançant PCR quantitativa (qPCR) [210, 211], microarrays [81, 212] o piroseqüenciació [212]. Totes elles ajuden a comprendre la localització, la composició, l'abundància i el funcionament dels bacteris en el TGI.

L'electroforesi en gel amb gradient desnaturalitzant (DGGE) és una tècnica rutinària de laboratori que s'ha estès àmpliament en l'estudi ambiental per caracteritzar l'estructura i dinàmica de les poblacions bacterianes. És un mètode ràpid i sensible que proveeix una caracterització tangible de la diversitat i composició d'una comunitat bacteriana obtenint un perfil microbià que representa els majors constituents de la comunitat analitzada [213]. Tanmateix, existeixen certes limitacions en la informació que es pot treure de cada mostra, les quals comencen en estadis previs a la DGGE durant el procés d'obtenció de suficient DNA per a la seva detecció.

El mètode d'extracció del DNA de les mostres ha d'ésser eficient i net obtenint un DNA lliure de restes de reactius que s'empren per a l'extracció. És important utilitzar un mètode d'extracció que sigui adequat pel tipus de mostra de què es disposa per optimitzar l'aïllament del DNA bacterià.

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) és un mètode molecular que amplifica un fragment concret de DNA motlle [214]. És un mètode sensible però que produeix un biaix en la informació del DNA que hi ha en la mostra donat que només detecta aquells fragments de DNA que es troben en més d'un 1% [215]. Aquí cal afegir els problemes que sorgeixen en la PCR: el disseny d'encebadors o primers, les condicions del programa del termociclador, i la neteja dels productes obtinguts per a la seva posterior utilització en la DGGE.

Cada un d'aquests passos pot influir en el resultat, el qual, d'altra banda, proveeix de molta informació sobre la comunitat: i) es genera un perfil bacterià que es pot analitzar i comparar amb d'altres mitjançant softwares específics d'anàlisi d'imatges i obtenir clústers, ii) es pot identificar cada una de les bandes que s'obtenen en el gel mitjançant reamplificació del producte i seqüenciació mitjançant bases de dades com el GenBank [216] o el Ribosomal Database Project [217].

OBJECTIUS

Capítol 1: Determinació de l'abundància de bacteris específics associats al CCR respecte individus control i relació amb les dades clíniques dels pacients.

En els darrers anys han aparegut pocs estudis sobre la microbiota i el càncer colorectal. Els estudis de diversitat realitzats es troben en els anys 2010 i 2011. Tanmateix, pocs estudis determinat l'abundància de bacteris específics en el CCR. D'aquests, tots s'han realitzat en femtes, i per tant, els resultats poden diferir dels que es realitzen amb biòpsies de mucosa intestinal. S'ha volgut comparar l'abundància de bacteris específics que han estat prèviament estudiats en femtes i que s'han relacionat amb el CCR, i s'ha procedit a:

- Determinar l'abundància de bacteris específics, i del total d'Eubacteris en pacients amb CCR en mostres de mucosa intestinal i comparar-ho amb controls sans mitjançant la tècnica molecular de qPCR.

Capítol 2: Diversitat i composició de la comunitat bacteriana en pacients amb càncer colorectal. Diferències entre teixits tumoral i mucós i cerca de bacteris rellevants.

Als anys 70 es va començar a postular el paper de la microbiota en el CCR, però l'etiologia d'aquesta malaltia no està clara i són pocs els estudis que han cercat la relació entre la microbiota intestinal i el CCR. Els primers treballs es varen realitzar utilitzant mètodes clàssics de cultiu i quan la microbiologia molecular va iniciar-se en aquest àmbit, la majoria d'estudis es van realitzar amb mostres fecals i no amb biòpsies fresques com les utilitzades en aquest estudi. Per tant, no està clar quina és la

composició i estructura de la microbiota de la mucosa intestinal, si en les neoplàsies s'estableixen poblacions bacterianes diferents o si existeixen bacteris més prevalents en malalts de CCR que en individus control, així com si factors exògens i la localització del tumor influencien en la comunitat bacteriana que habita en la mucosa intestinal. Els objectius específics van ser:

- Cercar si existeixen diferències en mostres de teixit mucós i tumoral: i) qualitativament: comparant els perfils microbians moleculars i ii) quantitativament: mitjançant l'abundància relativa de bacteris específics.
- Analitzar i comparar els perfils microbians de malalts de CCR i individus control qualitativa i quantitativament. Determinar aquells bacteris més prevalents o abundants per a cada grup estudiat.
- Determinar quins factors com la localització del tumor, l'edat, el sexe, el tabaquisme i la diabetis poden jugar un rol important en la composició i abundància dels bacteris en malalts de CCR.

Capítol 3: Desenvolupament d'una eina molecular basada en la PCR-DGGE específica pel gènere *Streptococcus* per analitzar les poblacions naturals d'estreptococs en pacients amb càncer colorectal.

Streptococcus bovis va ésser el primer bacteri relacionat amb el càncer colorectal fa més de 30 anys però el poc interès que genera aquest gènere ignora la importància que poden tenir altres membres d'aquest gènere en el càncer colorectal. Donat que per a d'altres grups bacterians relacionats amb el CCR, com els clostridis, existeixen mètodes moleculars i s'han descrit la població d'aquest en malalts de CCR en mostres fecals, el principal objectiu d'aquest capítol va ser desenvolupar una eina per a la detecció de la població d'estreptococs en mostres clíniques i la seva

aplicació en mostres de mucosa intestinal de malalts de CCR, malaltia de Crohn (CD), colitis ulcerosa (UC) i individus controls. Per assolir aquest objectiu s'ha realitzat específicament:

- Dissenyar d'una PCR amb encebadors específics per al gènere *Streptococcus* i la seva aplicació per a combinar-la amb una electroforesi amb gel amb gradient desnaturalitzant en mostres clíniques.
- Descriure de la població d'estreptococs en mostres de mucosa intestinal en pacients amb CCR, CD, UC i individus control.
- Identificar seqüències específiques en malalts de CCR.
- Analitzar els perfils microbians moleculars per establir si existeix algun perfil característic per algun dels grups estudiats.
- Comparar les poblacions obtingudes mitjançant tècniques de cultiu i la nova eina dissenyada.

Capítol 4: Cas clínic: Diagnòstic de càncer colorectal en un pacient amb una infecció causada per *Enterococcus faecalis*.

Enterococcus faecalis és un bacteri gram positiu que habita de manera natural el tracte intestinal humà. Durant l'estudi de diversitat bacteriana en pacients amb CCR, es va observar que un pacient presentava una infecció per *E. faecalis*. Donat que aquest bacteri s'ha relacionat amb la carcinogènesi en diversos estudis, s'ha volgut presentar el cas clínic d'aquest pacient per tal d'explicar l'abundant presència d'aquest bacteri en un malalt de CCR diagnosticat en el mateix moment en què patia aquesta infecció.

MATERIALS I MÈTODES

1. Patients

Mucosal samples were obtained during colonoscopies of 103 consecutive CRC patients (60 men and 43 women; average age of 7.86 ± 12.21 years), 6 Polyposi patients (5 men and 1 woman; 67 ± 14.68 average age years) and 48 healthy controls (27 men and 21 women; average age of 66.24 ± 13.17 years). No racial or socio-economic differences were observed among the patients or controls. CRC samples were taken from the mucosa surrounding the tumour and/or from the tumours. Tumours were from the sigmoid colon, the rectum, the caecum, the ascending colon, the descending colon or the splenic angle. Polyposi patient's samples were taken from the polyp mass and from the mucosa surrounding the polyp. Polyps were located in the descendant colon, the caecum and the sigma. Healthy control samples were obtained from normal mucosa from the rectum. Individuals included in this study were >18 years old, did not have any other intestinal disease, were not pregnant and had not been subjected to any surgical resection. Antibiotic treatment within three months prior to the colonoscopy was the only exclusion criterion. Ethical committee from Hospital Dr. Josep Trueta (Girona, Spain) and Hospital Sta. Caterina (Salt, Spain) approved this research study. All patients gave written informed consent prior to colonoscopy.

2. Bowel preparation and sampling

Colon cleansing was ensured by the use of biphosphate-based (Fleet Phospho Soda) or polietilenglycol-based (MoviPrep, Norgine Laboratories, Spain) compounds following the company's instructions.

Biopsies were removed from the the colonic mucosa and from the tumours and polyps during colonoscopy, depending on the location of the tumour

and the polyp. Rectum biopsies were obtained from control subjects. The masses of the biopsies averaged 22.76 ± 10.77 mg. All samples were immediately placed in sterile tubes containing 1 ml of phosphate buffered saline and stored at -20°C until processing.

3. Sample treatment and DNA extraction

Biopsy samples were subjected to two mild ultrasound wash cycles of 1 min at 50 Hz followed by a wash with 1 ml of phosphate buffered saline to remove transient and loosely attached bacteria. The nucleic acids were extracted from the biopsies with the NucleoSpin® Tissue DNA extraction kit (Macherey-Nägel) following the manufacturer's instructions. DNA was stored at -20°C until use.

4. Eubacterial 16S rRNA gene amplification and DGGE

The bacterial 16S rRNA genes were partially amplified by PCR from the total nucleic acids extracted from biopsies using the universal bacterial primers GC-357F 5'-CCCTACGGGAGGCAGCAG-3' (341-357) [215], with a 50-base GC clamp region to facilitate DGGE analyses, and 907R 5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3' (907-926) [218]. The bacterial V3 to V5 variable regions were targeted and yielded a product of approximately 580 bp. The PCR samples were prepared in a total volume of 50 μl as follows: 5 μl of 10x buffer (II) (Applied Biosystems, Foster City, CA, US), 2 mM MgCl_2 (25 mM; Applied Biosystems), 200 μM of deoxyribonucleoside triphosphates (10 mM; Universal Master Mix, Applied Biosystems-Roche Molecular Systems Inc., Branchburg, Germany), 500 nM of each primer, 2 U of *AmpliTaqGold*TM (5 U/ μl , Applied Biosystems), 33.8 μl of distilled water and 2 μl of template DNA

(or water as a negative control). The DNA extracted from biopsy samples was used as template. The cycling conditions for the amplification of the 16S rRNA gene fragments were 95°C for 10 min (Taq activation) followed by 5 cycles of 94°C for 30 s, 56°C for 1 min and 72°C for 1 min, then 30 cycles of 94°C for 30 s., 54°C for 1 min, and 72°C for 1 min, with a final extension of 72°C for 5 min. All reactions were carried using the GeneAmp PCR System (model 9700 cycler, Applied Biosystems). PCR products were visualised by gel electrophoresis on 1.5% (wt/vol) agarose gels in 0.5x TBE buffer (45 mM Tris-borate, pH 8.0, 1 mM EDTA) with ethidium bromide staining (0.5 µg/ml).

DGGE was carried out with an Ingeni phorU DGGE system (Vlissingen, The Netherlands) at 60°C in 1x TAE buffer. Approximately 2 µg of DNA was loaded in each lane of a 6% polyacrylamide gel containing a vertical denaturing gradient ranging from 30 to 70% urea/formamide. Gels were electrophoresed for 16 hours at 120 V, stained for 40 min using 1x SYBR Gold (Molecular Probes, Paisley, UK), placed on a UV transilluminator and photographed. To standardise the relative positions of bands, a lane containing a mixture of five 16S rRNA gene fragments from known species and one containing known GC% positions were included in each gel.

5. Sequencing and analysis of individual DGGE bands

After analysing the gel images, individual bands were excised with a sterile scalpel and allowed to passively diffuse for 45 min at 65°C. They were vigorously vortexed every 5 min in sterile tubs with 50 µl of 10 mM Tris-HCl, pH 8.0. The supernatants were used as template DNA to generate PCR products of the band to be sequenced, as described above

except that the forward primer 357F without the GC clamp was used. PCR products were purified and sequenced in both directions (forward and reverse) by Macrogen Inc. (Seoul, Korea) with an ABI 3730CL Automatic DNA sequencer. Sequence alignment was performed with ClustalW software [219]. Consensus sequences were obtained and manually refined with the BioEdit software package [220]. A phylogenetic tree was constructed with Mega 4.1 software. The sequences were grouped using the farthest neighbour method at a precision level of 0.01 on a distance matrix with the Jukes-Cantor correction and 500 bootstrap replications. The sequences were analysed using BLAST® software [216] from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and Sequence Match software from the Ribosomal Database Project II [221]. Chimeric sequences were identified using the CHECK_CHIMERA program. Sequences were grouped by the number of operational taxonomic units or phylotypes with the Mothur program using the farthest neighbour method at a 0.01 precision level, i.e., 99% minimum similarity for any pair of sequences belonging to the same phylotype, on a distance matrix with the Jukes-Cantor correction calculated with the DNADIST program of the Phylip software package [222].

6. Streptococcal 16S rRNA gene amplification and DGGE

6.1 Primer design

16S rRNA gene sequences from all *Streptococcus* species available in GenBank were aligned using Clustal X 1.81 [219]. The following sequences were used: *S. acidominimus* (accession number X58301), *S. macacae* (X58302), *S. mutans* (X58303), *S. rattus* (X58304), *S. cricetus* (X58305), *S. downe* (X58306), *S. sobrinus* (X58307), *S. oralis* (X58308), *S.*

constellatus (X58310), *S. intermedius* (X58311), *S. pneumoniae* (X58312), *S. hyointestinalis* (X58313), *S. equi* (X58314), *S. porcinus* (X58315), *S. iniae* (X58316), *S. bovis* (X58317), *S. equinus* (X58318), *S. alactolyticus* (X58319), *S. salivarius* (X58320), *S. vestibularis* (X58321), *S. pyogenes* (AM295007), *S. sanguinis* SK36 (NC009009), *S. thermophilus* CNRZ1066 (NC006449), *S. parauberis* strain SAP 9 (AF284579), *S. vestibularis* strain ATCC 49124 (AY188353), *S. macacae* strain ATCC 35911 (AY188351), *S. sobrinus* strain ATCC 33478 (AY188349), *S. cristatus* strain ATCC 51100 (AY584476), *S. waiu* (AF088900) and *S. parasanguis* (AF003933). Consensus sequences differing from other phylogenetic groups were used to design candidate primers. Resulting oligonucleotides were then tested for specificity using BLAST [216]. short sequences mode.

PCR primer suitability was analyzed using NetPrimer® and Primer Express (version 2.0) software. Primers were synthesized by TIB MOLBIOL (Berlin, Germany). Primers used in this work were listed in table 14.

Table 14. Primers used and designed for streptococcal specificity.

Primer	Sequence (5'-3')	Target	Reference
27R	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Eubacteria	Wang[223]
357F	CCCTACGGGAGGCAGCAG	Eubacteria	Muyzer[224]
1492R	ACGGTTACCTTGTTACGACTT	Eubacteria	Hayashi[64]
623F	GTGGCGAAAGCGGCTCTCT	<i>Streptococcus</i> sp	this work
623R	AGAGAGCCGCTTTCGCCAC	<i>Streptococcus</i> sp	this work
1043F	CACTCTAGCGAGACTGCCG	<i>Streptococcus</i> sp	this work
1043R	CGGCAGTCTCGTAGAGTG	<i>Streptococcus</i> sp	this work

6.2 PCR conditions.

PCR was performed in a thermal cycler (GeneAmp PCR system 2700, Applied Biosystems) adding 1 µl of genomic DNA as a template to a 24µl

PCR mixture containing 1x buffer (II) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 2mM MgCl₂, 200µM deoxyribonucleoside triphosphates (Universal Master Mix, Applied Biosystems-Roche Molecular systems Inc., Branchburg, Germany), 500nM of each primer and 1U AmpliTaqGold™ (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA). The optimal annealing temperature was assayed for the different sets of primers using a gradient thermal cycler (Biometra T Gradient, Göttingen, Germany). For the chosen oligonucleotides (1043f and 1492r) the reaction was conducted as follows: 10minutes at 95°C followed by 30cycles of 30seconds at 94°C, 1minute at 67°C and 1minute at 72°C, with a final extension of 10minutes at 72°C. Amplification products were analyzed by gel electrophoresis through 1.5% agarose gels in 0.5xTBE buffer (45mM Tris-borate, pH 8.0, 1mM EDTA) followed by staining with ethidium bromide (0,5µg/ml).

The amplification limit of the primer set was assayed over a five-fold serial dilution of genomic DNA from *S. pneumoniae*. Non-template controls were performed to verify the absence of contamination. Furthermore, strict precautions to prevent carry-over of amplified DNA were used after the PCR was completed. The specificity of the primer set was analyzed using DNA from different bacteria. Differences in the detection between bacterial samples were evaluated using the Probit test (Minitab® 14 Statistical Software, Pennsylvania, US). All P values <0.05 were two tailed.

6.3 Microorganisms.

A total of 45 bacterial strains were use in this study (Table 15), including 16 *Streptococcus* species covering all major taxonomic groups to date plus 29 other bacterial species covering a wide phylogenetic range. The strains

were obtained from the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Germany), from the Spanish Cell Type Collection (Valencia, Spain) and from the microbiology laboratory of the University of Girona.

Table 15. Species used to design specific-*Streptococcus* set of primers.

Species	Strain	Species	Strain
<i>Arthrobacter</i> spp	UdG_001	<i>Serratia marcescens</i>	UdG_013
<i>Bacillus cereus</i>	UdG_002	<i>Shigella sonnei</i>	CECT457
<i>Bacillus megaterium</i>	UdG_003	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Bacillus subtilis</i>	UdG_004	<i>Proteus mirabilis</i>	UdG_170
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33291	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	UdG_011
<i>Citrobacter</i> spp	CECT401	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	UdG_014
<i>Enterobacter aerogenes</i>	CECT684	<i>Streptococcus agalactiae</i>	CECT183
<i>Enterococcus avium</i>	CECT968	<i>Streptococcus anginosus</i>	CECT948
<i>Enterococcus columbae</i>	CECT4798	<i>Str. bovis</i>	DMSZ20480
<i>Enterococcus durans</i>	CECT411	<i>Str. mutans</i>	CECT479
<i>Enterococcus faecalis</i>	DMSZ20478	<i>Str. pyogenes</i>	CECT598
<i>Enterococcus faecium</i>	CECT410	<i>Str. sanguinis</i>	CECT480
<i>Enterococcus munditii</i>	CECT972	<i>Str. equinus</i>	CECT213
<i>Enterococcus gallinarum</i>	CECT970	<i>Str. salivarius</i>	CECT805
<i>Erwinia sppilophylus</i>	UdG_005	<i>Str. oralis</i>	CECT907
<i>Erythrobacter</i> spp	UdG_006	<i>Str. suis</i>	CECT958
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536	<i>Str. thermophilus</i>	CECT986
<i>Lactobacillus</i> sp.	UdG_007	<i>Str. uberis</i>	CECT994
<i>Listeria innocua</i>	CECT5376	<i>Str. intermedius</i>	CECT803
<i>Methylophilus metylophilus</i>	UdG_008	<i>Str. pneumoniae</i>	CECT993
<i>Micrococcus luteus</i>	UdG_009	<i>Str. sobrinus</i>	CECT4034
<i>Mycobacterium avium</i>	UdG_010	<i>Str. equi sb equi</i>	CECT989
<i>Salmonella</i> LT2	UdG_LT2		

DMSZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. **CECT**, Colección Española de Cultivos Tipo. **UdG**: University of Girona collection.

Bacterial DNA samples were isolated and purified using the commercial DNA extraction kit, DNA genomic Wizard® (Promega, Madison, EUA),

according to the manufacturer's guidelines for Gram-positive bacteria. DNA was stored at -20°C until use.

6.4 DGGE.

A 50 GC clamp was added to the 5' end of the primer 1043f to further separate fragments with denaturing gradient gel electrophoresis [215]. DGGE was performed on an Ingeny phorU DGGE system (Vlissingen, the Netherlands). The 6% polyacrylamide gel contained a vertical denaturing gradient ranging from 40% to 70% urea/formamide. Approximately 2µg DNA was loaded in each lane. Electrophoresis was performed at 60°C in 1x TAE buffer at 120V for 16 hours. The gel was then stained with SYBR gold (Molecular Probes, Paisley, UK) for 30 minutes, placed on a UV transilluminator and photographed. To standardize the relative positions of bands, 2 lanes of each gel contained a mix of five 16S rRNA gene fragments from different known species.

6.5 Isolation of streptococci from colonic biopsies

Fresh biopsies were washed as described above. After, biopsies were homogenized with 500 µl PBS and plated in CNA agar plates (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) for 48h at 37°C in CO₂ enrichment anaerobiosis jar (with a candle). DNA was isolated by using the DNA purification Wizard® Kit (Promega, Madison, EUA) according to the manufacturer's guidelines for gram-positive bacteria. Streptococcal isolates were confirmed by detecting *Tuf* gene (Elongation factor Tuf) by PCR [184]. Clonality of the isolates was conducted with a RAPD-PCR described by Duarte et al [225]. Isolates were sequenced by using the 1043f primer described above by MacroGen Inc (Seoul, Korea) with an ABI 3730CL Automatic DNA sequencer.

7. Quantification of bacteria by Real Time PCR.

Quantification of bacterial 16S rRNA genes in mucosal, tumoral and polyp tissues was done using 7500 sequence detector (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primer sets used were listed in Table 16, using modified experimental protocols described previously [209, 211, 213, 226, 227].

Table 16. Primer sets used to quantify bacteria in CRC, PP and control subjects.

Bacterium	Primer	Sequence (5'-3')	Position	L (bp)	Tm (°C)	Reference
<i>Desulfovibrio</i> sp.	DesF	CCGTAGATATCTGGA GGAACATCAG	691	135	62	[226]
	DesR	ACATCTAGCATCCATC GTTTACAGC	826			
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>EfaeF</i>	GCTTTCGGGTGTCGCT GATG	199	253	58	[227]
	<i>EfaeR</i>	CGTCCTTGTTCTTCTCT AAC	452			
All eubacteria	<i>EubF</i>	ACTCCTACGGGAGGC AGCAGT	330	200	54	[228]
	<i>EubR</i>	GTATTACCGCGGCTGC TGGCAC	530			
<i>Escherichia coli</i>	<i>EcoF</i>	CATGCCGCGTGTATG AAGAA	395	95	60	[211]
	<i>EcoR</i>	CGGGTAACGTCAATG AGCAAA	470			
	<i>EcoProbe</i>	TATTAACCTTTACTCCCT TCCTCCCCGCTGAA	437			
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	<i>FpraF</i> <i>FpraR</i> <i>FpraProbe</i>	Lopez-Siles, M. Personal communication			60	

E. coli and *F. prausnitzii* were quantified using the TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). *E. coli* PCR conditions were slightly modified as follows: amplification reactions were carried out in a total volume of 20 μ L containing 1 μ Taqman Buffer A, 6 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 300 nM of each primer, 100 nM of probe, and 1 U of AmpliTaqGold (Applied Biosystems, Foster City, CA). Treatment of AmpliTaqGold with DNAase I was performed to avoid contamination with residual *E. coli* DNA. DNAase I was used at 5×10^{-2} U/ μ L and incubated at room temperature for 5 minutes, followed by a deactivation step carried out by heating at 99°C for 10 minutes. Samples were analyzed in triplicate and an additional tube with an inoculum of DNA of known concentration was added as internal standard in order to detect the possibility of reaction inhibition. Ct values were translated into colony forming units (CFU). *F. prausnitzii* primer set and probe were a personal communication. The amplification reactions were carried out in a total volume of 20 μ L. The standard reaction mixture consisted of: 1 \times TaqMan® Universal PCR Master Mix 2 \times (Applied Biosystems-Roche Molecular Systems, Inc, Branchburg, New Jersey, USA), 300 nM of each primer and 200 nM of each probe, 103 copies of IAC template and up to 50 ng of genomic DNA template. Each sample was analyzed in triplicate. In addition to the IAC, simultaneous positive and quantification controls were performed in all amplification experiments.

E. faecalis, *Desulfovibrio sp.* and Eubacteria qPCR were performed using SYBR Green 490 as the fluorophore (Applied Biosystems) in a total volume of 20 μ L. A range of concentrations from 10^0 to 10^8 of DNA standards were assayed simultaneously in duplicate to generate standard curves for quantization of target DNA in test samples. All samples were analyzed in duplicate. DNA melting curves were used to monitor product specificities. Analysis of PCR amplification and melting curves were

made using Sequence Detection Software v.1.2.3 (Applied Biosystems). *E. faecalis* conditions included one cycle at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 32 sec and primer annealing at 58°C for 32 sec. *Desulfovibrio sp.* conditions were: 95°C for 10 min, followed by 38 cycles at 95°C for 15 sec and primer annealing at 62°C for 1 min. Eubacteria PCR conditions included one cycle at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 sec and primer annealing at 60°C for 1 min. The melt curve analysis was run for 43 repeats, increasing concordantly by 1°C.

Sterile water was used as a negative control in all qPCR. Negative controls were included to ensure that the fluorescence signals observed were indicative of PCR amplification of template DNA, and not other constituents of the PCR assay mixture. To normalize the biopsy size, human cell quantification was performed using the control RTi- CKFT-18S kit (Eurogentec, Belgium).

8. GenBank Accession Numbers

Sequences obtained in this study were deposited in the EMBL/GenBank database under the accession numbers trough HQ662606 to HQ662632, trough GQ411109 to GQ411163, trough EU563979 to EU564004, trough HQ172002 to HQ172107 and trough JN086225 to JN086235.

9. Statistical Analysis

9.1 DGGE analysis

The DGGE gel pictures were normalized with the GelCompar II software package (Applied-Maths) using a bacterial mix standard. After normalizing the pictures, the fingerprints from the DGGE gels were

translated into a presence/absence binary band matrix. Statistical analysis was performed with SPSSx version 11.0. Clustering of band patterns from all samples was performed with a hierarchical analysis by the Ward [229] method based on the pattern difference coefficient.

In the study of diversity of eubacterial in CRC patients, the prevalence of each phylotype and the factors of tobacco use, alcohol consumption and diabetes were analyzed with contingency tables.

9.2 Interbacterial relationships

Interbacterial relationships of those bacteria that presence/absence frequencies were significant between CRC patients and control subjects were performed using logistic regression models.

9.3 qPCR

Data analysis was done using SPSS version 15.0. The copy numbers of the 16S rRNA gene per million human cells were transformed into logarithms, and the normally disrupted data was subjected to analysis. T-Student test was used for comparison of bacterial amounts between different subject groups. Probability values of <0.05 were taken as statistically significant.

RESULTATS

CHAPTER 1

Determination of specific bacterial abundance associated with Colorectal Cancer patients in comparison to healthy controls and clinical features relationships.

1.1 Introduction

Colorectal cancer could be a result of multiple factors such as genetics, environment, diet and lifestyle. All these can, to an extent, interact with the colonic microbiota and therefore modify the bacterial profile. However, it is difficult to state observed changes in bacterial composition in diseased colons that contribute in same way in the disease onset or are an epiphenomenon, derived from the diseased-induced changes in the mucosal ecosystem. Commensal bacteria resident in the mucosa differ from those found on the luminal lining and the fecal compartment [230]. This microbiota would be able to interact with intestinal epithelial cells and contribute to the etiology of CRC.

The impact of the colonic microbiota on human gut physiology and health is strongly affected by a number of microbial activities [231], such as fermentation of dietary compounds [88, 232, 233], degradation of intestinal mucus [96] or bile salt transformation [234, 235]. Hydrogen sulfide (H₂S) is the toxic gas produced from sulfate during anaerobic respiration by sulfate-reducing bacteria (SRB), which are normal commensal members of the lower gastrointestinal tract. Hydrogen sulfide has the potential to damage DNA [142] leading epithelial cell damage and death and mucosal inflammation [236, 237]. Extracellular superoxide produced by non-enzymatic reduction of oxygen is generated by *E. faecalis*, the most common *Enterococcus* specie found as a normal inhabitant of the gastrointestinal tract. This metabolite can cause DNA damage through chromosomal instability, which can lead to carcinogenesis. *Faecalibacterium prausnitzii*, one of the major butyrate-producing bacteria in the intestine, fermentate undigested dietary carbohydrates generating butyrate, a short chain fatty acid, which may protect against oncogenesis as it enhances apoptosis of genetically damaged cells, inhibits

cell proliferation and promotes differentiation in CRC cells in vitro [108, 110, 238-240]. In addition, the effect of *E. coli* phylogenetic group B2 harbor a genomic island called “pks” that codes for the production of a polyketide-peptide genotoxin, Colibactin which leads into DNA damage [241].

1.2 Patients data

Mucosal biopsy samples were obtained during colonoscopy from 77 consecutive CRC patients (49 men and 28 women; 70.5±10.9 average age years), and from 45 control subjects (23 men and 22 woman; 59.1±14.56 average age years). The characteristics of the patients are shown in Table 17.

Table 17. Clinical features from patients included in chapter 1.

Group	N	Age (y)	Gender, % F/M	Tumour localization	Tumor Stage	Diabetis	Smoking (no smokers,smokers, ex-smokers)
CRC	77	70.5 ±10.9	63.6/36.3	25 R, 18 Sa, 6 R- S, 8 SA, 4 C, 4 AC, 10 DC	2 S 0, 15 S I, 19 S II, 11 S III, 15 S IV	15	8 smokers, 11 exsmokers, 26 non smokers
C	45	59.1 ±14.56	51.1/48.8	-	-	5	8 smokers/1 exsmoker/36 non smokers

CRC, colorectal cancer; C, control; R, rectum; S, sigma; C, caecum; R-S, rectum-sigma; SA, splenic angle; AC, ascendant colon; DC, descendant colon; S, tumour stage.

Consecutive CRC and control subjects were included. CRC patients were 11 years older than those with normal colonoscopy (p=0.000) and the ratio between male and female was higher in CRC patients (p=0.046) than in the control group. Diabetes or tobacco use were not different among both groups.

1.3 Quantification of bacteria in Colorectal Cancer Patients and Control Subjects

Bacteria from colonic tissue samples were quantified by real-time PCR. All bacteria were quantified and the counts were converted to the log number of 16S rRNA genes per milligram of mucosal tissue. The numbers of specific bacteria measured by real-time PCR are shown in Figure 19.

Levels of *E. coli* were significantly higher in CRC patients than in control subjects ($p=0.000$), whereas *F. prausnitzii* was more abundant in control subjects ($p=0.000$). *E. faecalis* and *Desulfovibrio sp.* did not differ in the normal and cancer groups. Numbers of Eubacteria was also found to be higher in CRC patients ($p=0.016$) (Table 26).

Focusing on CRC samples, tumor stage was split in two main groups: group 1: stages 0, I and II and group 2: stages III and IV according to tumor development. Quantitation by real time PCR (Table 18) revealed that *E. coli* was more abundant in the first stages ($p=0.010$) of the tumor development. In contrast, *F. prausnitzii*, *E. faecalis* and *Desulfovibrio sp.* were not found to be statistically significant between the different stages of carcinogenesis remaining stable along tumor development.

Table 18. Media quantitation of specific bacterium and all Eubacteria (Log_{10} CFU Equivalent/ 10^6 human cells) and significance level expressed as * (P values <0.05).

Species	State			Tumor stage		
	Cancer	Healthy	P value	Group 1	Group 2	P value
<i>E. coli</i>	4.04 ± 1.33	3.20 ± 1.35	0.000*	4.54±1.29	3.73±1.36	0.010*
<i>F. prausnitzii</i>	4.17 ± 1.16	5.11 ± 1.15	0.000*	4.18±0.92	3.79±1.29	0.149
<i>E. faecalis</i>	2.40 ± 1.87	2.78 ± 1.31	0.103	2.37±1.50	2.86±2.96	0.401
<i>Desulfovibrio sp.</i>	3.22 ± 1.38	3.21 ± 1.29	0.980	3.38±1.16	3.00±1.65	0.271
Eubacteria	7.12 ± 0.77	6.70 ± 0.97	0.016*	7.34±0.67	6.99±0.95	0.080

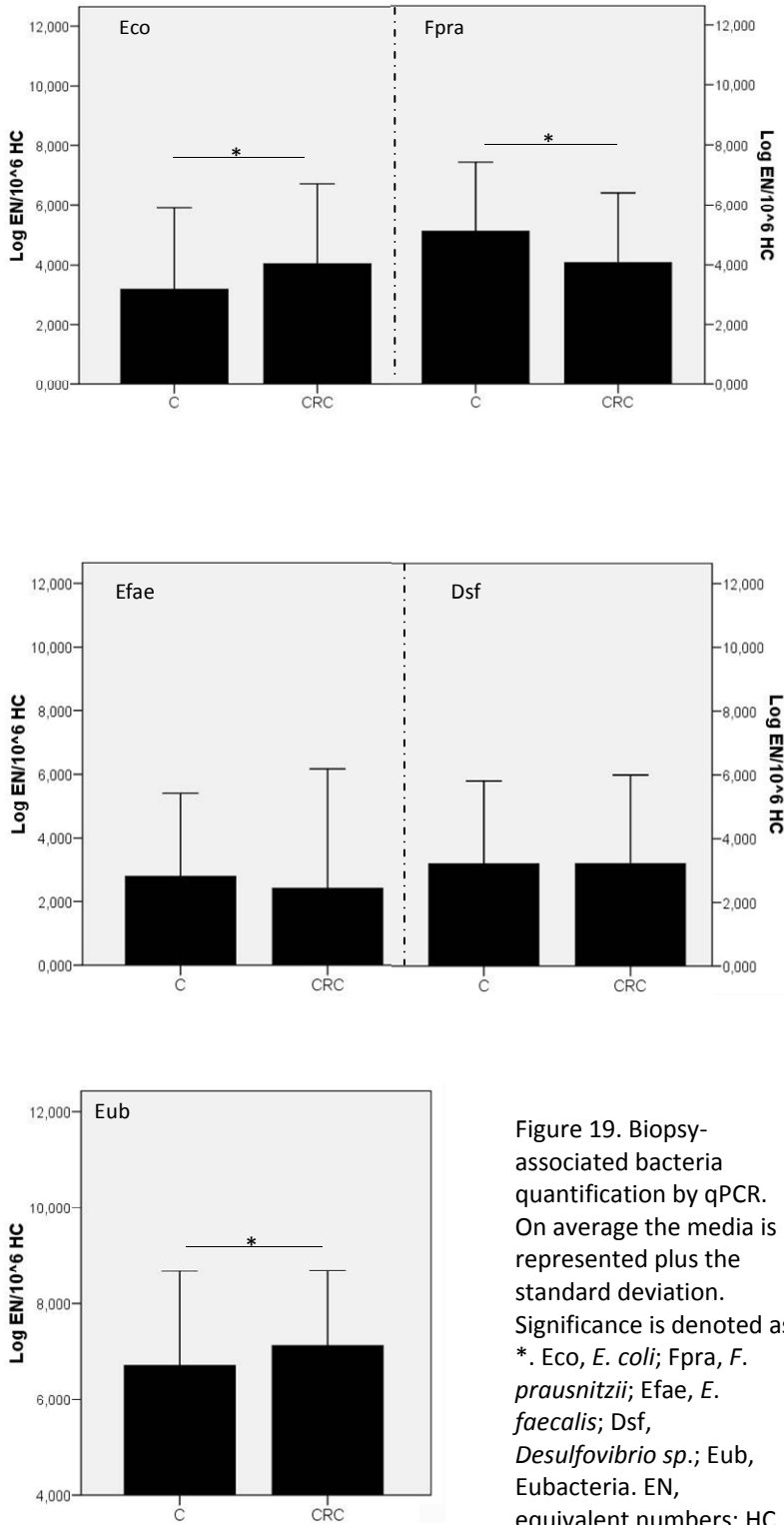


Figure 19. Biopsy-associated bacteria quantification by qPCR. On average the media is represented plus the standard deviation. Significance is denoted as *. Eco, *E. coli*; Fpra, *F. prausnitzii*; Efae, *E. faecalis*; Dsf, *Desulfovibrio sp.*; Eub, Eubacteria. EN, equivalent numbers; HC, human cells.

1.4 Patients features

Patient's features as gender (male or female) and sample location (proximal colon and distal colon) were analysed to find out differences or not of bacterial abundance (Table 19). Gender comparison resulted in no significant ($p>0.05$) differences between male and female when quantitation of the specific bacteria and Eubacteria were compared. Biopsy location comparison did not show differences in the numbers of these organisms along the colon and rectum ($p>0.05$).

Table 19. Abundance expressed as the media and significance (P value, significant is denoted as *) of different species and Eubacteria (Log_{10} CFU Equivalent/ 10^6 human cells) against subject features.

Species	Gender			Location		
	Male	Female	P value	Proximal colon	Distal colon	P value
<i>E. coli</i>	3.61±1.31	3.98±1.35	0.082	3.97±1.39	3.66±1.35	0.259
<i>F. prausnitzii</i>	4.43±1.21	4.53±1.32	0.646	4.57±1.40	4.42±1.20	0.551
<i>E. faecalis</i>	2.90±1.66	2.42±1.60	0.185	2.67±1.57	2.73±2.33	0.855
<i>Desulfovibrio sp.</i>	3.31±1.17	3.04±1.49	0.249	3.13±0.99	3.24±1.38	0.611
Eubacteria	6.87±0.86	7.00±0.90	0.386	7.02±0.67	6.88±0.93	0.349

Smoking and diabetes are considered risk factors for colorectal cancer development. It was analysed the impact of these factors on bacterial abundance (Table 20). Levels of *E. faecalis* and *Desulfovibrio sp.* were not significant between smokers (smokers plus ex smokers) and non smokers groups. In contrast, a higher quantity of *E. coli* was observed in non smokers ($p=0.002$), and *F. prausnitzii* was also more abundant in non smokers than in smoker subjects ($p=0.009$). Finally counts of Eubacteria resulted higher in non smokers than in smokers ($p=0.005$).

Table 20. Abundance expressed as the media and significance (P value, significant is denoted as *) of different species and Eubacteria (Log_{10} CFU Equivalent/ 10^6 human cells) against risk factors.

Species	Smoking			Diabetes		
	Yes	No	P value	Yes	No	P value
<i>E. coli</i>	3.02±1.38	3.91±1.32	0.002*	4.18±1.30	3.63±1.38	0.070
<i>F. prausnitzii</i>	3.99±1.01	4.57±1.26	0.009*	4.16±1.21	4.50±1.22	0.213
<i>E. faecalis</i>	2.89±1.31	2.67±1.68	0.631	2.36±1.14	2.78±1.65	0.431
<i>Desulfovibrio sp.</i>	2.94±1.08	3.27±1.13	0.159	3.36±1.44	3.16±1.31	0.531
Eubacteria	6.47±0.98	7.04±0.82	0.005*	6.87±0.44	7.12±0.93	0.067

Quantification by real time PCR was performed for specific bacterium and all Eubacteria, and the media was calculated to perform statistical analysis. In order to normalize bacterial counts with respect to the total bacterial counts, the relative concentration of the bacterial species studied was calculated with respect to Eubacteria. Significant differences were observed among CRC and C groups. The mean *E. coli*/Eubacteria (ECO/EUB) ratio was higher in CRC than in control samples ($p=0.020$). Contrarily, *F. prausnitzii*/Eubacteria (FPR/EUB) and *E. faecalis*/Eubacteria (EFA/EUB) values were higher in control samples than in CRC samples ($p=0.000$ and $p=0.027$, respectively). However, *Desulfovibrio sp.*/Eubacteria (DSV/EUB) did not show any differences among both sample groups ($p=0.287$) (Table 21).

Table 21. Relative abundance of specific bacteria per Eubacteria. Significance (P value) is denoted as *. Eub, Eubacteria.

Ratio	CRC	C	P value
<i>ECO/EUB</i>	0.56	0.47	0.020*
<i>FPR/EUB</i>	0.57	0.78	0.000*
<i>EFA/EUB</i>	0.34	0.49	0.027*
<i>DSV/EUB</i>	0.44	0.47	0.287

Tumor stage present different numbers of ECO/EUB ($p=0.014$), which was found to be lower in stages III and IV. The other relative abundance ratios were not significant, and bacterial ratios also did not show different results.

When ratios between specific bacteria were calculated (Table 22), it was found that ECO/FPR was significantly higher in CRC patients than in C subjects ($p=0.000$) and also the ratio ECO/EFA was greater in CRC group ($p=0.000$). In contrast, the ratio *F. prausnitzii/Desulfovibrio sp.* was higher in C group than in the CRC group ($p=0.015$). Other ratios analysed as *F. prausnitzii/E. faecalis*, *E. coli/Desulfovibrio sp.* And *E. faecalis/Desulfovibrio sp.* did not significant differences between both groups.

Table 22. Abundance ratios between specific bacteria. Significance (P value) is denoted as *.

Ratio	CRC	C	P value
<i>E. coli/F. prausnitzii</i>	1.08	0.64	0.000*
<i>E. coli/E. faecalis</i>	1.62	0.97	0.000*
<i>E. coli/Desulfovibrio sp.</i>	1.32	1.18	0.502
<i>F. prausnitzii/E. faecalis</i>	1.65	1.54	0.528
<i>F. prausnitzii/Desulfovibrio sp.</i>	1.32	1.82	0.015*
<i>E. faecalis/Desulfovibrio sp.</i>	0.85	1.26	0.16

General features were analysed to identify ratios that could be significantly different (Table 23). Gender type did not present differences among relative abundance of specific bacterium or bacterial ratios. Sample location did not show differences among ratios, except for *F. prausnitzii/E. faecalis*, which was higher in the proximal colon than in the distal colon ($p=0.03$). Risk factors as tobacco consumption and diabetes

did not affect on those ratios, except for the ECO/EUB, and FPR/EUB which were higher in non smokers ($p=0.001$) and in non diabetic subjects ($p=0.050$), respectively.

Table 23. Relative abundance ratios and ratios between specific bacteria. Significance (P value <0.05) is denoted as *.

Ratio	Sex			Location		
	Male	Female	P value	Proximal colon	Distal colon	P value
<i>E. coli</i> /Eub	0.52	0.56	0.163	0.56	0.52	0.320
<i>F. prausnitzii</i> /Eub	0.65	0.65	0.964	0.65	0.65	0.932
<i>E. faecalis</i> /Eub	0.42	0.34	0.116	0.37	0.40	0.643
<i>Desulfovibrio sp.</i> /Eub	0.48	0.42	0.104	0.44	0.46	0.585
<i>E. coli</i> / <i>F. prausnitzii</i>	0.91	0.94	0.761	1.06	0.88	0.305
<i>E. coli</i> / <i>E. faecalis</i>	1.41	1.45	0.842	1.85	1.3	0.051
<i>E. coli</i> / <i>Desulfovibrio sp.</i>	1.23	1.42	0.314	1.36	1.28	0.598
<i>F. prausnitzii</i> / <i>E. faecalis</i>	1.71	1.61	0.623	2.1	1.55	0.03*
<i>F. prausnitzii</i> / <i>Desulfovibrio sp.</i>	1.54	1.62	0.67	1.55	1.57	0.888
<i>E. faecalis</i> / <i>Desulfovibrio sp.</i>	1.02	0.98	0.871	0.94	1.02	0.64

CHAPTER 2

Diversity and composition of bacterial community in Colorectal Cancer patients. Differences among tumoral and mucosal tissues and search of relevant bacteria.

2.1 Introduction

The participation of microbiota in carcinogenesis has been postulated by several authors [25, 140, 147, 150, 160] perhaps the implication of them in the onset of CRC is still not clear [88, 101, 242]. Bacterial dysbiosis has been linked to mucosal inflammation in Inflammatory Bowel Diseases (IBD) [79, 92, 130, 243], and there is increasing evidence that colon cancer risk is influenced by interactions between the diet and microbiota [85, 88][244-246]. Participation of bacteria such as *Desulfovibrio sp.*, *Enterococcus faecalis* [151, 157] or the *Clostridium* group [150] is suggested in some way in the tumor development. Bacterial composition can be altered by environmental factors like diet, age or antibiotic treatment [61, 83, 85, 101, 105]. Recent studies associated mucosal-adherent microbiota with adenomas [152]. The association between microbiota and CRC has been studied by using fecal samples [63, 157], rectum-mucosal biopsy samples [152] and colonic mucosa biopsies [153], but only one study had been performed by using tumor biopsy samples [154].

2.2 Fingerprinting and abundance of colonic mucosal microbiota from patients of Colorectal Cancer and Polyposis.

2.2.1 Patients data

Clinical data and features of 15 Colorectal cancer patients (CRC), 8 Polyposis patients (PP) and 19 control subjects (C) were included in this experimental assay (Table 24).

Table 24. Clinical data of patients included in chapter 2.

Group	n	Age	Gender, % F/M	Tumour localization	Main characteristics
CRC	15	73±10.2	13.3/86.6	6 R, 4 S, 1 C, 1 AS, 2 DS, 1 SA	Anemia, alteration in deposition
PP	8	63±16.01	25/75	3 DC, 2 C, 2 S, 1 R	Anemia, familiar screening
C	19	55.5±14.3	42.1/57.9	15 R, 3 S, 1 SA	Abdominal pain, diarrhees

CRC, colorectal cancer; PP, polyposis patients; C, control; R, rectum; S, sigma; SA, splenic angle; AC, ascendant colon; DC, descendant colon; S, tumour stage

2.2.2 Sequence analysis and bacterial composition

Twenty-seven differential partial 16S rRNA gene sequences from CRC patients were obtained by PCR-DGGE (Table 25). In PP patients bands did not show any differences from normal mucosal and polyp tissue. Sequences were grouped into 23 phylotypes, 7 of which were novel ($\leq 95\%$ similarity with any GenBank or RDP sequence). The phylotypes belonged to Bacteroidetes (29.6%), Firmicutes (26%), Fusobacteria (26%) and Actinobacteria (3.7%). However, 14.8% of the phylotypes could not be assigned to any known phylogenetic group. Up to 50% of the sequences retrieved from the human GI tract or human faeces, and 8 phylotypes share higher identity to uncultured bacteria.

The main phylotypes identified were *Fusobacterium sp.*, *Prevotella sp.*, *Ruminococcus sp.*, *Bacteroides vulgatus*, *Actinomyces sp.*, *Alistipes onderdonkii* and *Leptotrichia sp.* and were found either in normal mucosal biopsies or in tumor biopsies ($p > 0.05$).

Table 25. Description of the different phlotypes found from the total of DGGE bands identified.

Id pacient	Accession number GenBank	Max id (%)	Nearest sequence	Description	Source
CRC103a.1	HQ662621	91 [†]	HM302755	Uncultured bacterium clone ncd810d11c1	Skin
CRC108a.14	HQ662613	92 [†]	FJ371730.1	Uncultured bacterium clone TS8_a01e11	Fecal sample
CRC112a.16	HQ662620	92 [†]	FJ984622.1	<i>Fusobacterium necrophorum</i> strain 2008-10-864	Tundra reindeer
CRC113a.19	HQ662631	93 [†]	GQ358359.1	Uncultured <i>Prevotellaceae</i> bacterium clone SGYA625	Foregut
CRC104a.5	HQ662623	95 [†]	AB547667.1	<i>Porphyromonas somerae</i>	Strain JCM 13867
CRC108a.15	HQ662626	95 [†]	EU009776.1	Uncultured bacterium clone DTB_G40	Turkey cecum
CRC113a.17	HQ662632	95 [†]	HM007586.1	<i>Bacteroides ureolyticus</i> strain DSM 20703	Strain DSM 20703
CRC104a.8	HQ662627	96	AB547706.1	<i>Prevotella timonensis</i>	Type strain
CRC104a.7	HQ662610	97	AJ270470	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> L2-6	Type strain
CRC116a.28	HQ662628	97	AM277971.2	Uncultured bacterium clone AP13S.117	Fecal sample
CRC103a.3	HQ662609	98	EF402992.1	Uncultured bacterium clone SJTU_B_15_29	Fecal sample
CRC114c.24	HQ662622	98	GU470888.1	<i>Actinomyces cardiffensis</i> strain F0333	Oral microbiome
CRC116a.26	HQ662612	98	HM479948.1	Uncultured organism clone UUAV8CA111	Fecal sample
CRC116c.33	HQ662619	98	GU905830.1	Uncultured <i>Fusobacterium sp.</i> clone PigA_H12	Tonsil
CRC104a.6	HQ662625	99	AB554231.1	<i>Alistipes onderdonkii</i>	Strain JCM 16771
CRC107a.11	HQ662624	99	AB510712.1	<i>Bacteroides vulgatus</i>	Strain JCM 5826
CRC116a.25	HQ662611	99	HQ018634.1	Uncultured <i>Faecalibacterium sp.</i> clone 2 (38)	Fecal sample

CRC116a.29	HQ662606	99	HQ018610.1	Uncultured <i>Ruminococcus</i> sp. clone 3 (35)	Fecal sample
CRC116a.31	HQ662629	99	EU728713.1	<i>Prevotella</i> sp. DJF_B116	Intestine
Id patient	Accession number GenBank	Max id (%)	Nearest sequence	Description	Source
CRC116c.36	HQ662618	99	GU905842.1	Uncultured <i>Fusobacterium</i> sp. clone PigB_E09	Tonsil
CRC120a.44	HQ662607	99	HQ018610.1	Uncultured <i>Ruminococcus</i> sp. clone 3 (35)	Fecal sample
CRC103a.2	HQ662608	100	HM302893.1	Uncultured bacterium clone ncd812g01c1	Skin, popliteal fossa
CRC116a.32	HQ662630	100	DQ905268.1	Uncultured bacterium clone 013-g9	Fecal sample
CRC116c.34	HQ662614	100	AB525413.1	<i>Fusobacterium necrophorum</i> subsp. <i>funduliforme</i>	Strain JCM 3724
CRC116c.35	HQ662616	100	AB525413.1	<i>Fusobacterium necrophorum</i> subsp. <i>funduliforme</i>	Strain JCM 3724
CRC116c.37	HQ662617	100	AB525413.1	<i>Fusobacterium necrophorum</i> subsp. <i>funduliforme</i>	Strain JCM 3724
CRC119c.43	HQ662615	100	AB525413.1	<i>Fusobacterium necrophorum</i> subsp. <i>funduliforme</i>	Strain JCM 3724

Table 25, continued.

2.2.3 DGGE fingerprints of CRC and PP patients

The banding patterns observed with DGGE represent the major constituents of the analyzed environments [247]. Only species that constitute 1% or more of the total population are readily detected by this molecular approach [215]. Bacterial DGGE fingerprints (Figure 20) were characterized by the presence of up to 10 main bands.

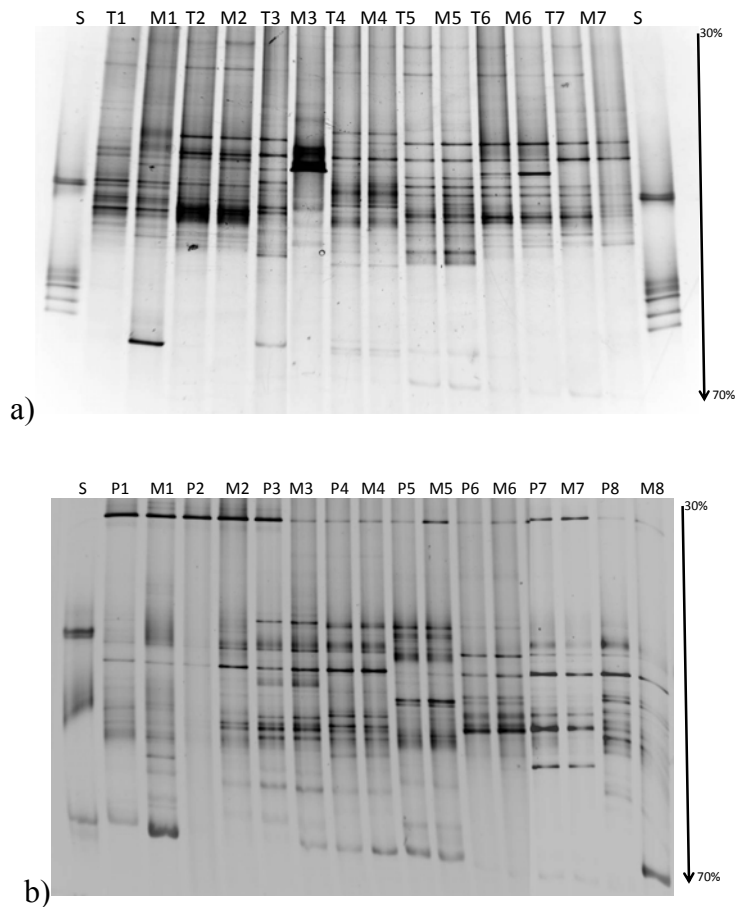


Figure 20. PCR-DGGE bacterial fingerprints from colonic mucosal samples: a) CRC patients. T, tumour tissue; M, mucosa tissue and b) Polyposi patients. P, polyp tissue; M, mucosa tissue; S, standard used to know the relative positions of the bands for further comparison. Each band corresponded to a specific phylotype or bacterial specie. Vertical denaturing gradient gel ranged from 30 to 70% urea/formamide.

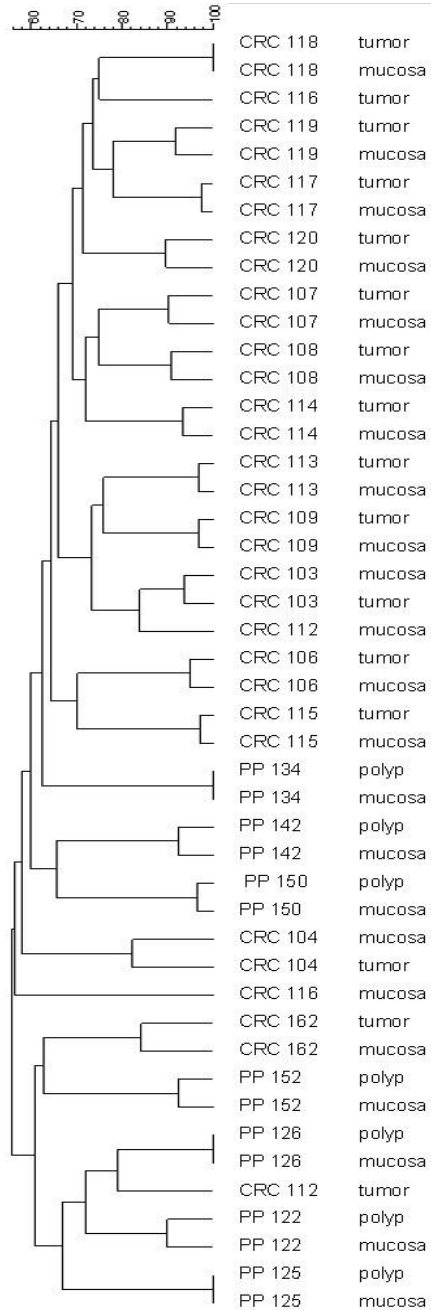


Figure 21. Cluster analysis of DGGE profiles according to the band pattern similarity. Hierarchical distance clustering of biopsy DGGE profiles. Scale bar describes DGGE similarity between profiles. CRC, colorectal cancer patients; PP, polyposi patients. Type of sample is described as mucosa, polyp or tumor.

Intra individual variation was generally low, regardless of the sample origin as shown in cluster analysis (Figure 21). CRC and PP samples were grouped by patients and not by the localization where the sample came from. Only one patient, patient (CRC 116, samples T3 and M3 from figure 19.a), presented different fingerprints. Tumor localization, age and gender were not a grouping factor for the samples.

2.2.4 Bacterial DNA quantification

Bacterial quantification was performed to appreciate the abundance of specific bacteria in mucosal colonic biopsies. These bacteria were selected according to a literature review. The selected species were: *E. coli*, *F. prausnitzii*, *E. faecalis* and *Desulfovibrio sp.* Total amount of Eubacteria was also quantified.

Bacteria from colonic tissue samples were quantified by real-time PCR. To obtain normally distribution data counts were converted to the log number of 16S rRNA genes per million human cells. The overall numbers of individual bacteria measured by real-time PCR are shown in Table 26. qPCR is a highly sensitive assay which detects very low numbers in samples analyzed. However, *E. faecalis* was not detected in four samples. The average of each subject group was calculated to assess whether reduction of certain bacterium or shifts in abundance were occurring.

Table 26. Quantification of bacteria in colonic biopsy samples (Log₁₀ EN/10⁶ human cells) and comparison between groups. Significance value is denoted as * (P<0.05).

Bacteria	CRC	PP	C	Pvalue CRC/C	Pvalue CRC/PP	Pvalue PP/C
<i>E. coli</i>	4.59±1.30	3.34±0.99	3.56±1.35	0.012*	0.002*	0.589
<i>F.prausnitzii</i>	4.31±0.93	4.88±1.08	6.01±0.83	0.000*	0.067	0.001*
<i>E. faecalis</i>	1.95±1.17	2.47±0.79	3.92±1.04	0.000*	0.13	0.005*
<i>Desulfovibrio sp.</i>	3.59±1.04	3.01±1.04	3.66±1.23	0.894	0.079	0.109
Eubactea	7.37±0.52	6.27±0.72	6.42±1.26	0.001*	0.000*	0.686

The numbers of *E. coli* were significantly different between CRC subjects and PP patients and the control subjects ($p=0.012$ and $p=0.002$ respectively). The same happened for *E. faecalis* ($p=0.000$ and $p=0.005$ respectively). In contrast, *F. prausnitzii* were more abundant in control subjects than diseased patients $p=0.000$ and $p=0.001$ respectively. In addition, the total amount of Eubacteria were higher in CRC patients ($p=0.001$ compared to C subjects and $p=0.000$ compared to PP patients). Finally, no differences were found in *Desulfovibrio sp.*

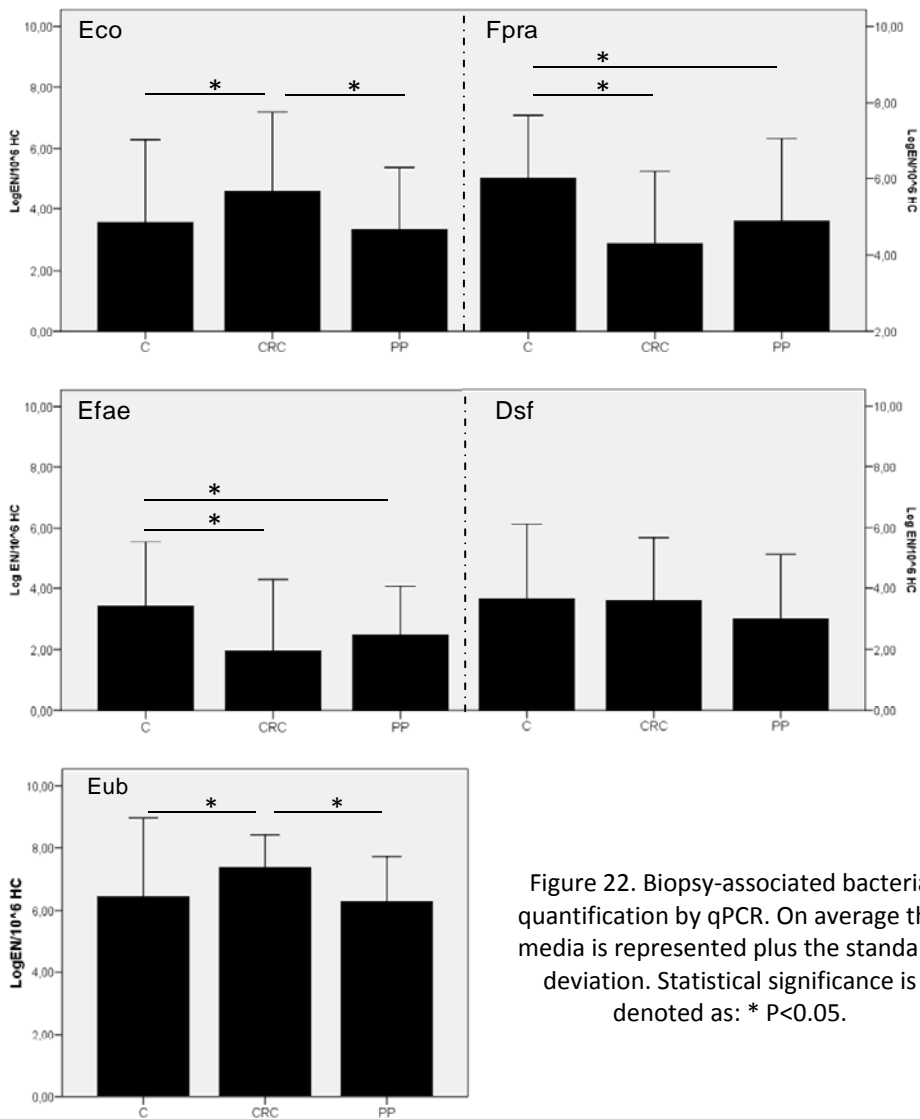


Figure 22. Biopsy-associated bacteria quantification by qPCR. On average the media is represented plus the standard deviation. Statistical significance is denoted as: * $P<0.05$.

When samples were split according to the biopsy type (Table 27), it was found that *E. faecalis* was more abundant in the tumor biopsies than in the mucosa ($p=0.014$), but in contrast, it was more abundant in the mucosa of PP patients than in the polyp mass ($p=0.013$). The quantity of Eubacteria was also higher in tumor than in mucosa biopsies ($p=0.011$).

Table 27. Quantification mean and standard deviation of bacteria in colonic biopsy samples (Log₁₀ CFU Equivalent/10⁶ human cells). Significance value * ($p<0.05$) was used to compare different tissues.

Bacteria	CRC samples			PP samples		
		Mean±SD	P		Mean±SD	P
LogEco	mucosaCRC	4,37±1,13	0.358	mucosa PP	3,48±1.23	0.559
	tumor	4,82±1,47		polyp	3,21±0.77	
LogFpra	mucosaCRC	4,10±0,75	0.219	mucosa PP	4,74±1.15	0.613
	tumor	4,52±1,08		polyp	5,03±1.07	
LogEfae	mucosaCRC	1,43±0,9	0.014*	mucosa PP	2,94±0.51	0.013*
	tumor	2,49±1.21		polyp	2,00±0.77	
LogDsf	mucosaCRC	3,32±0.88	0.149	mucosa PP	3,06±0.75	0.891
	tumor	3,87±1.15		polyp	2,98±1.33	
LogEub	mucosaCRC	7,14±0.41	0.011*	mucosa PP	6,15±0.63	0.508
	tumor	7,61±0.53		polyp	6,40±0.82	

The comparison of the different mucosal tissues (Table 28) revealed that *E. coli* and *Desulfovibrio sp.* had similar abundance in the mucosal tissue of CRC, PP and C subjects. However, *F. prausnitzii* was more abundant in C subjects than in CRC and PP patients ($p=0.000$ and $p=0.004$ respectively). PP patients and C subjects had more *E. faecalis* in the mucosa than CRC patients ($p=0.000$ in both cases), but the total of Eubacteria was higher in CRC mucosa samples than in PP and C subjects ($p=0.000$ and $p=0.044$ respectively)(Figure 23).

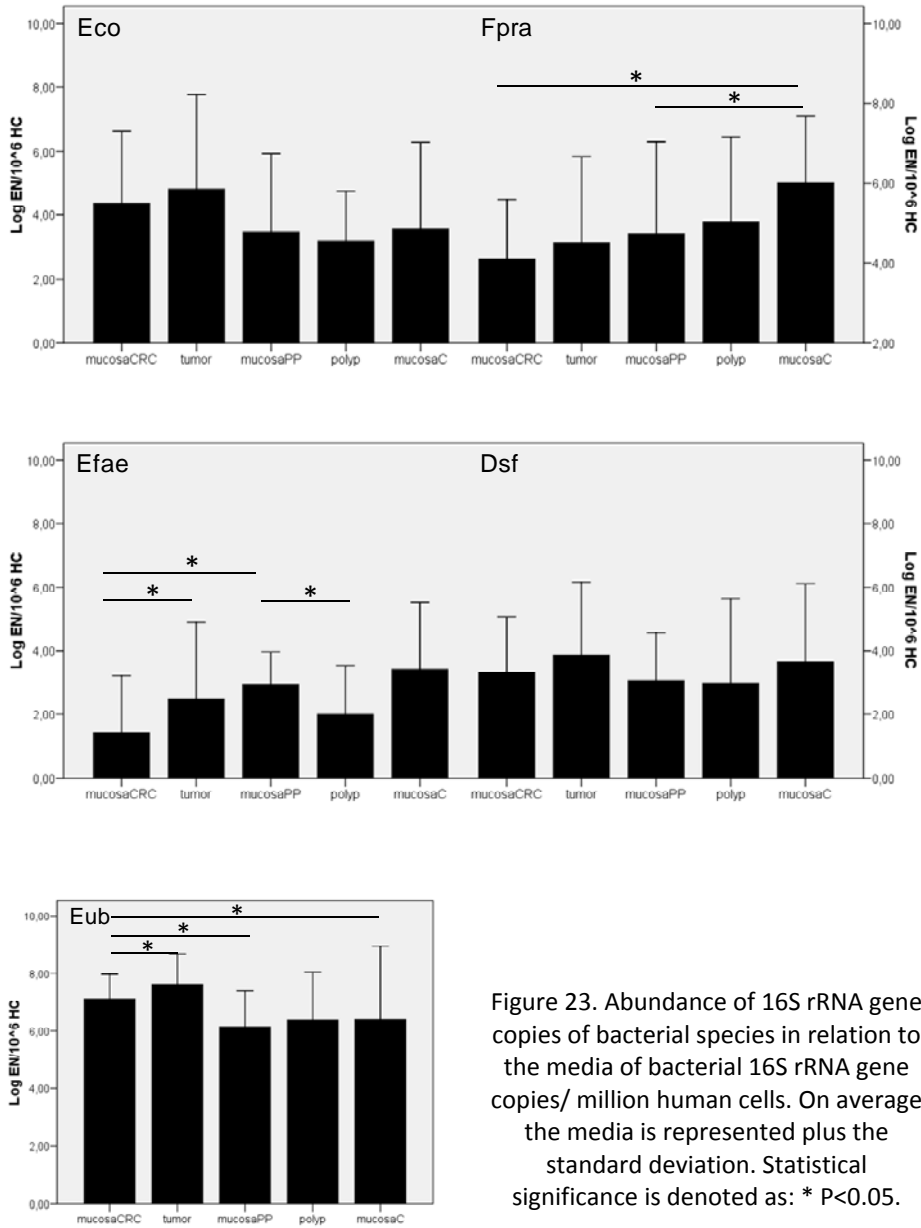


Figure 23. Abundance of 16S rRNA gene copies of bacterial species in relation to the media of bacterial 16S rRNA gene copies/ million human cells. On average the media is represented plus the standard deviation. Statistical significance is denoted as: * P<0.05.

Table 28. Mean quantity and standard deviation of bacteria in mucosal samples (Log₁₀ CFU Equivalent/10⁶ human cells). Significance value * (p<0.05).

Bacteria	Mucosa samples from CRC and C			Mucosa samples from PP and C			Mucosa samples from CRC and PP		
		Mean	P		Mean	P		Mean	P
LogEco	M_C	3,57±1.36	0.076	M_C	3,57±1.36	0.879	M_CRC	4,37±1.13	0.097
	M_CRC	4,37±1.13		M_PP	3,48±1.23		M_PP	3,48±1.23	
LogFpra	M_C	6,01±0.84	0.000*	M_C	6,01±0.84	0.004*	M_CRC	4,1±0.75	0.119
	M_CRC	4,1±0.75		M_PP	4,74±1.15		M_PP	4,74±1.15	
LogEfae	M_C	3,43±1.05	0.000*	M_C	3,43±1.05	0.220	M_CRC	1,43±0.9	0.000*
	M_CRC	1,43±0.9		M_PP	2,94±0.51		M_PP	2,94±0.51	
LogDsf	M_C	3,66±1.23	0.374	M_C	3,66±1.23	0.212	M_CRC	3,320.88	0.478
	M_CRC	3,32±0.88		M_PP	3,06±0.75		M_PP	3,06±0.75	
LogEub	M_C	6,43±1.27	0.044*	M_C	6,43±1.27	0.573	M_CRC	7,14±0.41	0.000*
	M_CRC	7,14±0.41		M_PP	6,15±0.63		M_PP	6,15±0.63	

2.3 Diversity of Eubacteria in the colonic mucosa of Colorectal Cancer patients, and comparison with healthy control subjects.

The load of microbiota can be analysed quantitatively or qualitatively. It was previously shown the abundance of bacteria in tumoral and mucosal biopsies. Fingerprinting of these tissues resulted highly similar, and colonic mucosal biopsies surrounding the tumor area were used to study the diversity of microbiota in CRC patients in comparison to healthy controls. In addition, to figure out prevalent bacteria in CRC patients and the impact of risk factors (tobacco use and diabetes) were analysed.

2.3.1 Patients data

Clinical data from CRC patients and C subjects are listed in table 29.

Table 29. Sampling size and main characteristics of patients and healthy control subjects analyzed.

Group	N	Age	Gender, % F/M	Tumour localization	Diabetis	Smoking (No, yes, ex)	Main characteristics
C	19	64.1 ±10.4	45/55	-	3	16/0/3	Diahrrea, anemia, familiar screening
CRC	41	69.8 ±10.1	44/56	20 S, 10 R, 3 C, 1 AS, 1 DS	8	26/3/12	consecutive patients diagnosed

C, control; CRC, colorectal cancer; S, sigma; R, rectum; C, caecum; AS, ascending colon; DS, descending colon.

2.3.2 DGGE fingerprint

The banding pattern (Figure 24) observed by DGGE represents the major constituents of the analyzed community [247].

After hierarchical analysis based on a presence/absence binary band matrix, samples fingerprints were grouped in five clusters (Figure 25). Hierarchical analysis of the banding pattern confirmed the initial visualisations; cluster 1 was associated with control subjects ($p=0.001$), and clusters 4 and 5 were associated with CRC patients ($p=0.08$ and $p=0.026$, respectively), whereas clusters 2 and 3 did not differentiate between CRC and control groups.

Tumour localisation, diabetes status, age, alcohol consumption and gender did not affect the clustering distribution of the samples. However, since it was split non-smokers into real non-smokers and ex-smokers, it was found ex-smokers more common in CRC patients than healthy controls ($p=0.01$). Statistical analysis of the clusters revealed an association between diabetes and clusters 4 and 5, which were associated with CRC ($p=0.003$ and $p=0.000$, respectively). Ex-smokers samples were more commonly found

in cluster 5 than in the other groups ($p=0.001$). Statistical results are described in Table 30. Cluster 1, which was associated with control subjects, contained 68% of the identified phylotypes, whereas clusters 4 and 5 contained 86% each, resulting in a higher microbial diversity in CRC bacterial pattern.

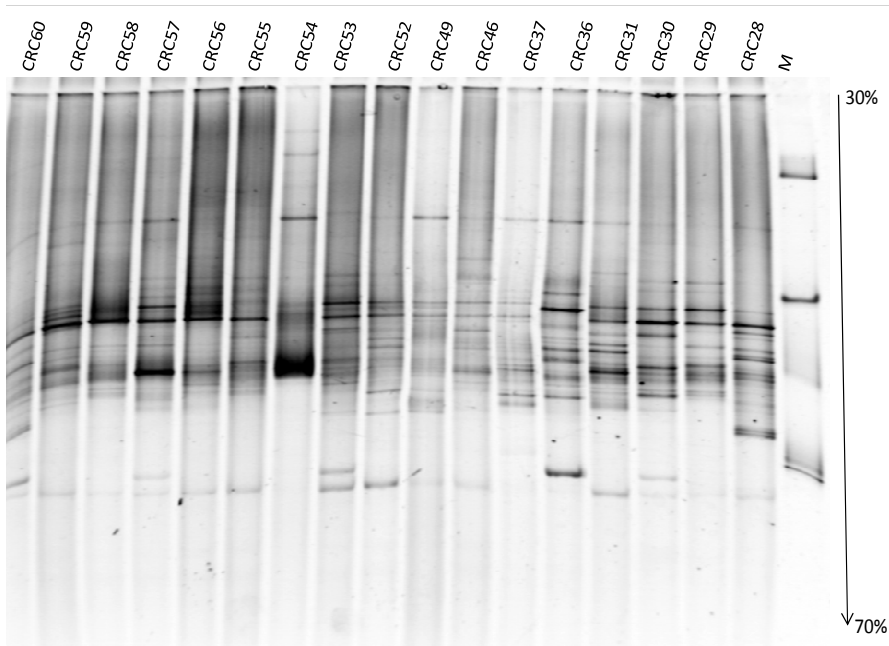


Figure 24. Example of DGGE gel image of CRC patients. Each lane corresponded to the bacterial fingerprint of one sample. The later lane (M) corresponded to the standard used to know the relative positions of the bands for further comparison. Each band corresponded to a specific phylotype or bacterial specie, and selected bands were excised, reamplified and sequenced for analysis identification and comparison. Vertical denaturing gradient gel ranged from 70 to 30% urea/formamide.

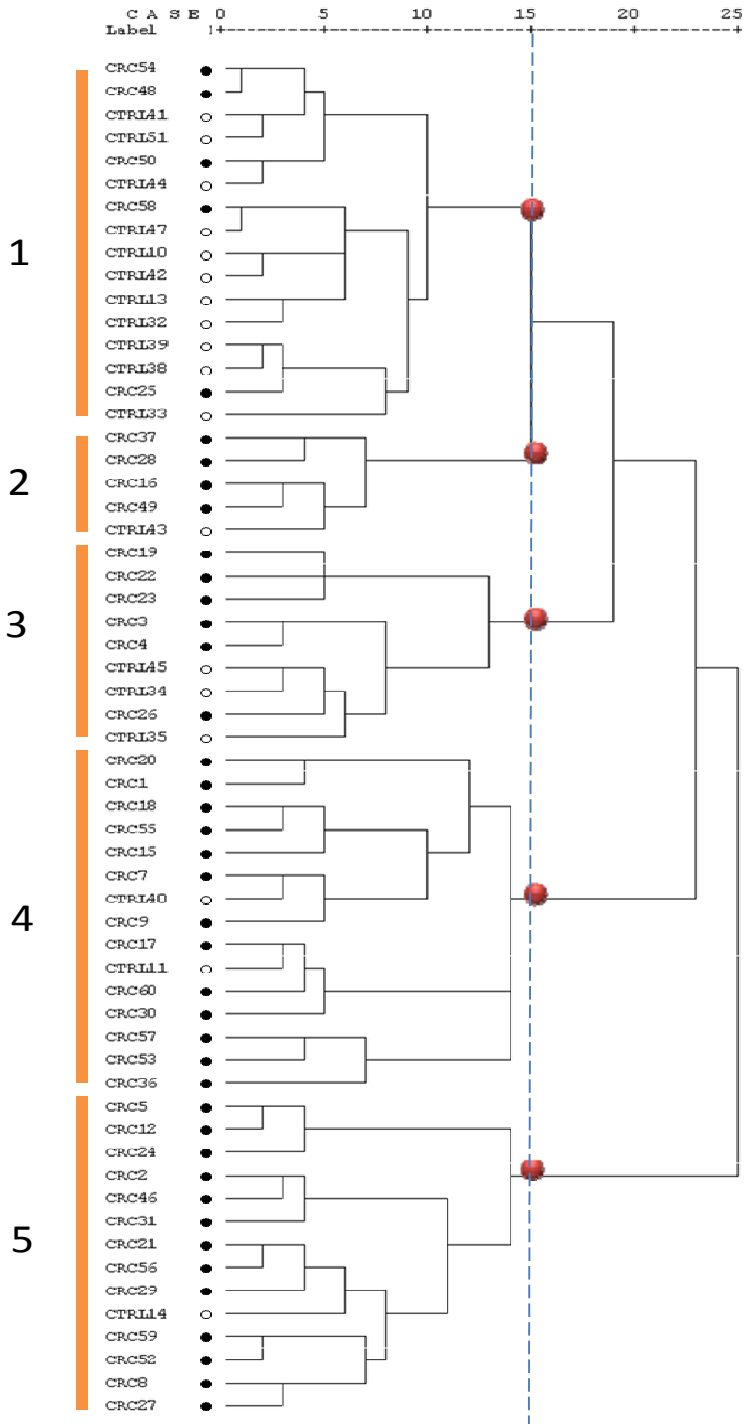


Figure 25. Cluster analysis of DGGE profiles. Hierarchical distance clustering of biopsy DGGE profiles. Scale bar describes DGGE similarity between profiles. White dots indicate control subjects. Black dots indicate CRC subjects.

Table 30. Association of risk factors analyzed with the different bacterial pattern clusters identified in this study by the P value (denoted as *). N.S., non significant.

Cluster	Diabetes	past-smokers
1	n.s.	n.s.
2	n.s.	n.s.
3	n.s.	n.s.
4	0.003*	n.s.
5	0.000*	0.001*

2.3.3 Sequence and bacterial composition analyses

We obtained 158 partial 16S rRNA gene sequences from both CRC patients (122 sequences) and C subjects (36 sequences) of the selected bands in the DGGE gels. Sequences were sorted into 55 phylotypes, 9 of which were novel ($\leq 95\%$ similarity with any GenBank or RDP sequence) (Table 39). Firmicutes (56.3%) was the dominant group followed by Bacteroidetes (21.8%), Actinobacteria (10.9%), Proteobacteria (7.2%) and Fusobacteria (1.8%). Up to 68% of the phylotypes were related to cultured bacteria, and 32% corresponded to uncultured bacteria.

The genus *Faecalibacterium* was the major representative of the Firmicutes phylum and was the most prevalent in both CRC patients and control subjects (94.92%).

Table 31. Description of the different phylotypes found from the total of DGGE bands identified.

DGGE Band	Acc. nº	Description	Max Id.	Isolation	Phylum	Acc. BLAST	Acc. RDP-II	Patient	Sample localization
51	GQ411155	<i>Prevotella intermedia</i> strain 36-PIN	85 ⁺	Type strain	Actinobacteria	AF414826.1	-	C	rectum
44	GQ411148	<i>Streptococcus thermophilus</i> strain T1	90 ⁺	Type strain	Firmicutes	EF990662.1	-	CRC	cecum
47	GQ411151	<i>Bacillus sp.</i> EN-V5	91 ⁺	Type strain	Firmicutes	DQ988158.1	-	C	rectum
49	GQ411153	Uncultured bacterium clone orang1_aai55b02	93 ⁺	sumatran orangutan feces	Bacteroidetes	EU777476.1	-	CRC	sigma
56	GQ411160	Uncultured bacterium clone RL306aal89c02	94 ⁺	Human feces	Bacteroidetes	DQ805634.1	DQ217839	CRC	rectum
41	GQ411145	<i>Clostridium sp.</i> cTPY-17	95 ⁺	rat feces	Firmicutes	AY239462.1	EF451053	CRC	sigma
5	GQ411113	<i>Coprococcus catus</i> strain GD/7	95 ⁺	pure culture	Firmicutes	EU266552.1	EU266552	CRC	rectum
55	GQ411159	Uncultured bacterium clone SJTU_G_06_22	95 ⁺	Human fecal sample	Bacteroidetes	EF405125.1	EU136696	CRC	sigma
36	GQ411140	<i>Klebsiella sp.</i> ND-2	95 ⁺	atrazine-contaminated soil	Proteobacteria	EU075144.1	EU075144	CRC	sigma
18	GQ411126	<i>Ruminococcus gnavus</i> ATCC 29149	96	Type strain	Firmicutes	EU530381.1	X94967	CRC	rectum
8	GQ411116	<i>Streptococcus salivarius</i> HT9R	96	Type strain	Firmicutes	AB355616.1	AY188352	CRC	rectum
38	GQ411142	<i>Calymmatobacterium granulomatis</i> KH 22	96	Peripheral blood monocytes	Proteobacteria	AF010251.1	DQ470482	CRC	sigma
42	GQ411146	<i>Coprococcus comes</i> strain ATCC 27758	96	Type strain	Firmicutes	EF031542.1	-	CRC	cecum

Table 31. Continued

DGGE Band	Acc. nº	Description	Max Id.	Isolation	Phylum	Acc. BLAST	Acc. RDP-II	Patient	Sample localization
48	GQ411152	Uncultured bacterium clone RL247_aaj24e11	97	Human feces	Firmicutes	DQ800130.1	AB233029	CRC	rectum
35	GQ411139	<i>Roseburia faecalis</i> strain M6/1	97	Type strain	Firmicutes	AY804149.1	AY804150	C	rectum
40	GQ411144	<i>Bacteroides massiliensis</i> strain B84634	97	Human feces	Bacteroidetes	AY126616.1	AY126616	CRC	sigma
50	GQ411154	<i>Parabacteroides merdae</i> JCM 9497	97	Type strain	Bacteroidetes	AB238928.1	EU136685	CRC	rectum
6	GQ411114	<i>Prevotella stercorea</i> CB35	97	Human feces	Bacteroidetes	AB244774.1	AB244774	CRC	rectum
9	GQ411117	<i>Faecalibacterium prasnitzii</i>	98	Human feces	Firmicutes	FJ372208.1	AJ270469	CRC	sigma
17	GQ411125	<i>Clostridium perfringens</i> strain BG-C76	98	Substrate from biogas plant	Firmicutes	FJ384379.1	CP000246	C	rectum
13	GQ411121	<i>Bacteroides caccae</i> ATCC 43185	98	Type strain	Bacteroidetes	FJ363049.1	X83951	CRC	sigma
37	GQ411141	<i>Bacterium</i> VA-S-13	98	Type strain	Bacteroidetes	AY395281.1	Y17662	CRC	sigma
43	GQ411147	<i>Selenomonas sputigena</i>	98	Human subgingival plaque	Firmicutes	AF287793.1	AY341820	CRC	cecum
45	GQ411149	<i>Actinomyces genomosp.</i> C2	98	Human mouth	Actinobacteria	AY278611.1	AY278611	CRC	cecum
60	GQ411163	<i>Prevotella</i> sp. DJF_B116	98	Intestine	Actinobacteria	EU728713.1	AB244774	CRC	sigma
10	GQ411118	<i>Faecalibacterium prasnitzii</i> secondary band	99	Human feces	Firmicutes	DQ806659.1	AJ270469	CRC	rectum
3	G411111	<i>Coriobacterium</i> sp. CCUG 33918	99	Human colonic mucosal biopsy	Actinobacteria	EF071151.1	AJ131150	CRC	sigma

Table 31. Continued

DGGE Band	Acc. nº	Description	Max Id.	Isolation	Phylum	Acc. BLAST	Acc. RDP-II	Patient	Sample localization
12	GQ411120	<i>Ruminococcus obeum</i> clone 1-33	99	Greenland ice core	Firmicutes	EF402307.1	AY169419	CRC	sigma
33	GQ411137	<i>Acinetobacter sp.</i> F166	99	Raw milk	Proteobacteria	EF204261.1	AB020207	CRC	rectum
31	GQ411135	<i>Eubacterium rectale</i>	99	Greenland ice core	Firmicutes	FJ372064.1	AY169428	CRC	rectum
4	GQ411112	<i>Enterococcus faecium</i> strain MMA2	99	Type strain	Firmicutes	DQ295038.1	AJ276356	CRC	splenic angle
16	GQ411124	<i>Ruminococcus lactaris</i> ATCC 29176	99	Type strain	Firmicutes	AM075750.1	L76602	CRC	sigma
46	GQ411150	Butirat producing bacterium	99	Human feces	Firmicutes	FJ371045.1	DQ100445	CRC	rectum
7	GQ411115	<i>Peptostreptococcus stomatis</i> strain W2278	99	Type strain	Firmicutes	DQ160208.1	AF044947	CRC	rectum
34	GQ411138	<i>Clostridium nexile</i> DSM 1787	99	Type strain	Firmicutes	EU767133.1	X73443	C	rectum
22	GQ411128	Uncultured bacterium clone TS5-a04C07	99	Human feces	Firmicutes	FJ371045.1	DQ100445	CRC	rectum
30	GQ411134	Uncultured <i>Peptostreptococcus sp.</i> clone 133A1	99	Amniotic fluid	Firmicutes	EU644476.1	DQ160208	CRC	rectum
54	GQ411158	Uncultured bacterium clone FL_1aaa02d05	99	Francois Langur feces	Firmicutes	EU775170.1	-	CRC	sigma
29	GQ411133	<i>Parvimonas micra</i> ATCC 33270	99	Type strain	Firmicutes	AM420073.1	AY323523	CRC	rectum
39	GQ411143	Uncultured <i>Ralstonia sp.</i> clone 3P-3-2-C16	99	K. S. Centre clean room floor	Proteobacteria	EU705729.1	AY509958	CRC	sigma

Table 31. Continued

DGGE Band	Acc. nº	Description	Max Id.	Isolation	Phylum	Acc. BLAST	Acc. RDP-II	Patient	Sample localization
28	GQ411132	<i>Clostridium ramosum</i> strain CM-C50	99	Cattle manure	Firmicutes	EU869233.1	X73440	CRC	rectum
52	GQ411156	Uncultured bacterium clone Z678	99	Human trans. colon mucosal biopsy	Firmicutes	AY979353.1	-	CRC	sigma
32	GQ411136	Uncultured Dorea sp. clone M4-77	99	Adenoma colorectal cancer	Firmicutes	EU530365.1	AJ132842	CRC	rectum
11	GQ411119	<i>Prevotella</i> sp. DJF_B116	99	Intestine	Bacteroidetes	FJ369798.1	EF534314	CRC	rectum
19	GQ411127	<i>Olsenella uli</i> ATCC49627	99	Type strain	Actinobacteria	FJ369798.1	EF534314	CRC	sigma
27	GQ411131	<i>Porphyromonas somerae</i> WAL 6690	99	Type strain	Bacteroidetes	AY968205.1	AY968205	CRC	rectum
57	GQ411161	Uncultured bacterium clone orang1_aai55b02	99	Sumatran orangutan feces	Bacteroidetes	EU777476.1	-	CRC	rectum
53	GQ411157	Uncultured bacterium clone TS4_a04d08	99	Human feces	Firmicutes	FJ369115.1	AY305316	CRC	rectum
1	GQ411109	RNA mitochondrial	100	<i>H. sapiens</i> mitochondrion	Human	FJ743691.1	-	CRC	splenic angle
15	GQ411123	Uncultured bacterium clone C5_781	100	Human feces	Firmicutes	EU768710.1	M59230	CRC	sigma
14	GQ411122	Uncultured bacterium clone TS49_a04c06	100	Human feces	Firmicutes	FJ368766.1	M59230	CRC	sigma
25	GQ411129	<i>Fusobacterium</i> sp. DJF_B100	100	intestine	Fusobacteria	EU728711.1	EU728711	C	rectum
26	GQ411130	Uncultured bacterium isolate CD0402	100	intestinal mucosa from CD patient	Firmicutes	AM075698.1	L76604	CRC	ascending colon

Table 31. Continued

DGGE Band	Acc. nº	Description	Max Id.	Isolation	Phylum	Acc. BLAST	Acc. RDP-II	Patient	Sample localization
2	GQ411110	Uncultured bacterium clone TS51_a04h11	100	Human feces	Bacteroidetes	FJ369798.1	EF534314	CRC	rectum
59	GQ411162	<i>Prevotella</i> sp. DJF_B116	100	Intestine	Actinobacteria	EU728713.1	EU728713	CRC	sigma

Novel phlotypes with identities $\leq 95\%$ to any NCBI/EMBL sequence are indicated (†)

Noticeably, a secondary band with a sequence that also corresponded to this group was more frequently found in CRC patients more often than control subjects ($p=0.019$). Other members of this phylum, such as *Clostridium sp.*, were also more frequently detected in CRC patients than control subjects ($p=0.009$). Conversely, *Roseburia faecalis* and *Clostridium nexile* were more prevalent in control subjects than CRC patients ($p=0.043$ and $p=0.002$, respectively), even though the low frequencies of both bacterial species in samples. Two phylotypes (b46 and b48) related to uncultured bacteria were found in 31% and 45% of CRC patients respectively and in 5.5% and 11% of control subjects ($p=0.03$ and $p=0.009$ respectively). Other Firmicutes abundantly found were *Bacillus sp.* (42.37%), *Ruminococcus obeum* (38.98%), *Ruminococcus gnavus* (37.29%), *Eubacterium rectale* (33.9%) and *Streptococcus salivarius* (32.2%)

Of the *Bacteroidetes*, *Bacteroides caccae* (27.12%) was the most frequently detected species in both sample types followed by *Parabacteroides merdae* (22%), which was more frequently found in CRC patients than control subjects ($p=0.043$)

Coriobacterium sp. (Actinobacteria) was found in 81% of CRC patients whereas the frequency in control subjects was significantly reduced to 55% ($p=0.020$). *Acinetobacter sp.* represented the Proteobacteria phylogroup in both CRC and control samples (38%).

From the total of phylotypes analysed, frequencies of six phylotypes were significantly higher in CRC patients than in control subjects. Five of these sequences shared similarity with uncultured bacterial sequences retrieved from the human GI tract or human faeces, and the remaining sequence (GQ411154) shared 97% similarity with *Parabacteroides*

merdae strain JCM 9497. In contrast, phylotypes including sequences B35 (97% similarity to *Roseburia faecalis*) and B34 (99% similarity to *Clostridium nexile*) were more prevalent in healthy subjects than CRC patients (Table 32). Clinical features of patients as tumour localization, tobacco consumption or diabetes were not associated to any specific phylotype.

Table 32. Phylotypes showing significant prevalence in CRC and control samples. Percentages indicate the proportion of samples of either type containing this phylotype.

Band	Accession number	Description	% CRC	%C	P value
b41	GQ411145	<i>Clostridium sp.</i> cTPY-17	45.24	11.11	0.009
b48	GQ411152	Uncultured bacterium clone RL247_aaj24e11	45.24	11.11	0.009
b35	GQ411139	<i>Roseburia faecalis</i> strain M6/1	19.05	44.44	0.047
b50	GQ411154	<i>Parabacteroides merdae</i> JCM 9497	28.57	5.56	0.043
b10	GQ411118	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	85.71	61.11	0.019
b3	GQ411111	<i>Coriobacterium sp.</i> CCUG 33918	80.95	55.56	0.020
b46	GQ411150	Butyrate producing bacterium	30.95	5.56	0.030
b34	GQ411138	<i>Clostridium nexile</i> DSM 1787	9.52	44.44	0.002

2.3.4 Bacterial indexes

Phylotypes B3 (*Coriobacterium sp.*), B34 (*Clostridium nexile*) and B35 (*Roseburia faecalis*) were of interest. B3 was the most prevalent phylotype in CRC patients, whereas B34 and B35 were associated with healthy controls. From this observation, a logistic regression model was applied considering these phylotypes as the explanatory variables (Table 33). It was obtained a risk (or odds ratio) with crude estimates of 4.55 (CI: 1.059; 19.5) for B3, whereas B34 and B35 were found to be protective species (82.9% and 75.1%, respectively). Random experimental design was performed in order to avoid any confounder bias.

Table 33. Relationship of the different phylotypes showing the highest relatedness with CRC risk according to the logistic regression model performed in this work. OR, Odds Ratio, CI, confidence interval at 95% precision.

Phylotype	OR	CI (95%)	Pvalue
B3	4.55	(1.059 , 19.5)	0.0416*
B34	0.171	(0.038 , 0.77)	0.0216*
B35	0.249	(0.059 , 1.048)	0.0580

CHAPTER 3

Streptococcal composition and diversity in Colorectal cancer patients compared to healthy controls

3.1 Introduction

Streptococcus is a diverse genus covering both pathogenic and non-pathogenic species that occurs as commensal flora on the skin, in the gastrointestinal tract, in the oral cavity and the urogenital tract in both humans and animals [178]. No clear relationship has been established so far between Streptococci and bowel diseases. However the interest of streptococci in the GI tract increased when an association of *S. bovis* endocarditis and colorectal cancer was established [129, 149, 164, 175, 190, 248]. Etiology of CRC is still not clear. Environmental and hereditary factors are important in its onset and development [249]. However, *S. bovis* is present in up to 15% of CRC cases [166]. Moreover, bacteremia and infectious endocarditis caused by *Streptococcus bovis* may be related to the presence of inflammation or neoplastic lesions in the large intestine [167]. Although the relation between *S. bovis* and CRC is well-known, no efforts to identify these species in the colonic mucosa have been done beyond classical culturing-dependent methods or molecular approaches. Little is known about the prevalence, abundance and ecological role of streptococci in the gastrointestinal tract and many relevant molecular studies have overlooked streptococcal species [61, 67, 250-252] that are not as abundant as other bacteria and mislead the importance of this bacterial group.

3.2 Development of a molecular approach to detect and identify members of the *Streptococcus* genus in clinical samples.

3.2.1 *Streptococcus*-specific PCR

A multiple alignment of the 16S rRNA sequences from *Streptococcus* species revealed regions conserved among the streptococci but distinct from those of other bacteria. These conserved 16S rRNA sequence regions were used for primer design.

Two primers (623F/R and 1043F/R) were found to be specific for the *Streptococcus* genus and were combined with the universal eubacterial primers 27F [223], 357F [215] and 1492R [251]. Four primer sets were designed in the study (Table 34). Set 1 was formed by oligonucleotides 27F and 623R; set 2 by 357F and 1043R, set 3 by 623F and 1043R and set 4 by 1043F and 1492R.

Table 34. Primer sets used in this work.

Primer	Sequence (5'-3')	Target	Reference
27R	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Eubacteria	[223]
357F	CCCTACGGGAGGCAGCAG	Eubacteria	[215]
1492R	ACGGTTACCTTGTTACGACTT	Eubacteria	[251]
623F	GTGGCGAAAGCGGCTCTCT	<i>Streptococcus</i> sp	this work
623R	AGAGAGCCGCTTTCGCCAC	<i>Streptococcus</i> sp	this work
1043F	CACTCTAGCGAGACTGCCG	<i>Streptococcus</i> sp	this work
1043R	CGGCAGTCTCGCTAGAGTG	<i>Streptococcus</i> sp	this work

After testing the 4 primer sets designed, it was found that the amplicon generated by set 1 exceeded the expected size, and set 3 did not work. The other two primer sets produced amplicons of the expected size. However, since DGGE does not work properly for PCR products larger than 600 bp

and set 2 produced a fragment approximately 690 bp in size, set 4 (450 bp) was chosen. Moreover, set 4 enclosed the hypervariable regions V7-V9 that in principle provides a higher resolution for the identification of the fragments. The optimal annealing temperature for this primer pair was empirically determined to be 67°C. The combination of primers 1043F and 1492R was highly specific for identification of the *Streptococcus* genus. The 30-cycle PCR assays clearly amplified genomic DNA from the 17 streptococcal species tested. *Enterococcus faecalis* was the only non-streptococcal bacterial species amplified by the assay (Table 35). Specificity was later confirmed with 27 additional *Streptococcus* isolates from our laboratory.

Table 35. Specificity test assay for primers 1043F-1492R on bacterial species from the genus *Streptococcus* and other phylogenetic groups.

<i>Streptococcus</i> species	PCR	Actinobacteria & Firmicutes	PCR	Proteobacteria	PCR
<i>S. agalactiae</i>	+	<i>Arthrobacter spp.</i>	-	<i>Campylobacter jejuni</i>	-
<i>S. sanguinis</i>	+	<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Citrobacter spp</i>	-
<i>S. anginosus</i>	+	<i>Bacillus megaterium</i>	-	<i>Escherichia coli</i>	-
<i>S. mutans</i>	+	<i>Bacillus subtilis</i>	-	<i>Enterobacter aerogenes</i>	-
<i>S. pyogenes</i>	+	<i>Enterococcus avium</i>	-	<i>Erwinia spillophilus</i>	-
<i>S. bovis</i>	+	<i>Enterococcus columbae</i>	-	<i>Erythrobacter spp</i>	-
<i>S. equi sb equi</i>	+	<i>Enterococcus durans</i>	-	<i>Methylophilus metylophilus</i>	-
<i>S. sobrinus</i>	+	<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-
<i>S. equinus</i>	+	<i>Enterococcusgallinarum</i>	-	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-
<i>S. salivarius</i>	+	<i>Enterococcus munditii</i>	-	<i>Salmonella LT2</i>	-
<i>S. oralis</i>	+	<i>Lactobacillus spp.</i>	-	<i>Serratia marcescens</i>	-
<i>S. suis</i>	+	<i>Listeria innocua</i>	-	<i>Shigella sonnei</i>	-
<i>S. thermophilus</i>	+	<i>Micrococcus luteus</i>	-		
<i>S. uberis</i>	+	<i>Mycobacterium avium</i>	-		
<i>S. intermedius</i>	+	<i>Staphylococcus aureus</i>	-		
<i>S. pneumoniae</i>	+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-		
		<i>Enterococcus faecalis</i>	+		

The lowest detectable concentration of template was 170 genome equivalents per reaction (95% probability) after analyzing five replicates of a serially diluted *S. pneumoniae* DNA sample.

3.2.2 Use of primers 1043f-1492r on clinical samples

To test our primer set on clinical samples, we used DNA isolated from mucosal colon biopsies of healthy controls, from patients with colorectal cancer, and from bronchoalveolar lavages of patients with streptococcal infection. The banding pattern obtained by DGGE (Figure 26) represented the principal streptococci constituents of the analyzed community that contribute to >1% of the total streptococcal population [215].

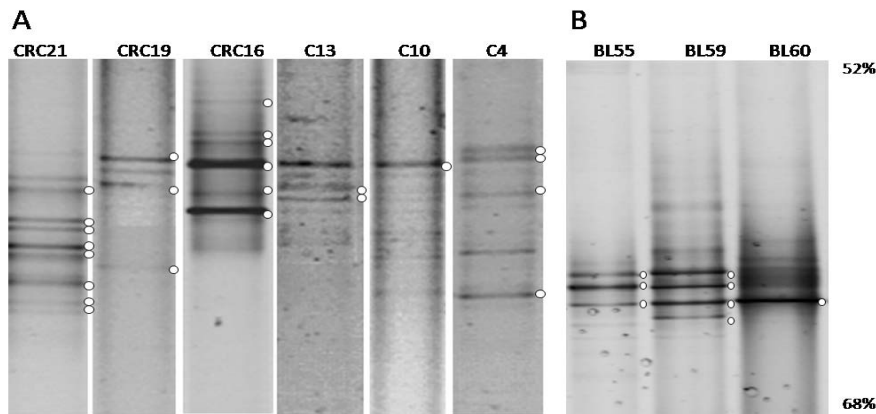


Figure 26. DGGE profiles representing 16S rRNA gene fragments from *Streptococcus* sp. from A (colon biopsies) and B (bronchoalveolar lavages). White dots indicate the main bands subjected to reamplification and sequencing.

Thirty-three selected 16S rRNA gene PCR products from DGGE bands were sequenced and compared with entries in the Genbank database and Ribosomal Database Project II (Table 36). Chimeric sequences were identified by CHECK-CHIMERA software. In the colonic mucosal samples, the dominant phylotypes belonged to the viridans group of streptococci. Sequences matched those of known *Streptococcus* species

such as: *S. thermophilus*, *S. mitis*, *S. intermedius*, or *S. pneumoniae*. Bronchoalveolar lavage samples contained mainly *Streptococcus pneumoniae*. Other streptococci species such as *S. thermophilus* or *S. iniae* were also found as accompanying species, which unlike colonic samples belong to the salivarius and pyogenic group. A total of eleven bands had no identity to known cultured strains and probably are non-culturable streptococci. Of these, bands 4a, 13b and 16c corresponded to novel phylotypes as they shared <94% identity with any GenBank sequences.

3.3 Streptococcal populations of mucosal samples in CRC and IBD patients determined by PCR-DGGE

3.3.1 Patients data

Main characteristics and clinical data from subjects included in this work are listed in table 37.

Table 37. Characteristics and Clinical Data from CRC patients and Healthy controls subjects Analysed.

Group	n	Age, y	Gender, F/M, %	Main characteristics
C	18	64.1±10.4	45/55	Diahreea, anemia, familiar screening
CRC	41	69.8±10.1	44/56	Consecutive patients diagnosed
UC	5	39.6±13.92	20/80	1ulcerative proctitis, 1 pancotitis, 2 left colitis, 1 rectum and sigma
CD	11	34.19±15.82	46/54	5 C-CD, 4 IC-CD, 1 I-CD

C, indicates control; CRC, colorectal cancer; UC, ulcerative colitis and CD, Crohn's disease. C-CD, colònic-CD; IC-CD, ileocolonic CD; I-CD, ileal CD

Table 36. Sequence identification from DGGE bands in GenBank and RDP-II.

DGGE Band	Accession number	Size (pb)	Similarity (%)	Nearest sequence(NCBI)	Description	Source	Nearest strain (RDP-II)
C13.a	EU563992	378	91†	AF432136	<i>Streptococcus</i> oral clone	Tongue dorsum scrapings	<i>Streptococcus mitis</i> (T); ATCC 49456
CRC16.c	EU563987	374	93†	DQ346424	Uncultured <i>Streptococcus</i>	Human oral cavity	<i>Streptococcus thermophilus</i> (T); DSM 20617
CRC4.a	EU563979	276	94†	DQ819119	Uncultured bacterium clone aab26a11	Digestive tract of zebrafish	<i>Streptococcus thoralensis</i> (T) S69
CRC16.a	EU563985	375	95†	EF400504	Uncultured bacterium clone SJTU_E_14_21	Human fecal sample	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (T); ATCC 33400
CRC21.c	EU563999	379	95†	EF404797	Uncultured bacterium clone SJTU_C_10_72	Human fecal sample	No significant match
CRC21.e	EU564001	377	95†	DQ905141	Uncultured bacterium clone 002C-d6	Human fecal sample	No significant match
CRC16.b	EU563986	377	96	AM157451	<i>Streptococcus salivarius</i>	Human breast milk	<i>Streptococcus thermophilus</i> (T); DSM 20617
C19b	EU563995	338	96	EF071403	Uncultured Firmicutes clone M0027_118	Human colonic mucosa	<i>Enterococcus faecium</i> (T); DSM20477
CRC21.a	EU563997	377	96	AY854277	Uncultured bacterium clone CATTLE_15	Herbivore gastrointestinal tract	No significant match
C10.a	EU563984	373	97	DQ905402	Uncultured bacterium clone 013C-C10	Human fecal sample	<i>Streptococcus thermophilus</i> (T); DSM 20617
C19.a	EU563994	336	97	DQ677551	Uncultured <i>Streptococcus</i> sp. clone D01	Human saliva	<i>Streptococcus mitis</i> (T); ATCC 49456
CRC21.d	EU564000	337	97	EF405369	Uncultured bacterium clone SJTU_G_02_85	Human fecal sample	No significant match
CRC21.f	EU564002	376	97	DQ905380	Uncultured bacterium clone 013C-A11	Human fecal sample	No significant match
CRC4.b	EU563980	283	97	EF404405	Uncultured bacterium clone SJTU_C_09_54	Human fecal sample	<i>Streptococcus thermophilus</i> (T); DSM 20617
CRC4.d	EU563983	376	97	DQ905141	Uncultured bacterium clone 002C-d6	Human fecal sample	No significant match
BL55.a	EU563978	358	97	AY959207.1	Uncultured bacterium clone rRNA434	Human vaginal epithelium	<i>Enterococcus avium</i>
BL59.b	EU563975	359	97	AY803232.1	Uncultured bacterium clone D112	Rhizoplane of Lemna minor	No significant match
CRC16.e	EU563989	374	98	AY959090	Uncultured bacterium clone rRNA317	Human vaginal epithelium	<i>Streptococcus intermedius</i> (T); ATCC27335

Table 36. Continued

DGGE Band	Accession number	Size (pb)	Similarity (%)	Nearest sequence(NCBI)	Description	Source	Nearest strain (RDP-II)
CRC16.g	EU563991	375	98	AY959090	Uncultured bacterium clone rRNA317	Human vaginal epithelium	<i>Streptococcus intermedius</i> (T); ATCC27335
CRC21.g	EU564003	378	98	EF406903	Uncultured bacterium clone DSS_7DAYS_C05_T7P	Mouse colon	No significant match
CRC21.h	EU564004	374	98	EF406903	Uncultured bacterium clone DSS_7DAYS_C05_T7P	Mouse colon	No significant match
CRC4.c	EU563981	337	98	EF401722	Uncultured bacterial clone	Human fecal sample	No significant match
BL55.b	EU563972	358	98	AB200871.1	<i>Streptococcus thermophilus</i> strain:DL1	A Georgia yogurt	<i>Streptococcus thermophilus</i>
BL59.a	EU563974	358	98	AY762259.1	<i>Streptococcus iniae</i> strain SCCF5L	strain="SCCF5L	<i>Streptococcus uberis</i> (T); ATCC 19436
C13.b	EU563993	376	99	AM157442	<i>S. pneumoniae</i> 4V4	Human breast milk	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (T); ATCC 33400
CRC16.d	EU563988	374	99	AY138233	Uncultured <i>Streptococcus</i>	Human estomach biopsy	<i>Streptococcus uberis</i> (T); ATCC 19436
CRC16.f	EU563990	376	99	AY959090	Uncultured bacterium clone rRNA317	Human vaginal epithelium	<i>Streptococcus intermedius</i> (T); ATCC27335
C19.c	EU563996	375	99	EF405528	Uncultured bacterium clone SJTU_G_01_33	Human fecal sample	<i>Clostridium orbiscindens</i> (T); DSM 6740
CRC21.b	EU563998	378	99	EF404797	Uncultured bacterium clone SJTU_C_10_72	Human fecal sample	No significant match
BL59.c	EU563976	351	99	AM157442.1	<i>Streptococcus pneumoniae</i> clone 4V4	Breast milk	<i>Streptococcus pneumoniae</i> clone 4V4
BL59.d	EU563977	357	99	AM157442.1	<i>Streptococcus pneumoniae</i> clone 4V4	Breast milk	<i>Streptococcus pneumoniae</i> clone 4V4
BL60.a	EU563973	355	99	AM157442.1	<i>Streptococcus pneumoniae</i> clone 4V4	Breast milk	<i>Streptococcus pneumoniae</i> clone 4V4
BL55.c	EU563971	356	100	AM157442.1	<i>Streptococcus pneumoniae</i> clone 4V4	Breast milk	<i>Streptococcus pneumoniae</i> clone 4V4

Novel phlotypes with identities $\leq 95\%$ to any NCBI/EMBL sequence are indicated (+)

3.3.2 Streptococci isolation

Two hundred forty one isolates were selected after streptococci isolation procedures using fresh biopsies from 4 control subjects and 15 CRC patients. Partial amplification of the *tuf* gene, which was described specifically for *Streptococcus sp.*, was positive for 144 isolates. Of these, 118 distinct isolates were distinguished by RAPD. Up to 77 isolates from this pool were sequenced resulting into 52 streptococcal species, 22 enterococcal species, 2 *Eubacterium sp.* and one *Lactobacillus sp.* (Table 38). Noticeably, of the 22 isolates of *Enterococcus sp.* that were identified, 17 (77.3%) were obtained from only two CRC patients.

Table 38. Bacterial isolates identified by culturing methods.

Specie	Number of isolates
<i>S. salivarius</i>	33
<i>S. parasanguinis</i>	13
<i>S. anginosus</i>	10
<i>S. pneumoniae</i>	1
<i>S. oralis</i>	4
<i>S. intermedius</i>	2
<i>S. agalactiae</i>	1
<i>S. gordonii</i>	1
<i>S. difficile</i>	1
<i>S. pasteurianus</i>	1
<i>S. sanguis</i>	2
<i>S. suis</i>	6
<i>S. mitis</i>	2
<i>Unc. Streptococcus</i>	7
<i>S. oral clone</i>	5
<i>Streptococcus sp</i>	3
<i>Enterococcus</i>	22
<i>Eubacterium sp.</i>	2
<i>Lactobacillus sp.</i>	2

Concerning the genus *Streptococcus*, the species *S. salivarius* and *S. parasanguis* were the most frequently found, accounting for 36% and 14%

of total, respectively. These two species were found in 41.2% and 35.3% of the samples, respectively. Members of the *salivarius* and *mitis* groups were equally found in both compared groups, whereas the *anginosus* group was predominantly present (83%) in the CRC group.

3.3.3 Streptococcal diversity by PCR-DGGE

PCR-DGGE revealed the main streptococcal species present in the analysed community (Figure 27).

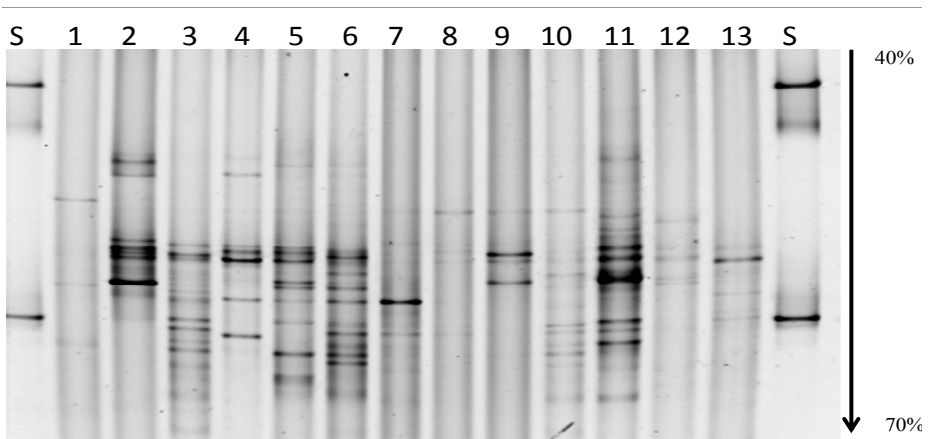


Figure 27. Example of a DGGE gel using *Streptococcus*-genus specific primer set. Each lane corresponded to the bacterial fingerprint of one CRC sample. Standard lane (S) corresponded to the standard used to know the relative positions of the bands for further comparison in gel analysis software. DGGE gel ranged from 40% to 70% urea/formamide.

Hierarchical analysis of the banding patterns did not show differences among CRC and IBD patients and control. Samples from these subjects presented similar streptococcal fingerprints and grouped unevenly across different clusters (Figure 29).

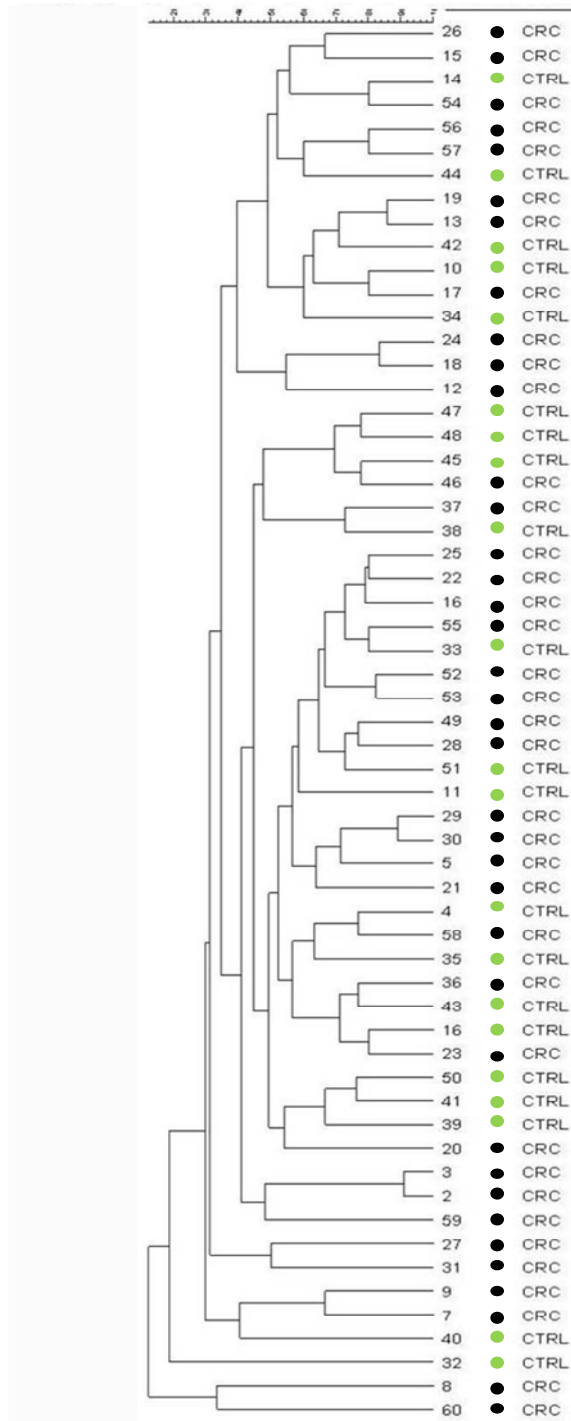


Figure 28. Hierarchical distance clustering of biopsy DGGE profiles. Scale bar describes DGGE similarity between profiles. CRC, colorectal patients; CTRL, control subjects.

One hundred forty two partial 16S rRNA gene sequences were obtained from CRC patients (97 sequences), IBD patients (11 sequences) and control subjects (34 sequences) after reamplification and sequencing of the selected bands from the DGGE gels (Table 39). Ten phylotypes (7% of the total sequences) were novel ($\leq 95\%$ similarity with any known GenBank or RDP sequence), twenty streptococcal phylotypes were identified (35.2%), plus different uncultured streptococcal phylotypes (5.6%). Other phylotypes identified belonged to *Leuconostoc* (2.8%), *Enterococcus* (7%) and *Clostridia* (6.3%). Up to 35.2% of the sequences were related to uncultured bacteria isolated, all of them from human feces. Of these, 7.1% did not have significant match to any isolated bacteria (sequences shared less than 60% of similarity to sequences from isolated bacteria from the RDP-II database) as found with streptococcal isolates, the *salivarius* and *mitis* groups were the most abundant in all groups of patients (CRC, UC and CD) and healthy controls. No difference in the prevalence of these groups was observed among the 3 patient groups. Sequences related to the *pyogenic* group were only found in CRC patients and control subjects, sequences related to the *anginosus* group belonged to CRC patients and from the *mutans* group to control subjects, the *bovis* group were present in CRC and IBD patients. Concerning sequences related to uncultured bacteria, they were more frequently found in CRC patients and IBD patients (82.2%) than in control subjects (17.7%). These sequences formed a different branch in the phylogenetic tree and seem to be related to *Clostridiaceae* (Figure 29). It should be noted that these sequences could not specifically belong to of the genus *Streptococcus*, probably due to the specificity scope of the primer set used in this work. These oligonucleotides target variable regions of the gene 16S rRNA of all streptococcal species covering a wider phylogenetic range than that specifically expected for *Streptococcus* genus.

Table 39. Sequence identification of DGGE bands in GenBank and RDP-II.

Sample	Accession number	Max Id (%)	Nearest sequence	Description	Source
CD184.36	JN086229	90†	AM157419.2	<i>Streptococcus salivarius</i> clone 3C4	Type strain
CD167.15	JN086234	94†	HM124019.1	Uncultured bacterium clone G52	Gut
CRC15.g	HQ172030	94†	AJ408991.1	Uncultured bacterium clone HuCB7	Human colon
CRC26.a	HQ172053	94†	AM157420.1	<i>Streptococcus mitis</i> clone 4C3	Type strain
CRC4.a	EU563979	94†	JN645289.1	<i>Enterococcus casseliflavus</i> strain W194	Type strain
CRC9.a	HQ172010	94†	EF403042.1	Uncultured bacterium clone SJTU_B_15_94	Human feces
C47.b	HQ172090	95†	AM420093.1	Uncultured <i>Streptococcus</i> sp. clone 302F04(oral)	Subgingival plaque
CRC16.a	EU563985	95†	EF400504	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Human feces
CRC21.e	EU563999	95†	EF404797	Uncultured bacterium clone SJTU_C_10_72	Human feces
CRC21.g	EU564001	95†	DQ905141	Uncultured bacterium clone 002C-d6	Human feces
C13.b	EU563992	96	CP002843.1	<i>Streptococcus parasanguinis</i> ATCC 15912	Type strain
C11.f	HQ172018	96	DQ905141.1	Uncultured bacterium clone 002C-d6	Piglet gastrointestinal tract
C41.f	HQ172082	96	DQ346437.2	Uncultured <i>Streptococcus</i> sp. clone 2.8	Human mouth
CRC15.a	HQ172024	96	AF064441.1	<i>Streptococcus difficile</i>	Type strain
CRC16.b	EU563986	96	AM157451	<i>Streptococcus salivarius</i>	Human breast milk
CRC19.c	EU563995	96	EF071403	<i>Enterococcus faecium</i> (T); DSM20477	Human colonic mucosa
CRC21. c	EU563997	96	AY854277	Uncultured bacterium clone CATTLE_15	Herbivore GIT
CRC24a	HQ172044	96	EU071467.1	Uncultured <i>Mogibacterium</i> sp. clone EHFS1_S01c	ESTEC HYDRA facility
CRC25.a	HQ172049	96	AY239440.1	Uncultured bacterium clone rc5-46	Rat feces
CRC26.b	HQ172054	96	AM157420.1	<i>Streptococcus mitis</i> clone 4C3	Type strain
C10.a	EU563984	97	DQ905402	Uncultured bacterium clone 013C-C10	Human feces
C14.b	HQ172023	97	CP000725.1	<i>Streptococcus gordonii</i> str. Challis substr. CH1	Type strain

Table 39. Continued

Sample	Accession number	Max Id (%)	Nearest sequence	Description	Source
C38.e	HQ172076	97	DQ905095.1	Uncultured bacterium clone 2-002-h7	Homo sapiens fecal sample
CRC19.a	EU563994	97	DQ677551	<i>Streptococcus mitis</i> (T); ATCC 49456	Human saliva
CRC21.f	EU564000	97	EF405369	Uncultured bacterium clone SJTU_G_02_85	Human feces
CRC21.h	EU564002	97	DQ905380	Uncultured bacterium clone 013C-A11	Human feces
CRC24b	HQ172045	97	AM157419.1	<i>Streptococcus salivarius</i> clone 3C3	Type strain
CRC25.e	HQ172052	97	EF401722.1	Uncultured bacterium clone SJTU_D_15_85	Human feces
CRC29.e	HQ172062	97	EF405369.1	Uncultured bacterium clone SJTU_G_02_85	Human feces
CRC37.d	HQ172074	97	EU530367.1	Uncultured <i>Oscillospira</i> sp. clone M4-8	Adenoma CRC
CRC4.b	EU563980	97	EF404405	Uncultured bacterium clone SJTU_C_09_54	Human feces
CRC4.e	EU563983	97	DQ905141	Uncultured bacterium clone 002C-d6	Human feces
CRC46.d	HQ172089	97	GQ897539.1	Uncultured bacterium clone A1-165	Human feces
CRC48.d	HQ172092	97	AM946016.1	<i>Streptococcus suis</i> P1/7	Type strain
CRC7.d	HQ172008	97	EF404797.1	Uncultured bacterium clone SJTU_C_10_72	Human fecal sample
UC195.44	JN086235	97	HQ172083.1	Uncultured bacterium clone 41.g	Colonic mucosa biopsy
C11.a	HQ172013	98	AF543299.1	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	Type strain
C11.b	HQ172014	98	AM157419.1	<i>Streptococcus salivarius</i> clone 3C3	Type strain
C11.d	HQ172016	98	EF990662.1	<i>Streptococcus thermophilus</i> strain T1	Type strain
C11.e	HQ172017	98	DQ238614.1	Uncultured bacterium clone 7	Piglet gastrointestinal tract
C39.a	HQ172078	98	GQ898359.1	Uncultured bacterium clone S2-74	Human feces
C45.d	HQ172087	98	DQ677788.1	<i>Streptococcus mutans</i> strain ChDC YM15	ChDC YM15; 9111
C47.e	HQ172091	98	EF071175.1	Uncultured Firmicutes bacterium clone M0015_044	Colonic mucosal biopsy
CD173.2	JN086232	98	NR_024842.1	<i>Streptococcus parasanguinis</i> strain ATCC 15912	Type strain

Table 39. Continued

Sample	Accession number	Max Id (%)	Nearest sequence	Description	Source
CD175.11	JN086225	98	HQ289887.1	<i>Enterococcus faecalis</i> clone 7C4	Midgut
CRC12.c	HQ172021	98	EF405297.1	Uncultured bacterium clone SJTU_G_03_78	Human feces
CRC15.f	HQ172029	98	EF404797.1	Uncultured bacterium clone SJTU_C_10_72	Human feces
CRC16.e	EU563989	98	AY959090	<i>Streptococcus intermedius</i> (T); ATCC27335	Human vaginal epithelium
CRC16.g	EU563991	98	AY959090	<i>Streptococcus intermedius</i> (T); ATCC27335	Human vaginal epithelium
CRC21.i	EU564003	98	EF406903	Uncultured bacterium clone DSS_7DAYS_C05_T7P	Mouse colon
CRC21.j	EU564004	98	EF406903	Uncultured bacterium clone DSS_7DAYS_C05_T7P	Mouse colon
CRC22.c	HQ172037	98	AF009503.1	<i>Streptococcus suis</i>	Type strain
CRC22.d	HQ172038	98	EF404797.1	Uncultured bacterium clone SJTU_C_10_72	Human feces
CRC22.e	HQ172039	98	EF404797.1	Uncultured bacterium clone SJTU_C_10_72	Human feces
CRC22.f	HQ172040	98	EF401722.1	Uncultured bacterium clone SJTU_D_15_85	Human feces
CRC23.a	HQ172041	98	DQ016719.1	Uncultured Streptococcus sp. clone 4.8	Human mouth
CRC23.b	HQ172042	98	AM157421.1	<i>Streptococcus parasanguis</i> clone 5C3	Breast milk
CRC26.f	HQ172057	98	AY278632.1	<i>Streptococcus genomosp.</i> C4	Human mouth
CRC27.b	HQ172060	98	DQ238614.1	Uncultured bacterium clone 7	Piglet gastrointestinal tract
CRC30.a	HQ172063	98	DQ238614.1	Uncultured bacterium clone 7	Piglet gastrointestinal tract
CRC36.b	HQ172072	98	DQ905437.1	Uncultured bacterium clone 013C-F11	Homo sapiens fecal sample
CRC37.c	HQ172073	98	DQ677551.1	Uncultured <i>Streptococcus sp.</i> clone D01	Human saliva
CRC4.c	EU563981	98	EF401722	Uncultured bacterial clone	Human feces
CRC46.c	HQ172088	98	EF403999.1	Uncultured bacterium clone SJTU_C_03_37	Human feces
CRC9.d	HQ172011	98	EF404275.1	Uncultured bacterium clone SJTU_C_07_50	Human feces
CRC9.e	HQ172012	98	EF404458.1	Uncultured bacterium clone SJTU_C_10_35	Human feces
C11.c	HQ172015	99	AM157421.1	<i>Streptococcus parasanguis</i> clone 5C3	Type strain

Table 39. Continued

Sample	Accession number	Max Id (%)	Nearest sequence	Description	Source
C13.c	EU563993	99	AM157442	<i>Str. pneumoniae</i> 4V4	Human breast milk
C14.a	HQ172022	99	AM157420.1	<i>Streptococcus mitis</i> clone 4C3	Type strain
C32.a	HQ172066	99	HM803934.1	<i>Leuconostoc citreum</i> strain B/110-1-3	Type strain
C33.a	HQ172067	99	AY581143.1	<i>Streptococcus vestibularis</i> isolate b88	<i>Sialia sialis</i>
C33.b	HQ172068	99	DQ346427.2	Uncultured <i>Streptococcus sp.</i> clone 4.5	Human mouth
C33.d	HQ172069	99	GQ896957.1	Uncultured bacterium clone C3-13	Feces
C34.b	HQ172070	99	AM157442.1	<i>Streptococcus pneumoniae</i> clone 4V4	Breast milk
C34.c	HQ172071	99	EF401144.1	Uncultured bacterium clone SJTU_D_06_31	Human feces
C38.c	HQ172075	99	AM946016.1	<i>Streptococcus suis</i> P1/7	Type strain
C38.f	HQ172077	99	DQ905095.1	Uncultured bacterium clone 2-002-h7	<i>Homo sapiens</i> fecal sample
C40.a	HQ172079	99	AM157442.1	<i>Streptococcus pneumoniae</i> clone 4V4	Breast milk
C41.c	HQ172080	99	GQ422711.1	<i>Streptococcus sp.</i> oral taxon 070 strain Hans 12F	Dental plaque
C41.e	HQ172081	99	GQ422711.1	<i>Streptococcus sp.</i> oral taxon 070 strain Hans 12F	Dental plaque
C41.g	HQ172083	99	GQ897035.1	Uncultured bacterium clone C3-94	Human feces
C42.a	HQ172084	99	GQ897472.1	Uncultured bacterium clone A1-165	Human feces
C44.c	HQ172085	99	AY581143.	<i>Streptococcus vestibularis</i> isolate b88	<i>Sialia sialis</i>
C44.d	HQ172086	99	AF432136.1	<i>Streptococcus sp.</i> oral clone FO042	Tongue dorsum scrapings
C51.c	HQ172096	99	FJ378680.1	<i>Enterococcus faecium</i> strain HN-N25	Type strain
C51.e	HQ172097	99	EU541439.1	<i>Clostridium orbiscindens</i> strain AIP029.07	Type strain
CD167.21	JN086233	99	HQ172097.1	<i>Clostridium orbiscindens</i> strain AIP165.06	Type strain
CD175.10	JN086231	99	AF323911.1	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	Colonic mucosa biopsy
CD193.9	JN086230	99	AY005043.1	<i>Streptococcus sp.</i> oral clone BM035	Subgingival dental plaque
CRC12.a	HQ172019	99	AB200871.1	<i>Streptococcus thermophilus</i> strain:DL1	Type strain

Table 39. Continued

Sample	Accession number	Max Id (%)	Nearest sequence	Description	Source
CRC12.b	HQ172020	99	AY986765.1	<i>Streptococcus anginosus</i> strain ChDC YA13	Type strain
CRC15.b	HQ172025	99	AY959207.1	Uncultured bacterium clone rRNA434	Human vaginal epithelium
CRC15.d	HQ172027	99	AF253396.1	Uncultured bacterium (human infant) P10J	Intestine of newborn
CRC15.e	HQ172028	99	EF404797.1	Uncultured bacterium clone SJTU_C_10_72	Human feces
CRC16.c	EU563987	99	GQ897035.1	Uncultured bacterium clone C3-94	Human feces
CRC16.d	EU563988	99	AY138233	<i>Streptococcus uberis</i> (T); ATCC 19436	Human estomach biopsy
CRC16.f	EU563990	99	AY959090	<i>Streptococcus intermedius</i> (T); ATCC27335	Human vaginal epithelium
CRC17.a	HQ172031	99	EF401722.1	Uncultured bacterium clone SJTU_D_15_85	Human feces
CRC17.b	HQ172032	99	AY327523.1	<i>Streptococcus bovis</i> RD11	Type strain
CRC19.d	EU563996	99	EF405528	<i>Clostridium orbiscindens</i> (T); DSM 6740	Human feces
CRC2.a	HQ172002	99	Z36296.1	<i>E. timidum</i> (ATCC 33093)	Type strain
CRC2.b	HQ172003	99	CP000725.1	<i>Streptococcus gordonii</i> str. Challis substr. CH1	Type strain
CRC2.c	HQ172004	99	AM491819.1	<i>L. kimchii</i> isolate R-32669	Mediterran. atmosphere
CRC2.d	HQ172005	99	AF432136.1	<i>Streptococcus</i> sp. oral clone FO042	Tongue dorsum scrapings
CRC20.a	HQ172034	99	AF515228.1	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> strain RO1	Type strain
CRC21.d	EU563998	99	EF404797	Uncultured bacterium clone SJTU_C_10_72	Human feces
CRC22.b	HQ172036	99	CP000725.1	<i>Streptococcus gordonii</i> str. Challis substr. CH1	Type strain
CRC24.c	HQ172046	99	AY518677.1	<i>Streptococcus mitis</i> strain Sm91	Type strain
CRC24.e	HQ172048	99	AJ488093.1	Uncultured bacterium clone IIIA-3	Environmental_sample
CRC25.c	HQ172050	99	EF404797.1	Uncultured bacterium clone SJTU_C_10_72	Human feces
CRC25.d	HQ172051	99	EF404797.1	Uncultured bacterium clone SJTU_C_10_72	Human feces
CRC26.c	HQ172055	99	AM295007.1	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Type strain
CRC26.d	HQ172056	99	AM157419.1	<i>Streptococcus salivarius</i> 16S clone 3C3	Type strain

Table 39. Continued

Sample	Accession number	Max Id (%)	Nearest sequence	Description	Source
CRC27.a	HQ172059	99	Z36296.1	<i>E. timidum</i> (ATCC 33093)	Type strain
CRC29.d	HQ172061	99	EU530367.1	Uncultured <i>Oscillospira</i> sp. clone M4-8	Adenoma colorectal cancer
CRC30.c	HQ172064	99	GQ898188.1	Uncultured bacterium clone S1-99	Human feces
CRC31.b	HQ172065	99	AM278864.2	Uncultured bacterium clone AP13U.74	Human feces
CRC48.e	HQ172093	99	EF403999.1	Uncultured bacterium clone SJTU_C_03_37	Human feces
CRC50.d	HQ172094	99	GQ871739.1	Uncultured bacterium clone MM11	Cecum mucosa
CRC50.f	HQ172095	99	EF403999.1	Uncultured bacterium clone SJTU_C_03_37	Human feces
CRC52.f	HQ172098	99	GQ422711.1	<i>Streptococcus</i> sp. oral taxon 070 strain Hans 12F	Dental plaque
CRC53.a	HQ172099	99	DQ905141.1	Uncultured bacterium clone 002C-d6	Human feces
CRC54.d	HQ172100	99	EU337116.1	<i>Enterococcus lactis</i> strain SK12	Type strain
CRC55.b	HQ172101	99	AM157421.1	<i>Streptococcus parasanguis</i> clone 5C3	Type strain
CRC55.c	HQ172102	99	AY986765.1	<i>Streptococcus anginosus</i> strain ChDC YA13	Type strain
CRC57.b	HQ172104	99	DQ346427.2	Uncultured <i>Streptococcus</i> sp. clone 4.5	Human mouth
CRC58.a	HQ172105	99	EU660206.1	<i>Streptococcus thermophilus</i> strain klds3.9206	Type strain
CRC59.c	HQ172106	99	GQ896957.1	Uncultured bacterium clone C3-13	Human feces
CRC60.c	HQ172107	99	GQ897646.1	Uncultured bacterium clone A2-147	Human feces
CRC7.a	HQ172006	99	AF543299.1	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	Type strain
CD174.25	JN086226	100	AM157433.1	<i>Enterococcus faecalis</i>	Breast milk
CD174.26	JN086227	100	AM157433.2	<i>Enterococcus faecalis</i>	Breast milk
CD184.27	JN086228	100	AM157419.1	<i>Streptococcus salivarius</i> clone 3C3	Type strain
CRC15.c	HQ172026	100	AY959207.1	Uncultured bacterium clone rRNA434	Human vaginal epithelium
CRC18.a	HQ172033	100	AM157433.1	<i>E. faecalis</i> clone 7C4	Type strain
CRC22.a	HQ172035	100	AY986765.1	<i>Streptococcus anginosus</i> strain ChDC YA13	Type strain

Table 39. Continued

Sample	Accession number	Max Id (%)	Nearest sequence	Description	Source
CRC23.c	HQ172043	100	EF401722.1	Uncultured bacterium clone SJTU_D_15_85	Human feces
CRC24.d	HQ172047	100	AY986765.1	<i>Streptococcus anginosus</i> strain ChDC YA13	Type strain
CRC26.g	HQ172058	100	AM157442.1	<i>Streptococcus pneumoniae</i> clone 4V4	Type strain
CRC57.a	HQ172103	100	AM157451.1	<i>Streptococcus salivarius</i> clone 1V5	Breast milk
CRC7.b	HQ172007	100	CP002925.1	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i> IS7493	Type strain
CRC8.a	HQ172009	100	EF593060.1	Uncultured <i>Leuconostoc sp.</i> clone 41b	Predigester slurry

Novel phylotypes with identities $\leq 95\%$ to any NCBI/EMBL sequence are indicated (+)

3.3.4 Comparison between culturing and PCR-DGGE approaches

Twelve streptococcal species were identified by both, culturing and molecular techniques. Uncultured *Streptococcus*, as well as the phylogenetically related *Eubacterium sp.* and *Enterococcus sp.* were also detected. All the species identified by either method are listed in Table 15. Of the total streptococcal species identified in this study, 66.6% were obtained by culturing methods whereas PCR-DGGE recognized 95.6%, Streptococci identified by both methods were up to 52% (Figure 30).

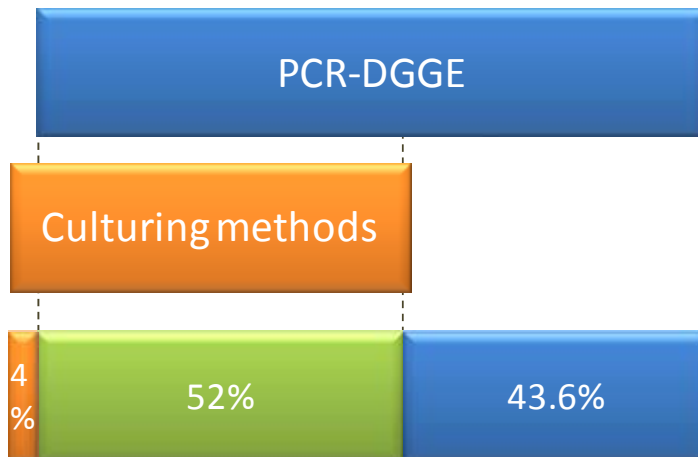


Figure 30. Contribution of culturing and molecular approaches to identify streptococcal species in a given sample. PCR-DGGE identifies 95.6% of all streptococci, which 43.6% are uniquely detected by molecular methods.

Using culturing-based methods, we found that *S. salivarius*, *S. parasanguis* and *S. anginosus* were the most abundant with 43.8%, 35% and 23% respectively. In contrast, the abundance by using molecular approaches was low in all streptococcal species, as they were more evenly distributed with frequencies under 15% (Table 40). Using both techniques, the *anginosus* group was found to be more prevalent in CRC patients than in healthy controls.

Table 40. Streptococcal species identified by culturing and DGGE. Abundance of the species in relation to the subjects.

Specie	Culturing	DGGE	Cult + DGGE	Culturing % subjects	DGGE % subjects
<i>S. salivarius</i>	+	+	+	43,75	10,2
<i>S. parasanguinis</i>	+	+	+	35,3	6,8
<i>S. anginosus</i>	+	+	+	23,5	6,8
<i>S. pneumoniae</i>	+	+	+	5,9	10,2
<i>S. oralis</i>	+	+	+	17,6	11,9
<i>S. intermedius</i>	+	+	+	5,9	1,7
<i>S. agalactiae</i>	+	+	+	5,9	-
<i>S. gordonii</i>	+	+	+	5,9	8,5
<i>S. difficile</i>	+	+	+	5,9	1,7
<i>S. pasteurianus</i>	+	-	-	5,9	-
<i>S. sanguis</i>	+	+	+	11	1,7
<i>S. thermophilus</i>	-	+	-	-	10,2
<i>S. mitis</i>	+	+	+	11	8,5
<i>S. mutans</i>	-	+	-	-	1,7
<i>S. thoraltensis</i>	-	+	-	-	1,7
<i>S. bovis</i>	-	+	-	-	1,7
<i>S. pyogenes</i>	-	+	-	-	1,7
<i>S. uberis</i>	-	+	-	-	1,7
<i>S. suis</i>	+	+	+	35,2	8,5
<i>S. vestibularis</i>	-	+	-	-	11,9
<i>S. genomosp.</i>	-	+	-	-	1,7
Uncultured Streptococcus	+	+	+	23,5	16,9
Uncultured bacterium	-	+	-	-	59,3

CHAPTER 4

Case Report Enterococcus faecalis infection with Colorectal Cancer. Identification by a 16S rRNA molecular approach

4.1 Introduction

Enterococcus faecalis is a lactic acid bacteria that formed part of the group D *Streptococcus* as *Streptococcus faecalis* until 1984 when it was reclassified as *E. faecalis* [253]. *E. faecalis* is a minority constituent of the colonic microbiota but can directly damage epithelial-cell DNA [141], promote chromosomal instability (CIN) through a macrophage-induced bystander effect [124] and trigger colitis and cancer in interleukin (IL)-10 knockout mice [122]. These effects are derived in part from the redoxactive phenotype of *E. faecalis* that occurs when this microorganism is grown without haematin [254] and leads to a block in respiration and the production of superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radical [140, 141]. These reactive oxygen species are known to damage DNA [255].

The aim of this study was to present a report on a case of bacterial infection associated with colorectal cancer. Identification of the causative organism was performed by polymerase chain reaction (PCR) combined with denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) followed by 16S rRNA sequencing.

4.2 Case report

A 77-year old man consulted Hospital Sta. Caterina's emergency room because of abdominal pain, diarrhea without blood and worsening of the general condition. He was admitted to study and control the condition. On interrogation he explained a history of pathologic iron deficiency anemia who had been studied with colonoscopy 5 years before with the discovery of cecal angiodysplasia.

On physical examination, abdominal pain and fever (37.3°C) were present, and he was pale. Abdominal exploration did not show signs of peritoneal irritation. No masses or enlarged viscera were palpated. The blood test showed microcytic hypochromic anemia with Hemoglobin 7.6 g/dL and leukocytosis with deviation to the left with 34.300 K/MCL. A simple abdominal X rays rejected an intestinal occlusion. Abdominal computed tomography did not show free fluid or pneumoperitoni as well as rejected internal collections. Patient was nonsmoker, non-alcohol consumer and did not present risk diseases for colorectal cancer or ischemic colitis as diabetes or hypertension.

He was admitted with presumptive diagnosis of acute diverticulitis, antibiotic therapy (cephalosporins 2 gr/ 8 hours) was started and blood transfusion and colonoscopy were performed. Colonoscopy showed a vegetated and infiltrative lesion in the splenic angle. It was found in the ascending colon, including the hepatic angle, a severe inflammation with edema and erythema of the mucosa and ulcerated colonic mucosa in some areas with a rigid fibrin deposit. Histological examination revealed the presence of adenocarcinoma at the splenic angle and right colon biopsies diagnosed that the source of the inflammatory process was an ischemic colitis (IC) (Figure 31). No microorganism culturing processes were performed. In addition, colonic mucosal biopsies surrounding the tumor were collected and placed to the Microbiology laboratory of the University of Girona to further microbial examination.

With the diagnosis of advanced colonic neoplasia in the splenic angle and associated ischemic colitis extended to the right colon, subtotal colostomy with ileo-sigmoid anastomosis was performed.

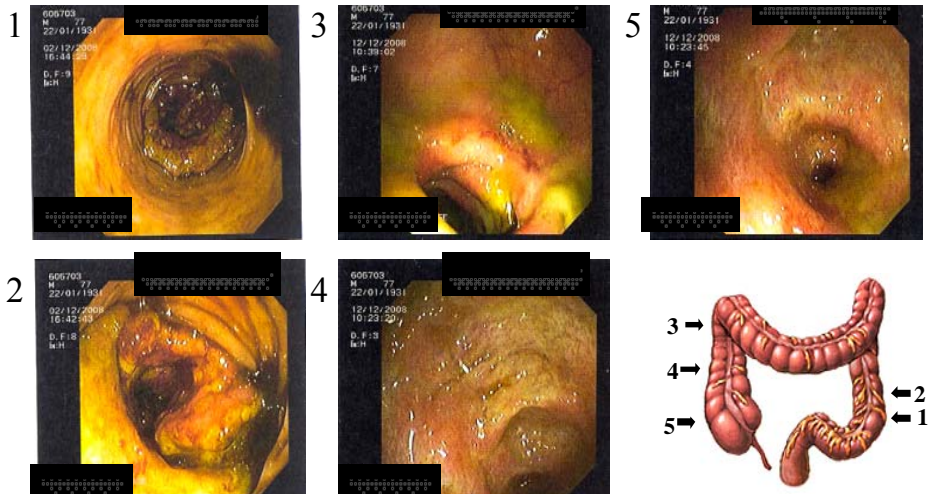


Figure 31. Colonoscopy images from the tumour at 60-70cm (1 and 2) and from the ischemic colitis along the right colon (3, 4 and 5).

A piece of 55-cm colon plus a 15-cm segment of small bowel were examined. Upon opened section, there was a 4,2 x 3,7-cm tumor which occupied the entire circumference and had 2,2 cm from the distal margin. It involved and surpassed the muscle layer affecting the surrounding adipose tissue. On the antimesenteric side, it contacted the serosa.

Microscopic analysis showed a malignant neoplasm infiltration constituted by a proliferation of irregular glands, anastomosed, covered by a single epithelium and pseudostratified and cells with increased in size and hyperchromatic nuclei and diminished cytoplasm. Abundant mucoid material forming large lakes in some acellular areas were observed between glands. The tumor infiltrated beyond the muscular capsule locating from the antimesenteric band within 0.1 cm from the serosa, affecting also the adjacent fat. Vascular invasion was observed and two of the 13 lymph node were metastatic without capsule rupture, the biggest one of 0.4 cm. The lesion was classified as pT3N1. The remaining proximal colonic mucosa presented ischemic colitis and inflammatory changes were consistent.

Having not received antibiotic treatment on the postoperative period in the seventh day, the patient presented a picture of abdominal pain and vomiting. The blood sample showed the presence of leukocytosis with deviation to the left. With suspected infectious-related post-surgical complication, one abdominal CT scan was performed which showed an intraabdominal subhepatic collection plus a subcutaneous collection under the scar. Both collections were punctured obtaining a brownish fluid that was subsequently cultured. Both cultures gave positive *Enterococcus faecalis* resistant to cephalosporin with β -lactamase positive and *Escherichia coli*. The treatment consisted on drainage of the collection plus antibiotic, Imipenem, with good clinical response and resolution of the clinical process. The patient was discharged without the incidence on the day 17 after surgery.

At the same time, colonic mucosal biopsies were processed at the Microbiological laboratory of the University of Girona. Biopsy samples were subjected first to two mild ultrasound wash cycles in order to discard all loose and transient bacteria and keep those bacteria that were highly-intimately adhered to the colonic mucosa. DNA was extracted with the NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nägel) following the manufacturer's instructions. The bacterial 16S rRNA based primers, PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) and sequencing were described previously [92]. Quantification of *E. faecalis* was also described previously [209]. To normalize biopsy size, human cell quantification was performed using the Control RTi-CKFT-18S kit (Eurogentec, Belgium).

DGGE gel image provided the bacterial fingerprint of the bacterial community (Figure 32). Interestingly, there was a majority band present in the sample. Sequencing analysis identified that band as *E. faecalis*

(GenBank Accession Number GQ411112). *E. faecalis* abundance was 80322.8 copies, which normalized was Log 4.819.

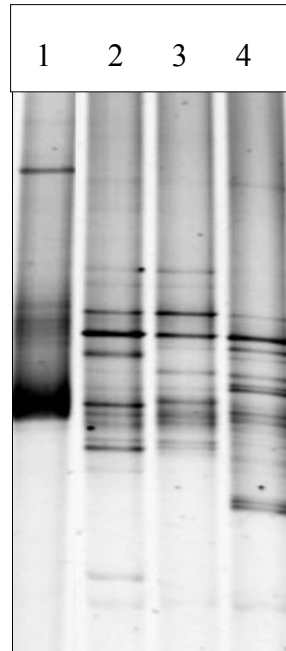


Figure 32. DGGE gel profile of CRC patients. Lane 1, bacterial fingerprint of the case patient. Faint bands were observed in the upper part and a dense band was observed in the lower part of the gel, which corresponded to *E. faecalis*. Lanes 2, 3 and 4 belonged to CRC patients with normal bacterial profile.

4.3 Discussion

The human colon harbors a high and diverse bacterial community [61], which has an important role in the maintenance of the human body providing protective, metabolic and trophic functions. The influence of each microorganism depends on the kind of metabolism and the products that can be used or not by the host. Some commensal bacteria have been described as opportunistic pathogen when environmental conditions favor their growing [33, 131, 155, 165, 256]. Etiology of sporadic colorectal cancer is not well known perhaps it is accepted that is a multifactorial disease. Factors described in the onset of CRC included diet [88, 257,

258], age [50], tobacco consumption [51], diabetes [44, 259] and microbiota [66, 152, 153, 260]. Although bacterial etiology of colorectal cancer has not been yet well established, microbiota is thought to produce a state of continual low-grade inflammation that may contribute to colon carcinogenesis [261]. The exact mechanisms underlying infection-related colonic tumorigenesis remain unclear, but inflammation-related oxidative stress and DNA damage are believed to be important contributors in CRC development [262]. *Enterococcus faecalis*, a prominent member of the gastrointestinal microbiota, behave as a normal resident of the intestinal ecosystem. Nevertheless, different studies linked this bacterium with colorectal cancer. It was demonstrated that the oxidative physiology of *E. faecalis* promoted chromosomal instability (CIN) in mammalian cells [124], an might enhance epithelial cell susceptibility to DNA damage through the activation of tissue macrophages and by modulating apoptosis in epithelial cells [254]. Furthermore, quantitative analysis of *E. faecalis* of CRC fecal samples suggested an association with CRC [157].

However, the role of *Enterococcus faecalis* is uncertain in this case. Biopsy samples were taken 4 days after admission and cephalosporin treatment underwent. At this point, two hypotheses could be accepted to explain this case. First, abdominal pain and fever were caused by bacterial infection and as consequence IC and CRC were detected. As it was described above, *E. faecalis* has the potential role to induce colonic carcinogenesis via toxic metabolites which damage DNA. This would be the first *E. faecalis*-related case found in the literature, which could demonstrate *in vivo* the ability of *E. faecalis* to become a risk for colorectal cancer development. Second, patient was admitted because of the IC and the neoplasia and *E. faecalis* infection was produced lately because of cephalosporin treatment. Enterococci have a remarkable ability to survive in an environment of heavy antibiotics. Resistance against

multiple antimicrobial agents has been recognized [263-265]. In particular, cephalosporin may produce alterations in bacterial flora with enterococcal overgrowth, especially in the gut, which may be a risk for *E. faecalis* infection [266]. In individuals undergoing antibiotic treatment or those who are immunocompromised, *E. faecalis* is able to colonize new niches of the intestinal microenvironment [267] due to antibiotic resistance (Figure 33).

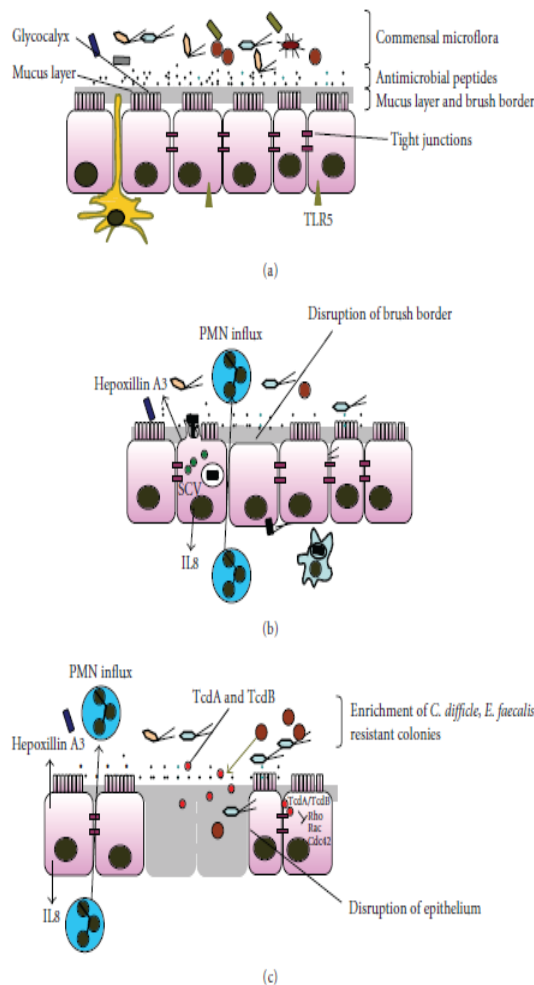


Figure 33. (a) Healthy epithelial surface. (b) Key features of *S. typhimurium* infected epithelium. Chemoattractants are secreted by the epithelial surface that leads to PMN influx. SCV: Salmonella containing vacuole (c) Intestinal epithelial surface of an antibiotic-treated patient showing enrichment of a set of antibiotic resistant members of the commensal microbiota such as *C. difficile* and *E. faecalis*. [267].

DNA-based molecular approaches gradually are replacing or complementing culture-based, biochemical, and immunological assays in routine microbiology laboratories. Non-culture-based molecular testing has the advantage of avoiding the delays of days to weeks for conventional culture to allow early recognition (weiler). In particular, different tools used in this study as PCR combined with DGGE and quantitative PCR offered a wide view of the colonic mucosa bacterial community and determined the bacterial load of the given sample. The bacterial fingerprint showed up the existence of an infection. 16S rRNA sequencing identified the main phylotype as *E. faecalis*. Abundance of this bacterium (Log= 4.81) was also highly significant (p=0.004) when compared with healthy controls (Log= 2.41) (data not shown).

E. faecalis antibiotic resistance until surgery gave the chance to overgrowth together with *E. coli* and developed an intraabdominal subhepatic collection. Specific antimicrobial treatment with Imipenem was performed and bacteria were eliminated. The presence of *E. faecalis* suggested the deficient effectiveness of cephalosporin treatment before surgery and the needed of an accurate antimicrobial treatment when

An accurate identification of *Enterococcus faecalis* was performed using colonic mucosal biopsy samples. The role of this bacterium in clinical infections may be present in patients who present fever, abdominal pain or diarrhea in order to avoid further infections. Microbiological molecular methods have found out an important infection caused by *E. faecalis*. The usefulness of molecular techniques may be a support tool to medical diagnosis to prevent potential infections.

DISCUSSIÓ

Discussió

El càncer va ser descrit per primer cop Hipòcrites (460-375 aC), però no va ésser fins els segles XIX i XX que es va profunditzar en el seu coneixement. El càncer colorectal, un dels més abundants del món occidental, va ésser particularitzat per Fearon i Vogelstein [17] el 1990 amb un model bastat en la seqüència adenoma-carcinoma que proposa que les mutacions de la cèl·lula germinal o les mutacions somàtiques són necessàries per a la transformació maligne. L'acumulació de múltiples mutacions genètiques determinen el comportament biològic del tumor. L'origen d'aquestes mutacions pot ser hereditari (genètic) o ambiental. Tant els factors endògens com els exògens poden afectar en la tumorigènesi no essent exclusius l'un de l'altre. L'interès per la microbiota intestinal va sorgir a durant la segona meitat del segle XX [118-120, 201, 268] i, fins l'actualitat els bacteris estan essent un important punt d'investigació per esbrinar la seva possible implicació en el desenvolupament del CCR.

El principal objectiu d'aquest treball era descriure la microbiota de la mucosa intestinal en malalts de càncer colorectal, comparant-los amb individus sans utilitzats com a control, per tal d'identificar possibles bacteris associats a aquesta malaltia. Aquesta descripció s'ha realitzat de manera qualitativa i quantitativa utilitzant diferents aproximacions metodològiques basades tant en el cultiu clàssic com en tècniques moleculars basades en l'ADN [214, 224, 269, 270]. L'ús de tècniques moleculars han permès en els darrers anys conèixer a un elevat nivell de precisió la comunitat bacteriana intestinal. Les tècniques tradicionals basades en l'aïllament i cultiu tenen un seguit de limitacions que impedeixen tenir una visió acurada. Entre aquests problemes, destaca el fet que un alt percentatge dels bacteris que habiten el tracte intestinal són

anaerobis obligats que habiten en nínxols que els proporcionen uns requeriment nutricionals i unes condicions fisiològiques òptimes pel seu creixement, i que malauradament encara no s'han pogut cultivar *in vitro*. En canvi, mitjançant tècniques moleculars, es va realitzar una descripció qualitativa utilitzant la PCR combinada amb la DGGE [63, 77], que tot i no fer una anàlisi exhaustiva de les mostres pel biaix que produeix en sí la PCR, permet l'obtenció d'un patró bacterià en un gran nombre de mostres, que és comparable amb d'altres mostres, que permet identificar filotips bacterians mitjançant la seqüenciació, i que té un cost més baix respecte altres tècniques més precises com la clonació o la piroseqüenciació, les quals han permès aprofundir en la composició de la comunitat bacteriana [61, 64, 271]. L'anàlisi quantitativa de determinades espècies bacterianes feta en aquest treball s'ha realitzat mitjançant la PCR a temps real, la qual permet la detecció de determinats bacteris o grups bacterians de manera ràpida, fiable i reproducible. [153, 209, 211, 227, 228].

Un altre factor que diferencia aquest treball de la gran majoria d'estudis similars és la utilització de biòpsies fresques de mucosa intestinal obtingudes mitjançant colonoscòpia, enlloc de mostres fecals. Aquest punt és clau per entendre millor la microbiota adherida a la mucosa intestinal, la qual és diferent de la que es troba en mostres fecals [61, 63], i per tant, per comprendre el seu paper en el tracte intestinal i el contacte amb l'hoste.

1. Composició Microbiana

Un dels principals objectius d'aquesta tesi era conèixer la diversitat microbiana en mostres intestinals de malalts de càncer colorectal. En un primer pas, s'ha procedit a fer una comparació entre els teixits tumoral i mucós per determinar si existeixen diferències en el patró microbià

d'ambdós teixits. Aquest punt ha estat clau per definir el tipus de mostra que s'utilitzaria en tot aquest treball. En estudis previs realitzats en el nostre laboratori sobre la malaltia de Crohn [92] ja utilitzaven mostres de mucosa intestinal no afectada, però en el cas de l'estudi del càncer, ha estat important conèixer si el microambient envoltant el tumor influeix en la distribució i composició de la microbiota al llarg del còlon i el recte.

Aquest treball és el primer que analitza el perfil de la comunitat microbiana intestinal en pacients amb CCR mitjançant la PCR-DGGE, encara que Scanlan [150] va ser el primer autor en estudiar la diversitat dels subgrups *Clostridia leptum* i *Clostridia coccoides* en aquests malalts utilitzant mostres fecals. La PCR-DGGE, malgrat produir un biaix afavorint l'amplificació d'aquells fragments de DNA més abundants, proveeix una visió general de la composició bacteriana, el seu cost és baix, i és altament reproduïble [77]. Recentment, però, s'han publicat diversos treballs que analitzen la comunitat bacteriana en el CCR mitjançant altres aproximacions metodològiques moleculars [152-154], però amb l'eina utilitzada, malgrat que produeix un biaix.

1.1 Teixit tumoral vs. teixit mucós

El patró microbià associat als teixits tumoral i mucós de malalts de CCR, així com l'associat a teixits poliposos i mucosos, respectivament, de pacients amb PP, no s'ha vist alterat, excepte per un pacient. Aquest pacient és l'únic descrit amb un CCR familiar, on no s'han trobat estudis específics de la microbiota associada a aquest tipus de càncer. A més, les diferències en la similitud entre mostres d'un mateix subjecte han resultat ser inferiors al 20%. En pacients amb PP no s'ha identificat cap banda del gel DGGE diferencial entre els dos tipus de mostres, però en pacients amb CCR se'n han identificat 27. Un cop relacionades totes les bandes en el

conjunt de tots els pacients cap ha resultat ser significativament ($p < 0.05$) més abundant en un tipus de teixit o en un altre. Malgrat això, cal remarcar que filotips com *Fusobacterium sp.* són relativament més comuns en mostres de teixit mucós, i al contrari, *Ruminococcus sp.* i *Prevotella sp.* s'han trobat en major freqüència en teixit tumoral. Tot i així, Marchesi i col·laboradors [154] van observar diferents patrons microbians en ambdós tipus de mostra en un estudi realitzat amb 6 pacients amb CCR, i tampoc varen trobar bacteris potencialment patogènics associats al teixit tumoral. Però cal remarcar que l'esmentat treball va utilitzar l'aproximació metodològica de la *nested-PCR*, és a dir, una PCR amb encebadors genèrics seguida d'una segona PCR amb encebadors específics, la qual produeix un biaix important en l'amplificació dels fragments de DNA de la comunitat microbiana present en la mostra. A més, no especifiquen si la malaltia és per causa esporàdica o familiar, fet que canviaria la interpretació dels resultats segons el que s'ha vist en aquest treball. En aquest darrer cas seria necessari un estudi més exhaustiu per esbrinar si el càncer colorectal familiar porta associada una alteració en el patró microbià, ja que no existeixen treballs centrats en aquesta matèria.

1.2 Diversitat microbiana en la mucosa intestinal de malalts de CCR vs. controls sans i associació amb factors de risc del CCR

Un cop es va comprovar l'elevada similitud entre els patrons microbians de mostres tumorals i mucoses, es va prosseguir utilitzant biòpsies fresques de la mucosa intestinal propera al tumor donada la major disponibilitat d'aquest tipus de mostra en front de les mostres tumorals. Aquestes generalment són més escasses i s'utilitzen a la unitat de patologia dels hospitals per tal d'analitzar-les amb major profunditat.

Els perfils microbians obtinguts per PCR-DGGE de mostres de malalts i controls no han resultat ser tan clarament distingibles com, per exemple, de la malaltia de Crohn [92]. No obstant, la classificació jeràrquica i l'anàlisi clúster dels patrons microbians han proporcionat un grup (clúster 1) associat a mostres control, i dos clústers, els 4 i 5 relacionats amb el CCR amb un 63.4% de les mostres de CCR ($p=0,026$). A més, al clúster 5 s'hi han associat característiques dels pacients, com ara ser exfumadors o la diabetis ($p=0,003$ i $p=0,000$ respectivament), les quals estan descrites com a factors de risc per desenvolupar un CCR [48, 51, 259, 272]. El resultat de l'anàlisi jeràrquica i clúster no és comparable amb cap altre estudi, tot i que és interessant destacar els resultats obtinguts per Shen [152] mitjançant l'anàlisi de fragments de restricció terminal (T-RFs) que van distingir dos clústers diferenciats, un associat al CCR (73,7% casos, 26,35% controls) i l'altre a controls (72% controls, 28% casos). Tot i així, cal remarcar que era interessant separar els no fumadors en exfumadors i no fumadors reals donada la importància que té aquest factor durant els anys posteriors a deixar el consum de tabac. Possiblement, no s'ha trobat relació amb els fumadors actius per l'elevat biaix que té el grup mostral, el qual conté un nombre molt baix de fumadors comparat amb una població de referència qualsevol. Actualment, no es pot proporcionar una clara explicació de la relació de la diabetis i els exfumadors i el clúster 5, tot i que estudis previs suggereixen que un estat d'hipòxia a nivell microvascular colònic pot estimular canvis en les criptes aberrants [273, 273-276], i que també pot influir en canvis en el microambient, possibilitant així la modificació la comunitat microbiana.

La seqüenciació del DNA de les bandes de la DGGE ha identificat els bacteris típics del còlon i el recte, un total de 55 filotips diferents, dels quals 9 són nous (s'assemblen en menys d'un 95% a qualsevol seqüència dipositada en el GenBank o el RDP-II). Fins el 31.4% de les seqüències

s'assemblen a bacteris no cultivats (segons el GenBank i el RDP-II) i la resta a bacteris ja coneguts. Però l'interès principal s'ha focalitzat en aquells bacteris amb diferent prevalença entre malalts de CCR i individus control. Concretament, 2 filotips s'han associat a individus control, *Clostridium nexile* i *Roseburia faecalis* i 6 a CCR, *Coriobacterium sp.*, *Clostridium sp.*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Parabacteroides merdae* i dos filotips que s'assemblen un a un bacteri productor de butirat i l'altre a un bacteri no cultivat. El bacteri més prevalent (85%) en malalts ha resultat ser un filotip (pertanyent al filogrup 1) de *F. Prausnitzii* [277, 278]. L'elevada prevalença d'aquest bacteri, considerat àmpliament com a un potencial indicador de salut [279], en pacients amb CCR sembla contradir aquestes suposicions, però Li i col·laboradors varen relacionar seqüències d'aquest bacteri a diferents metabòlits com la dihidrotimina i la 4-hidroxifenilacetilglicina [280]. Altrament, seria d'un gran interès un coneixement més intens d'aquest bacteri ja que l'abundància d'aquest bacteri ha estat més baixa en malalts de CCR que en individus sans (veure capítol 1 de resultats), d'acord també amb d'altres estudis [157]. L'altre filotip identificat més prevalent en CCR (80%), *Coriobacterium sp.* (banda B3), és un membre present a la microbiota intestinal, ja sia com a comensal o patogen [281, 282]. Recentment, Marchesi [154] va observar una sobrerrepresentació dels Coriobacteridae en mostres de CCR, encara que Shen no va detectar cap Actinobacteria [152]. Els altres filotips més freqüentment trobats en CCR, corresponents a les bandes B41, B46, B48 i B50 es trobaven presents entre el 28 i el 45%. B46 i B48 s'assemblaven més a bacteris no cultivats, i B41 i B50 a *Clostridium sp.* i *Parabacteroides merdae* respectivament. En canvi, *Clostridium nexile* (B34) i *Roseburia faecalis* (B35) van resultar més prevalents en controls sans. Aquests dos filotips proporcionen protecció per a l'hoste (OR: 0,17 i

0,24, respectivament), com s'ha pogut observar en els models descrits anteriorment (veure resultats capítol 2).

1.3 Diversitat del gènere *Streptococcus* en malalts de CCR i individus control

Tot i ser membres habituals de la microbiota intestinal [67, 283], i d'estar relacionats amb episodis infecciosos directament relacionats amb el càncer colorectal, la població d'estreptococs en el TGI no ha estat profundament estudiada fins ara. Per aquest motiu, s'han analitzat amb profunditat els estreptococs que habiten el còlon i el recte de malalts de CCR.

Primerament, s'ha dissenyat i desenvolupat un joc d'encebadors que detectin específicament el gènere *Streptococcus* i que permetin la combinació amb la DGGE per estudiar la diversitat d'aquest gènere en diferents mostres. El joc d'encebadors flanqueja les regions hipervariables del gen 16S rRNA V7, V8 i V9 [284], les quals permeten diferenciar les espècies, i és altament sensible, detectant fins a 170 equivalents genòmics (95% probabilitat) en una reacció. Però s'ha detectat també *Enterococcus faecalis*, el qual es va considerar durant dècades com a un estreptococ [253, 285], i comparteix un 93% d'identitat en la seqüència del gen 16S rRNA. Tanmateix, tenint en compte que l'objectiu era investigar totes les espècies d'estreptococs en una mostra, l'obtenció esporàdica de seqüències de *E. faecalis* no ha dificultat la finalitat d'aquest estudi. L'aplicació del joc d'encebadors en diferents mostres clíniques ha detectat fins un 91% de seqüències similars al gènere *Streptococcus*, i un 9% a d'altres gèneres (*Enterococcus* i *Clostridium*). Resultats previs (no es mostren) indiquen una elevada cultivabilitat d'aquest gènere (2/3 parts) comparat amb altres gèneres bacterians, i amb aquest nou mètodes es pot

identificar el terç restant, de manera que pot ser d'utilitat per completar la fotografia d'aquest gènere quan hi ha una infecció polimicrobiana.

En un segon apartat, s'han comparat els estreptococs aïllats de 17 individus per mètodes de cultiu amb els filotips obtinguts mitjançant la PCR-DGGE amb el joc d'encebadors desenvolupat prèviament. Els aïllats es van confirmar inicialment mitjançant l'amplificació parcial del gen *tuf* amb encebadors gènere-específic descrits prèviament [184], tot i que la posterior seqüenciació parcial del gen 16S rRNA ha indicat una baixa especificitat d'aquests encebadors (67.5% de positius), amplificant també per a *E. faecalis*, *Eubacterium* sp. i *Lactobacillus* sp., afegits a els ja descrits (*Enterococcus durans* i *Lactococcus lactis*). De totes les espècies obtingudes (15), 14 (95%) es van identificar per la PCR-DGGE, 10 (66%) per cultiu i fins a 8 (52%) es van detectar per ambdós mètodes, fet que demostra la necessitat de l'ús de mètodes independents de cultiu per a obtenir una imatge més real de la diversitat microbiana de l'ecosistema [286, 287]. Tot i així, ambdós mètodes indiquen una major prevalença del grup anginosus en CCR que en controls (83% cultiu i 18.8% PCR-DGGE, $p < 0.05$). Aquest grup forma part del grup viridans, que comprèn espècies tant comensals com patògenes i s'ha associat a diferents tipus d'infecció [288]; la predominança d'aquest grup en el CCR podria ser interessant per a futurs estudis sobre la influència d'aquest en l'etiologia de la malaltia.

Finalment, el patró microbià de les mostres de malalts i del grup control s'ha mantingut homogeni, i amb una gran diversitat de patrons dins cada grup. En canvi, altres autors han trobat diferents patrons al comparar el grup *Clostridium coccoïdes* en CCR i control sans [150] en mostres fecals. S'ha procedit a identificar totes les bandes diferencials en la DGGE, i s'ha detectat al voltant d'un 15.4% de filotips no corresponents a estreptococs, i un 7% de nous filotips.

A més, s'ha trobat un grup de filotips que formen una branca diferencial en el clúster (veure figura 28), constituïda bàsicament per bacteris no cultivats, que comparteixen menys d'un 60% de similitud amb bacteris ja cultivats. La inclusivitat dels encebadors va més enllà del gènere estrictament, la qual cosa permet estudiar grups filogenèticament similars i assegurar que no es queda cap estreptococ fora de l'estudi. Les seqüències més properes a aquest grup són de la família *Ruminococcaceae*, la qual està clarament posicionada en un altre clúster dins el filum Firmicutes. Aquests filotips, no cultivats i no caracteritzats fins el moment, han estat detectats pels encebadors dissenyats per *Streptococcus sp.*, i per tant, es podria pensar que són un grup nou de microorganismes, tal i com va passar a Spratt [284] quan, en dissenyar encebadors específics per *Eubacterium* va identificar dos nous grups de microorganismes. La manca de medis de cultiu adaptats a aquests microorganismes, les condicions de pH, la temperatura o el mostreig poden ser processos que impossibilitin cultivar-los.

2. Estudi quantitatiu per qPCR

L'objectiu principal d'aquest apartat ha estat quantificar bacteris específics en la mucosa intestinal de pacients amb CCR i comparar-ne els resultats amb individus control i diferenciar-ne l'abundància amb altres estudis que analitzen mostres fecals.

Si bé aquesta part treball no caracteritza el total de la microbiota de la mucosa intestinal, els bacteris estudiats mostren que existeixen diferències en el nombre total de bacteris específics entre pacients amb CCR i controls sans. Pocs treballs han determinat la quantitat de bacteris específics en el CCR, i la majoria analitzaren mostres fecals, les quals no són comparables amb les mostres de mucosa intestinal emprades en aquest treball.

Les variables de gènere i localització tumoral no afecten l'abundància dels diferents bacteris analitzats. Els valors obtinguts en el nombre de bacteris per als 2 gèneres (masculí i femení) han estat molt consistents la qual cosa dona robustesa als resultats presentats. Els nombres obtinguts també han estat consistents al llarg del còlon i el recte. Aquesta estabilitat independent de la localització ja ha estat descrita anteriorment [63, 79, 209, 289]. La diabetis, tot i estar descrita com a un factor modulador de la microbiota [290], tampoc ha estat un factor diferenciador de la quantitat de bacteris.

Quant a l'abundància de *Escherichia coli*, aquest és el primer estudi realitzat amb mostres fresques de mucosa intestinal (biòpsies) obtingudes per colonoscòpia. Els resultats no coincideixen amb els de treballs similars que analitzen mostres fecals [153]. *E. coli* ha estat significativament més abundant en malalts de CCR que en individus control ($p=0,000$) i amb poliposi ($p=0,002$), tant en valors absoluts com en la proporció d'aquest bacteri respecte els eubacteris ($p=0,020$). També la quantitat de *E. coli* en mostres de teixit tumoral i mucós ha estat similar, així com en mostres de teixit polipós i mucós, i quan s'han comparat els tres teixits mucosos provinents de CCR, PP i controls. La seva abundància és independent de la zona on es localitza el tumor, però en canvi s'ha pogut observar que hi ha més quantitat durant els estadis 0, I i II del tumor respecte als més tardans (III i IV). Altres factors de risc en el CCR analitzats han estat la diabetis, on els nombres d'*E. coli* han estat similars i el tabaquisme on, contràriament al que s'esperava, el nombre d'*E. coli* ha resultat major en no fumadors que en fumadors perquè: i) el tabaquisme està associat al càncer colorectal [31, 49, 51, 53], i ii) aquest bacteri es troba associat al CCR com s'ha vist anteriorment. Aquest punt en particular no és un resultat robust donat a la diferència entre les grandàries mostrals de subjectes fumadors (N=28) i no fumadors (N=62). Aquest organisme ha

estat recentment relacionat amb la malaltia de Crohn, una afecció inflamatòria intestinal [92, 291, 292]. Darrerament s'han aportat evidències sobre una possible relació d'aquest bacteri amb el càncer colorectal [241, 307].

Faecalibacterium prausnitzii s'ha detectat en major nombre en individus control que en pacients amb CCR i PP com en altres estudis [152] així com l'estudi de Balamurugan et al [157] realitzat amb femtes. No obstant, en un estudi més recent [153], també utilitzant femtes, no s'ha trobat diferències en el nombre total d'aquest bacteri respecte individus control. En comparar-ne l'abundància en els diferents teixits (tumoral vs. mucós i polipós vs. mucós), s'ha observat que, com *E. coli*, manté els mateixos nombres en cada tipus de mostra respectivament, i fixant-se només amb els diferents teixits mucosos, hi ha més quantitat de *F. prausnitzii* en mostres de mucosa de controls que de pacients amb PP i CCR. L'únic factor que s'ha trobat associat ha estat el tabaquisme, on aquest bacteri s'ha trobat més abundant en no fumadors que en fumadors. En aquest cas, tot i la diferència en la mida mostral de fumadors i no fumadors (explicat anteriorment), és lògic pensar que *F. prausnitzii* és més abundant en no fumadors, ja que s'ha demostrat que el tabac indueix canvis en la microbiota [293]. A més, és un dels principals productors de butirat, i s'està suggerint com a un bon indicador de salut colònica [92, 294, 295].

Desulfovibrio sp. va presentar abundàncies molt similars en els tres grups analitzats (CCR, PP i controls), i en els diferents tipus de biòpsies. Tanmateix, estudis previs utilitzant mostres fecals, varen trobar diferències entre el grup CCR i els grups control i PP, però entre els grups control i PP no hi havia diferències significatives en termes d'abundància d'aquest bacteri [151], tot i que un altre estudi [157] realitzat amb femtes tampoc troba diferències entre els grups CCR i controls. *Desulfovibrio sp.* malgrat

la capacitat de produir substàncies carcinogèniques no es relaciona específicament amb cap tipus de mostra de pacients amb CCR.

La quantitat de *Enterococcus faecalis* en els diferents grups no ha resultat significativament diferent, però al centrar atenció en els teixits, s'ha trobat més abundant en mostres tumorals que de mucosa en malalts de CCR. En canvi s'ha trobat més abundant en mucosa que en teixit polipós. Aquests valors apuntarien a *E. faecalis* com a un bacteri, potencialment patogen, que aprofita els canvis fisicoquímics que es produeixen en el tumor (major vascularització, major concentració d'oxigen i de nutrients) per ocupar aquest nou nínxol ecològic que ofereix l'existència d'un tumor. En particular, es va trobar un pacient amb CCR amb una infecció causada per aquest microorganisme, on la quantitat d'aquest era més del doble de l'habitual en mostres control. Cal remarcar que es desconeix si aquesta infecció podria ser causa d'una infecció crònica que va provocar el desenvolupament tumoral o bé si, donades les condicions del pacient, juntament amb l'administració de cefalosporines, es va produir un sobrecreixement causant de dita infecció. Tot i així, aquest possible rol s'hauria d'estudiar més àmpliament perquè els valors obtinguts en mostres de PP contradirien aquesta hipòtesi.

Els resultats observats en el capítol 2 han trobat *E. faecalis* més abundant en individus control que en pacients amb CCR i PP, els quals presentaven abundàncies similars. Aquesta variació pot ser deguda a la mida mostral, donat que en aquest apartat, el nombre de pacients amb CCR era de 15, el de pacients amb PP de 8, i el d'individus control de 19. Fixant-se amb la mitjana del nombre d'equivalents genòmics de cada bacteris assajat i amb les diferències significatives obtingudes, es podria corroborar l'estat de poliposi com a un estadi intermedi entre la salut de l'hoste fins el desenvolupament tumoral.

Respecte el nombre total d'Eubacteris, s'ha observat una major quantitat en el grup de CCR que en el control ($p=0,016$) i en PP ($p=0,000$). En teixit mucós se n'ha trobat major quantitat d'Eubacteris que en mucosa, però en canvi en individus amb PP els dos teixits presentaven abundàncies similars. Per últim, i de manera igual que en resultats ja descrits, la quantitat d'Eubacteris ha estat trobat més elevada en mucosa de CCR que d'individus control i PP. El tabac s'ha relacionat amb la quantitat d'Eubacteris, però no s'han trobat referències de si l'abundància en la mucosa intestinal es pot veure influenciada pel consum de tabac, tot i que en es va trobar que el tabaquisme i la microbiota de la part alta del tracte respiratori apunten a una major diversitat bacteriana més que canvis en l'abundància i la proporció de bacteris específics [296, 297].

En conclusió, la quantificació de bacteris mitjançant la qPCR ha produït dades que revelen: i) una l'associació d'*E. coli* amb el càncer colorectal, ii) recolzar el rol de *F. prausnitzii* es com a un potencial indicador de salut microbiana, iii) *Desulfovibrio sp.* no es relaciona específicament amb cap tipus de mostra, iv) *E. faecalis* és un bacteri amb un potencial notable que es contradia en tant que sí que s'associa a teixit tumoral, però en canvi es troba més abundant en mostres d'individus control i també de pacients amb PP, i que per tant, el rol d'aquest bacteri no ha quedat particularitzat, i v), en mostres de CCR existeix un major nombre de bacteris comparant-los amb mostres de PP i control.

Aquests canvis en l'abundància de bacteris específics, però, s'haurien de profunditzar tot augmentant el nombre d'estudis que treballessin amb biòpsies de la mucosa intestinal, la qual cosa afavoriria el posicionament de la microbiota dins del càncer colorectal.

3. Disbiosi bacteriana i el càncer colorectal

Amb el naixement, un ric i dinàmic ecosistema microbià s'instaura al llarg del tracte gastrointestinal i es desenvolupa fins a establir-se en un *core* propi de l'individu, alterat per la presència temporal d'altres microorganismes [66, 298, 299], que comparteix semblances amb altres individus [81, 278]. La relació simbiòtica que manté la microbiota amb l'hoste és essencial per mantenir l'homeòstasi, regulada per diverses accions com metabòliques, immunitàries o fisiològiques (figura 34). La microbiota pot veure's modulada per factors com la dieta, la medicació (antibiòtics), l'edat, o l'estrès produint-se així una disbiosi bacteriana que interfereix directament en l'estat de salut o malaltia de l'hoste.

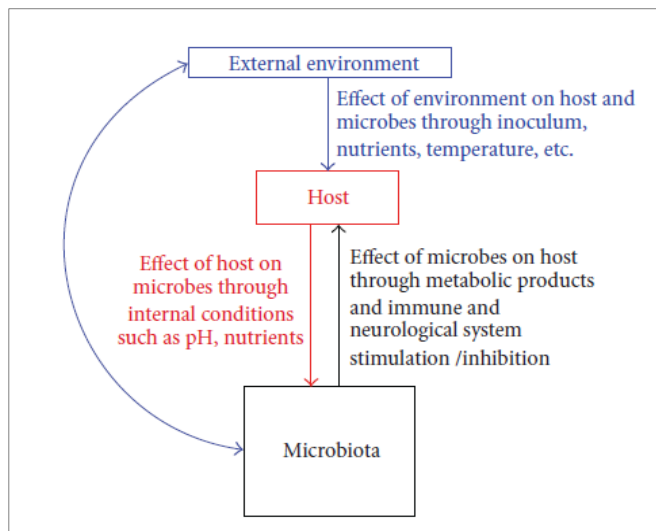


Figura 34. Potencials mecanismes d'interacció entre factors externs, la microbiota i l'hoste [300].

Existeixen estudis que demostren una relació entre la disbiosi microbiana i les malalties inflamatòries intestinals [90-92, 279], i també en altres malalties extra intestinals com l'obesitat [96-98] i la diabetis [290].

En el cas del càncer colorectal, cada cop es troben més estudis sobre l'impacte de la microbiota la seva etiologia [66, 88, 154, 260, 301], no només en estudis realitzats amb mostres de malalts de CCR [152, 153], sinò també en estudis d'animals *germ-free* que revelen l'important impacte de la microbiota en el desenvolupament tumoral [40, 121, 123, 158, 241, 302, 303] Així doncs, l'acció de la microbiota en la tumorigènesi pot iniciar-se en dues vies: i) la inflamació crònica i ii) la producció de metabòlits secundaris provinents de la dieta o del metabolisme de les sals biliars (figura 35).

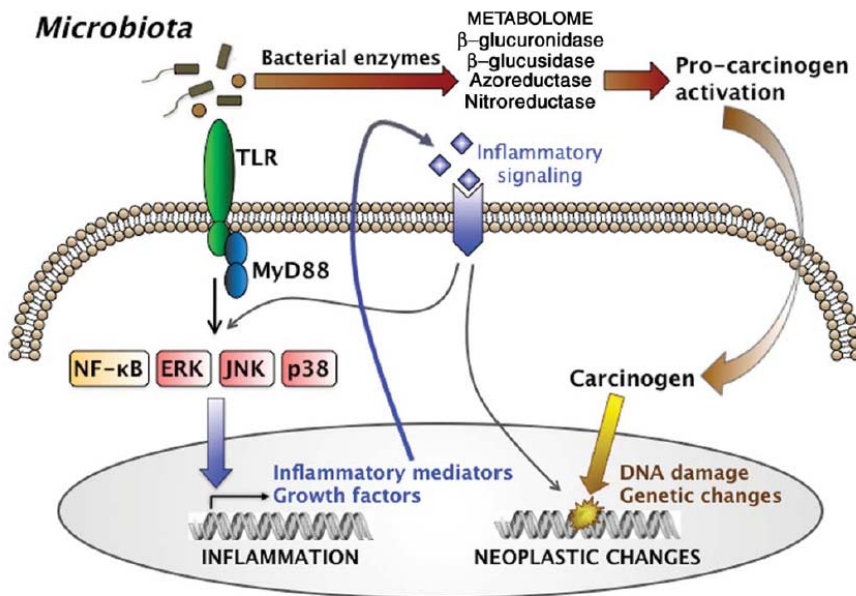


Figura 35. Promoció de la inflamció per part de la microbiota intestinal mitjançant TLRs, els quals promouen l'expressió de gens que codifiquen per factors de creixement o mediadors de la inflamció, que alhora promouen la neoplàsia. Independentment de la inflamció, la microbiota pot metabolitzar productes de la dieta o sals biliars generant procarcinògens que activen canvis neoplàtics [304].

Els resultats obtinguts al llarg d'aquesta tesi mostren també l'existència d'una disbiosi bacteriana en la mucosa intestinal dels malalts de càncer colorectal que corroboren resultats previs, ja siguin realitzats amb femtes o

amb biòpsies de mucosa intestinal. Tanmateix, és difícil determinar si aquesta disbiosi és causa o efecte de la malaltia. Establir de manera general la disbiosi com a un factor que augmenta el risc de desenvolupar un tumor és complex. No obstant, es podria formular que determinats bacteris poden iniciar la carcinogènesi, com és el cas de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, ja sigui per la promoció de la inflamació crònica seguida d'una infecció o bé per la producció de metabòlits carcinogènics derivats de substàncies provinents de la dieta o endògenes de l'hoste o degut a la disminució de bacteris protectors com *Faecalibacterium prausnitzii*. La variació d'un altre bacteri que s'havia associat al CCR (*Desulfovibrio sp.*) podria ser circumstancial pel canvi en les condicions fisiològiques de l'hoste en el moment d'anar desenvolupant un tumor.

La complexitat, diversitat i funcionalitat intrínseca de la microbiota intestinal, juntament amb l'impacte de factors exògens i endògens (dieta, ús antibiòtics, estrès, edat, MII, reducció de l'activitat física, obesitat, etc.) conflueixen pel manteniment de l'homeòstasi de l'hoste, però l'acció de determinats factors que modulen diferentment la microbiota intestinal pot afavorir en el desenvolupament tumoral. La informació que es pot obtenir d'estudis de la microbiota són essencials per detectar agents capaços de modular-la per prevenir el càncer colorectal i detectar individus amb un alt risc de patir aquesta malaltia. En concret, des del profund coneixement de què la microbiota no es pot considerar un ens independent del nostre organisme, és necessari innovar en estratègies de prevenció i de tractament del CCR; per exemple, realitzant estudis de metabolòmica que analitzin l'aportació de la microbiota en el manteniment de l'homeòstasi, o la millor caracterització de la microbiota des dels estadis inicials del tumor fins a estadis més tardans.

4. Efecte dels bacteris sobre el càncer colorectal

Escherichia coli

Aquest *Enterobacteri* gram negatiu, habitual comensal que habita en el tracte intestinal, pot esdevenir altament patogènica amb l'adquisició de factors de virulència, els quals permeten la colonització (invasió, adherència i entrada), l'evasió dels mecanismes de defensa de l'hoste, la multiplicació i el dany de l'hoste. Fins el moment, s'han classificat les diverses soques d'*E. coli* en quatre grups filogenètics: A, B1, B2 i D, essent els grups B2 i D els que presenten major nombre de factors de virulència [305]. Fins el 34% del grup B2 contenen illes *pks*, que són un clúster de gens que codifiquen per diferents factors de virulència com la colibactina, la qual indueix al dany del DNA, provocant el desenvolupament tumoral [241]. Altres autors també han demostrat que el factor de virulència CNF1 [306] està implicat en i) la inducció de l'expressió de COX2, el qual es troba sobreexpressat en alguns tipus de càncers, ii) l'activació del factor NF-kB (inflamació), iii) la protecció de cèl·lules epitelials contra l'apoptosi, iv) la producció de citoquines en l'epiteli i en les cèl·lules endotelials i v) la promoció de la motilitat cel·lular. Un altre tipus d'associació de *E. coli* amb el CCR es va trobar amb el patovar EPEC (enteropathogenic *E. coli*), el qual posseïa el gens *eae* que codifica per la intimina, una proteïna d'adhesió bacteriana que provoca una desregulació dels gens MMR (*mismatch repair genes*) conferint-li un fenotip mutat, el qual pot acumular milers de mutacions que provoquin una inestabilitat microsatèl·lits (MSI) que promogui la carcinogènesis [307].

Per tant, tot i que cada cop està més clara la possible implicació de *E. coli* en el càncer colorectal, no s'ha definit encara quin tipus de patovar o grup filogenètic es relaciona estrictament amb la carcinogènesis, fet que implica la necessitat d'estudis més exhaustius en aquest àmbit que incloguin l'aïllament de noves soques provinents de malalts de CCR, la seva caracterització, la identificació de nous factors de virulència associats al CCR

Enterococcus faecalis

Tot i ser un membre minoritari en la microbiota intestinal, *E. faecalis* juga un paper important en el manteniment de l'homeòstasi. És l'únic bacteri capaç de generar superòxid (O_2^-) en absència d'hematina o fumarasa donada la seva capacitat redox-activa. Aquest metabòlit pot danyar directament les cèl·lules epitelials [141] mitjançant la sobreexpressió de COX-2 en macròfags, la qual activa la inestabilitat cromosòmica (CIN), present en més del 80% dels casos de CCR esporàdic [308]. L'habilitat que té aquest bacteri per translocar-se [309], és un factor que facilita la promoció de la carcinogènesi, fent que *E. faecalis* moduli l'expressió gènica en la mucosa colònica en les vies associades a la inflamació, l'apoptosi i la regulació del cicle cel·lular (transició fase G2 a M) [254]. Més recentment, s'ha demostrat que *E. faecalis* indueix a l'aneuploidia i la tetraploidia en cèl·lules colòniques epitelials que causa una segregació cromosòmica que pot iniciar el procés tumoral [310].

Faecalibacterium prausnitzii

F. prausnitzii és un bacteri gram negatiu i anaerobi estricte que pertany al subgrup *Clostridium leptum* (clúster IV), el qual està format per dos filogrupos diferents [277]. És un dels bacteris més comunament trobats al tracte gastrointestinal. Juntament amb altres microorganismes com

Roseburia faecalis i *Eubacterium rectale*, és un dels majors productors d'àcids grassos de cadena curta, principalment butirat, acetat i propionat, els quals intervenen en diferents processos claus en el funcionament i desenvolupament dels colonòcits [109, 110, 239]. Les dades obtingudes en aquest treball mitjançant diferents eines moleculars difereixen en el rol potencial que pot tenir aquest bacteri en el càncer colorectal, donat que per una banda, s'ha trobat menys abundant en malalts de CCR respecte controls i, per una altra banda, el filogrup 1 s'ha mostrat més prevalent en malalts de CCR que en individus control. Tot i que en estudis previs no se'ls ha pogut diferenciar quant a utilització de substractes, la tolerància al pH o la sensibilitat a les sals biliars [277], la completa caracterització d'aquest filogrup, incloent gens funcionals o metabolòmica, són necessaris per a determinar millor el potencial rol d'indicador de salut bacteriana. Diversos estudis corroboren el paper protector que exerceix el butirat enfront el càncer colorectal [111, 311-313] tot i que també s'ha trobat que pot generar dimetilamina, que prové de la colina, relacionada amb una dieta rica en greixos, amb greix provinent del fetge i amb la diabetis tipus 2 en models experimentals amb ratolins [280].

Els canvis que poden succeir durant el desenvolupament tumoral, així com l'etiogènesi d'aquesta malaltia, poden produir diferents efectes en la població microbiana que es tradueixen en una metabolòmica diferent, i per tant, conèixer en profunditat tots els aspectes dels filogrupos de *F. prausnitzii* són importants per entendre el rol d'aquest microorganisme en la salut colònica humana.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. Els malalts de càncer colorectal presenten una disbiosi bacteriana que els diferencia dels individus sans, caracteritzada per un augment de la càrrega bacteriana i una modificació de la composició caracteritzada per un augment significatiu de firmicutes i actinobacteris i *Escherichia coli* i una minva també significativa de *Faecalibacterium prausnitzii*.
2. L'anàlisi de les agrupacions de filotips bacterians indica que no existeix cap patró microbià propi del càncer colorectal, tot i que existeixen grups o clústers clarament identificables amb aquesta malaltia.
3. D'acord amb allò observat per altres autors en estudis similars d'altres malalties intestinals, la composició i abundància de la microbiota intestinal es mantenen invariables al llarg del còlon i el recte.
4. L'estudi quantitatiu d'*Enterococcus faecalis* en el càncer colorectal no ha estat concluent, atès que s'ha trobat en nombres significativament més elevats en controls, però la seva abundància ha resultat ser significativament més gran en mostres de teixit tumoral.
5. A més dels estudis qualitius basats en PCR i empremtes moleculars (DGGE), l'ús de eines moleculars per a la quantificació de bacteris o grups de bacteris aporta una informació addicional valuosa sobre la composició de la microbiota intestinal que permet

aprofundir en l'estudi de les disbiosis produïdes per les malalties tant les inflamatòries com les neoplàsiques.

6. En un cas clínic de febre alta i dolor abdominal, l'anàlisi de la composició microbiana mitjançant tècniques moleculars ha estat clau en la identificació i resolució d'una infecció causada per *Enterococcus faecalis*, amb diagnòstic final de càncer colorectal i colitis isquèmica.
7. Malgrat que la inclusivitat ha abastat filogrups colindants al gènere *Streptococcus*, els encebadors dissenyats per a la seva detecció i estudi de diversitat han estat efectius i fiables, la qual cosa obre la possibilitat per a al seu ús en mostres clíniques.
8. Els estreptococs intestinals han resultat ser altament diversos, tot i ser un component molt minoritari de la microbiota intestinal. Malgrat les referències bibliogràfiques que relacionen *S. bovis* amb el càncer colorectal, aquest estudi indica que no es pot atribuir cap relació entre aquest gènere i aquesta malaltia, en les mostres analitzades.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografia

1. Li F, Lai M: **Colorectal cancer, one entity or three.** *J Zhejiang Univ Sci B* 2009, **10**(3):219-229.
2. Boman BM, Fields JZ, Cavanaugh KL, Guetter A, Runquist OA: **How dysregulated colonic crypt dynamics cause stem cell overpopulation and initiate colon cancer.** *Cancer Res* 2008, **68**(9):3304-3313.
3. Boman BM, Huang E: **Human colon cancer stem cells: a new paradigm in gastrointestinal oncology.** *J Clin Oncol* 2008, **26**(17):2828-2838.
4. Potten CS, Kellett M, Roberts SA, Rew DA, Wilson GD: **Measurement of in vivo proliferation in human colorectal mucosa using bromodeoxyuridine.** *Gut* 1992, **33**(1):71-78.
5. Cheng H, Bjerknes M, Amar J: **Methods for the determination of epithelial cell kinetic parameters of human colonic epithelium isolated from surgical and biopsy specimens.** *Gastroenterology* 1984, **86**(1):78-85.
6. Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM: **Stem cells: hype and reality.** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2002, :369-391. Review
7. Weissman IL: **Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution.** *Cell* 2000, **100**(1):157-168.
8. Pierce GB, Damjanov I: *The Biologic Basis of Cancer. The pathology of cancer:* New York: Cambridge Univ Press; 2006.
9. Todaro M, Francipane MG, Medema JP, Stassi G: **Colon cancer stem cells: promise of targeted therapy.** *Gastroenterology* 2010, **138**(6):2151-2162.
10. Vermeulen L, De Sousa E Melo F, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T, Tuynman JB, Todaro M, Merz C, Rodermond H, Sprick MR, Kemper K, Richel DJ, Stassi G, Medema JP: **Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment.** *Nat Cell Biol* 2010, **12**(5):468-476.

11. Michor F, Iwasa Y, Rajagopalan H, Lengauer C, Nowak MA: **Linear model of colon cancer initiation.** *Cell Cycle* 2004, **3**(3):358-362.
12. Okada F, Kawaguchi T, Habelhah H, Kobayashi T, Tazawa H, Takeichi N, Kitagawa T, Hosokawa M: **Conversion of human colonic adenoma cells to adenocarcinoma cells through inflammation in nude mice.** *Lab Invest* 2000, **80**(11):1617-1628.
13. Sancho E, Batlle E, Clevers H: **Signaling pathways in intestinal development and cancer.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004, **20**:695-723.
14. Vogelstein B, Kinzler KW: *The genetic basis for human cancer*: 2nd ed. Toronto: McGraw-Hill; 2001.
15. Rabeneck L, Davila JA, El-Serag HB: **Is there a true "shift" to the right colon in the incidence of colorectal cancer?** *Am J Gastroenterol* 2003, **98**(6):1400-1409.
16. Moran A, Ortega P, de Juan C, Fernandez-Marcelo T, Frias C, Sanchez-Pernaute A, Torres AJ, Diaz-Rubio E, Iniesta P, Benito M: **Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance.** *World J Gastrointest Oncol* 2010, **2**(3):151-158.
17. Fearon ER, Vogelstein B: **A genetic model for colorectal carcinogenesis.** *Cell* 1190, **61**:759-767.
18. Houlston RS, Tomlinson IP: **Polymorphisms and colorectal tumor risk.** *Gastroenterology* 2001, **121**(2):282-301.
19. Wielenga VJ, Smits R, Korinek V, Smit L, Kielman M, Fodde R, Clevers H, Pals ST: **Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway.** *Am J Pathol* 1999, **154**(2):515-523.
20. Dukes HH, Schwarte LH, Brandt AE: **The Hemoglobin Content of the Blood of the Hen: a Statistical Study of Influences and Relations.** *Science* 1932, **75**:25-26.
21. ASTLER VB, COLLIER FA: **The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum.** *Ann Surg* 1954, **139**(6):846-852.

22. Chapuis PH, Dent OF, Newland RC, Bokey EL, Pheils MT: **An evaluation of the American Joint Committee (pTNM) staging method for cancer of the colon and rectum.** *Dis Colon Rectum* 1986, **29**(1):6-10.
23. Hagggar FA, Boushey RP: **Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors.** *Clin Colon Rectal Surg* 2009, **22**(4):191-197.
24. Boyle P, Ferlay J: **Cancer incidence and mortality in Europe, 2004.** *Ann Oncol* 2005, **16**(3):481-488.
25. Pitari GM, Zingman LV, Hodgson DM, Alekseev AE, Kazerounian S, Bienengraeber M, Hajnoczky G, Terzic A, Waldman SA: **Bacterial enterotoxins are associated with resistance to colon cancer.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(5):2695-2699.
26. Bingham S, Riboli E: **Diet and cancer--the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition.** *Nat Rev Cancer* 2004, **4**(3):206-215.
27. Lopez-Abente G, Ardanaz E, Torrella-Ramos A, Mateos A, Delgado-Sanz C, Chirlaque MD, Colorectal Cancer Working Group: **Changes in colorectal cancer incidence and mortality trends in Spain.** *Ann Oncol* 2010, **21 Suppl 3**:iii76-82.
28. Jemal A, Clegg LX, Ward E, Ries LA, Wu X, Jamison PM, Wingo PA, Howe HL, Anderson RN, Edwards BK: **Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival.** *Cancer* 2004, **101**(1):3-27.
29. Cabanes A, Vidal E, Aragones N, Perez-Gomez B, Pollan M, Lope V, Lopez-Abente G: **Cancer mortality trends in Spain: 1980-2007.** *Ann Oncol* 2010, **21 Suppl 3**:iii14-20.
30. Hernandez-Guerrero A: **Colorectal cancer. What to do that the diagnosis be well timed?** *Rev Gastroenterol Mex* 2007, **72 Suppl 2**:116-121.
31. Wei EK, Wolin KY, Colditz GA: **Time course of risk factors in cancer etiology and progression.** *J Clin Oncol* 2010, **28**(26):4052-4057.

32. World Gastroenterology Organisation/International Digestive Cancer Alliance: **Colorectal cancer screening [abstract]**. 2007; .
33. Yang L, Pei Z: **Bacteria, inflammation, and colon cancer**. *World J Gastroenterol* 2006, **12**(42):6741-6746.
34. Compton CC, Greene FL: **The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond**. *CA Cancer J Clin* 2004, **54**(6):295-308.
35. Viennot S, Deleporte A, Moussata D, Nancey S, Flourie B, Reimund JM: **Colon cancer in inflammatory bowel disease: recent trends, questions and answers**. *Gastroenterol Clin Biol* 2009, **33** Suppl 3:S190-201.
36. Lakatos PL, Lakatos L: **Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: changes, causes and management strategies**. *World J Gastroenterol* 2008, **14**(25):3937-3947.
37. Lee JE, Willett WC, Fuchs CS, Smith-Warner SA, Wu K, Ma J, Giovannucci E: **Folate intake and risk of colorectal cancer and adenoma: modification by time**. *Am J Clin Nutr* 2011, **93**(4):817-825.
38. Lamprecht SA, Lipkin M: **Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms**. *Nat Rev Cancer* 2003, **3**(8):601-614.
39. Lamprecht SA, Lipkin M: **Cellular mechanisms of calcium and vitamin D in the inhibition of colorectal carcinogenesis**. *Ann N Y Acad Sci* 2001, **952**:73-87.
40. Yang K, Lamprecht SA, Shinozaki H, Fan K, Yang W, Newmark HL, Kopelovich L, Edelman W, Jin B, Gravaghi C, Augenlicht L, Kucherlapati R, Lipkin M: **Dietary calcium and cholecalciferol modulate cyclin D1 expression, apoptosis, and tumorigenesis in intestine of adenomatous polyposis coli1638N/+ mice**. *J Nutr* 2008, **138**(9):1658-1663.
41. Ahearn TU, McCullough ML, Flanders WD, Long Q, Sidelnikov E, Fedirko V, Daniel CR, Rutherford RE, Shaikat A, Bostick RM: **A Randomized Clinical Trial of the Effects of Supplemental Calcium and Vitamin D3 on Markers of Their Metabolism in Normal Mucosa of Colorectal Adenoma Patients**. *Cancer Res* 2011, **71**(2):413-423.

42. Carroll C, Cooper K, Papaioannou D, Hind D, Pilgrim H, Tappenden P: **Supplemental calcium in the chemoprevention of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis.** *Clin Ther* 2010, **32**(5):789-803.
43. Flood A, Peters U, Chatterjee N, Lacey JV, Jr, Schairer C, Schatzkin A: **Calcium from diet and supplements is associated with reduced risk of colorectal cancer in a prospective cohort of women.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005, **14**(1):126-132.
44. Giovannucci E: **Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence.** *J Nutr* 2001, **131**(11 Suppl):3109S-20S.
45. Müller F: **Tabakmissbrauch und lungencarcinoma.** *Z Krebsforsch* 1939, **49**:57-85.
46. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Maisonneuve P: **Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis.** *JAMA* 2008, **300**(23):2765-2778.
47. Paskett ED, Reeves KW, Rohan TE, Allison MA, Williams CD, Messina CR, Whitlock E, Sato A, Hunt JR: **Association between cigarette smoking and colorectal cancer in the Women's Health Initiative.** *J Natl Cancer Inst* 2007, **99**(22):1729-1735.
48. Acott AA, Theus SA, Marchant-Miros KE, Mancino AT: **Association of tobacco and alcohol use with earlier development of colorectal cancer: should we modify screening guidelines?** *Am J Surg* 2008, **196**(6):915-8; discussion 918-9.
49. Hannan LM, Jacobs EJ, Thun MJ: **The association between cigarette smoking and risk of colorectal cancer in a large prospective cohort from the United States.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009, **18**(12):3362-3367.
50. Bazensky I, Shoobridge-Moran C, Yoder LH: **Colorectal cancer: an overview of the epidemiology, risk factors, symptoms, and screening guidelines.** *Medsurg Nurs* 2007, **16**(1):46-51.
51. Slattery ML, Potter JD, Friedman GD, Ma KN, Edwards S: **Tobacco use and colon cancer.** *Int J Cancer* 1997, **70**(3):259-264.

52. Giovannucci E: **An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001, **10**(7):725-731.
53. Freedman AN, Michalek AM, Marshall JR, Mettlin CJ, Petrelli NJ, Zhang ZF, Black JD, Satchidanand S, Asirwatham JE: **The relationship between smoking exposure and p53 overexpression in colorectal cancer.** *Br J Cancer* 1996, **73**(8):902-908.
54. Samowitz WS, Slattery ML: **Microsatellite instability in colorectal adenomas.** *Gastroenterology* 1997, **112**(5):1515-1519.
55. Pöschl G, Seitz HK: **ALCOHOL AND CANCER.** *Alcohol and Alcoholism* 2004, **39**(3):155-165.
56. Lee KJ, Inoue M, Otani T, Iwasaki M, Sasazuki S, Tsugane S, JPHC Study Group: **Physical activity and risk of colorectal cancer in Japanese men and women: the Japan Public Health Center-based prospective study.** *Cancer Causes Control* 2007, **18**(2):199-209.
57. Chan AT, Giovannucci EL: **Primary prevention of colorectal cancer.** *Gastroenterology* 2010, **138**(6):2029-2043.
58. Rex DK: **Reducing costs of colon polyp management.** *Lancet Oncol* 2009, **10**(12):1135-1136.
59. Jia W, Li H, Zhao L, Nicholson JK: **Gut microbiota: a potential new territory for drug targeting.** *Nat Rev Drug Discov* 2008, **7**(2):123-129.
60. Berg RD: **The indigenous gastrointestinal microflora.** *Trends Microbiol* 1996, **4**(11):430-435.
61. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA: **Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora.** *Science* 2005, 1635-1638:.
62. Peterson DA, Frank DN, Pace NR, Gordon JI: **Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases.** *Cell Host Microbe* 2008, **3**(6):417-427.

63. Zoetendal EG, von Wright A, Vilpponen-Salmela T, Ben-Amor K, Akkermans AD, de Vos WM: **Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces.** *Appl Environ Microbiol* 2002, **68**(7):3401-3407.
64. Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y: **Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods.** *Microbiol Immunol* 2002, **46**(8):535-548.
65. Hold GL: **Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis.** *FEMS Microbiol Ecol* 2002, **39**:33-39.
66. Candela M, Guidotti M, Fabbri A, Brigidi P, Franceschi C, Fiorentini C: **Human intestinal microbiota: cross-talk with the host and its potential role in colorectal cancer.** *Crit Rev Microbiol* 2011, **37**(1):1-14.
67. Clarke JS, Barlett JG, Finegold SM, Gorbach SL, Wilson SE: **Bacteriology of the Gut and Its Clinical Implications.** *The Western Journal of Medicine* 1974, **121**(5):390-403.
68. Shanahan F: **Gut flora in gastrointestinal disease.** *Eur J Surg Suppl* 2002, (587):47-52.
69. Rajilic-Stojanovic M, Smidt H, de Vos WM: **Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited.** *Environ Microbiol* 2007, **9**(9):2125-2136.
70. Zoetendal EG, Akkermans AD, De Vos WM: **Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria.** *Appl Environ Microbiol* 1998, **64**(10):3854-3859.
71. Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, Dore J: **Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut.** *Appl Environ Microbiol* 1999, **65**(11):4799-4807.

72. Marteau P, Pochart P, Dore J, Bera-Maillet C, Bernalier A, Corthier G: **Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota.** *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**(10):4939-4942.

73. Zoetendal EG, von Wright A, Vilpponen-Salmela T, Ben-Amor K, Akkermans AD, de Vos WM: **Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces.** *Appl Environ Microbiol* 2002, **68**(7):3401-3407.

74. Xu J, Gordon JI: **Honor thy symbionts.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(18):10452-10459.

75. Guarner F, Malagelada JR: **Gut flora in health and disease.** *Lancet* 2003, **361**(9356):512-519.

76. Flint HJ, O'Toole PW, Walker AW: **Special issue: The Human Intestinal Microbiota.** *Microbiology* 2010, **156**(Pt 11):3203-3204.

77. Green GL, et al: **Molecular characterization of the bacteria adherent to human colorectal mucosa.** *Journal of Applied Microbiology* 2006, **100**:460-469.

78. Vanhoutte T, Huys G, Brandt E, Swings J: **Temporal stability analysis of the microbiota in human feces by denaturing gradient gel electrophoresis using universal and group-specific 16S rRNA gene primers.** *FEMS Microbiol Ecol* 2004, **48**(3):437-446.

79. Lepage P, Seksik P, Sutren M, de la Cochetiere MF, Jian R, Marteau P, Dore J: **Biodiversity of the mucosa-associated microbiota is stable along the distal digestive tract in healthy individuals and patients with IBD.** *Inflamm Bowel Dis* 2005, **11**(5):473-480.

80. Zoetendal EG, Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM: **High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota.** *Gut* 2008, **57**(11):1605-1615.

81. Rajilic-Stojanovic M, Heilig HG, Molenaar D, Kajander K, Surakka A, Smidt H, de Vos WM: **Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults.** *Environ Microbiol* 2009, **11**(7):1736-1751.

82. Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT: **Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles.** *Gut* 2001, **48**(2):198-205.
83. Sharma S, O'Keefe SJ: **Environmental influences on the high mortality from colorectal cancer in African Americans.** *Postgrad Med J* 2007, **83**(983):583-589.
84. Duncan SH, Louis P, Thomson JM, Flint HJ: **The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota.** *Environ Microbiol* 2009, **11**(8):2112-2122.
85. O'Keefe SJ: **Nutrition and colonic health: the critical role of the microbiota.** *Curr Opin Gastroenterol* 2008, **24**(1):51-58.
86. Shanahan F: **The host-microbe interface within the gut.** *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002, **16**(6):915-31.
87. Tlaskalova-Hogenova H, Stepankova R, Hudcovic T, Tuckova L, Cukrowska B, Lodinova-Zadnikova R, Kozakova H, Rossmann P, Bartova J, Sokol D, Funda DP, Borovska D, Rehakova Z, Sinkora J, Hofman J, Drastich P, Kokesova A: **Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases.** *Immunol Lett* 2004, **93**(2-3):97-108.
88. Davis CD, Milner JA: **Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention.** *J Nutr Biochem* 2009, 743-752.
89. Schmidt C, Stallmach A: **Etiology and pathogenesis of inflammatory bowel disease.** *Minerva Gastroenterol Dietol* 2005, **51**(2):127-145.
90. Macfarlane S, Furrie E, Kennedy A, Cummings JH, Macfarlane GT: **Mucosal bacteria in ulcerative colitis.** *Br J Nutr* 2005, **93** Suppl 1:S67-S72.
91. Macfarlane GT, Blackett KL, Nakayama T, Steed H, Macfarlane S: **The gut microbiota in inflammatory bowel disease.** *Curr Pharm Des* 2009, **15**(13):1528-1536.

92. Martinez-Medina M, Aldeguer X, Gonzalez-Huix F, Acero D, Garcia-Gil LJ: **Abnormal microbiota composition in the ileocolonic mucosa of Crohn's disease patients as revealed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis.** *Inflamm Bowel Dis* 2006, **12**(12):1136-1145.
93. Sur D, Bhattacharya SK: **Acute diarrhoeal diseases--an approach to management.** *J Indian Med Assoc* 2006, **104**(5):220-223.
94. Jafari F, Garcia-Gil LJ, Salmanzadeh-Ahrabi S, Shokrzadeh L, Aslani MM, Pourhoseingholi MA, Derakhshan F, Zali MR: **Diagnosis and prevalence of enteropathogenic bacteria in children less than 5 years of age with acute diarrhea in Tehran children's hospitals.** *J Infect* 2009, **58**(1):21-27.
95. Kanauchi O, Mitsuyama K, Araki Y, Andoh A: **Modification of intestinal flora in the treatment of inflammatory bowel disease.** *Curr Pharm Des* 2003, **9**(4):333-346.
96. Vrieze A, Holleman F, Zoetendal EG, de Vos WM, Hoekstra JB, Nieuwdorp M: **The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition.** *Diabetologia* 2010, **53**(4):606-613.
97. Duncan SH, Lopley GE, Holtrop G, Ince J, Johnstone AM, Louis P, Flint HJ: **Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss.** *Int J Obes (Lond)* 2008, **32**(11):1720-1724.
98. Turnbaugh PJ, Backhed F, Fulton L, Gordon JI: **Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome.** *Cell Host Microbe* 2008, **3**(4):213-223.
99. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI: **Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity.** *Nature* 2006, **444**(7122):1022-1023.
100. Hill MJ: **Diet and the human intestinal bacterial flora.** *Cancer Res* 1981, **41**(9 Pt 2):3778-3780.
101. Thompson-Chagoyan OC, Maldonado J, Gil A: **Colonization and impact of disease and other factors on intestinal microbiota.** *Dig Dis Sci* 2007, **52**(9):2069-2077.

102. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI: **The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice.** *Sci Transl Med* 2009, **1(6):6ra14**.
103. Cebra JJ: **Influences of microbiota on intestinal immune system development.** *Am J Clin Nutr* 1999, **69(5):1046S-1051S**.
104. Cummings JH, Macfarlane GT: **Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism.** *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1997, **21(6):357-365**.
105. Bingham SA: **Diet and colorectal cancer prevention.** *Biochem Soc Trans* 2000, **28:12-16**.
106. Bingham SA: **Epidemiology and mechanisms relating diet to risk of colorectal cancer.** *Nutr Res Rev* 1996, **9(1):197-239**.
107. Frankel WL, Zhang W, Singh A, Klurfeld DM, Don S, Sakata T, Modlin I, Rombeau JL: **Mediation of the trophic effects of short-chain fatty acids on the rat jejunum and colon.** *Gastroenterology* 1994, **106(2):375-380**.
108. Scheppach W, Bartram HP, Richter F: **Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer.** *Eur J Cancer* 1995, **31A(7-8):1077-1080**.
109. Louis P, Flint HJ: **Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine.** *FEMS Microbiol Lett* 2009, **294(1):1-8**.
110. Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ: **The microbiology of butyrate formation in the human colon.** *FEMS Microbiol Lett* 2002, **217(2):133-139**.
111. Siavoshian S, Segain JP, Kornprobst M, Bonnet C, Cherbut C, Galmiche JP, Blottiere HM: **Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression.** *Gut* 2000, **46(4):507-514**.
112. Hapfelmeier S, Macpherson AJ: **In remembrance of commensal intestinal microbes.** *Commun Integr Biol* 2010, **3(6):569-571**.

113. Cash HL, Hooper LV: **Commensal bacteria shape intestinal immune system development.** *ASM News* 2005, **71**(2):77-83.
114. Shi HN, Walker A: **Bacterial colonization and the development of intestinal defences.** *Can J Gastroenterol* 2004, **18**(8):493-500.
115. Abreu MT, Fukata M, Arditi M: **TLR Signaling in the Gut in Health and Disease.** *The Journal of Immunology* 2005, **174**(8):4453-4460.
116. Akira S, Takeda K: **Toll-like receptor signalling.** *Nat Rev Immunol* 2004, **4**(7):499-511.
117. Vannucci L, Stepankova R, Grobarova V, Kozakova H, Rossmann P, Klimesova K, Benson V, Sima P, Fiserova A, Tlaskalova-Hogenova H: **Colorectal carcinoma: Importance of colonic environment for anti-cancer response and systemic immunity.** *J Immunotoxicol* 2009, **6**(4):217-226.
118. Baumgartel T, Zahn D: **Intestinal bacterial flora in carcinoma].** *Dtsch Med Wochenschr* 1953, **78**(18):658-661.
119. Hill MJ, Drasar BS, Hawksworth G, Aries V, Crowther JS, Williams RE: **Bacteria and aetiology of cancer of large bowel.** *Lancet* 1971, **1**:95-100.
120. Drasar BS, Hill MJ: **Intestinal bacteria and cancer.** *Am J Clin Nutr* 1972, **25**(12):1399-1404.
121. Kado S: **Intestinal microflora are necessary for development of spontaneous adenocarcinoma of the large intestine T-cell receptor beta chain and p53 double-knockout mice.** *Cancer Research* 2001, **61**:2395-2398.
122. Balish E, Warner T: **Enterococcus faecalis induces inflammatory bowel disease in interleukin-10 knockout mice.** *Am J Pathol* 2002, **160**(6):2253-2257.
123. Chu FF, Esworthy RS, Chu PG, Longmate JA, Huycke MM, Wilczynski S, Doroshov JH: **Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes.** *Cancer Res* 2004, **64**(3):962-968.

124. Wang X, Huycke MM: **Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* promotes chromosomal instability in mammalian cells.** *Gastroenterology* 2007, **132**(2):551-561.
125. Abdulmir AS, Hafidh RR, Bakar FA: **The association of *Streptococcus bovis/gallolyticus* with colorectal tumors: The nature and the underlying mechanisms of its etiological role.** *J Exp Clin Cancer Res* 2011, **30**:11.
126. Bleibel W, D'Silva K, Elhorr A, Bleibel S, Dhanjal U: ***Streptococcus bovis* endophthalmitis: a unique presentation of colon cancer.** *Dig Dis Sci* 2007, **52**(9):2336-2339.
127. zur Hausen H: ***Streptococcus bovis*: causal or incidental involvement in cancer of the colon?** *Int J Cancer* 2006, **119**(9):xi-xii.
128. Klein RS, Recco RA, Catalano MT, Edberg SC, Casey JI, Steigbigel NH: **Association of *Streptococcus bovis* with carcinoma of the colon.** *N Engl J Med* 1977, **297**(15):800-2.
129. Biarc J, Nguyen IS, Pini A, Gosse F, Richert S, Thierse D, Van Dorsselaer A, Leize-Wagner E, Raul F, Klein JP, Scholler-Guinard M: **Carcinogenic properties of proteins with pro-inflammatory activity from *Streptococcus infantarius* (formerly *S.bovis*).** *Carcinogenesis* 2004, **25**(8):1477-1484.
130. Mahida YR, Rolfe VE: **Host-bacterial interactions in inflammatory bowel disease.** *Clin Sci (Lond)* 2004, **107**(4):331-341.
131. Ohkusa T, Nomura T, Sato N: **The role of bacterial infection in the pathogenesis of inflammatory bowel disease.** *Intern Med* 2004, **43**(7):534-539.
132. Darfeuille-Michaud A: **Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E. coli* pathotype associated with Crohn's disease.** *Int J Med Microbiol* 2002, **292**(3-4):185-193.
133. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H: **Mucosal flora in inflammatory bowel disease.** *Gastroenterology* 2002, **122**(1):44-54.

134. McKay DM: **Intestinal inflammation and the gut microflora.** *Can J Gastroenterol* 1999, **13**(6):509-516.
135. Uronis JM, Muhlbauer M, Herfarth HH, Rubinas TC, Jones GS, Jobin C: **Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility.** *PLoS One* 2009, **4**(6):e6026.
136. Lupp C, Robertson ML, Wickham ME, Sekirov I, Champion OL, Gaynor EC, Finlay BB: **Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae.** *Cell Host Microbe* 2007, **2**(2):119-129.
137. Stecher B, Hardt WD: **The role of microbiota in infectious disease.** *Trends Microbiol* 2008, **16**(3):107-114.
138. Bingham SA, Pignatelli B, Pollock JR, Ellul A, Malaveille C, Gross G, Runswick S, Cummings JH, O'Neill IK: **Does increased endogenous formation of N-nitroso compounds in the human colon explain the association between red meat and colon cancer?** *Carcinogenesis* 1996, **17**(3):515-523.
139. Slattery ML, Potter JD, Duncan DM, Berry TD: **Dietary fats and colon cancer: assessment of risk associated with specific fatty acids.** *Int J Cancer* 1997, **73**(5):670-677.
140. Huycke MM, Gaskins HR: **Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models.** *Exp Biol Med (Maywood)* 2004, **229**(7):586-597.
141. Huycke MM, Abrams V, Moore DR: **Enterococcus faecalis produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA.** *Carcinogenesis* 2002, **23**(3):529-536.
142. Medani M, Collins D, Docherty NG, Baird AW, O'Connell PR, Winter DC: **Emerging role of hydrogen sulfide in colonic physiology and pathophysiology.** *Inflamm Bowel Dis* 2010, 1620-1625.
143. Costarelli V: **Bile acids as possible human carcinogens: new tricks from an old dog.** *Int J Food Sci Nutr* 2009, **3**:1-10.

144. Gill CI, Rowland IR: **Diet and cancer: assessing the risk.** *Br J Nutr* 2002, **88 Suppl 1**:S73-87.
145. Flynn C, Montrose DC, Swank DL, Nakanishi M, Ilesley JN, Rosenberg DW: **Deoxycholic acid promotes the growth of colonic aberrant crypt foci.** *Mol Carcinog* 2007, **46**(1):60-70.
146. Stadler J, Stern HS, Yeung KS, McGuire V, Furrer R, Marcon N, Bruce WR: **Effect of high fat consumption on cell proliferation activity of colorectal mucosa and on soluble faecal bile acids.** *Gut* 1988, **29**(10):1326-1331.
147. Moore W, Moore L: **Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer.** *Appl Environ Microbiol* 1995, **61**(9):3202-3207.
148. Kanazawa K, Konishi F, Mitsuoka T, Terada A, Itoh K, Narushima S, Kumemura M, Kimura H: **Factors influencing the development of sigmoid colon cancer. Bacteriologic and biochemical studies.** *Cancer* 1996, **77**(8 Suppl):1701-1706.
149. Ellmerich S, Scholler M, Durantion B, Gosse F, Galluser M, Klein JP, Raul F: **Promotion of intestinal carcinogenesis by *Streptococcus bovis*.** *Carcinogenesis* 2000, **21**(4):753-756.
150. Scanlan PD, Shanahan F, Clune Y, Collins JK, O'Sullivan GC, O'Riordan M, Holmes E, Wang Y, Marchesi JR: **Culture-independent analysis of the gut microbiota in colorectal cancer and polyposis.** *Environ Microbiol* 2008, **10**(3):789-798.
151. Scanlan PD, Shanahan F, Marchesi JR: **Culture-independent analysis of desulfovibrios in the human distal colon of healthy, colorectal cancer and polypectomized individuals.** *FEMS Microbiol Ecol* 2009, **69**(2):213-221.
152. Shen XJ, Rawls JF, Randall T, Burcal L, Mpande CN, Jenkins N, Jovov B, Abdo Z, Sandler RS, Keku TO: **Molecular characterization of mucosal adherent bacteria and associations with colorectal adenomas.** *Gut Microbes* 2010, **1**(3):138-147.
153. Sobhani I, Tap J, Roudot-Thoraval F, Roperch JP, Letulle S, Langella P, Corthier G, Tran Van Nhieu J, Furet JP: **Microbial**

dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS One* 2011, **6**(1):e16393.

154. Marchesi JR, Dutilh BE, Hall N, Peters WH, Roelofs R, Boleij A, Tjalsma H: **Towards the human colorectal cancer microbiome.** *PLoS One* 2011, **6**(5):e20447.

155. Vogelmann R, Amieva MR: **The role of bacterial pathogens in cancer.** *Curr Opin Microbiol* 2007, 76-81.

156. Swidsinski A, Khilkin M, Kerjaschki D, Schreiber S, Ortner M, Weber J, Lochs H: **Association between intraepithelial Escherichia coli and colorectal cancer.** *Gastroenterology* 1998, **115**(2):281-286.

157. Balamurugan R, Rajendiran E, George S, Samuel GV, Ramakrishna BS: **Real-time polymerase chain reaction quantification of specific butyrate-producing bacteria, Desulfovibrio and Enterococcus faecalis in the feces of patients with colorectal cancer.** *J Gastroenterol Hepatol* 2008, **23**(8 Pt 1):1298-1303.

158. Engle SJ, Ormsby I, Pawlowski S, Boivin GP, Croft J, Balish E, Doetschman T: **Elimination of colon cancer in germ-free transforming growth factor beta 1-deficient mice.** *Cancer Res* 2002, **62**(22):6362-6366.

159. Erdman SE, Poutahidis T, Tomczak M, Rogers AB, Cormier K, Plank B, Horwitz BH, Fox JG: **CD4+ CD25+ regulatory T lymphocytes inhibit microbially induced colon cancer in Rag2-deficient mice.** *Am J Pathol* 2003, **162**(2):691-702.

160. Newman JV, Kosaka T, Sheppard BJ, Fox JG, Schauer DB: **Bacterial infection promotes colon tumorigenesis in Apc(Min/+) mice.** *J Infect Dis* 2001, **184**(2):227-230.

161. Martin HM, Campbell BJ, Hart CA, Mpofu C, Nayar M, Singh R, Englyst H, Williams HF, Rhodes JM: **Enhanced Escherichia coli adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer.** *Gastroenterology* 2004, **127**(1):80-93.

162. Toprak NU, Yagci A, Gulluoglu BM, Akin ML, Demirkalem P, Celenk T, Soyletir G: **A possible role of Bacteroides fragilis enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer.** *Clin Microbiol Infect* 2006, **12**(8):782-786.

163. Tabibian N, Clarridge J: ***Streptococcus bovis* septicemia and large bowel neoplasia.** *Am Fam Physician* 1989, **39**(4):227-229.
164. Corredoira J, Alonso MP, Coira A, Varela J: **Association between *Streptococcus infantarius* (formerly *S. bovis* II/1) bacteremia and noncolonic cancer.** *J Clin Microbiol* 2008, **46**(4):1570.
165. Herrera P, Kwon YM, Ricke SC: **Ecology and pathogenicity of gastrointestinal *Streptococcus bovis*.** *Anaerobe* 2009, **15**(1-2):44-54.
166. Nguyen IS, Biarc J, Pini A, Gosse F, Richert S, Thierse D, Van Dorsselaer A, Leize-Wagner E, Raul F, Klein JP, Scholler-Guinard M: ***Streptococcus infantarius* and colonic cancer: Identification and purification of cell wall proteins putatively involved in colorectal inflammation and carcinogenesis in rats.** *International Congress Series*, 2006, **1289**:257-261.
167. Nielsen S, Christensen J, Laerkeborg A, Haunso S, Knudsen J: **Molecular-biological methods of diagnosing colon-related *Streptococcus bovis* endocarditis.** *Ugeskr Laeger* 2007, **169**(7):610-611.
168. Abdulmir AS, Hafidh RR, Bakar FA: **Molecular detection, quantification, and isolation of *Streptococcus gallolyticus* bacteria colonizing colorectal tumors: inflammation-driven potential of carcinogenesis via IL-1, COX-2, and IL-8.** *Mol Cancer* 2010, **9**:249.
169. Volker M, Morris JG: **Colonic Bacterial Flora: Changing understandings in the molecular age.** *Journal of Nutrition* 2003, 459-464.
170. Cunningham MW: **Pathogenesis of group A streptococcal infections.** *Clin Microbiol* 2000, **13**:470-511.
171. Facklam R: **What happened to the Streptococci: Overview of taxonomic and nomenclature changes.** *Clinical Microbiology Reviews* 2002, **15**(4):613-630.
172. Facklam, R., Sahm, D.S., Teixeira, L.M.: *Streptococci, chapter 17.*
173. Lanie JA, Ng WL, Kazmierczak KM, Andrzejewski TM, Davidsen TM, Wayne KJ, Tettelin H, Glass JI, Winkler ME: **Genome sequence of**

Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6. *J Bacteriol* 2007, **189**(1):38-51.

174. Ruoff KL, et al.: **Bacteremia with *Streptococcus bovis* and *Streptococcus salivarius*: clinical correlates of more accurate identification of isolates.** *J Clin Microbiol* 1989, **27**:305-308.

175. Pandak N, Tomic-Paradzic M, Krizanovic B, Fornet-Sapceviski J: **The importance of *Streptococcus bovis* systemic infections.** *Lijec Vjesn* 2006, **128**(7-8):206-209.

176. zur Hausen H: ***Streptococcus bovis*: causal or incidental involvement in cancer of the colon?** *Int J Cancer* 2006, **119**(9):xi-xii.

177. Scheleifer, K. H., Dlipper-Balz,R.: **Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review.** *Syst. Appl. Microbiol.* 1987, **10**:1-19.

178. William FV: **An overview of the genus *Streptococcus*.** *Infect Dis Update* 2005, **12**(3):13-19.

179. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D: **A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria.** *Journal of Microbiological Methods* 2007, **69**(2):330-339.

180. Allmann MC,et al: **Polymerase chain reaction for detection of pathogenic microorganisms in bacteriological monitoring of dairy products.** *Res. Microbiol.* 1995, **146**:85-97.

181. Kawamura Y, Hou X, Sultana F, Miura H, Ezaki T: **Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus* [published erratum appears in *Int J Syst Bacteriol* 1995 Oct;**45**(4):882].** *Int J Syst Bacteriol* 1995, **45**(2):406-408.

182. Kawamura Y, Whiley R, Shu S, Ezaki T, Hardie J: **Genetic approaches to the identification of the mitis group within the genus *Streptococcus*.** *Microbiology* 1999, **145**(Pt 9):2605-2613.

183. Takao A, Nagamune H, Maeda N.: **Identification of the anginosus group within the genus *Streptococcus* using polymerase chain reaction.** *FEMS Microbiol Lett* 2004, **1**:83-89.
184. Picard FJ, Ke D, Boudreau DK, Boissinot M, Huletsky A, Richard D, Ouellette M, Roy PH, Bergeron MG: **Use of *tuf* sequences for genus-specific PCR detection and phylogenetic analysis of 28 streptococcal species.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**(8):3686-3695.
185. Ke D, Picard FJ, Martineau F, Menard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG: **Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci.** *J Clin Microbiol* 1999, **37**(11):3497-3503.
186. Martineau F, Picard F, Ke D, Paradis S, Roy P, Ouellette M, Bergeron M: **Development of a PCR Assay for Identification of Staphylococci at Genus and Species Levels.** *J Clin Microbiol* 2001, **39**(7):2541-2547.
187. Schuchat A: **Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms.** *Clinical Microbiology Reviews* 1998, **11**:497-513.
188. Sgro M, Shah PS, Campbell D, Tenuta A, Shivananda S, Lee SK: **Early-onset neonatal sepsis: rate and organism pattern between 2003 and 2008.** *J Perinatol* 2011, 794-798.
189. Bisno, J.A.L., Collins, C.M., Turner, J.: **M proteins of group C streptococci isolated from patients with acute pharyngitis.** *Journal of clinical microbiology* 1996, **34**:2511-2515.
190. Gold JS, Bayar S, Salem RR: **Association of *Streptococcus bovis* bacteremia with colonic neoplasia and extracolonic malignancy.** *Arch Surg* 2004, **139**(7):760-765.
191. Katz AR: **Severe streptococcal infections in historical perspective.** *Clin Infect Dis* 1990, **14**:298-307.
192. Sultana F, Kawamura Y, Hou XG, Shu SE, Ezaki T: **Determination of 23S rRNA sequences from members of the genus *Streptococcus* and characterization of genetically distinct organisms previously identified as members of the *Streptococcus anginosus* group.** *FEMS Microbiol Lett* 1998, **158**(2):223-30.

193. Whitney CN, Farley MM, et al.: **Increasing prevalence of multidrug resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States.** *N Engl J Med* 1999, **343**:1917-1924.
194. Black Sea: **Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children.** *Pediatr Infect Dis J* 2000, **19**:187-195.
195. Ko KS, Lee HK, Park MY, Kook YH: **Mosaic structure of pathogenicity islands in *Legionella pneumophila*.** *J Mol Evol* 2003, **57**(1):63-72.
196. Songy WB, Ruoff KL, Facklam RR, Ferraro MJ, Falkow S: **Identification of *Streptococcus bovis* biotype I strains among *S. bovis* clinical isolates by PCR.** *J Clin Microbiol* 2002, **40**(8):2913-2918.
197. Betriu C, Culebras E, Gomez M, Rodríguez-Avial I, Sanchez BA, Agreda MC, Picazo JJ: **Erythromycin and Clindamycin Resistance and Telithromycin Susceptibility in *Streptococcus agalactiae*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2003, **47**(3):1112–1114.
198. Chen Z, Saxena D, Caufield PW, Ge Y, Wang M, Li Y: **Development of species-specific primers for detection of *Streptococcus mutans* in mixed bacterial samples.** *FEMS Microbiol Lett* 2007, **272**(2):154-162.
199. Kresken M, Henrichfreise B, et al.: **High Prevalence of the ermB Gene among Erythromycin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Isolates in Germany during the Winter.** *Antimicrob Agents Chemother* 2004, **48**(8):3193–3195.
200. Friedrich IA, Wormser GP, Gottfried EB: **The association of remote *Streptococcus bovis* bacteremia with colonic neoplasia.** *Am J Gastroenterol* 1982, **77**(2):82-84.
201. Burns CA, McCaughey R, Lauter CB: **The association of *Streptococcus bovis* fecal carriage and colon neoplasia: possible relationship with polyps and their premalignant potential.** *Am J Gastroenterol* 1985, **80**(1):42-46.
202. Robbins N, Klein RS: **Carcinoma of the colon 2 years after endocarditis due to *Streptococcus bovis*.** *Am J Gastroenterol* 1983, **78**(3):162-163.

203. Murray PR, Baron EJJ, American Society for Microbiology: **Manual of clinical microbiology**: Washington, D.C.: ASM Press; 2003.
204. Macfarlane GT, Gibson GR, Cummings JH: **Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon**. *J Appl Bacteriol* 1992, **72**(1):57-64.
205. Van der Waaij LA, Harmsen HJ, Madjipour M, Kroese FG, Zwieters M, van Dullemen HM, de Boer NK, Welling GW, Jansen PL: **Bacterial population analysis of human colon and terminal ileum biopsies with 16S rRNA-based fluorescent probes: commensal bacteria live in suspension and have no direct contact with epithelial cells**. *Inflamm Bowel Dis* 2005, **11**(10):865-871.
206. Kleessen B, Kroesen AJ, Buhr HJ, Blaut M: **Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls**. *Scand J Gastroenterol* 2002, **37**(9):1034-1041.
207. Hopkins MJ, Englyst HN, Macfarlane S, Furrrie E, Macfarlane GT, McBain AJ: **Degradation of cross-linked and non-cross-linked arabinoxylans by the intestinal microbiota in children**. *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**(11):6354-6360.
208. Wang M, Ahrne S, Jeppsson B, Molin G: **Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes**. *FEMS Microbiol Ecol* 2005, **54**(2):219-231.
209. Ahmed S, Macfarlane GT, Fite A, McBain AJ, Gilbert P, Macfarlane S: **Mucosa-associated bacterial diversity in relation to human terminal ileum and colonic biopsy samples**. *Appl Environ Microbiol* 2007, **73**(22):7435-7442.
210. Boonjink CC, El-Aidy S, Rajilic-Stojanovic M, Heilig HG, Troost FJ, Smidt H, Kleerebezem M, De Vos WM, Zoetendal EG: **High temporal and inter-individual variation detected in the human ileal microbiota**. *Environ Microbiol* 2010, **12**(12):3213-3227.
211. Huijsdens XW, Linskens RK, Mak M, Meuwissen SG, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH: **Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR**. *J Clin Microbiol* 2002, **40**(12):4423-4427.

212. Van den Bogert B, de Vos WM, Zoetendal EG, Kleerebezem M: **Microarray analysis and barcoded pyrosequencing provide consistent microbial profiles depending on the source of human intestinal samples.** *Appl Environ Microbiol* 2011, 2071-2080.
213. Muyzer G, Smalla K: **Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology.** *Antonie Van Leeuwenhoek* 1998, **73**(1):127-141.
214. Kleppe HH, et al: **Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases.** *J. Mol. Biol.* 1971, **56**:341-347.
215. Muyzer, G. de Waal, E. C. Uitterlinden, A.G.: **Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA.** *Appl Environ Microbiol* 1993, **59**(3):695-700.
216. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**(17):3389-3402.
217. Maidak, B. L. Cole, J. R. Lilburn, T. G. Parker, C.T.Jr, Saxman, P. R. Farris, R. J. Garrity, G. M. Olsen, G. J. Schmidt, T. M. Tiedje, J.M.: **The RDP-II (Ribosomal Database Project).** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**(1):173-174.
218. Muyzer G, Teske A, Wirsén CO, Jannasch HW: **Phylogenetic relationships of Thiomicrospira species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments.** *Arch Microbiol* 1995, **164**(3):165-172.
219. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG: **The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**(24):4876-4882.
220. Hall T: **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 1999, **41**:95-98.

221. Larsen N, Olsen GJ, Maidak B, McCaughey L, Overbeek R, Macke TJ, Marsh TL, Woese CR: **The ribosomal database project.** *Nucleic Acids Res* 1993, **21**(13):3021-3023.
222. Felsenstein J: **PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c.** 1993, **Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.**
223. Wang X, Heazlewood SP, Krause DO, Florin TH.: **Molecular characterization of the microbial species that colonize human ileal and colonic mucosa by using 16S rDNA sequence analysis.** *J Appl Microbiol.* 2003, **95**(3):508-520.
224. Muyzer G: **DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems.** *Curr Opin Microbiol* 1999, **2**(3):317-322.
225. Duarte RS, Barros RR, Facklam RR, Teixeira LM: **Phenotypic and genotypic characteristics of Streptococcus porcinus isolated from human sources.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**(9):4592-4601.
226. Fite A, Macfarlane GT, Cummings JH, Hopkins MJ, Kong SC, Furrie E, Macfarlane S: **Identification and quantitation of mucosal and faecal desulfovibrios using real time polymerase chain reaction.** *Gut* 2004, **53**(4):523-529.
227. Bartosch S, Fite A, Macfarlane GT, McMurdo ME: **Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota.** *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**(6):3575-3581.
228. Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N: **Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set.** *Microbiology* 2002, **148**(Pt 1):257-266.
229. Jobson JD: **Applied multivariate data analysis. Vol 2.** 1992, **2.**
230. Sonnenburg JL, Angenent LT, Gordon JI: **Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine?** *Nat Immunol* 2004, **5**(6):569-573.

231. Kovatcheva-Datchary P, Zoetendal EG, Venema K, de Vos WM, Smidt H: **Tools for the tract: understanding the functionality of the gastrointestinal tract.** *Therap Adv Gastroenterol* 2009, **2**(4):9-22.
232. Walker AW, Ince J, Duncan SH, Webster LM, Holtrop G, Ze X, Brown D, Stares MD, Scott P, Bergerat A, Louis P, McIntosh F, Johnstone AM, Lobley GE, Parkhill J, Flint HJ: **Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota.** *ISME J* 2011, **5**(2):220-230.
233. Vitali B, Ndagijimana M, Cruciani F, Carnevali P, Candela M, Guerzoni ME, Brigidi P: **Impact of a synbiotic food on the gut microbial ecology and metabolic profiles.** *BMC Microbiol* 2010, **10**:4.
234. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB: **Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria.** *J Lipid Res* 2006, **47**(2):241-259.
235. Zampa A, Silvi S, Fabiani R, Morozzi G, Orpianesi C, Cresci A: **Effects of different digestible carbohydrates on bile acid metabolism and SCFA production by human gut micro-flora grown in an in vitro semi-continuous culture.** *Anaerobe* 2004, **10**(1):19-26.
236. Attene-Ramos MS, Wagner ED, Gaskins HR, Plewa MJ: **Hydrogen sulfide induces direct radical-associated DNA damage.** *Mol Cancer Res* 2007, **5**(5):455-459.
237. Roediger WE, Moore J, Babidge W: **Colonic sulfide in pathogenesis and treatment of ulcerative colitis.** *Dig Dis Sci* 1997, **42**(8):1571-1579.
238. Comalada M, Bailon E, de Haro O, Lara-Villoslada F, Xaus J, Zarzuelo A, Galvez J: **The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2006, **132**(8):487-497.
239. Hodin RA, Meng S, Archer S, Tang R: **Cellular growth state differentially regulates enterocyte gene expression in butyrate-treated HT-29 cells.** *Cell Growth Differ* 1996, **7**(5):647-653.
240. Mortensen FV, Langkilde NC, Joergensen JC, Hessov I: **Short-chain fatty acids stimulate mucosal cell proliferation in the closed human rectum after Hartmann's procedure.** *Int J Colorectal Dis* 1999, **14**(3):150-154.

241. Cuevas-Ramos G, Petit CR, Marcq I, Boury M, Oswald E, Nougayrede JP: **Escherichia coli induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(25):11537-11542.
242. Mager DL: **Bacteria and cancer: cause, coincidence or cure?** *Journal of Translational Medicine* 2006, **4**(14).
243. Mylonaki M, Rayment NB, Rampton DS, Hudspith BN, Brostoff J: **Molecular characterization of rectal mucosa-associated bacterial flora in inflammatory bowel disease.** *Inflamm Bowel Dis* 2005, **11**(5):481-487.
244. Geier MS, Butler RN, Howarth GS: **Probiotics, prebiotics and synbiotics: a role in chemoprevention for colorectal cancer?** *Cancer Biol Ther* 2006, **5**(10):1265-1269.
245. Horie H, Kanazawa K, Kobayashi E, Okada M, Fujimura A, Yamagiwa S, Abo T: **Effects of intestinal bacteria on the development of colonic neoplasm II. Changes in the immunological environment.** *Eur J Cancer Prev* 1999, **8**(6):533-537.
246. Gorbach SL, Goldin BR: **The intestinal microflora and the colon cancer connection.** *Rev Infect Dis* 1990, **12 Suppl 2**:S252-S261.
247. H. Heuer, K. Smalla: **Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities.** In J. D. van Elsas, E. M. H. Wellington, and J. T. Trevors (ed.), *Modern soil microbiology.* Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. 1997, :p. 353-373.
248. Bleibel W, D'Silva K, Elhorr A, Bleibel S, Dhanjal U: **Streptococcus bovis endophthalmitis: a unique presentation of colon cancer.** *Dig Dis Sci* 2007, **52**(9):2336-2339.
249. Heavey PM, McKenna D, Rowland IR: **Colorectal cancer and the relationship between genes and the environment.** *Nutr Cancer* 2004, **48**(2):124-141.
250. Gueimonde M, Ouwehand A, Huhtinen H, Salminen E, Salminen S: **Qualitative and quantitative analyses of the bifidobacterial microbiota in the colonic mucosa of patients with colorectal cancer,**

diverticulitis and inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007, **13**(29):3985-3989.

251. Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y: **Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods.** *Microbiol Immunol* 2002, **46**(8):535-458.

252. Hayashi H, Takahashi R, Nishi T, Sakamoto M, Benno Y: **Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism.** *J Med Microbiol* 2005, **54**(Pt 11):1093-1101.

253. Schleifer R, Kilpper-Balz K: **Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov.** *Int. J. Sys. Bacteriol.* 1984, **34**:31–34.

254. Allen TD, Moore DR, Wang X, Casu V, May R, Lerner MR, Houchen C, Brackett DJ, Huycke MM: **Dichotomous metabolism of *Enterococcus faecalis* induced by haematin starvation modulates colonic gene expression.** *J Med Microbiol* 2008, **57**(Pt 10):1193-1204.

255. Marnett LJ: **Oxyradicals and DNA damage.** *Carcinogenesis* 2000, **21**(3):361-370.

256. Rhen Mea: **The basis of persistent bacterial infections.** *TRENDS in Microbiology* 2003, **11**(2):80-86.

257. Olejnik A, Tomczyk J, Kowalska K, Grajek W: **The role of natural dietary compounds in colorectal cancer chemoprevention].** *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2010, **64**:175-187.

258. Willett WC: **Diet and cancer: one view at the start of the millennium.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001, **10**(1):3-8.

259. Ren X, Zhang X, Zhang X, Gu W, Chen K, Le Y, Lai M, Zhu Y: **Type 2 diabetes mellitus associated with increased risk for colorectal cancer: Evidence from an international ecological study and population-based risk analysis in China.** *Public Health* 2009, **123**(8):540-544.

260. Vaughan, Arthur C. Ouwehand and Elaine E.: **Chapter 12. The gastrointestinal microbiota in cancer.** *Taylor & Francis (New York) Gastrointestinal Microbiology.*
261. Sinicrope FA: **Sporadic colorectal cancer: an infectious disease?** *Gastroenterology* 2007, **132**(2):797-801.
262. Seril DN, Liao J, Yang GY, Yang CS: **Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models.** *Carcinogenesis* 2003, **24**(3):353-362.
263. Baylan O, Nazik H, Bektore B, Citil BE, Turan D, Ongen B, Ozyurt M, Acikel CH, Haznedaroglu T: **The relationship between antibiotic resistance and virulence factors in urinary enterococcus isolates.** *Mikrobiyol Bul* 2011, **45**(3):430-445.
264. Sun J, Sundsfjord A, Song X: **Enterococcus faecalis from patients with chronic periodontitis: virulence and antimicrobial resistance traits and determinants.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011, 267-272.
265. Arias CA, Panesso D, McGrath DM, Qin X, Mojica MF, Miller C, Diaz L, Tran TT, Rincon S, Barbu EM, Reyes J, Roh JH, Lobos E, Sodergren E, Pasqualini R, Arap W, Quinn JP, Shamooy Y, Murray BE, Weinstock GM: **Genetic basis for in vivo daptomycin resistance in enterococci.** *N Engl J Med* 2011, **365**(10):892-900.
266. Pallares R, Pujol M, Pena C, Ariza J, Martin R, Gudiol F: **Cephalosporins as risk factor for nosocomial Enterococcus faecalis bacteremia. A matched case-control study.** *Arch Intern Med* 1993, **153**(13):1581-1586.
267. Srikanth CV, McCormick BA: **Interactions of the intestinal epithelium with the pathogen and the indigenous microbiota: a three-way crosstalk.** *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2008:626827.
268. Horie H, Kanazawa K, Okada M, Narushima S, Itoh K, Terada A: **Effects of intestinal bacteria on the development of colonic neoplasm: an experimental study.** *Eur J Cancer Prev* 1999, **8**(3):237-245.
269. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric

N: **The real-time polymerase chain reaction.** *Mol Aspects Med* 2006, **27**(2-3):95-125.

270. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Kaczmarek EB, Fox AJ: **Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR.** *J Clin Microbiol* 2000, **38**(5):1747-1752.

271. Frank DN, Pace NR: **Molecular-phylogenetic analyses of human gastrointestinal microbiota.** *Curr Opin Gastroenterol* 2001, **17**(1):52-57.

272. Vinikoor LC, Long MD, Keku TO, Martin CF, Galanko JA, Sandler RS: **The association between diabetes, insulin use, and colorectal cancer among Whites and African Americans.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009, **18**(4):1239-1242.

273. Mariani F, Sena P, Marzona L, Riccio M, Fano R, Manni P, Gregorio CD, Pezzi A, Leon MP, Monni S, Pol AD, Roncucci L: **Cyclooxygenase-2 and Hypoxia-Inducible Factor-1alpha protein expression is related to inflammation, and up-regulated since the early steps of colorectal carcinogenesis.** *Cancer Lett* 2009, **279**(2):221-229.

274. Goethals L, Debucquoy A, Perneel C, Geboes K, Ectors N, De Schutter H, Penninckx F, McBride WH, Begg AC, Haustermans KM: **Hypoxia in human colorectal adenocarcinoma: comparison between extrinsic and potential intrinsic hypoxia markers.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006, **65**(1):246-254.

275. Wali RK, Roy HK, Kim YL, Liu Y, Koetsier JL, Kunte DP, Goldberg MJ, Turzhitsky V, Backman V: **Increased microvascular blood content is an early event in colon carcinogenesis.** *Gut* 2005, **54**(5):654-660.

276. Guebel DV, Torres NV: **A computer model of oxygen dynamics in human colon mucosa: implications in normal physiology and early tumor development.** *J Theor Biol* 2008, **250**(3):389-409.

277. Lopez-Siles M, Khan TM, Duncan SH, Harmsen HJ, Garcia-Gil LJ, Flint HJ: **Cultured representatives of two major phylogroups of human colonic *Faecalibacterium prausnitzii* can utilize pectin, uronic acids, and host-derived substrates for growth.** *Appl Environ Microbiol* 2012, **78**(2):420-428.

278. Tap J, Mondot S, Levenez F, Pelletier E, Caron C, Furet JP, Ugarte E, Munoz-Tamayo R, Paslier DL, Nalin R, Dore J, Leclerc M: **Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core.** *Environ Microbiol* 2009, **11**(10):2574-2584.
279. Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, Nalin R, Jarrin C, Chardon P, Marteau P, Roca J, Dore J: **Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach.** *Gut* 2006, **55**(2):205-211.
280. Li M, Wang B, Zhang M, Rantalainen M, Wang S, Zhou H, Zhang Y, Shen J, Pang X, Zhang M, Wei H, Chen Y, Lu H, Zuo J, Su M, Qiu Y, Jia W, Xiao C, Smith LM, Yang S, Holmes E, Tang H, Zhao G, Nicholson JK, Li L, Zhao L: **Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(6):2117-2122.
281. Funke G, von Graevenitz A, Clarridge JE, 3rd, Bernard KA: **Clinical microbiology of coryneform bacteria.** *Clin Microbiol Rev* 1997, **10**(1):125-159.
282. Coyle MB, Lipsky BA: **Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects.** *Clin Microbiol Rev* 1990, **3**(3):227-246.
283. Hill MJ, Drasar BS: **The normal colonic bacterial flora.** *Gut* 1975, **16**(4):318-323.
284. Spratt DA, Weightman AJ, Wade WG: **Diversity of oral asaccharolytic *Eubacterium* species in periodontitis--identification of novel phylotypes representing uncultivated taxa.** *Oral Microbiol Immunol* 1999, **14**(1):56-59.
285. Köhler W: **The present state of species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*.** *International Journal of Medical Microbiology* 2007, **297**:133-150.
286. Turrone F, Ribbera A, Foroni E, van Sinderen D, Ventura M: **Human gut microbiota and bifidobacteria: from composition to functionality.** *Antonie Van Leeuwenhoek* 2008, **94**(1):35-50.
287. Rondon, M. R. August, P. R. Bettermann, A. D. Brady, S. F. Grossman, T. H. Liles, M. R. Loiacono, K. A. Lynch, B. A. MacNeil, I.

- A. Minor, C. Tiong, C. L. Gilman, M. Osburne, M. S. Clardy, J. Handelsman, J. Goodman, R.M.: **Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms.** *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**(6):2541-2547.
288. Gray T: ***Streptococcus anginosus* Group: Clinical Significance of an Important Group of Pathogens.** *Clin Microbiol Newsletter* 2005, **27**:155-159.
289. Hong PY, Croix JA, Greenberg E, Gaskins HR, Mackie RI: **Pyrosequencing-based analysis of the mucosal microbiota in healthy individuals reveals ubiquitous bacterial groups and micro-heterogeneity.** *PLoS One* 2011, **6**(9):e25042.
290. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, Al-Soud WA, Sorensen SJ, Hansen LH, Jakobsen M: **Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults.** *PLoS One* 2010, **5**(2):e9085.
291. Martinez-Medina M, Aldeguer X, Lopez-Siles M, Gonzalez-Huix F, Lopez-Oliu C, Dahbi G, Blanco JE, Blanco J, Garcia-Gil LJ, Darfeuille-Michaud A: **Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease.** *Inflamm Bowel Dis* 2009, **15**(6):872-882.
292. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, Bringer MA, Swidsinski A, Beaugerie L, Colombel JF: **High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease.** *Gastroenterology* 2004, **127**(2):412-421.
293. Benjamin JL, Hedin CR, Koutsoumpas A, Ng SC, McCarthy NE, Prescott NJ, Pessoa-Lopes P, Mathew CG, Sanderson J, Hart AL, Kamm MA, Knight SC, Forbes A, Stagg AJ, Lindsay JO, Whelan K: **Smokers with active Crohn's disease have a clinically relevant dysbiosis of the gastrointestinal microbiota.** *Inflamm Bowel Dis* 2011, 1536-4844.
294. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bridonneau C, Furet JP, Corthier G, Grangette C, Vasquez N, Pochart P, Trugnan G, Thomas G, Blottiere HM, Dore J, Marteau P, Seksik P, Langella P: ***Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified**

by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(43):16731-16736.

295. Sartor RB: **Therapeutic correction of bacterial dysbiosis discovered by molecular techniques.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(43):16413-16414.

296. Haffajee AD, Socransky SS: **Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota.** *J Clin Periodontol* 2001, **28**(5):377-388.

297. Charlson ES, Chen J, Custers-Allen R, Bittinger K, Li H, Sinha R, Hwang J, Bushman FD, Collman RG: **Disordered microbial communities in the upper respiratory tract of cigarette smokers.** *PLoS One* 2010, **5**(12):e15216.

298. Flint HJ, Duncan SH, Scott KP, Louis P: **Interactions and competition within the microbial community of the human colon: links between diet and health.** *Environ Microbiol* 2007, **9**(5):1101-1111.

299. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI: **The human microbiome project.** *Nature* 2007, **449**(7164):804-810.

300. Foxman B, Goldberg D, Murdock C, Xi C, Gilsdorf JR: **Conceptualizing human microbiota: from multicelled organ to ecological community.** *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2008, **2008**:613979.

301. Hope ME: **Sporadic colorectal cancer- role of the comensal microbiota.** *FEMS Letters* 2005, :7.

302. Gravaghi C, Bo J, Laperle KM, Quimby F, Kucherlapati R, Edelmann W, Lamprecht SA: **Obesity enhances gastrointestinal tumorigenesis in Apc-mutant mice.** *Int J Obes (Lond)* 2008, **32**(11):1716-1719.

303. Yang K, Kurihara N, Fan K, Newmark H, Rigas B, Bancroft L, Corner G, Livote E, Lesser M, Edelmann W, Velcich A, Lipkin M, Augenlicht L: **Dietary Induction of Colonic Tumors in a Mouse Model of Sporadic Colon Cancer.** *Cancer Res* 2008, **68**(19):7803-7810.

304. Arthur JC, Jobin C: **The struggle within: microbial influences on colorectal cancer.** *Inflamm Bowel Dis* 2011, **17**(1):396-409.

305. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E: **Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group.** *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**(10):4555-4558.

306. Travaglione S, Fabbri A, Fiorentini C: **The Rho-activating CNF1 toxin from pathogenic *E. coli*: a risk factor for human cancer development?** *Infect Agent Cancer* 2008, **3**:4.

307. Maddocks OD, Short AJ, Donnenberg MS, Bader S, Harrison DJ: **Attaching and effacing *Escherichia coli* downregulate DNA mismatch repair protein in vitro and are associated with colorectal adenocarcinomas in humans.** *PLoS One* 2009, **4**(5):e5517.

308. Grady WM: **Genomic instability and colon cancer.** *Cancer Metastasis Rev* 2004, **23**(1-2):11-27.

309. Wells CL, Erlandsen SL: **Localization of translocating *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, and *Enterococcus faecalis* within cecal and colonic tissues of monoassociated mice.** *Infect Immun* 1991, **59**(12):4693-4697.

310. Wang X, Allen TD, May RJ, Lightfoot S, Houchen CW, Huycke MM: ***Enterococcus faecalis* induces aneuploidy and tetraploidy in colonic epithelial cells through a bystander effect.** *Cancer Res* 2008, **68**(23):9909-9917.

311. Clarke JM, Young GP, Topping DL, Bird AR, Cobiac L, Scherer BL, Winkler JG, Lockett TJ: **Butyrate delivered by butyrylated starch increases distal colonic epithelial apoptosis in carcinogen-treated rats.** *Carcinogenesis* 2012, **33**(1):197-202.

312. Hu S, Dong TS, Dalal SR, Wu F, Bissonnette M, Kwon JH, Chang EB: **The microbe-derived short chain fatty acid butyrate targets miRNA-dependent p21 gene expression in human colon cancer.** *PLoS One* 2011, **6**(1):e16221.

313. Bordonaro M, Lazarova DL, Sartorelli AC: **Butyrate and Wnt signaling: a possible solution to the puzzle of dietary fiber and colon cancer risk?** *Cell Cycle* 2008, **7**(9):1178-1183.