

# PROYECTO FIN DE MÁSTER

## **Prevalence of *Streptococcus gallolyticus* in a non-selected cohort of colorectal cancer patients: clinical and pathological profile**

There is an unambiguous association of *Streptococcus gallolyticus* infection with colorectal cancer, although there is limited information about epidemiology or interaction between molecular and environmental factors. We performed an original quantitative analysis of *S. gallolyticus* in unselected colorectal cancer patients and their association with clinical, pathological and tumour molecular profiles.

Autora: Maria Andrés Franch.

Tutor académico: Sergio Padilla Urrea

Tutora: Victoria Sánchez Hellín.

## ÍNDICE

### I. ASPECTOS PRELIMINARES

Resumen

### II. CUERPO DEL TRABAJO

#### 1. Introducción

#### 2. Estado de la cuestión

Dimensión del problema del cáncer colorrectal (CCR)

Etiopatogenia del CCR

*S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (biotipo I) y CCR

#### 3. Hipótesis

#### 4. Objetivos

#### 5. Metodología

Diseño

Sujetos del estudio y tamaño muestral

Variables

Mediciones

- Diseño y validación de la PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) para la amplificación y cuantificación del gen bacteriano *sodA*
- Detección y cuantificación de *S. gallolyticus* en CCR mediante qPCR
- Variables demográficas, clínicas y patológicas
- Fenotipo metilador de secuencias CpG
- Análisis de la inestabilidad de microsatélites (MSI)
- Detección cualitativa de VEB y CMV en mucosa normal y tejido tumoral

Análisis estadístico

Dificultades y limitaciones

#### 6. Aspectos éticos y de confidencialidad

#### 7. Resultados

Datos obtenidos mediante su aplicación

Análisis e interpretación de los resultados

Consideraciones finales y conclusiones

#### 8. Aplicabilidad y utilidad práctica de los resultados obtenidos o previsibles

#### 9. Discusión

### III.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

#### I. ASPECTOS PRELIMINARES

##### Resumen

La evidencia científica que apoya el papel de *Streptococcus gallolyticus*, patógeno oportunista antiguamente conocido como *Streptococcus bovis* biotipo I, en la carcinogénesis del cáncer colorrectal (CCR) ha aumentado en los últimos años. La identificación correcta del microorganismo es crucial para evaluar la asociación entre la bacteria y el CCR. En este estudio, se ha diseñado una PCR cuantitativa a tiempo real dirigida frente al gen *sodA* de *Streptococcus gallolyticus* que amplifica específicamente las tres subespecies de *S. gallolyticus* (*S. gallolyticus* subsp *gallolyticus*, *S. gallolyticus* subsp *pasteurianus* and *S. gallolyticus* subsp *macedonicus*), y de esta manera, poder estimar la prevalencia de *S. gallolyticus* (SG) en un total de 380 muestras (de tejido tumoral y su mucosa normal correspondiente) procedentes de 190 pacientes de una cohorte no seleccionada que presentaba CCR esporádico.

Se determinaron las principales rutas genéticas del CCR: la presencia de anomalías cromosómicas (chromosomal instability (CIN)), la inestabilidad de microsatélites (microsatellite instability (MSI)) y el fenotipo metilador de secuencias CpG (CpG island methylator phenotype (CIMP)). La presencia de coinfección con el virus Epstein-Barr (VEB) y/o Citomegalovirus también fue detectada mediante PCR.

La prevalencia de SG observada en nuestra cohorte fue de 3.2%. Todos los resultados positivos para SG fueron detectados en muestras de tejido tumoral, y se asociaron de manera significativa a estadios tempranos del tumor, así como a coinfección por VEB. La baja prevalencia observada puede sugerir un posible efecto oncomodulador, que podría estar potenciado por otras variables patológicas analizadas, tales como un estatus CIMP negativo y estabilidad de microsatélites (MSS).

Palabras clave: Cáncer colorrectal; *Streptococcus gallolyticus*; gen *sodA*; PCR cuantitativa a tiempo real.

## Abstract

Increasing evidence suggest that *Streptococcus gallolyticus*, an opportunistic pathogen previously known as *Streptococcus bovis* biotype I, may play a role in the colorectal cancer (CRC) carcinogenesis. Here, we perform a quantitative real-time PCR targeting *sodA* gene of *Streptococcus gallolyticus* to specifically amplify the three subspecies of *S. gallolyticus* (*S. gallolyticus* subsp *gallolyticus*, *S. gallolyticus* subsp *pasteurianus* and *S. gallolyticus* subsp *macedonicus*) to estimate the prevalence of *S. gallolyticus* (SG) in a total of 380 samples (tumour tissue and their corresponding normal colonic mucosa) derived from 190 patients from an unselected cohort with sporadic colorectal cancer.

The major genetic pathways of CRC, chromosomal instability (CIN), microsatellite instability (MSI) and CpG island methylator phenotype (CIMP) were performed. And the presence of *Epstein-Barr* virus (EBV) and *Citomegalovirus* co-infection was also detected by PCR. The prevalence of SG in our cohort was 3.2%. All positive findings were obtained from tumour tissues and were significantly associated to earlier stages of the tumour and EBV co-infection. This low prevalence of SG might suggest a possible oncomodulator effect, possibly associated with other pathological variables analysed such as a negative CIMP status and microsatellite stability (MSS).

Keywords: Colorectal cancer; *Streptococcus gallolyticus*; *sodA* gene; Quantitative real-time PCR.

## II. CUERPO DEL TRABAJO

### 1. Introducción

El cáncer colorrectal (CCR) supone el tercer tipo de cáncer más frecuente en varones, después de pulmón y próstata, y el segundo en mujeres después de cáncer de mama en toda la población mundial<sup>1</sup>. Debido a esta elevada prevalencia, así como a la continua aparición de nuevos casos, es clave su detección temprana y adecuada mientras el tumor esté localizado, ya que esto puede detener su progresión y con ello mejorar considerablemente las tasas de curación<sup>2</sup>.

Las principales características moleculares del CCR son bien conocidas, estableciéndose como modelo carcinogénico un proceso en diferentes etapas con la progresiva acumulación de alteraciones (epi)genéticas a lo largo de los años. Existen tres rutas implicadas en la carcinogénesis molecular de cáncer de colon: inestabilidad cromosómica (chromosomal instability (CIN)), inestabilidad de microsatélites (microsatellite instability (MSI)) y fenotipo metilador de secuencias CpG (CpG island methylator phenotype (CIMP)). Estos mecanismos pueden solaparse y combinarse de manera que uno puede aparecer como resultado de los otros<sup>3</sup>. Además, la situación se complica más cuando, a la ya existente heterogeneidad patogénica, se unen otros factores hereditarios y ambientales. Los principales factores ambientales relacionados con el CCR son la dieta y la microbiota asociada. Algunos agentes infecciosos, ya sean virus o bacterias, pueden desempeñar un papel como oncomoduladores. Determinados virus como el virus de *Epstein-Barr* (VEB) y el *Citomegalovirus* (CMV) se han asociado con tejido tumoral en pacientes con CCR, cuando se comparan con los tejidos sanos de los mismos pacientes<sup>4</sup>. Del mismo modo, se han asociado infecciones bacterianas con CCR, principalmente mediante dos mecanismos: inflamación y/o producción de metabolitos carcinogénicos<sup>5-7</sup>. Entre estas infecciones, una de las asociaciones mejor estudiadas, es el caso de bacteremia por el grupo *Streptococcus bovis*, hasta el punto de considerarla como un indicador clave en enfermedad intestinal maligna<sup>8-10</sup>. Sin embargo, no todas las especies incluidas en este grupo presentan el mismo grado de implicación en el desarrollo o progresión de neoplasias colorrectales subyacentes, y ha sido necesaria la introducción de nuevas herramientas y técnicas moleculares con el fin de mejorar la correcta identificación a nivel de subespecie que conforman el grupo *S. bovis*<sup>11</sup>. En este sentido, el patógeno oportunista *Streptococcus gallolyticus* subespecie *gallolyticus* (anteriormente conocido como

*Streptococcus bovis* biotype I), se ha relacionado de manera consistente con CCR, demostrando un mayor riesgo de asociación a esta enfermedad que otras subespecies<sup>12,13</sup>, hasta el punto de que una infección por este microorganismo se considera generalmente como un indicador de malignidad en el colon. Los resultados de un reciente meta-análisis sugieren una vinculación inequívoca entre la infección por *Streptococcus gallolyticus* (SG) con CCR, proponiendo como factores de riesgo la colonización de la mucosa colónica<sup>14</sup>. Sin embargo, a pesar de la evidencia existente que sostiene esta asociación, no se ha demostrado aún si esta relación entre la presencia o no de SG en CCR es causa o efecto del desarrollo del proceso neoplásico. El conocimiento de la prevalencia de SG en muestras de tejido de colon de pacientes con CCR, partiendo de un método diagnóstico preciso, permitiría aproximarnos a este dilema que se plantea respecto al papel del SG como causa versus consecuencia del proceso neoplásico. Los datos disponibles hasta el momento son escasos, y se han llevado a cabo pocos estudios de prevalencia de SG en un grupo de pacientes no seleccionado con CCR. Además, no hay suficiente información respecto al perfil molecular tumoral en casos de CCR con SG.

Por todo lo comentado anteriormente, hemos querido llevar a cabo un estudio de prevalencia de manera cuantitativa de SG en tejido tumoral y su correspondiente mucosa normal en un grupo no seleccionado de pacientes con CCR, y su asociación con las variables clínicas, patológicas y moleculares.

## **2. Estado de la cuestión**

### **Dimensión del problema del cáncer colorrectal.**

El cáncer colorrectal (CCR) constituye un problema sanitario de primera magnitud en España y su incidencia está aumentando en nuestro país, así como en el resto de la Unión Europea. Teniendo en cuenta ambos sexos conjuntamente, el tipo de cáncer más frecuente es el de colon, con casi 28.000 nuevos casos al año en España. Según el Sistema de Información Oncológico (SIO), **en la Comunidad Valenciana, el CCR es el de mayor incidencia para toda la población y causa unas 1.300 muertes al año aproximadamente.** La incidencia del CCR está altamente relacionada con la edad<sup>15</sup>. La mayoría de los casos se diagnostican entre los 65 y los 75 años, con un máximo a los 70. **Cuando la enfermedad está localizada, las tasas de curación oscilan entre el 70 y el 90%. Por tanto, la detección precoz debe ser un objetivo prioritario** para la prevención de esta enfermedad.

## **Etiopatogenia del CCR**

El CCR es una **enfermedad multifactorial donde se combinan tanto factores de tipo ambiental como genéticos** en su origen y progresión. La mayoría de los tumores son esporádicos (70-80%), mientras que una pequeña proporción de ellos corresponde a formas hereditarias. Aproximadamente entre 5% y 10% de los CCR son causados por mutaciones genéticas heredadas de alta penetrancia. Además, un 20-25% adicional de casos presenta una agregación familiar de esta neoplasia donde intervienen alelos de moderada penetrancia y factores ambientales, lo que se conoce como CCR familiar<sup>16</sup>.

En los últimos años hemos asistido a un importante avance en el conocimiento de los mecanismos involucrados en el desarrollo y en la progresión de esta enfermedad. Además del componente hereditario, otros **factores de riesgo** son: la **edad** (más del 90% de los pacientes diagnosticados con CCR son mayores de 50 años), **el consumo de tabaco, el consumo de alcohol, la inactividad física, la obesidad, la aparición de pólipos adenomatosos, historia previa de CCR, enfermedad inflamatoria intestinal, la dieta** (pobre en fibras y/o alta en carnes rojas y en grasas, especialmente grasas animales) y **la asociación individual con determinadas bacterias clave**, tales como *Streptococcus gallolyticus* subespecie *gallolyticus*<sup>14</sup>, *Enterococcus faecalis*<sup>17-19</sup>, *Bacteroides fragilis enterotoxigénico*<sup>20</sup>, *Escherichia coli*<sup>21,22</sup> y *Fusobacterium spp*<sup>23-25</sup>.

### ***S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (biotipo I) y CCR.**

La incidencia de adenomas y adenocarcinomas de colon en los pacientes que han presentado bacteriemia o endocarditis por *S. bovis* oscila entre el 6 y el 67%<sup>26</sup>. Y en el caso concreto de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (biotipo I), hay una mayor asociación con lesiones malignas y premalignas en colon. **La asociación estadística entre bacteriemia y endocarditis causada por este microorganismo es del 94%**, y la asociación entre bacteriemia y cáncer de colon es del 71%<sup>12</sup>. Alteraciones en el intestino debidas al cáncer de colon o la presencia de pólipos pueden afectar al flujo del contenido intestinal, provocando la acumulación de materia fecal muy próxima a las células epiteliales y al tumor. En el colon, esta materia es metabólicamente pobre, pero muy rica en carbohidratos y taninos, los cuales pueden ser degradados por bacterias como *S. bovis*<sup>27</sup>. Este ambiente es muy favorable para la proliferación de SG y, a su vez, el resto de microorganismos son inhibidos por los polifenoles alimentarios. La proliferación en el lumen intestinal, junto con la alteración del epitelio de la mucosa, puede favorecer la traslocación de la bacteria y su paso al torrente sanguíneo, lo que provoca la

aparición de endocarditis SG posee una cápsula polisacáridica que lo protege de la respuesta inmune, y junto con sus proteínas de superficie y los pili favorecen su adherencia al endotelio celular como paso preliminar en el desarrollo de la endocarditis infecciosa<sup>28</sup>. Recientemente se ha estudiado la interacción de SG con las células endoteliales humanas. Aunque se ha demostrado una gran variabilidad entre diferentes aislados, se ha comprobado que presenta una gran capacidad de adherencia e invasión a las células endoteliales, así como la capacidad para formar biopelículas<sup>29</sup>.

Existen numerosas áreas de incertidumbre en este campo, entre ellas, no está muy claro si la colonización intestinal de estas bacterias es la causa o la consecuencia del cáncer colorrectal. En el caso concreto de SG, se sabe que la presencia de esta bacteria en la microbiota intestinal oscila entre 5-16% en población sana<sup>30</sup>, mientras que en los pacientes con cáncer colorrectal esta proporción aumenta hasta 5 veces más<sup>17</sup>.

En cualquier caso, las frecuencias son todavía muy variables entre estudios, posiblemente debido a diferencias de factores de riesgo entre diferentes poblaciones, pero también a las diferencias metodológicas utilizadas en la detección.

### 3. Hipótesis

El estudio de la prevalencia de *S. gallolyticus* en muestras de tejido tumoral y tejido normal asociado en una población no seleccionada de pacientes con cáncer colorrectal (CCR), resultará de gran utilidad como paso previo que permita sentar las bases para estudios longitudinales posteriores diseñados para poder establecer el papel causal o no del microorganismo en la etiopatogenia del CCR.

### 4. Objetivos

#### **Objetivo general:**

Determinar la prevalencia de *Streptococcus gallolyticus* en un cohorte de pacientes con CCR.



### **Objetivos específicos:**

1. Diseñar y validar un ensayo cuantitativo mediante PCR a tiempo real (qPCR), dirigido frente al gen *sodA* que amplifique específicamente las tres subespecies de *S. gallolyticus* (*S. gallolyticus* subsp *gallolyticus*, *S. gallolyticus* subsp *pasteurianus* and *S. gallolyticus* subsp *macedonicus*).
2. Determinar la presencia de SG en muestras de tejido tumoral y normal asociado, de mucosa de colon, en una cohorte no seleccionada de pacientes con CCR.
3. Determinar la carga bacteriana mediante qPCR de las muestras que resulten positivas para SG.
4. Describir y analizar las características demográficas (edad, sexo) clínicas y patológicas y su relación con la presencia de SG.
5. Evaluar la presencia de co-infecciones víricas por CMV y/o VEB y su relación con la presencia de SG.
6. Estudiar los factores asociados con el tumor (localización, estadio, rutas implicadas en la carcinogénesis) con la presencia de SG.

### **5. Metodología**

**Diseño:** Estudio transversal descriptivo que incluye una cohorte de pacientes con CCR de acuerdo a los objetivos que se quieren evaluar.

**Sujetos del estudio y tamaño muestral:** Un total de 380 muestras procedentes de 190 pacientes con CCR esporádico del Hospital Provincial de Castellón se han procesado para determinar la prevalencia de *Streptococcus gallolyticus* mediante un sistema de qPCR (los pacientes habían sido sometidos a resección quirúrgica por CCR en 2003 e incluidos en un estudio aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital de Castellón y del Hospital General Universitario (HGU) de Elche para su inclusión en el Biobanco, momento en el que se tomaron las muestras de biopsias y se firmaron los consentimientos informados.

- a. Criterios de inclusión: 1) pacientes con CCR sometidos a tratamiento quirúrgico con intención curativa, 2) pacientes que firmaron consentimiento informado para la inclusión del material biológico excedente del diagnóstico en el Biobanco del HGU de Elche.
- b. Criterio de exclusión: 1) casos con criterios de sospecha de síndrome de Lynch u otros síndromes hereditarios de cáncer.

El material biológico requerido para cada caso es ADN de tejido tumoral (250 ng) y ADN del correspondiente tejido normal (250 ng). Los tejidos de origen están criopreservados y custodiados en el Biobanco del HGU de Elche.

### **Variables:**

**Variables demográficas:** sexo (hombre, mujer) y edad al diagnóstico (cuantitativa).

**Variables clínicas:** infección por virus de *Epstein-Barr* (VEB) (sí, no) y/o infección por *Citomegalovirus* (CMV) (sí, no).

**Variables histopatológicas:** estadio (I, II, III o IV), localización del tumor (proximal, distal), marcadores tumorales ([MSI vs MSS]; [CIMP + versus CIMP -]), ruta de la carcinogénesis implicada (CIN, MSI, CIMP).

**Presencia de SG** (sí, no)

**Cuantificación** de la carga bacteriana.

### **Mediciones:**

**Diseño y validación de la PCR cuantitativa a tiempo real para la amplificación del gen bacteriano *sodA*.** Los *primers* para PCR (RT y convencional) fueron diseñados partiendo de una colección de 76 aislados procedentes de episodios de bacteriemia del HGU de Elche.

Las cepas fueron originalmente identificadas como *Streptococcus bovis* mediante el kit comercial API© 20 Strep (bioMérieux) y posteriormente se mantuvieron congeladas a -80° C. Los aislados fueron sembrados en placas de agar chocolate incubadas a 37° C durante 24

horas. Una colonia de cada placa fue seleccionada para la extracción de ADN usando Chelex© (Bio-Rad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

1. Para la obtención de controles positivos válidos, se diseñaron *primers* específicos de acuerdo a la secuencia de nucleótidos del gen *sodA*, para PCR convencional, alineando las secuencias de *S. infantarius*, *S. lutetiensis* y *S. gallolyticus*, delimitando un amplicón de 419bp.

Forward: sodA\_F (YGATRCAGAAACAATGACATTDCA)

Reverse: sodA\_R (ATTGRTTYTTACCYTCTGA)

Condiciones de la PCR:

- Desnaturalización inicial: 94°C durante 2 min
- 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 10s, hibridación a 50°C durante 30s, elongación a 68°C durante 30s
- Elongación final a 68°C durante 7 min.

El producto de la amplificación se visualizó en gel de agarosa al 2%. Este producto fue enviado para confirmación y secuenciación Sanger a Secugen (Madrid, España). Para la identificación de las secuencias se utilizó la base de datos BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Aquellas cepas identificadas como *S. gallolyticus*, se utilizaron como controles positivos.

2. Para la RT-PCR, también se diseñaron *primers* y sonda TaqMan específicos (Beacon Designer), de acuerdo a la secuencia de nucleótidos del gen *sodA*, para poder amplificar específicamente las tres subespecies de *S.gallolyticus* (*S. gallolyticus* subesp *gallolyticus*, *S. gallolyticus* subesp *pasteurianus* y *S. gallolyticus* subesp *macedonicus*):

Forward primer SG\_F (5'- TGGCTCATTGAYGAATT-3')

Reverse primer SG\_R (5'- GAGAGCACTTCAAGTTTG-3')

Probe SG (5'-FAM-TTCATTCACCACAAGCCA-BHQ1-3')

Condiciones de la PCR:

- 95°C durante 10 min.
- 2 x 40 ciclos de amplificación (95°C-15 s y 60°C-1 min).

- El volumen total para la reacción fue de 25  $\mu\text{l}$  y la composición de la mezcla, la siguiente: 12.5  $\mu\text{l}$  de Universal PCR MasterMix (Applied Biosystems), 0.75  $\mu\text{l}$  de 12.5 pmol/ $\mu\text{l}$  Reverse y Forward *primers*, 0.25  $\mu\text{l}$  de la sonda 4 pmol/ $\mu\text{l}$ , 5  $\mu\text{l}$  de ADN y agua libre de RNasas hasta 25  $\mu\text{l}$ .

La curva patrón y el límite de detección se obtuvieron a partir de la concentración de ADN presente en un control positivo confirmado. Esta concentración inicial (ng/ $\mu\text{l}$ ) se convirtió a número de copias de SG ( $10^6$  copias/ $\mu\text{l}$ ), y se utilizó como el punto más concentrado en la recta patrón. A partir de éste, se realizaron hasta 6 diluciones seriadas 1/10 hasta obtener un límite de detección inferior igual a 10 copias/ $\mu\text{l}$ . Los 6 puntos de la recta patrón (10 a 1.000.000 copias/ $\mu\text{l}$ ; (Pearson's correlation coefficient  $>0.99$ )), se representaron de acuerdo con el ciclo umbral (Ct) en el que amplificaba cada dilución. La recta patrón fue aceptada cuando la pendiente era de -3.3 a -6.6.

La especificidad de los *primers* fue testada por triplicado con 20 aislados de *S. gallolyticus* confirmado.

Hasta donde sabemos, no existen kits comerciales disponibles para la detección cuantitativa de SG, y ningún artículo publicado ha presentado un método validado similar.

**Detección y cuantificación de *S. gallolyticus* en CCR mediante PCR a tiempo real.** Se utilizaron un total de 380 muestras procedentes de 190 pacientes no seleccionados, diagnosticados de CCR de colon esporádico en el Hospital Provincial de Castellón. En 2003, estos pacientes fueron sometidos a resección quirúrgica del tumor con intención curativa y se recogieron biopsias procedentes de la colonoscopia. Se obtuvieron dos muestras de tejido por paciente: una de la mucosa normal y otra de la mucosa tumoral. Todas las muestras se mantuvieron congeladas hasta la realización de los análisis. Se obtuvo el consentimiento escrito de todos los participantes para la inclusión de sus muestras en el Biobanco. El estudio fue aprobado por el comité de Ética del Hospital Provincial de Castellón y del HGU de Elche. El estudio cumple con la Declaración de Helsinki (2013).

El ADN de las biopsias se extrajo con Biorobot EZ1 (Qiagen, Valencia, CA) y EZ1 DNA Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, previa homogeneización mecánica (Tissue Lyser; Qiagen, Valencia, CA). El ADN del tejido normal y tumoral fue preparado para la PCR a tiempo real frente al gen *sodA* de SG (50 nanogramos de ADN/ $\mu\text{l}$   $\rightarrow$  5  $\mu\text{l}$ ).

Se utilizó qPCR para la amplificación del gen *sodA* de SG en tejido normal y tumoral de las biopsias, utilizando los primers SG\_F, SG\_R y la sonda SG descritos anteriormente. Los controles positivos y negativos, así como los puntos de la recta patrón fueron testados en cada determinación junto con las muestras. Todas las muestras se analizaron por triplicado. Los Ct obtenidos para cada muestra positiva, se interpolaron por regresión lineal en la recta patrón para poder ser cuantificada en número de copias/ $\mu$ l.

**Variabes demográficas, clínicas y patológicas.** Los datos demográficos (edad y género), y las variables clínicas y patológicas (localización tumoral y estadio, marcadores tumorales y coinfección por VEB y/o CMV) se recogieron como información asociada del Biobanco del Hospital Provincial de Castellón. La clasificación de la localización de los tumores se realizó de la siguiente manera: aquellos tumores localizados en ciego hasta la flexura esplénica, fueron agrupados como tumores proximales; los situados en el colon descendente, sigmoide, unión rectosigmoidea y recto, se agruparon como tumores distales. El estadio del tumor en el diagnóstico fue clasificado como I, II, III y IV, siendo el I el menos avanzado y el estadio IV el más avanzado.

**Fenotipo metilador de secuencias CpG.** El estatus metilacional del ADN tumoral se realizó mediante amplificación multiplex con sonda dependiente de ligado (methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA)) usando *the SALSA MLPA ME042 CIMP probemix* (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Este ensayo, contiene 31 sondas MS-MLPA que detectan el estatus CIMP de regiones promotoras en los siguientes 8 genes: CACNA1G, CDKN2A, CRABP1, IGF2, MLH1, NEUROG1, RUNX3 y SOCS1. La metilación alterada en estos genes, está descrita en la bibliografía y ha sido utilizada para testar el estatus CIMP<sup>31</sup>. Los tumores se consideraron CIMP+ cuando al menos cinco genes mostraban metilación.

**Análisis de la inestabilidad de microsatélites (MSI).** La determinación de la MSI en el ADN tumoral se hizo por multiplex-PCR y análisis molecular de fragmentos a través de electroforesis capilar, utilizando cinco marcadores monomórficos mononucleotídicos (BAT25, BAT26, NR21, NR24 y NR27) tal y como se ha descrito<sup>32</sup>. Los tumores se clasificaron como MSI cuando al menos dos de los marcadores mostraban un patrón de picos alterado.

**Detección cualitativa de virus Epstein-Barr virus (VEB) y Citomegalovirus (CMV) en**

### **mucosa normal y tejido tumoral.**

La presencia de VEB y CMV se detectó por amplificación mediante PCR convencional singleplex en GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Las condiciones de la PCR y los *primers* utilizados se muestran en la tabla 1. Las muestras se testaron por triplicado, utilizando en cada prueba controles positivos y negativos. El análisis de los genes TP53 y de beta-globina humanos se realizó en paralelo como controles para cada ADN. El producto de la amplificación fue visualizado en gel de agarosa utilizando bromuro de etidio. Se consideraron como positivas aquellas muestras en las que se visualizó correctamente en el gel el amplicón en al menos dos de las 3 determinaciones. Para asegurar la especificidad del test, 10 resultados positivos consecutivos se secuenciaron en las dos direcciones (*forward* y *reverse*) con 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems), y las secuencias resultantes se alinearon en BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para su correcta identificación y confirmación.

Tabla 1. Condiciones de la PCR y los *primers* utilizados para la detección cualitativa de EBV y CMV.

EBV	Forward primer: AACATTGGCAGCAGGTAAGC Reverse primer: ACTTACCAAGTGTCCATAGGAGC
	PCR conditions: 95°C-8min; [95°C-30 s; 55°C-30 s; 72°C-30 s]x5; [95°C-30 s; 60°C-30 s; 72°C-30 s]x40; 72°C-10 min
	Amplicon size: 257 bp
CMV	Forward primer: GTACACGCACGCTGGTTACC Reverse primer: GTAGAAAGCCTCGACATCGC
	PCR conditions: 95°C-8min; [95°C-30 s; 55°C-30 s; 72°C-30 s]x5; [95°C-30 s; 60°C-30 s; 72°C-30 s]x40; 72°C-10 min
	Amplicon size: 186 bp

**Análisis estadístico:** El análisis estadístico se ha llevado a cabo mediante el paquete estadístico SPSS (versión 15.0; SPSS Inc, Chicago, IL.). Se ha utilizado el test *Chi cuadrado* ( $\chi^2$ ) para comparar las variables cualitativas consideradas en el estudio. Valores  $P < 0.05$  se han considerado significativos.

**Dificultades y limitaciones:** Teniendo en cuenta que existe cierta dificultad para establecer relaciones causales, susceptibles a sesgos de inclusión y/o no respuesta, el estudio que aquí se plantea es de tipo descriptivo cuyo alcance pretendido es ofrecer una prueba de concepto que sirva de base para el desarrollo de ulteriores proyectos de investigación. Si los resultados son propicios, se procederá al diseño de otros proyectos donde se aborden objetivos que permitan estudiar diferencias en la composición de la microbiota entre tumores colorrectales con y sin SG, tras normalizar con la composición de la microbiota de sus

respectivos tejidos colónicos no tumorales, y otros objetivos que permitan diseccionar los mecanismos por los cuales esta microbiota sinergiza con factores etiológicos que promueven el cáncer colorrectal. Con este planteamiento, no se detectan a priori limitaciones relevantes que puedan comprometer la consecución de los objetivos.

## **6. Aspectos éticos y de confidencialidad**

Se obtuvo el consentimiento escrito de todos los participantes para la inclusión de sus muestras en el Biobanco. El estudio fue aprobado por el comité de Ética del Hospital Provincial de Castellón y del HGU de Elche. El estudio cumple con la Declaración de Helsinki (2013).

Los formularios y archivos informáticos de datos respetarán las normas de confidencialidad en lo que se refiere a la identificación de personas.

## **7. Resultados**

### **Datos obtenidos mediante su aplicación**

Se analizaron los datos de 190 pacientes (95 hombres y 95 (50%) mujeres). La mediana de edad fue 71 años (rango 30 a 94). Respecto a la localización tumoral, 38 casos se localizaron en colon proximal (20%) y 118 (62%) casos en colon distal. La distribución tumoral según estadio fue: 42 (22%) estadio II y 48 (25%) estadio III.

La qPCR demostró absoluta sensibilidad y especificidad en la detección de SG. El límite de detección se estableció en 10 copias de ADN bacteriano. Del total de pacientes estudiados, 6 (3.2%) fueron positivos para SG, encontrándose sólo en muestras de tejido tumoral. El número medio de copias de SG fue de 7,018.3 (rango 44-34,585).

Respecto al estatus MSI, éste fue positivo en 18 tumores (9.5%) versus 172 (90.5%) con MSI estatus negativo (MSS). El estatus CIMP fue positivo en el 22% casos (42/190). De acuerdo con estos datos, el 70.5% tumores se clasificaron como CIN (CIMP - y MSS 134/190); 9.5% como MSI (MSI y cualquier CIMP: 18/190); y 16.8% como CIMP (CIMP+ y MSS: 32/190).

Estas frecuencias en la distribución de la ruta molecular concuerdan con las descritas en la literatura<sup>3</sup>.

### **Análisis e interpretación de los resultados**

Todos los resultados positivos procedían de muestras de tejido tumoral, mientras que ninguno se obtuvo a partir de ADN de mucosa normal (p=0.014). La presencia de SG se asoció a tumores en estadio II (p=0.026) y co-infección por VEB (p=0.042) (*Supplementary information*). No se han encontrado otras asociaciones estadísticamente significativas.

**Supplementary information.** Relationship between categorical variables (Chi-square test). Besides the described association of SG infection with tumour tissue and EBV infection, other significant associations were found among the analysed variables. Thus, co-infection of EBV and CMV was observed in tumour tissues. As expected, MSI status is associated to proximal colon, early stages of tumours and CIMP<sup>+</sup> [2, 6]. In the same context, the MSI pathway is consequently associated to proximal colon and early stages.

	Tissue	Gender	Location	Stage	CIMP	MSI	Pathway	CMV	EBV	SG
Tissue	-	-	-	-	-	-	-	<0.001	<0.001	0.014
Gender	-	-	0.053	0.674	0.725	0.143	0.258	0.174	0.189	0.097
Location	-	-	-	0.187	0.073	<0.001	0.005	0.452	0.889	0.432
Stage	-	-	-	-	0.647	0.002	0.008	0.514	0.129	0.026
CIMP	-	-	-	-	-	0.002	-	0.286	0.066	0.749
MSI	-	-	-	-	-	-	-	0.559	0.333	0.421
Pathway	-	-	-	-	-	-	-	0.494	0.115	0.616
CMV	-	-	-	-	-	-	-	-	<0.001	0.929
EBV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.042

CIMP: CpG island methylator phenotype tumor; MSI: Microsatellite instability; CMV: *Cytomegalovirus*; EBV: *Epstein-Barr virus*; SG: *Streptococcus galloyticus*.

En la evaluación del grupo de pacientes con presencia de SG, se observa un perfil clínico y patológico predominante, consistente en pacientes masculinos con tumor distal en estadio II, co-infectado con VEB, CIMP- y MSS. En la Tabla 2 se describe las características de los 6 casos positivos para SG.



**TABLE 2.** Description of the six cases of *Streptococcus gallolyticus* identified during the study

Case	Gender	Age	EBV co-infection	CMV co-infection	CIMP status	Tumour location	Stage	Microsatellite phenotype	Mean Qty
1	Male	62	+	-	P	Distal	III	MSS	840
2	Male	63	-	-	P	Proximal	II	MSS	149
3	Male	83	+	+	N	Distal	II	MSS	1,390
4	Female	72	+	-	N	Distal	-	MSS	34,585
5	Male	63	+	-	N	Distal	II	MSS	5,102
6	Male	63	+	-	N	Proximal	II	MSS	44

EBV: *Epstein-Barr virus*; CMV: *Cytomegalovirus*; "P" indicates CpG island methylator phenotype (CIMP)-positive tumour; "N" indicates CpG island methylator phenotype (CIMP)-negative tumour; MSS: Microsatellite stability; Mean Qty: Mean of *S. gallolyticus* number of copies.

Nuestros resultados muestran una baja prevalencia (3.2%) de SG en pacientes con CCR si lo comparamos con otros estudios<sup>13</sup>. Abdulmir et al (2010)<sup>33</sup> publicó una mayor prevalencia; hasta un 49% en tejido tumoral y 36% en la mucosa de colon normal correspondiente. Sin embargo, los pacientes de este estudio presentaban historia de bacteriemia por SG, lo cual se diferencia de nuestra cohorte, ya que no han sido seleccionados en base a ningún criterio más allá de la resección quirúrgica con intención curativa del CCR. Además, diferencias en aspectos metodológicos relacionados con la detección del SG también podrían ser causa de discrepancias en los resultados.

### **Consideraciones finales y conclusiones**

En este estudio, mostramos por primera vez la prevalencia de SG en tejido tumoral y su correspondiente tejido normal en una cohorte no seleccionada de pacientes con CCR. A pesar de la baja prevalencia, nuestros resultados sugieren que el SG podría tener un papel oportunista como oncomodulador en la carcinogénesis y/o en la progresión del tumor en estadios tempranos de la enfermedad debido a la ausencia del microorganismo en la mucosa de colon no tumoral.

## **8. Aplicabilidad y utilidad práctica de los resultados obtenidos o previsibles**

La relevancia de esta prueba es considerable si tenemos en cuenta que se pretende detectar específicamente la presencia de un microorganismo implicado en procesos neoplásicos, en contextos reales de cáncer colorrectal. La presencia de esta bacteria en el tejido tumoral y la

posible implicación en la carcinogénesis y/o progresión de la enfermedad, podría tener un significado pronóstico y por tanto aplicabilidad como marcador subrogado de enfermedad en estadios precoces, así como para poder predecir el desarrollo de cáncer en pacientes con alto riesgo, y en consecuencia, instaurar programas preventivos.

## 9. Discusión

La etiología multifactorial del CCR está ampliamente documentada y apoyada en la literatura científica. El conocimiento completo de los mecanismos implicados y de las interacciones entre ellos debería ser considerado para poder disponer de un enfoque multidimensional, abordando todos los factores de riesgo prevenibles y tratables. En este sentido, hay que destacar el interés por la contribución de la microbiota intestinal en la carcinogénesis del CCR, ya que ha sido un tema de gran interés desde hace décadas<sup>33-35</sup>.

En este trabajo, analizamos la presencia del SG, un patógeno oportunista relacionado clínicamente con CCR<sup>13</sup>, mediante una PCR cuantitativa a tiempo real que amplifica el gen *sodA*, en una amplia cohorte de pacientes con CCR. A pesar de la baja prevalencia (3,2%) de SG en estos pacientes, los resultados indican que SG podría ejercer una influencia en la carcinogénesis del CCR, ya que no se ha detectado en muestras de mucosa no tumoral de colon. Considerando los aspectos clínico-patológicos de nuestra cohorte, cuando se ha considerado la presencia o no de SG, dos variables han presentado significación estadística: estadios tempranos de la enfermedad y co-infección por VEB. Se trata de un hallazgo importante, ya que por un lado, el estadio del carcinoma colorrectal es un factor pronóstico importante para la supervivencia<sup>36</sup>, y por otro parte, mientras que los porcentajes de ADN de VEB encontrados en CCR alcanzan el 19%<sup>37</sup>, nuestros datos muestran una tasa mayor. Además, cuando se evaluó el grupo de pacientes con SG en tejido tumoral, el análisis reveló un perfil clínico y patológico concreto, consistente en varones con localización distal del tumor en estadio II, co-infectado con VEB, CIMP-. De acuerdo con el estatus CIMP y MSS, estos pacientes podrían presentar un peor pronóstico, ya que ambos se han asociado a un peor desenlace<sup>38</sup>.

En conclusión, estos resultados sugieren que la presencia de *Streptococcus gallolyticus* en las muestras de tejido tumoral de pacientes con CCR, podría indicar un peor pronóstico como marcador tumoral predictivo. Sería de gran utilidad conocer cómo el ambiente y la microbiota presentes en el entorno pueden seleccionar favorablemente el crecimiento del SG e involucrarlo en el desarrollo del tumor.

### III. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015; 136(5): E359-86
2. Pancione M, Remo A, Colantuoni V. Genetic and epigenetic events generate multiple pathways in colorectal cancer progression. *Patholog Res Int*. 2012:509348
3. Carethers JM, Jung BH. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2015; 149(5): 1177-1190.e3
4. Bernard Levin, MD; David A. Lieberman, MD; Beth McFarland, MD; Screening and Surveillance for the Early Detection of Colorectal Cancer and Adenomatous Polyps, 2008: A Joint Guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *CA Cancer J Clin*. 2008; 58(3): 130-60
5. Sears CL, Garrett WS. Microbes, microbiota, and colon cancer. *Cell Host Microbe*. 2014;15(3):317-28
6. Biarc J, Nguyen IS, Pini A, Gossé F, Richert S, Thiersé D, Van Dorsselaer A, Leize-Wagner E, Raul F, Klein JP, Schöller-Guinard M. Carcinogenic properties of proteins with pro-inflammatory activity from *Streptococcus infantarius* (formerly *S.bovis*). *Carcinogenesis*. 2004; 25(8):1477-84
7. Liu Z, Cao AT, Cong Y. Microbiota regulation of inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *Semin Cancer Biol*. 2013 Dec; 23(6 Pt B):543-52
8. Judith G. Reynolds, Ellen Silva, and William M. McCormack. Association of *Streptococcus bovis* Bacteremia with Bowel Disease. *J Clin Microbiol*. 1983; p. 696-697

9. Beth Ann Zarkin, M.D., Keith D. Lillemoe, M.D., John L. Cameron, M.D., Philip N. Effron, M.D., Thomas H. Magnuson, M.D., and Henry A. Pitt, M.D. The Triad of *Streptococcus Bovis* Bacteremia, Colonic Pathology, and Liver Disease. *Ann. Surg.* June 1990 vol 211. N 6
10. Corredoira JC, Alonso MP, Garcia JF. Clinical characteristics and significance of *Streptococcus salivarius* bacteremia and *Streptococcus bovis* bacteremia: a prospective 16-year study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24(4):250–5
11. Romero-Hernández B, del Campo R, Cantón R. *Streptococcus bovis*, taxonomic status, clinical relevance and antimicrobial susceptibility. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013; 31 Suppl 1: 14-9
12. Ahmed S Abdulamir, Rand R Hafidh, Fatimah Abu Bakar. 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
13. Boleij A, Tjalsma H. The itinerary of *Streptococcus gallolyticus* infection in patients with colonic malignant disease. *Lancet Infect Dis.* 2013 (8):719-24
14. Boleij A, Van Gelder MMHJ, Swinkels DW, Tjalsma H. Clinical Importance of *Streptococcus gallolyticus* Infection Among Colorectal Cancer Patients: Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2011; 53(9): 870–878
15. Rougier P, Mitry E. Epidemiology, treatment and chemoprevention in colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2003; 14 Suppl 2:3-5.
16. Castells A, Castellvi-Bel S, Balaguer F. Concepts in familial colorectal cancer: where do we stand and what is the future? *Gastroenterology* 2009; 137: 404-9.
17. Wang, X., Yang, Y., Moore, D.R., Nimmo, S.L., Lightfoot, S.A., and Huycke, M.M.. 4-hydroxy-2-nonenal mediates genotoxicity and bystander effects caused by *Enterococcus faecalis*-infected macrophages. *Gastroenterology.* 2012; 142: 543–551.
18. Winters, M.D., Schlinke, T.L., Joyce, W.A., Glore, S.R., and Huycke, M.M.. Prospective case-cohort study of intestinal colonization with enterococci that produce extracellular superoxide and the risk for colorectal adenomas or cancer. *Am. J. Gastroenterol.* 1998; 93: 2491–2500.
19. Yang, Y., Wang, X., Huycke, T., Moore, D.R., Lightfoot, S.A., and Huycke, M.M.. Colon macrophages polarized by commensal bacteria cause colitis and cancer through the bystander effect. *Transl. Oncol.* 2003; 6: 596–606.

20. ToprakToprak, N.U., Yagci, A., Gulluoglu, B.M., Akin, M.L., Demirkalem, P., Celenk, T., and Soyletir, G. A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006; 12: 782–786.
21. Arthur, J.C., Perez-Chanona, E., Mühlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J.M., Fan, T.-J., Campbell, B.J., Abujamel, T., Dogan, B., Rogers, A.B., et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science.* 2012; 338: 120–123.
22. Swidsinski, A., Khilkin, M., Kerjaschki, D., Schreiber, S., Ortner, M., Weber, J., and Lochs, H. Association between intraepithelial *Escherichia coli* and colorectal cancer. *Gastroenterology.* 1998; 115: 281–286.
23. Castellarin, M., Warren, R.L., Freeman, J.D., Dreolini, L., Krzywinski, M., Strauss, J., Barnes, R., Watson, P., Allen-Vercoe, E., Moore, R.A., and Holt, R.A. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res.* 2012; 22: 299–306.
24. Kostic, A.D., Gevers, D., Pedamallu, C.S., Michaud, M., Duke, F., Earl, A.M., Ojesina, A.I., Jung, J., Bass, A.J., Tabernero, J., et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res.* 2012; 22: 292–298.
25. Warren, R.L., Freeman, D.J., Pleasance, S., Watson, P., Moore, R.A., Cochrane, K., Allen-Vercoe, E., and Holt, R.A. Co-occurrence of anaerobic bacteria in colorectal carcinomas. *Microbiome.* 2013; 1: 16.
26. Klein RS, Recco RA, Catalano MT, Edberg SC, Casey JI, Steigbigel NH. Association of *Streptococcus bovis* with carcinoma of the colon. *N Engl JMed.* 1977; 297: 800–2.
27. O'Donovan L, Brooker JD. Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*. *Microbiol.* 2001; 147: 1025-33.
28. Hinse D, Vollmer T, Rückert C, Blom J, Kalinowski J, Knabbe C, et al. Complete genome and comparative analysis of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *Gallolyticus*, an emerging pathogen of infective endocarditis. *BMC Genomics.* 2011; 12: 400.
29. Vollmer T, Hinse D, Kleesiek K, Dreier J. Interactions between endocarditis-derived *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* isolates and human endothelial cells. *BMC Microbiol.* 2010; 10: 78.
30. Noble CJ. Carriage of group D streptococci in the human bowel. *J Clin Pathol.* 1978; 31:1182-6.

31. Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9(7):489-99. doi:10.1038/nrc2645.
32. Buhard O, Cattaneo F, Wong YF, Yim SF, Friedman E, Flejou JF, Duval A, Hamelin R. Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. *J Clin Oncol*. 2006; 24(2):241-51.
33. Abdulmir AS, Hafidh RR, Abu Bakar F. 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
34. McCoy W, Mason JM. Enterococcal endocarditis associated with carcinoma of the sigmoid; report of a case. *J Med Assoc State Ala*. 1951; 21 (6): 162–6.
35. Vivienne Aries, J. S. Crowther, B. S. Drasar, M. J. Hill, and R. E. O. Williams. Bacteria and the etiology of cancer of the large bowel. *Gut*. 1969; 10, 334-335
36. Holliday HW, Hardcastle JD. Delay in diagnosis and treatment of symptomatic colorectal cancer. *Lancet*. 1979; 1(8111): 309-11
37. Karpinski P, Myszk A, Ramsey D, Kielan W, Sasiadek MM. Detection of viral DNA sequences in sporadic colorectal cancers in relation to CpG island methylation and methylator phenotype. *Tumour Biol*. 2011; 32(4): 653-9
38. Ogino S, Nosho K, Irahara N, Meyerhardt JA, Baba Y, Shima K, Glickman JN, Ferrone CR, Mino-Kenudson M, Tanaka N, Dranoff G, Giovannucci EL, Fuchs CS. Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype. *Clin Cancer Res*. 2009; 15(20): 6412-20