

# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Scienze Chirurgiche e Microbiologia Applicata

Ciclo XXIX

## STILI DI VITA ED ALTERAZIONI GENETICHE NEL CANCRO DEL COLON PROSSIMALE: CONFRONTO PILOTA TRA ADENOCARCINOMA ED ADENOCARCINOMA MUCOIDE

Coordinatore:  
Chiar.mo Prof. Luigi Roncoroni

Tutor:  
Chiar.mo Prof. Leopoldo Sarli

Dottorando: Dr. Francesco Tartamella

## INDICE

• <b>Riassunto</b>	.....	<b>3</b>
• <b>Materiale e Metodi</b>	.....	<b>4</b>
• <b>Considerazioni Statistiche</b>	.....	<b>9</b>
• <b>Risultati</b>	.....	<b>10</b>
• <b>Discussione</b>	.....	<b>14</b>
• <b>Tabelle</b>	.....	<b>17</b>
• <b>Bibliografia</b>	.....	<b>28</b>

## Riassunto della tesi

**Introduzione:** In Emilia-Romagna circa 5632 pazienti presentavano diagnosi di cancro del colon retto (CCR) nel 2014, rappresentando la seconda causa di decesso per neoplasia, con una incidenza superiore alla media italiana dopo la Lombardia e la regione Lazio (3304 casi di CCR nel sesso maschile e 2228 casi nel sesso femminile in Emilia Romagna nel 2014) per una prevalenza nazionale di circa 32.500 di pazienti affetti da CCR nell'ultimo anno. I costi umani e sociali del CCR, che ancora oggi presenta una mortalità del 36-46%, sono elevati. Fattori genetici ed ambientali, come l'alimentazione ricca di proteine e di grassi saturi, tipica dei paesi occidentali ed in particolare della nostra regione, sono considerati fattori di rischio per lo sviluppo del CCR. Nella letteratura scientifica recente, l'assunzione di diverse sostanze è stata correlata con un'aumento dell'incidenza di CCR: in particolare, un elevato consumo di carne rosse e insaccati, farine raffinate, dolci, alcol ed un basso apporto di frutta e vegetali rappresentano fattori di rischio elevato per lo sviluppo di CCR (HR = 1.18 a 11.7). Al contrario, un'elevato consumo di frutta e vegetali così come di pane integrale, pesce e carni bianche è risultato essere un fattore protettivo. I modelli eziologici proposti per spiegare queste associazioni si sono principalmente concentrati sugli effetti dell'esposizione della mucosa intestinale a fattori cancerogeni o anticancerogeni endogeni (acidi biliari, metabolici della microflora intestinale) ed esogeni (pireni, polisaccaridi non digeribili, antiossidanti, vitamine etc). Altri fattori comportamentali, in particolare l'attività fisica, sono stati chiamati in causa nella cancerogenesi colica.

Recenti studi di genetica molecolare sulle cellule delle neoplasie coloretali hanno evidenziato alterazioni genetiche che conducono alla cancerogenesi: l'instabilità dei microsatelliti (MSI).

Negli ultimi anni, inoltre, la ricerca in ambito di eziopatogenesi del cancro del colon-retto ha portato all'attenzione dei ricercatori il ruolo della microflora intestinale (microbiota), le alterazioni della quale sono state dimostrate in numerose patologie ambiente-dipendente. Dati crescenti dalla letteratura internazionali dimostrano specifici cambiamenti nella microflora, denominati disbiosi, nelle feci dei pazienti affetti da

cancro colo-rettale, ipotizzando che il microbiota alterato funzioni da piattaforma per il processo cancerogenetico. Dai risultati della nostra recente attività scientifica e clinica in ambito di patogenesi del cancro colo-rettale è emersa nel territorio di Parma una prevalenza dell'istotipo adenocarcinoma mucinoso (ADKm) sensibilmente maggiore (38.5%), rispetto a quella riportata in letteratura (1.6% e 25.4%). Questo peculiare istotipo è stato da noi riscontrato prevalentemente nel colon prossimale (60% dei tumori del colon destro), con prognosi favorevole rispetto ai tumori non mucinosi del colon destro. Inoltre queste neoplasie mucinose presentano un'elevata frequenza di instabilità microsatellitare. Le ragioni di questa elevata incidenza sul nostro territorio non sono attualmente note e si presume siano coinvolti fattori genetici ed ambientali.

**Obiettivi:** Questo studio è di tipo prospettico, ha lo scopo di ricercare le differenze in termini di stili di vita, dieta, alterazioni della microflora intestinale ed alterazioni genetiche del tumore tra pazienti affetti da adenocarcinoma mucinoso e non del colon prossimale, sottoposti a trattamento chirurgico di emicolectomia destra con e senza allargamento al colon trasverso ad intento curativo/palliativo in regime di elezione/urgenza. Inoltre verranno indagate eventuali correlazioni eziopatogenetiche tra i risultati delle suddette analisi eseguite nella popolazione oggetto dello studio.

## **Materiale e Metodi**

Questo studio è di tipo prospettico trasversale su 30 pazienti consecutivi affetti da cancro del colon prossimale, candidati ad intervento chirurgico resettivo di emicolectomia destra con e senza allargamento al colon trasverso fino alla flessura splenica; sono stati analizzati le abitudini alimentari, la microflora intestinale residente della mucosa neoplastica e sana, le caratteristiche isto-patologiche e l'analisi dei microsatelliti.

I pazienti afferenti alla U.O. di Clinica Chirurgica e Terapia Chirurgica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, affetti da patologia neoplastica del colon prossimale candidati ad intervento chirurgico resettivo di emicolectomia destra con e senza allargamento al colon trasverso in elezione sono stati sottoposti ad un esame

clinico completo standard con raccolta dei dati anamnestici, esame obiettivo di base e neurologico. Al termine della visita, qualora il paziente non presentasse controindicazioni specifiche alla partecipazione allo studio veniva inviato ad un incontro con uno degli investigatori deputati alla presentazione del protocollo di ricerca comprendente counselling, informazioni relative alla patologia, al trattamento chirurgico, al protocollo, mediante somministrazione della documentazione specifica. Se confermata l'eleggibilità del candidato e il paziente acconsentiva a partecipare allo studio, si acquisiva il consenso informato.

La casistica operatoria del nostro Istituto di Clinica Chirurgica e Terapia Chirurgica inerente al 2013 documenta l'esecuzione di 93 interventi chirurgici di resezione del colon su paziente affetti da CCR. Nelle nostre recenti pubblicazioni (Sarli e collaboratori) l'incidenza dell'ADK mucinoso è del 38,5 % con una prevalenza del 60% a livello del colon destro prossimale; sulla base di queste considerazioni era stato stimato di concludere lo studio in circa 18 mesi. D'altro canto, per una prevalenza attesa pari allo 0.5% (22,000 casi/4,400,000 residenti circa), la numerosità del campione appare sufficiente per uno studio avente una precisione assoluta dello 0.05%, ammettendo un intervallo di confidenza al 95%.

*Criteri di inclusione* (popolazione): pazienti afferenti alla Clinica Chirurgica e Terapia Chirurgica affetti da patologia neoplastica del colon prossimale candidati ad intervento chirurgico resettivo di emicolectomia destra con e senza allargamento al colon trasverso.

*Criteri di esclusione*: incapacità di intendere e volere, disordini neuro-psichiatrici o agitazione psico-motoria severa tali da determinare una compliance insufficiente, malattie infiammatorie croniche intestinali, anamnesi farmacologica recente positiva per antibiotici, lassativi e probiotici, tumore primitivo non-resecabile.

La gestione dei dati è stata eseguita mediante l'allestimento su un database relazionale in formato Microsoft Access® appositamente disegnato e protetto da specifica cifratura di sicurezza, la cui chiave d'accesso era accessibile ai soli partecipanti allo studio.

In fase pre-operatoria sono stati raccolti i seguenti dati e campioni:

- Abitudini alimentari: somministrazione di food-frequency.
- Stili di vita e comportamento: tabagismo, assunzione di farmaci.
- Dati antropometrici e clinico-anamnestici: età, genere, peso, altezza, familiarità per malattie neoplastiche, anamnesi patologica positiva per malattia neoplastica.

La raccolta dei campioni di microbiota intestinale residente su ogni pezzo operatorio è stata eseguita mediante l'esecuzione di due biopsie con strumenti sterili della mucosa intestinale colica, rispettivamente a livello della neoplasia ed in sede più distale possibile alla neoplasia stessa. Durante le biopsie dei campioni di mucosa neoplastica e sana, gli strumenti sterili sono stati sostituiti al fine di evitare eventuali contaminazioni microbiche. Le biopsie sono state poste all'interno di contenitori sterili. Questi sono stati mantenuti in congelatore (-80°C) fino alla consegna al centro di ricerca. Sui contenitori dei campioni ricevuti sono state applicate delle etichette adesive riportanti il codice alfanumerico identificativo del paziente e successivamente avviata la procedura di stoccaggio a -80°C.

La raccolta post-operatoria dei dati ha preso in considerazione le caratteristiche anatomo-patologiche dei pezzi operatori secondo i protocolli routinari comprendenti stadiazione TNM, istotipo, grading. Inoltre è stata eseguita l'estrazione del DNA, l'analisi biomolecolare dei frammenti e l'analisi del microbiota intestinale.

#### *Tecnica di estrazione del DNA ed analisi dei frammenti*

In questo studio, per ciascun paziente sono stati analizzati la componente tumorale e la corrispondente mucosa sana, congelati rapidamente in azoto liquido, subito dopo l'asportazione chirurgica e successivamente conservati a -80 °C.

Il DNA è stato estratto a partire da un frammento di tessuto neoplastico e di corrispondente mucosa sana frammentato mediante pestello e purificato secondo il protocollo del kit QIAGEN DNeasy tissue kit (QIAGEN, Hilden, Germany) che prevede una digestione enzimatica con proteinasi K e la successiva purificazione mediante adsorbimento su colonnina con filtro di silice.

Il DNA così ottenuto è stato quindi quantificato utilizzando lo spettrofotometro Nanodrop ND-1000 della Nanodrop Technology che consente di utilizzare solo 1 µl di campione per la lettura.

L'analisi biomolecolare dei frammenti è stata effettuata utilizzando markers altamente polimorfici localizzati in regioni cromosomiche potenzialmente coinvolte nello sviluppo e nella progressione del carcinoma coloretale secondo quanto consigliato dal protocollo revisionato di Bethesda (Umar A, Boland C, Terdiman J, et al. Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and Microsatellite Instability. *Journal of the National Cancer Institute* 2004;96).

Ciascun microsatellite è stato amplificato mediante PCR da DNA di tessuto normale e tumorale utilizzando la seguente miscela di reazione:

- 1 2 µl DNA campione
- 2 10x buffer (10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X- 100
- 3 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 4 0.2 mM di ciascun dNTP (Promega, Madison, WI)
- 5 0.4 µM di ciascun primer
- 6 1.25 U Taq Polimerasi (Promega, Madison, WI)

Ciascun primer con direzione “senso” (forward) è stato marcato con sostanze fluorescenti; l'amplificazione dei microsatelliti è stata ottenuta utilizzando PCR di 35-40 cicli con differenti temperature di appaiamento (annealing), specifiche per ciascun coppia di primer. La presenza e le dimensioni degli amplificati è stata verificata attraverso corsa elettroforetica utilizzando un gel di agarosio al 2%.

Gli amplificati ottenuti sono stati successivamente separati in un gel denaturante di poliacrilammide al 6%, utilizzando il sequenziatore automatico CEQ 8000 XL (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Alla fine della corsa elettroforetica, il segnale fluorescente emesso dai primer è stato automaticamente analizzato attraverso un software di analisi d'immagini, con generazione di elettroferogrammi in cui ciascun allele appariva come un picco.

L'instabilità dei microsatelliti (MSI) è stata valutata mediante la comparsa nell'elettroferogramma di nuovi picchi (corrispondenti a nuovi alleli) nel DNA tumorale,

non presenti nella controparte normale<sup>19</sup>. In accordo con i criteri internazionali adottati in letteratura i tumori sono stati classificati come MSI-H quando l'instabilità era presente in almeno il 40% dei marcatori microsatellitari e come MSI-L quando l'instabilità coinvolgeva meno del 40% dei marcatori. Le neoplasie senza MSI sono state definite MSS (MSI-stabili)<sup>20</sup>.

### *Tecnica di analisi del microbiota*

I campioni costituiti da due biopsie fresche di mucosa intestinale, rispettivamente neoplastica e sana, sono stati immediatamente congelati al momento della raccolta a -80°C e mantenuti tali fino alla procedura di estrazione del DNA. L'estrazione del DNA è stata eseguita attraverso l'impiego del QIAamp DNA Stool Mini kit secondo le istruzioni del fabbricatore (Qiagen Ltd. Strasse, Germany). Sequenze parziali del gene 16S rRNA sono state amplificate dal DNA estratto utilizzando il primer pair Probio\_Uni and /Probio\_Rev (Milani et al. 2013, PloS One). Le condizioni della PCR usata sono state 5 minuti a 95°C, 35 cicli di 30 secondi a 94°C, 30 secondi a 55°C e 90 secondi a 72°C, seguito da 10 minuti a 72°C. L'amplificazione è stata effettuata impiegando un Verity Thermocycler (Applied Biosystems). L'integrità delle PCR amplicons è stata analizzata mediante elettroforesi sulla Experion workstation (BioRad, UK).

Si è proceduto al sequenziamento degli amplicons 16S rDNA-based con Ion Torrent PGM. I prodotti derivati della PCR dalla amplificazione di specifiche regioni ipervariabili di 16S rDNA sono stati purificati dalla separazione elettroforetica su gel agatosio all'1.5% attraverso l'impiego di un Wizard SV Gen PCR Clean-Up System (Promega), seguita da un ulteriore step di purificazione attraverso l'Agencourt AMPure XP DNA purification beads (Beckman Coulter Genomics GmbH, Bernried, Germany) al fine di rimuovere i primer dimeri. La concentrazione di DNA della libreria della sequenza amplificata è stata stimata attraverso l'Experion system (BioRad). Dalla concentrazione dalle dimensioni medie di ciascuna amplicon libreria è stato calcolato il totale dei frammenti di DNA per microlitro e le librerie da ciascuna corsa sono state diluite a 3 x 10<sup>8</sup> DNA molecole prima dell'amplificazione clonale. La PCR in emulsione è stata

eseguita impiegando l'Ion OneTouch™ 200 Template Kit v2 DL (Life Technologies) in accordo con le istruzioni di fabbrica. Sequenziando le amplicon librerie caricate su un chip 316 mediante impiego di Ion Torrent PGM system e applicando l'Ion Sequencing 200 kit (Life Technologies) in accordo con le istruzioni di fabbrica. Dopo il sequenziamento, le letture delle sequenze individuali sono state filtrate dal PGM software per rimuovere le sequenze di bassa qualità e le sequenze policlonali.

L'analisi del microbiota è stata basata sulle sequenze. I file sff sono stati processati mediante l'impiego del QIIME software al fine di calcolare le misurazioni di diversità a valle (gli indici di alfa e beta diversità, analisi Unifrac), le 16S rRNA Operational Taxonomic Units (OTUs) sono state definite da un valore di omologia di sequenza  $\geq 99\%$ . Tutte le letture sono state classificate dalla collocazione tassonomica più bassa possibile usando il QIIME ed un dataset di riferimento selezionato dal Ribosomal Database Project.

### **Considerazioni statistiche**

L'analisi statistica è stata effettuata mediante l'utilizzo del software SPSS 22.0 / R 3.2. Le variabili continue sono state espresse come media  $\pm$  deviazione standard se normalmente distribuite o come mediana  $\pm$  range interquartile se non-normalmente distribuite. Le variabili categoriali sono state riportate come proporzioni (intervallo di confidenza al 95%). Le differenze tra i gruppi sono testate con t-test di Student, ANOVA per campioni indipendenti (per le variabili normalmente distribuite), Wilcoxon, U-test di Mann-Whitney, Kruskal-Wallis (per le variabili non-normalmente distribuite), test esatto di Fisher e Chi-quadro di Pearson per le proporzioni. Le relazioni tra variabili continue sono state quantificate utilizzando i coefficienti di correlazione di Spearman (intervallo di confidenza al 95%). L'analisi multivariata finalizzata all'elaborazione di modelli predittivi e all'individuazione di predittori indipendenti è stata effettuata con modelli di regressione multipla lineare e logistica.

## **Risultati**

Ad oggi sono stati arruolati 28 pazienti, di cui 18 casi di adenocarcinoma del colon destro e 10 casi di adenocarcinoma mucinoso, mentre 7 soggetti sono stati esclusi dallo studio (drop-out), a causa della difficoltà di compilazione del questionario o dei risultati dell'analisi istologica non riconducibile alla patologia considerata criterio di inclusione dello studio. L'età media dei pazienti è di 75,9 anni con prevalenza di sesso femminile (72%), di BMI medio pari a 27,5 per il primo gruppo e 28,8 per il secondo ed a dimostrazione dell'alto livello di complessità assistenziale, il rischio anestesilogico (ASA score) prevalente è pari a tre (78%) (vedi Tabella 1).

Lo staging post-operatorio è favorevole dal punto di vista della prognosi in quanto il 62% dei pazienti presentano staging I e II con un'aspettativa di vita a 5 aa "disease-free" pari a 90% ed 80 % rispettivamente (Vedi tabella 2).

Dal punto di vista chirurgico l'intervento è stato un'emicolectomia destra, eventualmente allargato al colon trasverso, con approccio prevalentemente videolaparoscopico (69%). In soli tre casi è stato necessario alla conversione laparotomia, rispettivamente per la presenza di sindrome aderenziale (che ha impedito la prosecuzione in laparoscopia), per la presenza di una neoplasia con stadio avanzato T4 che ha reso necessario l'ampliamento del gesto chirurgico in wedge resection epatica con consensuale duodenocefalopancreasectomia per la presenza di metastasi epatiche ed infiltrazione della testa del pancreas; nell'ultimo caso la presenza di un voluminoso lipoma del mesentere ileale ha reso impossibile la prosecuzione dell'intervento in videolaparoscopia. Il tempo chirurgico medio per intervento è stato di 176 minuti per l'approccio videolaparoscopico e 163 minuti per l'approccio tradizionale open (escluso l'intervento chirurgico per neoplasia avanzata con staging T4). Nel decorso post-operatorio la canalizzazione è avvenuta in media in terza giornata post-operatoria. Le uniche complicanze sono state due di carattere medico (un versamento pleurico ed una raccolta addominale, entrambe trattate conservativamente), ed una di tipo chirurgico (una fistola del moncone ileale a livello dell'anastomosi ileo-colica, che ha reso necessario un

reintervento); l'unico decesso verificatosi è stato per l'insorgenza di un'infarto del miocardio acuto (Vedi tabella 3).

#### *Risultati analisi microsatelliti (MSI)*

Il DNA è stato estratto da sezioni istologiche della porzione tumorale. La casistica comprende 10 (36%) ADK MUC e 18 (64%) ADK.

Considerando tutti i campioni, l'analisi dello studio della MSI ha evidenziato la presenza di 17 (61%) casi con fenotipo stabile (MSS) e 11 (39%) (con fenotipo instabile (MSI-H). Nell'ambito dei ADK MUC, i casi con fenotipo instabile era pari al 45% (5/11), mentre nei ADK era pari al 28% (5/18). Nessuna differenza statisticamente significativa è emersa tra i due gruppi di CCR con differente istologia per quanto riguarda l'instabilità dei microsatelliti.

#### *Risultati del Food Frequency Questionnaire (FFQ).*

Un totale di 28 soggetti sono stati reclutati per lo studio. Sulla base delle analisi istologiche effettuate, 18 soggetti sono stati inseriti per il gruppo ADK, 10 per il gruppo ADK MUC, mentre 7 soggetti sono stati esclusi dallo studio (drop-out), a causa della difficoltà di compilazione del questionario o dei risultati dell'analisi istologica non riconducibile alla patologia considerata criterio di inclusione dello studio. Il FFQ EPIC è stato somministrato ai pazienti reclutati dal personale del Dipartimento di Scienze degli Alimenti dell'Università di Parma e i dati risultanti dalla compilazione del questionario sono stati decodificati presso la Fondazione IRCCS-Istituto Nazionale dei Tumori (Struttura complessa di Epidemiologia e prevenzione). Le frequenze e quantità giornaliere di 302 singoli alimenti, 75 gruppi alimentari e l'intake giornaliero dei 38 macro, micro nutrienti presenti nella Banca Dati di Composizione degli Alimenti per Studi Epidemiologici in Italia (BDA) ed energia sono stati estratti dai questionari. I dati sono stati analizzati statisticamente mediante il t-test per campioni indipendenti (software SPSS versione 23,  $p < 0.05$ ), al fine di valutare differenze tra i due gruppi.

Sulla base dei confronti fra gruppi di pazienti volontari (ADK e ADK MUC), le frequenze e quantità giornaliere di consumo di alimenti, gruppi alimentari e l'intake di macronutrienti emersi non risultano essere differenti in modo statisticamente significativo tale da suggerire per il momento dati rilevanti che individuino elementi della dieta che possano influenzare la modulazione di uno o l'altra tipologia cancerosa. I risultati mostrano un aumentato intake di energia e quindi consumo di macro e micronutrienti da parte del gruppo ADK e inferiore per ADK MUC, nonostante i dati non siano significativamente differenti, ad eccezione della vitamina C (vedi tabelle 4, 5, 6, 7 ed 8).

Il trend dei risultati, quindi, mostra un aumentato consumo di nutrienti da parte del gruppo ADK. Ad oggi, il forte limite dei risultati ottenuti è descritto dallo sbilanciamento della numerosità a favore del gruppo di adenocarcinoma non mucinoso (ADK). I dati derivanti dai FFQ dei futuri pazienti arruolati consentiranno di aumentare la numerosità dei due gruppi e di eseguire un'indagine più puntuale delle differenze dei consumi alimentari. Successivamente, l'analisi dell'intake dei componenti alimentari rilevati col questionario ci permetterà di verificare come possa la dieta influenzare la selezione di specifici ceppi batterici e la microflora presente nei campioni prelevati durante l'operazione chirurgica, al fine di esplorare meglio la correlazione dieta-microbiota-cancro.

#### *Risultati dell'analisi del microbiota intestinale residente*

I casi raccolti consistono in 28 campioni di mucosa colica sana, prelevati nel punto più distante rispetto alla neoplasia, e 28 campioni di mucosa neoplastica, rispettivamente 18 ADK e 10 ADK MUC. Dal punto di vista quali-quantitativo i batteri con una prevalenza di circa il 90% nei campioni ADK rispetto ai corrispettivi campioni di mucosa sana sono i Prevotella, Fusobacterium e Campylobacter (Vedi Tabella 9). I batteri con una prevalenza di circa 70% nei campioni sani rispetto ai corrispettivi campioni di mucosa con ADK sono i Blautia, Enterorhabdus, Dorea, Ruminococcus e U. m. of Firmicutes Phylum (Vedi Tabella 10). I batteri con una prevalenza di circa l'80% nei campioni ADK MUC rispetto ai corrispettivi campioni di mucosa sana sono Parvimonas,

Peptostreptococcus, Fusobacterium e Campylobacter (Vedi Tabella 11). I batteri con una prevalenza > dell'80% nei campioni sani rispetto ai corrispettivi campioni di mucosa con ADK MUC sono Rominococcus, Clostridium sensu stricto 1, U.m. of Rominococcaceae family e Subdoligranulum (Vedi Tabella 12). Dal confronto tra campioni ADK e i rispettivi campioni di mucosa sani, i batteri più abbondanti nel primo gruppo risultano essere l'Helicobacter, il Fusobacterium, l'U. m. of S24-7 family, il Campylobacter, l'U. m. of Sphingomonadaceae family, il Salinibacter ed il Bacillus (Vedi Tabella 13).

Dal confronto tra i campioni ADK MUC ed i rispettivi campioni di mucosa sana, i batteri più abbondanti nel primo gruppo risultano essere i Selenomonas ed i Mucispirillum (Vedi Tabella 14).

Dal confronto tra i campioni di mucosa prelevata in sede di ADK ed in sede di ADK MUC, i batteri più abbondanti nel primo gruppo risultano essere i Coprococcus e Shuttleworthia, mentre nel secondo gruppo i Parvimonas, i Peptostreptococcus, i Gemella, i Natranaerovirga (Vedi Tabella 15).

## Discussione

Numerosi studi sono stati pubblicati di recente riguardo la correlazione tra microbiota intestinale e CCR; i batteri prevalentemente implicati sono di quattro generi: Actinomyces, Atopobium, Fusobacterium,, and Haemophilus<sup>22, 23</sup>

Nessun lavoro finora pare far distinzione tra il ruolo del microbiota residente e fecale nella cancerogenesi del CCR. Inoltre in letteratura emerge che le alterazioni genetiche ed epigenetiche, lo stile di vita, i fattori ambientali ed altri specifici fattori come l'età, il sesso, la razza, la poliposi colica, possono influire sullo sviluppo del CCR ed il microbiota intestinale può interagire con essi ed essere compartecipe nella cancerogenesi. I pathway con cui il microbiota intestinale possa determinare l'insorgenza del CCR sono:

- Stato infiammatorio cronico
- Bioisntesi di genotossine
- Produzione di metaboliti tossici<sup>23</sup>

Tra i fattori inizianti la disbiosi troviamo in letteratura il lavoro di Kaitlin J, giugno 2016, dove la creazione di un microfilm batterico sulla mucosa intestinale da parte di *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Parvimonas*, e *Gemella*, batteri che comunemente troviamo come commensali peridontali, comporta l'uso di peptidi e aminoacidi come fonte di energia, i cui metaboliti creano una ambiente con pH neutro; questo microambiente, creato dai suddetti batteri definiti “driver”, pone le basi per la disbiosi, ossia la proliferazione e colonizzazione intestinale da parte di altri generi di batteri non saprofiti, ma bensì definiti di “passaggio”<sup>24</sup>.

In Emilia Romagna l'ADK MUC ha una maggiore incidenza nel colon destro e presenta una prognosi migliore<sup>16</sup>; nel presente studio i generi Selenomonas e Peptostreptococcus sono stati riscontrati prevalentemente nell'istotipo ADK MUC, ed anche nel lavoro di Jackson HT (2014)<sup>25</sup> sono stati riscontrati prevalentemente in sede appendicolare rispetto i restanti tratti colici. I batteri che prevalentemente sono stati rilevati nelle appendiciti perforate sono i Fusobacter e Prevotella; questi ceppi batterici nel suddetto lavoro sono risultati prevalentemente presenti nell'istotipo ADK che Sarli et Co nel 2011 descrisse prevalentemente localizzato nel colon distale ed a prognosi

peggiore; in base a queste considerazioni è possibile ipotizzare un ruolo “Promotore” correlato ad una maggiore virulenza a carico della mucosa colica da parte dei generi *Fusobacter* e *Prevotella*, tale per cui i paziente si presentino con stadio neoplastico più avanzato e quindi con prognosi peggiore.

Un interessante punto di riflessione sorge dal lavoro di Mima K. E coll. (*Gut* 2015)<sup>26</sup>, dove è stata data una posizione rilievo al *Fusobacterium nucleatum* nel tumore del colon destro con elevata instabilità dei microsatelliti (MSI-H), associato a determinate alterazioni genetiche (MLH1 hypermethylation, CIMP-high and BRAF) e con prognosi peggiore; l’autore per tal motivo proporrebbe tale specie come biomarker prognostico. Il lavoro di Mima, a differenza del presente studio, non pone l’attenzione sui diversi istotipi di adenocarcinomi (ADK) del colon, di cui i mucinosi risultano essere più frequenti nella regione Emilia Romagna. Il nostro studio fa luce sulla correlazione tra microbiota intestinale e due istotipi di ADK del colon. Nella nostra esperienza<sup>16</sup>, l’adenocarcinoma mucinoso è più frequente nel colon destro, associato ad instabilità dei microsatelliti e con prognosi migliore a differenza dello studio di Mima, inoltre nella nostra popolazione sono implicati microbioti intestinali di specie diversa, quali *Parvimonas*, *Peptostreptococcus* e *Gemella* (vedi tabella 15).

L’*Helicobacter Pylori* (Hp) nel presente studio è risultato prevalentemente abbondante nell’istotipo ADK in modo statisticamente significativo. In letteratura emergono pochi lavori dal 1950 al 2010 che confermano tale dato<sup>27</sup>. Ad oggi la correlazione tra cancro del colon ed infezione da Hp trova pareri discordanti e molti bias sono rappresentati dalla diversa metodica di ricerca utilizzata nei lavori scientifici per individuare l’infezione da Hp. La sede più frequente in cui è insorta la neoplasia nei pazienti Hp positivi è stato il colon discendente ed il retto<sup>28</sup>. Ciò confermerebbe i nostri dati in cui l’infezione da Hp è più frequente nell’istotipo ADK che Sarli et Col. hanno descritto essere più frequente nel colon sinistro rispetto all’istotipo ADK MUC<sup>16</sup>. Zhang nel suo studio attribuisce all’Hp un ruolo “Iniziatore” e non “Promoter” in quanto i suoi pazienti Hp positivi presentavano uno stadio oncologico migliore (stadio I e II). E’ pensabile che in seguito intervengano altri fattori genetici e/o ambientali che portino a uno staging avanzato della neoplasia. Tale ruolo da “Iniziatore” dell’Hp nella

cancerogenesi coloretale è legata al prolungato rilascio di gastrina nei pazienti Hp positivi; tale entero-ormone agisce sulla mucosa colica come fattore di crescita tumorale attivando i recettori gastrina-specifici (CCK<sub>B</sub>-R) che sono implicati nella sequenza adenoma-carcinoma coloretale.

I generi di batteri presenti nel nostro studio più frequenti nei corrispettivi campioni di mucosa sana sono risultati essere i Ruminococcus e Dorea; in letteratura recentemente questi generi di batteri sono stati correlati alla presenza di obesità, steatosi e steatofibrosi epatica non alcol correlata<sup>29</sup>; nel nostro studio questi batteri sono stati riscontrati prevalentemente nei campioni di mucosa sana nel gruppo ADK MUC, dove il BMI medio risultava maggiore rispetto ai casi ADK anche se non in modo statisticamente significativo, ma la tendenza del peso superiore riscontrato nei pazienti con ADK MUC è in linea con lo studio di Del Chierico<sup>29, 30, 31</sup>.

Concludendo, i dati preliminari di questo studio confermano un'interazione tra microbiota intestinale, istotipo CCR ed alimentazione. Al fine di ricercare una correlazione statisticamente significativa, soprattutto per la somministrazione dei FFQ, sarebbe utile aumentare la numerosità dei casi arruolati alla luce dei dati ottenuti che finora risultano incoraggianti.

## Tabella

ANAGRAFICA		
Totale N° Casi		28
Istologico	ADK	ADK MUC
	N° Casi	18    10
Età (media)		75,9
Sesso	M	8 (28%)
	F	20 (72%)
BMI (media)	ADK	ADK MUC
		27,5    28,8
ASA score (n° pz)		2 (8)
		3 (20)
Comorbidità		
<i>BPCO</i>		5
<i>Tireopatia</i>		11
<i>Epatopatie</i>		3
<i>Diabete Mellito 2</i>		7
<i>Iperensione arteriosa</i>		18
<i>Osteoporosi</i>		2
<i>Cardiopatie</i>		11
<i>Ictus</i>		2
<i>Dislipidemia</i>		6
<i>Gastrite</i>		3
<i>Depressione</i>		4
<i>Vasculopatie</i>		4
<i>Disturbi SNC</i>		6
<i>Nefropatie/Uropatie</i>		5
<i>Gammopatia</i>		1

**Tabella 1**  
Anagrafica

TMN	N° Casi	Stadio	Sopravv. a 5 aa
pT1, N0, M0	2	I	74%
pT1, N0, LVI, M0	2		
pT2, N0, M0	5		
pT3, N0, M0	7	II	66,5%
pT3, N0, LVI, M0	2		
pT3, N1a, M0	1	III B	46,3%
pT3, N1b, LVI, M0	2		
pT3, N2a, M0	1		
pT3, N2a, LVI, M0	2		
pT3, N1b, M0	1		
pT3, N1, M1	1	IV	5,7%
pT4b, N0, LVI, M1	1		
pT4b, N2a, LVI, M1	1		

**Tabella 2**  
Staging post-operatorio  
dei pazienti operati

Dati Operatori		
N°	T operatorio (media)	
VL 19	176	
Open 9	163	
Conversione (n°)	3 (1 Aderenze, 1 lipoma del meso, 1 stadio T4)	
Canalizzazione (media gg PO)	Gas	3
	Feci	3
Complicanze		
Versamento pleurico	2	
Raccolta addominale	2	
Fistola moncone ileale	1	
Decesso	1 (IMA)	

**Tabella 3**  
Dati operatori e complicanze

**Tabella 4:** Frequenze di consumo degli alimenti singoli (volte/giorno) risultati statisticamente significativi in seguito al confronto tra i due gruppi.

		ADK	ADK MUC
Riso con legumi	<i>media</i>	0.001	0.029
	<i>DS</i>	0.003	0.032
Brodo di carne	<i>media</i>	0.096	0.009
	<i>DS</i>	0.114	0.017
Pasta in minestra	<i>media</i>	0.302	0.124
	<i>DS</i>	0.249	0.127
Barbabietole rosse	<i>media</i>	0.014	0.000
	<i>DS</i>	0.025	0.000
Soppressata	<i>media</i>	0.008	0.000
	<i>DS</i>	0.016	0.000
Antipasto sott'aceto	<i>media</i>	0.052	0.004
	<i>DS</i>	0.077	0.011
Kiwi	<i>media</i>	0.109	0.003
	<i>DS</i>	0.180	0.007
Succhi/spremute arancio	<i>media</i>	0.515	0.054
	<i>DS</i>	0.736	0.107
Yogurt frutta intero	<i>media</i>	0.141	0.003
	<i>DS</i>	0.279	0.007

**Tabella 5:** Quantità giornaliera di consumo degli alimenti singoli (g/giorno) risultati statisticamente significativi in seguito al confronto tra i due gruppi.

		<b>ADK</b>	<b>ADK MUC</b>
Brodo di carne	<i>Media</i>	14.605	1.438
	<i>DS</i>	17.222	2.883
Bollito	<i>Media</i>	6.089	1.163
	<i>DS</i>	8.642	2.180
Finocchi	<i>Media</i>	6.137	1.326
	<i>DS</i>	8.190	2.446
Kiwi	<i>Media</i>	10.968	0.263
	<i>DS</i>	18.078	0.742
Succhi/spremute arancio	<i>Media</i>	64.353	6.700
	<i>DS</i>	91.960	13.287
Yogurt frutta intero	<i>Media</i>	17.611	0.263
	<i>DS</i>	34.919	0.742

**Tabella 6:** Frequenze di consumo dei gruppi alimentari (volte/giorno) risultati statisticamente significativi in seguito al confronto tra i due gruppi.

		<b>ADK</b>	<b>ADK MUC</b>
Vitello	<i>media</i>	0.018	0.003
	<i>DS</i>	0.026	0.010
Succhi di frutta e di verdura	<i>media</i>	0.552	0.093
	<i>DS</i>	0.737	0.150

**Tabella 7:** Quantità giornaliera di consumo dei gruppi alimentari (g/giorno) risultati statisticamente significativi in seguito al confronto tra i due gruppi.

		<b>ADK</b>	<b>ADK MUC</b>
Vitello	<i>media</i>	2.090	0.446
	<i>DS</i>	2.885	1.028
Succhi di frutta e verdura	<i>media</i>	69.048	11.683
	<i>DS</i>	92.121	18.644

**Tabella 8:** Quantità giornaliera di consumo dei principali macronutrienti (g/giorno), energia (kJ/giorno) e vitamina C (mg/giorno).

		<b>ADK</b>	<b>ADK MUC</b>
Energia	<i>media</i>	8698.923	7141.915
	<i>DS</i>	3245.622	2000.242
Proteine totali	<i>media</i>	74.582	63.795
	<i>DS</i>	32.053	19.263
Proteine animali	<i>media</i>	50.260	41.652
	<i>DS</i>	27.797	11.177
Lipidi totali	<i>media</i>	76.269	65.649
	<i>DS</i>	40.703	21.720
Lipidi animali	<i>media</i>	40.518	32.758
	<i>DS</i>	26.386	16.137
Glucidi disponibili	<i>media</i>	269.885	207.101
	<i>DS</i>	97.815	49.566
Fibra alimentare	<i>media</i>	18.799	16.732
	<i>DS</i>	6.582	5.701
Vitamina C*	<i>media</i>	121.617	89.032
	<i>DS</i>	51.010	22.645

\*Statisticamente significativo  $p < 0.05$

**Tabella 9**

**Batteri più abbondanti nei campioni ADK rispetto i corrispettivi campioni sani in almeno metà dei pazienti**

	Pazienti														Prevalenza*				
	1	2	7	9	10	11	14	17	18	21	23	25	26	28		29	31	32	33
<i>Prevotella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88.89%
<i>Fusobacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88.89%
<i>Campylobacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88.89%
U. m. of Bacteria kingdom	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	77.78%
<i>Slackia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	72.22%
<i>Alloprevotella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	72.22%
U. m. of S24-7 family	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	72.22%
<i>Gemella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	72.22%
U. m. of Deffluvialeaceae family	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	72.22%
<i>Sutterella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	72.22%
<i>Escherichia-Shigella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	72.22%
U. m. of Enterobacteriaceae family	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	72.22%
U. m. of Porphyromonadaceae family	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	66.67%
<i>RC9 gut group</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	66.67%
<i>Maryinbryantia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	66.67%
<i>Shuttleworthia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	66.67%
U. m. of vadinBB60 family	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	66.67%
U. m. of Sphingomonadaceae family	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	66.67%
<i>Helicobacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	66.67%
Others	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	66.67%
<i>Propionibacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	61.11%
<i>Barnesiella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	61.11%
<i>Odoribacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	61.11%
<i>Alistipes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	61.11%
U. m. of Christensenellaceae family	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	61.11%
<i>Clostridium sensu stricto 3</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	61.11%
<i>Parvimonas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	61.11%
<i>Anaerostipes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	61.11%
<i>Oribacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	61.11%
<i>Roseburia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	61.11%
<i>Intestinimonas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	61.11%
U. m. of Erysipelotrichaceae family	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	61.11%
<i>Succiniclasticum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	61.11%
<i>Hafnia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	61.11%
<i>Klebsiella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	61.11%
<i>Cloacibacillus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	61.11%
<i>Bifidobacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55.56%
<i>Microbacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55.56%
<i>Rothia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55.56%
<i>Atopobium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55.56%
<i>Paraprevotella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55.56%
<i>Salinibacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55.56%
<i>Staphylococcus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55.56%
<i>Streptococcus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55.56%
U. m. of Family XIII family (Clostridiales order)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55.56%
<i>Catonella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55.56%
<i>Johnsonella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55.56%
<i>Peptostreptococcus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55.56%
<i>Anaerotruncus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55.56%
<i>Flavonifractor</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55.56%
<i>Oscillibacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55.56%
<i>Veillonella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55.56%
<i>Bilophila</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55.56%
<i>Enhydrobacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55.56%
U. m. of Gammaproteobacteria class	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55.56%
U. m. of Micrococcales order	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Eggerthella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
U. m. of Actinobacteria phylum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Butyrivimonas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
U. m. of Prevotellaceae family	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Rikenella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
U. m. of Bacteroidales order	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
U. m. of P5D1-392 family	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
U. m. of Ruminococcaceae family	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Oscillospira</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Solobacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Leptotrichia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Bradyrhizobium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Ochrobactrum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Methylobacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Desulfovibrio</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
U. m. of Helicobacteraceae family	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Citrobacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Haemophilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%

\*Con prevalenza si intende la percentuale di coppie in cui si è osservata la variazione.

**Tabella 10**

**Batteri più abbondanti nei campioni sani rispetto i corrispettivi campioni ADK in almeno metà dei pazienti**

	Pazienti														Prevalenza*			
	1	2	7	9	10	11	14	17	18	21	23	25	26	28		29	31	32
<i>Blautia</i>	+	+	+	+	+	+	+	+				+	+	+		+	+	72.22%
<i>Enterorhabdus</i>	+	+	+	+			+	+	+	+			+		+		+	66.67%
<i>Dorea</i>	+	+					+	+	+	+	+		+		+	+	+	66.67%
<i>Ruminococcus</i>			+	+	+	+			+				+	+		+	+	66.67%
U. m. of Firmicutes phylum	+	+	+	+			+					+	+	+	+	+	+	66.67%
<i>Collinsella</i>	+	+		+	+	+		+					+	+		+	+	61.11%
U. m. of Coriobacteriaceae family	+	+	+		+	+	+		+							+	+	61.11%
<i>Bacteroides</i>	+	+	+	+					+			+		+	+	+	+	61.11%
<i>Enterococcus</i>		+	+	+	+			+		+		+	+	+	+	+	+	61.11%
<i>Christensenella</i>	+	+	+	+		+		+		+		+		+	+	+	+	61.11%
U. m. of Lachnospiraceae family	+	+		+	+	+			+	+	+	+	+	+	+			61.11%
<i>Moryella</i>	+		+	+				+	+			+	+	+	+	+	+	61.11%
U. m. of Peptostreptococcaceae family	+	+		+	+	+			+			+	+	+	+		+	61.11%
<i>Subdoligranulum</i>	+	+	+		+	+	+	+					+	+		+	+	61.11%
<i>Actinomyces</i>	+	+	+	+	+	+	+		+			+		+				55.56%
<i>Parabacteroides</i>	+	+		+		+	+							+	+		+	55.56%
<i>Lactobacillus</i>	+	+	+	+		+		+		+		+	+				+	55.56%
<i>Mogibacterium</i>	+	+	+		+	+	+		+	+	+	+						55.56%
<i>Acetitomaculum</i>	+		+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+		55.56%
<i>Coprococcus</i>			+	+					+			+	+	+	+	+	+	55.56%
<i>Pseudobutyrvibrio</i>	+	+		+			+	+	+			+	+		+		+	55.56%
<i>Acetanaerobacterium</i>	+	+	+					+	+	+	+		+	+	+			55.56%
<i>Faecalibacterium</i>	+	+		+	+	+	+	+				+	+				+	55.56%
U. m. of Clostridiales order	+	+	+	+		+		+		+		+	+	+		+		55.56%
<i>Phascolarctobacterium</i>		+	+	+					+	+	+		+	+	+	+	+	55.56%
<i>Eggerthella</i>	+	+			+		+	+	+			+	+				+	50.00%
U. m. of Bacteroidales order	+	+	+	+				+							+	+	+	50.00%
<i>Lachnospira</i>	+	+	+						+		+	+	+		+	+	+	50.00%
U. m. of Ruminococcaceae family		+	+					+	+	+		+	+	+	+	+	+	50.00%
<i>Holdemania</i>		+				+	+		+		+	+	+	+	+	+	+	50.00%

\*Con prevalenza si intende la percentuale di coppie in cui si è osservata la variazione.

**Tabella 11**

**Batteri più abbondanti nei campioni malati ADK MUC rispetto i corrispettivi sani in almeno metà dei pazienti**

	Pazienti										Prevalenza*
	3	6	12	15	16	19	20	22	24	30	
<i>Parvimonas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80.00%
<i>Peptostreptococcus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80.00%
<i>Fusobacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80.00%
<i>Campylobacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80.00%
<i>Microbacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	70.00%
<i>Barnesiella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	70.00%
<i>Alloprevotella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	70.00%
U. m. of Gastranaerophilales order	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	70.00%
<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	70.00%
U. m. of P5D1-392 family	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	70.00%
<i>Oscillibacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	70.00%
U. m. of vadinBB60 family	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	70.00%
<i>Phascolarctobacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	70.00%
<i>Dialister</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	70.00%
<i>Helicobacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	70.00%
<i>Escherichia-Shigella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	70.00%
<i>Hafnia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	70.00%
<i>Cloacibacillus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	70.00%
Others	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	70.00%
<i>Propionibacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60.00%
<i>Bacteroides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60.00%
<i>Alistipes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60.00%
<i>RC9 gut group</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60.00%
U. m. of S24-7 family	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60.00%
<i>Lactobacillus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60.00%
<i>Lactococcus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60.00%
<i>Streptococcus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60.00%
U. m. of Christensenellaceae family	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60.00%
<i>Coprococcus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60.00%
<i>Marvinbryantia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60.00%
<i>Intestinimonas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60.00%
<i>Solobacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60.00%
<i>Succiniclasticum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60.00%
U. m. of Firmicutes phylum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60.00%
<i>Leptotrichia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60.00%
U. m. of Sphingomonadaceae family	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60.00%
<i>Parasutterella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60.00%
<i>Citrobacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60.00%
<i>Corynebacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
U. m. of Micrococcales order	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Slackia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Butyricimonas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
U. m. of Porphyromonadaceae family	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Rikenella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Gemella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Staphylococcus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
U. m. of DeFluviitaleaceae family	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Mogibacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Anaerostipes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Howardella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Roseburia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
U. m. of Peptococcaceae family	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
U. m. of Peptostreptococcaceae family	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Anaerotruncus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Oscillospira</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Catenibacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Selenomonas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Bradyrhizobium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Methylobacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Paracoccus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Sutterella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Bilophila</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
U. m. of Helicobacteraceae family	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Klebsiella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
U. m. of Enterobacteriaceae family	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Haemophilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
U. m. of Gammaproteobacteria class	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
U. m. of RF9 order	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%
<i>Akkermansia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.00%

\*Con prevalenza si intende la percentuale di coppie in cui si è osservata la variazione.

## Tabella 12

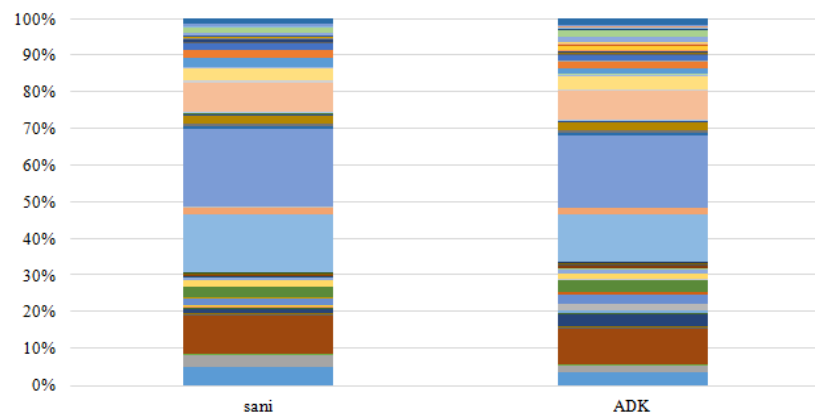
### Batteri più abbondanti nei campioni sani rispetto i corrispettivi campioni ADK MUC in almeno metà dei pazienti

	Pazienti										Prevalenza*
	3	6	12	15	16	19	20	22	24	30	
<i>Ruminococcus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	90.00%
<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	+	+	+			+	+	+	+	+	80.00%
U. m. of Ruminococcaceae family	+	+	+	+			+		+	+	80.00%
<i>Subdoligranulum</i>	+	+		+		+	+	+	+	+	80.00%
<i>Actinomyces</i>	+	+	+				+	+	+	+	70.00%
<i>Collinsella</i>	+	+	+				+	+	+	+	70.00%
<i>Parabacteroides</i>	+	+		+			+	+	+	+	70.00%
U. m. of Bacteroidales order	+	+		+		+	+		+	+	70.00%
<i>Blautia</i>	+	+			+	+	+	+		+	70.00%
<i>Dorea</i>	+	+	+			+	+	+		+	70.00%
<i>Oribacterium</i>	+			+	+	+	+		+	+	70.00%
<i>Pseudobutyrvibrio</i>	+	+		+		+	+	+		+	70.00%
<i>Bifidobacterium</i>	+	+	+		+		+			+	60.00%
<i>Atopobium</i>	+	+	+		+	+		+			60.00%
<i>Eggerthella</i>		+	+					+	+	+	60.00%
<i>Enterorhabdus</i>	+	+		+				+	+	+	60.00%
U. m. of Coriobacteriaceae family	+	+			+	+	+			+	60.00%
<i>Prevotella</i>	+	+				+	+		+	+	60.00%
U. m. of Family XIII family (Clostridiales order)	+	+		+	+		+		+	+	60.00%
U. m. of Lachnospiraceae family	+	+	+				+	+	+		60.00%
<i>Lachnospira</i>	+	+	+				+		+	+	60.00%
<i>Moryella</i>	+	+	+			+	+				60.00%
<i>Shuttleworthia</i>	+	+	+	+			+			+	60.00%
<i>Faecalibacterium</i>	+					+	+	+	+	+	60.00%
<i>Flavonifractor</i>	+	+	+		+			+		+	60.00%
U. m. of Clostridiales order	+			+	+	+			+	+	60.00%
<i>Holdemania</i>	+	+		+				+	+	+	60.00%
U. m. of Erysipelotrichaceae family	+	+	+			+		+		+	60.00%
<i>Veillonella</i>	+	+	+				+		+	+	60.00%
U. m. of Bacteria kingdom	+	+	+	+					+	+	60.00%
<i>Corynebacterium</i>	+	+					+	+		+	50.00%
<i>Rothia</i>	+	+	+				+	+			50.00%
U. m. of Actinobacteria phylum	+	+				+	+	+			50.00%
<i>Odoribacter</i>	+						+	+	+	+	50.00%
U. m. of Porphyromonadaceae family	+	+					+	+		+	50.00%
U. m. of Prevotellaceae family	+					+	+	+	+	+	50.00%
U. m. of Clostridiaceae 1 family	+					+	+	+	+	+	50.00%
U. m. of Defluviitaleaceae family			+		+		+		+	+	50.00%
<i>Anaerostipes</i>	+	+			+		+			+	50.00%
<i>Catonella</i>	+						+	+	+	+	50.00%
<i>Roseburia</i>	+	+					+	+	+	+	50.00%
U. m. of Peptostreptococcaceae family	+			+	+		+			+	50.00%
<i>Anaerotruncus</i>	+	+				+	+			+	50.00%
<i>Oscillospira</i>		+			+			+	+	+	50.00%
<i>Turicibacter</i>	+	+		+			+			+	50.00%
<i>Thalassospira</i>	+	+					+		+	+	50.00%
<i>Sutterella</i>	+	+					+		+	+	50.00%
<i>Klebsiella</i>	+	+		+		+				+	50.00%

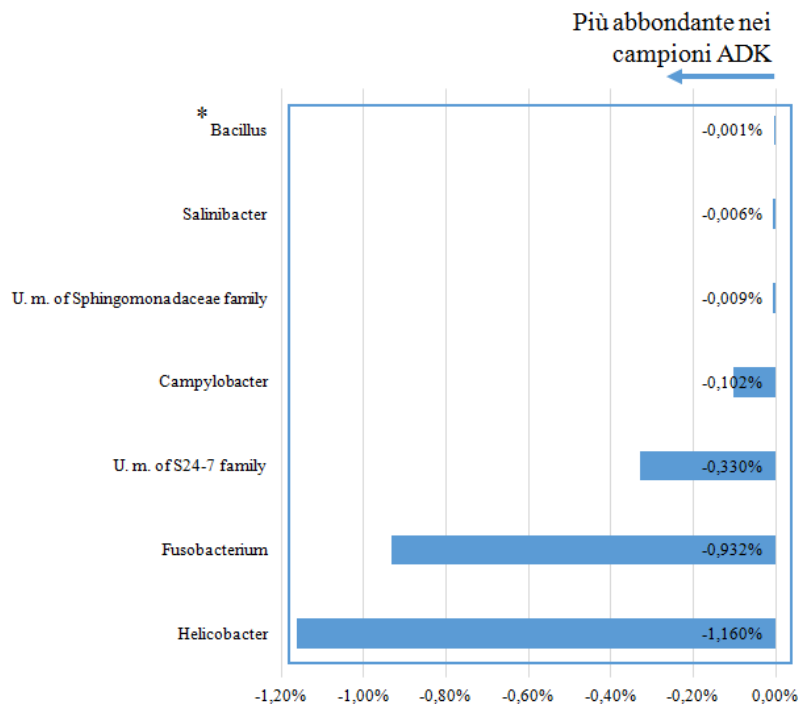
\*Con prevalenza si intende la percentuale di coppie in cui si è osservata la variazione.

Tabella 13

### Barplot della composizione batterica Confronto tra campioni ADK e i rispettivi campioni sani



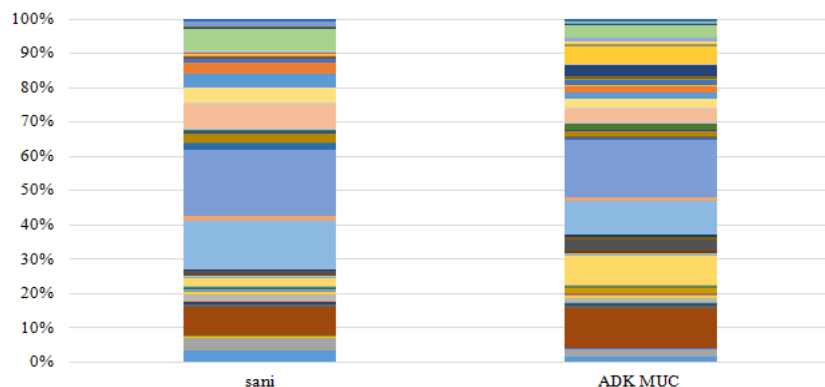
- Bifidobacterium
- Eggerthella
- U. m. of Coriobacteriaceae family
- Butyrivomona
- Alloprevotella
- U. m. of Prevotellaceae family
- Rikenellia
- Gemella
- Lactobacillus
- Streptococcus
- Clostridium sensu stricto 3
- U. m. of Family XIII family (Clostridiales order)
- Blautia
- Howardella
- Lachnospira
- Pseudobutyrvibrio
- Anaerotruncus
- U. m. of Ruminococcaceae family
- Ruminococcus
- Catenibacterium
- Tuncibacter
- Succinivibrionium
- Selenomonas
- Fusobacterium
- Thalaspospira
- Sutterella
- Neisseria
- Campylobacter
- Klebsiella
- Enhydrobacter
- Cloacibacillus
- U. m. of RRF9 order
- Others
- Atopobium
- Olsanella
- Bacteroides
- Parabacteroides
- Paraprevotella
- Alistipes
- U. m. of S24-7 family
- Staphylococcus
- U. m. of PSD1-392 family
- U. m. of Christensenellaceae family
- U. m. of Desfluvitaleaceae family
- Mogibacterium
- Dorea
- U. m. of Lachnospiraceae family
- Marvinbryantia
- U. m. of Paptostreptococcaceae family
- Faecalibacterium
- Intestinimonas
- Subdoligranulum
- U. m. of Erysipelotrichaceae family
- Acidaminococcus
- Dialister
- Veillonella
- Leptotrichia
- U. m. of Sphingomonadaceae family
- Comamonas
- Bilophila
- Helicobacter
- Morganella
- Pseudomonas
- Pyramidobacter
- Akkermansia
- Collinsella
- Slackia
- Barnesiella
- Porphyromonas
- Prevotella
- RC9 gut group
- U. m. of Bacteroidales order
- Enterococcus
- Lactococcus
- Clostridium sensu stricto 1
- Parvimonas
- Anaerostipes
- Epulopiscium
- Johnsonella
- Moryella
- Peptostreptococcus
- Flavonifractor
- Oscillospira
- U. m. of vadinBB60 family
- Solobacterium
- Paucolactobacterium
- Magaphaera
- U. m. of CFT112H7 family
- Devosia
- Parasutterella
- Eikenella
- Desulfovibrio
- Escherichia-Shigella
- Haemophilus
- Treponema
- Synergistes
- U. m. of Bacteria kingdom



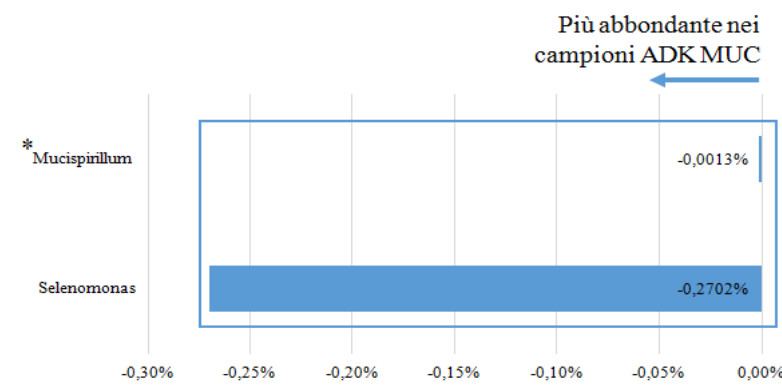
\*Nel barplot sono riportate le differenze sani-ADK solo dei taxa con un p-value < 0,05

Tabella 14

### Barplot della composizione batterica Confronto tra campioni ADK MUC e i rispettivi campioni sani



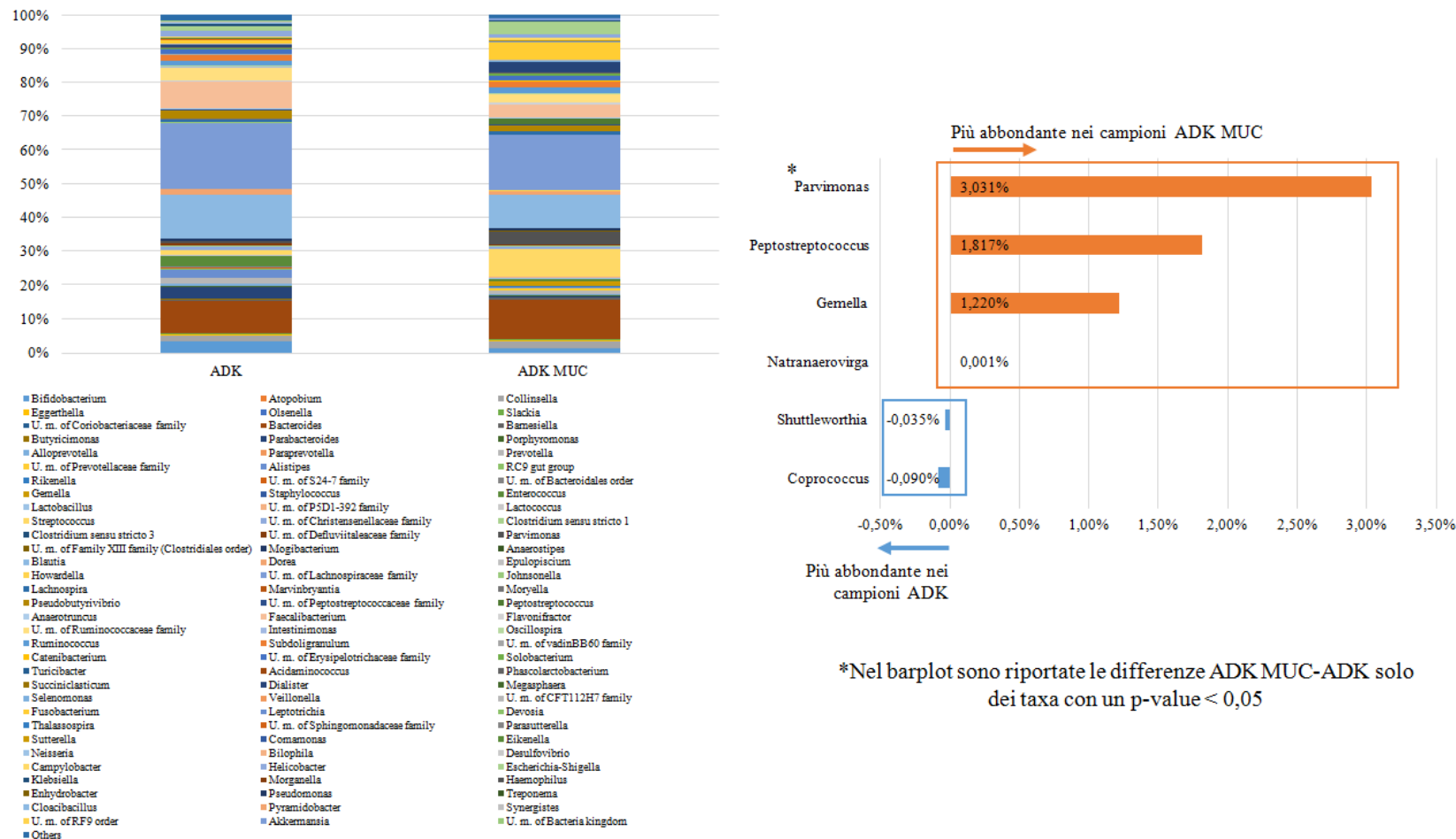
- |   |   |                                |
|---|---|--------------------------------|
| ■ Bifidobacterium                                   | ■ Atopobium                             | ■ Collinsella                  |
| ■ Eggerthella                                       | ■ Clostridium                           | ■ Slackia                      |
| ■ U. m. of Coriobacteriaceae family                 | ■ Bacteroides                           | ■ Bacteroides                  |
| ■ Butyrivomox                                       | ■ Parabacteroides                       | ■ Bacteroides                  |
| ■ Alloprevotella                                    | ■ Paraprevotella                        | ■ Prevotella                   |
| ■ U. m. of Prevotellaceae family                    | ■ Alistipes                             | ■ RCS9 gut group               |
| ■ Rikenella   | ■ U. m. of S24-7 family                 | ■ U. m. of Bacteroidales order |
| ■ Gemella   | ■ Staphylococcus                        | ■ Enterococcus                 |
| ■ Lactobacillus                                     | ■ U. m. of PSD1-392 family              | ■ Lactococcus                  |
| ■ Streptococcus                                     | ■ U. m. of Christensenellaceae family   | ■ Clostridium sensu stricto 1  |
| ■ Clostridium sensu stricto 3                       | ■ U. m. of Deфиuivittalesaceae family   | ■ Parvimonas                   |
| ■ U. m. of Family XIII family (Clostridiales order) | ■ Negibacterium                         | ■ Anaerostipes                 |
| ■ Blautia   | ■ Doros                                 | ■ Epulopiscium                 |
| ■ Howardella  | ■ U. m. of Lachnospiraceae family       | ■ Johnsonella                  |
| ■ Lachnospira                                       | ■ Marvinbryantia                        | ■ Moryella                     |
| ■ Pseudobutyrvibrio                                 | ■ U. m. of Peptostreptococcaceae family | ■ Peptostreptococcus           |
| ■ Anaerotruncus                                     | ■ Faecalibacterium                      | ■ Flavivibrio                  |
| ■ U. m. of Ruminococcaceae family                   | ■ Intestinimonas                        | ■ Oscillospira                 |
| ■ Ruminococcus                                      | ■ Subdoligranulum                       | ■ U. m. of vadinBB60 family    |
| ■ Catenibacterium                                   | ■ U. m. of Erysipelotrichaceae family   | ■ Solobacterium                |
| ■ Turicibacter                                      | ■ Acidaminococcus                       | ■ Phascolarctobacterium        |
| ■ Succiniclasticum                                  | ■ Dialister                             | ■ Magaphara                    |
| ■ Selenomonas                                       | ■ Veillonella                           | ■ U. m. of CFT112H7 family     |
| ■ Fusobacterium                                     | ■ Leptotrichia                          | ■ Devosia                      |
| ■ Thalaspospira                                     | ■ U. m. of Sphingomonadaceae family     | ■ Parasutterella               |
| ■ Sutterella  | ■ Comamonas                             | ■ Eikenella                    |
| ■ Neisseria   | ■ Bilophila                             | ■ Desulfovibrio                |
| ■ Campylobacter                                     | ■ Helicobacter                          | ■ Escherichia-Shigella         |
| ■ Klebsiella  | ■ Morganella                            | ■ Haemophilus                  |
| ■ Eubacterium                                       | ■ Pseudomonas                           | ■ Treponema                    |
| ■ Cloacibacillus                                    | ■ Pyramidobacter                        | ■ Synergistes                  |
| ■ U. m. of RF9 order                                | ■ Akkermansia                           | ■ U. m. of Bacteria kingdom    |
| ■ Others  |   |                                |



\*Nel barplot sono riportate le differenze sani-ADK MUC solo dei taxa con un p-value < 0,05

Tabella 15

### Barplot della composizione batterica Confronto tra campioni ADK e ADK MUC



## **Bibliografia:**

1. Contribution of behavioral risk factors and obesity to socioeconomic differences in colorectal cancer incidence.  
Doubeni CA, Major JM, Laiyemo AO, Schootman M, Zauber AG, Hollenbeck AR, Sinha R, Allison J. *J Natl Cancer Inst.* 2012 Sep 19;104(18):1353-62.
2. Genetic instability in colorectal cancers.  
Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. *Nature* 1997; 386: 623-7.
3. Multiple pathways leading to genomic instability and tumorigenesis.  
Sweezy MA, Fishel R. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 726: 165-77.
4. Molecular genetics of colorectal cancer. Fearon ER.  
*Ann N Y Acad Sci* 1995; 768: 101-10.
5. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease.  
Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, et al. *N Engl J Med* 1998; 338: 1481-7.
6. Application of cDNA microarrays to generate a molecular taxonomy capable of distinguishing between colon cancer and normal colon.  
Zou TT, Selaru FM, Xu Y, et al. *Oncogene* 2002; 21: 4855-62.
7. Differential expression of the L-plastin gene in human colorectal cancer progression and metastasis.  
Otsuka M, Kato M, Yoshikawa T, et al. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289: 876-81.
8. Dietary patterns and the risk of colorectal cancer and adenomas.  
Randi G, Edefonti V, Ferraroni M, La Vecchia C, Decarli A. *Nutr Rev.* 2010 Jul;68(7):389-408.
9. Diet and cancer prevention: Contributions from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study.  
Gonzalez CA, Riboli E. *Eur J Cancer.* 2010 Sep;46(14):2555-62.
10. Cancer genetics and their application to individualised medicine.  
Lifers GJ, Tollenaar RA. *Eur J Cancer* 2002; 38: 872-9.

11. Microbial induction of immunity, inflammation, and cancer.  
Greer J., O'Keefe S. *Front Physiol* 2011 1: 168.
12. Large bowel cancer: causation and management.  
McIllmurray M., Langman M. *Gut* 1975 16: 815–820.
13. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa.  
DeFillipo C., Cavalieri D., Di P., Ramazzotti M., Poullet J., Massart S., et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 107: 14691–14696.
14. Molecular characterization of mucosal adherent bacteria and associations with colorectal adenomas.  
Shen X., Rawls J., Randall T., Burcal L., Mpande C., Jenkins N., et al. *Gut Microbes* 2010 1: 138–147.
15. Alteration of local microflora and alpha-defensins hyper-production in colonic adenoma mucosa.  
Pagnini C., Corleto V., Mangoni M., Piloizzi E., Torre M., Marchese R., et al. *J Clin Gastroenterol* 2011 45: 602–610.
16. Two Subtypes of Mucinous Adenocarcinoma of the Colorectum: Clinicopathological and Genetic Features.  
L. Sarli, L. Bottarelli, C. Azzoni, G. DiCola, A. L. Barilli, R. Costi, A. Mazzeo, C. Salvemini, C. Porrini, S. Cecchini, M. Taglia, L. Roncoroni, C. Borghi. *Annals of Surgical Oncology* 15(11):3326.
17. Mucinous subtype as prognostic factor in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis.  
J Verhulst, L Ferdinande, P Demetter, W Ceelen. *J Clin Pathol* doi:10.1136/jclinpath-2011-200340.
18. Does the prognosis of colorectal mucinous carcinoma depend upon the primary tumour site? Results from two independent databases.  
Gao P, Song YX, Xu YY, Sun Z, Sun JX, Xu HM, Wang ZN. *Histopathology*. 2013 Nov;63(5):603-15.

19. Mueller J, Haegle N, Keller G, et al. Loss of heterozygosity and microsatellite instability in de novo versus ex-adenoma carcinomas of the colorectum. *Am J Pathol* 1998;153:1977-84.
20. Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and Microsatellite Instability.  
Umar A, Boland C, Terdiman J, et al. *Journal of the National Cancer Institute* 2004;96.
21. Beckmann MW, Picard F, An HX, et al. Clinical impact of detection of loss of heterozygosity of BRCA1 and BRCA2 markers in sporadic breast cancer. *Br J Cancer* 1996;73:1220-6.
22. Comparison of human gut microbiota in control subjects and patients with colorectal carcinoma in adenoma: Terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing analyses.  
Kasai C, Sugimoto K, Moritani I, Tanaka J, Oya Y, Inoue H, Tameda M, Shiraki K, Ito M, Takei Y, Takase K.  
*Oncol Rep.* 2016 Jan;35(1):325-33. doi: 10.3892/or.2015.4398. Epub 2015 Nov 4. PMID: 26549775
23. Factors Determining Colorectal Cancer: The Role of the Intestinal Microbiota.  
Nistal E, Fernández-Fernández N, Vivas S, Olcoz JL.  
*Front Oncol.* 2015 Oct 12;5:220. doi: 10.3389/fonc.2015.00220. eCollection 2015. Review. PMID: 26528432
24. Metabolic and Community Synergy of Oral Bacteria in Colorectal Cancer.  
Flynn KJ, Baxter NT, Schloss PD.  
*mSphere.* 2016 May 11;1(3). pii: e00102-16. doi: 10.1128/mSphere.00102-16. eCollection 2016 May-Jun. Review. PMID: 27303740
25. Culture-independent evaluation of the appendix and rectum microbiomes in children with and without appendicitis. Jackson HT, Mongodin EF, Davenport KP, Fraser CM, Sandler AD, Zeichner SL. *PLoS One.* 2014 Apr 23;9(4):e95414. doi: 10.1371/journal.pone.0095414. PMID: 24759879

26. *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis.  
Mima K, Nishihara R, Qian ZR, Cao Y, Sukawa Y, Nowak JA, Yang J, Dou R, Masugi Y, Song M, Kostic AD, Giannakis M, Bullman S, Milner DA, Baba H, Giovannucci EL, Garraway LA, Freeman GJ, Dranoff G, Garrett WS, Huttenhower C, Meyerson M, Meyerhardt JA, Chan AT, Fuchs CS, Ogino S.  
*Gut*. 2015 Aug 26. pii: gutjnl-2015-310101. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310101.  
PMID: 26311717
27. Microbial and viral pathogens in colorectal cancer. Collins D, Hogan AM, Winter DC. *Lancet Oncol*. 2011 May;12(5):504-12. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70186-8. Epub 2010 Nov 8. Review. PMID: 21067973
28. *Helicobacter pylori* infection and colorectal cancer risk: evidence from a large population-based case-control study in Germany. Zhang Y, Hoffmeister M, Weck MN, Chang-Claude J, Brenner H. *Am J Epidemiol*. 2012 Mar 1;175(5):441-50. doi: 10.1093/aje/kwr331. Epub 2012 Jan 31. PMID: 22294430
29. Gut microbiota profiling of pediatric NAFLD and obese patients unveiled by an integrated meta-omics based approach. Del Chierico F, Nobili V, Vernocchi P, Russo A, De Stefanis C, Gnani D, Furlanello C, Zandonà A, Paci P, Capuani G, Dallapiccola B, Miccheli A, Alisi A, Putignani L. *Hepatology*. 2016 Mar 29. doi: 10.1002/hep.28572. PMID: 27028797
30. A genome-wide systems analysis reveals strong link between colorectal cancer and trimethylamine N-oxide (TMAO), a gut microbial metabolite of dietary meat and fat. Xu R, Wang Q, Li L. *BMC Genomics*. 2015;16 Suppl 7:S4. doi: 10.1186/1471-2164-16-S7-S4. PMID: 26100814
31. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease.  
Wang Z1, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, Feldstein AE, Britt EB, Fu X, Chung YM, Wu Y, Schauer P, Smith JD, Allayee H, Tang WH, DiDonato JA, Lusis AJ, Hazen SL.  
*Nature*. 2011 Apr 7;472(7341):57-63. doi: 10.1038/nature09922.