

**ROSA LILIANA SOLIS CASTRO**

**DETERMINAÇÃO DOS PRINCIPAIS PATÓTIPOS DE *Escherichia coli* ISOLADAS  
DE PACIENTES COM CÂNCER DE RETO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

São Paulo  
2017

**ROSA LILIANA SOLIS CASTRO**

**DETERMINAÇÃO DOS PRINCIPAIS PATÓTIPOS DE *Escherichia coli* ISOLADAS  
DE PACIENTES COM CÂNCER DE RETO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo  
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

CASTRO , ROSA LILIANA SOLIS

Determinação dos principais patótipos de  
Escherichia coli isoladas de pacientes com câncer de  
reto / ROSA LILIANA SOLIS CASTRO ; orientador MARIO  
JULIO AVILA CAMPOS. -- São Paulo, 2017.

106 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São  
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Câncer de reto. 2. Escherichia coli. 3.  
Patótipos e ExPEC. 4. Filogrupos. 5. ERIC-PCR. I.  
AVILA CAMPOS, MARIO JULIO , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): ROSA LILIANA SOLIS CASTRO

Titulo da Dissertação: Determinação dos principais patótipos de *Escherichia coli* isoladas de pacientes com câncer de reto

Orientador: Dr. MARIO JULIO AVILA CAMPOS

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

(  ) **Aprovado(a)**                      (  ) **Reprovado(a)**

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000  
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 30 de julho de 2015.

**PARECER 1255/CEPSH**

CAAE: 46288715.1.0000.5467

A Comissão de *Ética em Pesquisas em Seres Humanos* do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Principais grupos bacterianos do trato intestinal de pacientes com câncer colorretal*" do pesquisador Prof. Dr. **Mário Júlio Ávila Campos** e da aluna **Rosa Liliana Solis Castro**.

Cabe aos pesquisadores elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final), de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: [www.icb.usp.br](http://www.icb.usp.br).

*Aos pesquisadores cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.*

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **13.07.2016**, bem como anexado uma cópia à Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Prof. Dr. **PAOLO M. A. ZANOTTO**  
Coordenador da Comissão de Ética em  
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

*A mi familia. Su cariño y esfuerzo son la  
inspiración de mi vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Dr. Mario Julio Avila-Campos pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa. Sua experiência contribuiu na minha formação acadêmica. Obrigada pela paciência.

A Dra. Viviane Nakano pela colaboração e idéias para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Dr. Waldir Pereira Elias Jr. pela colaboração na identificação das cepas EAEC atípicas.

À Universidad de Tumbes pelo incentivo e permissão para realizar o curso de Mestrado no ICB-USP.

Ao Dr. José De La Cruz Martínez (ex-Reitor), professores do Dpto. Académico de Biología e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Saúde, que apoiaram e incentivaram a minha qualificação profissional.

Ao Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) e ao Dr. Ulysses Riveiro pelas facilidades para a coleta das amostras.

Aos colegas do Laboratório de Anaeróbios, Viviane Arenas, Naiane Cardoso, Luis Albornoz, Rita Lima Rodrigues, Paula Betin, Ana Paula Barbosa, Luciane Cavalheiro, Filipe Menezes e Alejandra Guzmán, Obrigada pela amizade!!

A Gabriela Freire minha primeira amiga brasileira, obrigada pelos momentos compartilhados dentro e fora do laboratório, e pela colaboração na pesquisa.

Ao meu caríssimo amigo Anderson Moraes pela ajuda em todo momento da minha estadia em Sao Paulo, pelas correções em meu português e na escrita, as experiências com você ficarão por sempre nas minhas lembranças. Muito obrigada!!

A Auxiliar de Laboratório Márcia Harumi pelo apoio técnico e pelo companheirismo.

À Gisele Santana, secretária da Pós-graduação, obrigada pela ajuda e facilidades brindadas, e as Secretárias do Departamento Naíde Farripas e Isabel Ferraz pela atenção e colaboração.

A Sra. Rosana Prisco do ICB/USP e à Camila Martin muito obrigada pela colaboração na análise estatística dos resultados.

Aos Professores do Departamento de Microbiologia pela formação recebida.



## **Agradecimento Especial**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa recebida no primeiro ano de mestrado, com o Processo 1533074.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudo recebida durante o segundo ano de mestrado, com número de Processo 2015/23666-0.

## RESUMO

CASTRO, R. L. S. **Determinação dos principais patótipos de *Escherichia coli* isoladas de pacientes com câncer de reto.** 2017. 106 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

No Brasil, os cânceres de cólon e de reto são considerados as neoplasias gastrintestinais mais comumente observadas na população. Nos últimos anos vêm se relatando na literatura nacional e internacional a possível relação da presença de microrganismos com o desenvolvimento de câncer; entretanto, ainda não se observam evidências científicas convincentes dessa interação. Este estudo teve como objetivo determinar a presença e participação dos diferentes patótipos de *Escherichia coli* em pacientes com e sem câncer de reto. Foram coletadas amostras fecais de pacientes com neoplasia de reto, e de indivíduos sadios sem sinais de câncer (pólipos e/ou tumor), usadas como controle. Uma porção fecal foi semeada em ágar MacConkey isolando-se aleatoriamente quatro colônias de cada amostra. A identificação em nível de espécie, e dos patótipos, assim como dos fatores de virulência das cepas extra-intestinais de *E. coli* foi realizada por PCR convencional. Para a caracterização molecular das *E. coli* foi usada a técnica de ERIC-PCR. Os pacientes com neoplasia de reto apresentaram idade média de 63 anos de idade ( $P < 0,001$ ). Nos pacientes com câncer de reto, a ocorrência de *E. coli* extra-intestinal (ExPEC; 53 cepas, 44,1%) foi menor do que as cepas de *E. coli* diarreiogênicas (DEC; 59 cepas, 49,2%). A presença de *E. coli* enteroagregativa típica (tEAEC) foi observada em 44,1% das cepas DEC (59 cepas) isoladas de amostras fecais de pacientes com câncer de reto e em 12,9% das cepas DEC isoladas dos indivíduos sadios (31 cepas) ( $P = 0,003$ ); entretanto, as *E. coli* enteropatogênicas atípicas (aEPEC) foram isoladas em ambos os grupos de pacientes (câncer: 22 cepas, 37,3%; sadios: 15 cepas, 48,4%). O gene *afa/dra* da adesina Afa/Dr foi observado em maior prevalência nas ExPEC (35 cepas, 66,0%) isoladas de pacientes com câncer de reto ( $P < 0,001$ ). As cepas de *E. coli* mostraram combinações gênicas que variaram de 2 a 8 genes, observando-se 39 e 24 combinações gênicas nas cepas de pacientes com câncer de reto e indivíduos sadios, respectivamente. Pelo ERIC-PCR observou-se elevada diversidade genética em todas as cepas, e clusters de cepas clone foram observadas em cepas isoladas do mesmo paciente. Foi observada a presença dos oito filogrupos de *E. coli*, sendo o filogrupo B2 (55,2%) o mais predominante. Os filogrupos D e E não agruparam cepas de indivíduos sadios. Os resultados sugerem maiores estudos para determinar o papel das DEC, particularmente das aEPEC, tEAEC e ExPEC de forma individual ou em associação, avaliando-se o provável sinergismo e/ou a co-infecção de diferentes patótipos nesses processos, assim como sua presença no trato intestinal em pacientes assintomáticos com câncer de reto.

**Palavras-chave:** Câncer de reto. *Escherichia coli*. Patótipos. Fatores de virulência Filogrupos. ERIC-PCR.

## ABSTRACT

CASTRO, R. L. S. **Determination of the main pathotypes of *Escherichia coli* in patients with rectal cancer.** 2017. 106 p. Master thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

In Brazil, colon and rectal cancer are increasing and they are considered the gastrointestinal neoplasia most commonly observed in the population. In recent years, national and international literatures have shown a possible correlation among the presence of microorganisms with the development of cancer; however, no convincing scientific evidence of this interaction has been observed. This study aimed to determine the presence and participation of different pathotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with or without rectal cancer. Fecal samples were collected from patients with rectal cancer and healthy individuals with no signs of cancer (polyps and/or tumor) used as a control. Feces were plated onto agar MacConkey and four strains were randomly selected from each sample. Conventional PCR was used for identification of *E. coli* and pathotypes, as well as to detect virulence genes in extra-intestinal strains. The molecular characterization of *E. coli* was performed by ERIC-PCR. Patients with rectal cancer were mean age of 63 years old ( $P < 0.001$ ). Diarrheogenic *E. coli* (DEC, 59 strains, 49.17%) were more prevalent than extra-intestinal *E. coli* (ExPEC, 53 strains, 44.17%). The presence of tEAEC was observed in 44.1% of the DEC strains (59 strains) isolated from patients with rectal cancer and in 12.9% of the DEC strains isolated from the healthy patients (31 strains) ( $P = 0.003$ ). Atypical enteropathogenic *E. coli* (aEPEC) strains were isolated in both patient groups (cancer: 22 strains, 37.3%; healthy: 15 strains, 48.4%). The gene *afa/dra* for adhesin Afa/Dr was observed in higher prevalence in the ExPEC strains (35 strains, 66.0%) isolated from patients with rectal cancer ( $P < 0.001$ ). *E. coli* strains showed genetic combinations from 2 to 8 genes, showed 39 and 24 genetic combinations in strains from cancer and healthy patients, respectively. All strains showed high genetic diversity by ERIC-PCR, and some clusters grouped clone strains isolated from the same patient. It was observed presence of eight filogroups and B2 filogroup (55.2%) was the most prevalent. Filogroups D and E were absent in strains from healthy. The results suggest further studies to determine the role of DEC, particularly aEPEC, tEAEC, and ExPEC, individually or in combination, and the synergism and co-infection of different pathotypes in these processes, as well as its presence in the intestinal microbiota in asymptomatic patients with rectal cancer.

**Keywords:** Rectal cancer. *Escherichia coli*. Pathotypes. Virulence factors. Phylogroups. ERIC-PCR.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Segmentos intestinais do cólon e reto.....	23
<b>Figura 2</b> - Modelo bacteriano <i>driver-passenger</i> no desenvolvimento do câncer colorretal.....	30
<b>Figura 3</b> - Mecanismos patogênicos de EPEC.....	34
<b>Figura 4</b> - Mecanismos patogênicos de STEC.....	35
<b>Figura 5</b> - Mecanismos patogênicos de EAEC.....	36
<b>Figura 6</b> - Estratégias de infecção de ETEC e EIEC.....	38
<b>Figura 7</b> - Mecanismos patogênicos de DAEC.....	39
<b>Figura 8</b> - Estratégia de infecção de AIEC.....	40
<b>Figura 9</b> - Detecção do gene 16S rRNA para <i>E. coli</i> .....	63
<b>Figura 10</b> - Detecção do gene <i>stx-1</i> na determinação do patótipo STEC...	65
<b>Figura 11</b> - Detecção do patótipo EPEC pela presença do gene <i>eae</i> .....	65
<b>Figura 12</b> - Detecção do patótipo tEAEC pela presença do gene <i>aggR</i> .....	66
<b>Figura 13</b> - Multiplex-PCR na detecção de cepas EAEC.....	66
<b>Figura 14</b> - Adesão de cepas aEAEC em células HEP-2.....	67
<b>Figura 15</b> - Determinação dos filogrupos de <i>E. coli</i> das cepas de pacientes com CR e sadios.....	72

<b>Figura 16</b> - Perfis de ERIC-PCR de 13 cepas de <i>E. coli</i> isoladas de pacientes com câncer de reto e sadios.....	75
<b>Figura 17</b> - Dendrograma mostrando as relações filogenéticas e os filogrupos de 37 cepas de <i>E. coli</i> enteropatogênicas (aEPEC).....	77
<b>Figura 18</b> - Dendrograma mostrando as relações filogenéticas e os filogrupos de 48 cepas típicas e atípicas de <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC).....	78
<b>Figura 19</b> - Dendrograma mostrando as relações filogenéticas e os filogrupos de 90 cepas de <i>E. coli</i> extra-intestinal (ExPEC).....	79

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Genes, sequências oligonucleotídicas e condições de PCR utilizados na identificação dos patótipos de <i>Escherichia coli</i> .....	57
<b>Tabela 2</b> - Genes, sequências oligonucleotídicas e condições de PCR utilizados na identificação de <i>Escherichia coli</i> extra-intestinais (ExPEC)..	58
<b>Tabela 3</b> - Sequências de oligonucleotídeos e tamanho dos produtos usados na identificação dos filogrupos de <i>E. coli</i> .....	59
<b>Tabela 4</b> - Análise dos dados demográficos dos pacientes com câncer de reto e indivíduos saudáveis.....	62
<b>Tabela 5</b> - Distribuição de 192 cepas DEC, ExPEC e comensais de <i>Escherichia coli</i> isoladas de fezes de 30 pacientes com câncer de reto e 18 indivíduos saudáveis.....	63
<b>Tabela 6</b> - Distribuição dos patótipos de 90 <i>Escherichia coli</i> (DEC) isolados de 30 pacientes com câncer de reto (59 cepas) e 18 indivíduos saudáveis (31 cepas).....	64
<b>Tabela 7</b> - Detecção de genes de virulência em 90 cepas ExPEC isoladas de pacientes com câncer de reto e indivíduos saudáveis.....	68
<b>Tabela 8</b> - Combinações gênicas em 53 cepas ExPEC isoladas de pacientes com câncer de reto.....	70
<b>Tabela 9</b> - Combinações gênicas em 37 cepas ExPEC isoladas de indivíduos saudáveis sem câncer.....	71
<b>Tabela 10</b> - Tipificação dos filogrupos das 120 cepas de <i>Escherichia coli</i> isoladas de pacientes com câncer de reto e indivíduos saudáveis.....	73
<b>Tabela 11</b> - Filogrupos de <i>E. coli</i> segundo a classificação de DEC, ExPEC ou comensal das 120 cepas de <i>Escherichia coli</i> isoladas de pacientes com câncer de reto e indivíduos saudáveis.....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CCR = Câncer colorretal
- Apc* = gene adenomatous polyposis coli
- tp53* = gene *Tumor protein 53* supressor de tumor
- INCA = Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
- CR = Câncer de reto
- DEC = *E. coli* diarreogênicas
- ExPEC= *E. coli* extra-intestinais
- EPEC = *E. coli* enteropatogênica
- ETEC = *E. coli* enterotoxigênica
- EAEC = *E. coli* enteroagregativa
- EIEC = *E. coli* enteroinvasiva
- ADEC = *E. coli* com aderência difusa
- EHEC = *E. coli* enterohemorrágica
- AIEC = *E. coli* aderente invasiva
- PCR = Reação em cadeia da polimerase
- ERIC-PCR = Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR
- pH = Potencial hidrogênio
- 16S rRNA = sub unidade 16S do ácido ribonucléico ribossomal
- DNA = Ácido desoxirribonucléico
- IL-17 = Interleucina-17
- pks* = gene de colibactina
- cnf* = gene do fator necrotizante citotóxico
- cdt* = gene da toxina distensora citoletal
- CEACAM = Molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcino-embrionário
- CD = Doença de Crohn
- IL-10 = Interleucina-10
- HEp-2 = cepa 2 de células de carcinoma epidermóide humano
- CIF = Fator de inibição do ciclo celular
- EspF = Proteína efetora de EPEC, requerida para iniciar morte mitocondrial
- afaC = adesina afimbrial
- lpfA = longo polar fimbrial

*htrA* = gene da protease periplasmática contra estresse  
*dsbA* = gene da oxido-reductase para ompF  
tEPEC = EPEC típicas  
aEPEC = EPEC atípicas  
A/E = lesão “attaching and effacing”  
BFP = bundle forming pilus  
T3SS = sistema de secreção tipo 3  
LEE = locus enterocyte effacement  
*Eae* = proteína intimina  
Tir = receptor da intimina  
Stx1 = Toxina Shiga tipo 1  
Stx2 = Toxina Shiga tipo 2  
SHU = Síndrome urémico hemolítico  
HCT-116 = Linhagem celular de câncer de cólon humano  
*aggR* = gene regulador de transcrição de EAEC  
pAA = plasmídeo de aderência agregativa  
AAF = fímbrias de aderência agregativa  
AA = Aderência agregativa  
EAST-1 = Enterotoxina termoestável de EAEC  
GMPc = guanidina monofosfato cíclico  
SPATEs = Serine proteases auto-transportadoras de *Enterobacteriaceae*  
Pic = Protein involved in intestinal colonization  
Pet = Plasmid-encoded toxin  
CFA = Antígeno de fatores de colonização de ETEC  
ST = Enterotoxina termostável  
LT = Enterotoxina termolábil  
pINV = Plasmídeo de virulência para invasividade  
DAF = Receptor Decay accelerating factor para DAEC  
PMN = Neutrófilos polimorfonucleares  
IL-8 = Interleucina-8  
Sat = Secreted autotransporter toxin  
TNF- $\alpha$  = Fator de necrose tumoral alfa  
ITU = Infecção do trato urinário



NMEC = *E. coli* produtora de meningite neonatal

LPS = lipopolissacarídeo

PAIs = Ilhas de patogenicidade

*papA* = gene da subunidade estrutural da fímbria P

*papC* = gene da subunidade para montagem da fímbria P

*sfa/foc* = genes das sub-unidades da fímbria S e F1C

*afa/dra* = genes das adesinas de ligação ao antígeno do grupo sanguíneo Dr

*kpsM7II* = gene das unidades polissacarídicas da cápsula tipo 2

*iutA* = gene do sideróforo aerobactina

*ibeA* = gene da toxina de invasão do epitélio cerebrovascular

*hlyA* = gene da hemolisina alfa

Caco-2 = Linhagem celular de adenocarcinoma colorrectal

Rho GTPases = Proteínas da superfamília Ras

PAI-II = Ilha de patogenicidade II

PPTase = Fosfopanteteinil transferase

MLST = Multilocus sequence typing

PFGE = Pulsed Field Gel Electrophoresis

RAPD = Random Amplification of Polimorphic DNA

bp = pares de bases

ICESP = Instituto do Câncer do Estado de São Paulo

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	22
<b>2.1 Geral</b> .....	22
<b>2.2 Específicos</b> .....	22
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	23
<b>3.1 Câncer de Reto</b> .....	23
3.1.1 <i>Incidência na população</i> .....	24
3.1.2 <i>Fatores predisponentes</i> .....	25
<b>3.2 Microbiota residente intestinal e fecal</b> .....	26
3.2.1 <i>Microbiota intestinal na saúde</i> .....	26
3.2.2 <i>Microbiota intestinal no câncer de cólon e/ou reto</i> .....	27
3.2.3 <i>Escherichia coli e o Câncer colorretal</i> .....	30
<b>3.3 Cepas de <i>Escherichia coli</i></b> .....	32
3.3.1 <i>Escherichia coli</i> <i>diarreiogênica (DEC)</i> .....	33
3.3.1.1 <i>Escherichia coli</i> <i>enteropatogênica (EPEC)</i> .....	33
3.3.1.2 <i>Escherichia coli</i> <i>produtora de toxina Shiga (STEC)</i> .....	34
3.3.1.3 <i>Escherichia coli</i> <i>enteroagregativa (EAEC)</i> .....	35
3.3.1.4 <i>Escherichia coli</i> <i>enterotoxigênica (ETEC)</i> .....	36
3.3.1.5 <i>Escherichia coli</i> <i>enteroinvasiva (EIEC)</i> .....	37
3.3.1.6 <i>Escherichia coli</i> <i>difusamente aderente (DAEC)</i> .....	38
3.3.1.7 <i>Escherichia coli</i> <i>aderente invasiva (AIEC)</i> .....	39
3.3.2 <i>Escherichia coli</i> <i>extra-intestinal (ExPEC)</i> .....	40
3.3.3 <i>Fatores de virulência de ExPEC</i> .....	41
3.3.3.1 <i>Adesinas</i> .....	41
3.3.3.1.1 <u>Fímbria P</u> .....	42
3.3.3.1.2 <u>Fímbria S/F1C</u> .....	42
3.3.3.1.3 <u>Adesinas Dr/Afa</u> .....	43
3.3.3.2 <i>Toxinas</i> .....	44
3.3.3.2.1 <u>Toxina de invasão do endotélio cerebral</u> .....	44
3.3.3.2.2 <u>Hemolisina alfa</u> .....	45

3.3.3.2.3	<u>Fator de necrose citotóxico (CNF1)</u> .....	45
3.3.3.2.4	<u>Colibactina (PKS)</u> .....	46
3.3.3.3	Sideróforo aerobactina.....	47
3.3.3.4	Cápsula polissacarídica.....	48
3.3.4	<i>Filogrupos de E. coli</i> .....	48
3.3.5	<b>Variabilidade genética e ERIC-PCR</b> .....	50
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	52
4.1	<b>Pacientes</b> .....	52
4.2	<b>Coletas das amostras clínicas</b> .....	52
4.3	<b>Isolamento e identificação de cepas de <i>Escherichia coli</i> comensais, diarreio gênicas e extra-intestinais</b> .....	52
4.3.1	<i>Extração de DNA total bacteriano</i> .....	53
4.3.2	<i>Determinação dos patótipos de E. coli</i> .....	53
4.3.3	<i>Teste de adesão em células HEp-2</i> .....	54
4.4	<b>Tipagem molecular de <i>Escherichia coli</i> por ERIC-PCR</b> .....	55
4.5	<b>Determinação dos Filogrupos</b> .....	55
4.6	<b>Análises estatísticas</b> .....	56
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	62
5.1	<b>Pacientes</b> .....	62
5.2	<b>Identificação das cepas de <i>Escherichia coli</i></b> .....	62
5.3	<b>Classificação das <i>E. coli</i> diarreio gênicas (DEC)</b> .....	64
5.4	<b>Determinação de <i>E. coli</i> extra-intestinal (ExPEC)</b> .....	67
5.5	<b>Tipificação dos filogrupos de <i>E. coli</i></b> .....	72
5.6	<b>Tipificação molecular de <i>E. coli</i> por ERIC-PCR</b> .....	75
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	80
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	88
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	89
	<b>ANEXOS</b>	
<b>A</b>	<b>- Questionário demográfico e características clínicas</b> .....	102
<b>B</b>	<b>- Detecção dos nove genes avaliados para a identificação de fatores de virulência das <i>E. coli</i>. Figuras 20-28</b> .....	103
<b>C</b>	<b>- Detecção da associação dos genes <i>cnf-1</i> e <i>hly</i></b> .....	106

## 1 INTRODUÇÃO

Bactérias pertencentes à microbiota residente intestinal humana participam de diversos processos infecciosos, cujo papel tem despertado o interesse de microbiologistas e clínicos visando-se obter melhor conhecimento da etiologia e desenvolvimento dos diferentes processos em que participam, incluindo os vários tipos de câncer que acometem o ser humano.

O câncer intestinal mais conhecido é o colorretal (CCR). Esta patologia é observada em maior frequência em populações de países ocidentais. O CCR afeta a população de países desenvolvidos e em desenvolvimento, aparecendo aproximadamente um milhão de casos por ano, distribuídos em 550.000 homens e 470.000 mulheres. A incidência é variada em diferentes partes do mundo, devido às variações genéticas, populacionais, hábitos dietéticos e ambientais (ARVELO; SOJO; COTTE, 2015).

A principal característica no CCR é o aparecimento dos adenomas ou pólipos, que podem ser malignos. Aproximadamente 70% das mutações precoces se originam no gene *adenomatous polyposis coli(apc)* (BRENNER; KLOOR; POX, 2014). Entretanto, para a sua progressão é necessário que ocorra uma série de mutações adicionais no gene *Tumor protein 53* supressor de tumor (*tp53*) e do oncogene *Kirstein rat sarcoma(k-ras)* (KHEIRELSEID; MILLER; JERIN, 2013).

No Brasil, o CCR é o quarto tumor maligno mais frequente em homens (12.490 novos casos por ano) e o terceiro em mulheres (14.500 novos casos por ano), sendo observado entre 50 a 70 anos de idade; entretanto, esse risco aumenta a partir dos 40 anos (BEDANI; ROSSI, 2009). Em 2015, o número de casos de câncer de cólon e/ou reto no Brasil alcançou a marca aproximada de 33 mil, com um risco estimado de 17 novos casos a cada 100 mil homens e a cada 100 mil mulheres (FACINA, 2014). Para o ano 2016, foi de 16.660 homens e de 17.620 mulheres (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, INCA, 2016).

Dentre os cânceres intestinais, o câncer de reto (CR) constitui-se o segundo (28%) tipo mais frequentemente observado no intestino grosso, depois do câncer proximal (42%) (LI; LAI, 2009; SIEGEL; DESANTIS; JEMAL, 2014). Estudos epidemiológicos consideram esses tipos de câncer como uma única entidade clínica, sendo denominado de câncer colorretal (FAZELI; KERAMATI, 2015; Li; LAI, 2009).

Alguns fatores abióticos estão relacionados ao desenvolvimento do câncer de cólon e/o reto. Entre eles podem ser mencionados as características genéticas, idade, hábitos alimentares, obesidade, consumo de álcool e fumo, sedentarismo e inflamação crônica do trato intestinal (ARVELO; SOJO; COTTE, 2015; COMPARE; NARDONE, 2014; LABIANCA et al., 2010).

Dos fatores que estariam relacionados ao desenvolvimento do carcinoma intestinal podemos mencionar também a microbiota. A microbiota residente intestinal desempenha função importante na homeostase e equilíbrio desse ecossistema. Entretanto, em casos de desequilíbrio ou disbiose da microbiota, podem ser observadas mudanças metabólicas microbianas. (AHN et al., 2013; ARTHUR et al., 2012; KEKU et al., 2015; NEISCH, 2009). Estudos mais recentes têm mostrado a participação de alguns microrganismos denominados de patobiontes, onde sua proliferação no ecossistema intestinal produziria a diminuição da função protetora da microbiota residente (WU et al., 2013, ZACKULAR et al., 2015). Dentre esses microrganismos patobiontes são destacadas as espécies toxigênicas de *Bacteroides fragilis* e *Clostridium perfringens* (LEUNG; TSOI; YU, 2014; TOPRAK et al., 2006).

Outro grupo bacteriano intestinal com enorme participação na homeostase intestinal, é constituído pela *Escherichia coli* e seus diferentes patótipos, que podem se apresentar como agentes etiológicos em vários processos infecciosos, extra e intra-intestinais; essas bactérias têm sido também relacionadas ao câncer colorretal (ARTHUR et al., 2014; BUC et al., 2013; SWIDSINSKI et al., 1998). Estudos fenotípicos, genotípicos e epidemiológicos têm mostrado que cepas de *E. coli* são classificadas em diferentes patótipos, devido à presença de genes que codificam a produção de fatores de virulência, sendo agrupadas em *E. coli* diarreogênicas (DEC) e *E. coli* extra-intestinais (ExPEC). Cepas com a ausência desses genes são consideradas não patogênicas ou comensais (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Também, mediante o uso da técnica de Multilocus Sequence Typing (MLST), as *E. coli* são divididas em quatro grupos filogenéticos (A, B1, B2 e D). Membros pertencentes aos filogrupos A e B1 são, geralmente, não patogênicos; enquanto que, os filogrupos B2 e D estão envolvidos em infecções extra e intra-intestinais, incluindo a doença de Crohn e a doença intestinal inflamatória crônica, considerada

como principal fator de risco para o câncer colorretal (BOUDEAU et al., 1999; CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000).

Em nível mundial, as cepas DEC são consideradas importantes na diarreia endêmica e epidêmica, sendo classificadas em seis patótipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* com aderência difusa (ADEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (NATARO; KAPER, 1998). Darfeuille-Michaud et al (1998) relataram que a cepa *E. coli* aderente invasiva (AIEC) está fortemente associada às doenças inflamatórias intestinais, como a doença de Crohn; e mais recentemente foi informado que essa cepa está também relacionada com o CCR (ARTHUR et al., 2012; RAISCH et al., 2014). Estudos relacionando os diferentes patótipos de *E. coli* com o câncer de cólon e/o reto ainda são escassos na literatura.

Nas últimas décadas, com o desenvolvimento de técnicas moleculares para a detecção, identificação e caracterização de bactérias patogênicas, o diagnóstico de doenças infecciosas tem se tornado mais rápido e eficiente. O aprimoramento da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem permitido classificar de forma mais eficiente os grupos microbianos com elevada similaridade genética. O método *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR* (ERIC-PCR) tem sido muito utilizado na determinação de sequências nucleotídicas pequenas, repetidas e dispersas no genoma bacteriano, e na análise filogenética de enterobactérias (ATEBA; MBEWE, 2014; VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991).

Tendo em vista a diversidade bacteriana encontrada no trato intestinal, assim como nos diversos processos infecciosos que ocorrem nesse ecossistema, e nos diferentes tipos de câncer, especialmente de cólon e reto, este estudo certamente fornecerá dados microbiológicos de interesse clínico para estabelecer estratégias para o melhor diagnóstico e tratamento desse tipo de carcinoma intestinal que tanto acomete à população mundial.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Determinar a presença e participação dos diferentes patótipos de *Escherichia coli* em pacientes com e sem câncer de reto.

### **2.2 Objetivos Específicos**

1. Isolar e identificar cepas de *Escherichia coli* de material fecal de pacientes com e sem câncer de reto;
2. Determinar a presença dos diferentes patótipos das *E. coli* isoladas, diarreogênicas, extra-intestinais e comensais;
3. Caracterizar molecularmente as cepas isoladas pela técnica ERIC-PCR; e
4. Tipificar os respectivos filogrupos das cepas de *E. coli* isoladas.

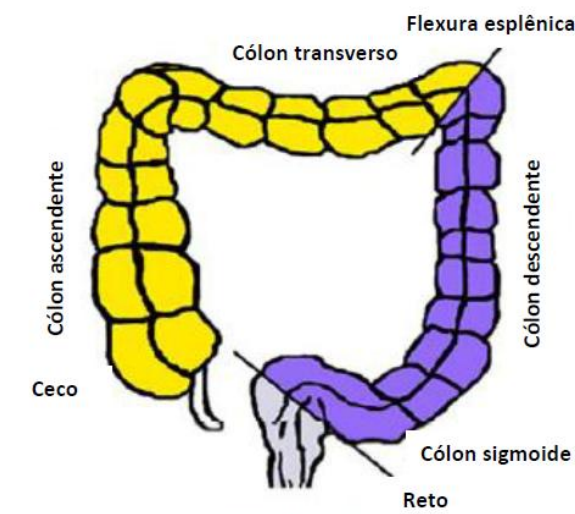
### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Câncer de Reto

O câncer retal é um dos tipos de câncer mais frequentes que acometem humanos, e é o segundo mais comum que ocorre no intestino grosso. Do ponto de vista anatômico e embrionário, os cânceres de cólon e de reto têm características distintas. O cólon (proximal e distal) está localizado na cavidade peritoneal e se origina no intestino médio. O reto está localizado dentro da pélvis originando-se no intestino posterior, entre o cólon sigmóide e o canal anal (Figura 1) (FAZELI; KERAMATI, 2015; LI; LAI, 2009).

Essas duas porções intestinais possuem funções diferentes. O reto está exposto ao material fecal mais concentrado com níveis de pH entre 6 a 8, diferentemente do cólon(5,5 a 7,5) (BOOIJINK et al., 2007; FAZELI; KERAMATI, 2015). As diferenças de pH, ao lado de outros fatores, podem levar ao aparecimento de tumores. Os tumores originados ao lado direito do colón são classificados como tumores do ceco, de cólon ascendente e de cólon transversal. Os que se formam ao lado esquerdo são classificados como tumores de cólon descendente, sigmóide e retal (Figura 1) (LI; LAI, 2009).

**Figura 1** - Segmentos intestinais do cólon e reto, segundo Li e Lai (2009)



A principal característica do câncer de cólon ou reto é o aparecimento de adenomas, os quais podem ser ou não malignos, podendo progredir até carcinomas,



com características malignas como a invasão de tecidos e metástase. Entretanto, do ponto de vista molecular, é possível que ocorram mutações precoces no gene *apc* (BRENNER; KLOOR; POX, 2014) e outras adicionais no gene *tp53* supressor de tumor, e do oncogene *k-ras*, os quais são de importância clínica (KHEIRELSEID; MILLER; JERIN, 2013).

Processos de câncer de reto geralmente são abordados associados aos do câncer de cólon, sendo comumente denominado de câncer colorretal (CCR), embora seja importante a correta identificação (FAZELI; KERAMATI, 2015; LI; LAI, 2009).

### 3.1.1 Incidência na população

Na ordem de incidência, ambos os tipos de câncer, de cólon proximal e de reto, constituem mais de 50% do denominado câncer colorretal (LI; LAI, 2009; SIEGEL; DESANTIS; JEMAL, 2014). A literatura mundial mostra que este tipo de tumor é observado em menor frequência em mulheres (24% da população) sendo maior em homens (31%) (SIEGEL; DE SANTIS; JEMAL, 2014; WU et al., 2004).

A incidência do CCR no mundo é muito variada. Em países desenvolvidos, ele ocorre por volta de 55% e tem sido observada em maior incidência na Austrália e Nova Zelândia (32,2% em homens e mulheres). Já na região baixa ao Oeste da África ocorre em 4,5 % dos homens e 3,8% das mulheres (FAZELI; KERAMATI, 2015; FERLAY et al., 2015).

No estudo realizado por Brenner, Kloor e Pox (2014), relata-se que nos Estados Unidos e em outros países desenvolvidos, a incidência de CCR tem se estabilizado, diminuindo em alguns casos, devido particularmente às políticas de Saúde, incentivando a detecção precoce desta doença. De forma contrária, nos últimos 10 anos a incidência e mortalidade deste câncer vêm aumentando nos países em desenvolvimento, particularmente, no Leste europeu, Ásia e América do Sul (ARNOLD et al., 2016). Segundo Favoriti et al. (2016), o aumento deste tipo de câncer se deve à expectativa de vida aumentada na população, à adoção de condutas alimentares e estilo de vida ocidentais.

Em nível mundial, este carcinoma é a quarta causa mais comum de mortalidade em homens e a terceira em mulheres (FAVORITI et al., 2016; FERLAY

et al. 2015). A mortalidade aumenta (52%) em regiões menos desenvolvidas, onde há uma séria deficiência no prognóstico, como é observado, por exemplo, na Costa Rica, Colômbia, Brasil (ARNOLD et al., 2016; FERLAY et al., 2015), e em áreas da China (BRENNER; KLOOR; POX, 2014). No Brasil, como mencionado anteriormente, as estimativas de ocorrência destes carcinomas vem aumentando de forma alarmante (INCA, 2016).

### 3.1.2 Fatores predisponentes

São vários os fatores que podem influenciar no desenvolvimento do câncer de cólon e/ou reto. É sabido que esses carcinomas se desenvolvem principalmente em indivíduos com predisposição genética ou adquirida, e em resposta à exposição aos fatores ambientais (BRENNER; KLOOR; POX, 2014; WATSON; COLLINS, 2011).

Este câncer não é comumente observado em pessoas com idade  $\leq 40$  anos, mas o risco aumenta a partir dos 40 a 50 anos (BEDANI; ROSSI, 2009; FAVORITI et al., 2016; WU et al., 2004). No estudo realizado por Fazeli e Keramati (2015), se relata o número elevado de câncer de reto em adultos maiores de 65 anos de idade, e baixa proporção em adultos entre 40 e 50 anos de idade.

Estudos epidemiológicos têm mostrado que a falta de atividade física (ARNOLD et al., 2016; LABIANCA et al., 2010), doença inflamatória intestinal (JESS; RUNGOE; PEYRIN-BIROULET, 2012), tabagismo (LIANG; CHEN; GIOVANNUCCI, 2009), excessivo consumo de álcool e carne vermelha (CHAN et al., 2011), obesidade (MA et al., 2013) e diabetes (JIANG et al., 2011), são fatores predisponentes para o desenvolvimento de câncer de reto, especialmente, em homens (FEDIRKO et al., 2011).

Estudos recentes mostram que a composição da microbiota intestinal poderia estar relacionada ao desenvolvimento de CCR ou CR. A disbiose intestinal com microrganismos pró-carcinogênicos contribuem para a inflamação intestinal exacerbada e desenvolvimento de carcinomas (COLEMAN; NUNES, 2016; WANG et al. 2012; WU et al., 2013; ZACKULAR et al., 2015).

## 3.2 Microbiota intestinal

### 3.2.1 Microbiota intestinal na saúde

A colonização inicial do trato intestinal começa imediatamente após o nascimento, onde os recém-nascidos são expostos a uma complexa população de microrganismos oportunistas derivadas particularmente do trato vaginal, material fecal e pele materna (ADLEBERTH; WOLD, 2009; SEKIROV et al., 2010).

Após o início do estabelecimento da microbiota intestinal, podem ocorrer durante os primeiros anos de vida, mudanças importantes na sua composição, com incremento da diversidade microbiana após os três anos de idade (SEKIROV et al., 2010; YATSUNENKO et al., 2012). A maturação da microbiota é um exemplo de sucessão microbiana, observado pelas mudanças qualitativas e quantitativas até alcançar a comunidade clímax (YATSUNENKO et al., 2012). Neste estágio, é observada a predominância dos Filos *Bacteroides* e *Firmicutes*, e em menor proporção os Filos *Verrucomicrobia*, *Proteobacteria* (ADLEBERTH; WOLD, 2009; PALMER, 2007).

Com a utilização de técnicas moleculares, particularmente, analisando-se regiões do gene 16S rRNA (PCR e o pirosequenciamento), têm sido possível avaliar a diversidade microbiana em amostras fecais de humanos saudáveis, inclusive da mucosa do cólon (COSTELLO et al., 2009; ECKBURG et al., 2005; HOLD et al., 2002; SUAUI et al., 1999; YATSUNENKO et al., 2012). Essas pesquisas têm possibilitado observar que a microbiota intestinal residente é diversa, constituída por bactérias, protozoários, vírus e fungos, sendo denominados organismos comensais, que interagem dinamicamente entre eles e com o hospedeiro (NEISH, 2009).

Dessa população microbiana, as bactérias intestinais atingem níveis, no cólon, de  $10^{11}$  a  $10^{12}$  células/grama de conteúdo luminal (SUAUI et al., 1999). Esses microrganismos realizam funções vitais para o hospedeiro, auxiliando na digestão de alimentos, síntese de vitaminas, maturação do sistema imune e resistência à colonização de microrganismos exógenos (KOSTIC et al., 2013; NEISCH, 2009; NICHOLSON et al., 2012).

No trato gastrintestinal a microbiota é distribuída homogeneamente, de acordo com sua localização (GERRITSEN et al., 2011); assim, se observa no estômago e

duodeno um número de aproximadamente  $10^1 - 10^3$  bactérias, no jejum de  $10^4 - 10^8$  bactérias e no íleo de  $10^{10} - 10^{12}$  bactérias (BOOIJINK et al., 2007; NEISH, 2009; SEKIROV et al., 2010). Em 2005, Eckburg et al. confirmaram que a microbiota intestinal tem uma grande diversidade, assim, a associada à mucosa intestinal é diferente da microbiota fecal. Dentre a microbiota associada ao lúmen intestinal estão os gêneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, Família *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Ruminococcus*; enquanto, *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Enterococcus* estão associados à mucosa intestinal (SEKIROV et al., 2010).

Em adultos e idosos, as taxas mais abundantes no intestino correspondem ao Filo *Bacteroidetes* (57% - 59,8%) quando comparado com *Firmicutes* (35,2% - 40%) (COSTELLO et al., 2009); e dentre os gêneros bacterianos bem caracterizados estão *Bacteroides* (29%- 40,6%), *Alistipes* (17%), *Parabacteroides* (17%), *Faecalibacterium* (6%), *Ruminococcus* (4%), *Roseburia* (3%), e *Bifidobacterium* (0.41%) (CLAESSON et al., 2011).

Outros estudos têm mostrado a presença de outros grupos bacterianos, na mesma faixa etária, como *Clostridium* Clusters IV (56%) e XIV (36%) (ECKBURG et al. 2005; CLAESSON et al., 2011). *Clostridium* Clusters XVI (3%) e XI (2%) estão presentes em menor proporção, embora sua participação na manutenção e proteção do epitélio normal do cólon seja devido à produção de butirato (CLAESSON et al., 2011; HOLD et al., 2002). Espécies de *Candida*, *Lactobacillus*, e Bifidobactérias são comuns em crianças, tais como *B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. infantis* e *B. catenulatum*, *Enterobacteriaceae* e enterococos correspondem a < 1% da microbiota (ADDLEBERTH; WOLD, 2009; ECKBURG et al., 2005).

### 3.2.2 Microbiota intestinal no câncer de cólon e/ou reto

Uma comunidade microbiana é considerada estável quando mantém sua estrutura e funções simbióticas com seu hospedeiro, resistindo às mudanças provocadas por fatores extrínsecos ou intrínsecos (BÄCKHED et al., 2012).

A disbiose da microbiota intestinal pode levar ao super crescimento de microrganismos com potencial patogênico ou patobiótico (WU et al., 2013); ou à

perda de algumas espécies bacterianas, o que afetaria a função protetora da microbiota (ZACKULAR et al., 2015). Essas alterações têm sido reportadas em doenças relacionadas ao câncer de cólon e reto. Em pacientes com doenças inflamatórias intestinais, tais como a Doença de Crohn (CD) e Colite ulcerativa (UC), a microbiota se caracteriza pela pequena representação de membros dos Filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes*; enquanto, os Filos *Proteobacteria* e *Actinobacteria* são mais abundantes (FRANK et al., 2007).

No câncer de cólon ou de reto a microbiota intestinal dos pacientes varia dependendo do estado da doença e da evolução adenoma-carcinoma (SOBHANI, 2011; ZACKULAR et al., 2014), podendo diminuir (AHN et al., 2013) e modificar a diversidade microbiana no lúmen intestinal (CHEN et al., 2012).

Por estudos de metagenômica tem sido determinado que, nas fezes de pacientes com CCR, alguns grupos bacterianos como *Bacteroides* e *Fusobacterium* são mais prevalentes (porcentagem de hospedeiros infectados), enquanto *Enterococcus*, *Escherichia*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Campylobacter* e *Porphyromonas* são os mais abundantes (alto número de bactérias presentes nos pacientes) (AHN et al., 2013; WANG et al., 2012; WU et al., 2013).

Estudos realizados em tecidos cancerígenos de cólon, mostraram a presença de *Firmicutes* e *Fusobacterium* (GAO et al., 2015), *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus*, *Mogibacterium* (CHEN et al., 2012), *Lachnospiraceae* e *Enterobacteriaceae*, com uma menor abundância de *Bacteroides*, *Clostridiales* (ZACKULAR et al., 2014), *Bacteroides* e *Prevotella* (SOBHANI et al., 2011).

Por outro lado, Feng et al. (2015), concluíram que os microrganismos detectados em processos de carcinoma foram observados em maior quantidade na região do reto e cólon sigmóide em relação àqueles observados na região do cólon ascendente e transversal. Essas bactérias seriam *Bacteroides* spp., *Parabacteroides* spp., *Alistipes pudretinis*, *Bilophila wadsworthia*, *Lachnospiraceae bacterium* e *Escherichia coli*. Também, observaram que algumas bactérias orais, particularmente, anaeróbias como, *Fusobacterium* sp, *Pavimonas micra*, *Gemella morbillorum* e *Peptostreptococcus stomatis* mostraram alguma relação com o CCR.

Da mesma forma, Fukugaiti et al. (2015) relataram elevada porcentagem de *Fusobacterium nucleatum* e *C. difficile* em material fecal de pacientes brasileiros com câncer colorretal, sugerindo que esses microrganismos poderiam desempenhar

alguma função na carcinogênese do cólon. Mais recentemente, Castro et al. (2016) relataram a co-infecção sanguínea de *E. coli*, *B. fragilis* e *Enterococcus faecalis*, sugerindo-se que pacientes com CR podem produzir bacteremia com sintomas não específicos ou atípicos.

Bactérias produtoras de butirato, tais como *Roseburia* (*Lachnospiraceae*) e espécies de *Clostridium* estão significativamente diminuídas em processos de CCR (AHN et al., 2013; WANG et al., 2012; WU et al., 2013). O ácido butírico tem a capacidade de inibir o processo inflamatório pela redução do dano oxidativo do ácido desorribonucleico (DNA) induzindo a apoptose, assim como interferindo no crescimento de células tumorais.

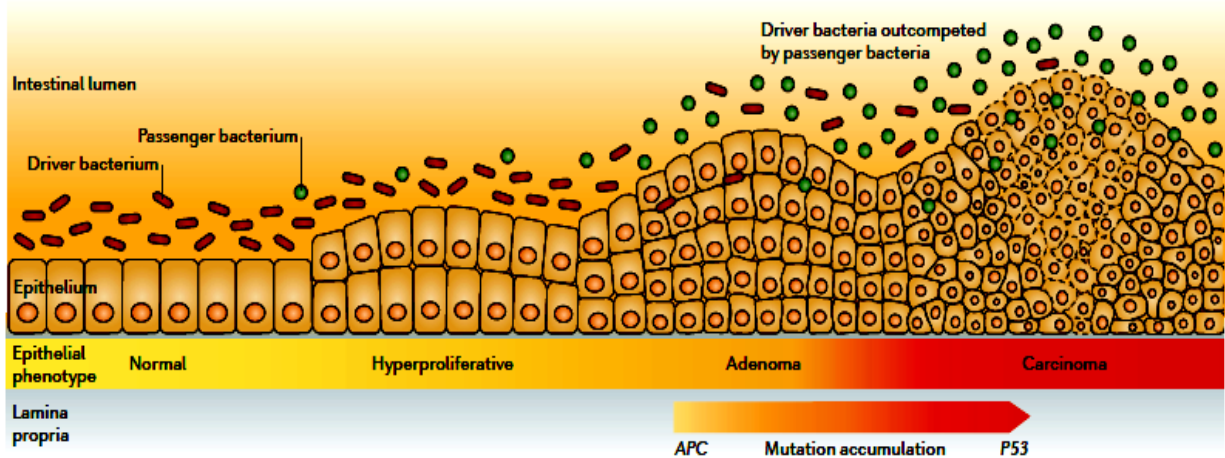
Alguns pesquisadores têm sugerido que a ação da microbiota intestinal envolvida com o câncer de cólon e de reto pode variar segundo a progressão da doença. Assim, Tjalsma et al. (2012) elaboraram um modelo bacteriano denominado *driver-passenger* pelo qual se explicaria o mecanismo bacteriano no início e progressão da carcinogênese (Figura 2).

Bactérias com características carcinogênicas contribuindo com o desenvolvimento inicial do câncer de cólon e de reto são denominadas de *drivers*; e aquelas que colonizam o tecido intestinal sadio e competem com as bactérias *drivers*, são chamadas de *passenger* as quais teriam papel principal nos estágios mais avançados da doença e na formação dos tumores (COLEMAN; NUNES, 2016; TJALSMA et al., 2012).

Dentre as espécies bacterianas consideradas *drivers*, durante os primeiros estágios do CCR, são observadas *B. fragilis* produtoras de metaloprotease e que interagem com células produtoras de IL-17 (SOBHANI et al., 2011; TJALSMA et al., 2012); membros da Família *Enterobacteriaceae*, incluindo *Shigella* spp., *Citrobacter* spp., e *E. coli*, importantes por colonizar a mucosa intestinal, e pela produção de sideróforos (TJALSMA et al., 2012).

É relatado também que, cepas de *E. coli* produzindo a proteína PKS ou colibactina, são capazes de induzir a quebra da dupla hélice de DNA, provocando o aumento das mutações nas células infectadas (ARTHUR et al., 2012; CUEVAS-RAMOS et al., 2010; NOUGAYRÈDE et al., 2006).

**Figura 2 - Modelo bacteriano *driver-passenger* no desenvolvimento do câncer colorretal.** Na colonização da mucosa intestinal as *drivers* causam inflamação, proliferação celular e produção de substâncias genotóxicas que contribuem para a formação de adenoma-carcinoma. Isto facilita a colonização das *passengers* patogênicas ou comensais promovendo ou suprimindo o tumor. (Tjalsma et al., 2012).



### 3.2.1 *Escherichia coli* e o Câncer colorretal

Diversos estudos demonstram a associação de *E. coli* com doenças produzidas no trato intestinal, especialmente com o câncer colorretal. Swidsinsky et al. (1998), analisando biopsias de adenomas, carcinoma colorretal e tecido sadio, mostraram a maior presença de *E. coli* em concentrações de  $10^3$ - $10^5$  UFC/ $\mu$ L em adenomas e carcinoma, que nos controle. Foi sugerido que as elevadas concentrações bacterianas seriam favorecidas pela resposta imune da mucosa intestinal e expressão anormal de antígenos de superfície nos pacientes com CCR, o que promoveria a adesão e colonização bacteriana antes do desenvolvimento do carcinoma, seguindo-se o modelo *driver-passenger* explicado anteriormente.

Estudos comparativos têm mostrado que *E. coli* estaria presente em maior concentração em amostras de CCR do que em tecidos sadios (ARTHUR et al., 2012), em câncer de cólon do que em diverticulite (BUC et al., 2013) e seriam

predominantemente associados ao filogruppo B2 (JIN et al. 2016; RAISCH et al., 2014). Buc et al. (2013), concluíram que em amostras de câncer colorretal predomina um tipo genético de *E. coli*, que coloniza tumores do cólon distal.

Cepas de *E. coli* associadas ao CCR apresentam genes *pks* (colibactina), *cnf* (fator necrotizante citotóxico) e *cdt* (toxina distensora citoletal) que expressam a produção de ciclomodulinas, o qual favoreceria a colonização e inflamação nas células de cólon distal (ARTHUR et al., 2012; BUC et al., 2013; RAISCH et al, 2014). A adesão bacteriana estaria associada à expressão de moléculas relacionadas ao CEACAM (Molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembrionário), facilitando a formação de biofilme, o que ocorre na cepa protótipo LF82 da doença de Crohn (RAISCH et al., 2014).

Pesquisas realizadas em camundongos deficientes de IL-10 tratados com azoximetano revelaram que a inflamação está associada às espécies dos Filos *Proteobacterias*, *Bacteroidetes* e *Verrucomicrobia*, promovendo-se com isto, a abundância de *E. coli* na microbiota luminal, favorecendo assim, a progressão da inflamação e tumorigênese (ARTHUR et al., 2012; ARTHUR et al., 2014). Nos casos de CCR, as bactérias precisam de fatores específicos, como o gene *pks*, que participa danificando o DNA (ARTHUR; JOBIN, 2013). Entretanto, esse aumento de *E. coli* diminui com o decorrer do tempo à medida que a inflamação aumenta, observando-se aumento dos Filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* (ARTHUR et al., 2014).

Tem sido relatado que *E. coli* aderente invasiva (AIEC) está associada com a doença inflamatória intestinal e câncer colorretal, e estaria relacionada geneticamente com as ExPEC dos grupos filogenéticos B2 e D, devido a que não exhibe padrão de aderência difusa em células HEP-2 nem genes associados à patogenicidade, como as DEC (ARTHUR et al., 2012; BRONOWSKY et al, 2008; VEJBORG et al., 2011).

Embora as pesquisas não relacionem diretamente a presença das DEC com o desenvolvimento do CCR, Buc et al. (2013), reportaram que cepas isoladas de CCR que expressam a CIF (fator de inibição do ciclo celular), pertenceriam ao patótipo EPEC. Da mesma forma, Maddocks et al. (2009), reportaram que a infecção crônica produzida por EPEC em adultos assintomáticos promoveria a tumorigênese no trato intestinal. Isto seria possível devido à expressão bacteriana de efetores protéicos (EspF) que diminuem a expressão das proteínas de reparo de DNA, aumentando a



frequência de mutações na célula hospedeira (MADDOCKS; SCANLON; DONNENBERG, 2013).

Recentemente, MAGDY et al. (2015) mostraram a presença de tEPEC possuindo os genes *eae* e *bfp* em todos os 108 pacientes com câncer de cólon e em 51 dos 248 pacientes sem câncer, sugerindo que a colonização intestinal por estas cepas poderia ser uma das causas do câncer colorretal.

Prorok-Hamon et al. (2014), identificaram que cepas de *E. coli* isoladas de CCR eram capazes de expressar a produção de fímbrias *afaC* e *lpfA*, sendo importantes na adesão celular e translocação nas células M, respectivamente. Mostraram também que, cepas do patótipo DAEC expressavam *pks*, sendo capazes de aderir e invadir linhagens celulares e de possuir os genes *htrA* e *dsbA*, que mediam a produção de proteínas ativadas em condições de estresse, para a sobrevivência bacteriana no interior de macrófagos, de forma similar às cepas AIEC.

### 3.3 Cepas de *Escherichia coli*

Entre os microrganismos relacionados ao câncer intestinal se destaca *Escherichia coli* que forma parte da microbiota residente intestinal. Taxonomicamente, pertence ao Filo *Proteobacteria*, Família *Enterobacteriaceae*. Agrupa bactérias facultativas, móveis ou imóveis e crescem a 37 °C (ARTHUR et al., 2014; BERGEY'S , 2005; CROXEN et al., 2013). Esta bactéria comensal participa da homeostase intestinal, e sua patogenicidade está relacionada à presença de genes associados a elementos genéticos móveis que codificam a produção de fatores de virulência, que podem ser transferidos entre espécies mediante a transferência horizontal de genes (CROXEN et al., 2013; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Cepas de *E. coli* podem ser agrupadas em três grupos: (1) organismos comensais do trato gastrointestinal e que não causam doença; (2) cepas que causam doenças intestinais diarreicas (*E. coli* diarreogênicas, DEC); e (3) cepas que geralmente causam doenças extra-intestinais (ExPEC) (CROXEN et al., 2013; JOHNSON; RUSSO, 2002).

### 3.3.1 *Escherichia coli* diarreiogênica (DEC)

Este grupo contém aquelas cepas que causam diarreia em crianças e adultos, sendo agrupadas pelos fatores de virulência e mecanismos de patogenicidade que produzem. São classificadas em seis patótipos (*E. coli* enteropatogênica-EPEC, *E. coli* enterotoxigênica-ETEC, *E. coli* enterohemorrágica-EHEC, *E. coli* enteroagregativa-EAEC, *E. coli* enteroinvasiva-EIEC e *E. coli* difusamente aderente-DAEC) (CROXEN et al., 2013; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004); sendo adicionadas a *E. coli* enteroagregativa hemorrágica (EAHEC) e *E. coli* aderente invasiva (AIEC). A classificação em sorotipos está baseada na identificação do antígeno somático O e o antígeno flagelar H, existindo 174 tipos de *E. coli* O, e 53 tipos de *E. coli* H; porém um pequeno grupo de combinações O:H são patogênicas (CROXEN et al., 2013).

#### 3.3.1.1 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

Consideradas como agente causador da diarreia endêmica especialmente em crianças menores de cinco anos de idade (SANCHEZ et al., 2006), e em países em desenvolvimento está associada com a elevada mortalidade (10-40%) (FARFAN-GARCIA et al., 2016). Devido à presença ou ausência do plasmídeo de fator de aderência de EPEC (EAF), estas cepas são classificadas como EPEC típicas (tEPEC) e EPEC atípicas (aEPEC) (KAPER; NATARO E MOBLEY, 2004; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

A caracterização das EPEC torna-se importante já que essas bactérias têm sido observadas em números aumentados em crianças assintomáticas e sintomáticas (SHETTY et al., 2012). No Brasil, estudos epidemiológicos mostram a frequência de aEPEC em pacientes sintomáticos (8,3%) e assintomáticos (11,7%), com declínio de cepas tEPEC. Assim sugere-se que a aEPEC pode ser considerada um patógeno emergente (BENEVIDES-MATOS et al., 2015; BUERIS et al., 2007; LOZER et al., 2013).

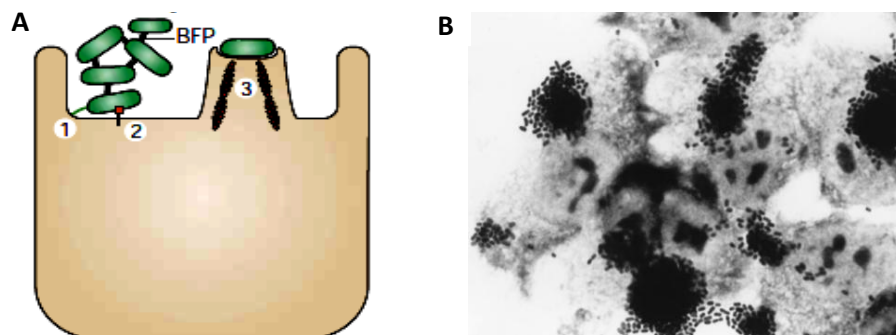
O quadro diarreico originado por EPEC está relacionado à lesão *attaching and effacing* (A/E), que elimina o borde ciliar e a formação de pedestais nas células

epiteliais intestinais (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Na Figura 3, observam-se os mecanismos patogênicos produzidos por essas bactérias.

A Figura 3A, representa a adesão inicial da bactéria com o enterócito, por meio do pili tipo IV (*bundle forming pilus*, BFP). A auto-agregação das bactérias gera a formação de micro-colônias, produzindo a característica aderência localizada nas tEPEC (Figura 3B). A translocação das proteínas efetoras, e a íntima ligação com os enterócitos, são facilitados pelo sistema de secreção tipo 3 (T3SS) codificado pelo *locus enterocyte effacement* (LEE).

A proteína intimina (codificada pelo gene *eae*) se liga ao receptor Tir, participando ao lado das proteínas efetoras (Map, EspF, Esp B, EspG, EspH, EspZ), na polimerização dos filamentos de actina para a formação dos pedestais e alteração da fisiologia do enterócito (Figura 4B). A alteração da morfologia do citoesqueleto danifica as microvilosidades, perdendo sua função (CROXEN et al., 2013; NATARO; KAPER, 1998), desenvolvendo conseqüentemente a diarreia.

**Figura 3 - Mecanismos patogênicos de EPEC.** A) Formação da lesão A/E (Kaper et al., 2004);  
B) Aderência localizada de tEPEC em células Hep-2 (Nataro e Kaper, 1998).



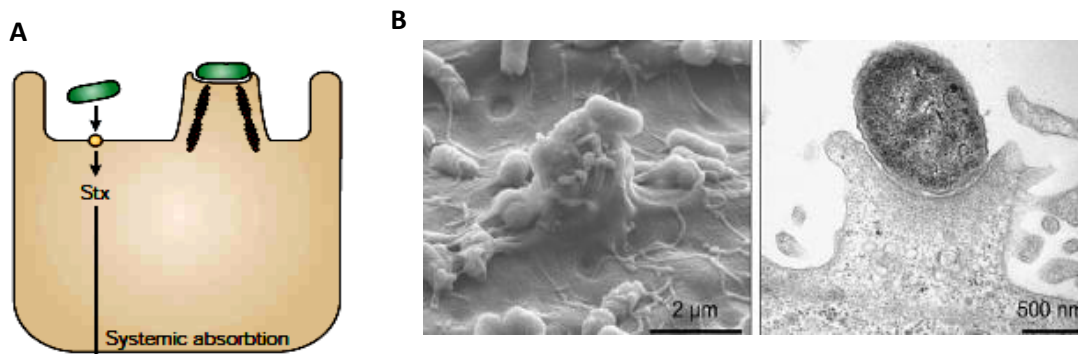
### 3.3.1.2 *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC) ou *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)

STEC ou *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) é considerado um patógeno importante na Saúde Pública, que causa dor abdominal, diarreia com sangue e febre. Este patógeno pode possuir ou não o LEE, causando uma lesão A/E similar às cepas EPEC (Figura 4). Caracteriza-se pela produção de uma ou mais toxinas Shiga (STX, subgrupos Stx-1 e Stx-2). Entretanto, cepas STEC que não possuem o

LEE são consideradas agentes etiológicos da Síndrome urêmica hemolítica (SHU) (CROXEN et al., 2013; KAPER, NATARO; MOBLEY, 2004; SCHMIDT, 2010).

A toxina Shiga-1 (STX-1) produz toxicidade nas células intestinais e no epitélio glomerular, bloqueando a progressão da fase S na linhagem celular HCT-116 de câncer de cólon humano (BHATTACHARJEE et al., 2005). Seu mecanismo de ação ainda não está totalmente esclarecido, sendo sugerido que produza dano irreversível no DNA das células cancerígenas.

**Figura 4 - Mecanismos patogênicos de STEC.** A) Formação da lesão A/E (Kaper; Nataro e Mobley, 2004); B) Formação de pedestais de EPEC e EHEC em células Hep-2 (Schmidt, 2010).

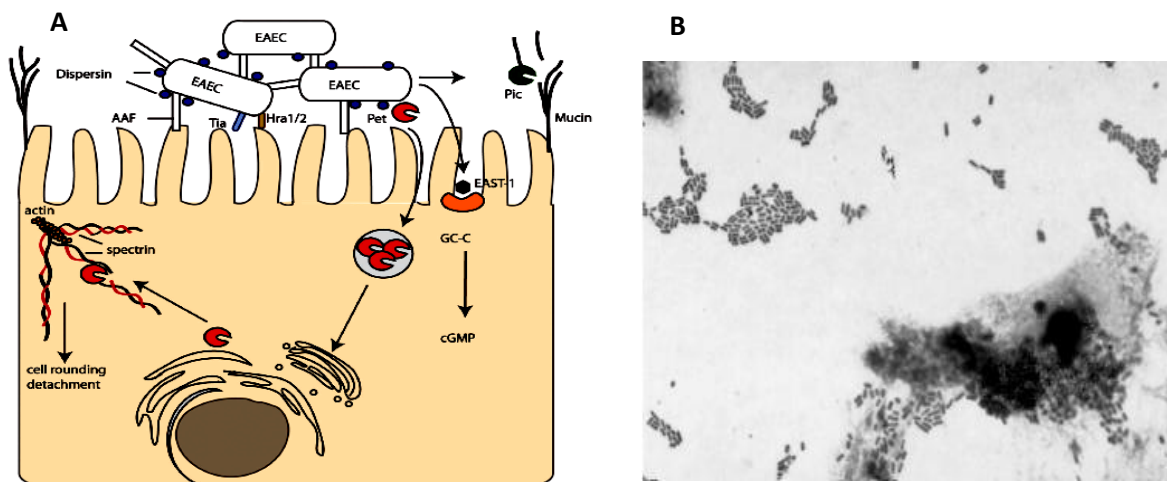


### 3.3.1.3 *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

Em países em desenvolvimento, essa bactéria está associada à diarreia persistente em crianças e adultos. Também, tem sido relacionada à diarreia do viajante e em pacientes infectados com HIV (CROXEN et al., 2013; POOLMAN, 2017). No Brasil, essa bactéria tem sido encontrada em pacientes sintomáticos e assintomáticos, variando de 10,7% a 74%, pelo qual é também reconhecida como patógeno emergente na população afetada (BENEVIDES-MATOS et al., 2015; BUERIS et al., 2007; NUNES et al., 2013). As EAEC segundo a presença do regulador de transcrição *aggR* codificado pelo plasmídeo de aderência agregativa (pAA), podem ser classificadas como EAEC típica (tEAEC) e EAE atípica (aEAEC) (NATARO et al., 1994).

Na figura 5 pode-se observar que a aderência aos enterócitos é favorecida pelas adesinas fimbriais (fímbrias de aderência agregativa-AAF) e afimbriais (geralmente Dr) (CROXEN et al., 2013). Em células HEp-2 o padrão de aderência agregativa (AA) é descrito como tijolos empilhados. O efeito citotóxico é produzido pela enterotoxina termoestável de *E. coli* agregativa (EAST-1), que altera as concentrações de guanidina monofosfato cíclico (GMPc) e por as SPATEs (Serina proteases auto-transportadoras de *Enterobacteriaceae*). Dessas proteases, tem sido observado que, a *Protein involved in intestinal colonization* (Pic) está envolvida na colonização intestinal e na indução de formação de muco pelas células caliciformes; entretanto, a *Plasmid-encoded toxin* (Pet) tem um efeito enterotoxina, causando a quebra da espectrina, desta maneira alterando a morfologia da célula epitelial (arredondamento) (CLEMMENTS et al., 2012; CROXEN et al., 2013; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

**Figura 5 - Mecanismos patogênicos de EAEC.** A) Estratégia de infecção de EAEC (Clements et al., 2012); B) Aderência agregativa em células Hep-2 (Nataro e Kaper, 1998).



#### 3.3.1.4 *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)

Esta bactéria produz casos sintomáticos e assintomáticos de diarreia aguda, causando em alguns casos desidratação. Também, produz processos diarreicos

com produção de muco e/ou sangue em viajantes, principalmente nos países em desenvolvimento (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

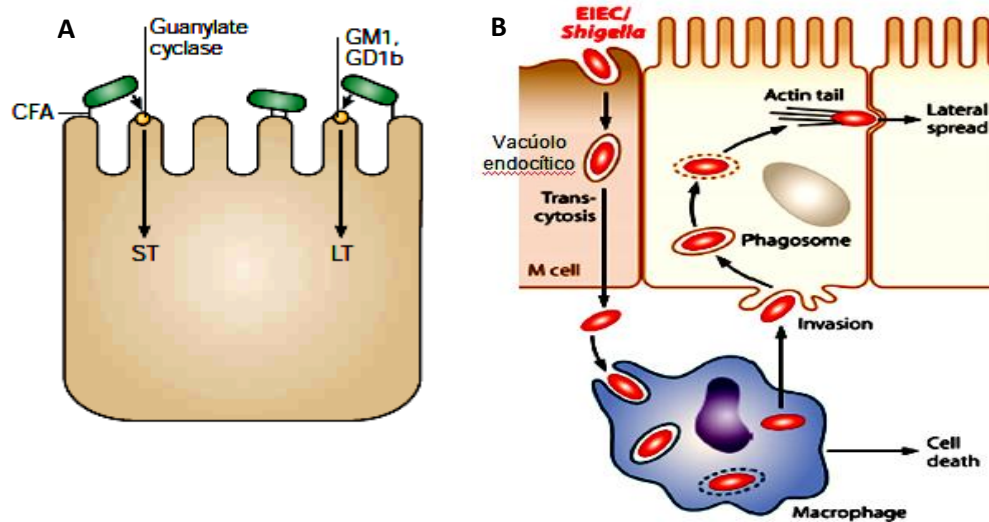
A sua patogenicidade (Figura 6A) está relacionada à aderência aos enterócitos mediante fímbrias (CF-fatores de colonização), denominadas também antígeno de fatores de colonização (CFA). Após a colonização, a bactéria elabora dois tipos de enterotoxinas, termostáveis (ST) e termolábeis (LT), as quais se unem aos receptores de guanilato ciclase ou de gangliósido, respectivamente, para facilitar seu ingresso na célula (CROXEN et al., 2013; NATARO; KAPER, 1998).

#### 3.3.1.5 *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)

Cepas de EIEC estão associadas à presença de quadros infecciosos diarreicos com muco e sangue, e que na maioria das vezes é confundida com o processo disentérico produzido por *Shigella* (POOLMAN, 2017). As bactérias estão intimamente relacionadas às espécies de *Shigella*, e abrigam o plasmídeo de virulência para a invasividade (pINV) que codifica a produção do T3SS, proteínas efetoras e antígenos de plasmídeos de invasão (ipa) (FARFAN-GARCIA et al., 2016; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Estes microrganismos têm a capacidade de evadir a resposta imune do hospedeiro, devido a sua rápida invasão às células do cólon (Figura 6B). Inicialmente ingressam nas células M, atravessando a barreira epitelial por transcitose. Na submucosa, as bactérias são fagocitadas por macrófagos, onde sobrevivem, causando apoptose dos macrófagos. Uma vez liberada, a bactéria ingressa nas células intestinais, sendo captada pelo fagossoma. Após sua multiplicação se liberam e migram para as células adjacentes, movendo-se lateralmente entre uma e outra célula pela polimerização da actina (CROXEN et al., 2013; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

**Figura 6 - Estratégia de infecção de ETEC e EIEC.** A) ETEC (Kaper, Nataro e Mobley, 2004); B) EIEC (Croxen et al., 2013).



### 3.3.1.6 *Escherichia coli* difusamente aderente (DAEC)

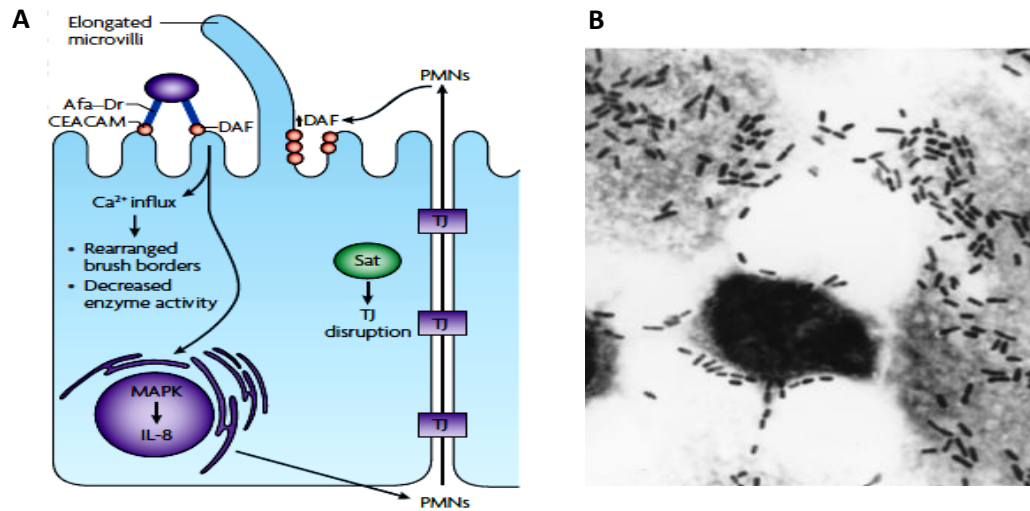
Estão envolvidas em processos agudos e recorrentes de diarreias aquosas, e têm sido isoladas de portadores assintomáticos. Esse patótipo pode produzir doença inflamatória (CROXEN et al., 2013).

As cepas apresentam padrão de adesão difusa em células HEp-2 (Figura 7B). A união da bactéria ao enterócito ocorre por meio de adesinas afimbriais (Afa) e fimbriais (Dr-F1845) aos receptores DAF (*Decay accelerating factor*) (CROXEN; FINLAY, 2010; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004), assim como também pode se ligar aos receptores CEACAM (CROXEN et al., 2013).

O efeito citopático produzido nas células da mucosa intestinal é realizado mediante a ativação das vias de sinalização do enterócito (IL-8) que induz a migração transepitelial de neutrófilos polimorfonucleares (PMN), exacerbando a regulação de DAF (Figura 7A). A única SPATE associada tem sido a toxina Sat (*Secreted autotransporter toxin*), ocasionando rearranjo das micro-vilosidades e das *tight junction* nas células intestinais, aumentando a permeabilidade (CLEMMENTS et al., 2012; CROXEN; FINLAY, 2010).



**Figura 7 - Mecanismos patogênicos de DAEC.** A) Estratégia de infecção de DAEC (Croxen e Finlay, 2010); B) Adesão difusa de DAEC células Hep-2 (Nataro e Kaper, 1998).



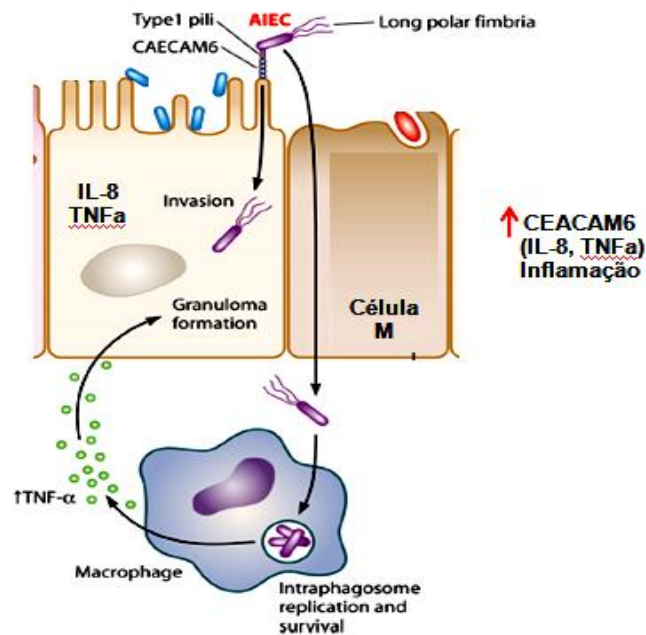
### 3.3.1.7 *Escherichia coli* aderente invasiva (AIEC)

Essas cepas estão associadas à doença de Crohn e são altamente aderentes e invasivas aumentando sua capacidade de induzir inflamação (DARFEUILLE-MICHAUD et al., 2004). Este mesmo fenômeno invasivo foi observado em *E. coli* isoladas de pacientes com CCR, pela cepa protótipo *E. coli* 11G5 (BONNET et al., 2014; RAISCH et al., 2014). As AIEC têm sido relacionadas geneticamente às ExPEC, compostas de outros fatores de virulência (BARNICH; DARFEUILLE-MICHAUD, 2007; BRONOWSKY et al., 2008).

Essas bactérias são capazes de formar biofilmes pela expressão de receptores específicos na célula hospedeira como o CEACAM (BRINGER et al., 2012). Isto é observado nas primeiras lesões produzidas na mucosa e placas de Peyer de pacientes com síndrome de Crohn onde após da adesão, invadem as células M (BARNICH et al., 2003). Similarmente, a outros microrganismos invasivos, AIEC atravessam a barreira epitelial, onde após fagocitadas pelos macrófagos, induzem a produção de TNF- $\alpha$  e IL-8 (BRINGER et al., 2012), aumentando a inflamação e a formação de granulomas no cólon (Figura 8).



Figura 8 - Estratégia de infecção de AIEC (Adaptado de Croxen et al., 2013).



### 3.3.2 *Escherichia coli extraintestinal (ExPEC)*

As ExPEC são cepas patogênicas que pertencem a microbiota intestinal, podendo causar infecções extra-intestinais, como no trato urinário (ITU), meningite neonatal (NMEC) e septicemia (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004); entretanto, são capazes de colonizar assintomaticamente o trato intestinal do hospedeiro e se comportar como colonizadores mais efetivos em comparação às cepas comensais (JOHNSON; RUSSO, 2002).

Essas bactérias estão agrupadas principalmente no filogruppo B2, conhecido por abrigar as cepas mais virulentas (DUBOIS et al., 2010), e menos difundidas no filogruppo D (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000). Possuem diversos fatores de virulência como adesinas, invasinas, camadas de polissacarídeos (LPS e cápsula), toxinas, sideróforos, proteases e proteínas de resistência ao soro, sendo que esses fatores são codificados por genes localizados em ilhas de patogenicidade (PAIs) (JOHNSON; RUSSO, 2002).

Os genes dos fatores de virulência das ExPEC que estão conjuntamente localizados em PAIs ou plasmídeos dão uma vantagem seletiva porque podem ser

transferidos horizontalmente de forma mais eficiente que quando se encontram individualmente (JOHNSON; RUSSO, 2002), no entanto a co-localização pode ser variável, exibindo diferentes padrões de combinações gênicas, conferindo aptidão para colonização intestinal (JOHNSON et al., 2001).

Picard et al. (1999) têm mostrado que o número de fatores de virulência de cepas ExPEC é proporcional a seu potencial patogênico. Da mesma forma, em cepas isoladas de infecção intestinal, as combinações dos fatores de virulência produzidos por essas cepas, podem colaborar para desencadear um processo infeccioso mais complexo no hospedeiro (VEJBORG et al., 2011)

Segundo Sheka, Tevis e Kennedy (2015) e Hernández-Boussard et al. (2016), as bacteremias e bacteriurias produzidas por cepas ExPEC, seriam as responsáveis pelo aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes com câncer, devido ao comprometimento da mucosa intestinal e das funções do sistema imunológico do hospedeiro.

### 3.3.3 Fatores de virulência de ExPEC

Johnson et al. (2003), definiram que as cepas ExPEC contêm dois ou mais marcadores de virulência, entre eles, gene *papA* (subunidade estrutural da fímbria P) e/ou gene *papC* (montagem da fímbria P), gene *sfa/foc* (sub-unidades da fímbria S e F1C), gene *afa/dra* (adesinas de ligação ao antígeno do grupo sanguíneo Dr), gene *kpsMTII* (unidades polissacarídicas da cápsula tipo 2) e gene *iutA* (sideróforo aerobactina).

#### 3.3.3.1 Adesinas

A aderência das bactérias ao hospedeiro representa o fator de virulência essencial das bactérias patogênicas e o primeiro passo na colonização (KATOULI, 2010). O processo de aderência se inicia quando as estruturas protéicas (adesinas) se ligam a receptores específicos da célula hospedeira (ANTÃO; WIELER; EWERS,

2009; KLEMM; HANCOCK; SCHEMBRI, 2010). Diversos patógenos bacterianos podem expressar diferentes adesinas, as quais variam durante os diversos estágios da infecção, podendo mudar de receptor alvo segundo a preferência do tecido, sendo este fenômeno denominado de tropismo tissular (KLEM; SCHEMBRI, 2000).

As pesquisas são limitadas com respeito à colonização intestinal por ExPEC, devido a que o foco como patógenos extra-intestinais está envolvido na colonização de tecidos extra-intestinais. Em cepas isoladas da doença de Crohn e Câncer de cólon têm sido identificadas diversas adesinas características das cepas relacionadas à infecção do trato urinário (UTI) (BRONOWSKY et al., 2008; BUC et al., 2013; DARFEUILLE-MICHAUD et al., 1998).

#### 3.3.3.1.1 Fímbria P

Esta fímbria é a segunda de maior importância, depois da fímbria tipo 1, que participa na adesão das cepas UPEC na produção de pielonefrite (KATOULI, 2010). Está conformada pela subunidade protéica principal (PapA) conectada a uma fibrila com componentes principais (PapE) e menores (PapF, PapK e PapG).

As fimbrias P reconhecem as sequências de carboidratos  $\alpha$ Gal (1-4)  $\beta$ Gal (ANTÃO; WIELER; EWERS, 2009, WOLD et al., 1988). Essas fimbrias podem contribuir com a habilidade das cepas ExPEC, para colonizar (JOHNSON; RUSSO, 2002) e depois invadir tecidos (UTI) (KATOULI, 2010).

Wold et al. (1988) relataram que fimbrias P não se ligam diretamente a superfície das células do cólon, e sim aos materiais associados à mucosa. Dados similares foram também obtidos por Addleberth et al. (1995) em células de cólon e de íleo.

#### 3.3.3.1.2 Fímbria S/F1C

A fímbria S está presente em cepas de *E. coli* envolvidas na pielonefrite e reconhecem receptores de ácido siálico, assim como fibronectina, laminina e sialoglicoproteínas. A expressão da fímbria S depende de fatores ambientais como

temperatura, osmolaridade e presença de glicose (ANTÃO; WIELER; EWERS, 2009). Addleberth et al. (1995), têm demonstrado que a expressão de fímbria S em ExPEC possibilita o incremento da adesão aos enterócitos do cólon e íleo.

Já a fímbria F1C é codificada pelo operon *foc* que contribui com as propriedades adesivas das cepas UPEC, desencadeando uma resposta inflamatória com a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-8) (ANTÃO; WIELER; EWERS, 2009). Em pesquisa com a colonização intestinal em camundongos, a fímbria F1C foi requerida por *E. coli* Nissle para a aderência às superfícies intestinais, sendo capaz de induzir formação de biofilme (LASARO et al., 2009). Por outro lado, Picard et al. (1999), demonstraram que cepas ExPEC isoladas de humanos e que expressaram o operon *sfa/foc*, estritamente se agruparam no filogruppo B2.

#### 3.3.3.1.3 Adesinas Dr/Afa

As adesinas Dr são fimbriais resistentes à manose, e sua expressão está dirigida pelos genes *draA*, *draC*, *draD* e *draE* (ANTÃO; WIELER; EWERS, 2009). Estão presentes principalmente em cepas associadas a ITU ou diarreia aguda, e em cepas isoladas de fezes de indivíduos adultos (DARFEUILLE-MICHAUD et al., 1998).

Cepas ExPEC expressando essas adesinas podem se aderir mais eficientemente aos enterócitos do cólon do que do íleo, principalmente nas microvilosidades, em comparação com as fímbrias tipo 1 e fímbrias P, permitindo a colonização e permanência no cólon (ADDLEBERTH et al., 1995).

As adesinas Afa são afimbriais, e estão codificadas pelo operon cromossômico *afa* que contém os genes *afaA* (regulador transcripcional), *afaE* (adesina resistente à manose), *afaD* (invasina), *afaB* (chaperona periplasmática) e *afaC* (usher) (PROROK-HAMON et al., 2014; SERVIN, 2014). Picard et al. (1999) mostraram que em cepas ExPEC isoladas de humanos o operon *afa* era raramente encontrado.

Similarmente a outras fímbrias da família Dr, as adesinas Afa/Dr se ligam à uma proteína de membrana (DAF), que protege as células do dano produzido pelo complemento. Essa adesão poderia alterar as funções regulatórias do complemento,

induzindo a produção de IL-8 pelos enterócitos, o que contribuiria para a patogênese de doenças inflamatórias intestinais (ADDLEBERTH et al., 1995; CROXEN; FINLAY, 2010).

### 3.3.3.2 Toxinas

As toxinas são responsáveis pela disseminação das bactérias nos tecidos, a indução da resposta inflamatória, citotoxicidade e resistência aos macrófagos, para o benefício da bactéria. Dentre elas podemos mencionar a toxina de invasão do epitélio cerebrovascular (*ibeA*), alfa hemolisina, fator de necrose citotóxico (CNF) e colibactina (PKS).

#### 3.3.3.2.1 Toxina de invasão do endotélio cerebral

A toxina de invasão do endotélio cerebral (gene *ibeA*) encontra-se em algumas cepas de *E. coli* do grupo filogenético B2, principalmente em cepas que produzem meningite neonatal (CHE et al., 2011), e segundo Picard et al. (1999) é encontrada raramente em cepas ExPEC. Este gene está localizado na ilha genômica GimA (HUANG et al., 2001), e conjuntamente com seu receptor vimentina, desempenham um papel fundamental na transmigração de PMN (induzido por *E. coli*) pelas células endoteliais do epitélio cerebral (CHE et al., 2011).

Além disso, o gene *ibeA* poderia estar envolvido nas reações redox (como uma possível desidrogenase), já que a deleção deste gene em *E. coli* responde pela baixa resistência à exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogênio) mostrando seu papel na resistência ao estresse produzido por esse composto (FLECHARD et al., 2012).

Cieza et al. (2015), demonstraram que em cepas AIEC isoladas de doença de Crohn, o gene *ibeA* contribuiu com o processo de invasão, sobrevivência nos macrófagos e com a resposta inflamatória intestinal em modelo murino.

### 3.3.3.2.2 Hemolisina alfa

A hemolisina alfa é uma toxina dependente de cálcio, formadora de poros, e secretada principalmente por cepas de *E. coli* do filogruppo B2 (JIN et al., 2016; PICARD et al., 1999). Pode levar à lise de eritrócitos e células epiteliais renais do hospedeiro quando se encontra em elevada concentração (WILES; LULESUS; MULVEY, 2008). É codificada no cromossomo pelo gene *hlyA* e sua produção é regulada geralmente pela disponibilidade de ferro. A hemolisina é tóxica para muitas células conduzindo à inflamação, dano tissular e quebra da função de fagocitose (KATOULI, 2010).

Segundo Birösová et al. (2004), o gene *hlyA* é mais frequentemente encontrado em cepas isoladas de fezes, e a associação com aerobactina permite a vantagem dessas cepas no intestino. Entretanto, a presença de hemolisina e a toxina necrosante citotóxica (CNF-1) em cepas *E. coli* levam a perda das *tight junction* nas células Caco-2 (MIRSEPASI-LAURINSEN et al., 2016), sendo um mecanismo que contribuiria com a patofisiologia de doenças intestinais inflamatórias e elevada perda da permeabilidade celular (BUCKER et al., 2014; MIRSEPASI-LAURINSEN et al., 2016).

*E. coli* isoladas de CCR e produtoras de hemolisina alfa possivelmente são responsáveis pelo efeito citotóxico nas células epiteliais do cólon, podendo conduzir à carcinogênese do tecido do cólon, embora essa toxina não iniba o desenvolvimento do tumor (JIN et al., 2016).

### 3.3.3.2.3 Fator de necrose citotóxico (CNF1)

A característica de produção da toxina CNF-1 tem sido detectada em cepas de *E. coli* isoladas de crianças com diarreia e daquelas produtoras de sepse, meningite e infecção do trato urinário (FABRI et al., 2013). Raisch et al. (2014) mostraram que *E. coli* isoladas de pacientes com câncer de cólon abrigavam o gene *cnf-1* em elevada prevalência em relação das cepas isoladas de diverticulite.

CNF-1 é uma toxina protéica, cujo alvo são as proteínas Rho GTPases, e as quais governam aspectos celulares como morfologia, adesão celular, motilidade,

remodelamento das ligações celulares e fagocitose (FABRI et al., 2013; TRAVAGLIONE; FABRI; FIORENTINI, 2008).

A toxina pode induzir a quebra das *tight junction* (o que causaria a motilidade de células tumorais), invasividade e metástase, multinucleação e bloqueio da progressão do ciclo celular (transição G2/M) (BUC et al., 2013; FABBRI et al., 2013). Além disso, protege as células epiteliais contra apoptose, favorecendo a sobrevivência de células com instabilidade genética (FABBRI et al., 2013). Contudo, CNF-1 poderia melhorar a habilidade das células de se aderir umas a outras à matriz extracelular afetando o potencial tumorigênico das células epiteliais (TRAVAGLIONE; FABRI; FIORENTINI, 2008).

Dados da literatura mostram que a produção de CNF-1 em cepas de *E. coli*, principalmente do filogruppo B2, está associada à expressão da hemolisina alfa provavelmente devido a que ambos os genes estão localizados na mesma ilha de patogenicidade (PAI-II) (BUC et al., 2013; DUBOIS et al., 2010).

#### 3.3.3.2.4 Colibactina (PKS)

A colibactina é uma genotoxina produzida por enterobactérias patogênicas e é codificada pela Ilha de patogenicidade poliacetil sintasa (~54-kb) (CUEVAS-RAMOS et al., 2010; NOUGAYRÈDE et al., 2006; RAISCH et al., 2014), que induz dano persistente ao DNA, bloqueio da transição de G2/M, e eventualmente morte apoptótica em células epiteliais humanas (CUEVAS-RAMOS et al., 2010; NOUGAYRÈDE et al., 2006; SECHER et al., 2013). Por outro lado, tem sido mostrado que cepas de *E. coli pks+* isoladas de biopsias de CCR contribuem à senescência das células e à proliferação tumoral em camundongos (COUGNOUX et al., 2014).

Recentemente, Tronnet et al. (2016), demonstraram que a transcrição de colibactina é regulada por uma transferase (PPTase, fosfopanteteinil transferase) e dependente da disponibilidade de ferro, sendo este elemento fator importante na virulência bacteriana e na carcinogênese intestinal.

Raisch et al. (2014) e Buc et al. (2013) em estudos diferentes, observaram que cepas de *E. coli* associadas à mucosa de câncer de cólon e produtoras de

colibactina, são altamente persistentes no trato intestinal e mais prevalentes do que as cepas isoladas de diverticulite, induzindo a proliferação celular e carcinogênese, podendo estar associadas à produção de outras genotoxinas (CNF-1). Arthur et al. (2012) relataram que *E. coli pks+* não induzem a formação de adenocarcinomas no epitélio de cólon sadio, devido a que a capa de muco contém peptídeos antibacterianos.

Nougayrède et al. (2006), indicaram que a ilha de patogeniidade *pks* esta ausente em cepas DEC e presente em ExPEC, restrita ao filogruppo B2 que agrupa geralmente cepas ExPEC e comensais. Entretanto, *E. coli* isoladas de CCR com aderência difusa possuíam o gene *pks*, conferindo habilidade para produzir angiogênese e genotoxicidade (PROROK-HAMON et al., 2014).

Alguns pesquisadores sugerem que a ilha de patogenicidade *pks* poderia atuar como fator de colonização intestinal (DUBOIS et al., 2010); contudo, *pks* por si só não pode conferir a habilidade de colonização (NOWROUZIAN; OSWALD, 2012). Porém se propõe que cepas que carregam *pks* teriam vantagem na colonização intestinal, já que a renovação lenta do epitélio intestinal seria uma estratégia bacteriana para sua permanência no intestino com efeitos na patogenicidade (NOUGAYRÈDE et al., 2006), o que contribuiria ao desenvolvimento do CCR (CUEVAS-RAMOS et al., 2010).

### 3.3.3.3 Sideróforo aerobactina

Os sideróforos são quelantes de íons férricos produzidos por vários membros da Família *Enterobacteriaceae*, especialmente, as patogênicas incluindo as ExPEC quando se encontram em ambientes com baixo conteúdo de ferro (OKEKE et al., 2004; WILES; LULESUS; MULVEY, 2008). Dessa maneira, as cepas de *E. coli* são capazes de secretar sideróforos como enterobactina, aerobactina, salmoquelina e yersiniobactina (SEARLE et al., 2015).

No hospedeiro o fornecimento de ferro é limitado, e a habilidade para produzir múltiplos sideróforos por *E. coli* tem um papel importante na fisiologia bacteriana, facilitando a colonização intestinal (OKEKE et al., 2004; SEARLE et al., 2015). Segundo Bullen et al. (2005), os microrganismos se tornam mais virulentos quando a



disponibilidade de ferro esta aumentada, e só nesse momento os mecanismos de resistência à infecção são abolidos.

Bactérias patogênicas que se aderem à mucosa, como por exemplo, as EAEC possuem mais de um sistema transportador de ferro, seja de aerobactina e/o yersiniobactina, que as capacita para a persistência no trato intestinal (OKEKE et al., 2004; OPAL et al., 1990). Searle et al. (2015), manifestaram que a elevada produção de sideróforos em *E. coli* intestinal está ligada à presença de genes de aerobactina; sendo uma vantagem competitiva para a persistência no trato intestinal (KATOULI, 2010); e na ausência desse gene, a hemolisina alfa serve como uma via alternativa de aquisição de ferro (OPAL et al., 1990).

#### 3.3.3.4 Cápsula polissacarídea

As cápsulas são polissacarídeos que protegem a bactéria do sistema imune, e colaboram com a sobrevivência à ação do soro, evitando o reconhecimento do antígeno O (KATOULI, 2010). A produção de cápsula K1 é comumente encontrada em cepas de *E. coli* residentes intestinais, colaborando para a colonização eficiente do intestino grosso (KATOULI, 2010).

Principalmente a cápsula K1 é associada com cepas ExPEC que causam meningite neonatal (WILES; LULESUS; MULVEY, 2008), e tem importância na invasão celular uma vez que impede a fagocitose favorecendo a passagem pela barreira hemato-cerebral (CROXEN; FINLAY, 2010; WILES; LULESUS; MULVEY, 2008).

#### 3.3.4 Filogrupos de *E. coli*

A heterogeneidade ou clonalidade das cepas de *E. coli*, seja por transmissão horizontal de genes (ilhas de patogenicidade, antígenos O ou genes *house-keeping*), tem levado aos pesquisadores a classificá-las em filogrupos, pela análise das características fenotípicas e genotípicas, nichos ecológicos, habitats, e capacidade

de causar doença (CLERMONT et al., 2011; CLERMONT et al., 2013; ESCOBAR-PARAMO et al., 2004; ESCOBAR-PARAMO et al., 2004a; PICARD et al., 1999). As relações filogenéticas das espécies do gênero *Escherichia*, e particularmente, de *E. coli* têm sido avaliadas por técnicas como MLST (*Multilocus sequence typing*) (CLERMONT et al., 2011; CLERMONT et al., 2011a; WALK et al., 2009). Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000), desenvolveram um PCR baseado na detecção de quatro genes (*chuA*, *arpA*, *yja*, e *TspE4.C2*) em *E. coli* podendo assim classificá-las em quatro filogrupos (A, B1, B2 e D).

Estudos utilizando a técnica MLST, têm mostrado a existência de novos filogrupos dentro do gênero *Escherichia*, sendo denominados Clado I, Clado II, Clado III, Clado IV e Clado V. Esses Clados são geneticamente diferentes de *E. coli*, e em alguns casos, fenotipicamente similares, tornando difícil sua classificação (CLERMONT et al., 2011a; WALK et al., 2009). Atualmente, são reconhecidos oito filogrupos de *E. coli*, sete pertencendo a *E. coli sensu stricto* (A, B1, B2, C, D, E, F), e um ao *Escherichia* Clado I (CLERMONT et al., 2013).

Membros de *E. coli* pertencentes aos filogrupos A e B1, são considerados comensais não patogênicos devido à carência de fatores de virulência. Cepas DEC também têm sido isoladas de animais e humanos, e pertenceram aos grupos A, B1 e E (CLERMONT et al., 2011). Estudos têm mostrado a letalidade e capacidade de produzir infecções extra-intestinais, incluindo os filogrupos A, B1, B2 e D (CLERMONT et al., 2011; CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000; ESCOBAR-PÁRAMO et al., 2004; PICARD et al., 1999). Deles, se destaca o filogrupo B2 pela elevada produção de vários fatores de virulência, entre eles, adesinas, antígenos capsulares, sideróforos, e hemolisinas (NOWROUZIAN; OSWALD, 2013; PICARD et al., 1999).

Escobar-Páramo et al. (2004), concluíram que cepas EHEC se agrupam nos filogrupos A e B1; as ETEC nos filogrupos A, B1 e C; tEPEC nos filogrupos B1 e B2; e as aEPEC no grupo E. As cepas EAEC e DAEC se distribuem entre todos os filogrupos.

Cepas de *E. coli* isoladas de pacientes com doenças inflamatórias intestinais, como a doença de Crohn e colite ulcerativa, as quais são consideradas fatores de risco para o desenvolvimento de câncer colorretal, e de pacientes com CCR são

frequentemente agrupadas no filogrupos B2 (BUC et al., 2012; JIN et al., 2016; RAISCH et al., 2014; VEJBORG et al., 2014).

Em estudo realizado em dez diferentes populações humanas de três continentes, foi observada variações nos filogrupos encontrados, concluindo-se que a predominância de algum tipo bacteriano depende da localização geográfica, assim como do clima. Cepas isoladas de populações tropicais pertenceram ao filogrupos A e em menor frequência ao grupo B1 (ESCOBAR-PÁRAMO et al., 2004a).

### 3.3.5 Variabilidade genética e ERIC-PCR (*Enterobial Repetitive Intergenic Consensus-Polierase Chain Reaction*)

As cepas de *E. coli* podem carregar vários genes de virulência, o que determina seu potencial patogênico. As combinações de genes dos fatores de virulência nessa bactéria podem ser explicadas devido à transferência horizontal do material genético entre as células bacterianas, seja que aconteça entre cepas ExPEC ou derivados de diferentes patovares de *E. coli* (JOHNSON; STELL, 2000; NUNES et al., 2013).

Técnicas como MLST tem permitido determinar que as enterobacteriáceas de pacientes com doença inflamatória intestinal poderiam melhorar o fitness bacteriano, virulência ou resistência antibiótica pela transferência horizontal de genes, o que resultaria em novas cepas patogênicas ou comensais com fenótipos alterados (STECHEER et al., 2012).

A análise das diferenças filogenéticas, clonalidade segundo a origem das cepas, estudos de evolução, e resistência antibiótica têm sido reportados utilizando técnicas como MLST, PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) e RAPD (*Random Amplification of Polimorfic DNA*) (CLERMONT et al., 2011a; CLERMONT et al. 2011b; LEVERT et al., 2010). Dalla-Costa et al. (1998) manifestaram que as técnicas de Ribotipagem e ERIC-PCR são fáceis, rápidas e adequadas para discriminar a existência de clones ou variações genéticas nas cepas DEC.

A técnica ERIC-PCR é importante porque mostra perfis *E. coli* que permitem discriminar cepas de enterobacteriáceas pela amplificação entre as seqüências ERIC, o que gera um perfil único (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991).

Segundo Hulton, Higgins e Sharp (1991), as sequências ERIC são sequências repetidas de DNA de 126 bp, conservadas no genoma das enterobactérias, e não apresentam similaridades com plasmídios, fagos ou sequências eucarióticas, ou alguma sequência de inserção conhecida.

A técnica ERIC-PCR permite diferenciar cepas obtidas de diversas amostras clínicas ou de diferentes espécies, além da descoberta de novas cepas, possíveis rotas de transmissão epidemiológica, prevenção e controle de surtos de doenças (ATEBA; MBEWE, 2014; LANG et al. 2013). Para cepas isoladas de surtos ou de amostras clínicas, o padrão de sequências similares geradas, refletiria contaminação cruzada, propagação clonal ou descendência de um mesmo antecessor (ATEBA; MBEWE, 2014; RAMAZANZADEH; SAMANI, SERVEH; SAMANI SAMAN, 2013).

Dhanashree e Shrikara (2012) estudaram as relações genéticas por RAPD, ERIC-PCR e sorotipificação, de *E. coli* que causam diarreia, concluindo que as tipagens moleculares por RAPD e ERIC-PCR revelaram perfis diferentes para sorogrupos diferentes, e cepas com diferente serogrupo O se agruparam também em clusters diferentes. Entretanto, as similaridades genéticas observadas por RAPD e ERIC entre as cepas indicaram uma origem genética comum ou uma fonte comum.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Pacientes**

Foram selecionados 30 pacientes entre 40 e 86 anos de idade, sem distinção de gênero e raça, e diagnosticados com câncer de reto (CR). Também, foram analisados 18 indivíduos sadios sem diagnóstico de câncer. Esses pacientes foram inscritos no Setor de Cirurgia Gastrointestinal do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP).

Os pacientes com câncer foram diagnosticados por colonoscopia realizada por especialistas do ICESSP. Dados demográficos e clínicos como tabagismo, consumo de álcool, sinais clínicos entre o início dos sintomas e o diagnóstico, lesão, histórico familiar, e uso de antibióticos, entre outros, também foram coletados (Anexo 1 – Questionário de dados demográficos e clínicos dos pacientes). Pacientes apresentando quadros infecciosos sistêmicos, crônicos e/ou usando antibióticos foram excluídos deste estudo.

Todos os pacientes participantes assinaram o Termo de Livre Consentimento aprovado pelo Comitê de Ética do ICB (Proc. No. 1165/CEPSH) e da Faculdade de Medicina (Proc. No. 321/14) da Universidade de São Paulo.

### **4.2 Coletas das amostras clínicas**

Amostras fecais frescas foram coletadas no período de aproximadamente 1-3 semanas após o procedimento de colonoscopia, a fim de permitir o restabelecimento da microbiota intestinal. As fezes foram acondicionadas em coletores plásticos esterilizados sem nenhum tipo de conservante e transportadas para o laboratório em intervalo máximo de 4 horas.

### **4.3 Isolamento e identificação de cepas de *Escherichia coli* comensais, diarreiogênicas e extra-intestinais**

Parte do material fecal foi semeada em placas com ágar MacConkey (Becton Dickinson, BD, Brasil) e incubadas a 37 °C por 18-24 horas. De cada material clínico, quatro colônias lactose-positivas características foram selecionadas aleatoriamente

e repicadas em meio não seletivo Luria-Bertani (LB; BD, Brasil) para obtenção de cultura pura. Em seguida, foi realizada a coloração de Gram. A identificação em nível de espécie foi realizada por pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se oligonucleotídeos específicos 16S rRNA (MALINEN et al., 2003) (Tabela 1).

#### 4.3.1 *Extração de DNA total bacteriano*

A partir de cada crescimento bacteriano, uma colônia foi cultivada em 3 ml de caldo LB (incubado a 37 °C por 24 horas). O pellet foi obtido por centrifugação e utilizado para a extração do DNA total com auxílio do kit comercial - DNA Illustra bacterial genomic prep mini spin (GE Healthcare).

#### 4.3.2 *Determinação dos patótipos de E. coli*

Os diferentes patótipos foram determinados por PCR convencional, segundo metodologias descritas por Aranda, Fagundes-Neto e Scaletsky (2004); Aranda et al. (2007); Tornieporth et al. (1995), e por PCR multilplex para as aEAEC (Andrade, Gomes e Elias, 2014). Os oligonucleotídeos e as condições de PCR estão descritas na Tabela 1. As cepas de *E. coli* extra-intestinais (ExPEC) foram avaliadas segundo a metodologia descrita por Jonhson e Stell (2000), observando-se a presença de pelo menos dois de nove genes, conforme constam na Tabela 2.

Todas as reações de amplificação de DNA foram realizadas em volumes finais de 25 µL, contendo: 10 X de tampão PCR, MgCl<sub>2</sub> (50 mM), dNTP (20 µM), 0,5 U Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil), cada iniciador (0,4 µM) e 2,0 µL de DNA (30 a 50 ng/µL). As amplificações foram realizadas em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Alemanha) nas seguintes condições: 1 ciclo de 94 °C por 5 min; 35 ciclos de: 94 °C por 30 seg, temperatura de anelamento por 1 min (para os patótipos; Tabela 1) ou por 30 seg (para as ExPEC; Tabela 2), e 72 °C por 1 min; e 1 ciclo de 72 °C por 5 min para a extensão final do DNA.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose (1%), corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e fotografados sob luz UV com o sistema Kodak Scientific System. Em todas as análises foram utilizados marcadores de peso

molecular de 100 bp e 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen, Brasil). Após identificação os isolados foram mantidos em meio LB, congelados em Cryo Care (Key Scientific Products, Inc., EUA) e estocados em skim milk a -80 °C.

As cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 e os patótipos DEC (EHEC EDL 933, ETEC H10407, EAEC 042, EIEC O124:14, EPEC E2348/69), cedidas pelo Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, foram utilizados como controles positivos; e *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 e *Escherichia coli* K12 usados como controles negativos na detecção dos patótipos.

#### 4.3.3 Teste de adesão em células HEP-2

O teste de adesão bacteriana às células HEP-2 foi realizado para determinar a aderência característica das EAEC nas cepas que foram positivas somente ao gene *aaiA* pelo PCR multiplex (determinação das EAEC atípicas). As cepas positivas somente ao gene *aaiA* são consideradas falsas-positivas para aEAEC, uma vez que podem apresentar padrões diferentes à adesão da agregativa (AA) a qual é característica das EAEC (ANDRADE; GOMES; ELIAS, 2014).

As células HEP-2 foram cultivadas em placas de microtitulação com lamínulas e com meio de cultura MEM-SFB (10%), sendo incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C durante 48 horas ou até que seja observada semi confluência celular. As bactérias foram crescidas em 3 ml de caldo LB sem agitação, a 37 °C por 16 horas. Posteriormente, o meio de cultura das placas foi desprezado, lavadas com PBS e adicionadas 0,96 mL de MEM-SFB 2%, acrescido de manose (1%). Em seguida, foi acrescentado 0,04 mL da cultura bacteriana (diluição final 1:25), e as placas incubadas a 37 °C por 3 h. O meio foi retirado das placas e lavadas 6 vezes com PBS. As culturas celulares foram fixadas com 1 mL de metanol absoluto por pelo menos 10 minutos.

Para a coloração das células, o metanol foi desprezado e o corante May-Grunwald (0,2%) (diluído 1:2 com tampão Sørensen) foi adicionado durante 5 minutos, sendo posteriormente desprezado, e adicionando-se 1 mL do corante de Giemsa (1:3, com tampão de Sørensen) por 20 minutos. Assim, as lamínulas foram lavadas com água destilada até retirar o excesso de corante, e secas à temperatura ambiente. As lamínulas foram montadas sobre lâminas com Entelan, e após 1 hora,

a observação microscópica era realizada (100 X), observando-se o padrão de adesão agregativa (AA).

#### **4.4 Tipagem molecular de *Escherichia coli* por ERIC-PCR (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991; SNEATH; SOKAL, 1973)**

A tipagem foi realizada pela técnica de ERIC-PCR. Brevemente, as amplificações de DNA foram realizadas em volumes final de 25 µL, contendo: 10 X de tampão PCR, MgCl<sub>2</sub> (50 mM), dNTP (20 µM), 0,5 U Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil), cada iniciador (0,4 µM) e 5,0 µL de DNA (20 a 25 µL). Os iniciadores usados foram: ERIC-1: 5'- ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C -3' e ERIC-2: 5'- AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G -3'.

As reações de PCR foram programadas para: 1 ciclo a 94 °C por 10 min; seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 52 °C por 1 min, e 72 °C por 8 min; e 1 ciclo a 72 °C por 16 min para extensão final do DNA. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1,5%), e posteriormente, corados e fotografados, como descrito anteriormente. Os diferentes perfis genéticos foram analisados e os respectivos dendrogramas construídos com auxílio do programa NTSYS (Applied Biostatitics, Inc. versão 2.21) utilizando o coeficiente de DICE. As cepas controle usadas foram *E. coli* ATCC 25922, *Escherichia fergusonii* ATCC 25468, *B. fragilis* ATCC 25285, *Clostridium perfringens* ATCC 13124.

#### **4.5 Determinação dos Filogrupos (CLERMONT et al., 2013)**

As amplificações de DNA foram realizadas por PCR, em volumes de 20 µL, contendo 10 X buffer, MgCl<sub>2</sub> (50mM), 10 mM de cada dNTP, Platinum *Taq* polymerase (0,5 U), DNA (100 ng/µL) e iniciadores correspondentes (Tabela 3). A concentração de cada iniciador foi de 20 pmol exceto para os primers AceK.F (40 pmol), ArpA1.R (40 pmol), trpBA.F (12 pmol), e trpBA.R (12 pmol). As reações de PCR foram realizadas usando-se as seguintes condições: desnaturação a 94 °C por 4 min; 30 ciclos a 94 °C por 5 seg, 57 °C por 20 seg (grupo E) ou 59 °C (Quadruplex e grupo C), e uma extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos de PCR foram



analisados por eletroforese em gel de agarose (1,5%), e posteriormente, corados e fotografados, como descrito anteriormente. Para os isolados que pelo PCR quadruplex apresentaram os seguintes resultados genotípicos: *arpA* e *yjaA* (Filogrupo A ou C), *arpA* e *chuA* (Filogrupo D ou E), *arpA*, *chuA* e TspE4.C2 (Filogrupo D ou E), ou *arpA*, *chuA* e *yjaA* (filogrupo E ou Clado I), um segundo PCR era realizado com iniciadores específicos para os grupos E e C. Como controle positivo foi usado o DNA da cepa *E. coli* EDL 933 cedido pelo Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, SP, Brasil.

#### **4.6 Análises estatísticas**

Os dados demográficos obtidos dos pacientes foram analisados com o teste de Chi Square (variáveis categóricas) e com o t-test (variáveis contínuas) utilizando o programa Statgraphics Centurion XVI.

Os dados microbiológicos qualitativos foram analisados com o programa estatístico SPSS 19.0 (IBM Corp. Released 2011). A comparação dos dados qualitativos entre os grupos avaliados foi realizada utilizando-se o teste de Chi Square; e as análises foram consideradas significativas quando  $P \leq 0,05$  (\*).

**Tabela 1** - Genes, sequências oligonucleotídicas e condições de PCR utilizados na identificação dos patótipos de *Escherichia coli*

Genes alvo	Patótipos	Oligonucleotídeos 5' → 3'	Temperaturas	
			de anelamento (°C)	Tamanhos dos produtos (bp)
16S rRNA	-	F: GTT AAT ACC TTT GCT CAT TGA R: ACC AGG GTA TCT AAT CCT GTT	50	340
<i>Eae</i>	EPEC	F: CTG AAC GGC GAT TAC GCG AA R: CCA GAC GAT ACG ATC CAG	64	917
<i>Bfp</i>	tEPEC	F: AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC R: GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA	62	326
<i>aggR</i>	tEAEC	F: GTA TAC ACA AAA GAA GGA AGC R: ACA GAA TCG TCA GCA TCA GC	58	254
<i>aaiA</i>	aEAEC	F: CCCACGACCAGATAACG R: GTTTTCAGGATTGCCATTAG	56	476
<i>aatA</i>	aEAEC	F: CTGGCGAAAGACTGTATCAT R: CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	56	630
<i>aaiG</i>	aEAEC	F: GGGAGTGTTCAGTCTGGAC R: ATTTGTCACAAGCTCAGCAT	56	782
<i>elt</i>	ETEC	F: GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC R: CGG TCT CTA TAT TCC CTGT T	50	450
<i>est</i>	ETEC	F: ATT TTT CTT TCT GTA TTG TCT T R: CAC CCG GTA CAA GCA GGA TT	50	190
<i>ipaH</i>	EIEC	F: GTT CCT TGA CCG CCT TTC CGA TAC CGT C R: GCC GGT CAG CCA CCC TC TGA GAG TAC	56	424
<i>stx1</i>	STEC	F: ATA AAT CGC CAT TCG TTG ACT AC R: AGA ACG CCC ACTG AGA TCA TC	50	180
<i>stx2</i>	STEC	F: GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC R: TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G	50	255

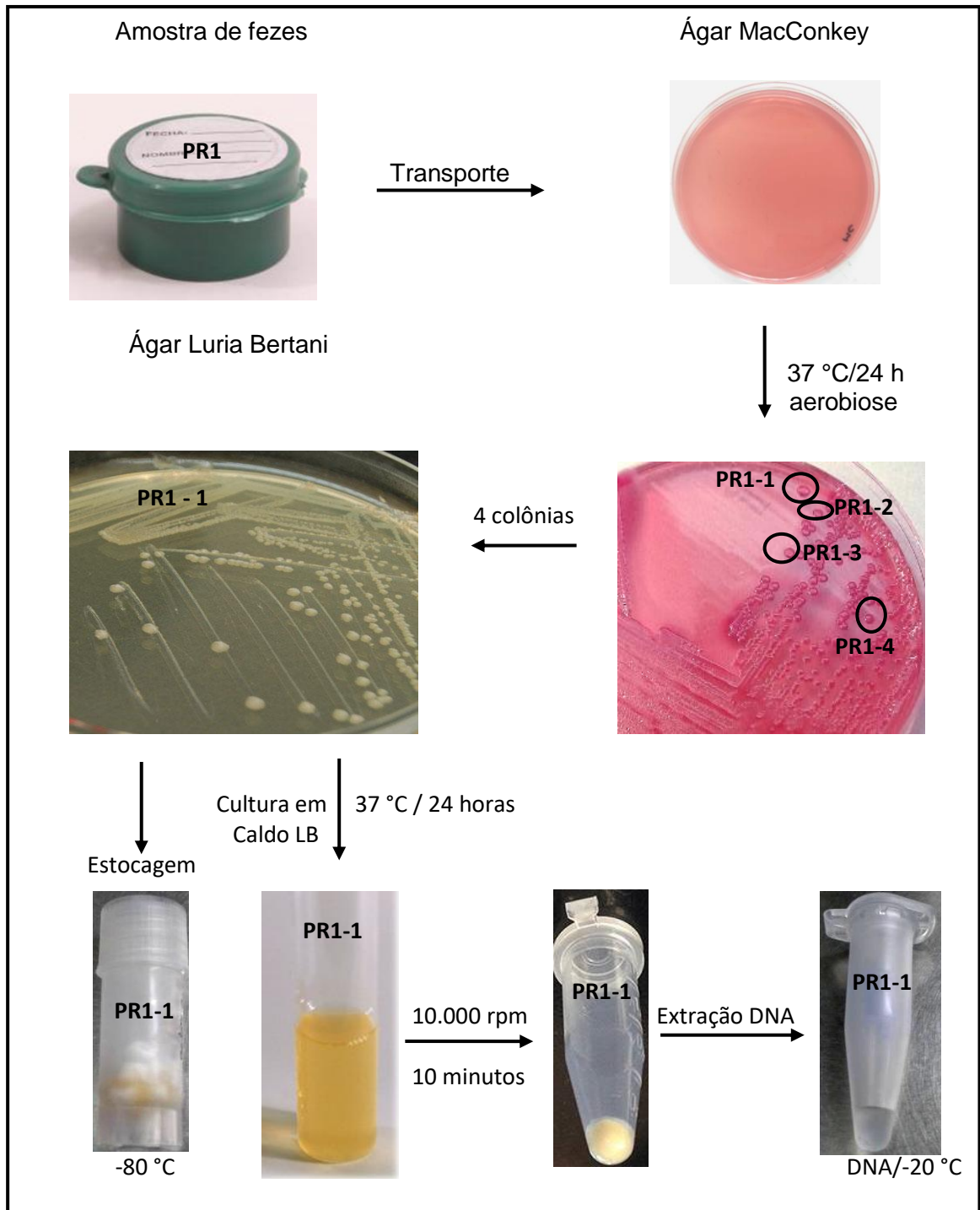
**Tabela 2** - Genes, seqüências oligonucleotídicas e condições de PCR utilizados na identificação de *Escherichia coli* extra-intestinais (ExPEC)

Genes alvo	Oligonucleotídeos	Temperaturas de anelamento (°C)	Tamanho dos produtos (bp)
	5' → 3'		
<i>papA</i>	F: ATG GCA GTG GTG TCT TTT GGT G R: CGT CCC ACC ATA CGT GCT CTT C	62	720
<i>papC</i>	F: GTG GCA GTA TGA GTA ATG ACC GTT A R: ATA TCC TTT CTG CAG GGA TGC AAT A	60	200
<i>sfa/foc</i>	F: CTC CGG AGA ACT GGG TGC ATC TTA C R: CGG AGG AGT AAT TAC AAA CCT GGC A	62	410
<i>afa/Dra</i>	F: GGC AGA GGG CCG GCA ACA GGC R: CCC GTA ACG CGC CAG CAT CTC	64	559
<i>iutA</i>	F: GGC TGG ACA TCA TGG GAA CTG G R: CGT CGG GAA CGG GTA GAA TCG	62	300
<i>kps</i> MT II	F: GCG CAT TTG CTG ATA CTG TTG R: CAT CCA GAC GAT AAG CAT GAG CA	62	272
<i>cnf1</i>	F: AAG ATG GAG TTT CCT ATG CAG GAG R: CAT TCA GAG TCC TGC CCT CAT TAT T	60	498
<i>ibeA</i>	F: AGG CAG GTG TGC GCC GCG TAC R: TGG TGC TCC GGC AAA CCA TGC	64	170
<i>hlyA</i>	F: AAC AAG GAT AAG CAC TGT TCT GGC T R: ACC ATA TAA GCG GTC ATT CCC GTC A	64	1177

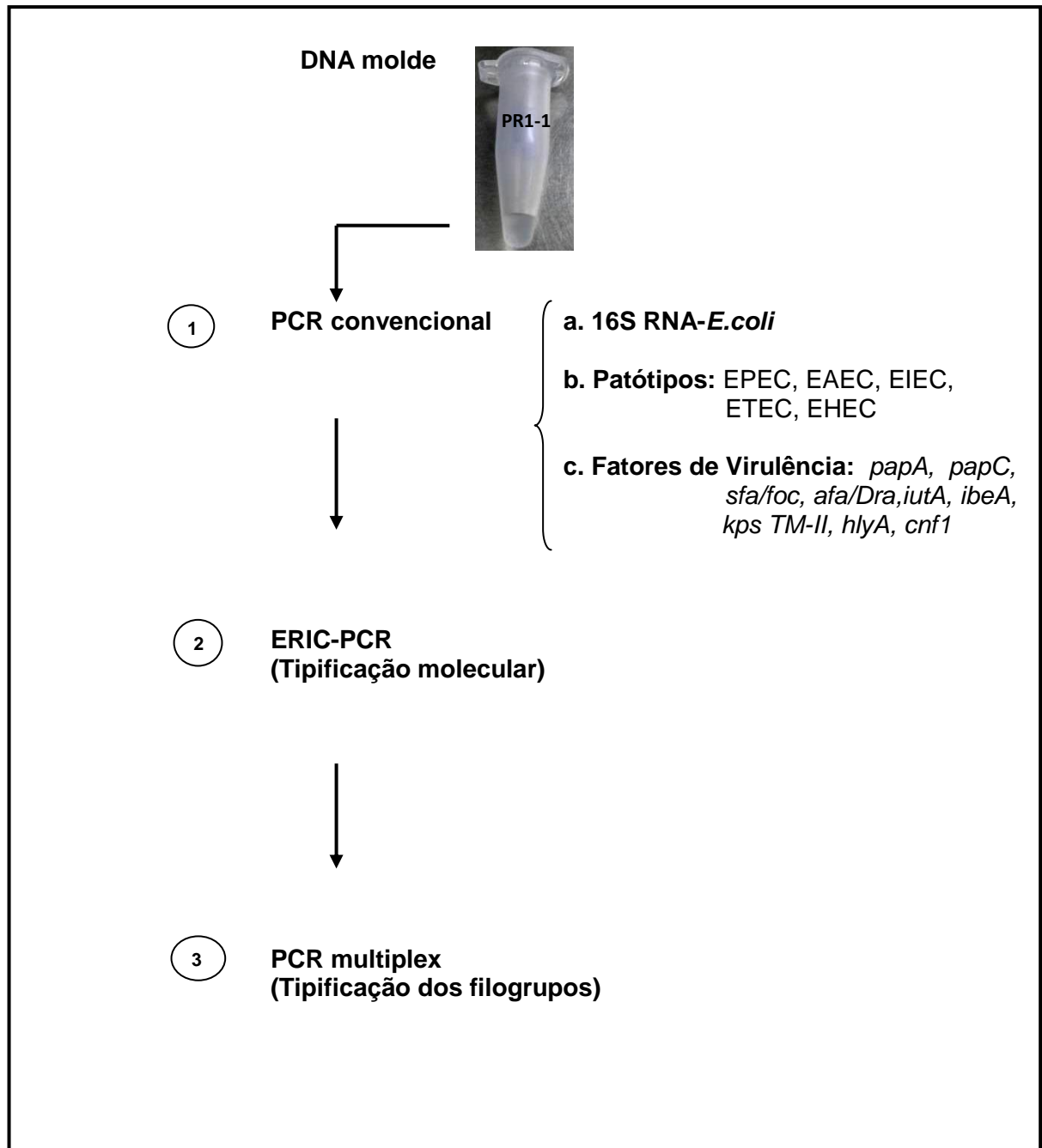
**Tabela 3** - Sequências de oligonucleotídeos e tamanho dos produtos usados na identificação dos filogrupos de *E. coli*.

Tipo de PCR	Nomenclatura do iniciador	Gene alvo	Sequência oligonucleotídica	Tamanho do amplicon	
Quadruplex	chuA.1b	<i>chuA</i>	5'-ATGGTACCGGACGAACCAAC-3'	288 bp	
	chuA.2b		5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'		
	yjaA.1b	<i>yjaA</i>	5'-CAAACGTGAAGTGTTCAGGAG-3'	211bp	
	yjaA.2b		5'-AATGCGTTCCTCAACCTGTG-3'		
	TspE4C2.1b	TspE4.C2	5'-CACTATTCGTAAGGTCATCC-3'	152 bp	
	TspE4C2.2b		5'-AGTTTATCGCTGCGGGTCGC-3'		
	AceK.f	<i>arpA</i>	5'-AACGCTATTCGCCAGCTTGC-3'	400 bp	
	ArpA1.r		5'-TCTCCCCATACCGTACGCTA-3'		
	Grupo E	ArpAgpE.f	<i>arpA</i>	5-GATTCCATCTTGTCAAATATGCC-3'	301 bp
		ArpAgpE.r		5'-GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG-3'	
Grupo C	trpAgpC.1	<i>trpA</i>	5'-AGTTTTATGCCAGTGCGAG-3'	219 bp	
	trpAgpC.2		5'-TCTGCGCCGGTCACGCC-3'		
Controle interno ( <i>E. coli</i> )	trpBA.f	<i>trpBA</i>	5'-CGGCGATAAAGACATCTTCAC-3'	489 bp	
	trpBA.r		5'-GCAACGCGGCCTGGCGGAAG-3'		

## Fluxograma de Trabalho para isolamento bacteriano e do DNA



## Fluxograma de Trabalho para identificação genotípica



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Pacientes

A análise dos dados demográficos obtidos dos dois grupos de participantes não mostrou diferenças significativas com relação ao gênero, histórico familiar, consumo de álcool ou fumo, entretanto, em relação ao fator idade houve diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,001$ ) (Tabela 4).

**Tabela 4** - Análise dos dados demográficos dos pacientes com câncer de reto e indivíduos sadios

Dados	Câncer de reto (n=30)	Sadios (n=18)	Valor de <i>P</i>
Gênero			
Masculino	16	8	0,551
Feminino	14	10	
Anos (idade média)	63 ± 23	46,5 ± 16,5	< 0,001*
Histórico familiar	10	8	0,440
Fumante			
Nunca	21	13	0,773
Sim	2	2	
Ex-fumante	7	3	
Consumo de álcool			
Não	22	10	0,206
Sim/Socialmente	8	8	

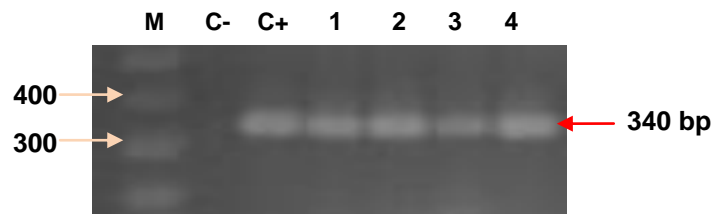
\* Valores baseados no Chi-square test ( $P < 0,05$ ).

### 5.2 Identificação das cepas de *Escherichia coli*

Das 48 amostras fecais coletadas, 192 cepas de *E. coli* foram isoladas e identificadas, correspondendo, 120 cepas de pacientes com câncer de reto e 72

cepas de indivíduos saudáveis. A identificação bacteriana em nível de espécie foi realizada por PCR 16S rRNA (Figura 9). As 192 cepas foram classificadas em 90 *E. coli* diarreio gênicas (DEC), 90 *E. coli* extra-intestinais (ExPEC) e 12 comensais, segundo a presença ou ausência dos genes de virulência avaliados, conforme o descrito no item 4.3 do Material e Métodos. Nos pacientes com CR, as cepas DEC, ExPEC e comensais foram isoladas em maior frequência que no grupo de indivíduos saudáveis, mas sem valores estatisticamente significativos (Tabela 5).

**Figura 9** - Detecção do gene 16S rRNA para *E. coli*



Legenda: Perfil de PCR em gel de agarose 1%. Colunas: M, marcador de peso molecular 1 kb ladder; C-, *Bacteroides fragilis* (controle negativo); C+, *E. coli* ATCC 25922 (controle positivo); 1, 2, 3, e 4, cepas isoladas de pacientes CR.

**Tabela 5** - Distribuição de 192 cepas DEC, ExPEC e comensais de *Escherichia coli* isoladas de fezes de 30 pacientes com câncer de reto e 18 indivíduos saudáveis.

Cepas de <i>E. coli</i>	Câncer de Reto		Sadios		Valor de <i>P</i>
	(n = 120)		(n = 72)		
	Nº	(%)	Nº	(%)	
DEC	59	(49,2)	31	(43,0)	0,411
ExPEC	53	(44,1)	37	(51,4)	0,332
COMENSAIS	8	(6,7)	4	(5,6)	0,759

Chi-square test,  $P < 0,05$  ( $\alpha = 0,05$ )

DEC (*Escherichia coli* diarreio gênicas)

ExPEC (*E. coli* extra-intestinais)



### 5.3 Classificação das *E. coli* diarreogênicas (DEC)

As cepas DEC foram observadas em ambas as amostras fecais dos pacientes com CR (59 cepas) e em indivíduos saudáveis (31 cepas) (Tabela 5). Na Tabela 7 se observa a classificação das cepas DEC em pacientes com e sem câncer. Dessas cepas, só as tEAEC de ambos os grupos apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,003$ ). Cepas STEC abrigoando o gene *stx-1* (Figura 10) foram observadas em um paciente com CR e em quatro indivíduos saudáveis, com valores significativos ( $P < 0,027$ ). Nenhuma cepa STEC abrigou o gene *stx-2*.

**Tabela 6** - Distribuição dos patótipos de 90 *Escherichia coli* (DEC) isolados de 30 pacientes com câncer de reto (59 cepas) e 18 indivíduos saudáveis (31 cepas)

Cepas de <i>E. coli</i>	Câncer de Reto		Sadios		Valor de <i>P</i>
	(n = 59)		(n = 31)		
	Nº	(%)	Nº	(%)	
aEPEC	22	(37,3)	15	(48,4)	0,309
tEAEC	26	(44,1)	4	(12,9)	0,003*
aEAEC	10	(16,9)	8	(25,8)	0,318
STEC ( <i>stx-1</i> )	1	(1,7)	4	(12,9)	0,027*
<b>TOTAL</b>	<b>59</b>	<b>(100)</b>	<b>31</b>	<b>(100)</b>	

Chi-square test,  $P < 0,05$  ( $\alpha = 0,05$ ).

aEPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica atípica

tEAEC: *E. coli* enteroagregativa típica

aEAEC: *E. coli* enteroagregativa atípica

STEC (*stx-1*): *E. coli* produtora de toxina shiga

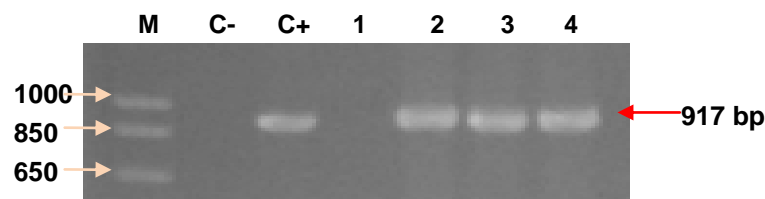
**Figura 10** - Detecção do gene *stx-1* na determinação do patótipo STEC.



Legenda: Perfil de PCR em gel de agarose 1%. Colunas: M, Marcador de peso molecular 1 kb ladder; C-, *E. coli* K12 (controle negativo); C+, EHEC-EDL933 (controle positivo); 1, 2, 3, 4, 5: amostras negativas (cepas PR23-1, PR25-1, PR27-3, PR27-2 e PR27-4); 6, amostra positiva (cepa PR28-1).

Das 90 cepas DEC, somente 22 cepas CR e 15 cepas de sadios foram classificadas como aEPEC sem diferenças significativas ( $P = 0,309$ ) (Tabela 6), por apresentaram o gene *eae* (Intimina) (Figura 11). Nenhuma das cepas EPEC apresentaram o gene *bfp* (bundle forming pili, pili tipo IV) sendo consideradas como aEPEC.

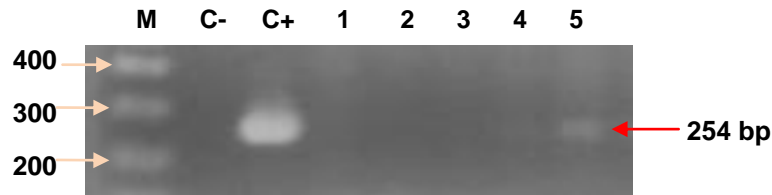
**Figura 11** - Detecção do patótipo EPEC pela presença do gene *eae*



Legenda: Perfil de PCR em gel de agarose 1%. Colunas: M, marcador de peso molecular 1kb; C-, *E. coli* K12 (controle negativo); C+, EPEC-E2348/69 (controle positivo); 1, cepa PR23-1 (amostra negativa); 2, 3, 4, amostras positivas (cepas PR23-1, PR23-2, PR23-3 e PR23-4).

O gene *aggR* foi observado em cepas tEAEC (Figura 12), sendo observadas em 44,1 % das cepas de pacientes com CR e em 12,9% das cepas de sadios. Pelo teste de Chi-Square se detectou significância estatística ( $P = 0,003$ ) entre as cepas tEAEC de CR e sadios.

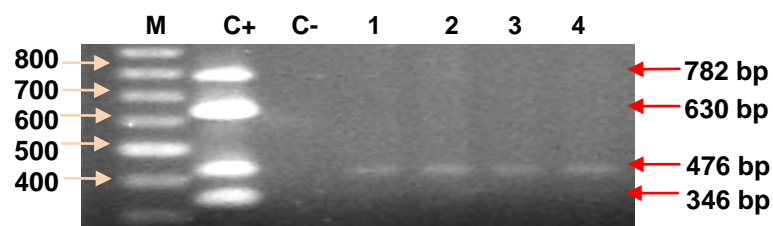
**Figura 12** - Detecção do patótipo tEAEC pela presença do gene *aggR*.



Legenda: Perfil de PCR em gel de agarose 1%. Colunas: M, Marcador de peso molecular 1kb ladder; C-, *E. coli* K12 (controle negativo); C+, cepa EAEC-042 (controle positivo); 1, 2, 3, 4, amostras negativas (cepas PR9-1, PR9-2, PR9-3 e PR9-4); 5, amostra positiva (cepa PR13-1).

As cepas aEAEC não abrigaram o gene *aggR* e foram identificadas por PCR multiplex pela detecção dos genes *aaiA*, *aaiG*, *aatA* (Figura 13). Nas cepas aEAEC abrigando somente o gene *aaiA*, era realizado o teste de adesão em células HEp-2 (Figura 14) para verificar o padrão de adesão agregativo característico das EAEC, segundo Andrade et al. (2014). A sua presença não mostrou diferenças significativas em cepas de ambos dos grupos de participantes ( $P = 0,318$ ) (Tabela 6).

**Figura 13** - Multiplex PCR na detecção de cepas aEAEC

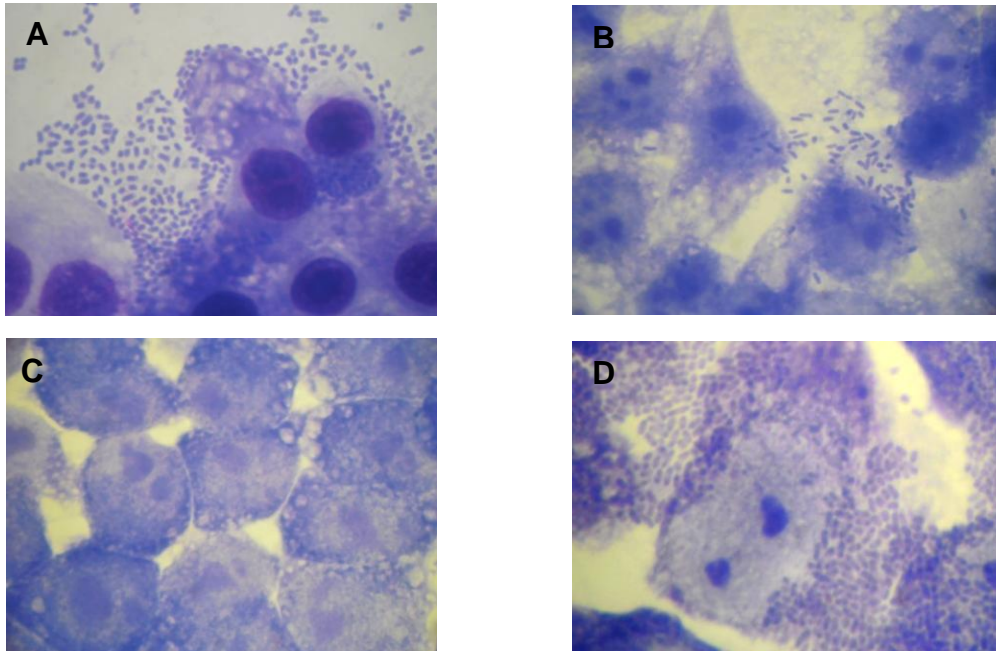


Legenda: Perfil de PCR em gel de agarose 1%. Colunas: M, Marcador de peso molecular 1kb ladder; C+, EAEC-042 (controle positivo) contendo os genes *aggR* (346 bp), *aaiA* (476 bp), *aatA* (630 bp) e *aaiG* (782 bp); C-, *E. coli* K12 (controle negativo); 1, 2, 3, 4: amostras abrigando o gene *aaiA* (cepas PS1.1-1, PS1.1-2, PS1.1-3, e PS1.1-4).

Cepas pertencentes aos patótipos ETEC (LT e ST) e EIEC não foram detectados nas amostras clínicas avaliadas. Interessantemente, em amostras de quatro pacientes com CR (PR19, PR33, PR36 e PR40) foram observadas associações entre os patótipos aEPEC e tEAEC; e em dois pacientes com CR

(amostras PR2 e PR13), as oito bactérias isoladas pertenceram somente ao patótipo tEAEC.

**Figura 14** - Adesão de cepas aEAEC em células HEp-2



Legenda: A) aEAEC (adesão agregativa); B) ExPEC (adesão não agregativa); C) Sem bactéria (controle negativo); e D) tEAEC O42 (adesão agregativa). (Observação microscópica 1.000X).

#### 5.4 Determinação de *E. coli* extra-intestinal (ExPEC)

A avaliação dos genes de virulência foi realizada em todas as cepas de *E. coli* especificamente para determinar as cepas ExPEC (positivas para mais de dois dos nove genes de virulência avaliados). As cepas comensais foram definidas pela ausência de algum dos genes avaliados ou pela presença de pelo menos um deles (Tabela 5).

Como observada na Tabela 7, nas 53 cepas ExPEC avaliadas, os genes de *papA* e *cnf-1* foram carregados por <50% das cepas isoladas de pacientes com CR. Da mesma forma, os genes *papA*, *afa/dra* e *ibeA* estiveram presentes em <50% das 37 cepas isoladas de indivíduos saudáveis.

A relação estatística entre cepas de pacientes com CR e indivíduos saudáveis para a presença dos genes *afa/dra* ( $P = 0,000$ ), *iutA* ( $P = 0,041$ ) e *cnf-1* ( $P = 0,029$ ) mostraram valores estatisticamente significativos.

**Tabela 7** - Detecção de genes de virulência em 90 cepas ExPEC isoladas de pacientes com câncer de reto e indivíduos saudáveis.

Genes alvo	Origem das ExPEC				Valor de <i>P</i>
	Cancer (n = 53)		Sadio (n = 37)		
	Nº	(%)	Nº	(%)	
<i>papA</i>	18	(34,0)	13	(35,1)	0,908
<i>papC</i>	45	(84,9)	27	(73,0)	0,164
<i>sfa/foc</i>	33	(62,3)	26	(70,3)	0,432
<i>afa/Dra</i>	35	(66,0)	6	(16,2)	0,000*
<i>iutA</i>	51	(96,2)	31	(83,8)	0,041*
<i>Kps</i>	46	(86,8)	28	(75,7)	0,175
<i>ibeA</i>	29	(54,7)	14	(36,8)	0,115
<i>hlyA</i>	32	(60,4)	23	(62,2)	0,864
<i>cnf1</i>	22	(41,5)	24	(64,9)	0,029*

Chi-square test,  $P < 0,05$  ( $\alpha=0,05$ )

Gene *papA*: subunidade maior da Proteína estrutural da fímbria P

Gene *papC*: Proteína de membrana externa da fímbria P

Gene *sfa/foc*: Adesina fimbrial S-F1C

Gene *afa/dra*: Adesina antígeno específico Dr

Gene *iutA*: Aerobactina (sideróforo)

Gene *kpsMT-II*: síntese da Cápsula

Gene *ibeA*: Proteína de invasão

Gene *hlyA*: alfa hemolisina

Gene *cnf1*: Fator de necrose citotóxico tipo 1.

Na Tabela 8 podem se observar as 39 diferentes combinações gênicas apresentadas pelas 53 cepas ExPEC isoladas de CR. Na Tabela 9 se observam as 24 combinações das 37 cepas de indivíduos sadios. Foram observadas combinações formadas por 2 a 8 genes. Nenhuma das cepas apresentou os nove genes avaliados.

A detecção dos nove genes avaliados para a identificação de fatores de virulência das *E. coli* estão representadas das Figura 20 à Figura 28 (Anexo II).

**Tabela 8** - Combinações gênicas em 53 cepas ExPEC isoladas de pacientes com câncer de reto

Combinação de genes	Cepas (n = 53)	
	Nº	%
papA + papC + sfa/foc + afa/dra + iutA + kps + ibeA + cnf1	1	1,87
papA + papC + sfa/foc + afa/dra + iutA + kps + hlyA + cnf1	1	1,87
papA + papC + sfa/foc + iutA + kps + ibeA + hlyA + cnf1	1	1,87
papC + sfa/foc + afa/dra + iutA + kps + ibeA + hlyA + cnf1	4	7,55
papA + papC + afa/dra + iutA + kps + hlyA + cnf1	1	1,87
papC + sfa/foc + afa/dra + iutA + kps + hlyA + cnf1	3	5,66
papC + sfa/foc + afa/dra + iutA + kps + ibeA + hlyA	4	7,55
papC + sfa/foc + afa/dra + iutA + ibeA + hlyA + cnf1	1	1,87
papC + afa/dra + iutA + kps + ibeA + hlyA + cnf1	1	1,87
papA + papC + sfa/foc + afa/dra + iutA + kps	1	1,87
papA + papC + sfa/foc + iutA + kps + ibeA	1	1,87
papA + papC + afa/dra + iutA + kps + ibeA	4	7,55
papA + papC + iutA + kps + hlyA + cnf1	1	1,87
papC + sfa/foc + afa/dra + iutA + kps + hlyA	1	1,87
papC + sfa/foc + afa/dra + iutA + ibeA + hlyA	1	1,87
papC + sfa/foc + afa/dra + iutA + kps + ibeA	1	1,87
papC + sfa/foc + iutA + kps + hlyA + cnf1	1	1,87
papC + sfa/foc + iutA + kps + ibeA + hlyA	1	1,87
papC + iutA + kps + ibeA + hlyA + cnf1	1	1,87
sfa/foc + afa/dra + iutA + kps + ibeA + hlyA	1	1,87
papA + papC + sfa/foc + iutA + ibeA	1	1,87
papA + papC + afa/dra + iutA + kps	2	3,77
papC + sfa/foc + afa/dra + iutA + ibeA	1	1,87
papC + afa/dra + iutA + kps + ibeA	1	1,87
papC + afa/dra + iutA + hlyA + cnf1	2	3,77
papC + iutA + kps + hlyA + cnf1	1	1,87
sfa/foc + afa/dra + iutA + kps + ibeA	1	1,87
sfa/foc + iutA + kps + ibeA + hlyA	1	1,87
sfa/foc + iutA + kps + hlyA + cnf1	1	1,87
papA + papC + iutA + kps	1	1,87
papA + papC + kps + hlyA	1	1,87
papA + sfa/foc + afa/dra + iutA	1	1,87
papC + iutA + kps + ibeA	1	1,87
papC + iutA + kps + hlyA	2	3,77
sfa/foc + afa/dra + iutA + kps	1	1,87
papC + iutA + kps	1	1,87
papC + hlyA + cnf1	1	1,87
sfa/foc + iutA + kps	1	1,87
iutA + kps	1	1,87

**Tabela 9** - Combinações gênicas em 37 cepas ExPEC isoladas de indivíduos sadios sem câncer

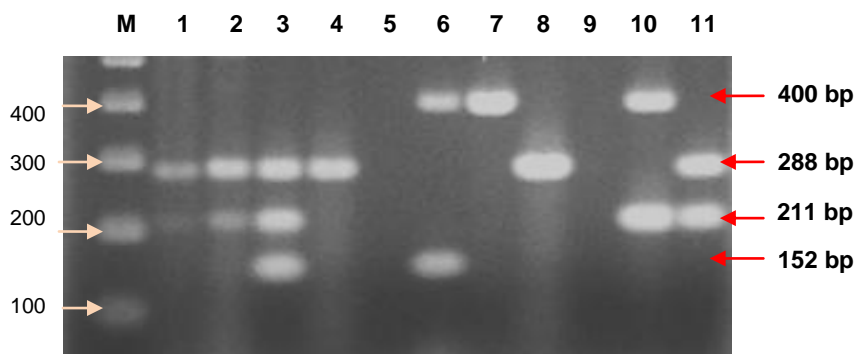
Combinação de genes	Cepas (n = 37)	
	Nº	%
papA + papC + sfa/foc + afa/dra + iutA + kps + hly + cnf1	2	5,41
papA + papC + sfa/foc + iutA + kps + ibeA + hlyA + cnf1	1	2,70
papC + sfa/foc + afa/dra + iutA + kps + ibeA + hlyA + cnf1	2	5,41
papA + papC + sfa/foc + iutA + kps + hlyA + cnf1	6	16,22
papC + sfa/foc + afa/dra + iutA + kps + ibeA + hlyA	1	2,70
papC + sfa/foc + iutA + kps + ibeA + hlyA + cnf1	3	8,11
papC + sfa/foc + afa/dra + iutA + kps + ibeA	1	2,70
papC + sfa/foc + iutA + kps + hlyA + cnf1	1	2,10
sfa/foc + afa/dra + iutA + kps + ibeA + hlyA	1	2,10
papA + papC + sfa/foc + iutA + cnf1	2	5,41
papA + papC + iutA + kps + cnf1	1	2,70
papC + sfa/foc + iutA + hlyA + cnf1	2	5,41
papC + sfa/foc + ibeA + cnf1	1	2,70
papC + kps + ibeA + hlyA	1	2,70
sfa/foc + iutA + ibeA + hlyA	1	2,70
papA + iutA + kps	1	2,70
papC + sfa/foc + cnf1	1	2,70
papC + kps + cnf1	1	2,70
sfa/foc + iutA + kps	1	2,70
ibeA + hlyA + cnf1	1	2,70
papC + iutA	1	2,70
iutA + kps	3	8,11
iutA + cnf1	1	2,70
ibeA + cnf1	1	2,70



### 5.5 Tipificação dos filogrupos de *E. coli*

Seguindo-se a metodologia de Clermont et al. (2013) e usando-se o PCR multiplex, conseguiu-se uma boa determinação dos filogrupos das cepas avaliadas, conforme observada na Figura 15.

**Figura 15** - Determinação dos filogrupos de *E. coli* das cepas de pacientes com CR e sadios



Legenda: Perfil de PCR em gel de agarose 1,5 %. Colunas: M, Marcador de peso molecular 1 kb ladder; 1, Grupo B2 (cepa PR1-1); 2, Grupo B2 (cepa PR10-1); 3, Grupo B2 (cepa PS1-1); 4, Grupo F (cepa PR3-2); 5 e 9, *E. fergusonii* ATCCC 35469 (controle negativo); 6, Grupo B1 (cepa PR27-3); 7, Grupo A (cepa PR3-3); 8, Grupo F (cepa PR30-1); 10, Grupo A/C (cepa PS2-1); 11, Grupo B2 (cepa PS5-2).

Na Tabela 10 pode ser observado que a maioria das cepas *E. coli* isoladas de ambos os grupos de participantes, pertenceram ao filogrupo B2. Nenhuma cepa de paciente sadio avaliada pertenceu aos filogrupos D ou E.

O filogrupo B2 foi observado em 55,2% do total das cepas avaliadas, o filogrupo A em 15,6%, e o filogrupo B1 em 13,5%. Cepas pertencentes aos filogrupos C, D, E, F e *Escherichia* Clado I foram observadas em < 6% das cepas (Tabela 10).

As cepas pertencentes ao filogrupo B1 mostraram valores estatisticamente significativos ( $P = 0,006$ ) entres as cepas de sadios e de CR. Da mesma forma, o filogrupo F nas cepas de CR mostrou diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,045$ ) em relação às cepas de sadios.

**Tabela 10** - Tipificação dos filogrupos das 120 cepas de *Escherichia coli* isoladas de pacientes com câncer de reto e indivíduos saudáveis

Filogrupos	<i>E. coli</i>			Valor de <i>P</i>
	Câncer	Sadios	Total	
	n = 120	n = 72	n = 192	
	N° (%)	N° (%)	N° (%)	
<b>A</b>	18 (15,0)	12 (16,7)	30 (15,6)	0,758
<b>B1</b>	10 (8,3)	16 (22,2)	26 (13,5)	0,006*
<b>B2</b>	68 (56,7)	38 (52,8)	106 (55,2)	0,600
<b>C</b>	7 (5,8)	2 (2,8)	9 (4,7)	0,332
<b>D</b>	1 (0,8)	0 (0,0)	1 (0,5)	0,437
<b>E</b>	5 (4,2)	0 (0,0)	5 (2,6)	0,079
<b>F</b>	10 (8,3)	1 (1,4)	11 (5,7)	0,045*
<b>Clado I</b>	1 (0,8)	3 (4,2)	4 (2,1)	0,117

Chi-square test,  $P < 0,05$ ; ( $\alpha=0,05$ )

Na Tabela 11 observa-se a tipificação dos filogrupos das cepas DEC, ExPEC e comensais avaliadas. O filogrupo B1 foi detectado com valores estatisticamente significativos entre as cepas aEPEC de CR ( $P = 0,047$ ), comensais ( $P = 0,012$ ) e ExPEC ( $P = 0,012$ ). As cepas ExPEC pertencentes ao Clado I também mostraram diferenças significativas ( $P = 0,035$ ).

Os filogrupos C e F agruparam cepas aEPEC, tEAEC, e ExPEC de CR. O filogrupo E agrupou cepas tEAEC, ExPEC e comensais de pacientes com CR, e o filogrupo D foi observado somente em uma cepa comensal de CR (Tabela 11).

**Tabela 11** - Filogrupos de *E. coli* segundo a classificação de DEC, ExPEC ou comensal das 120 cepas de *Escherichia coli* isoladas de pacientes com câncer de reto e indivíduos saudáveis.

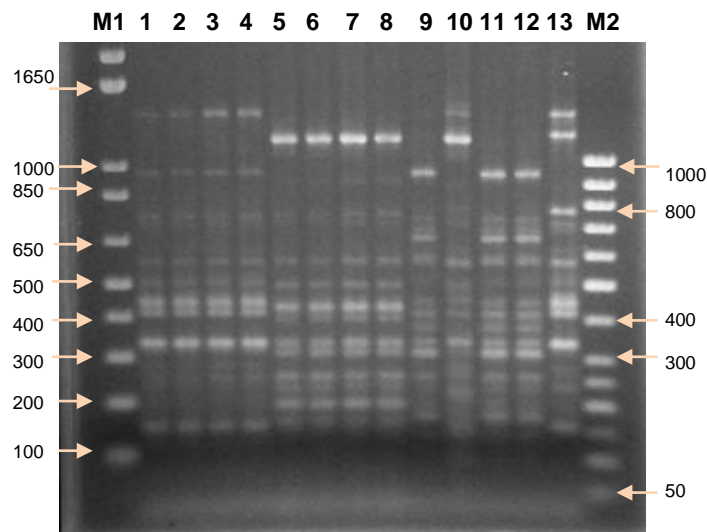
Filogrupo	aEPEC			tEAEC			aEAEC			STEC			Comensal			ExPEC		
	Câncer	Sadio	P	Câncer	Sadio	P	Câncer	Sadio	P	Câncer	Sadio	P	Câncer	Sadio	P	Câncer	Sadio	P
<b>A</b>	2 (9,10%)	3 (20,0%)	0,341	7 (26,9%)	2 (50,0%)	0,348	1 (10,0%)	0 (0%)	0,357	0 (0%)	0 (0%)	ND	3 (37,5%)	2 (50,0%)	0,679	5 (9,40%)	5 (13,5%)	0,545
<b>B1</b>	5 (22,7%)	0 (0%)	<b>0,047*</b>	0 (0%)	0 (0%)	ND	1 (10,0%)	4 (50,0%)	0,06	0 (0%)	0 (0%)	ND	0 (0%)	2 (50,0%)	<b>0,012*</b>	4 (7,50%)	10 (27%)	<b>0,012*</b>
<b>B2</b>	11 (50,0%)	10 (66,7%)	0,315	15 (57,7%)	2 (50,0%)	0,773	8 (80,0%)	4 (50,0%)	0,180	1 (100%)	4 (100%)	ND	2 (25,0%)	0 (0%)	0,273	31 (58,5%)	18 (48,6%)	0,356
<b>C</b>	2 (9,10%)	2 (13,3%)	0,683	1 (37,0%)	0 (0%)	0,696	0 (0%)	0 (0%)	ND	0 (0%)	0 (0%)	ND	0 (0%)	0 (0%)	ND	4 (7,50%)	0 (0%)	0,087
<b>D</b>	0 (0%)	0 (0%)	ND	0 (0%)	0 (0%)	ND	0 (0%)	0 (0%)	ND	0 (0%)	0 (0%)	ND	1 (11,1%)	0 (0%)	0,488	0 (0%)	0 (0%)	ND
<b>E</b>	0 (0%)	0 (0%)	ND	2 (7,70%)	0 (0%)	0,566	0 (0%)	0 (0%)	ND	0 (0%)	0 (0%)	ND	2 (25,0%)	0 (0%)	0,273	1 (19,0%)	0 (0%)	0,401
<b>F</b>	1 (4,50%)	0 (0%)	0,403	2 (7,70%)	0 (0%)	0,566	0 (0%)	0 (0%)	ND	0 (0%)	0 (0%)	ND	0 (0%)	0 (0%)	ND	8 (15,1%)	2 (5,30%)	0,139
<b>CLADO I</b>	1 (4,50%)	0 (0%)	0,403	0 (0%)	0 (0%)	ND	0 (0%)	0 (0%)	ND	0 (0%)	0 (0%)	ND	0 (0%)	0 (0%)	ND	0 (0%)	3 (8,10%)	<b>0,035*</b>
<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>15</b>		<b>26</b>	<b>4</b>		<b>10</b>	<b>4</b>		<b>1</b>	<b>4</b>		<b>8</b>	<b>4</b>		<b>53</b>	<b>37</b>	

Chi-square test,  $P < 0,05$  ( $\alpha=0,05$ ) . ND: Sem dados positivos suficientes para realizar os teste de Chi-square.

## 5.6 Tipificação molecular de *E. coli* por ERIC-PCR

A tipificação das cepas pelo teste de ERIC-PCR, segundo a metodologia de Versalovic et al. (1991) mostrou-se muito reprodutível, formando bandas claras e nítidas (Figura 16). Esta técnica foi utilizada para avaliar as relações filogenéticas das cepas aEPEC, EAEC (típicas e atípicas) e ExPEC isoladas de ambos os grupos de participantes.

**Figura 16** - Perfis de ERIC-PCR de 13 cepas de *E. coli* isoladas de pacientes com câncer de reto e sadios



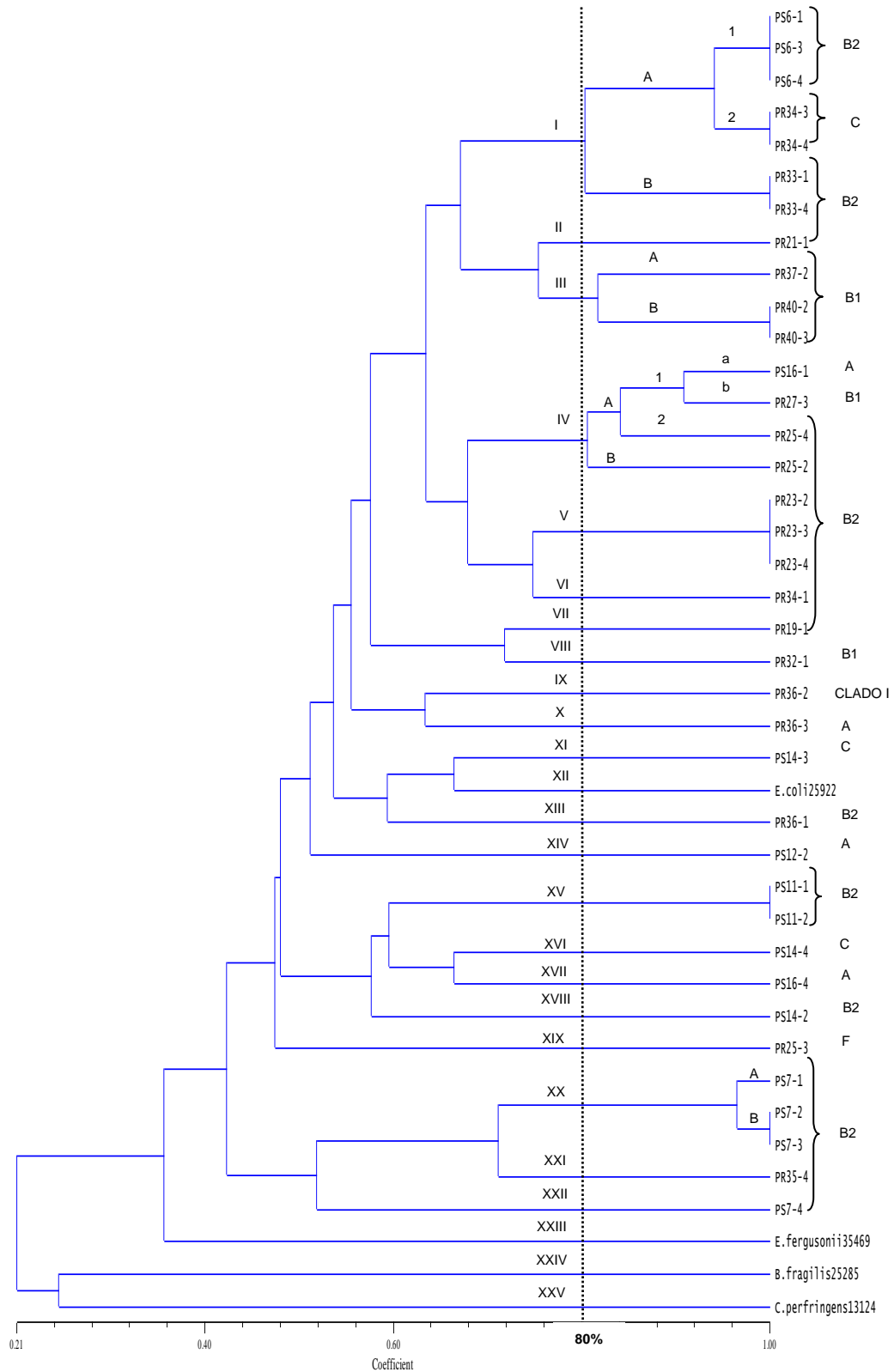
Legenda: Perfil de PCR em gel de agarose 1,5 %. Colunas: M1, 1 kb plus ladder; 1 – 13, DNA das cepas avaliadas; M2, 100 bp ladder.

Pelo ERIC-PCR as 37 aEPEC isoladas de CR e sadios foram agrupadas em 22 clusters (I a XXIV) com 80% de similaridade (Figura 17). *Escherichia* Clado I formada por uma cepa de CR foi agrupada no cluster IX (2,8%). 64,9% das cepas pertencentes ao filogruppo B2 foram agrupadas nos clusters I, II, IV-VII, XIII, XV, XX-XXII. 2,8% das cepas foram agrupadas no filogruppo F, e evidenciou-se a mesma porcentagem (13,51%) para as cepas que formaram os filogruppos A, B1 e C, e.

Somente os clusters I e IV agruparam simultaneamente cepas de CR e saudáveis (Figura 26). Interessantemente, nessa Figura, os clones encontrados nos clusters I, III, V e XV agruparam cepas da mesma origem, isto é, cepas de CR ou de sadios, e foram distribuídos nos filogrupos B1, B2 e C.

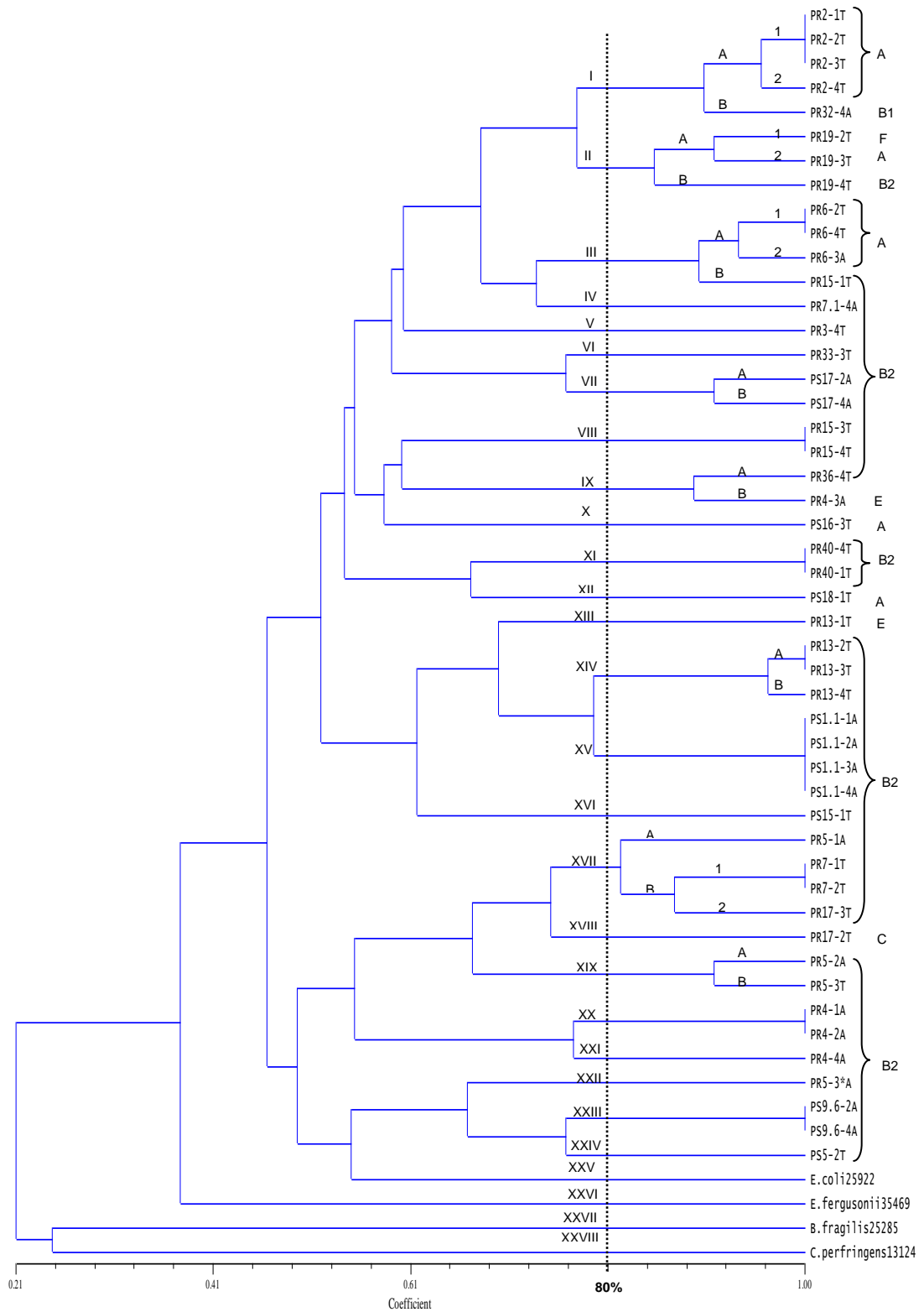
Na Figura 18 observa-se a formação de 24 clusters originados pelas 18 cepas aEAEC e 30 cepas tEAEC. Os filogrupos foram distribuídos em: B2 com 29 (60,42%) cepas; A com 10 (20,83%) cepas; B1 com 5 (10,42%) cepas; E com 2 (4,17%) cepas; C e F, com uma (2,08%) cepa cada. Não foram observados clusters contendo simultaneamente cepas de CR e saudáveis. As cepas de referência *E. coli* ATCC 25922, *E. fergusonii* ATCC 35469, *B. fragilis* ATCC 25285 e *C. perfringens* ATCC 13124 formaram os clusters XXV, XXVI, XXVII e XXVIII, respectivamente.

Na Figura 19 observa-se o agrupamento filogenético das 90 cepas ExPEC formando 36 clusters. 49 (54,4%) cepas formaram o filogrupo B2, 14 (15,6%) cepas o filogrupo B1, 10 (11,1%) cepas o filogrupo A, 9 (10%) cepas o filogrupo F, 4 (4,4%) cepas o filogrupo C, 3 (3,3%) cepas o Clado I, e 1 (1,1%) cepa o filogrupo E. Os filogrupos C, D, E e F agruparam somente cepas de CR. O filogrupo B2 agrupou 11 clones bacterianos em 9 clusters (IV, VI, VII, VIII, X, XI, XIII, XIV e XXXIV); o filogrupo B1 mostrou 3 clones nos clusters XXI e XXX; o filogrupo A com 2 clones (Clusters XVI e XXVIII); e os filogrupos C, F e Clado I, mostraram 1 cepa cada (Clusters XVII, XXXIII e XXIX, respectivamente). As cepas de referência *E. coli* ATCC 25922 foi agrupada no cluster XXIII, e *E. fergusonii* ATCC 35469, *B. fragilis* ATCC 25285 and *C. perfringens* ATCC 13124, foram agrupadas nos clusters XXXVIII, XXXIX e XL, respectivamente.



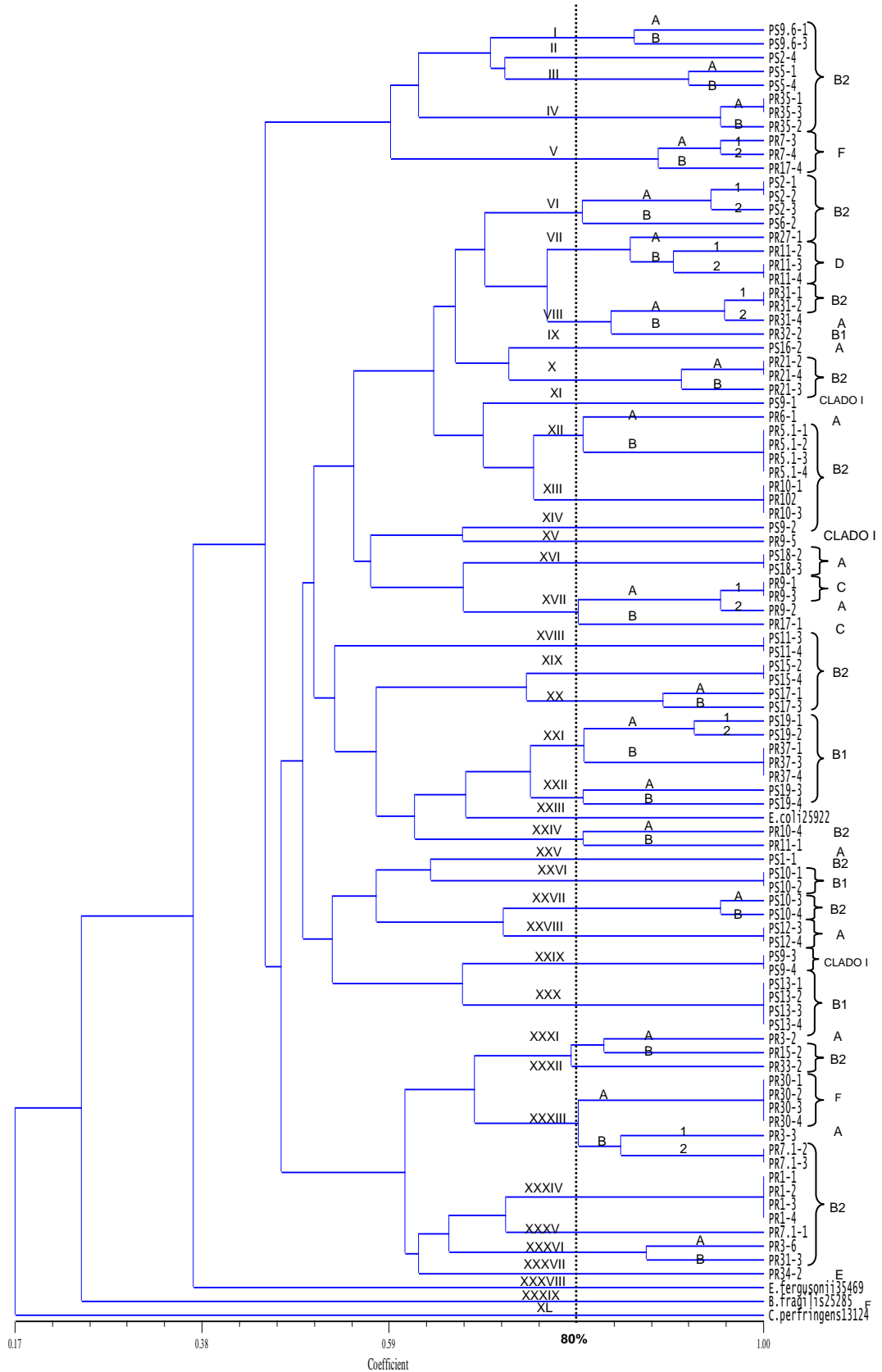
**Figura 17** - Dendrograma mostrando as relações filogenéticas e os filogrupos de 37 cepas de *E. coli* enteropatogênicas (aEPEC) isoladas de pacientes com câncer de reto e indivíduos saudáveis (Coeficiente Dice com 80% de similaridade).

Legenda: I-XXV (clusters), PR (isolados de pacientes com CR), PS (isolados de indivíduos saudáveis)



**Figura 18** - Dendrogramas mostrando as relações filogenéticas e os filogrupos de 48 cepas típicas e atípicas de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) isoladas de pacientes com câncer de reto e indivíduos saudáveis (Coeficiente Dice com 80% de similaridade).

Legenda: I-XXVIII (clusters), PR (isolados de pacientes com CR), PS (isolados de indivíduos saudáveis), A (cepa EAEC atípica), T (cepa EAEC típica)



**Figura 19 -** Dendrograma mostrando as relações filogenéticas e os filogrupos de 90 cepas de *E. coli* extra-intestinal (ExPEC) isoladas de pacientes com câncer de reto e indivíduos sadios (Coeficiente Dice com 80% de similaridade).

Legenda: I-LX (clusters), PR (isolados de pacientes com CR), PS (isolados de indivíduos sadios)



## 6 DISCUSSÃO

O câncer de cólon e/ou reto é considerado um grave problema de Saúde Pública no Brasil e no mundo inteiro. Devido ao aumento de novos casos observados todo ano, os níveis de morbidade e mortalidade por esses processos são elevados, especialmente em países da América do Sul (ARNOLD, 2016). Estudos vêm sendo realizados na direção de encontrar potenciais fatores que estariam envolvidos no desenvolvimento desses tipos de cânceres (ARVELO; SOJO; COTTE, 2015; COMPARE; NARDONE, 2014). Fatores genéticos, dieta, alterações microbianas e a produção de determinados produtos metabólicos podem ser responsáveis pela contribuição para o início e progressão dessa doença (KOSTIC et al., 2013). Comumente, as lesões iniciais são constituídas por pólipos ou adenomas (benignos), que em alguns casos, podem-se tornar malignas (CUNNINGHAM et al., 2010; LABIANCA et al., 2010).

Neste estudo, foi avaliada a presença de cepas de *E. coli* e seus diferentes patótipos em pacientes com câncer de reto e indivíduos sadios. Nossos resultados mostram que os pacientes com CR apresentaram idade média de  $63 \pm 23$  anos, reforçando dados da literatura em relação à prevalência desses processos com o aumento da idade, sendo também observada uma diferença estatisticamente significativa em relação aos indivíduos sadios (idade média  $46,5 \pm 16,5$  anos) ( $P < 0,001$ ) (Tabela 4).

Por outro lado, embora outros fatores como o tabagismo (LIANG et al., 2009) e o excessivo consumo de álcool (CHAN et al., 2011) tenham sido também relacionados com o desenvolvimento do CCR, em nosso estudo, os pacientes analisados não mostraram valores significativos para esses fatores. Em relação ao gênero e histórico familiar de câncer, também, não foram observadas diferenças, o que sugere que esse processo seja de caráter esporádico adquirido e sem predisposição genética, segundo a definição de Arvelo, Sojo e Cotte (2015).

No intestino humano as comunidades microbianas são complexas e diversas, tanto na mucosa como no lúmen intestinal, e cumprem papéis importantes na saúde e na doença. Tjalsma et al. (2012) e Wu et al. (2013), relataram que as alterações anatômicas e fisiológicas intestinais iniciais produzidas pelo câncer levaria à super-

população de alguns microrganismos patobióticos, como *E. coli* que atuaria como uma bactéria driver.

Estudos realizados na população chinesa analisando-se os microbiomas em indivíduos com diferentes estágios de CCR e indivíduos saudáveis mostraram fortes evidências de desequilíbrio nos intestinos danificados, com elevada prevalência de espécies de *Enterococcus*, *Escherichia*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Streptococcus* e *Peptostreptococcus* (WANG et al., 2012; WU et al., 2013). Já análises comparativas mostram que *E. coli* estaria presente em maior concentração nas amostras de CCR do que em tecidos saudáveis (ARTHUR et al., 2012; BUC et al., 2013).

Dentre os patótipos de *E. coli* encontrados em nossos pacientes (DEC, ExPEC e comensais), as ExPEC estiveram presentes em maior proporção nos indivíduos saudáveis, o que era esperado, uma vez que essas cepas colonizam o trato intestinal de indivíduos saudáveis e doentes, sem causar doença gastrointestinal (JOHNSON; RUSSO, 2002). Além disso, essas cepas podem atuar como colonizadoras mais efetivas do que as comensais, devido à expressão de certos fatores de virulência, como fímbrias, facilitando assim, sua persistência no cólon (WOLD et al., 1992).

A literatura tem mostrado a participação de cepas geneticamente relacionadas às ExPEC em pacientes com CCR e com doença inflamatória do trato gastrointestinal, as quais carregam uma alta variedade de genes envolvidos na virulência das cepas sugerindo-se que, nesse ecossistema intestinal alterado, esses genes e seus produtos ativariam as vias inflamatórias no sítio de desenvolvimento do tumor (BRONOWSKY et al., 2008; VEJBORG et al., 2011).

Embora, pesquisas relacionadas ao CCR não relatem a presença de cepas DEC, em nosso estudo, foram recuperadas 90 cepas, e é provável que, os fatores de virulência e mecanismos de patogenicidade que elas produzem, podem causar alguma alteração nas células epiteliais intestinais. Segundo Swidsinski et al. (1998), a elevada presença de *E. coli* nos pacientes com CCR estaria associada de alguma maneira à sua progressão por meio da expressão anormal de antígenos de superfície promovendo a adesão e colonização bacteriana, colaborando para um comportamento *driver*, sendo capaz de quebrar o DNA e provocando o aumento de mutações nas células infectadas (NOUGAYRÈDE et al., 2006).

Estudos têm mostrado que cepas EPEC são raramente encontradas em indivíduos adultos saudáveis, e em crianças causam diarreia (SANCHEZ et al., 2006). Dados epidemiológicos, no Brasil e em outras partes do mundo, mostram a elevada prevalência das aEPEC sobre as tEPEC em pacientes sintomáticos e assintomáticos (BUERIS et al., 2007; BENEVIDES–MATOS et al., 2015; LOZER et al., 2013; SHETTY et al., 2012).

Neste estudo, cepas aEPEC foram isoladas em elevado número em ambos os grupos dos pacientes analisados, mas não foram observados valores estatisticamente significativos, o que pode sugerir que sua presença não teria alguma relação com o tipo de processo analisado neste estudo. Também, reforça a definição de serem considerados patógenos emergentes, e sua participação em indivíduos sintomáticos e assintomáticos estaria relacionada à susceptibilidade do hospedeiro (HU; TORRES, 2015), embora seja necessário estudar os mecanismos que essa bactéria utiliza para se manter estável em pacientes com CR e indivíduos saudáveis.

Segundo Maddocks et al. (2009) e Maddocks et al (2013), a infecção crônica por cepas EPEC em adultos assintomáticos poderia promover a tumorigênese nas células do cólon, porque elas expressam efetores protéicos com efeitos sob a expressão das proteínas de reparo do DNA, que têm a função de proteger à célula contra o acúmulo de mutações. A presença de cepas aEPEC observada em nossos pacientes com câncer pode indicar alguma participação no desencadeamento do CR. Esta hipótese deve ser vista com muita cautela, uma vez que faltam maiores estudos sobre este patótipo e em maior número de pacientes avaliados.

Recentemente, Magdy et al. (2015), relataram a presença de tEPEC em pacientes com câncer de cólon e indivíduos saudáveis, sugerindo que a colonização intestinal por essas cepas poderia ser uma das causas do câncer colorretal, já que certas cepas bacterianas produzem metabólitos ou toxinas que danificam o DNA, particularmente das células do cólon. Interessantemente, Buc et al. (2013), encontraram três cepas isoladas de 38 pacientes de CCR, as quais além de produzir o efector T3SS e a ciclomodulina CIF (Fator inibidor do ciclo), também possuíam o gene *eae* que é comumente observado em EPEC. Certamente, essas cepas EPEC cumprem algum papel importante no CR, mas isto necessita ser profundamente investigado.

As cepas tEAEC e aEAEC têm sido observadas como causadoras de processos diarreicos em crianças e em adultos de países desenvolvidos e em desenvolvimento (BUERIS et al., 2007; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004, SHETTY et al., 2012), e estão relacionadas com a produção de enterotoxinas e citotoxinas, produzindo inflamação e invasão da superfície da mucosa intestinal (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Na literatura nacional se observa a prevalência de isolamento do patótipo EAEC (10,7% a 74%) em material fecal de crianças sintomáticas e assintomáticas, e isto sugere que, EAEC pode ser considerado patógeno emergente responsável pelos casos de diarreia aguda e persistente, envolvendo uma complexa ação de fatores de virulência (BENEVIDES-MATOS et al., 2015; BUERIS et al., 2007; NUNES et al., 2013). Em nosso estudo, a presença de cepas tEAEC e aEAEC foi maior em pacientes com câncer de reto do que em indivíduos saudáveis, e é provável que esses patótipos, devido à produção de citoxinas induzindo a síntese de IL-8, possam estar envolvidos no processo inflamatório e/ou no desenvolvimento de adenomas ou carcinomas (CROXEN; FINLAY, 2010).

Por outro lado, alguns pesquisadores não relacionam a presença desses microrganismos EAEC com o câncer de cólon, e sim com cepas geneticamente relacionadas com as ExPEC e à doença de Crohn (DARFEUILLE-MICHAUD et al., 1998; RAISCH et al., 2014). Isto sugere que, a presença das EAEC (típicas e atípicas) pode aumentar nos processos infecciosos, devido a sua característica emergente, como já sugerido por Shetty et al. (2012) e Benevides-Matos et al. (2015). Além demais, o fato de essas cepas EAEC terem sido encontradas em porcentagens maiores nos pacientes com CR, mostra também alguma participação nesse processo, e o sinergismo bacteriano entre EAEC típicas e atípicas ou com outros patótipos deve ser investigado.

Cepas STEC ou VTEC estão relacionadas com processos diarreicos sanguinolentos, não sanguinolentos, e síndrome urêmica hemolítica, sendo agrupadas em cepas produtoras de toxinas STX-1 e STX-2 (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). A expressão dessas toxinas, particularmente a STX-1, causa a inibição da fase S do ciclo celular, e inicia a apoptose em células de câncer de cólon humano, o que vem sendo avaliado como possível aplicação terapêutica, já que nos últimos 20 anos muitas das toxinas bacterianas têm emergido como agentes

terapêuticos com possíveis aplicações contra o câncer e doenças neurológicas, como a toxina botulínica (BHATTACHARJEE et al., 2005). A verotoxina-1 já foi testada contra tumores de meningioma maligno, um tipo de câncer no cérebro, obtendo-se resultados alentadores, onde o tratamento mostrou um aumento da apoptose e uma diminuição da proliferação celular (SALHIA et al., 2002).

Os escassos dados na literatura sobre a prevalência dos diferentes patótipos de *E. coli* em diferentes processos infecciosos, particularmente, câncer retal, dificulta a comparação clínica e estatística de nossos resultados. Algumas cepas de *E. coli* como as ExPEC colonizam de forma efetiva o intestino humano de forma assintomática (JOHNSON; RUSSO, 2002); além de produzirem proteínas denominadas sideróforos que participam da captação e transporte de ferro. Segundo Bullen et al. (2005), o caráter virulento das cepas é aumentado quando a disponibilidade de ferro está aumentado, favorecendo sua persistência nos tecidos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; WILES; LULESUS; MULVEY, 2008).

A maioria das *E. coli* avaliadas abrigaram os genes *iutA* e *kps* que mediam respectivamente, a produção de sideróforos e cápsula, promovendo a proteção bacteriana e uma eficiente colonização do intestino grosso (KATOULI, 2010). Em nosso estudo, poucas não abrigaram o gene *iut*, o que pode sugerir a provável existência de outro gene, não avaliado neste estudo, envolvido na aquisição de ferro, permitindo assim a adaptação às diferentes condições ambientais, isto é, intra- ou extra-intestinal. Okeke et al. (2004) referem que as cepas de *E. coli* que apresentam o gene *iutA* (aerobactina) estariam relacionadas à produção de diarreia em crianças.

Cepas ExPEC produzem adesinas mediadas pelos genes *sfa/foc*, *papA*, *papC*, e *afa/dra*, conferindo-lhes habilidade para se aderir e colonizar células intestinais e outros tecidos. Segundo Addleberth et al. (1995), a presença de fímbrias P, S e F1C incrementam a adesão aos enterócitos. Neste estudo, as cepas isoladas de CR apresentaram os genes *afa/dra* com valores estatisticamente significativos ( $P = 0,000$ ). Este resultado sugere que a presença desses elementos possibilita a adesão mais eficiente ao DAF (*Decay accelerating factor*), induzindo mais efetivamente a inflamação intestinal (ADDLEBERTH et al., 1995). A presença dessas adesinas tem sido identificada em cepas associadas à doença de Crohn,

infecção do trato urinário (UTI), e câncer de cólon (BRONOWSKY et al., 2008; BUC et al., 2013; DARFEUILLE-MICHAUD et al., 1998).

Estudos mostram que a toxina CNF-1 é produzida pela maioria das cepas de *E. coli* isoladas dos pacientes com CCR (BUC et al., 2013; RAISCH et al., 2014), conferindo proteção contra a apoptose, especialmente de células epiteliais com instabilidade genética. A maioria das cepas avaliadas neste estudo, abrigaram os genes *afa/dra*, *cnf-1*, *hlyA*, *kps*, *iutA*, *sfa/foc* e *papC*, e isto poderia representar um aumento na habilidade de adesão e persistência dessas cepas no epitélio intestinal.

Segundo Birösová et al. (2004) a presença do gene *hlyA* é frequentemente observada em cepas isoladas de fezes; e Jin et al. (2016), relatam que esse gene estaria relacionado aos efeitos citotóxicos e à morte das células intestinais. Os genes *hly* e *cnf-1* compartilham a mesma ilha de patogenicidade (PAI-II), e isto afeta a estrutura celular do epitélio intestinal contribuindo ao processo inflamatório (BUC et al., 2013, BUCKER et al., 2014; DUBOIS et al., 2010; MIRSEPASI-LAURINSEN et al., 2016).

As cepas ExPEC isoladas de pacientes com câncer de reto e de indivíduos saudáveis apresentaram até oito dos nove genes pesquisados, e isto sugere que esses microrganismos apresentam elevado arsenal virulento concordando com relatos de outros pesquisadores (PICARD et al., 1999; VEJBORG et al., 2011). A ocorrência de combinações de genes de virulência nestas bactérias pode ser explicada devido à transferência horizontal do material genético entre as células bacterianas, o que favoreceu a presença de vários perfis genéticos encontrados (JOHNSON; STELL, 2000; NUNES et al., 2013).

Em nosso estudo, a expressão desses genes não foi avaliada, mas, certamente, a presença de dois ou mais genes em uma cepa bacteriana pode exercer algum papel específico nos diferentes processos infecciosos. Devido à falta de relatos na literatura com relação à presença desses genes nas ExPEC de indivíduos com câncer de reto, torna-se difícil afirmar se determinadas associações gênicas poderiam estar envolvidas com o desenvolvimento de pólipos ou tumores.

A técnica de ERIC-PCR é uma ferramenta fácil e rápida para identificar a existência de clones ou variações genéticas nas cepas de enterobactérias. Os padrões de bandas gerados nas 175 cepas analisadas demonstraram a grande diversidade de *E. coli* isoladas de pacientes com câncer e de indivíduos saudáveis.

Os clusters gerados mostraram que algumas das cepas apresentaram perfis genéticos similares por ERIC-PCR. Interessantemente, isto só foi observado em cepas isoladas de um mesmo paciente, sugerindo que essas cepas seriam clones. Em cepas isoladas de surtos ou de amostras clínicas, o padrão de sequências similares gerado, poderia refletir contaminação cruzada, propagação clonal ou descendência de um mesmo antecessor (ATEBA e MBEWE, 2014; DIAS SIQUEIRA et al., 2013).

Para nosso conhecimento, a tipagem molecular pelo ERIC-PCR de *E. coli* enteroagregativa, enteropatogénica, e extra-intestinal, isoladas de pacientes com câncer de reto, e sua relação com os respectivos filogrupos, parece ser o primeiro relato na literatura. Esta técnica tem sido usada como poderosa ferramenta para poder discriminar a relação ou diversidade genética, e a significância epidemiológica de cepas isoladas de diferentes origens (DHANASHREE; SHRIKARA, 2012; DIAS SIQUEIRA et al., 2013).

A elevada diversidade observada em *E. coli* mostra que as ExPEC predominantemente pertencem ao filogrupo B2 e nenhuma ao filogrupo D. Cepas dos filogrupos A e B1 são frequentemente considerados patógenos intestinais ou comensais (ESCOBAR-PÁRAMO et al., 2004; KÖLHER; DOBRINT, 2011). A literatura mostra que em pacientes com CCR as *E. coli* isoladas pertencem ao filogrupo B2 e estão associadas à produção de ciclodulinas (BUC et al., 2013; RAISH et al., 2014), além disso, essas cepas aumentariam numericamente em pacientes com estágios de câncer mais avançados (BONNET et al., 2013). Contrariamente, Hashemizadeh, Kalantar-Neyestanaki e Mansouri (2017) e Lee et al. (2015), relataram que cepas fecais pertencem principalmente ao filogrupo B1, e o filogrupo B2 em cepas isoladas de UTI.

Escobar-Páramo et al. (2004), concluíram que cepas EHEC são classificadas nos grupos A e B, patovares EPEC nos grupos B1 e B2, e cepas EAEC distribuídas nos diferentes filogrupos de *E. coli*. A diferença com esses dados, as STEC de nosso estudo estiveram agrupadas no filogrupo B2, no entanto, as EAEC estiveram distribuídas nos filogrupos *stricto sensu* de *E. coli*, corroborando o dado obtido por Escobar-Paramo et al. (2004). O filogrupo B1 quando relacionado com as aEPEC, mostrou significância estatística ( $P = 0,047$ ), entanto que, o filogrupo F teve significância estatística em cepas CR em relação às de indivíduos sadios, o que

pode sugerir alguma relação desses filogrupos com o CR. Segundo Clermont et al. (2013), as cepas de EPEC podem ser encontradas nos filogrupos B1 e B2, e o filogrupo F é um filogrupo irmão do filogrupo B2. As cepas de EPEC poderiam manifestar seu poder patógeno no CCR, uma vez que, as cepas pertencentes ao filogrupo B2 tem sido relacionadas a esse tipo de câncer por serem mais virulentas (BUC et al., 2013; JIN et al., 2016; RAISH et al., 2014; VEJBORG et al., 2014).

Em pacientes com CR a colonização intestinal de patobiontes, como *E. coli*, assim como da resposta imune da mucosa intestinal, provoca a inflamação desse ambiente, o que pode ser crítico para o desenvolvimento do tumor, porém é necessário a expressão de genes associados ao desenvolvimento do câncer, como as toxinas citotóxicas e genotóxicas (ARTHUR et al., 2014; RAISCH et al., 2014).

No Brasil, estudos avaliando a presença de patótipos de *E. coli* em indivíduos com câncer de reto são escassos. Os resultados deste estudo sugerem maiores pesquisas para determinar o papel das DEC, particularmente, das aEPEC, tEAEC e ExPEC de forma individual ou em associação, avaliando-se o provável sinergismo e a co-infecção de diferentes patótipos nesses processos, assim como sua presença no trato intestinal em pacientes assintomáticos com câncer de reto.



## 7 CONCLUSÕES

Os dados deste estudo permitem concluir que:

1. Em pacientes com câncer de reto as cepas *E. coli* diarreiogênicas (DEC) predominam na microbiota fecal, sendo as aEPEC e tEAEC as mais significativas, e
2. O filogrupo B2 foi observado em maior proporção nas ExPEC, independente da diversidade genética observada entre as cepas analisadas.

## REFERÊNCIAS\*

- ADLERBERTH, I. et al. Adhesin of *Escherichia coli* associated with extra-intestinal pathogenity confer binding to colonic cells. **Microb. Pathog.**, v. 18, p. 373-385, 1995.
- ADLERBERTH, I; WOLD, A. Establishment of the gut microbiota in Western infants. **Acta Pediátr.**, v. 98, p. 229-238, 2009.
- AHN, J. et al. Human Gut Microbioma and Risk of Colorectal Cancer. **J. Natl. Cancer Int.**, v. 24, p.1907-1911, 2013.
- ANDRADE, F.B.; GOMES, T.A.T.; ELIAS, W.P. A sensitive and specific molecular tool for detection of both typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Microb. Meth.**, v. 106, p. 16-18, 2014.
- ANTÃO, E.M.; WIELER, L.H.; EWERS, C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Pathogens**, v. 1, p. 22, 2009.
- ARANDA, K.R.S. et al. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 267, p.145–150, 2007.
- ARANDA, K.R.S.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I.C.A. Evaluation of Multiplex PCRs for Diagnosis of Infection with Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 5849–5853, 2004.
- ARNOLD, M. et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. **Gut**, v. 0, p. 1-9, 2016.
- ARTHUR J.C. et al. Intestinal Inflammation Targets Cancer-Inducing Activity of the Microbiota. **Science**, v. 338, p. 120-123, 2012.
- ARTHUR, J.C; JOBIN, C. The complex interplay between inflammation, the microbiota and colorectal câncer. **Gut Microbes**, v. 4, p. 253-258, 2013.
- ARTHUR, J.C. et al. Microbial genomic analysis reveals the essential role of inflammation in bacteria-induced colorectal cancer. **Nat. Commun.**, v. 5, p. 4724, 2014.
- ARVELO, F.; SOJO, F.; COTTE, C. Biology of colorectal cancer. **ecancer**, v. 5, p. 520, 2015.

---

\*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- ATEBA, C.; MBEWE, M. Genotypic characterization of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from different sources in North West Province, South Africa, using enterobacterial Reetitive Intergenic Consensus PCR analysis. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 15, p. 9735-9747, 2014.
- BÄCKHED, F. et al. Defining a Healthy Human Gut Microbiome: Current Concepts, Future Directions, and Clinical Applications. **Cell Host & Microbe**, v. 12, p. 611-622. 2012.
- BARNICH, N. et al. Regulatory and functional co-operation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. **Mol. Microbiol.**, v. 48 p. 781-794, 2003.
- BARNICH, N.; DARFEUILLE-MICHAUD, A. Adherent-invasive *Escherichia coli* and Crohn's disease. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 23, p. 16-20, 2007.
- BEDANI, R.; ROSSI, E. A. Microbiota intestinal e probióticos: Implicações sobre o câncer de cólon. **J. Port. Gastreterol.**, v. 16, p. 19-28, 2009.
- BENEVIDES-MATOS, N. et al. Adherence and virulence genes of *Escherichia coli* from children diarrhoea in the Brazilian Amazon. **Braz. J. Microbiol.**, v. 46, p. 131-137, 2015.
- BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. Don J. Brenner, Noel R. Krieg, James T. Staley. Springer; v. 2, 2005.
- BHATTACHARJEE, R. et al. *Escherichia coli* verotoxin 1 mediates apoptosis in human HCT116 colon cancer cells by inducing overexpression of the GADD family of genes and S phase arrest. **FEBS Letters**, v. 579, p. 6604-6610, 2005.
- BIROSÖVÁ, E. et al. Detection of virulence factors in a-haemolytic *Escherichia coli* strains isolated from various clinical materials. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 10, p. 569-573, 2004.
- BONNET, M. et al. Colonization of the Human Gut by *E. coli* and Colorectal Cancer Risk. **Clin. Cancer. Res.**, v. 20, p. 859-867, 2014.
- BOOIJINK, C.C. et al. Microbial communities in the human small intestine: coupling diversity to metagenomics. **Future Microbiol.**, v. 2, p. 285-295, 2007.
- BOUDEAU, J. et al. Invasive Ability of an *Escherichia coli* Strain Isolated from the Ileal Mucosa of a Patient with Crohn's Disease. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 4499-4509, 1999.
- BRENNER, H.; KLOOR, M.; POX, C. Colorectal cancer. **Lancet**, v. 383, p. 1490-1502, 2014.
- BRINGER, M. et al. Replication of Crohn's disease-associated AIEC within macrophages is dependent on TNF- $\alpha$  secretion. **Lab. Invest.**, v. 92, p. 411-419, 2012.

- BRONOWSKY, C. et al. A subset of mucosa-associated *Escherichia coli* isolates from patients with colon cancer, but not Crohn's disease, share pathogenicity islands with urinary pathogenic *E. coli* **Microbiology**, v. 154, p. 571-583, 2008.
- BUC, E. et al. High Prevalence of Mucosa-Associated *E. coli* Producing Cyclomodulin and Genotoxin in Colon Cancer. **PLoS ONE**, 8: e56964, 2013.
- BÜCKER, R. et al.  $\alpha$ -Haemolysin of *Escherichia coli* in IBD: a potentiator of inflammatory activity in the colon. **Gut**, v. 63, p. 1893–1901, 2014.
- BUERIS, V. et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 839-844, 2007.
- BULLEN, J. et al. Iron and infection: the heart of the matter. **FEMS Immun. Medic. Microbiol.**, v. 43, p. 325-330, 2005.
- CASTRO R.L.S. et al. Bloodstream Infection due to Bacterial Co-Infection in Patients with Rectal Carcinoma: Report of Two Cases. **Colorec. Cancer**. v. 2, p. 4, 2016.
- CHAN, D. et al. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. **PLoS One**, v. 6, p. e20456, 2011.
- CHE, X. et al. Involvement of IbeA in Meningitic *Escherichia coli* K1-Induced Polymorphonuclear Leukocyte Transmigration Across Brain Endothelial Cells. **Brain Pathol.**, v. 21, p. 389-404, 2011.
- CHEN, W. et al. Human Intestinal Lumen and Mucosa-Associated Microbiota in Patients with Colorectal Cancer. **PLoS ONE**, v. 7, p. e39743, 2012.
- CIEZA, R.J. et al. The IbeA Invasin of Adherent-Invasive *Escherichia coli* Mediates Interaction with Intestinal Epithelia and Macrophages. **Infect. Immun.**, v. 83, p. 1904-1918, 2015.
- CLAESSON, M. et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. **PNAS**; v. 108, p. 4586-4591, 2011.
- CLEMENTS, A. et al. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 3, p. 71–87, 2012.
- CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 4555-4558, 2000.
- CLERMONT, O. et al. Characterization of the cryptic *Escherichia* lineages: rapid identification and prevalence. **Environ. Microbiol.**, v. 13, p. 2468-2477, 2011.
- CLERMONT, O. et al. Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. **Infect. Genet. Evol.**, v. 11, p. 654-662. 2011a.

- CLERMONT, O. et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Env. Microbiol. Rep.**, v. 5, p. 58-65, 2013.
- COLEMAN, O.; NUNES, T. Role of the Microbiota in Colorectal Cancer: Updates on Microbial Associations and Therapeutic Implications. **BioResearch Open Access**, v. 5.1, p. 279-288, 2016.
- COMPARE, D.; NARDONE, G. The bacteria-hypothesis of colorectal cancer: pathogenetic and therapeutic implications. **Transl. Gastrointest. Cancer**, v. 3, p. 44-53, 2014.
- COSTELLO, E.K. et al. Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time. **Science**, v. 326, p. 1694-1697, 2009.
- CROXEN, M.A.; FINLAY, B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nat. Rev. Microbiol.**; v. 8, p. 23-38, 2010.
- CROXEN, M.A. et al. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 26, p. 822-880, 2013.
- COUGNOUX, A. et al. Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. **Gut**, v.0. p. 1–11, 2014.
- CUEVAS-RAMOS, G. et al. *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. **PNAS**, v. 107, p. 11537-11542, 2010.
- CUNNINGHAM, D. et al. Colorectal cancer. **Lancet**, v. 375, p. 1030-1047, 2010.
- DALLA-COSTA, L.M. et al. Characterisation of diarrhoeagenic *Escherichia coli* clones by ribotyping and ERIC-PCR. **J. Med. Microbiol.**, v. 47, p. 227-234, 1998.
- DARFEUILLE-MICHAUD, A. et al. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 115, p. 1405-1413, 1998.
- DARFEUILLE-MICHAUD, A. et al. High Prevalence of Adherent-Invasive *Escherichia coli* Associated With Ileal Mucosa in Crohn's Disease. **Gastroenterology**, v. 27, p. 412-421, 2004.
- DHANASHREE, B.; SHRIKARA, P. Molecular typing of enteropathogenic *Escherichia coli* from diarrheagenic stool samples. **J. Clin. Diag. Res.**, v. 6, p. 400-404, 2012.
- DIAS-SIQUEIRA, V. et al. High genetic diversity among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolated in a public hospital in Brazil. **Brazilian J. Parm. Sci.**, v. 49, p. 51-56, 2013.
- DUBOIS, D. et al. Cyclomodulins in Urosepsis Strains of *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, p. p. 2122–2129, 2010.

- ECKBURG, P.B. et al. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. **Science**, v. 308, p. 1635-1638, 2005.
- ESCOBAR-PÁRAMO, P. et al. A Specific Genetic Background Is Required for Acquisition and Expression of Virulence Factors in *Escherichia coli*. **Mol. Biol. Evol.**, v. 21, p. 1085-1094, 2004.
- ESCOBAR-PÁRAMO, P. et al. Large-Scale Population Structure of Human Commensal *Escherichia coli* Isolates. **App. Environm. Microbiol.**, v. 70, p. 5698-5700, 2004a.
- FABBRI, A. et al. The Cytotoxic Necrotizing Factor 1 from *E. coli*: A Janus Toxin Playing with Cancer Regulators. **Toxins**, v. 5, p. 1462-1474, 2013.
- FACINA, T. 2014. Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil. **Rev. Brasil. Cancerol.**, v. 60, p. 63, 2014.
- FARFAN-GARCIA, A.E. et al. Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. **Rev. Chilena Infectol.**, v. 33, p. 438-450, 2016.
- FAVORITI, P. et al. Worldwide burden of colorectal cancer: a review. **Updates Surg.**, v. 68, p. 7–11, 2016.
- FAZELI, M.; KERAMATI, M. Rectal cancer: a review. **Med. J. Islam. Repub. Iran**, v. 29, p. 171.e, 2015.
- FEDIRKO, V. et al. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. **Ann. Oncol.**, v. 22, p. 1958-1972, 2011.
- FENG, Q. et al. Gut microbiome development along the colorectal adenoma–carcinoma sequence. **Nat. Commun.**, v. 6, p. 6528, 2015.
- FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int. J. Cancer**, v. 136, p. E359–E386, 2015.
- FLECHARD, M. et al. New Role for the *ibeA* Gene in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Stress Resistance of *Escherichia coli*. **J. Bacteriology**, v. 194, p. 4550-4560, 2012.
- FRANK, D.N. et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. **PNAS**, v. 104, p. 13780-13785, 2007.
- FUKUGAITI, M.H. et al. High occurrence of *Fusobacterium nucleatum* and *Clostridium difficile* in the intestinal microbiota of colorectal carcinoma patients. **Braz. J. Microbiol.**, v. 46, p. 1135-1140, 2015.
- GAO, Z. et al.. Microbiota dysbiosis associated with colorectal cancer. **Frontiers in Mirobiol.**, v. 6, p. 1-9, 2015.

GERRITSEN, J. et al. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. **Genes Nutr.**, v. 6, p. 209-240, 2011.

HASHEMIZADEH, Z.; KALANTAR-NEYESTANAKI, D.; MANSOURI, S. Association between virulence profile, biofilm formation and phylogenetic groups of *Escherichia coli* causing urinary tract infection and the commensal gut microbiota: A comparative analysis. **Microb. Path.**, v. 110, p. 540e545, 2017.

HERNÁNDEZ-BOUSSARD, T. et al. Risks of adverse events in colorectal patients: population-based study. **J. Surg. Research.**, v. 202, p. 328-334, 2016.

HOLD, G.L. et al. Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 39, p. 33-39, 2002.

HU, J.; TORRES, A.G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander?. **Clin Microbiol Infect.**, v. 21, p. 729–734, 2015.

HUANG, S.H. et al. A novel genetic island of meningitic *Escherichia coli* K1 containing the *ibeA* invasion gene (*GimA*): functional annotation and carbon-source-regulated invasion of human brain microvascular endothelial cells. **Funct. Integr. Genomics**, v. 1, p. 312-322, 2001.

HULTON, C.S.J.; HIGGINS, C.F.; SHARP, P.M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiol.**, v. 5, p. 825-834 1991.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa 2016: Síntese de resultados e comentários. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/sintese-de-resultados-comentarios.asp>. Acesso em: 26 Nov. 2016.

JESS, T., RUNGUE, C; PEYRIN-BIROULET, L. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. **Clin. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 10, p. 639-645, 2012.

JIANG, Y. et al. Diabetes mellitus and incidence and mortality of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. **Eur. J. Epidemiol.**; v. 26, p. 863-876, 2011.

JIN, Y. et al. Hemolytic *E. coli* Promotes Colonic Tumorigenesis in Females. **Cancer Res.**, v. 76, p. 2891-2900, 2016.

JOHNSON J.R.; STELL A.L. Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 261-72, 2000.

JOHNSON, J.R. et al. Phylogenetic Distribution of Extraintestinal Virulence-Associated Traits in *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 78-88, 2001.

JOHNSON, J.R.; RUSSO, T.A. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E. coli*". **Journal Lab. Clin. Medicine**, v. 139, p. 155-162, 2002.

- JOHNSON, J.R. et al. Isolation and Molecular Characterization of Nalidixic Acid-Resistant Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* from Retail Chicken Products. **Antimicrob. Agents Chemoth.**, v. 47, p. 2161–2168, 2003.
- KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 123-140, 2004.
- KATOULI, M. Population structure of gut *Escherichia coli* and its role in development of extra-intestinal infections. **Iran. J. Microbiol.**, v. 2, p. 59-72, 2010.
- KEKU, T. et al. The gastrointestinal microbiota and colorectal cancer. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 308, p. 351-363, 2015.
- KHEIRELSEID, E.; MILLER, N.; JERIN, M. Molecular biology of colorectal cancer: Review of the literature. **American J. Mol. Biology**, v. 3, p. 72-80, 2013.
- KLEMM, P.; SCHEMBRI, M.A. Bacterial adhesins: function and structure. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 290, p. 27-35, 2000.
- KLEMM, P.; HANCOCK, V.; SCHEMBRI, M.A. Fimbrial adhesins from extraintestinal *Escherichia coli*. **Environ. Microbiol. Rep.**, v. 2, p. 628-640, 2010.
- KÖHLER, C.D.; DOBRINDT, U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? **Int. J. Med. Microbiol.**; v. 301, p. 642- 647, 2011.
- KOSTIC, A. et al. Microbes and Inflammation in Colorectal Cancer. **Cancer Immunol. Res.**, v. 1, p. 150-157, 2013.
- LABIANCA, R. et al. Colon cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 74, p. 106-133, 2010.
- LANG, X.Y. et al. Development of an enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR) to detect and genotype enterotoxigenic *Escherichia coli* of calf origin. **African J. Microbiol. Research**, v. 7 p. 4001-4005, 2013.
- LASARO, M.A. et al. F1C Fimbriae Play an Important Role in Biofilm Formation and Intestinal Colonization by the *Escherichia coli* Commensal Strain Nissle 1917. **App. Environ. Microbiol.**, v. 75, p. 246–251, 2009.
- LEE, J.H. et al. Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 62, p. 84-90, 2015.
- LEUNG, A.; TSOI H.; YU, J. *Fusobacterium* and *Escherichia*: models of colorectal cancer driven by microbiota and the utility of microbiota in colorectal cancer screening. **Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol.** Early online, 1–7, 2014.



LEVERT, M. et al. Molecular and Evolutionary Bases of Within-Patient Genotypic and Phenotypic Diversity in *Escherichia coli* Extraintestinal Infections. **PLoS Pathog.**, v. 6, p. e1001125, 2010.

LI, F.; LAI, M. Colorectal cancer, one entity or three. **J. Zhejiang Univ. Sci. B.**, v. 10, p. 219-229, 2009.

LIANG, P.; CHEN, T.; GIOVANNUCCI, E. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. **Int. J. Cancer**, v. 124, p. 2406-2415, 2009.

LOZER, D. et al. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities. **BMC Infect. Dis.**, v. 13, p. 418, 2013.

MA, Y. et al. Obesity and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. **PLoS One**, v. 8: e53916, 2013.

MADDOCKS, O.D.K. et al. Attaching and Effacing *Escherichia coli* Downregulate DNA Mismatch Repair Protein In Vitro and Are Associated with Colorectal Adenocarcinomas in Humans. **PLoS One**, v. 4, p. e5517, 2009.

MADDOCKS, O.D.K.; SCANLON, K.M.; DONNENBERG, M.S. An *Escherichia coli* effector protein promotes host mutation via depletion of DNA mismatch repair proteins. **MBio**, v. 4, p. 00152-1, 2013.

MAGDY, A. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC): Does it have a role in colorectal tumourigenesis? A Prospective Cohort Study. **Inter. J. Surg.**, v. 18, p. 169-173, 2015.

MALINEN, E. et al. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 59-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. **Microbiology**, v. 149, p. 269–277, 2003.

MIRSEPASI-LAURIDSEN, H. et al. Secretion of Alpha-Hemolysin by *Escherichia coli* Disrupts Tight Junctions in Ulcerative Colitis Patients. **Clin. Transl. Gastroenterol.**, v. 7, p. e149. 2016.

NATARO, J.P. et al. AggR, a Transcriptional Activator of Aggregative Adherence Fimbria I Expression in Enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 4691-4699, 1994.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, p. 142-201, 1998.

NEISCH, A. Microbes in gastrointestinal health and disease. **Gastroenterology**, v. 136, p. 65–80, 2009.

NICHOLSON, J.K. et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. **Science**, v. 336, p. 1262-1267, 2012.

NOUGAYRÈDE, J.P. et al. *Escherichia coli* Induces DNA Double-Strand Breaks in Eukaryotic Cells. **Science**, v. 313, p. 848-851, 2006.

NOWROUZIAN, F.; OSWALD, E. *Escherichia coli* strains with the capacity for long-term persistence in the bowel microbiota carry the potentially genotoxic pks island. **Microbial Pathogen.**, v. 53, p. 180-182, 2012.

NUNES, I. et al. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case–control study among children from north-eastern Brazil. **J. Med. Microbiol.**, v. 62, p. 683-693, 2013.

OKEKE, I. et al. Molecular Epidemiology of the Iron Utilization Genes of Enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 36-44, 2004.

OPAL, S.M. et al. Aerobactin and  $\alpha$ -Hemolysin as Virulence Determinants in *Escherichia coli* Isolated from Human Blood, Urine, and Stool. **J. Infect. Dis.**, v. 161, p. 794-796, 1990.

PALMER, C. et al. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. **PLoS Biol.**, v. 5, p. e177, 2007.

PICARD, B. et al. The Link between Phylogeny and Virulence in *Escherichia coli* Extraintestinal Infection. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 546-553, 1999.

POOLMAN, J. 2017. *Escherichia coli*. International Encyclopedia of Public Health, v. 2, p. 585-593, 2017.

PROROK-HAMON, M. et al. Colonic mucosa-associated diffusely adherent *afaC+* *Escherichia coli* expressing *lpfA* and *pks* are increased in inflammatory bowel disease and colon cancer. **Gut**, v. 63, p. 761–770, 2014.

RAISCH, J. et al. Colon cancer-associated B2 *Escherichia coli* colonize gut mucosa and promote cell proliferation. **World J. Gastroenterol.**, v. 20, p. 6560-6572, 2014.

RAMAMZANZADEH, R.; ZAMANI, S., ZAMANI, S. Genetic diversity in clinical isolates of *Escherichia coli* by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)–PCR technique in Sanandaj hospitals. **Iran. J. Microbiol.**, v. 5, p. 126-131, 2013.

SALHIA, B.; RUTKA, J.T.; LINGWOOD, C.; NUTIKKA, A.; VAN FURTH, W.R. The treatment of malignant meningioma with verotoxin. **Neoplasia**, v. 4, p. 304–311, 2002.

SÁNCHEZ, S. et al. Caracterización geno-fenotípica de aislados de *Escherichia coli* AEEC de pacientes pediátricos con procesos diarreicos infecciosos en la ciudad de La Paz: implicancias para el diagnóstico y epidemiología de las enfermedades diarreicas agudas. **Arch Pediatr Urug.**, v. 77, p. 196-208, 2006.

SEARLE, L.J. et al. Variation in Siderophore Biosynthetic Gene Distribution and Production across Environmental and Faecal Populations of *Escherichia coli*. **PLoS ONE**, v. 10, p. e0117906, 2015.

SECHER, T. et al. *Escherichia coli* Producing Colibactin Triggers Premature and Transmissible Senescence in Mammalian Cells. **PLoS ONE**, v. 8, p. e77157. 2013.

SEKIROV, I. et al. Gut Microbiota in Health and Disease. **Physiol. Rev.**, v. 90, p. 859-904, 2010.

SERVIN, A.L. Pathogenesis of Human Diffusely Adhering *Escherichia coli* Expressing Afa/Dr Adhesins (Afa/Dr DAEC): Current Insights and Future Challenges. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 27, p. 823-869, 2014.

SHEKA, A.; TEVIS, S; KENNEDY, D. Urinary tract infection after surgery for colorectal malignancy: risk factors and complications. **Am. J. Surg.**, v. 211, p. 31-39, 2015.

SHETTY, V. et al. Prevalence and Characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* Isolated from Adults and Children in Mangalore, India. **J. Lab Physicians**, v. 4, p. 24-29, 2012.

SIEGEL, R.; DESANTIS. C.; JEMAL, A. Colorectal cancer statistics, 2014. **CA Cancer J. Clin.**, v. 64, p. 104-117, 2014.

SCHMIDT, M.A. LEeways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. **Cell. Microbiol.**, v. 12, p. 1544–1552, 2010.

SNEATH, P.H; SOKAL, R.R. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. San Francisco, CA. **W.H Freeman**, p. 573, 1973.

SOBHANI, I. et al. Microbial Dysbiosis in Colorectal Cancer (CRC) Patients. **PLoS ONE**, v. 6, p. e16393, 2011.

STECHEER, B. et al. Gut inflammation can boost horizontal gene transfer between pathogenic and commensal Enterobacteriaceae. **PNAS**, v. 109, p. 1269-1274, 2012.

SUAU, A. et al. Direct Analysis of Genes Encoding 16S rRNA from Complex Communities Reveals Many Novel Molecular Species within the Human Gut. **App. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 4799–4807, 1999.

SWIDSINSKI, A. et al. Association between intraepithelial *Escherichia coli* and colorectal cancer. **Gastroenterology**, v. 115, p. 281-286, 1998.

TJALSMA, H. et al. A bacterial driver–passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 10, p. 575-582, 2012.

TOPRAK, N.U. et al. A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 12, p. 782-786, 2006.

- TORNIEPORTH, N.G.; JOHN J.; SALGADO K; JESUS, P.; LATHAM, E.; MELO, M.C. Differentiation of pathogenic *Escherichia coli* strains in Brazilian children by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 1371-1374, 1995.
- TRAVAGLIONE, S.; FABBRI, A.; FIORENTINI, C. The Rho-activating CNF1 toxin from pathogenic *E. coli*: A risk factor for human cancer development? **Infect. Agents and Cancer**, v. 3, p. 4, 2008.
- TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, p. 508-513, 2002.
- TRONNET, S. et al. Iron Homeostasis Regulates the Genotoxicity of *Escherichia coli* That Produces Colibactin. **Infect. Immun.**, v. 84, p. 3358-3368, 2016
- VEJBORG, R. et al. Comparative genomics of *Escherichia coli* isolated from patients with inflammatory bowel disease. **BMC Genomics**, v. 12, p. 316, 2011.
- VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. Distribution of repetitive DNA sequence in eubacterias and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nuc. Acids Res.**, v. 19, p. 6823-6831, 1991.
- WALK, S. et al. Cryptic Lineages of the Genus *Escherichia*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v 75, p. 6534-6544, 2009.
- WANG, T. et al. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. **J. Intl. Soc. Microb. Ecol.**, v. 6, p. 320–329, 2012.
- WATSON, A.; COLLINS, P. Colon Cancer: A Civilization Disorder. **Digest. Dis.**, v. 29, p. 222-228, 2011.
- WILES, T.; LULESUS, R.; MULVEY, M. 2008. Origins and Virulence Mechanisms of Uropathogenic *Escherichia coli*. **Exp. Mol. Pathol.**, **85**: 11–19, 2008.
- WOLD, A.E. et al. Attachment of *Escherichia coli* via mannose- or Gal $\alpha$ 1 $\rightarrow$  4Gal $\beta$ -containing receptors to human colonic epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 2531-2537, 1988.
- WOLD, A.E. et al. Resident colonic *Escherichia coli* strains frequently display uropathogenic characteristics. **J. Infect. Dis.**, v. 165, p. 46-52 1992.
- WU, X. et al. Subsite-Specific Colorectal Cancer Incidence Rates and Stage Distributions among Asians and Pacific Islanders in the United States, 1995 to 1999. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 13, p. 1215-1222, 2004.
- WU, N. et al. Dysbiosis Signature of Fecal Microbiota in Colorectal Cancer Patients. **Microb. Ecol.**, v. 66, p. 462-470, 2013.
- YATSUNENKO, T. et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**, v. 486, p. 222–227, 2012.

ZACKULAR, J.P. et al. The Human Gut Microbiome as a Screening Tool for Colorectal Cancer. **Cancer Prev. Res.**, v. 7, p. 1112-1121, 2014.

ZACKULAR, J.P. et al.. Manipulation of the Gut Microbiota Reveals Role in Colon Tumorigenesis. **MSphere**, v. 1, p. e00001-15, 2015.

## **ANEXOS**

## A - QUESTIONÁRIO DEMOGRÁFICO E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

DATA DA APLICAÇÃO: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### **1. DADOS PESSOAIS**

**NOME:** \_\_\_\_\_

**IDADE:** \_\_\_\_\_

**GÊNERO:** Feminino ( ) Masculino ( )

**ESTADO CIVIL:** Solteiro(a) ( ); Casado (a) ( ); Divorciado(a) ( ); Viúvo(a) ( ); Companheiro(a) ( ).

**ESCOLARIDADE:** Analfabeto(a) ( ); Lê e escreve ( ); Fundamental ( ); Médio ( ); Superior ( ).

**PROFISSÃO:** \_\_\_\_\_

### **2. DADOS CLÍNICOS**

**FUMA:** SIM ( ); NÃO ( )

**DROGAS:** SIM ( ); NÃO ( ); QUAL: \_\_\_\_\_, ORAL/INJETAVEL: \_\_\_\_\_

**CONSUMO DE ÁLCOOL:** Diariamente ( ); Uma vez por semana ( ); Uma vez ao mês ( ); Eventualmente ( ); Nunca ( ).

**SEXO:** Faz sexo regular SIM ( ); NÃO ( ); Parceiro é Fixo, SIM ( ), NÃO ( ); Diariamente ( ); 1 vez ao dia ( ); 1 vez por semana ( ); 1 vez por mês ( ); Eventualmente ( ); Não faz sexo ( ); Outro: \_\_\_\_\_

**PRÁTICA SEXO ORAL,** SIM ( ), NÃO ( ); **ANAL,** SIM ( ), NÃO ( ).

**QUANTO TEMPO LEVOU ENTRE OS PRIMEIROS SINAIS CLÍNICOS E O DIAGNÓSTICO? QUAIS FORAM OS SINTOMAS?**

\_\_\_\_\_

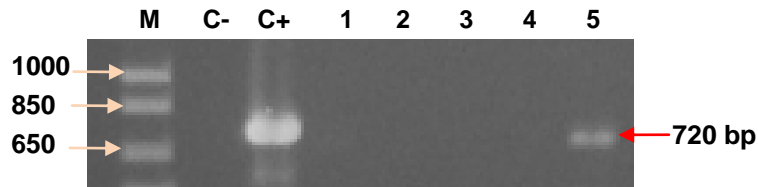
**HISTÓRICO FAMILIAR DE CÂNCER COLORRETAL OU RETO:** SIM ( ), NÃO ( ), QUEM \_\_\_\_\_

**HISTÓRICO DE COLITES** (inflamação do cólon do reto): Sim ( ), Não ( )

**FAZ USO DE ANTIBIÓTICOS:** Sim ( ), Não ( ), QUAL: \_\_\_\_\_

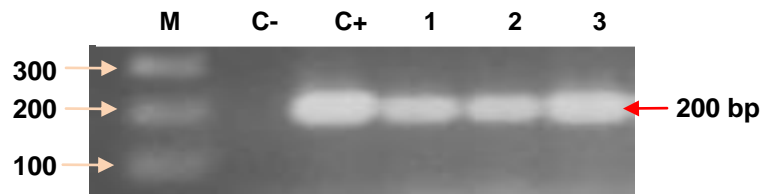
## B - Detecção dos nove genes avaliados para a identificação de fatores de virulência das *E. coli*

**Figura 20** - Detecção do gene *papA* por PCR



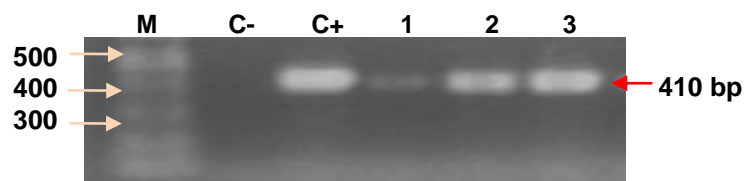
Legenda: Perfil de PCR em gel de agarose 1%. Colunas: M, Marcador de peso molecular 1 kb ladder; C-, *E. coli* K12 (controle negativo); C+, *E. coli* ATCC 25922 (controle positivo); 1, 2, 3, 4, amostras negativas (cepas PR28-1, PR28-2, PR28-3, PR28-4); 5, amostra positiva (cepa PR30-1).

**Figura 21** - Detecção do gene *papC* por PCR



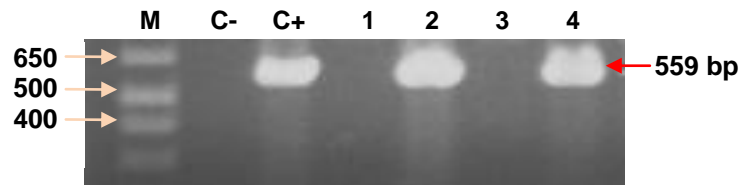
Legenda: Perfil de PCR em gel de agarose 1%. Colunas: M, Marcador de peso molecular 1 kb ladder, C-, *E. coli* K12 (controle negativo); C+, *E. coli* ATCC 25922 (controle positivo); 1, 2, 3, amostras positivas (cepas PS16-1, PS16-2 e PS16-3).

**Figura 22** - Detecção do gene *sfa/foc* por PCR

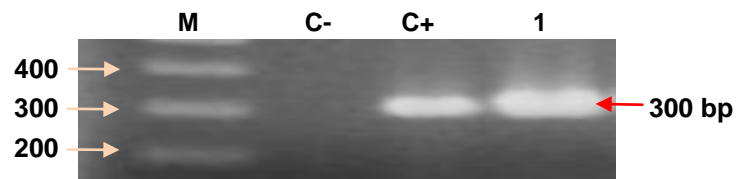


Legenda: Perfil de PCR em gel de agarose 1%. Colunas: M, Marcador de peso molecular 1 kb ladder; C-, *E. coli* K12 (controle negativo); C+, *E. coli* ATCC 25922 (controle positivo); 1, 2, 3, amostras positivas (cepas PS13-1, PS13-2 e PS13-3).

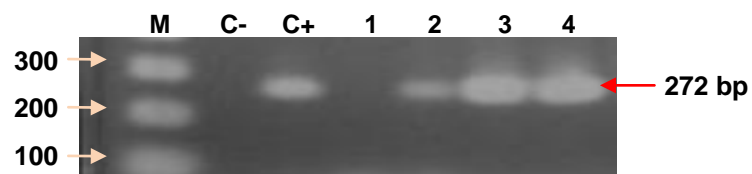


**Figura 23 - Detecção do gene *afa/Dra* por PCR**

Legenda: Perfil de PCR em gel de agarose 1%. Colunas: M, Marcador de peso molecular 1 kb ladder; C-, *E. coli* K12 (controle negativo); C+, *E. coli* ATCC 25922 (controle positivo); 1, 3, amostras negativas (cepas PR36-1 e PR36-3); 2, 4, amostras positivas (cepas PR36-2 e PR36-4).

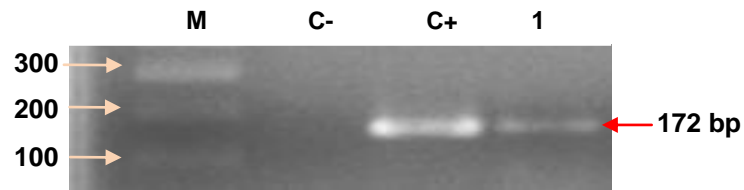
**Figura 24 - Detecção do gene *iutA* por PCR**

Legenda: Perfil de PCR em gel de agarose 1%. Colunas: M, Marcador de peso molecular 1 kb ladder; C-, *E. coli* K12 (controle negativo); C+: *E. coli* ATCC 25922 (controle positivo); 1, amostra positiva (cepa PR37-1).

**Figura 25 - Detecção do gene *kpsMTII* por PCR**

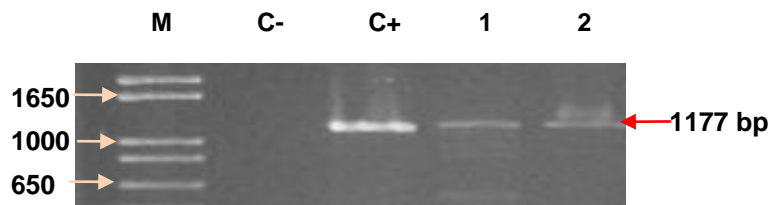
Legenda: Perfil de PCR em gel de agarose 1%. Colunas: M, Marcador de peso molecular 1 kb ladder; C-, *E. coli* K12 (controle negativo); C+: *E. coli* ATCC 25922 (controle positivo); 1, amostra negativa (cepa PR17-1); 2, 3, 4, amostras positivas (cepas PR17-2, PR17-3 e PR17-4).

**Figura 26 - Detecção do gene *ibeA* por PCR**



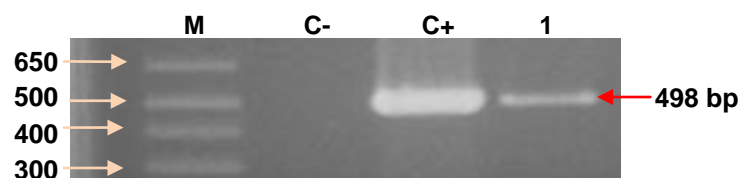
Legenda: Perfil de PCR em gel de agarose 1%. Colunas: M, Marcador de peso molecular 1 kb ladder; C-, *E. coli* K12 (controle negativo); C+, *E. coli* ATCC 25922 (controle positivo); 1, amostra positiva (cepa PR40-1).

**Figura 27 - Detecção do gene *hlyA* por PCR.**



Legenda: Perfil de PCR em gel de agarose 1%. Colunas: M, Marcador de peso molecular 1 kb ladder; C-, *E. coli* K12 (controle negativo); C+, *E. coli* ATCC 25922 (controle positivo); 1, 2, amostras positivas (cepas PR3-4 e PR5-1).

**Figura 28 - Detecção do gene *cnf1A* por PCR.**



Legenda: Perfil de PCR em gel de agarose 1%. Colunas: M, Marcador de peso molecular 1 kb ladder; C-, *E. coli* K12 (controle negativo); C+: *E. coli* ATCC 25922 (controle positivo); 1, amostra positiva (cepa PR40-1).

### C - Detecção da associação dos genes *cnf-1* e *hly*

**Tabela 12** - Distribuição da combinação dos genes *cnf-1* e *hlyA* em 192 cepas de *E. coli* isoladas de pacientes com CR e sadios

Grupos de <i>E. coli</i>	Combinação dos genes <i>cnf-1</i> e <i>hlyA</i>				Valor de <i>P</i>
	Câncer de reto (n = 120)		Sadios (n = 72)		
	Nº	(%)	Nº	%	
aEPEC	2	(1,7)	3	(4,2)	0,292
tEAEC	6	(5,0)	2	(2,8)	0,456
aEAEC	2	(1,7)	5	(6,9)	0,059
STEC ( <i>stx-1</i> )	0	(0,0)	2	(2,8)	0,066
ExPEC	20	(16,7)	17	(23,6)	0,238

Chi-square test,  $P < 0,05$  ( $\alpha=0,05$ )