

Gabriela Gama Freire Alberca

Possível associação da presença de bactérias anaeróbias do trato gastrointestinal com a neoplasia retal: ocorrência e caracterização molecular bacteriana.

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

**São Paulo
2020**

Gabriela Gama Freire Alberca

Possível associação da presença de bactérias anaeróbias do trato gastrointestinal com a neoplasia retal: ocorrência e caracterização molecular bacteriana.

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Nilton Lincopan

Co-orientadora: Profa. Dra. Viviane Nakano

Orientador: Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos (*in memoriam*)

Versão Corrigida

**São Paulo
2020**

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)

Gama Freire Alberca, Gabriela

Possível associação da presença de bactérias anaeróbias do trato gastrointestinal com a neoplasia retal: ocorrência e caracterização molecular bacteriana. / Gabriela Gama Freire Alberca; orientador Prof. Dr. Nilton Lincopan; coorientador Profa. Dra. Viviane Nakano . -- São Paulo, 2020. 123 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. microbiota fecal. 2. câncer retal. 3. Clostridium perfringens. 4. Bacteroides fragilis. 5. toxinas. I. Lincopan, Prof. Dr. Nilton , orientador. II. Nakano , Profa. Dra. Viviane , coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Gabriela Gama Freire Alberca

Titulo da Tese: Possível Associação da presença de bactérias anaeróbias do trato gastrointestinal com a neoplasia retal: ocorrência e caracterização molecular bacteriana.

Orientador: Prof. Dr. Nilton Lincopan
Co-orientadora: Profa. Dra. Viviane Nakano

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da 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:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (11) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 25 de março de 2015.

PARECER 1236/CEPSH

A Comissão de *Ética em Pesquisas em Seres Humanos* do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Possível associação de espécies toxigênicas de Bacteroides fragilis e Clostridium perfringens com a neoplasia colorretal: Ocorrência e caracterização molecular bacteriana*" do pesquisador Prof. Dr. **Mário Júlio Ávila Campos**.

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: 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 **25.03.2016**.

Atenciosamente,

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

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, foste Tu que me ensinaste que nada é impossível, que perante qualquer dificuldade quem acredita no teu amor encontrará o caminho da superação. Assim, meu Deus, a Ti dedico e agradeço por mais esta conquista.

Á minha mãe Zildete Gama que sacrificiou-se, dedicou-se e não mediu esforços para que eu tivesse a oportunidade de estudar e ter uma boa formação, hoje cheguei aonde estou graças a sua sementinha plantada. Serei eternamente grata.

Ao meu esposo Ricardo Wesley Alberca por ter me incentivado a fazer o doutorado e por sempre estar ao meu lado nos momentos de dificuldade e alegria. Agradeço também pela paciência, companherismo, e compreensão. Talvez não existam palavras suficientes e significativas que me permitam agradecer a você com justiça, com o devido merecimento. Mas é tudo que posso fazer, é te agradecer.

E ao meu filho Bernardo Alberca, por me dar forças para finalizar a produção dessa tese.

A ajuda de vocês e apoio foram muito importantes para mim, e nunca vou esquecer tudo que vocês fizeram por mim. Muito obrigada! Com todo o carinho e de coração eu agradeço, e para sempre minha gratidão será à vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Mario Julio Avila-Campos (in memoriam), pela oportunidade, orientação, confiança, paciência e por transmitir todo o seu ensinamento e sabedoria. Para sempre será recordado com carinho, respeito e admiração pelo profissional e ser humano que era, fica aqui a minha eterna gratidão!

À minha co-orientadora Professora Dra. Viviane Nakano, pelos ensinamentos durante todos esses anos, pela orientação, parceria, amizade, dedicação e em especial por toda atenção dispendida para a produção dessa tese.

Ao Professor Dr. Nilton Lincopan pela aceitação da minha orientação na reta final do meu doutorado.

Ao Instituto de Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), principalmente o setor de Endoscopia, ao Dr. Ulysses Ribeiro e em especial a Dra. Adriana Vaz Safatle Ribeiro, aos médicos residentes, as enfermeiras e técnicos de enfermagem por toda contribuição.

Aos pacientes e os familiares que permitiram que essa pesquisa fosse realizada.

À auxiliar de laboratório Márcia Harumi, pelo apoio técnico, companherismo e amizade, lembrarei com carinho das novas conversas.

Ao Dr. Santiago Lattar e a Dra. Viviane Arenas por toda contribuição, dedicação e conhecimentos compartilhados nesse trabalho.

Às amigas que ganhei no Laboratório de Anaeróbios, a Dra. Naiane Cardoso pela amizade, cumplicidade e todo apoio durante o meu doutorado. A MSc. Rosa Liliana Solis pela amizade, parceria e colaboração na pesquisa, lembrarei com carinho dos nossos momentos compartilhados. A Alejandra Guzmán e Luciane Cavalheiro, obrigada por tornarem meus dias mais fáceis no laboratório.

Aos colegas de laboratório que ali passaram, Claudia Freire, Érika Francisca, Filipe Menezes, Bruno Alves, Ana Paula Barbosa, Rita Rodrigues, Paula Betin e Dr. Luís Llanco e em especial à Dra. Miriam Fernandes pela confiança a mim depositada, pelos ensinamentos compartilhados durante meu estágio.

À Gisele Santana e Renato Aguiar, secretaria de Pós-graduação, obrigada por todo suporte e proatividade.

À Rosana Prisco (ICBIII) e ao Dr. Ricardo Wesley Alberca pela colaboração para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço também aos funcionários do Departamento de Microbiologia.

À CAPES pelo apoio financeiro concedido durante a elaboração desta pesquisa.

APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci

RESUMO

ALBERCA, G. G. F. **Possível associação da presença de bactérias anaeróbias do trato gastrointestinal com a neoplasia retal: ocorrência e caracterização molecular bacteriana.** 2020. 123 f. Dissertação (Doutorado em Microbiologia) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2020.

As interações da microbiota gastrintestinal com o câncer de reto (CR) vêm sendo muito estudadas, mas até o momento não há evidências científicas convincentes sobre essa relação. As bactérias anaeróbias são predominantes na microbiota residente do trato gastrintestinal. Bactérias como: *Bacteroides fragilis* e *Clostridium perfringens*, são encontradas na microbiota intestinal de humanos e animais, entretanto são agentes oportunistas e sua patogenicidade está relacionada à produção de vários fatores de virulência como toxinas e enzimas hidrolíticas. Neste estudo, foram avaliados 40 pacientes de câncer de reto e 20 pacientes sem câncer. Sendo coletados dos pacientes com câncer: 25 amostras fecais, 38 amostras de sangue, 36 amostras de tecido tumoral e de tecido adjacente. Dos pacientes sem câncer foram coletados: 16 amostras fecais, 19 amostras de sangue e 14 amostras de tecido retal sadio. Foram realizados o isolamento para as bactérias anaeróbias do “grupo” *Bacteroides fragilis*, *Parabacteroides* spp. e *Clostridium* spp. em todas as amostras clínicas, bem como o estudo da diversidade genética e a detecção de bactérias intestinais e orais pela técnica quantitativa da PCR em tempo real. As espécies *B. ovatus* ($P = 0,018$) e *B. stercoris* ($P = 0,018$) apresentaram diferenças estatísticas no isolamento em relação aos pacientes com e sem câncer. Das 24 cepas de *B. fragilis* isoladas nenhuma abrigou o gene *bft* ou seus subtipos em ambos os grupos estudados. Na distribuição de espécies do gênero *Clostridium* não foi verificada diferenças entre os pacientes avaliados, mas a espécie *C. perfringens* foi a mais prevalente em ambos os grupos. Das cepas de *C. perfringens* isoladas de pacientes com câncer 80 pertenceram ao toxintipo A e 5 ao toxintipo G. Dessas 85 cepas, 8 abrigaram o gene *tpel*, 5 o gene *netB* e 6 *netE*. Nenhuma cepa abrigou essas três toxinas simultaneamente; e todas abrigaram os genes *nanI* e *nanJ*. Todas as 47 cepas dos pacientes controles, pertenceram ao toxintipo A e apresentaram os genes *nanI* e *nanJ* e não abrigaram os genes *tpel*, *becA*, *becB*, *netB*, *netE*, *netF* e *netG*. Sobre a diversidade genética de *B. fragilis* por AP-PCR foi verificada elevada diversidade e nenhuma cepa de paciente com câncer e sem câncer apresentaram 100% de homologia. Em *C. perfringens* foi verificada uma cepa de paciente sem câncer (S15.1) agrupou-se no mesmo cluster que outras três cepas de pacientes com câncer apresentando 100% de homologia. Foram isolados *B. fragilis*, *E. coli* e *E. faecalis* de 2 amostras de pacientes com câncer por hemocultura. Todas as demais amostras não apresentaram resultados positivos da hemocultura. Pelo ensaio de PCR em tempo real foi verificado diferenças estatísticas nas amostras fecais para o Filo *Bacteroidetes*, *E. coli*, *D. pneumosintes* e *F. nucleatum*. Nos tecidos avaliados, observou-se diferenças para o Filo *Bacteroidetes*, Filo *Firmicutes*, *Clostridium* Cluster I, *Lactobacillus* spp., *E. coli*, *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*. Os resultados demonstraram que a microbiota fecal é bastante diversa e complexa, por isso mais estudos são necessários para analisar os possíveis efeitos da modulação da microbiota no desenvolvimento do câncer reto e possíveis terapias.

Palavras-chave: microbiota fecal, câncer retal, *Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragilis*, toxinas.

ABSTRACT

ALBERCA, G. G. F. **Possible association of the presence of anaerobic bacteria from the gastrointestinal tract with rectal neoplasia: occurrence and molecular characterization.** 2020. 123 p. Thesis (PhD in Science - Microbiology) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2020.

The interactions of gastrointestinal microbiota with rectal cancer (RC) have been much studied, but there is no scientific evidence on this relationship. Anaerobic bacteria are predominant in the resident microbiota of the gastrointestinal tract. Bacteria such as: *Bacteroides fragilis* and *Clostridium perfringens*, are found in the intestinal microbiota of humans and animals, however they being opportunistic agents and their pathogenicity are related to the production of several virulence factors such as toxins and hydrolytic enzymes. In this study, 40 patients with rectal cancer and 20 patients without cancer were evaluated. From cancer patients: 25 fecal samples, 38 blood samples, 36 samples of tumor tissue and adjacent tissue were collected. From the patients without cancer were collected: 16 fecal samples, 19 blood samples and 14 samples of healthy rectal tissue. The isolation for anaerobic bacteria of the "group" *Bacteroides fragilis*, *Parabacteroides* spp. and *Clostridium* spp. was performed in all clinical samples, as well as the study of genetic diversity and the detection of intestinal and oral bacteria by the quantitative real-time PCR. The species *B. ovatus* ($P = 0.018$) and *B. stercoris* ($P = 0.018$) showed statistical differences in isolation in relation to patients with and without cancer. Of the 24 strains of *B. fragilis* isolated, none harbored the *bft* gene or its subtypes in both groups studied. In the distribution of species of the genus *Clostridium* there were no differences between the patients evaluated, but the species *C. perfringens* was the most prevalent in both groups. Of the strains of *C. perfringens* isolated from cancer patients 80 were to toxinotype A and 5 to toxinotype G. Of these 85 strains, 8 harbored the *tpeL* gene, 5 the *netB* gene and 6 the *netE* gene. No strain harbored these three toxins simultaneously; and they all harbored the *nanI* and *nanJ* genes. All 47 strains from the control patients belonged to the toxinotype A and had the *nanI* and *nanJ* genes and did not harbor the *tpeL*, *becA*, *becB*, *netB*, *netE*, *netF* and *netG* genes. About the genetic diversity of *B. fragilis* by AP-PCR was verified high diversity and no strain of cancer and control patient had 100% homology. In *C. perfringens* one control patient strain (S15.1) was found in the same cluster as three other cancer patient strains with 100% homology. *B. fragilis*, *E. coli* and *E. faecalis* were isolated from 2 samples of cancer patients per blood culture. All other samples showed no positive results from blood culture. The real-time PCR assay showed statistical differences for Phylum *Bacteroidetes*, *E. coli*, *D. pneumosintes* and *F. nucleatum* in the fecal samples. In the evaluated tissues, differences were observed for Phylum *Bacteroidetes*, Phylum *Firmicutes*, *Clostridium* Cluster I, *Lactobacillus* spp., *E. coli*, *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans*. The results have shown that faecal microbiota is quite diverse and complex, so further studies are needed to analyse the possible effects of microbiota modulation on the development of rectal cancer and possible therapies.

Keywords: Fecal microbiota, rectal cancer, *Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragilis*, toxins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Gráficos de pizza apresentam a distribuição de casos e mortes para os 10 tipos de câncer mais comuns em 2018 para ambos os sexos.....	25
Figura 2 - Progressão em etapas do câncer de colorretal.....	27
Figura 3 - Progressão em etapas do câncer de colorretal.....	32
Figura 4 - Fatores de influenciam o início e progressão do câncer de cólon.....	36
Figura 5 - Interações entre a microbiota intestinal e seu hospedeiro.....	41
Figura 6 - Composição do diversificado microbioma humano por localização do trato gastrointestinal.....	42
Figura 7 - Esquema sobre o antagonismo das hipóteses de aquisição da microbiota no início da vida.....	43
Figura 8 - Diagrama de Venn com os gêneros bacterianos que compõem a microbiota intestinal.....	45
Figura 9 - Principais gêneros bacterianos que compõem a microbiota oral.....	46
Figura 10 - Mecanismos de ação das principais toxinas de <i>C. perfringens</i>	51
Figura 11 - Microbiota associada a mecanismos envolvidos na patogênese de câncer colorretal.....	58
Figura 12 - Dendograma mostrando a análise AP-PCR de <i>B. fragilis</i> isolada de amostras fecais em pacientes com e sem câncer de reto.....	78
Figura 13 - Exemplo de Padrões de bandas de PFGE de isolados de <i>C. perfringens</i> obtidos quando o DNA cromossômico foi digerido com a enzima de restrição <i>SmaI</i>	80
Figura 14 - Dendograma mostrando a análise PFGE de <i>C. perfringens</i> isolado de amostras fecais em pacientes com e sem câncer de reto.....	81
Figura 15 - Composição taxonômica da microbiota de pacientes com e sem câncer. Gráfico de barras mostrando a abundância relativa das bactérias intestinais estudadas em todas as amostras.....	89
Figura 16 - Composição taxonômica da microbiota de pacientes com e sem câncer. Gráfico de barras mostrando os números de cópias/g em log das bactérias intestinais em todas as amostras.....	90
Figura 17 - Composição taxonômica da microbiota de pacientes com e sem câncer. Gráfico de barras mostrando a abundância relativa das bactérias orais em todas as	

amostras.....	91
Figura 18 - Composição taxonômica da microbiota de pacientes com e sem câncer. Gráfico de barras mostrando os números de cópias/g em log das bactérias orais em todas as amostras.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências oligonucleotídicas usadas na detecção de <i>Escherichia coli</i> , e das espécies dos gêneros <i>Bacteroides</i> e <i>Parabacteroides</i> por multiplex-PCR.....	62
Tabela 2 - Sequências oligonucleotídicas usadas na detecção de <i>Bacteroides fragilis</i> toxigênicos.....	65
Tabela 3 - Sequências oligonucleotídicas usadas na detecção de <i>Clostridium perfringens</i> toxigênicos.....	66
Tabela 4 - Sequências nucleotídicas na detecção quantitativa de bactérias intestinais (sistema SYBR) e orais (sistema TaqMan).....	72
Tabela 5 - Dados demográficos de pacientes com e sem câncer de reto.....	73
Tabela 6 - Espécies bacteriana isoladas de hemoculturas positivas de pacientes com câncer de reto.....	75
Tabela 7 - Distribuição das espécies dos gêneros <i>Bacteroides</i> e <i>Parabacteroides</i> em amostras fecais de 25 pacientes com e 16 sem câncer de reto.....	76
Tabela 8 - Distribuição das espécies do gênero <i>Clostridium</i> isoladas de 41 amostras fecais de 25 pacientes com e 16 sem câncer.....	84
Tabela 9 - Detecção quantitativa de bactérias intestinais (sistema SYBR) e orais (sistema TaqMan) em amostras fecais de pacientes com e sem câncer retal.....	85
Tabela 10 - Detecção quantitativa de bactérias intestinais (sistema SYBR) e orais (sistema TaqMan) em amostras de tecido adjacente e sadio de pacientes com e sem câncer retal.....	86
Tabela 11 - Quantificação de bactérias intestinais (sistema SYBR) e orais (sistema TaqMan) em amostras de tecido adjacente e sadio de pacientes com câncer e sem câncer retal.....	87
Tabela 12 - Quantificação de bactérias intestinais (sistema SYBR) e orais (sistema TaqMan) em amostras de tecido tumoral e tecido sadio adjacente ao tumor, em pacientes com câncer de reto.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-PCR: do inglês *Application of polymerase chain reaction with arbitrary primer*

ATCC: do inglês *American Type Culture Collection*

BBE: ágar *Bacteroides fragilis* bile-esculina

BEC: enterotoxina binária

BHI: do inglês *brain heart infusion*

bp: do inglês *base pair*

BSA: do inglês *bovine serum albumin*

CCR: câncer de colorretal

CR: câncer de reto

DNA: do inglês *deoxyribonucleic acid*

dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados

EC: solução de Tris-NaCl-EDTA- Brij 58- Na-desoxicolato - Na-lauroilsarcosina

EDTA: do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*

ES-P: solução de EDTA-sarcosina- proteinase K

ETBF: *Bacteroides fragilis* enterotoxigênico

FAP: polipose adenomatosa familiar

h: hora

HNCCP: câncer colorretal hereditário sem polipose

IC: Instabilidade cromossômica

ICB: Instituto de Ciências Biomédicas

ICESP: Instituto do Câncer do Estado de São Paulo

IMC: índice de massa corpórea

INCA: Instituto Nacional de Câncer

kb: quilobase

mg: miligramas

MgCl₂: cloreto de magnésio

min.: minuto

mM: milimolar

mL: mililitros

MSI: instabilidade de microssatélite

NetB: do inglês *Necrotic enteritis toxin B-like*

OPA: do inglês *oligonucleotide primers arbitrary*

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PFGE: do inglês *pulsed field gel electrophoresis*

PIV: solução Tris-NaCl

Q1: primeiro quartil

Q3: terceiro quartil

rpm: rotações por minuto

rRNA: do inglês *Ribosomal ribonucleic acid*

SDS: do inglês *sodium dodecyl sulfate*

seg.: segundo

TBE: solução tampão de Tris-Borato- EDTA

TE: Tampão Tris-EDTA

T_m: Temperatura de *melting*

TpeL: do inglês *Toxin Clostridium perfringens large cytotoxin*

TSA: do inglês *Trypticase soy agar*

UV: Radiação Ultravioleta

µg: micrograma

µL: microlitro

µM: micromolar

ng: nanograma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	24
2.1. Geral.....	24
2.2. Específicos.....	24
3. ANÁLISE DA LITERATURA.....	25
3.1. Câncer	25
3.2. Câncer de colorretal (CCR).....	28
3.3. Câncer de reto.....	29
3.4. Fatores de riscos	30
3.4.1. Fatores genéticos.....	31
3.4.2. Síndromes hereditárias.....	34
3.4.3. Dieta.....	35
3.4.4. Obesidade.....	37
3.4.5. Tabagismo.....	38
3.4.6. Álcool.....	39
3.4.7. Microbiota.....	39
3.5. Microbiota.....	40
3.5.1. Microbiota intestinal.....	40
3.5.2. Microbiota oral.....	45
3.6. Bactérias anaeróbias.....	48
3.6.1. Espécie <i>Clostridium perfringens</i>	50
3.6.2. Espécie <i>Bacteroides fragilis</i>	55
3.7. Bactérias e câncer colorretal.....	57
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	60
4.1. Participantes.....	60
4.2. Coleta das amostras clínicas.....	60
4.2.1. Amostras fecais.....	60
4.2.2. Amostras sanguíneas.....	60
4.2.3. Amostras de tecido tumoral e adjacente e tecido sadio de pacientes com e sem câncer, respectivamente.....	60
4.3. Isolamento e identificação bacteriana.....	61

4.3.1. Material fecal.....	61
4.3.2. Material sanguíneo.....	61
4.3.3. Identificação bacteriana.....	61
4.4. Avaliação molecular.....	63
4.4.1. Extração de DNA total de material fecal.....	63
4.4.2. Extração de DNA total do sangue.....	63
4.4.3. Extração de DNA total de tecido.....	63
4.4.4. Extração de DNA de <i>B. fragilis</i> e <i>C. perfringens</i>	64
4.4.5. Avaliação da qualidade, concentração e integridade do DNA.....	64
4.5. Avaliação das cepas toxigênicas de <i>B. fragilis</i> e <i>C. perfringens</i>	64
4.5.1. Detecção de <i>B. fragilis</i> enterotoxigênicos (presença do gene <i>bft</i> e respectivos subtipos <i>bft-1</i> , <i>bft-2</i> e <i>bft-3</i>).....	64
4.5.2. Detecção de <i>C. perfringens</i> toxigênicos.....	65
4.5.3. Detecção de genes <i>nanH</i> , <i>nanI</i> e <i>nanJ</i> na produção de neuraminidase.....	67
4.6. Diversidade genética de <i>B. fragilis</i> pela técnica de AP-PCR.....	68
4.7. Diversidade genética de <i>C. perfringens</i> pela técnica de PFGE.....	68
4.8. Construção dos dendrogramas da diversidade genética de <i>B. fragilis</i> e <i>C. perfringens</i>	69
4.9. Análise quantitativa de bactérias intestinais pelo sistema SYBR Green e bactérias orais pelos sistema TaqMan nas amostras clínicas (fezes, sangue e tecidos).....	70
4.10. Análise estatística.....	71
5. Resultados.....	73
5.1. Dados demográficos.....	73
5.2. Isolamento de <i>B. fragilis</i> nas amostras fecais.....	74
5.3. Isolamento de <i>C. perfringens</i> nas amostras fecais.....	74
5.4. Toxinotipagem de <i>C. perfringens</i>	77
5.5. Detecção dos genes <i>tpeL</i> , <i>becA</i> , <i>becB</i>	77
5.6. Detecção dos genes <i>netB</i> , <i>netE</i> , <i>netF</i> , <i>netG</i>	77
5.7. Detecção dos genes <i>nanH</i> , <i>nanI</i> , <i>nanJ</i>	77
5.8. Diversidade genética das cepas de <i>B. fragilis</i> isoladas de pacientes com e sem câncer de reto.....	77
5.9. Diversidade genética das cepas toxigênicas de <i>C. perfringens</i> isoladas de	

pacientes com e sem câncer de reto.....	79
5.10. Isolamento bacteriano nas amostras de sangue.....	83
5.11. Detecção quantitativa de bactérias intestinais e orais em amostras fecais...	84
5.12. Detecção quantitativa de bactérias intestinais e orais nas amostras de sangue.....	84
5.13. Detecção bacteriana quantitativa em tecido sadio adjacente ao tumor e em tecido retal sadio.....	85
5.14. Detecção quantitativa de bactérias em tecido tumoral e em tecido sadio do paciente sem câncer.....	87
5.15. Detecção quantitativa de bactérias em tecido tumoral e em tecido sadio adjacente ao tumor.....	88
6. Discussão.....	93
7. Conclusão.....	103
REFERÊNCIAS.....	104
Anexo I – Questionário demográfico e características clínicas.....	120
Anexo II – Artigo publicado.....	121

1. INTRODUÇÃO

O câncer de cólon e reto é considerado o terceiro tumor maligno mais prevalente nos países desenvolvidos, onde aproximadamente 1,8 milhões de novos pacientes/ano são observados, com 862.000 mortes anuais (WHO, 2018). Nos Estados Unidos da América a incidência de câncer colorretal tem diminuído entre os maiores de 50 anos e aumentado abaixo dessa faixa etária, essa mudança possivelmente se deve as alterações do estilo de vida (JAHANI-SHERAFAT *et al.*, 2018; RAWLA; SUNKARA; BARSOUK, 2019).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), em 2018, na população brasileira, o câncer de colorretal apresentou uma estimativa de 36.360 novos casos, sendo considerado o 3º tumor mais prevalente em homens com (16.830 casos) e o 2º mais comum em mulheres (17.900 casos). A estimativa para o ano de 2020 a 2022 é de 41 mil novos casos, possivelmente será considerado o 2º tumor mais prevalente em homens e mulheres (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2019; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2018).

Nas regiões Sul e Sudeste, em relação às regiões Norte e Nordeste, a população apresenta elevada incidência dessa neoplasia, provavelmente devido aos diferentes padrões alimentares e sócio-econômicos (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2019; PINHO; FRANÇA-JUNIOR, 2003).

As neoplasias que acometem o cólon e o reto devem ser tratadas de maneiras distintas, pois o cólon e o reto apresentam diferenças na anatomia, função e padrões metastáticos (TAMAS *et al.*, 2015). Dessa forma é possível que a microbiota intestinal bacteriana envolvida nesses processos seja distinta.

Estima-se que menos de 10% dos casos de desenvolvimento do câncer intestinal estejam relacionados a históricos familiares, como polipose adenomatosa familiar (FAP) e o câncer colorretal hereditário sem polipose (HNCCP); e 70% dos casos podem ser classificados como esporádicos (ou somáticos), ou seja, não estão relacionados a fatores hereditários (KRAVOCHUCK; CHURCH, 2017; PARREIRAS *et al.*, 2013; RONCUCCI; PEDRONI; MARIANI, 2017).

Os fatores envolvidos no desenvolvimento dos diversos tipos de câncer são: idade, gênero, fatores ambientais, doenças inflamatórias intestinais, dieta, tabagismo, sedentarismo, índice de massa corpórea (IMC), diabetes melitus, e

fatores genéticos (CARR *et al.*, 2018; ELINAV *et al.*, 2013; NUNEZ *et al.*, 2018). Interessantemente, DOUBENI *et al.*, (2012) afirmam que os fatores de risco como: saneamento, educação escolar; e comportamento de risco como: dieta, falta de exercícios, e uso de medicamentos, entre outros, estão mais associados com o desenvolvimento de câncer de cólon do que ao câncer de reto.

A microbiota residente intestinal é constituída por várias espécies bacterianas comensais que fornecem ao hospedeiro uma proteção contra patógenos exógenos. Por outro lado, a microbiota residente pode causar inflamação ou tumorigênese devido à capacidade de apresentar atividades enzimáticas, como β -glicosidases, álcool desidrogenase, ácidos graxos de cadeia curta, nitroreduases, fitoquímicos, ácidos biliares secundários, entre outros (HUYCKE; GASKIN, 2004; LOUIS; HOLD; FLINT, 2014). Alterações na ecologia intestinal podem causar constipação e aumentar os riscos de desenvolver doenças, como: colite e câncer de cólon (DENIPOTE; TRINDADE; BURINI, 2010).

O papel da microbiota é de fundamental importância para a homeostase do intestino, podendo desempenhar um papel favorável ou desfavorável para o organismo. Alterações na homeostase acarretam uma série de desordens tanto na composição microbiana como no metabolismo do hospedeiro (HOLMES, A. J. *et al.*, 2017; HOLMES, E. *et al.*, 2012).

As bactérias anaeróbias são predominantes na microbiota residente da cavidade bucal, trato intestinal, e trato genital feminino, tendo como destaque espécies dos gêneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (BEDANI *et al.*, 2010; SUMMANEN, 1993). Algumas dessas espécies bacterianas tais como os dos gêneros *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp., têm mostrado alguma relação simbiótica com a saúde do hospedeiro (GOMES; MALCATA, 1999; SHAH, N. P., 2007; SLAVIN, 2013).

Segundo GAO *et al.*, (2015), o filo *Firmicutes* e os gêneros *Lactococcus*, *Bacteroides* e *Streptococcus* estariam presentes em maior abundância no tecido tumoral de câncer colorretal quando comparados com os tecidos adjacentes sem câncer. Espécies do gênero *Bacteroides* se destacam dentre a família *Bacteroidaceae*, por serem o gênero mais observado em infecções do trato gastrointestinal. A virulência dessas bactérias está associada à habilidade de aderir às superfícies celulares, devido à expressão de cápsulas, fímbrias e adesinas, produção de toxinas e enzimas hidrolíticas, e ácidos graxos de cadeia curta, que

inibem a resposta de células T e interfere na quimiotaxia celular, além de induzir a apoptose de macrófagos e polimorfonucleares, estimulando assim, a resposta inflamatória (OBISO, JR.; BEVAN; WILKINS, 1997).

Dentre as espécies do gênero *Bacteroides*, *B. fragilis* destaca-se por participar de infecções oportunistas de natureza endógena, assim como, de infecções extra-intestinais, urogenitais e bacteremias (SACK *et al.*, 1994). Sua patogenicidade está também relacionada a proteínas de membrana e produção de enzimas específicas, incluindo a enterotoxina ou fragilisina (SEARS, 2009; SEARS; GEIS; HOUSSEAU, 2014). A presença de *B. fragilis* enterotoxigênico (ETBF) em material fecal e em biópsia de cólon, e doença inflamatória intestinal tem sido relatada (BOLEIJ *et al.*, 2015; ULGER TOPRAK *et al.*, 2006).

Clostridium perfringens pertence à microbiota residente intestinal de humanos. A virulência dessa bactéria é dependente da produção de toxinas, podendo produzir até 20 tipos diferentes de toxinas, tais como: alfa, beta, épsilon, iota, enterotoxina, NetB, TpeL, a mais recente, enterotoxina binária (BEC) e enzimas hidrolíticas (REVITT-MILLS; ROOD; ADAMS, 2015; YONOJI *et al.*, 2014). Antigamente, as cepas eram classificadas segundo a produção de quatro toxinas: toxina alfa (tipo A); toxina alfa e beta (tipo C), toxinas alfa, beta e épsilon (tipo B); toxinas alfa e épsilon (tipo D); e toxinas alfa e iota (tipo E) (UZAL, FRANCISCO *et al.*, 2014). Recentemente uma nova classificação do toxinotipo foi proposta por Rood *et al.*, (2018), acrescentando mais dois toxinotipos o F e o G: com a produção da toxina alfa e enterotoxina (tipo F) e toxina alfa e a NetB (tipo G), futuras alterações nessa classificação podem vir a serem proposta com adição de outras toxinas. Essas toxinas apresentam ação letal ou tóxica contra as células epiteliais do hospedeiro; entretanto, a afinidade de cada toxina com as células, ainda não está totalmente definida (TWETEN, 2001).

Além disso, espécies toxigênicas de *C. perfringens*, podem expressar até três sialidases, sendo codificadas pelos genes *nanH*, *nanI* e *nanJ* (LI; MCCLANE, 2014; LLANCO; NAKANO; AVILA-CAMPOS, 2014). Essas neuraminidases ou sialidases são enzimas que auxiliam no processamento de oligossacarídeos contendo ácido siálico. A sialidase NanI é predominante em *C. perfringens* do tipo A quando comparadas com às outras duas sialidases (LI; MCCLANE, 2014).

A maioria das bactérias anaeróbias presente na microbiota intestinal produzem diversos fatores de virulência, principalmente toxinas que agredem os

tecidos do hospedeiro. Embora as ações tóxicas sejam conhecidas, até o momento não é observada na literatura, alguma relação com células tumorais, particularmente tumores de câncer de cólon e/ou reto.

A bactéria facultativa *Escherichia coli* é uma bactéria comensal que participa de processos homeostáticos no intestino, mas também pode causar danos ao hospedeiro através da sua patogenicidade provenientes da presença de genes de virulência (MAINIL, 2013; SAROWSKA *et al.*, 2019).

Apesar de alguns estudos recentes mostrarem que existe uma associação da presença da bactéria *Escherichia coli* em lesões tumorais (LIU *et al.*, 2019), evidências de causa e consequência ainda necessitam ser investigadas (WASSENAAR, 2018). Existem diversas hipóteses da ação pró-oncogênica de espécies de *E. coli*, como as que possuem a capacidade de produzir toxinas (ANTONIO HERNÁNDEZ-LUNA; LAGUNES-SERVIN; LOPEZ-BRIONES, 2016) e/ou servir como bactéria *driver* para bactérias *passenger* oncogênicas (TJALSMA *et al.*, 2012).

Dentre as toxinas produzidas pela *E. coli*, a colibactina demonstrou potente efeito carcinogênico em modelo murino de inflamação intestinal (BAKTHAVATCHALU *et al.*, 2018). A capacidade de induzir o processo oncogênico é dependente dos genes de *pks* presentes nas cepas de *E. coli* (ARTHUR *et al.*, 2012). O mecanismo pelo qual a colibactina influencia no desenvolvimento do câncer está correlacionada com as propriedades de atuar no ciclo e morte de células eucarióticas (FAÏS *et al.*, 2018).

A cavidade oral é um ecossistema complexo, onde há a interação de diversos microrganismos, e observa-se um equilíbrio constante entre a atividade microbiana e a resposta imunológica do hospedeiro. Composta pelos filos *Firmicutes* (principalmente *Streptococcus*), *Bacteroidetes* (principalmente *Prevotella*) e *Proteobacteria* com *Fusobacteria*, *Actinobacteria* e *Haemophilus* segundo o projeto do microbioma humano desenvolvido pelo National Institute of Health (NIH) (HUSE *et al.*, 2012; KOLIARAKIS *et al.*, 2019; ZHOU *et al.*, 2013).

Bactérias anaeróbias orais como: *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* são consideradas oportunistas, pois em processo de disbiose oral corroboram com o desenvolvimento de doenças periodontais (AHN; SEGERS; HAYES, 2012). *P. gingivalis* e *F. nucleatum* possuem a capacidade de gerar alta

resposta pró-inflamatória (MCCOY *et al.*, 2013) e infecções crônicas (HAN; WANG, 2013).

Além disso, a presença de *P. gingivalis* em um processo inflamatório pode levar ao desenvolvimento de um microambiente pró-tumoral devido à sua capacidade de atuar na divisão celular e na apoptose das células do hospedeiro (MAO *et al.*, 2007). Também, estudos demonstram a associação de *F. nucleatum* com a neoplasia colorretal, entretanto, os mecanismos dessa relação ainda não estão totalmente esclarecidos (KOSTIC *et al.*, 2012). Ahn *et al.*, (2012) detectaram o aumento de bactérias gram-negativas pertencentes as espécies dos gêneros *Fusobacterium*, *Porphyromonas* e *Prevotella* em amostras fecais de pacientes com câncer de cólon e reto. Esse link oral-cólon pode constituir uma outra rota para bactérias orais mediando respostas inflamatórias sistêmicas.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Tendo em vista, a importância da participação das bactérias intestinais e orais como microbiotas residentes em processos clínicos, particularmente, em diversos tipos de câncer, este estudo visa obter dados microbiológicos sobre a possível associação dessas bactérias com a neoplasia retal.

2.2. Específicos

1. Análise qualitativa da presença de espécies dos gêneros *Bacteroides*, *Parabacteroides* e *Clostridium*, bem como de espécies toxigênicas de *B. fragilis* e *C. perfringens* em material fecal de pacientes com câncer e sem câncer de reto;
2. Análise qualitativa da presença de espécies dos gêneros *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Clostridium* e *Escherichia coli*, bem como de espécies toxigênicas de *B. fragilis* e *C. perfringens* em sangue de pacientes com câncer e sem câncer de reto;
3. Determinar a diversidade genética das cepas de *B. fragilis* e *C. perfringens* isoladas de pacientes com e sem câncer de reto e;
4. Análise quantitativa da presença de bactérias intestinais (*Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium perfringens*, *Clostridioides difficile*, *Clostridium Cluster I*, e Filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes*) e bactérias orais (*Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella intermedia*, *Dialister pneumosintes*, e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) em: fezes, sangue, tecido tumoral e tecido adjacente ao tumor de pacientes com câncer de reto; ou tecido retal sadio de pacientes sem câncer.

3. ANÁLISE DA LITERATURA

3.1. Câncer

O câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, sendo responsável por cerca de 9,6 milhões de mortes em 2018 (BRAY *et al.*, 2018).

Os tipos de câncer mais comuns no mundo são: câncer de pulmão e mama (2,09 milhões de casos cada), seguidos por colorretal (1,8 milhões de casos), próstata (1,28 milhões de casos), câncer de pele não-melanoma (1,04 milhões de casos) e estômago (1,03 milhões de casos). Já os cânceres que estão relacionados com a mortalidade são: pulmão (1,76 milhões de mortes), colorretal (862 mil mortes), estômago (783 mil mortes), fígado (782 mil mortes) e mama (627 mil mortes) (WHO, 2018). A estimativa de incidência de câncer do ano de 2018 a 2040 é de 18,1 milhões a 29,5 milhões de novos casos (BRAY *et al.*, 2018).

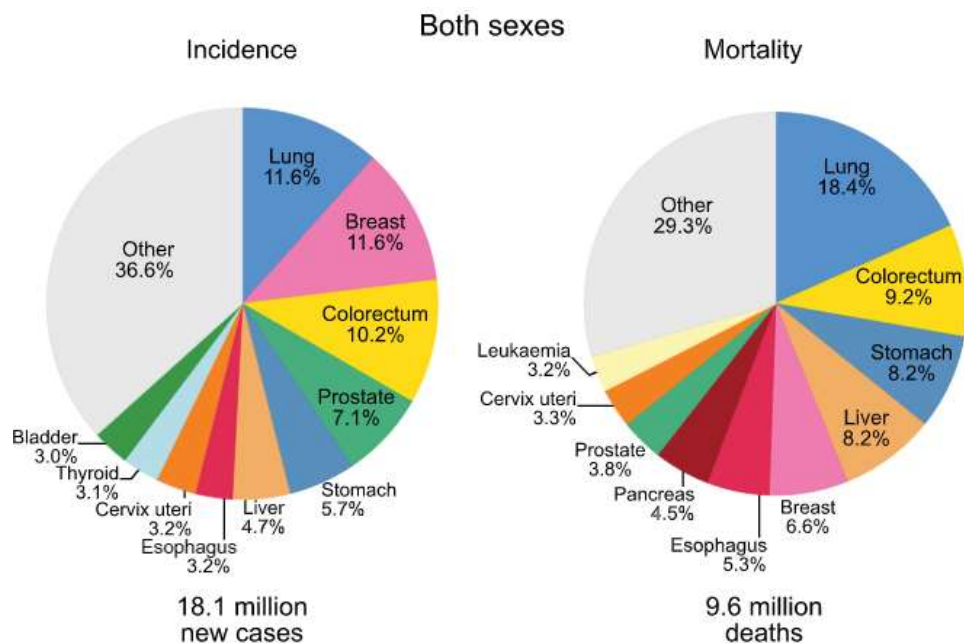


Figura 1: Gráficos de pizza apresentam a distribuição de casos e mortes para os 10 tipos de câncer mais comuns em 2018 para ambos os sexos. (BRAY *et al.*, 2018).

No Brasil no ano de 2020-2022 a estimativa será de cerca de 625 mil novos casos, sendo o câncer de pele não melanoma responsável por 177 mil novos casos, mama e próstata 66 mil cada, cólon e reto 41 mil, pulmão 30 mil e estômago 21 mil (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2019). Estima-se que os tipos de cânceres

com maiores incidências em homens serão: próstata (29,2%), cólon e reto (9,1%), pulmão (7,9%), estômago (5,9%) e cavidade oral (5,0%). Já nas mulheres serão: mama (29,7%), cólon e reto (9,2%), colo do útero (7,4%), pulmão (5,6%) e tireóide (5,4%), em ambos os sexos excluem o câncer de pele não melanoma, o que corresponderia em homens (27,1%) e nas mulheres (29,5%) (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2019).

Câncer é uma denominação de um conjunto de mais de 100 doenças que tem como principal característica o crescimento celular desordenado e que possui a capacidade de invadir órgão e tecidos (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2019).

O corpo humano é constituído aproximadamente de 30 trilhões de células, no interior de cada uma delas acontecem inúmeras reações e processos metabólicos para que continuem funcionando de maneira adequada. As células que apresentam alterações em seu funcionamento sejam alterações intracelulares, como as mutações ou alterações da molécula de DNA, ou extracelulares, como células portadoras de patógenos e estímulos de sobrevivência, passam por um processo conhecido como morte celular programada (ALBERTS *et al.*, 2017).

A diferença das células normais para as células cancerígenas é que a primeira, tem a capacidade de crescer, se dividir, não infiltrando órgãos e tecidos, ficando apenas restrita ao seu sítio e sofre morte celular programa quando necessária. Já a segunda, tem a capacidade de produzir novas células quando não são necessárias, se infiltram em órgãos e tecidos e tem a capacidade de invasão, se espalhando em diversas regiões do corpo e não conseguem realizar a morte celular programada de forma eficiente (BALAGAMWALA; AMARNATH, 2018).

O principal fator que leva ao desenvolvimento de câncer é a alteração do DNA da célula, devido mutações genéticas provenientes de diversos fatores principalmente ambientais ou genéticos (MICHOR; IWASA; NOWAK, 2004).

O surgimento do câncer ocorre através da transformação de células normais em células tumorais em um processo de três estágios: estágio de iniciação, promoção e progressão (EGGERT, 2011) (Figura 2). O estágio de iniciação é o primeiro estágio da carcinogênese, em que os genes sofrem modificações permanentes devido ao agente carcinogênico (conhecido como oncoiniciador), devido a isso ocorre à ativação de oncogenes e/ou a inativação de genes supressores tumorais, porém ainda não é detectável o tumor (DEBERARDINIS *et al.*, 2008; EGGERT, 2011).

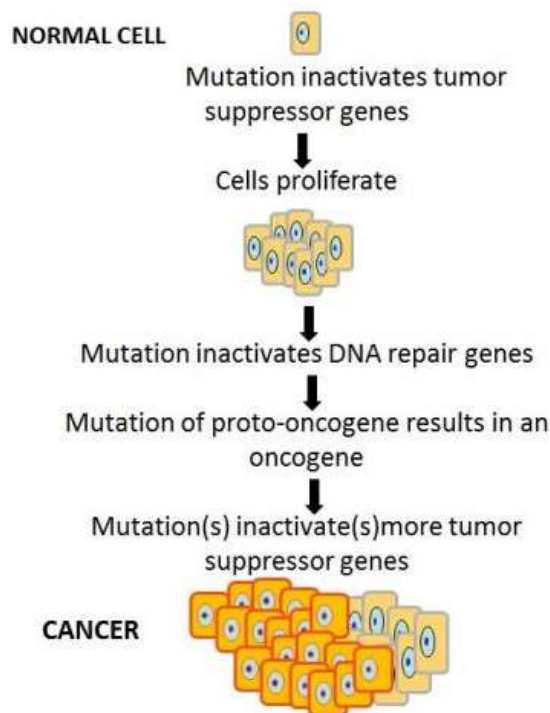


Figura 2. Processo de transformação da célula normal em célula tumoral. (WRIGHT, 2015).

Na promoção, segundo estágio, ocorre alterações dos genes nas células devido a agentes carcinogênicos (mutações somáticas) – oncopromotores (como por exemplo: radiação, agentes químicos, álcool, cigarro, vírus, etc.); a célula é lentamente transformada em célula maligna, através da proliferação; entretanto alguns indivíduos podem albergar mutações genéticas devido a herança familiar (mutações germinativas) e que pode disparar o mecanismo de uma célula cancerosa em potencial (DE ALMEIDA *et al.*, 2005).

No estágio de progressão, terceiro estágio, as células malignas se multiplicam de forma descontrolada e irreversível, levando a formação de tumor benigno em tumor maligno com a capacidade de infiltrar e invadir tecidos e órgãos (DE ALMEIDA *et al.*, 2005; NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2017).

Para que ocorra a carcinogênese, além de mutações no DNA, é necessário que o mecanismo de reparo de DNA esteja danificado, ausente ou ineficiente e, além disso, que ocorra a inativação de genes supressores ao tumor (BRÜCHER; JAMALL, 2014).

O desenvolvimento do câncer no indivíduo está associado as condições hereditárias, processos infecciosos ou de forma esporádicas (sem uma causa específica ou esclarecida). As condições hereditárias correspondem em média a 5 a

10% de todos os tipos de cânceres, enquanto que processos infecciosos correspondem cerca de 15% a 70-80% estão relacionados as condições esporádicas (BLATTNER, 1999; BRÜCHER; JAMALL, 2014; LIU *et al.*, 1995).

3.2. Câncer Colorretal (CCR)

O câncer colorretal é o terceiro tipo de câncer mais comum no mundo com 1.8 milhões de novos casos no ano de 2018, correspondendo cerca de 10,6% de todos os tipos de câncer com exceção de câncer de pele não melanoma (FERLAY *et al.*, 2019). Com uma maior incidência em países desenvolvidos, e é previsto um aumento mundial para 2,5 milhões de casos anuais em 2035 (DEKKER *et al.*, 2019).

Nos homens a incidência de câncer colorretal corresponde a 3° posição de todos os tipos de câncer, com 1.006.019 de novos casos no ano de 2018, com 11,4% de todos os tipos de câncer com exceção de câncer de pele não melanoma. Já nas mulheres a incidência se deve a 2° posição de novos casos no ano de 2018 com uma porcentagem de 9,7% de todos os tipos de câncer com exceção de câncer de pele não melanoma. Nos homens a incidência de câncer colorretal é menor apenas para o câncer de pulmão e próstata e nas mulheres a incidência é menor apenas para o câncer de mama (BRAY *et al.*, 2018).

No Brasil a estimativa para novos casos de câncer de cólon e reto é de cerca de 40.990 para o ano de 2020, sendo o 2° maior tipo de câncer em homens com 20.520 e o 2° maior nas mulheres com 20.470 novos casos. No ano de 2017 foram constatados 18.867 números de mortes pela doença, sendo 9.207 homens e 9.660 mulheres (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2019).

Quando se refere às regiões do Brasil, a incidência de todos os tipos de câncer (exceto os tumores de pele não melanoma), o câncer de cólon e reto nos homens corresponde a 2° posição na Região Sudeste (28,62/100 mil) e Centro-Oeste (15,40/100 mil), 3° na Região Sul (25,11/100 mil) e 4° Regiões Nordeste (8,91/100 mil) e Norte (5,27/100 mil). Já as incidências regionais para as mulheres, o câncer de colón e reto apresenta a 2° posição na Região Sudeste (26,18/100 mil) e Sul (23,65/100 mil) e corresponde a 3° posição para as Regiões Centro-Oeste (15,24/100 mil), Nordeste (10,79/100 mil) e Norte (6,79/100 mil) (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2019).

As neoplasias que acometem tanto a região do cólon quanto a do reto são comumente classificadas de maneira única, sendo denominadas de câncer colorretal (CCR), baseado nas suas semelhanças estruturais anatômicas e histológicas. Porém já é comprovado que esses tipos de neoplasias devem ser tratados de maneiras distintas, pois ambas apresentam diferenças, quanto a sua localização, origem embrionária, perfil macroscópico, histológicos, patologia, padrões metastáticos e tratamentos (PASCHKE *et al.*, 2018; TAMAS *et al.*, 2015).

O cólon e o reto além de possuírem funções diferentes também são expostos ao material fecal com a consistência (mais concentrado e menos concentrado) e tempo de exposição diferentes, além de diferentes níveis de pH de cada região (WEI *et al.*, 2004).

Nos Estados Unidos da América é estimado que 41% de todas as neoplasias do sistema intestinal ocorram no cólon e 28% no reto (THANIKACHALAM; KHAN, 2019). No Brasil esses dados não são discriminados.

3.3. Câncer de Reto

O reto faz parte do sistema gastrointestinal, localizado na porção final do intestino grosso, entre o cólon sigmóide e o canal anal, possui cerca de 10 a 15 cm de comprimento. É dividido em três partes: o reto superior, médio e inferior, o seu início se dá na junção retossigmóide e termina na região anorretal. A sua parede é constituída por cinco camadas, mucosa, submucosa, músculo circular interno, músculo longitudinal externo e camada serosa (BENSON *et al.*, 2018; FAZELI; KERAMATI, 2015).

O anorreto ou ampola retal (a junção da estrutura reto com o ânus/ dilatação da estrutura) possui a função de reservatório e continência fecal, pois possui a capacidade de armazenar as fezes e realizar a defecação quando necessário. Com o aumento do conteúdo no anorreto, se tem uma elevação da pressão intra-retal o que ocasiona a expansão da parede do reto; essa pressão intra-retal deve ser maior que anal para que ocorra a evacuação. Dentro da parede do reto se encontra os receptores de estiramento, que levam os estímulos ao encéfalo, estimulando a defecação (FANG *et al.*, 2008; LANGE *et al.*, 2007).

O câncer retal é o segundo tipo de câncer mais comum no intestino, ficando atrás apenas do câncer de cólon. O cólon e o reto apresentam diferenças quanto à origem embionária, enquanto que o primeiro se origina no intestino médio e posterior o outro se origina no intestino posterior, o reto se localiza na parte final do intestino grosso e isso faz com que seja mais exposto ao material fecal. Essas diferenças não são encontradas apenas na origem embionária, mas também a anatomia, níveis de pH, o gradiente de receptores de hormônios, inervação, função e vascularização, entre outros (DENG, 2017; FAZELI; KERAMATI, 2015; WEI *et al.*, 2004).

O câncer retal está fortemente associado à presença de metástase pulmonar quando comparados ao câncer de cólon, devido as diferentes vias de drenagem venosa em ambos as regiões. Uma vez que o sangue do reto é levado para a circulação sistêmica e o sangue proveniente do cólon é direcionado para o fígado por meio da veia porta. A disseminação metastática se deve as essas características anatômicas (HAN *et al.*, 2014).

3.4. Fatores de Riscos

O câncer colorretal (CCR) é amplamente associado a inflamações decorrentes de infecções bacterianas (HASAN; POLLACK; CHO, 2010). Muitos fatores estão envolvidos no desenvolvimento desse processo entre eles, a idade, gênero, fatores ambientais, doença inflamatória intestinal, fatores dietéticos, tabagismo, atividades físicas, índice de massa corpórea (IMC), diabetes mellitus, e fatores genéticos (ELINAV *et al.*, 2013; WEI *et al.*, 2004).

Fatores nutricionais podem ter uma importante função na prevenção ou no desenvolvimento do CCR. Dietas ricas em carne vermelha e alimentos processados, bem como o consumo de álcool estão associados ao desenvolvimento de CCR (BRENNER; KLOOR; POX, 2014), enquanto que o consumo de uma dieta rica em frutas e vegetais, e prática de exercícios físicos está associado com a sua prevenção (LUCAS; BARNICH; NGUYEN, 2017; THANIKACHALAM; KHAN, 2019).

Estudos demonstram que alterações no estilo de vida podem influenciar a incidência e prognóstico do CCR, independentemente de fatores genéticos do paciente (CARR *et al.*, 2018).

3.4.1. Fatores genéticos

A grande maioria de cânceres do intestino pode ser originada a partir de lesões pré-neoplásicas benignas, conhecidas como pólipos adenomatosos ou adenoma, papel fundamental no desenvolvimento do câncer, e correspondem cerca de 70% de todos os pólipos. O processo de formação desses pólipos deve se a uma perda de equilíbrio entre a proliferação e esfoliação celular na cripta da célula. A malignidade dos pólipos se deve a sua classificação dependendo da sua estrutura glandular (tubular, viloso ou misto/túbular-viloso), o grau de displasia (baixo ou alto) e tamanho (menores ou maiores que 1 cm) (FLEMING *et al.*, 2012).

Pólipos colorretais são estruturas que possuem um crescimento anormal do tecido na parede do cólon ou reto, que se projetam para lúmen intestinal. Podem ser neoplásicos (aqueles que crescem de forma contínua) ou não, e quando possuem origem epitelial são denominados de adenomas. São classificados em quatro tipos: polipóides, planos, pediculados ou sésseis, o seu surgimento se dá através de associação de mutações genéticas ou ambientais (TORRES NETO; ARCIERI; TEIXEIRA, 2010).

Os dois principais tipos de pólipos com malignidade são: os adenomas e os pólipos serrilhados sésseis (PSS), apresentando o primeiro estrutura glandular tubular ou tubular-vilosos, pequenos e arredondados, a capacidade do adenoma progredir para CCR está relacionada com o aumento do pólipo. Em contraste, o PSS possui aspecto plano e serrilhados (SIMON, 2016).

Os adenomas são displásicos, pois apresentam alterações nas células, como exemplo na sua arquitetura celular, levando uma sobreposição culminando na formação do câncer e a sua principal característica é a invasão da camada mucosa sobre a submucosa (CERATO *et al.*, 2007; SINICROPE *et al.*, 1996).

O adenoma benigno são pólipos displásicos que permanecem localizados ao epitélio ou camada da mucosa, quando se tem uma penetração e invasão na região da submucosa esse processo é denominado de carcinoma (CERATO *et al.*, 2007).

Quando existe uma agressão à mucosa intestinal devido a agentes cancerígenos (físicos, químicos e biológicos) de forma precoce são conhecidas como lesões inflamatórias inespecíficas, quando essa agressão se torna intensa e possui longa duração, ocasionará o surgimento de displasia, que possui a

capacidade de evoluir de níveis podendo levar ao surgimento do carcinoma (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A progressão do câncer de cólon e/ou reto, se deve a alterações na estrutura do epitélio, através da perda de adesão celular proporcionado pela adesina E-caderina, o que leva as células epiteliais a tentarem se reorganizar para possibilitar invasão e metastase (CERATO *et al.*, 2007; SINICROPE *et al.*, 1996).

Quanto ao estadiamento do câncer de intestino acontece em quatro estágios (0-IV) (Figura 3), desde a formação de um adenoma precoce (estágio 0), confinado à mucosa ou à camada muscular (estágio I), seguido de tumor confinado à camada serosa observando um aumento da angiogênese (estágio II), comprometimento dos linfonodos (Estágio III) e violação da parede intestinal levando a metástase invadindo tecidos e órgãos (Estágio IV) (NIBBE; CHANCE, 2009).

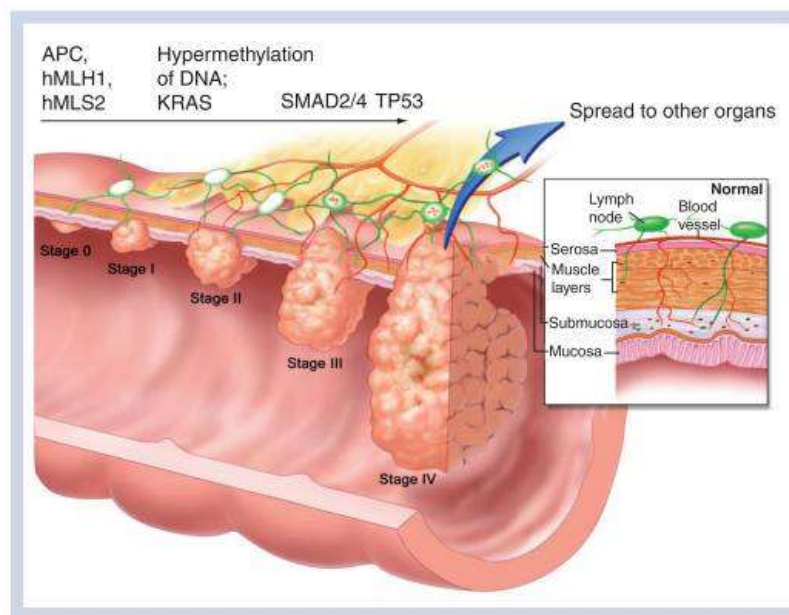


Figura 3: Progressão em etapas do câncer de colorretal. (NIBBE, CHANCE, 2009).

Existem vários fatores relacionados com o aparecimento dos adenomas (benigno) ou adenocarcinomas (maligno), como os fatores genéticos, através da herança familiar (germinativo) ou de forma adquirida (somáticos), que venham apresentar ou realizar mutações genéticas no DNA nas células intestinais (LAO; GRADY, 2011).

Aproximadamente dois terços dos cânceres colorretais são somáticos, ou seja, neoplasias que acometem tanto o reto e/ou cólon sem contribuição da

linhagem germinativa, histórico familiar ou presença de síndrome inflamatória intestinal prévia (CARETHERS; JUNG, 2015).

Em relação as diferenças no perfil molecular e expressões enzimáticas entre esses cânceres no processo de carcinogênese de origem esporádico, as mutações ou expressões da instabilidade cromossômica está presente no câncer de colo distal e reto bem como, alterações no gene *TP53*, proteínas ciclina D1, ciclina E e B-catenina, enquanto não foram evidenciados no câncer de cólon proximal. Este apresentou alterações na instabilidade de microssatélites, mutação nos genes *BRAF*, *KRAS*, *HOX* e *CDX2* e nas proteínas ciclina D3 e c-Myc, não observadas nos cânceres de cólon distal e reto (PASCHKE *et al.*, 2018).

O desenvolvimento de câncer somático pode ser influenciado por características genéticas do indivíduo e microambiente local. O CCR somático é formado pelo acúmulo de mudanças epigenéticas, através da perda de funções supressoras tumorais ou ganho de funções oncogênicas (VOGELSTEIN *et al.*, 2013).

Os dois principais mecanismos de instabilidade genômica que estão relacionados com o desenvolvimento e progressão do carcinoma colorretal: a instabilidade cromossômica (IC) e a instabilidade de microssatélites (MSI) (VALENTINI; SCHMOLL; VAN DE VELDE, 2018).

A instabilidade cromossômica, geralmente associada aos adenomas tradicionais que correspondem cerca de 70% de todos os cânceres esporádicos, gera mudanças genéticas que ativam oncogenes (*KRAS*, c-myc), inativam genes supressores tumorais (*APC*, *TP53*, *DCC/SMAD4*) e genes responsáveis pelo processo de apoptose (*BAX*) corroborando dessa forma para a carcinogêneses colorretal (CONLIN *et al.*, 2005; FRATTINI *et al.*, 2004; SIMON, 2016).

Em contraste, os pólipos serrilhados sésseis estão relacionados com a hipermetilação da região promotora de genes aberrantes e mutações no gene *BRAF* e *KRAS*, sendo este último menos frequente e mais associado ao adenoma (SIMON, 2016).

Já a instabilidade de microssatélites (MSI), pode ocorrer tanto em pólipos adenomatosos e serrilhados, podendo estar associado com mutações da linha germinativa, como ocorre no câncer colorretal hereditário sem polipose (HNCCP). Ocorre falhas durante o reparo nas replicações de DNA, mutações somáticas ou instabilidade de nucleotídeos, resultando em uma replicação desigual de sequências

repetitivas de DNA em regiões curtas e não codificantes, conhecidos como microssatélites (BOLAND; GOEL, 2010; VALENTINI; SCHMOLL; VAN DE VELDE, 2018; YAMANE *et al.*, 2014).

Existe um padrão de cinco microssatélites (D5S346, D17S250, D2S123 E BAT26, BAT25) que estão relacionados com câncer colorretal, sendo classificadas em alta, baixa ou estável instabilidade de microssatélite dependendo da presença de um ou mais desses marcadores (LOSSO *et al.*, 2012; VACANTE *et al.*, 2018).

3.4.2. Síndromes Hereditárias

Estima-se que 10% dos casos de desenvolvimento do câncer intestinal estejam relacionados a históricos familiares, como polipose adenomatosa familiar (FAP) e o câncer colorretal hereditário sem polipose (HNCCP); e 90% dos casos podem ser classificados como esporádicos, ou seja, não estão relacionados a fatores hereditários (BRENNER; KLOOR; POX, 2014).

As síndromes hereditárias são de cunho autossômico dominante e são conhecidas como síndromes poliposes, tendo um perfil de dois tipos: produção de grandes números de pólipos, como Polipose Adenomatosa Familiar (FAP- *Familial Adenomatous Polyposis*) e com um pequeno número ou ausência de pólipos, chamada de câncer de colorretal não polipose hereditário (HNPCC- *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*) (JASPERSON *et al.*, 2010; LYNCH; LYNCH; LYNCH, 2007).

A FAP é uma síndrome relacionada com câncer colorretal e corresponde cerca de 1% dos casos, o seu aparecimento se dá por volta da puberdade e seus sintomas podem surgir a partir dos trinta anos de vida, tendo como principal característica a produção de mais de cem pólipos adenomatosos. Podem manifestar tumores desmóides, também presença de pólipos no trato gastrointestinal superior, osteomas, carcinoma da tireóide, cistos epidérmicos hepatoblastomas entre outras lesões (DE MARCHIS *et al.*, 2017; GU *et al.*, 2008; MIYAKI *et al.*, 2008).

A inativação de genes supressores tumorais como APC (*APC Regulator of WNT Signaling Pathway*) é encontrada em 95% dos casos relatados para a síndrome FAP (Polipose Adenomatosa Familiar). Mutações mais raras como as dos genes *MUTYH* (de caráter autossômico recessivo), *SMAD4*, *SMAD2* e *DCC* (supressores tumorais) e o *TP53* levam a um processo de displasia e a progressão

do adenoma ao carcinoma e são comuns o seu aparecimento na região do cólon distal e reto (FRATTINI *et al.*, 2004; GU *et al.*, 2008; MIYAKI *et al.*, 2008; RONCUCCI; PEDRONI; MARIANI, 2017).

HNPCC também conhecida como síndrome de Lynch é uma das formas mais comuns de síndromes relacionadas com câncer colorretal, correspondem cerca de 3-15% dos casos de cânceres colorretais, caracterizada pela pouca presença ou ausência de pólipos múltiplos, além de apresentarem um risco maior em desenvolver tumores extracolônicos como: tumores de ovários, endométrio, cérebro, pelve renal e ureter, pâncreas, estômago e intestino delgado (COURA; ASHTON-PROLLA; PROLLA, 2005; KRAVOCHUCK; CHURCH, 2017).

A alta instabilidade de microssatélite é comum nos tumores do HNPCC sendo mais prevalente no câncer de cólon em relação ao câncer de reto. Essa síndrome é caracterizada pela mutação dos genes de reparo de DNA, o que acarreta na aceleração do processo de carcinogênese, 70% do HNPCC está relacionado com a mutação nos genes de reparo incompatíveis (MMR) como: *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS1* ou *PMS2*, sendo os mais encontrados o *MLH1* e *MSH2*, que correspondem cerca 50% e 30% dos casos de HNPCC respectivamente (COURA; ASHTON-PROLLA; PROLLA, 2005; DA SILVA *et al.*, 2016)

Embora apenas 10% dos casos de câncer colorretal estejam correlacionados com síndromes hereditárias, estudos verificaram que as síndromes hereditárias estão mais relacionadas com o desenvolvimento do câncer de colón do que câncer retal (IACOPETTA, 2002; WEI *et al.*, 2004).

3.4.3. Dieta

A correlação entre a dieta e o desenvolvimento de câncer colorretal vêm sendo muito estudado, tanto em humanos quanto em modelos experimentais. Estudos mostram que o consumo elevado de carne vermelha e processada são consideradas fatores de riscos para o desenvolvimento de pólipos e câncer colorretal, devido a produção de compostos como: componentes nitrosos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e aminas heterocíclicas, que são considerados potentes agentes cancerígenos (Figura 4) (BINGHAM, 1999; BOUTRON-RUAULT; MESRINE; PIERRE, 2017).

A microbiota intestinal interage constantemente com produtos alimentares e metabólitos produzidos pelo hospedeiro. Alguns produtos dietéticos como carne vermelha, podem interagir com a microbiota e levar a produção de metabólitos como o sulfato de hidrogênio que pode ocasionar dano ao DNA e induzir mutagênese (HUYCKE; GASKIN, 2004; ROOKS; GARRETT, 2011) ou induzir alterações estruturais como a redução da camada de muco e aumento de moléculas que auxiliam no desenvolvimento do microambiente tumoral como fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factors*) (CIANCHI *et al.*, 2004; MCGARR; RIDLON; HYLEMON, 2005; REA *et al.*, 2018).

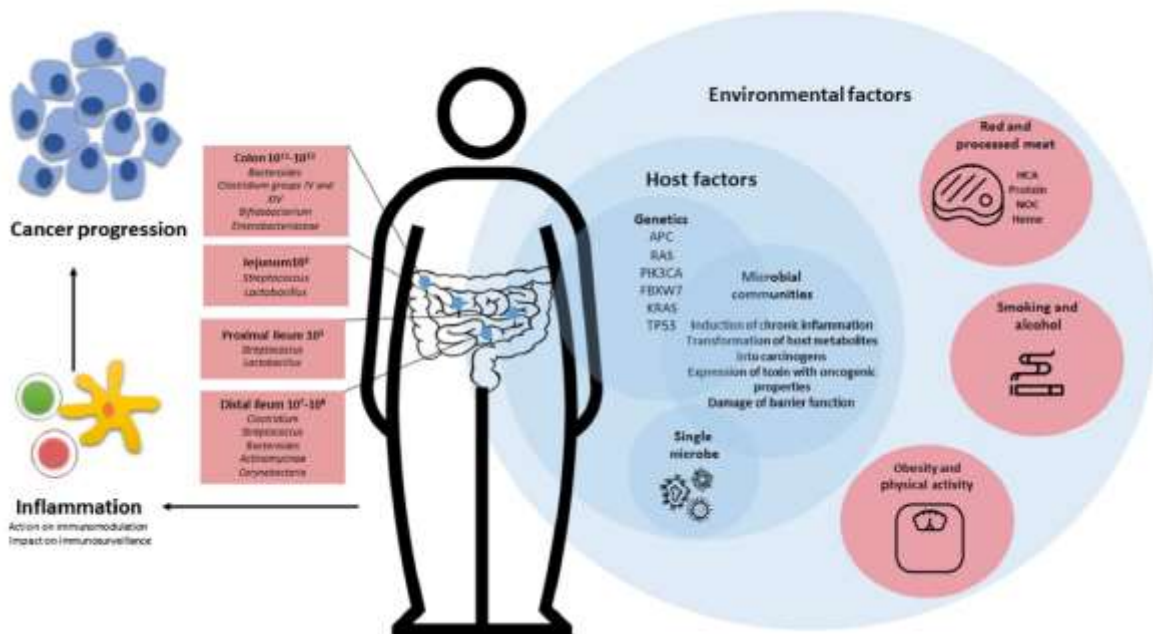


Figura 4. Fatores que influenciam o início e progressão do câncer de cólon. (ABU-GHAZALEH; CHUA; GOPALAN, 2020).

O consumo elevado de carboidratos mostrou-se um aumentado risco de câncer de reto em mulheres, enquanto que o consumo elevado de fibras insolúveis e cálcio apresentou-se como um fator de proteção para o desenvolvimento do câncer de cólon. Wakai *et al.*, (2006) também verificaram que o consumo de gorduras reduzia o risco de desenvolvimento câncer de colón e reto em mulheres.

Em contrapartida, dietas ricas em vegetais, cálcio e principalmente fibras contribuem para a prevenção do câncer de cólon e reto (GONÇALVES; MARTEL, 2013) e consumo de alimentos derivados de soja e carotenos para o câncer retal (SONG *et al.*, 2015). As fibras em particular possuem a capacidade de modular a

microbiota intestinal, favorecendo o crescimento de bactérias produtoras de butirato, que apresenta funções energéticas e epigenéticas nos colonócitos e propriedades supressoras de tumores nas linhagens de câncer colorretal (GONÇALVES; MARTEL, 2013).

A suplementação com vitaminas e minerais tem sido descritas como possíveis intervenções para a prevenção do desenvolvimento de CCR. O consumo de metionina (DE VOGEL *et al.*, 2008; KUNE; WATSON, 2006) e vitamina D (YIN *et al.*, 2009) foram associados com uma redução da incidência de CCR. Já o consumo de vitamina B6 demonstrou resultados ambíguos.(HARNACK *et al.*, 2002; ZSCHÄBITZ *et al.*, 2013).

Dessa forma, alimentos ou compostos nutricionais podem influenciar o desenvolvimento do câncer através de ações pró ou antiinflamatórias diretas. Por exemplo, alimentos com potencial antiinflamatório como vitamina A, gorduras poli insaturadas, magnésio, riboflavinas e zinco estão associadas com a prevenção de neoplasias (LUCAS; BARNICH; NGUYEN, 2017; THANIKACHALAM; KHAN, 2019).

Interessantemente, padrões ou alterações nos padrões alimentares influenciam a composição da microbiota, que também podem exercer ações pró ou antiinflamatórias. O maior consumo de proteínas e gordura leva a uma alteração na composição da microbiota intestinal com predominância do gênero *Bacteroides* e uma dieta mais rica em carboidratos uma predominância do gênero *Prevotella* (CONLON; BIRD, 2015), indicando uma possível associação da alimentação-microbiota-câncer.

3.4.4.Obesidade

A obesidade é considerada uma epidemia mundial, caracterizada de maneira geral pelo índice de massa corporal (IMC), entre 25-29,9 kg/m² como sobrepeso e obesidade acima de 30 kg/m² (PISCHON; NIMPTSCH, 2016).

Usualmente o desenvolvimento da obesidade está relacionado com o alto consumo energético e reduzida prática de atividades físicas, resultando no acúmulo de gordura nos tecidos adiposos, aumentando o risco do desenvolvimento de diversas doenças, entre elas o câncer (LAUBY-SECRETAN *et al.*, 2019). A atividade física têm sido descrita pela associação inversa com o desenvolvimento de câncer

de cólon, mas dados com câncer de reto permanecem inconclusivos (NUNEZ *et al.*, 2018).

A obesidade foi identificada como um fator de risco para o desenvolvimento de CCR, aproximadamente 11% dos casos de CCR na Europa tem sido atribuídos ao excesso de gordura corporal (Figura 4) (BARDOU; BARKUN; MARTEL, 2013). A Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (do inglês, *International Agency for Research on Cancer*) indica um aumento de 30% de chance no desenvolvimento de CCR em indivíduos obesos (LAUBY-SECRETAN *et al.*, 2016) sendo reportado um aumento de 47% no risco para o desenvolvimento de câncer de cólon e 15% no câncer de reto em indivíduos obesos quanto comparados a indivíduos com IMC normal (abaixo de 25 kg/m²) (MA *et al.*, 2013).

Dentre os possíveis mecanismos para a influência da obesidade no CCR estão a resistência a insulina e dislipidemia, além do aumento de moléculas pró-inflamatórias como citocinas e adiponectinas (HO *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2011). Não somente a obesidade influencia no desenvolvimento do CCR, mas indivíduos com sobrepeso apresentam pior prognóstico que indivíduos com IMC normal (SHAUKAT *et al.*, 2017).

Parte do fenômeno entre o CCR e a obesidade pode ser explicada também pela microbiota intestinal, de maneira que a microbiota está associada ao desenvolvimento da obesidade e vice-versa (KALLUS; BRANDT, 2012). Estudos demonstraram que a microbiota influencia na absorção energética dos alimentos (LE CHATELIER *et al.*, 2013) e também pode gerar uma inflamação intestinal (CANI *et al.*, 2007), o que acarreta o agravamento do processo de obesidade e também o desenvolvimento de neoplasias.

3.4.5. Tabagismo

O tabagismo têm sido amplamente associado com o desenvolvimento de cânceres, especialmente de pulmão (HECHT, 1999, 2012), mas recentemente foi verificado que o hábito de fumar está associado com o desenvolvimento de câncer de cólon e de reto, aumentando o risco do seu desenvolvimento em 18% quando comparado com não fumantes (BOTTERI *et al.*, 2008).

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento do câncer estão provavelmente associados aos danos no DNA ocasionados pela fumaça e seus

componentes tóxicos, que aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio e consequentemente aumentam o processo inflamatório (Figura 4) (BOTTERI *et al.*, 2008; DINO *et al.*, 2019). Em linhagens celulares o extrato do cigarro aumenta a sobrevivência de células tumorais, promovendo o rearranjo do citoesqueleto e aumentando a motilidade celular (DINO *et al.*, 2019).

3.4.6. Álcool

O consumo de álcool também tem sido associado com o desenvolvimento de câncer, em doses elevadas (acima de 50 gramas ao dia) o consumo de álcool tem associação tanto com o desenvolvimento quanto com a mortalidade em pacientes com câncer de cólon e reto (Figura 4) (CAI *et al.*, 2014). Um possível mecanismo para essa ação está relacionado com o composto acetaldeído, metabolizado a partir do álcool, que pode afetar o DNA, induzindo problemas no reparo celular, alterações estruturais, além de modificações na ação da glutatona (SINGH *et al.*, 2019; THANIKACHALAM; KHAN, 2019). Interessantemente, o consumo de álcool e o desenvolvimento de câncer colorretal parecem exibir um padrão de dose-dependência, quanto maior o consumo de álcool diário, maior o risco de desenvolvimento da neoplasia. Um consumo de 30 g/dia eleva o risco em 16% e um consumo de 45 g/dia eleva o risco em 41% (CHO *et al.*, 2004).

3.4.7. Microbiota

Além desses fatores já descritos anteriormente, a microbiota residente também é um fator importante no surgimento e desenvolvimento dessa doença. A microbiota é constituída por várias espécies de bactérias comensais que fornecem ao hospedeiro uma proteção contra patógenos exógenos ou pelos compostos metabólicos, como poliaminas, ácidos biliares secundários, ácidos graxos de cadeia curta e fitoquímicos, produzindo inflamação ou tumorigêneses (BLACHER *et al.*, 2017; HUYCKE; GASKIN, 2004; LOUIS; HOLD; FLINT, 2014).

A exposição constante a componentes produzidos pela microbiota tem sido proposto como um fator que pode influenciar o desenvolvimento de neoplasias. Dessa forma, as bactérias presentes no microambiente intestinal, sejam elas

comensais ou provenientes de um processo disbiótico, podem ser um fator preventivo ou indutor do CCR (CHEN, W. *et al.*, 2012; TJALSMA *et al.*, 2012).

O desenvolvimento do CCR por bactérias ou toxinas bacterianas, pode ser explicada pela quebra da barreira epitelial, produção de compostos pró-oncogênicos, aumento do processo inflamatório e a proliferação celular, que culmina no desenvolvimento do câncer (SCHWABE; JOBIN, 2013). Análises do microambiente intestinal indicam que não somente uma única bactéria pode ser responsável pelo processo oncogênico. Tjalsma *et al.*, (2012) propõem um modelo denominado *driver-passenger*, em que uma determinada bactéria possibilitaria a ação e colonização por outra bactéria, o que tem sido proposto como um possível mecanismo de tumorigêneses.

Além do desenvolvimento de câncer, alterações na microbiota intestinal estão associadas a diversas outras síndromes, como obesidade, diabetes, artrite reumatóide e síndromes inflamatórias intestinais (HUANG *et al.*, 2017; LEY *et al.*, 2006; VAAHTOVUO *et al.*, 2008).

Diversos fatores também influenciam na manutenção e alteração da microbiota como o envelhecimento, estilo de vida, utilização de medicamentos, etc, e embora em menor escala alterações provisórias da dieta, como restrição calórica ou aumento do consumo de determinados alimentos, podem influenciar no microbioma intestinal (REA *et al.*, 2018).

3.5.Microbiota

3.5.1.Microbiota intestinal

A microbiota intestinal humano é uma comunidade diversa constituída de aproximadamente de 10^{14} microrganismos (composta por bactérias, arqueas, vírus, fungos e protozoários), contendo mais de 1000 espécies diferentes e de 3 milhões de genes o que equivale a 100 vezes mais que os genes que constituem o genoma humano, o que lhes permite a produção de diversos metabólitos que o corpo humano não é capaz de produzir (CLEMENTE *et al.*, 2012; JANDHYALA *et al.*, 2015; TREMAROLI; BÄCKHED, 2012).

As bactérias intestinais possuem diversas funções como: contribuição nutricional, proteção contra patógenos exógenos, fortalecimento da barreira intestinal, modulação do sistema imunológico e inflamação, o que permite a

existência de uma relação simbiótica com o hospedeiro, sendo benéfico para ambos os organismos. O desequilíbrio da homeostase, leva a uma disbiose o que causaria danos tanto ao hospedeiro quanto ao microrganismo, como exemplo: diminuição da produção de anticorpos imunoglobulina A (IgA) no intestino, redução da metabolização das fibras pelo organismo, aumento da invasão por patógenos exógenos, entre outros (Figura 5) (BISCHOFF, 2011; HEINTZ-BUSCHART; WILMES, 2018; SOMMER; BÄCKHED, 2013; TREMAROLI; BÄCKHED, 2012; VALDES *et al.*, 2018).

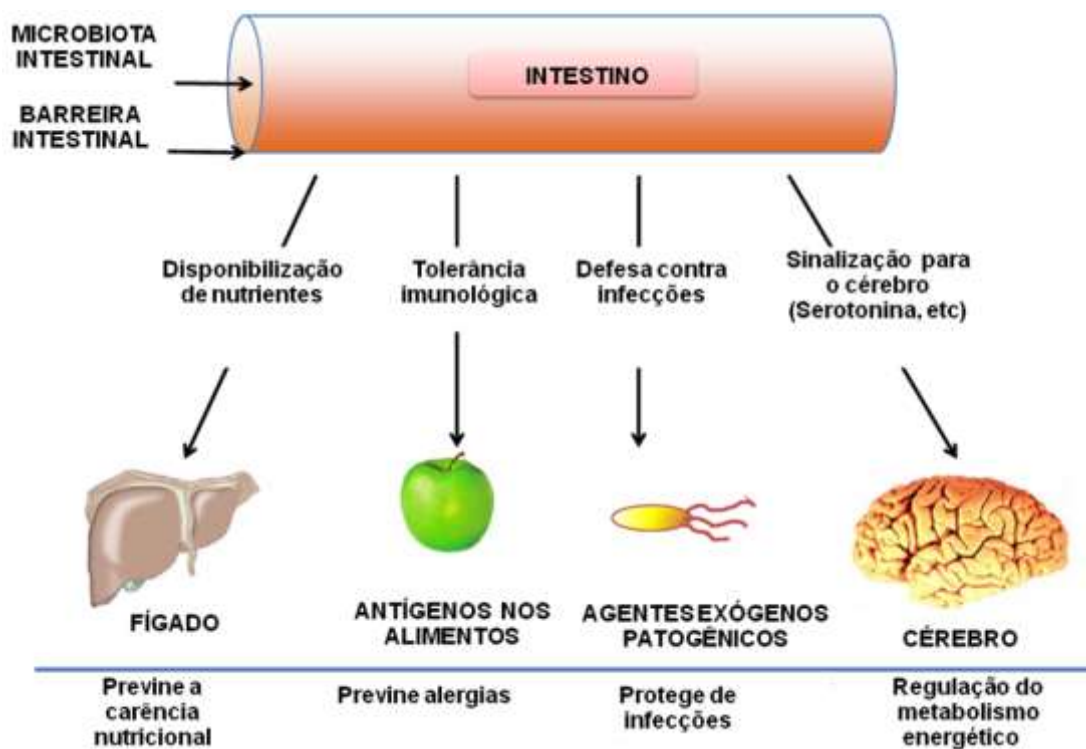


Figura 5. Interações entre a microbiota intestinal e seu hospedeiro. Adaptado de BISCHOFF, 2011.

A microbiota pode ser classificada em dois tipos: transitória (alóctone) e residente (autóctone), a primeira é constituída por bactérias transitórias provenientes principalmente do ambiente, que não possuem a capacidade de se estabelecer no local de forma permanente, e isso acontece devido a mudanças na microbiota. Já a segunda, é constituída por bactérias que estão presentes na microbiota de forma constante, que foram adquiridas no decorrer da sucessão bacteriana na vida do indivíduo, constituída em sua grande maioria de bactérias anaeróbias estritas e apesar dessa microbiota sofrer alguma alteração, essas bactérias residentes

possuem a capacidade de se restabelecer (JANDHYALA *et al.*, 2015; LITTMAN; PAMER, 2011).

Interessantemente a distribuição das bactérias por todo trato intestinal não é homogênea, o estômago possui entre 10^5 e 10^4 bactérias por grama, já o duodeno possui entre 10^5 e 10^8 bactérias por grama, chegando até 10^{10} e 10^{12} no intestino grosso. Dessa maneira influenciando o microambiente e as funções imunológicas locais (Figura 6) (JANDHYALA *et al.*, 2015; LUCAS; BARNICH; NGUYEN, 2017).

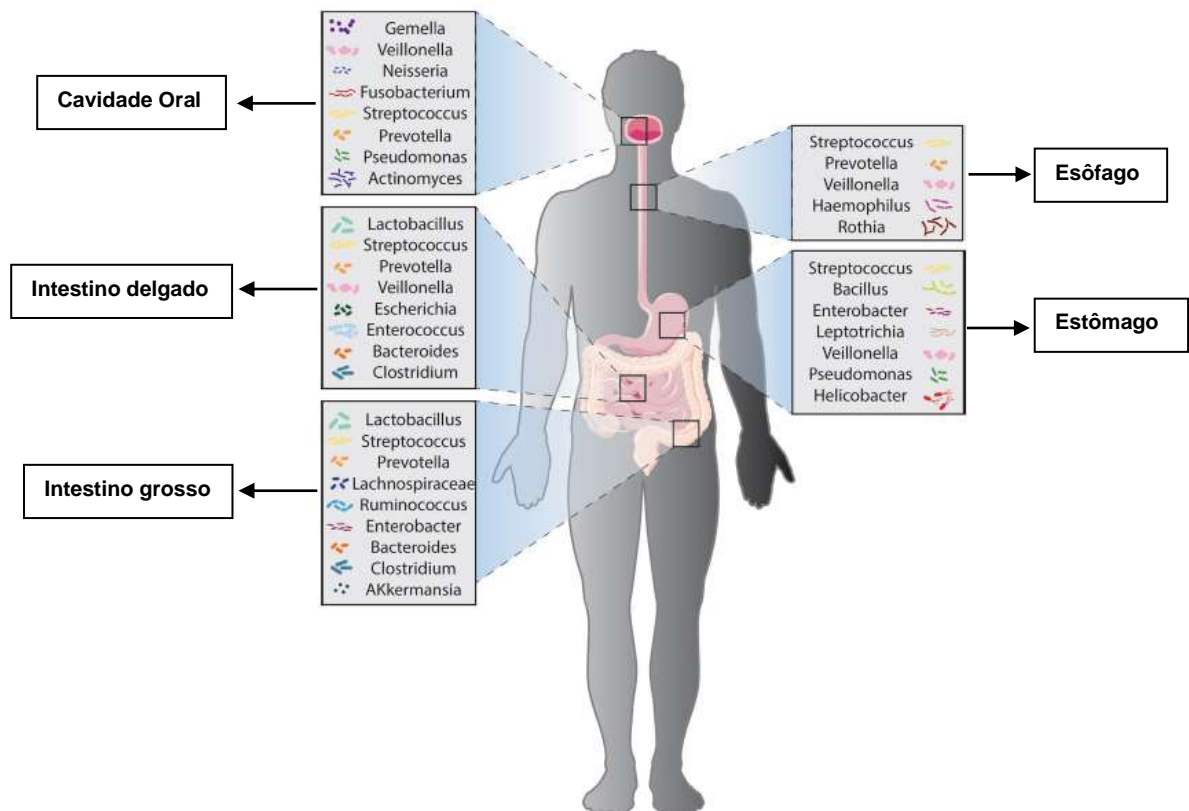


Figura 6. Composição do diversificado microbioma humano por localização do trato gastrointestinal. (RUAN *et al.*, 2020)

A implantação da microbiota intestinal se dá após o nascimento, antes disso o intestino é aparentemente estéril. Estudos relatam uma possível colonização microbiana no período pré-natal, através da transferência bacteriana de mãe para filho, pela placenta (AAGAARD *et al.*, 2014) via colonização oral ou intestinal, sangue do cordão umbilical (JIMÉNEZ *et al.*, 2005), líquido amniótico (DIGIULIO *et al.*, 2008) e mecônio (JIMÉNEZ *et al.*, 2005), porém ainda os estudos são controversos, pois não chegam ao consenso se as bactérias que compõem a microbiota uterina são residente, turistas ou invasoras (BAKER; CHASE; HERBST-

KRALOVETZ, 2018; HORNEF; PENDERS, 2017). Abaixo vemos a Figura 7 que apresenta o esquema do paradigma do útero estéril *versus* a hipótese de colonização intra uterina.

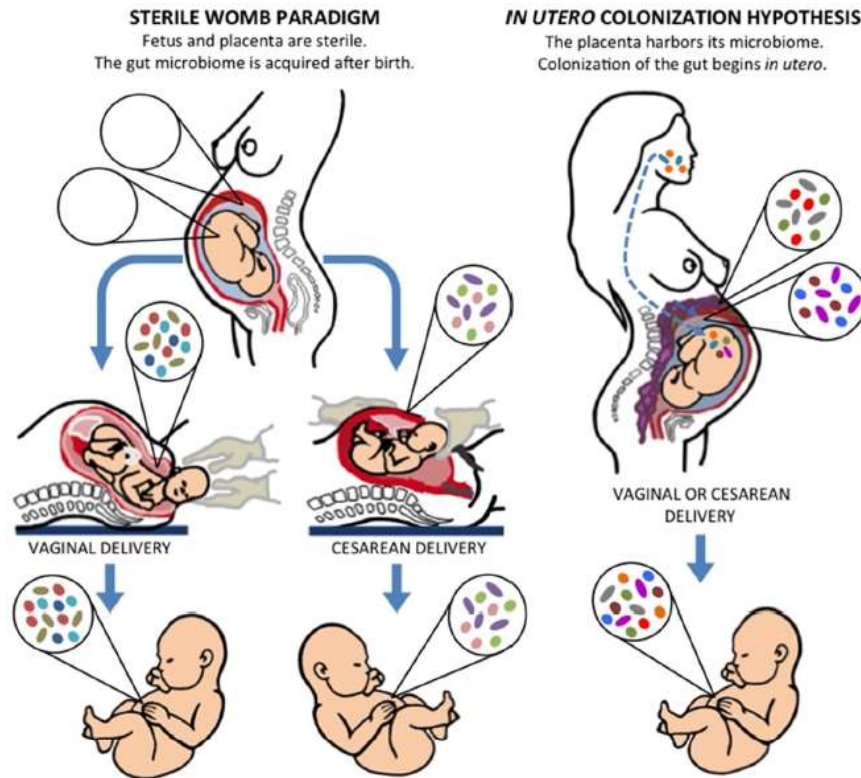


Figura 7. Esquema sobre o antagonismo das hipóteses de aquisição da microbiota no início da vida. (PEREZ-MUÑOZ *et al.*, 2017).

Os fatores que influenciam a composição dessa colonização microbiana são: as vias de parto (parto normal ou cesariana), aleitamento materno ou artificial, exposição ambiental, a dieta e o uso de antibióticos (HUANG, X.-Z., 2013; TORRAZZA; NEU, 2011). Um exemplo é o nascimento por parto normal, o recém-nascido passa pelo canal vaginal entrando em contato direto com a microbiota vaginal da mãe, prevalecendo a colonização de *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.* Em contrapartida, o nascimento por cesariana, o recém-nascido não tem contato direto com a microbiota vaginal materna, e as bactérias presentes no ambiente e dos profissionais de saúde acaba tendo a função de colonizar esses neonatos apresentando dessa forma uma comunidade bacteriana menos diversificada e semelhante a comunidade bacteriana da pele predominada por *Staphylococcus spp.* (TORRAZZA; NEU, 2011; VAN BEST *et al.*, 2015).

Após o nascimento o recém-nascido possui um ambiente intestinal aeróbio, favorecendo o crescimento de microrganismos facultativos principalmente a família *Enterobacteriaceae*, com o passar dos dias esse ambiente passa a sofrer alterações e se tornar anaeróbio, devido ao esgotamento dos níveis de oxigênio, favorecendo o crescimento e a predominância de microrganismos anaeróbios como *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp. e *Bacteroides* spp. (MATAMOROS *et al.*, 2013).

Nas primeiras semanas após o nascimento, a microbiota do neonato se assemelha a comunidade bacteriana vaginal e intestinal materna, ou ao ambiente que foi exposto. Após alguns meses, com a mudança na alimentação que antes era exclusiva de leite, favorecendo a predominância de bactérias fermentadoras como o *Bifidobacterium*, ocorre uma mudança na microbiota com a introdução de alimentos sólidos desencadeia uma diminuição de *Bifidobacterium* e *Enterobacteriaceae* e um aumento de *Bacteroides*, *Clostridium* e *Ruminococcus* (ARRIETA *et al.*, 2014; FALLANI *et al.*, 2011).

A progressão de uma microbiota intestinal infantil para adulta acontece por volta dos 12 a 30 meses de idade, por meio de uma sucessão ordenada de microrganismos, tendo de forma inicial uma baixa diversidade da microbiota com alta variabilidade interindividual e com a progressão para uma microbiota adulta se observa uma maior diversidade microbiana e menor variabilidade interindividual em que permanece estável na vida adulta, formando a microbiota residente (ARRIETA *et al.*, 2014; MATAMOROS *et al.*, 2013).

A microbiota residente intestinal adulta é constituída por cinco filos principais: os filos *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia* e em minoria estão representados pelos filos e gêneros, *Fusobacteria*, *Cyanobacteria*, *Lentisphaerae*, *Spirochaetes*, *Blautia* e *Akkermansia* (Figura 8) (TREMAROLI; BÄCKHED, 2012).

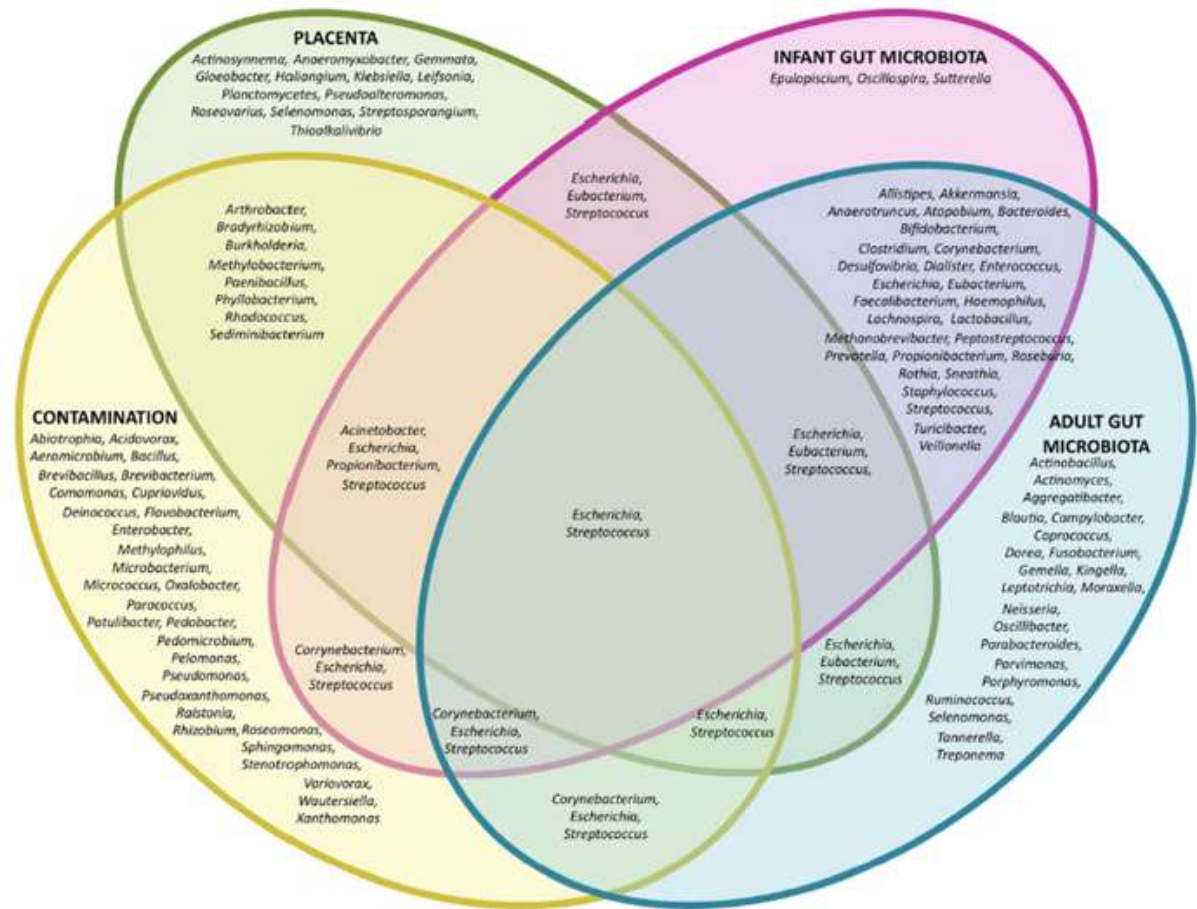


Figura 8. Diagrama de Venn com os principais gêneros bacterianos que compõem a microbiota intestinal. (PEREZ-MUÑOZ *et al.*, 2017).

3.5.2. Microbiota oral

A microbiota oral é constituída por cerca de aproximadamente 700 espécies diferentes distribuídos em diferentes ambientes como dentes, sucros gengivais, língua, bochecha, palato duro, palato mole, lábios e além das extensões contíguas. Como qualquer outra microbiota, a microbiota oral é constituída por microrganismos transitórios e residentes, porém é considerado como um dos mais abundantes e diversos microbiomas do corpo humano (Figura 9) (DEWHIRST *et al.*, 2010; LANGFELDT *et al.*, 2014; WADE, 2013).

A diferença de composição desses microrganismos nos sítios da boca se deve a fatores que oferecem condições diferentes de crescimento como: pH, temperatura, nutrientes (de fonte endógena ou exógena) e condições de anaerobiose. A microbiota oral residente possui o papel principal de estimular o

desenvolvimento do sistema imune do hospedeiro e combater patógenos exógenos, porém pode contribuir para patogenicidade de doenças periodontais ocasionadas pelas condições ambientais e imunológicas do hospedeiro (FARAN ALI; TANWIR, 2012).

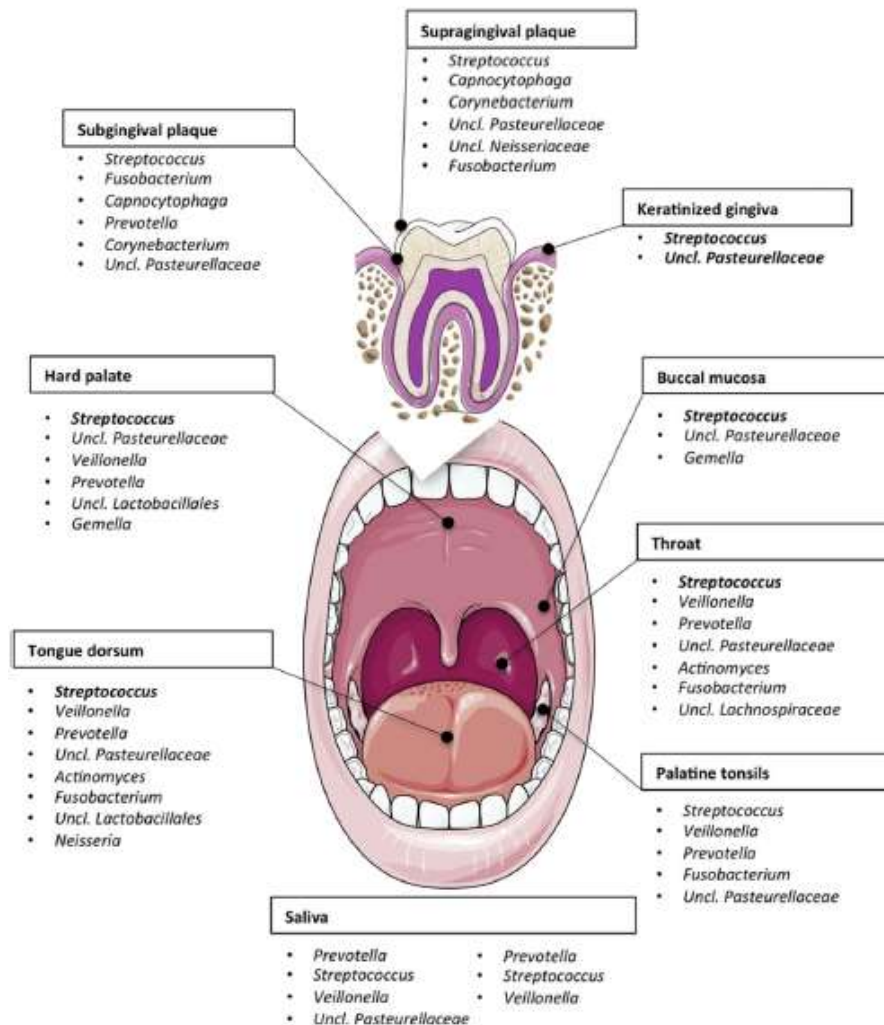


Figura 9. Principais gêneros bacterianos que compõem a microbiota oral. (SAMPAIO-MAIA *et al.*, 2016).

Estudos mostram que a implantação da microbiota na cavidade oral possui relação com o tipo de parto realizado. Aqueles nascidos através de parto normal apresentaram uma abundância para os gêneros *Bacteroides* e *Prevotella* enquanto *Propionibacterium*, *Slackia*, *Veillonella* e *Staphylococcus* são gêneros predominantes nos nascidos por parto de cesariana (GOMEZ; NELSON, 2017).

A composição da microbiota oral do recém-nascido também sofre influência da exposição ao contato com a microbiota oral, leite materno e auréola mamária da sua mãe, apresentando dessa forma similaridade da composição da microbiota nos

primeiros seis meses de vida devido a exposição constante nesse período (DRELL *et al.*, 2017).

Durante a vida intra-uterina, a cavidade oral é isenta de microrganismos, e a sua colonização se inicia durante o nascimento. Os primeiros microrganismos colonizadores são do tipo transitório, após algumas horas de vida a aquisição da microbiota também se dá ao contato direto com a mãe ou pessoas próximas. As bactérias orais ao se instalarem inicialmente são as aeróbias e as facultativas por serem tolerantes ao oxigênio, devido principalmente a composição da boca do recém-nascido, que nessa fase de vida é constituída apenas por uma mucosa lisa e ventilada (CHU *et al.*, 2017; SULYANTO *et al.*, 2019).

Com a erupção dos dentes se tem dois novos habitats a superfície dental e o sulco gengival. Na superfície dental ocorre a colonização de bactérias que possuem a capacidade de se aderirem a essa estrutura como algumas espécies de *Streptococcus* e *Actinomyces*. Já a colonização no sulco gengival é uma região com baixo teor de oxigênio o que possibilita a colonização de bactérias facultativas e anaeróbias estritas (HOLGERSON *et al.*, 2015).

Estudos apresentados por NELSON-FILHO *et al.*, (2013) mostraram a colonização bacteriana na cavidade bucal em curtos períodos de tempo após o nascimento: 10 min a 8 horas foi detectado 30,7% de amostras positivas para *Staphylococcus epidermidis*, 8-16 horas esse número subiu para 69,5% de positividade para essa bactéria e houve crescimento para estreptococos, 16-24 horas foi possível observar além da presença de *Staphylococcus epidermidis* correspondendo 77,78% das amostras, a presença *Staphylococcus aureus* em torno de 33,33% nas amostras dos recém-nascidos, além de crescimento para estreptococos. Após 24-56 horas de nascimento, todas as amostras coletadas através da língua, mucosa da bochecha, processo alveolar e palato, foram positivas para crescimento de bactérias citadas, exceto para *Streptococcus mutans* que não foi detectada em nenhum intervalo de tempo analisado (NELSON-FILHO *et al.*, 2013).

Já após alguns anos, os estudos apresentados por ROSENBLATT *et al.*, (2015), mostrou que nos primeiros 2 dias de vida, o recém-nascido apresenta colonização por *Streptococcus mutans*, que antes acreditava-se que a sua colonização se dava após a erupção dentária. A colonização por essa bactéria

cariogênica se dá ao contato direto com a microbiota da mãe e pessoas próximas (ROSENBLATT *et al.*, 2015).

A colonização bacteriana na cavidade oral é dividida em duas etapas, a primeira sendo colonizadas por bactérias colonizadoras iniciais e posteriormente as tardias. Existem receptores na película salivar como: mucinas sialidases, α amilase, fragmentos celulares bacterianos e glutinina salivar que são em sua maioria proveniente do hospedeiro, que proporciona a ligação das bactérias colonizadoras iniciais como: *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus gordonii* na película que reveste a superfície do dente, essas bactérias são a base para o crescimento do biofilme a cada higienização (KOLENBRANDER *et al.*, 2010).

Entre a colonização das bactérias iniciais e tardias, existem algumas bactérias que conseguem coagregar, ou seja, fazer uma interação célula-célula; esse processo tem como função a determinação da sucessão de gêneros que colonizam o esmalte do dente, bem como a formação de biofilmes multiespécies. A bactéria coagregadora principal é a *Fusobacterium nucleatum* que possui a capacidade de se ligar a qualquer bactéria oral, e esse processo de coagregação em sua grande maioria ocorre entre bactérias de gêneros diferentes. As bactérias colonizadoras tardias se ligam as bactérias já aderidas antecipadamente como: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Eubacterium* spp., *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, entre outras (KOLENBRANDER *et al.*, 2010).

Em um indivíduo adulto os filos predominantes na composição da microbiota oral são: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* (ZHANG, Y. *et al.*, 2018). Os gêneros bacterianos como: *Fusobacterium*, *Veillonella* e *Streptococcus* são em sua grande maioria distribuídas na cavidade oral, porém espécies como *Bacteroides*, *Prevotella* e *Neisseria* habitam determinadas regiões orais (KOLIARAKIS *et al.*, 2019).

3.6. Bactérias anaeróbias

As bactérias são classificadas de acordo a sua sensibilidade ao oxigênio, entre aeróbias e anaeróbias. As bactérias aeróbias possuem a capacidade de realizar a fosforilação oxidativa, que depende da presença de oxigênio, e as bactérias anaeróbias são incapazes de sobreviver em ambientes com a presença do

gás oxigênio (O₂), pois não possuem enzimas necessárias para metaboliza-lo, como a catalase, peroxidase e o superóxido dismutase (JOHNSON; HUG, 2019).

As bactérias anaeróbias realizam respiração em anaerobiose, utilizando outros compostos como aceptor final de elétrons sem ser o oxigênio (O₂), como carbonato (CO₂-CH₃COO), sulfato (SO₄), nitrato (NO₃), ferro (Fe) e enxofre (S-HS). A produção energética da via de anaerobiose implica na realização de glicólise e fermentação, em que durante essas etapas a produção de NADH é convertida novamente em NAD devido à perda do hidrogênio (JOHNSON; HUG, 2019).

A presença ou ausência de algumas enzimas é o que determina o grau de aerotolerância das bactérias desde aeróbio obrigatório ao anaeróbio estrito. As bactérias aeróbias obrigatórias necessitam da presença de oxigênio para sobreviver, enquanto que as bactérias anaeróbias não conseguem sobreviver nas condições do ar ambiente, devido as concentrações de CO₂ (0,04%) e O₂ (21%) (CIMOLAI, 2001).

Dentre as anaeróbias é possível subdividi-las em estritas e aerotolerantes sendo a primeira caracterizada por bactérias que sobrevivem somente em concentração menor ou igual a 0,5% de O₂ (como *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*) e a segunda constituídas por bactérias que sobrevivem em concentração até 8% de O₂, após o crescimento (como *Bacteroides fragilis*) (ALVES *et al.*, 2017; HENTGES, 1996).

Em um indivíduo adulto, as bactérias anaeróbias estão distribuídas por todo o corpo, sua prevalência e abundância depende das características locais, principalmente dos níveis de oxigênio. A baixa concentração de oxigênio no trato urogenital e no intestino favorece a proliferação dessas bactérias, enquanto que locais como a pele e a cavidade bucal propiciam um ambiente mais favorável para bactérias aeróbias e facultativas, entretanto ainda podemos encontrar bactérias anaeróbias nesses sítios também (Anaerobic Bacteria in Human Disease, 1977).

A microbiota intestinal passa por transformações no início da vida, passando de bactérias aeróbias, para bactérias facultativas e posteriormente predominantemente anaeróbias, sendo coerente com as concentrações de oxigênio no intestino. Entretanto as espécies presentes na microbiota e a sua proporção são altamente variáveis ao longo da vida de um indivíduo (ALBENBERG *et al.*, 2014; DOMINGUEZ-BELLO *et al.*, 2011).

No indivíduo adulto as bactérias intestinais estão predominantemente alocadas no intestino grosso, devido a abundância de condições para o seu crescimento, como: pH e baixo potencial redox (SENDER; FUCHS; MILO, 2016).

Dentre as bactérias anaeróbias intestinais os gêneros mais prevalentes são: *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus* e *Clostridium*. Existem também bactérias facultativas, que possuem a capacidade de sobreviver e proliferar tanto em ambiente aeróbio quanto anaeróbio, e no trato gastrointestinal têm a presença de *Enterococcus*, *Enterobacteriaceae* e *Streptococcus* (DOMINGUEZ-BELLO *et al.*, 2011).

3.6.1 Espécie *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens são bacilos gram positivos anaeróbios estritos, formadores de esporos, está presente no meio ambiente e faz parte da microbiota indígena de humanos e animais, porém pode desenvolver potencial patogênico via expressão de genes toxigênicos (NAVARRO; MCCLANE; UZAL, 2018; UZAL, 2013).

No último Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey (2009), *C. perfringens* está classificado como membro pertencente ao Filo *Firmicutes* (com baixo conteúdo de G-C), Classe *Clostridia*, Ordem *Clostridiales*, Família *Clostridiaceae* e Gênero *Clostridium* (DE VOS *et al.*, 2009).

O gênero *Clostridium* agrupa espécies em diferentes clusters, sendo que *C. perfringens* esta incluído no Cluster I, por apresentar características fenotípicas e genotípicas semelhantes a *C. butyricum* (cepa tipo do gênero), ao lado de outros patógenos importantes como *C. botulinum* e *C. tetani* (COLLINS *et al.*, 1994; GUPTA; GAO, 2009).

A virulência dessa bactéria é dependente da produção de toxinas, *C. perfringens* é capaz de produzir mais de 20 tipos de toxinas como alfa, beta, épsilon, iota, enterotoxina (CPE), NetB, TpeL, enterotoxina binária (BEC) e enzimas hidrolíticas (colagenase, sialidase, protease, urease, etc.) (KIU; HALL, 2018; LIU *et al.*, 2019; REVITT-MILLS; ROOD; ADAMS, 2015) (Figura 10). As cepas são classificadas de acordo com a produção dessa toxinas em tipo A (produtor da toxina alfa), tipo B (produtor das toxinas alfa, beta e épsilon), tipo C (produtor da toxina alfa e beta), tipo D (produtor das toxinas alfa e épsilon), tipo E (produtor das toxinas alfa

e iota), tipo F (produtor das toxinas alfa e enterotoxina) e tipo G (produtor das toxinas alfa e NetB) (ROOD *et al.*, 2018).

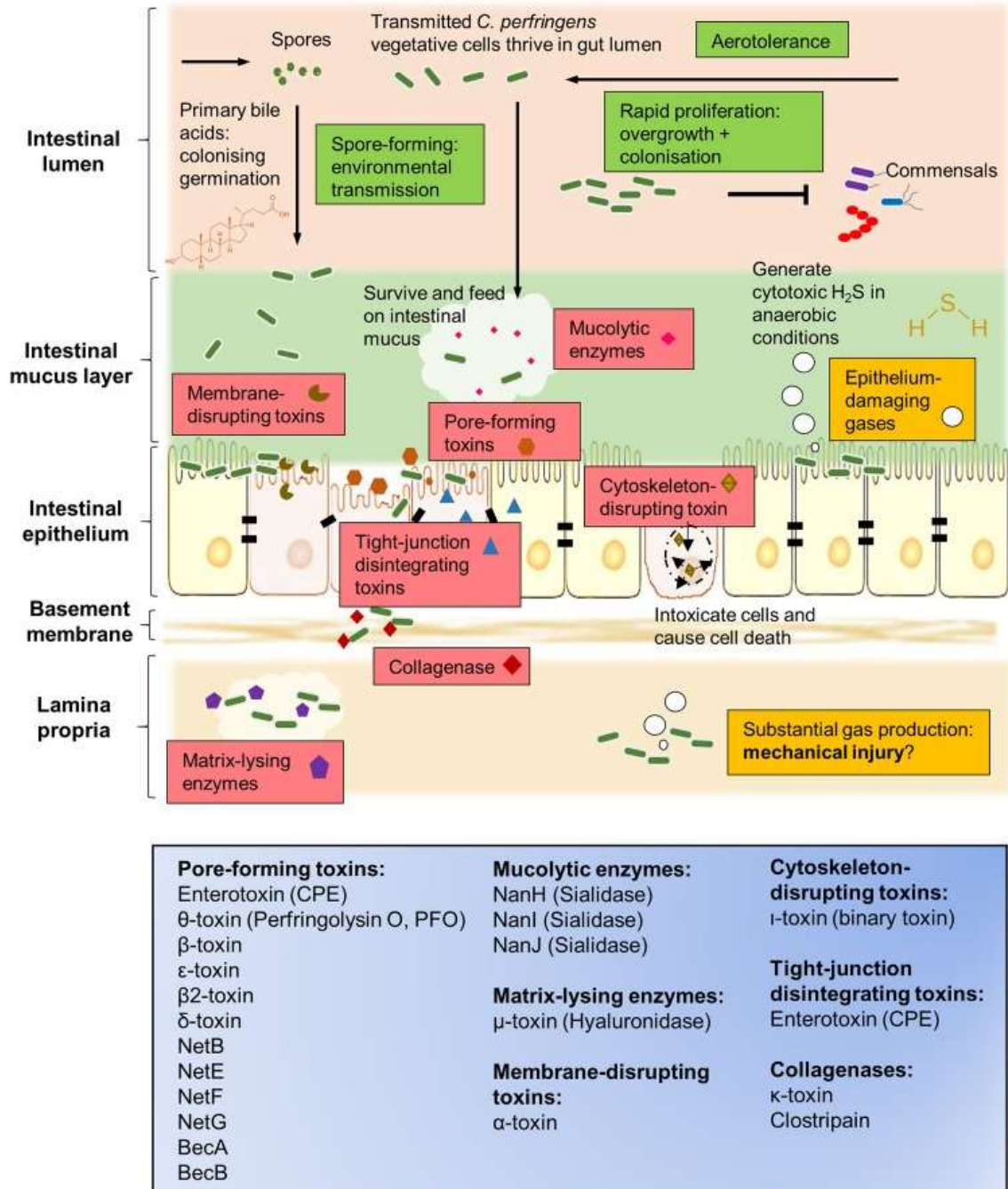


Figura 10. Mecanismos de ação das principais toxinas de *C. perfringens*. (KIU; HALL, 2018).

Essas toxinas apresentam toxicidade ou letalidade para as células epiteliais do hospedeiro (HOTZE; TWETEN, 2012) podendo induzir um estado pró-inflamatório e pró-patogênico (KIU; HALL, 2018).

A toxina alfa é uma metaloenzima dependente de zinco, codificada pelo gene cromossomal *cpa*, composta por 370 aminoácidos (JEWELL *et al.*, 2015). Essa toxina está envolvida no processo de mionecrose (gangrena gasosa), que é uma infecção caracterizada principalmente pela necrose do músculo esquelético em animais, com destaque para cavalos, bovinos e ovinos, podendo também acometer animais domésticos e selvagens, bem como humanos (JUNIOR *et al.*, 2020). Outros clostrídios como *Clostridium chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi* type A, *C. sordellii*, também são causadores da gangrena gasosa (CIHAN *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2016).

O seu mecanismo de ação é complexo variando de acordo com a concentração da toxina no local e os tipos de células envolvidas. Essa toxina é uma fosfolipase C que possui a capacidade de hidrolisar a fosfatidilcolina e esfingomiélinina presente na membrana plasmática, causando a ruptura (NAVARRO; MCCLANE; UZAL, 2018).

A toxina beta é uma prototoxina codificada pelo gene plasmidial *cpb*, composto por 336 aminoácidos (HUNTER *et al.*, 1993) pertencente à família das toxinas formadoras de poros. Essa toxina é sensível à tripsina, sendo ativa somente através de inibidores de tripsina, é produzida por espécies de *C. perfringens* do tipo B (presença dos genes *cpa*, *cpb* e *etx*) que causa disenteria hemorrágica e enterite necrótica em animais, esse toxinotipo não acomete humanos. E tipo C (presença dos genes *cpa* e *cpb*), que pode causar enterite necrótica em animais (conhecido como Pigbel, muito rara em humanos) e enterotoxemia aguda e hemorrágica (MATSUDA *et al.*, 2007; POSTHAUS *et al.*, 2020; THIEL *et al.*, 2017).

O seu mecanismo de ação se deve a formação de poros na membrana plasmática principalmente de células endotélias, permitindo a saída de íons potássio (K^+) e a entrada de íons de cálcio (Ca^{+2}), cloro (Cl^-) e sódio (Na^+), induzindo a fosforilação de quinases p38, MAP e JNK que ativam vias de sobrevivência e defesa das células do hospedeiro enquanto que a entrada de íons de cálcio, ativa a calpaina e necroptose (NAVARRO; MCCLANE; UZAL, 2018).

A toxina épsilon é uma prototoxina codificada pelo gene plasmidial *etx*, é a toxina mais potente produzida por espécies de *C. perfringens* do tipo B e D (presença do gene *cpa* e *etx*), sendo considerada a terceira toxina clostridial mais potente, após as toxinas do *C. botulinum* e *C. tetani* (POPOFF, 2011).

Essa toxina é ativada quando na presença de proteases produzidas pelas células intestinais do hospedeiro, como α -quimotripsina, tripsina e carboxipeptidases e também por protease produzida por algumas cepas de *C. perfringens* como λ -protease (FREEDMAN; MCCLANE; UZAL, 2016; HARKNESS; LI; MCCLANE, 2012).

A toxina épsilon possui a capacidade de atravessar a barreira intestinal, alcançando a corrente sanguínea, chegando a órgãos distantes como cérebro, coração e os rins (WIOLAND *et al.*, 2013). Possui a capacidade de formar poros na membrana plasmática, e as patologias associadas a essa toxina são enterotoxemia, que são infecções intestinais agudas que acometem animais domésticos, doença neurológica em ovinos e recentemente estudos associaram a esclerose múltipla humana a essa toxina (SAVVA *et al.*, 2019; WAGLEY *et al.*, 2019).

O seu mecanismo de ação se deve a formação de poros, através de processos que levam a produção de ceramida e a hidrólise da esfingomielina, levando a formação de oligômeros, o que resulta um poro heptamérico, com alterações de concentrações de íons como K^+ , Cl^- , Na^+ e Ca^{+2} , e também leva perda coenzimas importantes para a manutenção da célula (NAVARRO; MCCLANE; UZAL, 2018).

A toxina iota é sintetizada por espécies de *C. perfringens* do tipo E (presença do gene *cpa* e *iap*), é uma toxina binária, composta por duas proteínas: o componente enzimático (Ia) e o componente ligação (Ib), este é sintetizado na forma inativa, sendo ativo na presença da tripsina ou quimotripsina. Ambos os componentes são codificados por dois genes plasmidiais, *iap* e *iab* respectivamente (LI; MIYAMOTO; MCCLANE, 2007).

A patologia está relacionada com enterite e enterotoxemia em animais, como coelhos, cães, cordeiros, entre outros. Já em ruminantes, pode ocasionar enterite hemorrágica podendo levar a morte súbita. Porém o papel específico dessa toxina ainda é incerto (REDONDO *et al.*, 2015; SONGER, 2016).

O mecanismo de ação pode acontecer através da endocitose associada ao CD44 na célula hospedeira ou o componente Ib se liga a um receptor de lipoproteína que medeia à entrada da toxina na célula, ocorrendo à formação de heptâmeros na membrana plasmática e alterações nas concentrações de íons. O componente enzimático Ia é secretado levando a uma ativação de processos que leva a despolimerização dos filamentos do citoesqueleto, levando um aumento da

permeabilidade e mudança morfológica da célula (NAVARRO; MCCLANE; UZAL, 2018).

A enterotoxina (CPE) é constituída por um único polipeptídeo, codificada pelo gene *cpe* podendo ser cromossomal ou plasmidial, composto por 319 aminoácidos (FREEDMAN; SHRESTHA; MCCLANE, 2016). É produzida por espécies de *C. perfringens* do tipo F (presença do gene *cpa* e *cpe*), e pode estar presentes também nos tipos C e D. A sua patologia esta associada à intoxicação alimentar no homem, transmitidas por alimentos contaminados com a toxina ou pelos esporos (GRASS; GOULD; MAHON, 2013; LI *et al.*, 2010).

O seu mecanismo de ação se dá através da ligação da toxina a receptores da família das claudinas, especificamente 3, 4, 6, 8 e 14, na membrana da célula, ocorrendo à formação de pequenos complexos, que leva a oligomerização criando um pré-poro hexamérico na superfície da membrana. O pré-poro se liga a um barril beta, formando um poro ativo que permite o influxo de cálcio levando a morte celular (FREEDMAN; SHRESTHA; MCCLANE, 2016; NAVARRO; MCCLANE; UZAL, 2018).

A toxina NetB é uma toxina formadora de poro, codificada pelo gene plasmidial *netB* apresentando 323 aminoácidos, produzida por espécies de *C. perfringens* do tipo G (presença dos genes *cpa* e *netB*) e a sua patologia está associada a enterite necrótica em frangos (KEYBURN *et al.*, 2010; ROOD; KEYBURN; MOORE, 2016).

O seu mecanismo de ação é devido à formação de poros heptaméricos e hidrofóbicos na membrana fosfolipídica de animais, ocasionando alterações de concentrações de íons podendo levar a lise celular osmótica (KEYBURN *et al.*, 2010; NAVARRO; MCCLANE; UZAL, 2018).

A enterotoxina binária de *Clostridium perfringens* (BEC) é composta por duas proteínas: BECa e BECb sendo codificada pelos genes plasmidiais *becA* e *becB*, respectivamente. A sua patologia está associada a gastroenterite aguda em humanos de origem alimentar e apesar do seu mecanismo de ação ainda não ser totalmente definido, é sabido que a toxina BEC é expressa de forma recombinante, possui atividade citotóxica nas células Vero, ocasionando o seu arredondamento e posterior lise celular, mas essa ação só acontece quando inoculadas as duas proteínas simultaneamente (KAWAHARA *et al.*, 2016; YONOGI *et al.*, 2014).

A toxina TpeL pertence à família de grandes toxinas glicosilantes clostridiais, é uma das maiores toxinas produzidas pelo *C. perfringens* com um tamanho de 205

kDa e é codificada pelo gene plasmidial *tpeL*. A sua patologia está associada com enterite necrótica em frangos. Seu mecanismo de ação está relacionada com sua capacidade de modificar proteínas da família Ras na trionina 35 via glicolização, inativando assim as pequenas GTPases envolvidas em diversos processos fundamentais como a proliferação e diferenciação celular (CHEN; MCCLANE, 2015; SCHORCH *et al.*, 2018).

Além disso, a espécie *C. perfringens*, podem expressar 3 sialidases, caracterizadas pela expressão dos genes *nanH*, *nanI*, e *nanJ* (LI; MCCLANE, 2014; LLANCO *et al.*, 2017). Essas sialidases são enzimas que auxiliam no catabolismo de oligossacarídeos que contém ácido siálico, a sialidase NanI é predominante em *C. perfringens* tipo A (LI; MCCLANE, 2014), sendo importante para a adesão bacteriana e formação de biofilme (SOONG *et al.*, 2006). A liberação dessas neuraminidases influencia a expansão de algumas espécies bacterianas o que podem promover processos inflamatórios (JUGE; TAILFORD; OWEN, 2016) e conseqüentemente agravar processos tumorais.

3.6.2. Espécie *Bacteroides fragilis*

Aproximadamente 30% das bactérias intestinais pertencem ao gênero *Bacteroides*, sendo classificadas em mais de 20 espécies (CHEN *et al.*, 2015). Além de colonizar a cavidade intestinal, após um processo inflamatório ou trauma local podem ser translocadas para outros tecidos através da corrente sanguínea (SEIFERT; DALHOFF, 2010).

Por muitos anos, as principais espécies de interesse médico deste gênero formavam o chamado “grupo *Bacteroides fragilis*”, sendo elas: *B. fragilis*, *B. eggerthii*, *B. ovatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis*, *B. caccae*, *B. stercoris* e *B. vulgatus*, *B. distasonis* e *B. merdae* (HOLDEMAN; CATO; MOORE, 1977). Entretanto, Sakamoto e Benno (2006) propuseram que duas espécies pertencentes ao “grupo” fossem reclassificadas em um novo gênero denominado *Parabacteroides* e inclui as seguintes espécies: *Parabacteroides distasonis* (antigo *B. distasonis*) e *Parabacteroides merdae* (antigo *B. merdae*) (SAKAMOTO; BENNO, 2006).

Embora não seja a mais prevalente dentre as espécies de *Bacteroides*, *B. fragilis* destaca-se e são caracterizadas por ser bacilos gram negativos, bile resistentes, sacarolíticos e fazem parte da microbiota indígena, pode apresentar

fatores de virulência, e estão relacionados a casos de sepse, diarreia, infecções extra intestinais, necrose tecidual (WEXLER, 2007) e elevada resistência aos antimicrobianos (LIU *et al.*, 2008).

A virulência da *B. fragilis* está correlacionada a produção da toxina, ETBF, do inglês “*enterotoxigenic B. fragilis*” (PIERCE; BERNSTEIN, 2016) que são cepas que possuem a capacidade de secretar uma enterotoxina conhecida como fragilisina, uma metaloprotease dependente de zinco com tamanho de 20-kDa (SHAH *et al.*, 2017).

A toxina ETBF é codificada pelo gene *bft*, estando amplamente associada a diarreias em humanos (SEARS, 2009; ZHANG; WEINTRAUB, 1999). Essa toxina pode ser dividida em subtipos: *bft-1* (VPI 13784), *bft-2* (86-5443-2-2) e *bft-3* (Korea 419) de acordo com a sua estrutura bioquímica, e com potencial de virulência distinto (AVILA-CAMPOS *et al.*, 2007; KATO *et al.*, 2000; WU *et al.*, 1998).

A toxina possui a capacidade de degradar a proteína E-caderina nas células epiteliais intestinais, danificando a estrutura e a ligação célula-célula e propiciando a translocação bacteriana. O rompimento da E-caderina pela BFT é realizado de maneira ATP independente e induz a regulação da presenilina-1 um importante fator na regulação da E-caderina (WU *et al.*, 2007). Além de possuir a capacidade de evasão da resposta imune do hospedeiro (DENG *et al.*, 2016), essa bactéria induz o processo inflamatório, caracterizado pelo aumento de células do sistema imune no local, principalmente linfócitos T auxiliares, T gama delta e linfócitos inatos produtores de IL-17 e neutrófilos (LUCAS; BARNICH; NGUYEN, 2017). Além das propriedade pró-inflamatórias o BFT pode causar dano no DNA induzindo a formação de microadenoma (CHUNG *et al.*, 2018; DESTEFANO SHIELDS *et al.*, 2016).

Essa espécie bacteriana segundo Tjalsman *et al.*, (2012), é considerada uma bactéria “*driver*” que possui a capacidade de iniciar um processo carcinogênico, induzindo modulações no microambiente intestinal e favorecendo o crescimento de outras bactérias “*passenger*” com potencial carcinogênico (TJALSMA *et al.*, 2012).

A toxina BFT está mais presente em amostras fecais de pacientes com CCR do que em pacientes saudáveis (SOBHANI *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2012). Interessantemente, a presença do gene *bft* parece estar correlacionada também com a gravidade do CCR, visto que estudo de Bolei *et al.*, (2015) verificou que pacientes em estágio inicial tumoral apresentam o gene *bft* em 72% dos casos

comparados com 100% dos casos em estágio mais avançado (BOLEIJ *et al.*, 2015; PURCELL *et al.*, 2017).

3.7. Bactérias e câncer colorretal

Os microrganismos que constituem a microbiota indígena humana possuem uma relação benéfica com o hospedeiro, quando ocorre um desequilíbrio dessa relação, ocorre um processo conhecido como disbiose, podendo levar ao desenvolvimento de doenças, como a carcinogênese. Esse processo se deve a diversos fatores produzidos direto ou indiretamente pela microbiota, como a produção de toxinas, citotoxinas, fatores de virulência, ativação de fatores de transcrição oncogênicos, aumento de espécies reativas de oxigênio, entre outros (GARRETT, 2015; HELMINK *et al.*, 2019).

A relação dos microrganismos e o desenvolvimento de câncer já é bem estabelecida em alguns modelos, como por exemplo, a relação da espécie *Helicobacter pylori* e câncer gástrico, (WANG *et al.*, 2014), *Salmonella typhi* e *Helicobacter* spp. e o câncer biliar (DI DOMENICO *et al.*, 2017; HUANG *et al.*, 2004) e do Papilomavirus humano (HPV) e o câncer cervical (CROSBIE *et al.*, 2013).

Outras bactérias como o *C. septicum*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *B. fragilis* (ETBF), *Escherichia coli* e *Fusobacterium* spp. já foram associadas com o desenvolvimento, manutenção ou agravamento do câncer colorretal (JAHANI-SHERAFAT *et al.*, 2018; WEI *et al.*, 2016).

Fusobacterium nucleatum, bacilo gram negativo anaeróbio, que faz parte da microbiota oral e intestinal, é regularmente associado com doenças periodontais. Essa bactéria expressa a adesina FadA, que permite com que a bactéria se ligue a E-caderina e invada a célula epitelial, fazendo com que ative processos que leve a ativação de genes inflamatórios, oncogênicos e secreção de citocinas. Devido a isso têm sido associada à progressão do câncer colorretal através da invasão das células epiteliais humanas, desenvolvimento de processos inflamatórios e a ativação de respostas oncogênicas (HAN, YIPING *et al.*, 2005; RUBINSTEIN *et al.*, 2019).

Alguns patótipos de *Escherichia coli* também já foram associados com o processo inflamatório e danos ao DNA (REA *et al.*, 2018). A *Escherichia coli*, bactéria gram negativa facultativa que faz parte da microbiota intestinal, possui a capacidade de sintetizar toxinas como a colibactina codificada pelo gene *kps*. Essa

toxina induz diretamente danos ao DNA do hospedeiro gerando instabilidade genômica e mutações, corroborando dessa forma para a progressão do CCR (WASSENAAR, 2018).

Como descrito anteriormente espécies de *B. fragilis* ETBF têm sido relacionadas com o desenvolvimento de CCR pela ativação da via de sinalização Wnt/beta-catenina (DULAL; KEKU, 2014; SHIRYAEV *et al.*, 2013) que aumenta a proliferação celular e ativação da via do NF- κ B induzindo um ambiente inflamatório e causando dano ao DNA (KEENAN *et al.*, 2019; SEARS; GEIS; HOUSSEAU, 2014).

Dessa forma, a microbiota intestinal pode influenciar a carcinogênese colorretal via diversos mecanismos como pró-oncogênicos, pró-inflamatórios, metabólitos, ligantes da imunidade inata, adesinas ou toxinas de origem bacteriana. Ou via auxílio na proliferação de bactérias oportunistas/*drivers* que possuam essas características (Figura 11) (WONG; YU, 2019).

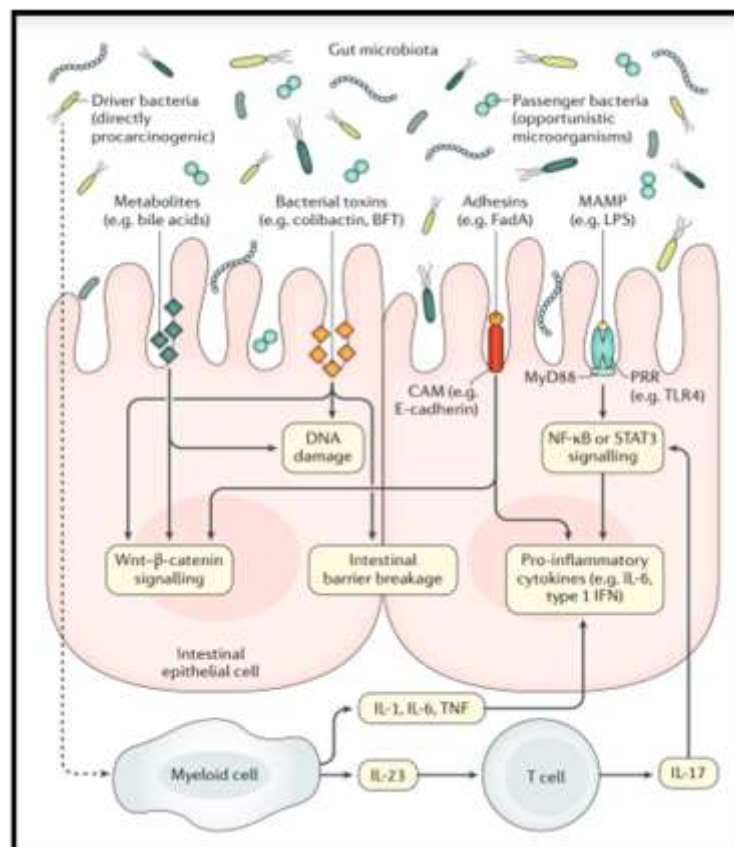


Figura 11. Microbiota associada a mecanismos envolvidos na patogênese de câncer colorretal (WONG; YU, 2019).

Outras bactérias anaeróbias estão associadas com a prevenção do desenvolvimento de câncer, como por exemplo, o *Bifidobacterium* spp. que é responsável pela síntese do composto folato, fundamental para a saúde gastrointestinal, prevenção de leucemia em crianças e também para a estabilidade cromossomal (YOUSSEF *et al.*, 2018).

Um dos possíveis mecanismos relacionados à prevenção do CCR é a produção do composto butirato que é obtido através da fermentação de fibras. Esse composto pode ser produzido pela bactéria *Faecalibacterium prausnitzii*, que vêm sendo considerada um importante probiótico devido também a sua capacidade de induzir a secreção Il-10, proliferar as células T reguladoras, e conseqüentemente reduzir a ativação da via do NF-kB obtendo uma redução da inflamação local (FERREIRA-HALDER; FARIA; ANDRADE, 2017; GAO *et al.*, 2017).

Estudos também mostraram que bactérias *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, a ordem *Clostridiales*, os gêneros *Faecalibacterium* e *Blautia*, encontram-se aumentados em pacientes saudáveis em comparação com pacientes com CCR (RAFTER, 2003; ZINATIZADEH *et al.*, 2018).

Recentemente, os estudos de associação da microbiota e o câncer de colorretal vêm sendo muito explorado, porém mais estudos são necessários para melhor compreender o papel dessas bactérias na carcinogênese, para que seja possível desenvolver terapias focadas na manipulação da microbiota no tratamento da doença. Entretanto, é importante reassaltar que a maioria dos estudos é realizada no câncer colorretal, considerada como estrutura única, dessa maneira ainda são escassos estudos focados exclusivamente na relação da microbiota com o câncer de reto.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Participantes

Foram selecionados 40 pacientes com câncer de reto (entre 40 e 90 anos de idade) e 20 pacientes sem câncer de reto (entre 31 e 67 anos de idade). Não houve distinção de sexo e raça na seleção dos participantes. Todos os pacientes com e sem câncer de reto foram diagnosticados por colonoscopia, realizados pela Dra. Adriana Vaz Safatle Ribeiro do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP). Os pacientes foram inscritos no Setor de Cirurgia Gastrointestinal do ICESP.

Dados demográficos e clínicos, como tabagismo, consumo de álcool, sinais clínicos entre o início dos sintomas e o diagnóstico, histórico familiar e uso de antibióticos, entre outros foram coletados de todos os participantes pela aplicação de um questionário no mesmo dia da realização da colonoscopia (Anexo I). Pacientes que apresentaram quadros infecciosos sistêmicos, crônicos, ou faziam o uso de antibióticos foram excluídos deste estudo. Todos os participantes assinaram o Termo de Livre Consentimento aprovados pelos Comitês de Ética do ICB (Proc. No. 1236/CEPSH) e da Faculdade de Medicina (Proc. No. 321/14) da Universidade de São Paulo.

4.2. Coletas das amostras clínicas

4.2.1. Amostras fecais. Foram coletadas de pacientes com e sem câncer de reto. As fezes foram coletadas em coletores esterilizados e sem conservantes, após 15 dias ao exame de colonoscopia, para garantir o restabelecimento da microbiota intestinal e/ou fecal.

4.2.2. Amostras sanguíneas. 10 mL de sangue venoso foram coletados de ambos os pacientes em tubos de EDTA (BD, Vacutainer®) antes do exame de colonoscopia.

4.2.3. Amostras de tecido tumoral e adjacente, e tecido sadio de pacientes com e sem câncer, respectivamente. As amostras de tecidos (100 - 200 mg) foram coletadas durante a colonoscopia. Todas as amostras teciduais foram depositadas

em tubos criogênicos contendo tampão TE 1X (Tris 10mM – EDTA 1mM, pH 8.0) e congeladas a -30 °C até seu uso. Todas as amostras clínicas coletadas foram transportadas e processadas laboratorialmente num intervalo máximo de 4 horas.

4.3. Isolamento e identificação bacteriana

4.3.1. Material fecal. Parte do material fecal foi semeada diretamente em meios seletivos ágar *Bacteroides fragilis* bile-esculina (BBE, oxgal, ágar soja tripcaseína (TSA), esculina, citrato férrico amoniacal, hemina 5 mg/mL, água destilada e gentamicina 40 mg) para isolamento das espécies do gênero *Bacteroides* e *Parabacteroides* e ágar *Clostridium* (peptona, extrato de levedura, citrato férrico amoniacal, ágar bacteriológico, água destilada e neomicina 30 mg) acrescido de sangue desfibrinado de carneiro (5%) para isolamento das espécies do gênero *Clostridium*. Os meios inoculados foram incubados em condições de anaerobiose (85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂), a 37 °C, por cinco dias. Dos crescimentos bacterianos, 3 a 5 colônias, características de cada bactéria, foram aleatoriamente selecionadas para a identificação presuntiva e definitiva em nível de gênero e espécie.

4.3.2. Material sanguíneo. 10 mL de sangue coletados foram inoculados em 100 mL de caldo infuso-cérebro-coração (BHI, Becton Dickinson, BD, Brasil) suplementado com hemina (5 mg/mL) e menadiona (1 mg/mL). Os tubos inoculados foram incubados em anaerobiose, a 37 °C, inicialmente por 7 dias, e posteriormente até 15 dias (caso não tenha sido observado crescimento). Após o crescimento bacteriano, alíquotas de 0,1 mL foram transferidas para: ágar MacConkey (Becton Dickinson, BD, Brasil) (incubados em aerobiose, 37 °C, de 24 h a 48 h); ágar *Bacteroides fragilis* bile-esculina (BBE), ágar sangue e ágar *Clostridium* suplementado, incubados em anaerobiose (37 °C, por cinco dias). Também, após o crescimento bacteriano, aleatoriamente, de 3 a 5 colônias características de cada espécie, foram selecionadas e submetidas à identificação presuntiva e definitiva.

4.3.3. Identificação bacteriana. Colônias características de cada gênero e espécie bacteriana, em cultura pura, foram identificadas em nível de espécie utilizando-se o kit comercial API-20A (BioMérieux, Brasil) ou pela fermentação de carboidratos para espécies de *Clostridium*, segundo Holdeman *et al.* (1977).

A identificação da espécie *Escherichia coli* foi realizada por PCR convencional utilizando primers 16S rRNA (MALINEN et al., 2003), e dos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides* por PCR Multiplex (LIU et al., 2013). Na Tabela 1, estão relacionados os iniciadores espécies-específicos usados na detecção de *E. coli*, *B. thetaiotaomicron*, *B. fragilis*, *B. vulgatus*, *B. caccae*, *B. ovatus*, *B. eggerthii*, *B. stercoris*, *B. uniformes*, *P. distasonis* e *P. merdae*.

Tabela 1. Sequências oligonucleotídicas usadas na detecção de *Escherichia coli*, e das espécies dos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides* por multiplex-PCR.

PCR	Oligonucleotídeos 5' → 3'	Tamanho amplicon (pb)	Espécies	Referências
16S rRNA	F: GTT AAT ACC TTT GCT CAT TGA R: ACC AGG GTA TCT AAT CCT GTT	340	<i>E. coli</i>	MALINEN et al. (2003)
Multiplex PCR-I	F: GTA CAC ACC GCC CGT	180	<i>B. thetaiotaomicron</i>	LIU et al. (2003)
	R: ACC TAT GAA ATC GTT GTT ACG	250	<i>B. vulgatus</i>	
	R: GGC TTC TTA CTT TCT CTC TTC CG	420	<i>B. fragilis</i>	
	R: GCT AAT CCC CCA ATC ATA C	500	<i>B. caccae</i>	
	R: TCG TTT CCC ATT GCT GG R: AAT AAT GCG TAC TCG AAC AC	610	<i>B. ovatus</i>	
Multiplex PCR-II	F: GTCATATTAACGGTGGCG F: TCCGTTTTCCACTTATAAGA	250	<i>B. eggerthii</i>	LIU et al. (2003)
	F: CTACGACATAGTCTTGGTGAG R: GGGTTBCCCCATTCCG	350	<i>B. uniformis</i>	
		400	<i>B. stercoris</i>	
Multiplex PCR-III	F: TGA TCC CTT GTG CTG CT R: ATC CCC CTC ATT CGG A	220	<i>P. distasonis</i>	LIU et al. (2003)
	F: GAG GTA TGT AGC TCT CTG GTA R: TTT TTA CCC CTT ACG GAG	310	<i>P. merdae</i>	

As reações de amplificação foram realizadas em volumes finais de 25 µL, contendo 10X de tampão PCR, MgCl₂ (50 mM), dNTP (20 µM), Platinum Taq DNA polimerase (0,5 U) (Invitrogen, ThermoFisher Brasil), cada iniciador (20 µM), e DNA (1 ng). Na amplificação da região 16S rRNA de *E. coli* o termociclador foi programado para: 1 ciclo de 94 °C (5 min.); 35 ciclos de 94 °C (30 seg.), 55 °C (1 min.), 72 °C (30 seg.); e 1 ciclo de 72 °C (5 min). Já, para a identificação dos

gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides*, o termociclador foi programado para: 1 ciclo de 94 °C (2 min.); 35 ciclos de 94 °C (30 seg.), 62 °C (para multiplex PCR-I) (30 seg.), 60 °C (multiplex PCR-II) (30 seg.) e 55 °C (multiplex PCR-III) (30 seg.), 72 °C (30 seg. para multiplex PCR I e III e 1 min para o multiplex PCR II); e 1 ciclo de 72 °C (5 min.).

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1%). Como controle de peso molecular foi usado o marcador 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen, ThermoFisher Brasil). O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e fotografado sobre transluminador UV com câmera Kodak (Eletrophoresis Documentation and Analyses System 120). Após a respectiva identificação, cada bactéria foi crescida em 5 mL de caldo BHI, em aerobiose e/ou anaerobiose, para a obtenção dos respectivos sedimentos para posterior extração de DNA. Todas as cepas bacterianas identificadas foram mantidas em ágar sangue e congeladas em skim milk a -80 °C.

4.4. Avaliação molecular

4.4.1. Extração de DNA total de material fecal. O DNA foi extraído utilizando-se o kit comercial QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Brasil), segundo instruções do fabricante.

4.4.2. Extração de DNA total do sangue. Foram utilizados para a extração de DNA 200 µL do sangue utilizando-se o kit comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Brasil), segundo instruções do fabricante.

4.4.3. Extração de DNA total de tecidos. A extração de DNA total dos tecidos tumorais e sadios foi realizada pelo método fenol-clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989). Brevemente, os tecidos foram macerados separadamente e adicionados lisozima, sendo incubados a 37 °C por 2 h. Em seguida, foi adicionado proteinase K e SDS (20%), e incubados a 55 °C, por 1 h. Após a incubação foram acrescentados volumes iguais de fenol:clorofórmio, e centrifugados (14.000 rpm, 15 min), e adicionados acetato de sódio (10%) e isopropanol. O DNA foi ressuspenso em tampão TE.

4.4.4. Extração de DNA de *B. fragilis* e *C. perfringens*. Os respectivos DNA foram obtidos do sedimento obtido de crescimento bacteriano em 5 mL de caldo BHI, pelo método fenol-clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989), conforme descrito anteriormente.

4.4.5. Avaliação da qualidade, concentração e integridade do DNA. Todos os DNA obtidos foram avaliados quanto a sua qualidade e concentração por espectrofotometria (DeNovix - Uniscense, Delaware, USA) e integridade por visualização em gel de agarose (1%). Todos os DNA foram mantidos a -80 °C, até seu uso.

4.5. Avaliação das cepas toxigênicas de *B. fragilis* e *C. perfringens*.

4.5.1. Detecção de *B. fragilis* enterotoxigênicos (presença do gene *bft* e respectivos subtipos *bft-1*, *bft-2* e *bft-3*) (PANTOSTI et al., 1997; KATO et al., 2000). A detecção por PCR convencional foi realizada utilizando-se os DNA obtidos das espécies de *B. fragilis* e do material clínico respectivo, fezes e sangue.

As reações de amplificação foram realizadas em volumes finais de 25 µL, contendo 10X tampão PCR, MgCl₂ (50 mM), dNTP (20 µM), Platinum *Taq* DNA polimerase (0,5 U; Invitrogen, ThermoFisher Brasil), cada iniciador (0,4 µM) (Tabela 2), e DNA (1 ng). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 2400 programado para, 1 ciclo de 94 °C (5 min.); 35 ciclos de 94 °C (1 min.), 52 °C (1 min.) e 72 °C (1 min.); e 1 ciclo de 72 °C (5 min.) para extensão final.

A detecção dos subtipos *bft-1*, *bft-2* e *bft-3*, foi realizada por PCR Multiplex, utilizando-se os oligonucleotídeos GFB-201, GBF-312, GBF322 e GFB-334 (Tabela 2). A amplificação do DNA foi realizada em volume final de 25 µL, contendo 10X tampão PCR, MgCl₂ (50 mM), dNTP (10 mM), Platinum *Taq* DNA polimerase (0,5 U) (Invitrogen, ThermoFisher, Brasil), cada iniciador (0,4 µM) e DNA bacteriano (1 ng). O termociclador foi programado para, 1 ciclo de 95 °C (5 min.), 35 ciclos de 95 °C (30 seg.), 62 °C (1 min.), 72 °C (2 min.); e 1 ciclo de 72 °C (5 min.). O peso molecular foi 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen). Todos os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, como descritos anteriormente.

Tabela 2. Sequências de oligonucleotídeos utilizadas na detecção de *Bacteroides fragilis* toxigênicos.

Bactéria/Genes	Oligonucleotídeos 5' → 3'	Temperatura de anelamento (°C)	Produtos (pb)	Referências
<i>B. fragilis</i> <i>bft</i>	F: GACGGTGTATGTGATTTGTCTGAGAGA R: ATCCCTAAGATTTTATTATCCCAAGTA	60	294	PANTOSTI et al. (1997)
<i>bft-1</i>	F: GAACCTAAAACGGTATATGT R: CCTCTTTGGCGTCGC	62	190	KATO et al. (2000)
<i>bft-2</i>	F: GAACCTAAAACGGTATATGT R: CGCTCGGCAACTAT	62	175	KATO et al. (2000)
<i>bft-3</i>	F: GAACCTAAAACGGTATATGT R: TGTCCCAAGTTCCCCAG	62	287	KATO et al. (2000)

4.5.2. Detecção de *C. perfringens* toxigênicos (BAUMS et al., 2004).

O toxinotipo das cepas isoladas foi determinado por PCR Multiplex utilizando-se DNA das espécies identificadas e das amostras clínicas fecais. Esta análise foi realizada somente em amostras fecais, uma vez que cepas foram isoladas desse material. Também, nenhuma amostra de sangue foi positiva para *Clostridium*.

Os genes avaliados foram: *plc* (toxina alfa), *cpb* (toxina beta), *cpb2* (toxina beta-2), *cpe* (enterotoxina), *etx* (toxina épsilon), e *iap* (toxina iota). As reações de amplificação foram realizadas em volumes finais de 25 µL, contendo 10X de tampão PCR, MgCl₂ (50 mM), dNTP (20 µM), Platinum *Taq* DNA polimerase (0,5 U) (Invitrogen, Brasil), cada iniciador (20 µM) (Tabela 3) e DNA (1 ng). O termociclador programado para: 1 ciclo de 95 °C (3 min.); 35 ciclos de 95 °C (1 min.), 56 °C (1 min.) e 72 °C (1 min.); e 1 ciclo de 72 °C (5 min.). Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, como descritos anteriormente.

Tabela 3. Sequências oligonucleotídicas usadas na detecção de *Clostridium perfringens* toxigênicos.

Bactéria/Genes	Oligonucleotídeos 5' → 3'	Temperatura de anelamento (°C)	Produtos (pb)	Referências
<i>C. perfringens</i>				
<i>cpa</i>	F: AGT CTA CGC TTG GGA TGG AA R: TTT CCT GGG TTG TCC ATT TC	55	900	BAUMS et al. (2004)
<i>cpb</i>	F: TCC TT CTT GAG GGG AGG ATA AA R: TGA ACC TCC TAT TTT GTA TCC C	55	611	BAUMS et al. (2004)
<i>cpe</i>	F: GGG GAA CCC TCA GTA GTT TCA R: ACC AGC TGG ATT TGA GTT TAA TG	55	506	BAUMS et al. (2004)
<i>etx</i>	F: TGG GAA CTT CGA TAC AAG CA R: TTA ACT CAT CTC CCA TAA CTG CAC	55	396	BAUMS et al. (2004)
<i>iap</i>	F: AAA CGC ATT AAA GCT CAC ACC R: CTG CAT AAC CTG GAA TGG CT	55	296	BAUMS et al. (2004)
<i>cpb2</i>	F: CAA GCA ATT GGG GGA GTT TA R: GCA GAAT CAG GAT TTT GAC CA	55	200	BAUMS et al. (2004)
<i>tpel</i>	F: ATA TAG AGG CAA GCA GTG GAG R: GGA ATA CCA CTT GAT ATA CCT G	55	474	AMIMOTO et al. (2007)
<i>becA</i>	F: CAA TGG GGC GAA GAA AAT TA R: AAC CAT GAT CAA TTA AAA CCT CA	55	499	YONOGI et al. (2014)
<i>becB</i>	F: TGC AAA TGA CCC TTA CAC TGA R: AGA TTG GAG CAG AGC CAG AA	55	416	YONOGI et al. (2014)
<i>netB</i>	F: GCT GGT GCT GGA ATA AAT GC R: TCG CCA TTG AGT AGT TTC CC	60	383	KEYBURN et al. (2008)
<i>netE</i>	F: TAGAAAACGTTCAATTGTATGG R: AGAAAAGCGCTGATACAGCTAATAAA	48	601	GOHARI et al. (2015)
<i>netF</i>	F: AACAATATGTACAGGTATAACT R: TTGATAGGTATAATATGGTTCT	45	862	GOHARI et al. (2015)
<i>netG</i>	F: TTGTTCCAGGATTAGTAGCATT R: CATGAGTTGCATAAGTTGGTGT	48	860	GOHARI et al. (2015)
<i>nanH</i>	F: ACAACGAAACGCTTATCGTGGCTAT R: ACCTTGGCATCCAGAGCCCTT	50	1.108	LLANCO et al. (2014)
<i>nanI</i>	F: ATTACAAAGGATAACTTTAATTTAAC R: TTTATTAGCTCCACTCTC	50	2.060	SHEU et al. (2002)
<i>nanJ</i>	F: GCTATTATTGAACTGCTATT R: ATCTTCATCTAAAACCTCAAT	50	2.400	CHIAREZZA et al. (2009)

A detecção dos genes *tpeL* (toxina TpeL), *becAB* (enterotoxina binária) (AMIMOTO et al., 2007; YONOGI et al., 2014) foi realizada em volumes finais de 25 µL, contendo 10X de tampão PCR, MgCl₂ (50 mM), dNTP (20 µM), Platinum *Taq* DNA polimerase (0,5 U) (Invitrogen, ThermoFisher Brasil), cada iniciador (20 µM) (Tabela 3), e DNA (1 ng). O termociclador foi programado para: 1 ciclo de 94 °C (2 min.); 35 ciclos de 94 °C (30 seg.), 55 °C (para os genes *tpeL*, *becA* e *becB*) (1 min.) e 72 °C (1 min.); e 1 ciclo de 72 °C (5 min.).

A detecção dos genes *netB*, *netE*, *netF* e *netG* (toxina Net) (GOHARI et al., 2015; KEYBURN et al., 2008) foi realizada em volumes finais de 25 µL, nas mesmas condições usadas para os genes *tpeL* e *becAB*. O termociclador foi programado para: 1 ciclo de 94 °C (3 min.); 30 ciclos de 94 °C (30 seg.), 45 °C (*netF*) e 48 °C (*netE* e *netG*) (30 seg.) e 72 °C (1 min.); e 1 ciclo de 72 °C (5 min.). Para detecção do gene *netB*, o termociclador foi programado para, 1 ciclo de 94 °C (2 min.); 35 ciclos de 94 °C (30 seg.), 60 °C (1 min.) e 72 °C (1 min.); e 1 ciclo de 72 °C (5 min.) (Tabela 3). Todos os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, como descrito anteriormente.

4.5.3. Detecção de genes *nanH*, *nanI* e *nanJ*, na produção de neuraminidas.

A identificação dos genes *nanI* e *nanJ* foi realizada segundo Sheu et al. (2002) e Chiarezza et al. (2009), e do gene *nanH*, segundo Llanco et al. (2014). As reações de amplificação foram realizadas em volumes finais de 25 µL, contendo 10X de tampão PCR, MgCl₂ (50 mM), dNTP (20 µM), Platinum *Taq* DNA polimerase (0,5 U) (Invitrogen), cada iniciador (20 µM) (Tabela 3), e DNA (1 ng). O termociclador foi programado para 1 ciclo de 94 °C (2 min.); 35 ciclos de 94 °C (30 seg.), 50 °C (1 min.) e 72 °C (3 min.); e 1 ciclo de 72 °C (5 min.) para extensão final. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, como descrito anteriormente.

4.6. Diversidade genética de *B. fragilis* pela técnica de AP-PCR (ERIBE e OSELEN, 2000).

A diversidade genética da espécie *B. fragilis* isoladas de amostras fecais foi determinada pela técnica de AP-PCR, através da utilização de iniciadores. Foram avaliados dois iniciadores OPA-03 e OPA-18. As sequências nucleotídicas para esses iniciadores arbitrários foram: OPA-3: 5'-AGT CAG CCA C-3' e OPA-18: 5'-AGG TGA CCG T-3'.

A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25 µL contendo tampão 10X PCR, MgCl₂ (50 mM), dNTP (20 mM), do iniciador (20 µM), 0,25 µL de *Taq* DNA Polimerase (5 U) (Invitrogen, ThermoFisher Brasil) e DNA (1 ng). O termociclador foi programado para 1 ciclo de 94°C (5 min.), 35 ciclos de 94°C (30 seg.), 36°C (1 min.), 72°C (2 min.) e 1 ciclo de 72°C (5 min.). As cepas de *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Bacteroides fragilis* GAI 97124 e *Escherichia coli* ATCC 25922 foram incluídas na análise. Como controle de peso molecular foi utilizado o marcador 1 kb Plus DNA ladder. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, como descrito anteriormente.

4.7. Diversidade genética de *C. perfringens* pela técnica de PFGE (LUKIMANN et al., 2002).

A diversidade genética da espécie *C. perfringens* isoladas de amostras fecais foi determinada pela técnica de *Pulse Field Gel Electrophoresis* (PFGE).

Os procedimentos da técnica de PFGE foram realizadas segundo o método de LUKIMANN et al. (2002), em que as cepas foram inoculadas em caldo infuso-cérebro-coração (BHI) suplementado com hemina (5 mg/mL) e menadiona (1 mg/mL). Os tubos foram incubados em anaerobiose, a 37 °C, durante 72 h. Deste caldo 2 mL foram misturados com 5 mL de PIV gelado (10 mM Tris, 1 M NaCl) e centrifugado a 3000 rpm por 15 min. a 4 °C. Posteriormente o sedimento foi suspenso com 750 µL de tampão PIV gelado. Em um tubo de 1,5 mL, foi acrescido 150 µL da suspensão com 150 µL de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA/USA), e essa mistura foi pipetada em moldes de plug. Após a solidificação, o plug foi incubado em 1 mL de tampão EC (Tris 6 mM, NaCl 1 M, 100mM EDTA (pH: 7.6), 0,5% Brij 58, Na-desoxicolato a 0,2%, Na-lauroilsarcosina a 0,5%) acrescidos de 1 mg/mL de lisozima e incubados por 55 °C

por uma noite. Retirou-se o tampão EC e acrescentou o tampão ES-P (0,5 M EDTA (pH: 9-9.5), 1% Sarcosina e 0,3 mg/mL de proteinase K) e incubadas novamente por 55 °C por uma noite. Foi realizado uma etapa de lavagens consecutivas: 3 vezes por 30 min. com aproximadamente 15 mL de TE (10:1) estéril (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA). A digestão do DNA foi realizado adicionando a enzima de restrição *Sma*I (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA/USA), usando 20 u/μL incubando a 25 °C durante 17 h., juntamente com 15 μL Buffer (10X), 1,5 μL BSA (10x) e 117 μL de água ultrapura.

A cepa *Clostridium perfringens* tipo A (ATCC 13124) e *Escherichia coli* ATCC 25922 foram utilizada como controles do experimento. Posteriormente, os fragmentos de restrição foram separados por eletroforese em gel de agarose (1%) utilizando-se solução TBE (0,5X, Tris-borato e EDTA), a 14 °C. A corrida de eletroforese realizada usando o aparelho CHEF-DR III System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA/USA) foi em média 20 h., com 6 V/cm, e tempo de pulso da rampa de 0,5 a 40 seg. Finalmente, o gel foi corado com solução de brometo de etídio e fotografado sobre transluminador UV com câmera Kodak (Eletrophoresis Documentation and Analyses System 120).

4.8. Construção dos dendrogramas da diversidade genética de *B. fragilis* e *C. perfringens*.

A construção dos dendrogramas foi realizada através do programa NTSYS (Applied Biostatitics, In. Versão 2.2.1) com a utilização dos coeficientes de similaridade de Jaccard, Dice, Simple Matching (SM) e UN1, em que se permite analisar os diferentes perfis genéticos, através da comparação de tamanhos de fragmentos ou de restrição.

4.9. Análise quantitativa de bactérias intestinais pelo sistema SYBR Green e bactérias orais pelo sistema TaqMan, nas amostras clínicas (fezes, sangue e tecidos).

As bactérias intestinais avaliadas foram: grupo *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridioides difficile*, *Clostridium perfringens*, *Cluster I*, Filo *Bacteroidetes* e Filo *Firmicutes*.

Para o sistema SYBR Green foram utilizados volumes finais de 20 µL, PCR Master Mix 2X (GoTaq qPCR Master Mix - Promega Corporation, Brasil), cada par de iniciadores (5 µM) (Tabela 4), DNA (1 ng) e água ultra-pura (Promega, Brasil). As condições para amplificação foram: 1 ciclo de 95 °C por 10 min., seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 seg., e temperatura de anelamento por 30 seg. (Tabela 4). Após cada ciclagem, a curva de dissociação foi determinada para avaliar a presença de *primers-dimers*. Como controle negativo foi utilizado mistura da reação substituindo-se DNA por água ultrapura esterilizada. A identificação do sinal fluorescente foi realizada nos 30 seg. finais da etapa de extensão.

Foi realizada a quantificação de bactérias orais pelo sistema TaqMan devido à dificuldade de detecção dessas bactérias e pela sensibilidade desse sistema. As bactérias foram: *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Dialister pneumosintes*, *Prevotella nigrescens* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Para o sistema TaqMan foram usados volumes finais de 25 µL, PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems, Foster City, CA), cada par de iniciadores (5 µM), 100 µM TaqMan probe (Applied Biosystems, Foster City, CA) (Tabela 4), DNA (2 ng), e água ultra-pura (Promega, Brasil). As condições de amplificação foram: 1 ciclo de 95 °C por 10 min., seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 seg., e temperatura de anelamento por 60 seg. (Tabela 4).

Para elaboração das respectivas curvas-padrão foram utilizadas bactérias de referência: *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523, *F. nucleatum* ATCC 25586, *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. intermedia* ATCC 25611, *P. nigrescens* ATCC 33563, *D. pneumosintes* ATCC 33040, *B. fragilis* ATCC 25285, *B. thetaiotaomicron* ATCC 29742, *E. coli* ATCC 25922, *L. acidophilus* ATCC 4356, *Bifidobacterium bifidum* ATCC 1696, *Clostridioides difficile* VPI 10468, e *C. perfringens* ATCC 13124. As curvas-padrão foram padronizadas com oito pontos de diluições seriadas. Todas as

amplificações foram realizadas em termociclador Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science, Qiagen, Brasil).

4.10. Análises estatísticas.

Os dados demográficos e clínicos dos pacientes, e os dados microbiológicos qualitativos e quantitativos, foram analisados comparativamente entre os grupos avaliados pelo teste de Fisher. Nas análises qualitativa e quantitativa, foi usado o *t*-test, para análise da distribuição, e o Chi-square, para comparação entre ambos os grupos de pacientes. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Na análise da distribuição foi usado o teste não paramétrico de Signed-Rank test, para comparação entre as amostras pareadas do mesmo paciente; e o teste não paramétrico de U de Mann-Whitney, para comparação entre ambos os grupos de pacientes; valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises foram obtidas com os programas estatísticos GraphPad Prism version 6.0 for Windows (GraphPad Software, La Jolla California, USA) e BioStat 2009 versão 5.3.5.

Tabela 4. Sequências nucleotídicas da detecção quantitativa de bactérias intestinais (sistema SYBR) e orais (sistema TaqMan).

Bactérias	Oligonucleotídeos 5' → 3'	Tm (°C)	Referências
Sistema SYBR			
Bacterias intestinais			
Grupo <i>B. fragilis</i>	F: GAG GAA GGT CCC CCA CAT TG R: TCC TTC ACG CTA CTT GGC TG	60	IGNACIO et al. (2016)
<i>Escherichia coli</i>	F: AGA AGC TTGCTC TTT GCT GA R: CTT TGG TCT TGC GAC GTT AT	60	LEE et al. (2010)
<i>Lactobacillus</i> spp.	F: AGC AGT AGG GAA TCT TCC A R: ATT YCA CCG CTA CAC ATG	60	PONNUSAMY et al.(2011)
<i>Bifidobacterium</i> spp.	F: CGC TGC TTA ACA CAT GCA AGT C R: CAC CCG TTT CCA GGA GCT ATT	60	PONNUSAMY et al.(2011)
Filo <i>Bacteroidetes</i>	F: TGG TAG TCC RCR CDG TAA ACG ATG R: ATG TTC CTC CGC TTG TGC	60	FERNANDES et al. (2016)
Filo <i>Firmicutes</i>	F: TRA AAC TYA AAG GAA TTG ACG R: ACC ATG CAC CAC CTG TC	61	DE GREGORIS et al. (2011)
Cluster I	F: ATG CAAGTC GAG CGA KG R:TAT GCG GTA TTA ATCTYC CTT T	60	RINTTILA et al. (2004)
<i>C. perfringens</i>	F: TCA TCA TTC AAC CAA AGG AGC AAT CC R: CCT TGG TAG GCC GTT ACC C	60	SIRAGUSA et al. (2007)
<i>Clostridioides difficile</i>	F: ATT AGG AGG AAC ACC AGT TG R: AGG AGA TGT CAT TGG GAT GT	56	KANG et al. (2010)
Sistema TaqMan:			
Bactérias orais			
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	F: CAAGTGTGATTAGGTAGTTGGTGGG R: CCTTCCTCATCACCGAAAGAA P: ATCGCTAGCTGGTCTGAGAGGATGGCC	60	NONNENMACHER et al.(2005)
<i>Dialister pneumosintes</i>	F: GAGGGGTTTGCGACTGATTA R: CCGTCAGACTTTTCGTCCATT P: CACCAAGCCGACGATCAGTAGCCG	60	NONNENMACHER et al.(2005)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	F: GCGGAACTACAAGTGTAGAGGTG R: GTTCGACCCCAACACCTAGTA P: AATGCCGATGGGGAAGCCAGCTTA	60	AMASYALI et al. (2011)
<i>Prevotella intermedia</i>	F: CCACATATGGCATCTGACGTG R: TCAATCTGCACGCTACTTGG P: ACCAAAGATTCATCGGTGGAGGATGGG	60	NONNENMACHER et al.(2005)
<i>Prevotella nigrescens</i>	F: CCGTTGAAAGACGGCCTAA R: CCCATCCCTTACCGGRA P: CCCGATGTGTTTCATTGACGGCATC	57	KUBONIWA et al., (2004)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	F: ACCTTACCCGGGATTGAAATG R: CAACCATGCAGCACCTACATAGAA P: ATGACTGATGGTGAAAACCGTCTTCCCTTC	57	KUBONIWA et al., (2004)

P: Sonda específica para cada microrganismo.

5. RESULTADOS

5.1 Dados demográficos.

A análise dos dados demográficos obtidos dos pacientes com e sem câncer retal pode ser observada na Tabela 5. Dos 40 pacientes com CR, foram coletadas 25 amostras fecais, 38 de sangue, 36 de tecido tumoral, e 36 de tecido adjacente ao tumor. Já dos 20 pacientes sem câncer, foram coletadas 16 amostras fecais, 19 amostras de sangue, e 14 de tecido retal sadio.

Tabela 5. Dados demográficos de pacientes com e sem câncer de reto.

Dados	Câncer de reto (n=40)		Sem câncer (n=20)		Valor de P*
	Nº.	(%)	Nº.	(%)	
Sexo					
Masculino	19	(47,5%)	7	(35%)	0,416
Feminino	21	(52,5%)	13	(65%)	
Idade (Média)	64,18 ± 12,95		48,95± 9,60		0,0008*
Histórico Familiar					
Sim	10	(25%)	10	(50%)	0,081
Não	30	(75%)	10	(50%)	
Consumo de álcool:					
Diariamente	4	(10%)	2	(10%)	0,709
Socialmente	10	(25%)	7	(35%)	
Nunca	26	(65%)	11	(55%)	
Tabagismo:					
Frequente	11	(27,5%)	6	(30%)	1,00
Nunca	29	(72,5%)	14	(70%)	

*P < 0,05: expressa resultados estatisticamente significantes (Teste de Fisher).

5.2. Isolamento de *B. fragilis* nas amostras fecais.

Das 25 amostras fecais analisadas dos pacientes com câncer, seis (24%) foram positivas para *B. fragilis* obtendo-se 11 cepas. Das 16 amostras fecais de sadios, sete (28%) apresentaram *B. fragilis* isolando-se 13 cepas. Nenhuma cepa isolada em ambos os grupos de pacientes, abrigou o gene *bft* ou seus subtipos, sendo consideradas não toxigênicas (NTBF). Outras espécies dos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides* também foram isoladas, sendo detectadas com valores estatisticamente significativas para *B. stercoris* ($P = 0,018$) e *B. ovatus* ($P = 0,018$) nos sadios em comparação aos pacientes com câncer (Tabela 6).

5.3. Isolamento de *C. perfringens* nas amostras fecais.

Das 25 amostras fecais dos pacientes com câncer, 23 (92%) foram positivas para *C. perfringens* obtendo-se um total de 85 cepas. Das 16 amostras fecais de pacientes sem câncer, 11 (68,75%) foram positivas para *C. perfringens* isolando-se 47 cepas. Outras espécies de *Clostridium* spp. também foram isoladas mas não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os pacientes com e sem câncer (Tabela 7).

Tabela 6. Distribuição das espécies dos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides* em amostras fecais de 25 pacientes com e 16 sem câncer de reto.

Pacientes (Nº. de fezes)	Nº de amostras positivas (Nº de cepas isoladas)								
	<i>B. fragilis</i>	<i>B. ovatus</i>	<i>B. caccae</i>	<i>B. stercoris</i>	<i>B. uniformis</i>	<i>B. thetaiotaomicron</i>	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. eggerthii</i>	<i>P. distasonis</i>
Com câncer									
(25)	6 (11)	0	2 (2)	0	1 (3)	1 (2)	12 (57)	3 (5)	7 (11)
Sem câncer									
(16)	7 (13)	4 (5)	2 (2)	4 (8)	2 (2)	0	8 (18)	0	3 (6)
Total									
(41)	13 (24)	4 (5)	4 (4)	4 (8)	3 (5)	1 (2)	20 (75)	3 (5)	10 (17)
Valor de P*	$P = 0.30$	$P = 0.018$	$P = 0.63$	$P = 0.018$	$P = 0.54$	$P = 1.00$	$P = 1.00$	$P = 0.26$	$P = 0.71$

* $P < 0,05$, expressa valores estatisticamente significantes (teste Chi-quadrado).

Tabela 7. Distribuição das espécies do gênero *Clostridium* isoladas de 41 amostras fecais de 25 pacientes com e 16 sem câncer.

Pacientes (Nº. de fezes)	Nº. de amostras positivas (Nº. de cepas isoladas)					
	<i>C. perfringens</i>	<i>C. butyricum</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. putrificum</i>	<i>C. clostridiforme</i>	<i>C. baratii</i>
Com câncer						
(25)	23 (85)	1 (1)	18 (38)	2 (3)	1 (1)	1 (3)
Sem câncer						
(16)	11 (47)	0	12 (12)	1 (1)	0	0
Total						
(41)	34 (132)	1 (1)	30 (50)	3 (4)	1 (1)	1 (3)
Valor de P*	<i>P</i> = 0,089	<i>P</i> = 1,00	<i>P</i> = 1,00	<i>P</i> = 1,00	<i>P</i> = 1,00	<i>P</i> = 1,00

**P* < 0,05: expressa valores estatisticamente significantes (teste Chi-quadrado).

5.4. Toxinotipagem de *C. perfringens*. Das 85 cepas de *C. perfringens* de pacientes com câncer retal, 80 pertenceram ao toxinotipo A (abrigoando o gene *cpa*) e 5 pertenceram ao toxinotipo G (abrigoaram o gene *netB*). Todas as 47 cepas dos pacientes controles (sem câncer) pertenceram ao toxinotipo A (abrigoando o gene *cpa*).

5.5. Detecção dos genes *tpeL*, *becA* e *becB*. Das 85 cepas de *C. perfringens* de pacientes com câncer retal, oito (11,42%) abrigoaram o gene *tpeL*, enquanto que, as cepas dos pacientes sadios não apresentaram positividade para esse gene. Nenhuma cepa de câncer e de controle abrigoou o gene *becA* ou *becB*.

5.6. Detecção dos genes *netB*, *netE*, *netF* e *netG*. Das 85 cepas de pacientes com câncer retal, cinco (7,14%) abrigoaram o gene *netB*, e seis (7,05%) o gene *netE*. Os genes *netF* e *netG* não foram observados. Também, nenhuma cepa (n = 47) de pacientes controle abrigoou esses genes.

5.7. Detecção dos genes *nanH*, *nanI* e *nanJ*. Todas as 85 cepas de *C. perfringens* de pacientes com câncer retal e 47 cepas de pacientes controles abrigoaram os genes *nanI* e *nanJ*. Nenhuma das cepas de pacientes com ou sem câncer abrigoaram o gene *nanH*.

5.8. Diversidade genética das cepas de *B. fragilis* isoladas de pacientes com e sem câncer de reto. Todas as cepas da espécie *B. fragilis* isoladas de amostras fecais de pacientes com e sem câncer de reto com um total de 24 isolados, foram avaliadas quanto à diversidade genética através da técnica de AP-PCR. Foi possível observar diferenças de padrões de bandas entre os isolados apenas com o iniciador arbitrário OPA-03. A relação genética dos isolados variou de 73% a 100% e apresentou similaridade de aproximadamente 96% (Figura 12).

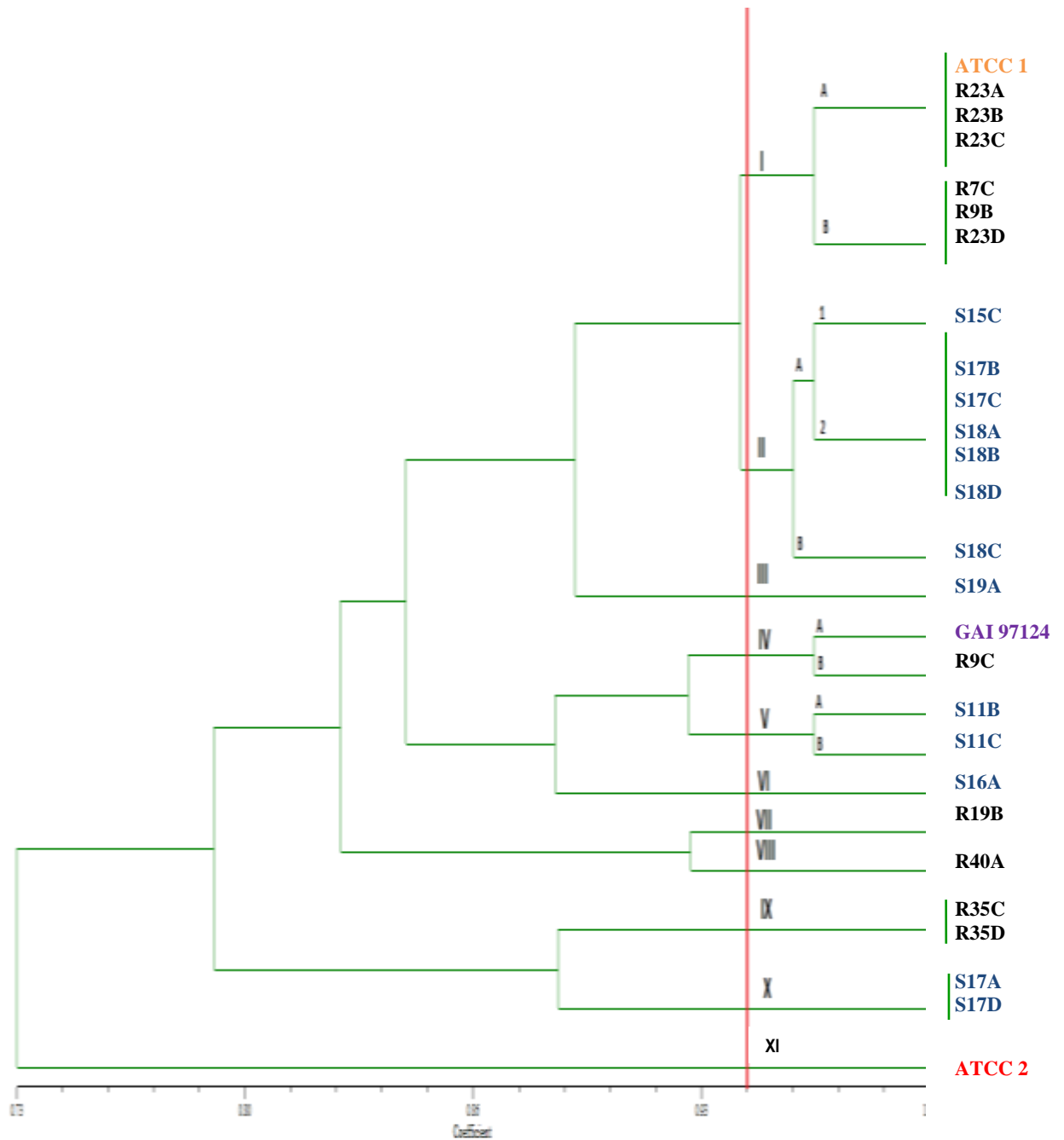


Figura 12. Dendrograma mostrando a análise AP-PCR de *B. fragilis* isolada de amostras fecais em pacientes com e sem câncer de reto, utilizando o coeficiente Simple Matching (SM). Legenda: **ATCC1:** *Bacteroides fragilis* ATCC 25285; **GAI 97124** *Bacteroides fragilis* (cepa positiva para toxina fragilisina subtipo-2); **ATCC2:** *Escherichia coli* ATCC 25922. R: isolados de pacientes com câncer retal e S: pacientes controles sem câncer retal.

Todas as espécies de *B. fragilis* analisados foram agrupadas em 11 clusters (I- XI) incluindo as cepas de referência *B. fragilis* ATCC 25285 (cepa não toxigênica) e GAI 97124 (cepa positiva para toxina fragilisina subtipo-2) e a cepa *E. coli* 25922 que foi a raiz do dendrograma. O cluster I abrigou sete isolados em dois grupos: A e B. O cluster IA agrupou quatro clones incluindo a cepa de referência *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 e o cluster IB abrigaram três clones provenientes de três pacientes diferentes, todos os clones constituídos do cluster I são de origem de pacientes com câncer com exceção da cepa de referência. No cluster II observou a formação de dois grupos (A e B), e dentro do grupo A houve a formação de dois subgrupos (1 e 2). No cluster IIA1 agrupou apenas um isolado, o cluster IIA2 agrupou seis clones e o cluster IIB abrigou apenas um isolado, todos esses clones são de origem de pacientes sem câncer. O cluster III, VI, VII e VIII abrigaram apenas um isolado. No cluster IV e V houve a formação de dois grupos (A e B) sendo constituído de um isolado cada um. No cluster IVA observou a presença da cepa de referência GAI 97124 e no cluster IVB abrigou apenas um isolado de origem de pacientes com câncer. No cluster V abrigou dois isolados do mesmo paciente, porém em grupos diferentes. Os clusters IX e X abrigaram dois isoaldos em cada, provenientes do mesmo paciente. E no cluster XI, a cepa de referência *Escherichia coli* ATCC 25922 ficou isolada das demais amostras de *B. fragilis*, apresentando-se como a raiz do dendrograma.

5.9. Diversidade genética das cepas toxigênicas de *C. perfringens* isoladas de pacientes com e sem câncer de reto.

Para a caracterização de PFGE, foram selecionadas dois isolados para cada paciente positivo para *C. perfringens*, sendo um total de 66 cepas (44 isolados de pacientes com câncer e 22 isolados sem câncer), um total de 61 isolados possuem o toxinotipo A (presença apenas da toxina alfa) e 4 isolados provenientes dos pacientes com câncer possuem o toxinotipo G (presença da toxina alfa e *netB*).

É importante destacar que nem todas os isolados toxigênicos para TpeL, NetB e NetE foram avaliadas, em razão a problemas técnicos como perda de isolados e a limitação do desenho experimental, visto que alguns pacientes apresentaram mais que dois isolados de *Clostridium perfringens* toxigênico.

Parte do resultado da técnica PFGE, foi ilustrada na Figura 13, observando que os isolados de *C. perfringens*, tiveram diferenças nos padrões de bandas obtidas através da digestão do DNA cromossômico pela enzima *SmaI*. Os isolados R21.1 e R21.5 provenientes do mesmo pacientes, tiveram um subtipo de PFGE idêntico dentro do pulsotipo X no grupo B, da mesma forma que os isolados R28.1 e R28.2 presentes no subtipo A2 no pulsotipo XII. Já os isolados R27.1 e R27.2 provenientes do mesmo pacientes, apresentaram diferentes pulsotipos e subtipos de PFGE (pulsotipo IIB1 e XIA2 respectivamente).

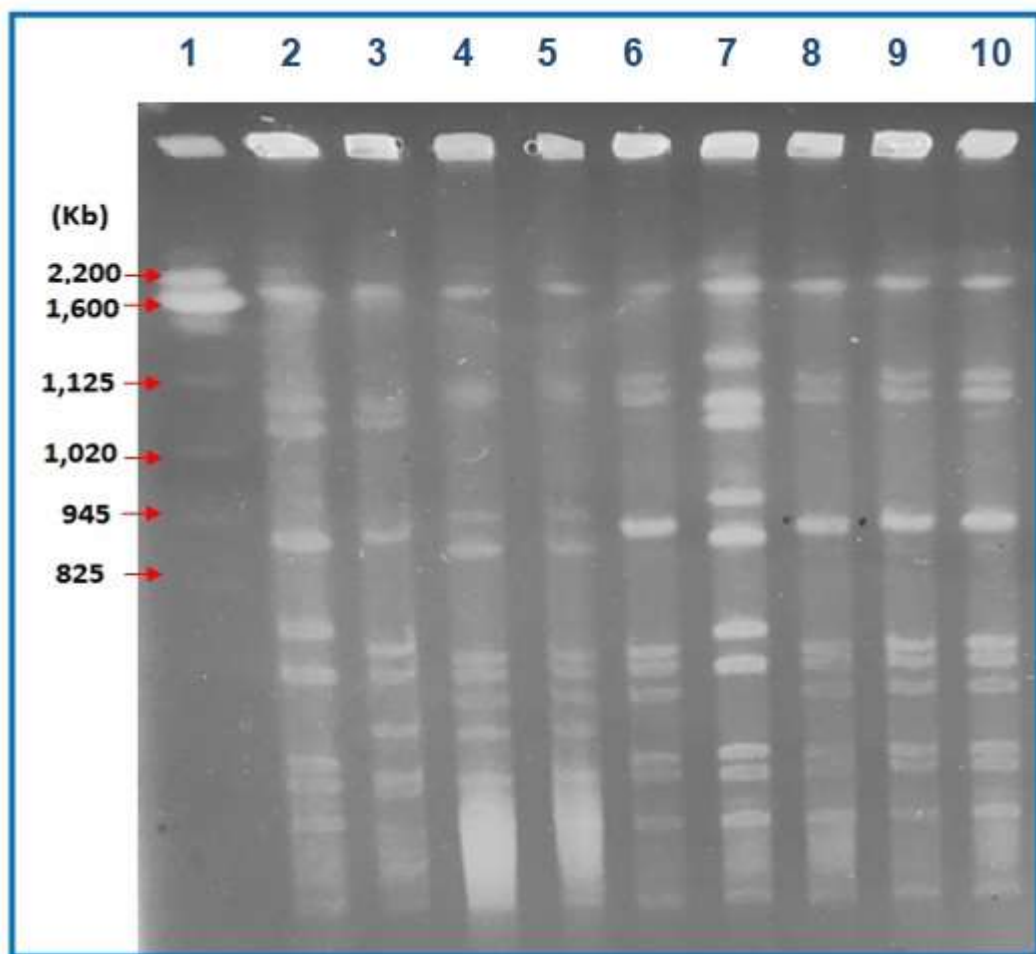


Figura 13. Exemplo de padrões de bandas de PFGE de isolados de *C. perfringens* obtidos quando o DNA cromossômico foi digerido com a enzima de restrição *SmaI*. Poços: **1** Marcador de peso molecular (*Saccharomyces cerevisiae* chromosomal DNA); **2** cepa de *Clostridium perfringens* ATCC 13124; **3** isolado R5.4 subtipo 1 (Pulsotipo VIII); **4 e 5** isolados R21.1 e R21.5 subtipo 2 (Pulsotipo IX); **6** isolado R25.1 subtipo 1.A (Pulsotipo XI); **7** isolado R27.1 subtipo 1 (Pulsotipo VII); **8** isolado R27.2 subtipo 1.B (Pulsotipo XI); **9 e 10** isolados R28.1 e R28.2 subtipo 1.B (Pulsotipo XI).

A relação genética dos isolados variou de 25% a 100% e apresentou um índice discriminatório igual a 0,80 o que gerou 30 pulsotipos identificados pelos números I- XXX (Figura 14).

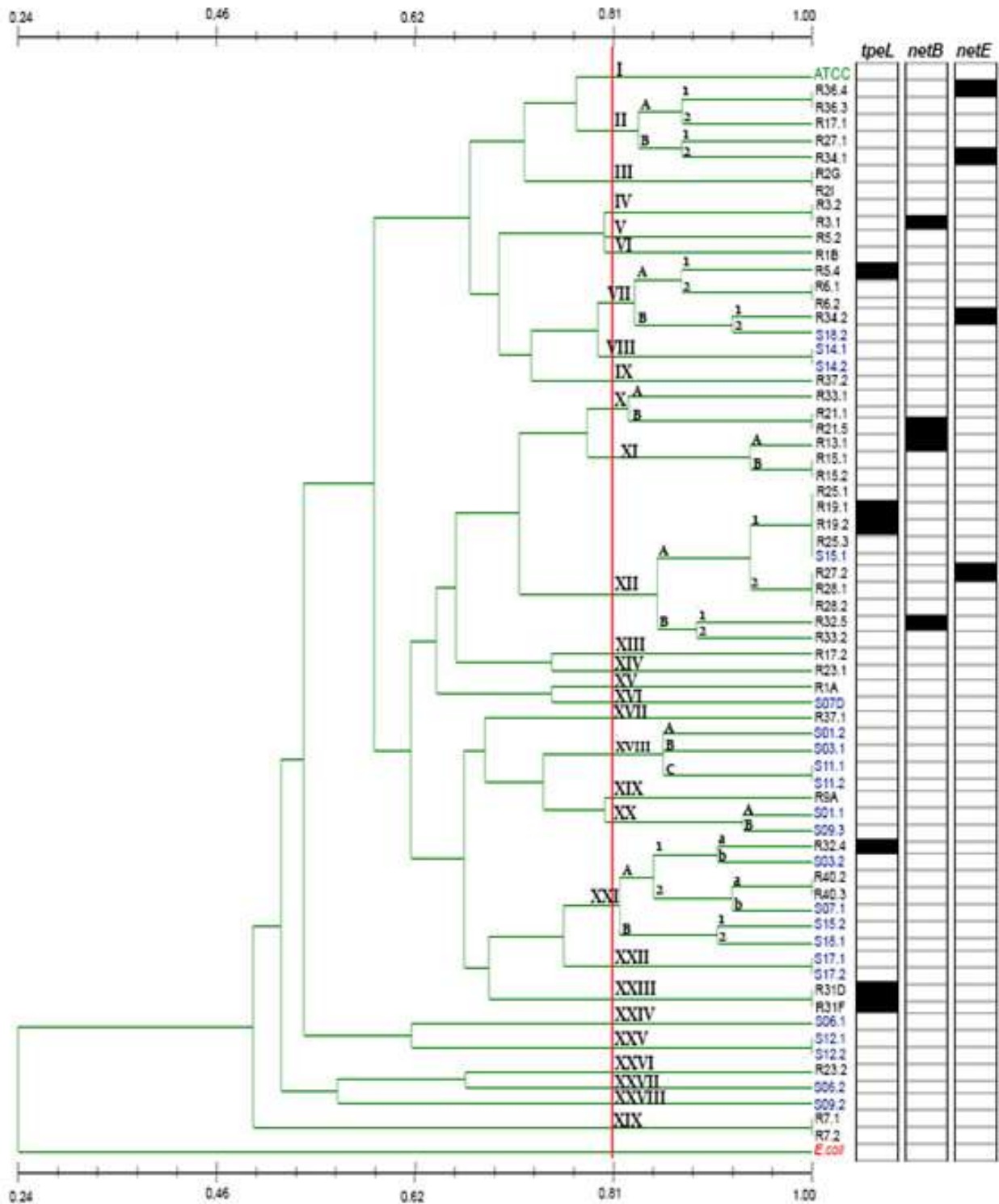


Figura 14. Dendrograma mostrando a análise PFGE de *C. perfringens* isolado de amostras fecais em pacientes com e sem câncer de reto, utilizando o coeficiente de Dice. Legenda: **ATCC**: *Clostridium perfringens* ATCC 13124; **E. coli**: *Escherichia coli* ATCC 25922; **R**: pacientes com câncer de reto e **S**: pacientes sem câncer.

Destes, 16 pulsotipos são constituídos exclusivamente por isolados provenientes de paciente com câncer; enquanto que os pulsotipos constituídos de isolados de pacientes sem câncer são de um total de 9, já 3 pulsotipos (VII, XII e XXI) compartilham isolados de ambos os pacientes, 1 pulsotipo (I) é constituído pela cepa de referência *C. perfringens* ATCC 13124 (isolado humano – gangrena gasosa) e 1 pulsotipo (I) é constituído pela cepa de referência *Escherichia coli* ATCC 25922 (XXX). Todos os isolados independentes do toxinotipo A, que abrigaram alguns dos genes considerados como potencial virulento foi observado em isolados derivados de fezes de pacientes com câncer. Observar-se que dos 44 isolados de *C. perfringens* provenientes de pacientes com câncer, 14 isolados abrigaram alguns dos 3 genes de virulência, sendo classificadas pelo PGFE em 8 pulsotipos (II, IV, VII, X, XI, XII, XXI e XXIII). É importante ressaltar que nenhuma dos isolados de sadios abrigaram esses genes de virulência.

O pulsotipo I abrigou apenas a cepa de referência *C. perfringens* ATCC 13124. O pulsotipo II observou a formação de dois grupos (A e B), e dois subgrupos (1 e 2), com um total de cinco isolados. O pulsotipo IIA1 abrigou dois clones provenientes do mesmo paciente, porém apenas um clone foi positivo para toxina NetE, já os outros subtipos IIA2, IIB1 e IIB2 abrigaram apenas um isolado, porém o subtipo IIB2 possui positividade para a toxina NetE.

O pulsotipo VII apresentou dois grupos (A e B) sendo constituídos cada um de dois subgrupos (1 e 2), com um total de cinco isolados. O pulsotipo VIIA2 abrigou dois clones originários do mesmo paciente, enquanto que os pulsotipos VIIA1, VIIB1 e VIIB2 abrigaram um isolado apenas. Neste pulsotipo dois isolados foram positivos para toxina TpeL e NetE (VIIA1 e VIIB1 respectivamente).

O pulsotipo X e XI abrigaram um total de três isolados cada um sendo distribuídos em dois grupos A e B. Nos grupos XA e XIA abrigaram apenas um isolado enquanto que o XB e XIB dois clones cada um provenientes do mesmo paciente. Neste pulsotipo dois isolados foram positivos para toxina NetB (subtipos XB e XIA)

O pulsotipo XII observou a formação de dois grupos (A e B) e dois subgrupos cada um (1 e 2), com um total dez isolados. O pulsotipo XIIA1 abrigou cinco isolados, dos quais quatro são clones provenientes de dois pacientes diferentes. O pulsotipo XIIA2 abrigou três isolados, sendo constituídos de dois clones do mesmo paciente. Os pulsotipos XIIB1 e XIIB2 abrigaram um único isolado. O subtipo XIIA1

possui dois isolados positivos para toxina TpeL, enquanto que o subtipo XIIA2 possui um isolado positivo para toxina NetE e o XIIB1 um isolado positivo para a toxina NetB.

No pulsotipo XVIII houve a formação de três grupos (A, B e C), com um total de quatro isolados. O pulsotipo XVIIIA e XVIII B abrigaram apenas um isolado enquanto que o XVIII C abrigou dois clones provenientes do mesmo paciente.

O pulsotipo XX formou dois grupos A e B sendo constituído de um isolado em cada.

O pulsotipo XXI houve formação de vários grupos (A e B), com múltiplos subgrupos (1 e 2) e (a e b), apresentando um total de sete isolados. Nos pulsotipos XXIA1a, XXIA1b, XXIA2b, XXIB1 e XXIB2 abrigaram um isolado em cada, enquanto que o XXIA2a abrigou dois clones de um mesmo paciente. A presença de toxina TpeL foi observada no pulsotipo XXIA1a.

Os pulsotipos III, IV, VIII, XXII, XXIII, XXV e XXIV, todos abrigaram dois clones provenientes do mesmo paciente em cada. Já os pulsotipos que abrigaram apenas um isolado estão alocados no V, VI, IX, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XIX, XXIV, XXVI, XXVII, XXVIII. Destes somente os pulsotipos IV e XXIII apresentaram isolados positivos para toxina NetB (IV) e toxina TpeL (XXIII).

E no cluster XXX, a cepa de referência *Escherichia coli* ATCC 25922 ficou isolada das demais amostras de *C. perfringens*, apresentando-se como a raiz do dendrograma

5.10. Isolamento bacteriano nas amostras de sangue. Somente duas amostras de sangue de pacientes com câncer retal foram hemocultura-positivas. Uma amostra mostrou a presença de *Enterococcus faecalis* e *Bacteroides fragilis*; e a outra apresentou *Enterococcus faecalis*, *Bacteroides fragilis* e *E. coli* (Tabela 8). Nenhuma amostra sanguínea dos pacientes controle foi positiva na hemocultura. Ambas as cepas de *B. fragilis* foram classificadas como NTBF, ou seja, não abrigaram o gene da toxinas e nem os subtipos.

Tabela 8. Espécies bacteriana isoladas de hemoculturas positivas de pacientes com câncer de reto.

Pacientes com câncer de reto	Bactérias isoladas
PR01	<i>Bacteroides fragilis</i>
	<i>Enterococcus faecalis</i>
	<i>Escherichia coli</i>
PR13	<i>Bacteroides fragilis</i>
	<i>Enterococcus faecalis</i>

5.11. Detecção quantitativa de bactérias intestinais e orais em amostras fecais.

Nas amostras fecais dos pacientes com câncer, *Dialister pneumosintes* ($P = 0,032$) apresentou-se em baixo número, contrariamente, aos números significativos observados para *Fusobacterium nucleatum* ($P = 0,018$), *Escherichia coli* ($P = 0,001$) e o filo *Bacteroidetes* ($P = 0,001$) em relação às amostras fecais dos pacientes sem câncer. Não foram verificadas diferenças significativas entre os outros microrganismos avaliados nos dois grupos de pacientes (Tabela 9 e Figuras 15-18).

5.12. Detecção quantitativa de bactérias intestinais e orais nas amostras de sangue.

Os dois pacientes com câncer (PR01 e PR13) que foram positivos na hemocultura, foram positivos para a detecção do Grupo *B. fragilis* apresentando quantificação de $2,74 \times 10^{-6}$ e $4,77 \times 10^{-6}$ cópias/mL, respectivamente. Todas as demais amostras de sangue dos pacientes com câncer e sem câncer não apresentaram positividade na detecção por qPCR das bactérias intestinais e orais.

Tabela 9. Detecção quantitativa de bactérias intestinais (sistema SYBR) e orais (sistema TaqMan) em amostras fecais de pacientes com e sem câncer retal.

Grupo Bacteriano	No. de cópias/g de fezes				Valor de P*
	Pacientes com câncer		Pacientes sem câncer		
	Mediana	Q1 - Q3	Mediana	Q1 - Q3	
Bactérias intestinais					
Filo <i>Firmicutes</i>	3,41 x 10 ³	1,27 x 10 ³ - 7,79 x 10 ³	1,29 x 10 ³	6,28 x 10 ² – 3,39 x 10 ³	0,076
Filo <i>Bacteroidetes</i>	1,21 x 10 ⁶	4,5 x 10 ⁵ - 4,19 x 10 ⁶	2,50 x 10 ⁵	1,03 x 10 ⁵ - 5,2 x 10 ⁵	0,001*
<i>Clostridium</i> Cluster I	3,82 x 10 ⁻³	0 - 6,71 x 10 ⁻²	0	0 - 7,57 x 10 ⁻²	0,161
<i>C. perfringens</i>	1,72 x 10 ²	4,59 x 10 – 4,62 x 10 ²	4,12 x 10	2,22 x 10 – 1,01 x 10 ²	0,060
<i>Clostridioides difficile</i>	0	0 - 0	0	0 - 0	0,102
Grupo <i>B. fragilis</i>	1,82 x 10 ⁴	9,96 x 10 ³ - 78 x 10 ⁴	1,93 x 10 ⁴	6,78 x 10 ³ - 406 x 10 ⁴	0,430
<i>Lactobacillus</i> spp.	7,71 x 10	9,24 - 36 x 10 ²	5,55 x 10	1,01 x 10 – 8,51 x 10 ²	0,741
<i>Escherichia coli</i>	5,67 x 10 ²	7,38 x 10 ³ - 1,94 x 10 ³	2 x 10	1,14 x 10 – 6,04 x 10	0,001*
<i>Bifidobacterium</i> spp.	2 x 10 ²	3,09 x 10 – 1,59 x 10 ³	1,17 x 10 ³	3,4 x 10 ⁻¹ - 156 x 10 ⁴	0,377
Bactérias orais					
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	0	0 – 4,51 x 10 ²	0	0 – 3,34 x 10 ⁵	0,905
<i>Dialister pneumosintes</i>	0	0 - 9,2 x 10 ⁶	7,43 x 10 ⁷	6,65 x 10 ² - 1,24 x 10 ⁸	0,032*
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	6,51 x 10 ⁷	4,29 x 10 ⁵ - 3,84 x 10 ⁸	6,85 x 10 ³	0 - 1,62 x 10 ⁶	0,018*
<i>Prevotella intermedia</i>	0	0 - 1,26 x 10 ⁸	1,55 x 10 ⁷	0 - 1,56 x 10 ⁹	0,310
<i>Prevotella nigrescens</i>	1,17 x 10 ⁶	0 - 7,78 x 10 ⁹	1,62 x 10 ⁸	1,27 x 10 ⁶ - 7,59 x 10 ⁸	0,691
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	0	0 - 3,1 x 10 ⁹	4,15 x 10 ⁸	9,4 x 10 ⁷ - 2,77 x 10 ⁹	0,061

Dados representados em mediana, primeiro quartil (Q1) e terceiro quartil (Q3). Análise estatística para dados não paramétricos realizada por Mann-Whitney (* $P < 0,05$).

5.13. Detecção bacteriana quantitativa em tecido sadio adjacente ao tumor e em tecido retal sadio. Nas amostras de tecido sadio adjacente ao tumor foi observado valor significativo para *Clostridium* Cluster I ($P = 0,002$) em relação aos tecidos retais de pacientes sadios. Enquanto que, nas amostras de tecido sadio dos pacientes sem câncer, observou-se elevado valor para o Filo *Bacteroidetes* ($P = 0,001$), *Lactobacillus* spp. ($P = 0,043$) e *Escherichia coli* ($P = 0,001$), quando

comparados ao tecido adjacente ao tumor. Não foram verificadas diferenças significativas entre os outros microrganismos avaliados nos dois grupos de pacientes (Tabela 10 e Figuras 15-18).

Tabela 10. Detecção quantitativa de bactérias intestinais (sistema SYBR) e orais (sistema TaqMan) em amostras de tecido adjacente e sadio de pacientes com e sem câncer retal.

Grupo Bacteriano	No. de cópias/g de tecido				Valor de <i>P</i> *
	Pacientes com câncer (tecido adjacente ao tumor)		Pacientes sem câncer (tecido sadio)		
	<u>Mediana</u>	<u>Q1 - Q3</u>	<u>Mediana</u>	<u>Q1 - Q3</u>	
Bactérias intestinais					
Filo <i>Firmicutes</i>	4,85 x 10 ⁻³	8,05 x 10 ⁻⁴ – 9,02 x 10 ⁻²	2,89 x 10 ⁻³	3,55 x 10 ⁻⁴ - 5,61 x 10 ⁻²	0,294
Filo <i>Bacteroidetes</i>	0,12 x 10	5,13 x 10 ⁻¹ - 0,34 x 10	0,57 x 10	0,33 x 10 – 0,132 x 10 ²	0,001*
<i>Clostridium</i> Cluster I	5,05 x 10 ⁻²	0 – 0,92 x 10	0	0 - 0	0,002*
Grupo <i>B. fragilis</i>	1,70 x 10 ⁻¹	6,97 x 10 ⁻² – 6,17 x 10 ⁻¹	1,93 x 10 ⁴	6,06 x 10 ⁻² – 0,18 x 10	0,199
<i>C. perfringens</i>	1,29 x 10 ⁻¹	2,07x10 ⁻² – 0,14 x 10	4,12 x 10	6,91 x 10 ⁻² – 0,82 x 10	0,127
<i>Clostridioides difficile</i>	0	0 - 0	0	0 - 0	-
<i>Lactobacillus</i> spp.	5,15 x 10 ⁻²	8,22 x 10 ⁻³ - 4,2 x 10 ⁻¹	3,61 x 10 ⁻¹	1,9 x 10 ⁻² - 1,34 x 10	0,043*
<i>Escherichia coli</i>	0	0 – 5,21 x 10 ⁻²	0,11 x 10	3,43 x 10 ⁻¹ – 0,68 x 10	0,001*
<i>Bifidobacterium</i> spp.	0	0 - 4,99 x 10 ⁻²	0	0 - 9,1 x 10 ⁻⁴	0,308
Bactérias orais					
<i>A.actinomycetemcomitans</i>	0	0 - 0	0	0 – 6,24 x 10 ³	0,195
<i>Dialister pneumosintes</i>	5,86 x 10 ⁶	0 - 2,19 x 10 ⁸	7,425 x10 ⁷	0 - 6,85 x 10 ⁷	0,571
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1,04 x10 ⁶	0 - 1,14 x 10 ⁹	6,85 x 10 ³	0 - 1,47 x 10 ⁸	0,343
<i>Prevotella intermedia</i>	0	0 - 1,44 x 10 ⁷	1,54 x 10 ⁷	0 - 1,49 x 10	0,094
<i>Prevotella nigrescens</i>	1,59 x 10 ⁷	0 - 2,90 x 10 ⁹	1,62 x 10 ⁸	0 - 1,93 x 10 ⁷	0,537
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	0	0 - 5,14 x 10 ⁶	4,15 x 10 ⁸	0 - 0	0,285

Dados representados em mediana, primeiro quartil (Q1) e terceiro quartil (Q3). Análise estatística para dados não paramétricos realizada por Mann-Whitney (**P* < 0,05).

5.14 Detecção quantitativa de bactérias em tecido tumoral e em tecido sadio do paciente sem câncer. No tecido tumoral, filo *Firmicutes* ($P = 0,0266$) e *Porphyromonas gingivalis* ($P = 0,0488$) apresentaram valores significativos, quando comparado ao tecido sadio do paciente sem câncer. Não foram verificadas diferenças entre os grupos em relação aos demais microrganismos (Tabela 11 e Figuras 15-18).

Tabela 11. Detecção quantitativa de bactérias intestinais (sistema SYBR) e orais (sistema TaqMan) em amostras de tecido tumoral de pacientes com câncer retal e tecido sadio de pacientes sem câncer retal.

Grupo Bacteriano	No. de cópias/g de tecidual				Valor de P
	Paciente com Câncer (tumor)		Paciente sem Câncer (tecido sadio)		
	Mediana	Q1 - Q3	Mediana	Q1 - Q3	
Bactérias intestinais					
Filo <i>Firmicutes</i>	$5,58 \times 10^{-2}$	$1,38 \times 10^{-5} - 1,27 \times 10$	$2,89 \times 10^{-3}$	$3,55 \times 10^{-4} - 5,61 \times 10^{-2}$	*0,0266
Filo <i>Bacteroidetes</i>	$1,65 \times 10$	$1,59 \times 10^{-1} - 8,00 \times 10$	$0,57 \times 10$	$0,33 \times 10 - 0,13 \times 10^2$	0,6698
<i>Clostridium</i> Cluster I	0	0 - 0	0	0 - 0	0,1041
Grupo <i>B. fragilis</i>	$7,94 \times 10^{-2}$	$2,37 \times 10^{-2} - 9,33 \times 10$	$1,93 \times 10^4$	$6,06 \times 10^{-2} - 0,18 \times 10$	0,9515
<i>C. perfringens</i>	$3,88 \times 10^{-2}$	$7,90 \times 10^{-3} - 2,018 \times 10$	$4,12 \times 10$	$6,91 \times 10^{-2} - 0,82 \times 10$	0,3910
<i>Clostridioides difficile</i>	0	0-0	0	0 - 0	-
<i>Lactobacillus</i> spp.	$1,42 \times 10^{-3}$	$0 - 2,84 \times 10^{-2}$	$3,61 \times 10^{-1}$	$1,9 \times 10^{-2} - 1,34 \times 10$	0,6848
<i>Escherichia coli</i>	$2,48 \times 10^{-1}$	$9,70 \times 10^{-3} - 1,21 \times 10$	$0,11 \times 10$	$3,43 \times 10^{-1} - 0,68 \times 10$	0,9697
<i>Bifidobacterium</i> spp.	0	$0 - 2,28 \times 10^{-3}$	0	$0 - 9,1 \times 10^{-4}$	0,2188
Bactérias orais					
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	$3,47 \times 10^4$	$0 - 1,47 \times 10^6$	0	$0 - 6,24 \times 10^3$	0,4258
<i>Dialister pneumosintes</i>	$3,40 \times 10^5$	$0 - 4,19 \times 10^6$	$7,425 \times 10^7$	$0 - 6,85 \times 10^7$	0,8394
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	$9,76 \times 10^7$	$5,75 \times 10^6 - 2,84 \times 10^8$	$6,85 \times 10^3$	$0 - 1,47 \times 10^8$	0,1272
<i>Prevotella intermedia</i>	$1,41 \times 10^7$	$3,57 \times 10^3 - 1,88 \times 10^8$	$1,54 \times 10^7$	$0 - 1,49 \times 10$	0,1475
<i>Prevotella nigrescens</i>	$3,07 \times 10^6$	$1,62 \times 10^5 - 4,00 \times 10^7$	$1,62 \times 10^8$	$0 - 1,93 \times 10^7$	0,8394
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	$3,19 \times 10^7$	$0 - 2,09 \times 10^9$	$4,15 \times 10^8$	0 - 0	*0,0488

Dados representados em mediana, primeiro quartil (Q1) e terceiro quartil (Q3). Análise estatística para dados não paramétricos realizada por Mann-Whitney (* $P < 0,05$).

5.15. Detecção quantitativa de bactérias em tecido tumoral e em tecido sadio adjacente ao tumor. No tecido tumoral, o *Cluster I* ($P = 0,001$) e *Lactobacillus* spp. ($P = 0,035$) foram observados em valores baixos; enquanto, *A. actinomycetemcomitans* ($P = 0,009$), filo *Firmicutes* ($P = 0,045$) e *Escherichia coli* ($P = 0,001$) apresentaram valores significativos, quando comparado ao tecido sadio adjacente. Não foram verificadas diferenças entre os grupos em relação aos demais microrganismos (Tabela 12 e Figuras 15-18).

Tabela 12. Quantificação de bactérias intestinais (sistema SYBR) e orais (sistema TaqMan) em amostras de tecido tumoral e tecido sadio adjacente ao tumor, em pacientes com câncer de reto.

Grupo Bacteriano	No. de cópias/g de tumor				Valor de <i>P</i>
	Tecido tumoral		Tecido adjacente ao tumor		
	Mediana	Q1 - Q3	Mediana	Q1 - Q3	
Bactérias intestinais					
Filo <i>Firmicutes</i>	$5,58 \times 10^{-2}$	$1,38 \times 10^{-5} - 1,27 \times 10$	$4,86 \times 10^{-3}$	$8,57 \times 10^{-4} - 8,44 \times 10^{-2}$	0,045*
Filo <i>Bacteroidetes</i>	$1,65 \times 10$	$1,59 \times 10^{-1} - 8,00 \times 10$	$1,21 \times 10$	$5,36 \times 10^{-1} - 3,27 \times 10$	0,067
<i>Clostridium</i> Cluster I	0	0 - 0	$5,04 \times 10^{-2}$	0 - $0,83 \times 10$	0,001*
Grupo <i>B. fragilis</i>	$7,94 \times 10^{-2}$	$2,37 \times 10^{-2} - 9,33 \times 10$	$1,70 \times 10^{-1}$	$7,07 \times 10^{-2} - 6,06 \times 10^{-1}$	0,759
<i>C. perfringens</i>	$3,88 \times 10^{-2}$	$7,90 \times 10^{-3} - 2,018 \times 10$	$1,29 \times 10^{-1}$	$2,43 \times 10^{-2} - 0,140 \times 10$	0,074
<i>Clostridioides difficile</i>	0	0-0	0	0 - 0	-
<i>Lactobacillus</i> spp.	$1,42 \times 10^{-3}$	0 - $2,84 \times 10^{-2}$	$5,15 \times 10^{-2}$	$8,30 \times 10^{-3} - 4,06 \times 10^{-1}$	0,035*
<i>Escherichia coli</i>	$2,48 \times 10^{-1}$	$9,70 \times 10^{-3} - 1,21 \times 10$	0	0 - $5,10 \times 10^{-2}$	0,001*
<i>Bifidobacterium</i> spp.	0	0 - $2,28 \times 10^{-3}$	0	0 - $4,85 \times 10^{-2}$	0,271
Bactérias orais					
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	$3,47 \times 10^4$	0 - $1,47 \times 10^6$	0	0 - 0	0,009*
<i>Dialister pneumosintes</i>	$3,40 \times 10^5$	0 - $4,19 \times 10^6$	$5,86 \times 10^6$	0 - $2,18 \times 10^8$	0,063
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	$9,76 \times 10^7$	$5,75 \times 10^6 - 2,84 \times 10^8$	$1,04 \times 10^6$	0 - $6,68 \times 10^8$	0,545
<i>Prevotella intermedia</i>	$1,41 \times 10^7$	$3,57 \times 10^3 - 1,88 \times 10^8$	0	0 - $7,21 \times 10^8$	0,383
<i>Prevotella nigrescens</i>	$3,07 \times 10^6$	$1,62 \times 10^5 - 4,00 \times 10^7$	$1,59 \times 10^7$	0 - $2,78 \times 10^9$	0,132
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	$3,19 \times 10^7$	0 - $2,09 \times 10^9$	0	0 - $5,04 \times 10^6$	0,115

Dados representados em mediana, primeiro quartil (Q1) e terceiro quartil (Q3). Análise estatística para dados não paramétricos realizada por Wilcoxon Singed-Rank ($*P < 0,05$).

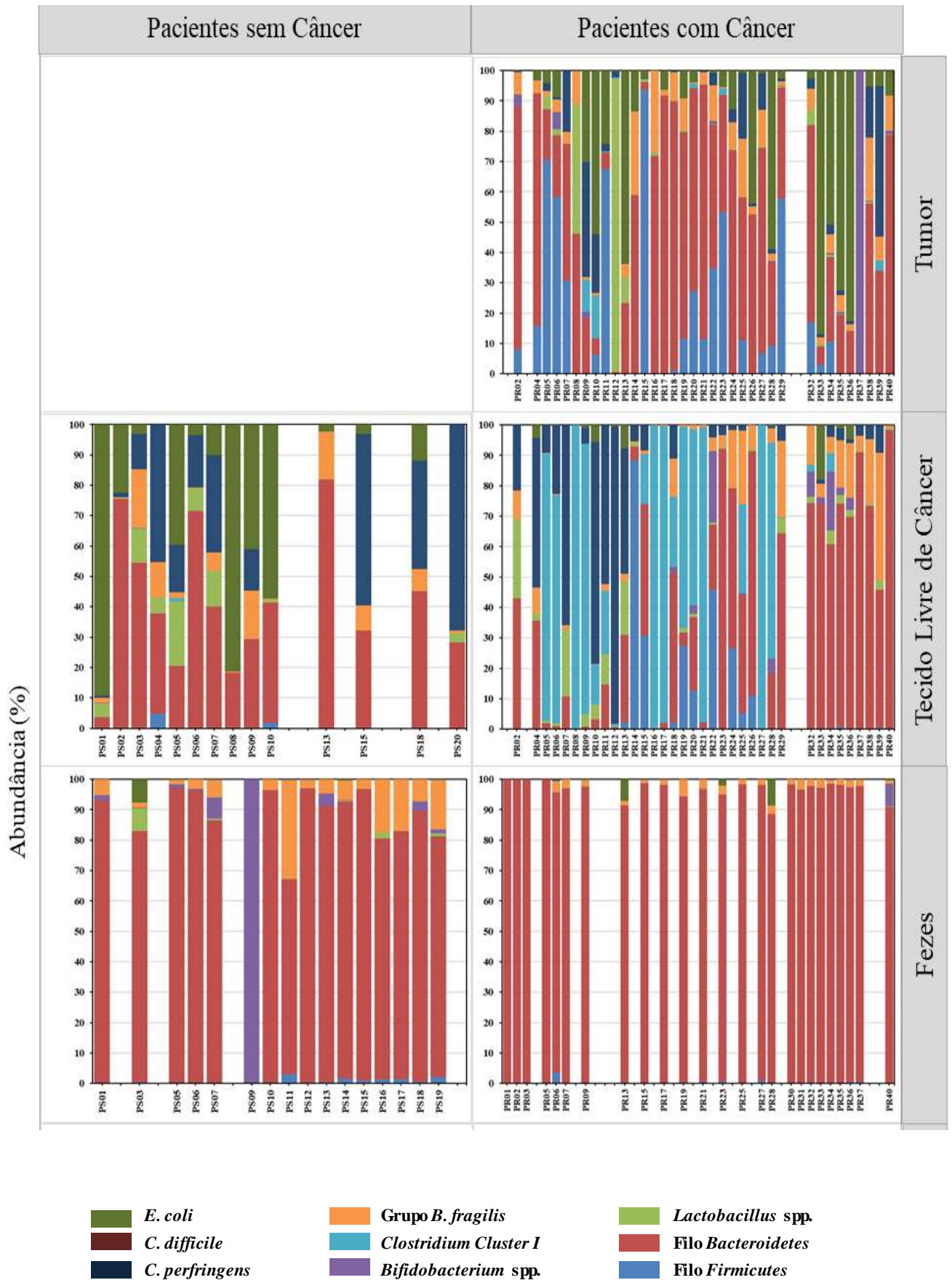


Figura 15: Composição taxonômica da microbiota de pacientes com e sem câncer. Gráfico de barras mostrando a abundância relativa das bactérias intestinais estudadas em todas as amostras.

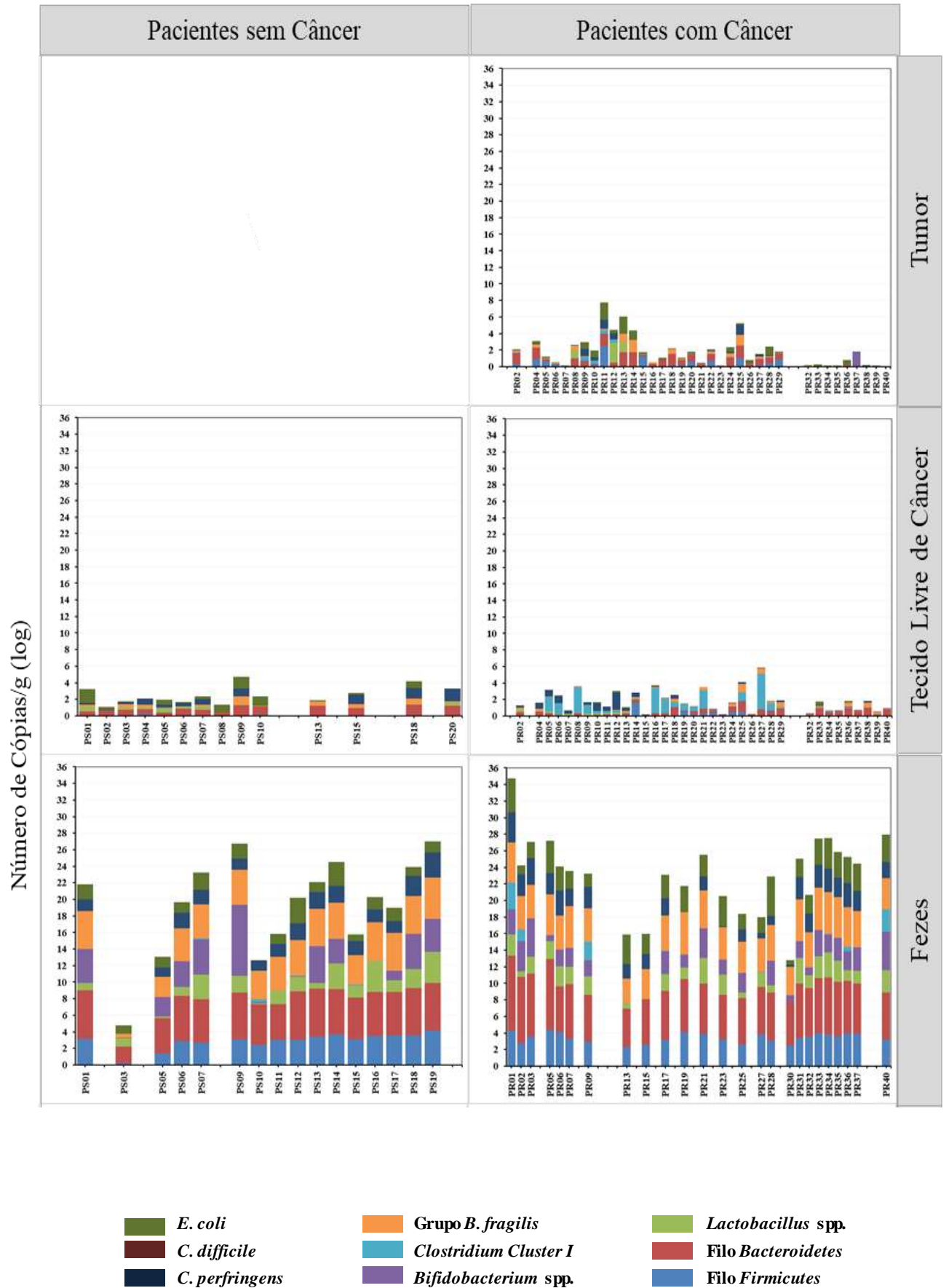


Figura 16: Composição taxonômica da microbiota de pacientes com e sem câncer. Gráfico de barras mostrando o número de cópias/g em log das bactérias intestinais em todas as amostras.

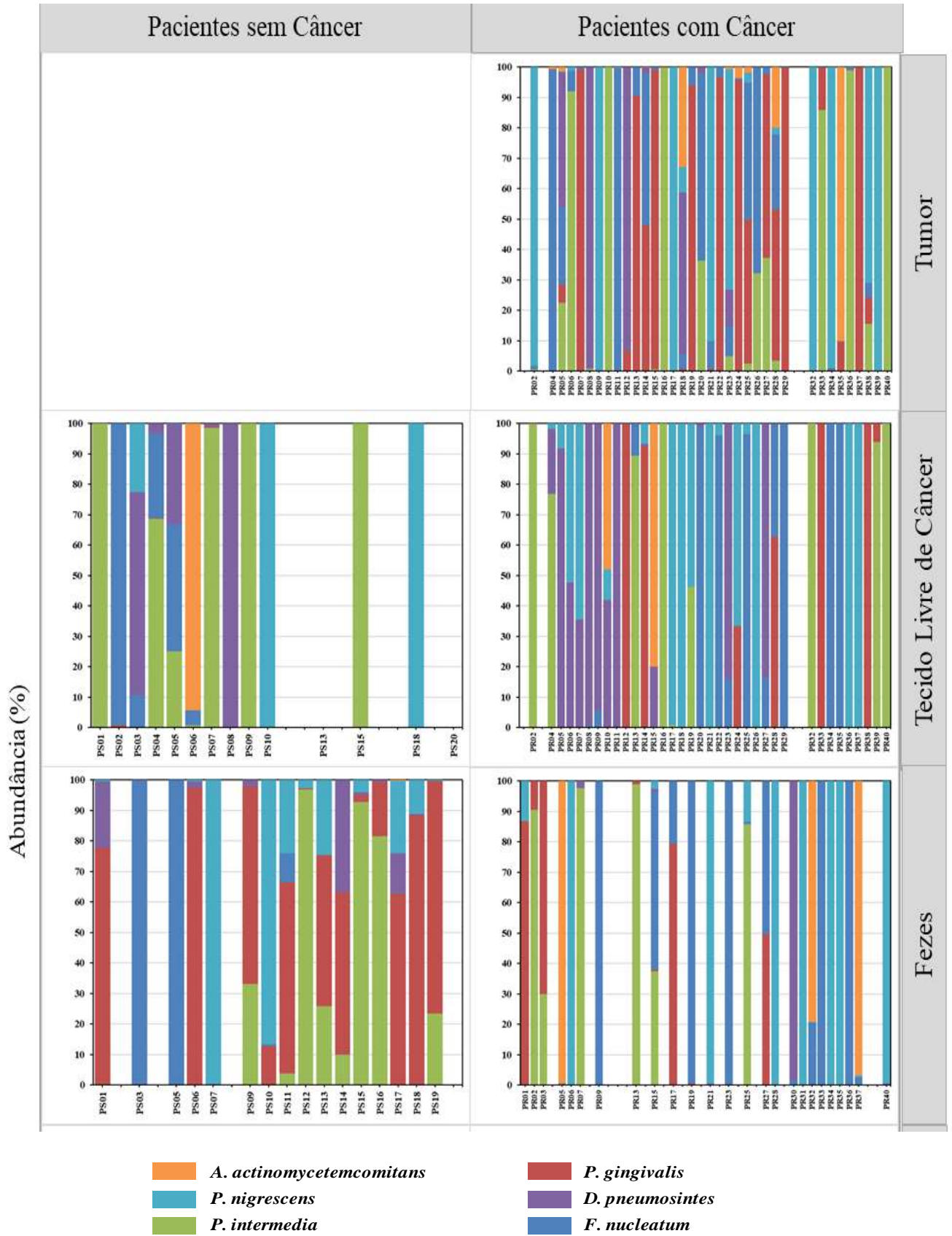


Figura 17: Composição taxonômica da microbiota de pacientes com e sem câncer. Gráfico de barras mostrando a abundância relativa das bactérias orais em todas as amostras.

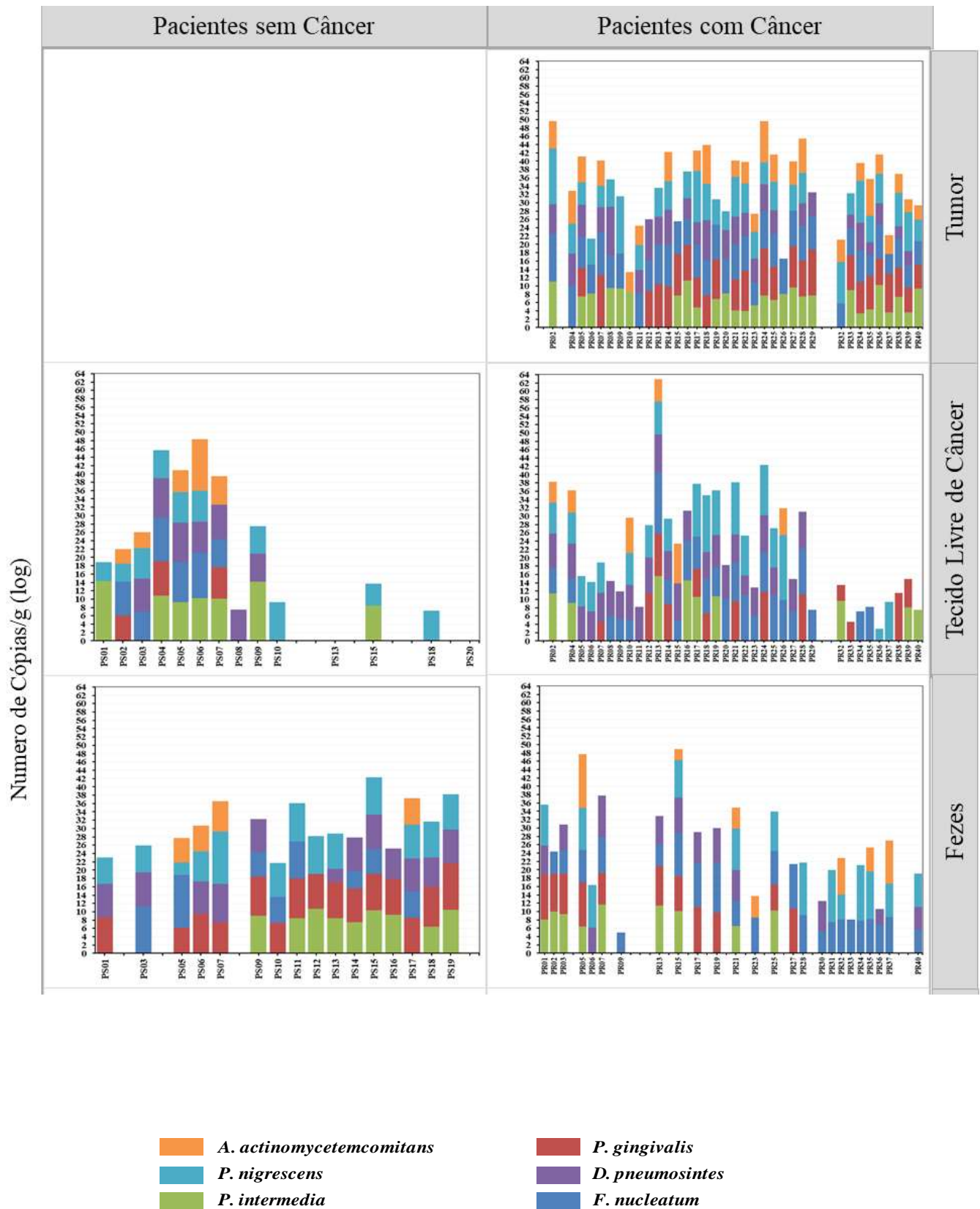


Figura 18: Composição taxonômica da microbiota de pacientes com e sem câncer. Gráfico de barras mostrando o número de cópias/g em log das bactérias orais em todas as amostras.

6. DISCUSSÃO

O câncer é uma patologia multifatorial, que pode ser desencadeada por fatores como obesidade, inflamação e exposição a componentes tóxicos (SINGH *et al.*, 2019), nos tumores associados ao intestino, as bactérias comensais e transitórias apresentam um papel fundamental no surgimento, desenvolvimento e prognóstico do câncer (VIVARELLI *et al.*, 2019).

Classicamente, o câncer de colorretal é utilizado para designar o câncer de cólon e reto. Entretanto, existem diversas diferenças quanto a estrutura, incidência, severidade e prognóstico do câncer (PASCHKE *et al.*, 2018). O câncer de reto (CR) é o segundo tipo mais prevalente de câncer associado ao intestino, os dados avaliando especificamente esse tipo de câncer e a microbiota fecal ainda são escassos, provavelmente isso se deve ao fato de ser classificado como câncer colorretal na maioria dos estudos (THOMAS *et al.*, 2016).

A presença de agentes pró-inflamatórios têm sido associado com diversas doenças, em especial o câncer (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). Diversas investigações têm surgido sobre a presença de bactérias toxigênicas na microbiota do trato gastrointestinal e o desenvolvimento de câncer (PIERCE; BERNSTEIN, 2016; YOUSSEF *et al.*, 2018).

As bactérias comensais exercem função simbiótica com o hospedeiro, auxiliando na digestão de componentes alimentar e proteção contra bactérias exógenas (BELKAID; NAIK, 2013). A disbiose desse microbioma, pode acarretar o desenvolvimento de diversas patologias como: doença celíaca, cardiopatias e mais recentemente podendo levar à carcinogênese (YU, 2018; ZENG; INOHARA; NUÑEZ, 2017).

Na nossa análise dos dados demográficos, verificou-se que somente a idade em ambos os grupos de pacientes foi estatisticamente significativa (Tabela 4), esses dados corroboram com a literatura em que a prevalência de CR é maior na população mais idosa (RAWLA; SUNKARA; BARSOUK, 2019). Outros fatores usualmente associados ao desenvolvimento de câncer como: tabagismo e consumo de álcool não apresentaram diferença em nosso estudo, indicando que o processo tumoral em nossos pacientes talvez seja de caráter esporádico relacionado a fatores não avaliados no estudo, como por exemplo: exposição ambiental, dieta, etc. Entretanto também não pode-se descartar a predisposição genética, uma vez que

não foram avaliados o perfil dos genes acionáveis correlacionados ao câncer hereditário.

Além dos fatores intrínsecos ou extrínsecos que possam influenciar o desenvolvimento dessa neoplasia, investigou-se as presenças de bactérias anaeróbias no trato gastrointestinal, com especial foco nas espécies de *Clostridium perfringens* e *Bacteroides fragilis* que são as mais associadas aos processos infecciosos em humanos (NAVARRO; MCCLANE; UZAL, 2018; WEXLER, 2007).

Bacteroides fragilis é uma bactéria anaeróbia estrita comumente encontrada no lúmen e mucosa intestinal. *B. fragilis* pode ser subdividida em: não toxigênicas (NTBF) sendo usualmente isoladas de amostras clínicas humanas e animais; e *B. fragilis* enterotoxigênica (ETBF) que é produtora de fragilisina (HUANG, J. Y.; LEE; MAZMANIAN, 2011).

A fragilisina é uma metaloproteína dependente de zinco, que atinge as células epiteliais intestinais e que estimula a clivagem da proteína supressora de tumor E-caderina que está associada com diversas doenças de cunho inflamatório, como diarreia aguda e CCR (HOUSSEAU; SEARS, 2010). Em nosso estudo, nenhuma das cepas isoladas de amostras fecais tanto de pacientes com e sem câncer de reto era portadora do gene *bft*, portanto cepas NTBF.

Além do potencial patogênico das bactérias, é necessário avaliar também a variedade genética das bactérias e seu impacto na saúde humana (DENIPOTE; TRINDADE; BURINI, 2010). Para isso, utilizamos a técnica de tipagem AP-PCR (*Arbitrary primer polymerase chain reaction*) para determinar a diversidade genética das cepas de *Bacteroides fragilis* isolados de pacientes com e sem câncer de reto, e mostrou boa discriminação entre as cepas analisadas, evidenciando a alta diversidade dessa espécie bacteriana.

Embora exista uma ampla variedade de técnicas para essa função, essa técnica foi escolhida neste estudo por se tratar de um método já estabelecido no Laboratório de Anaeróbios, previamente utilizada para espécies de *Bacteroides fragilis* e amplamente aceita na literatura (NAKANO *et al.*, 2007; SARMA *et al.*, 2000). É um método simples com excelente resolução desenvolvida por Williams *et al.* (1990) e Welsh e McClelland (1990) que através do auxílio do oligonucleotídeos de sequência aleatória tem o potencial de comparar cepas bacterianas. (WELSH; MCCLELLAND, 1990; WILLIAMS *et al.*, 1990).

Nesse estudo todas as cepas de *B. fragilis* testadas foram agrupadas com 96% de similiariedade, resultando na formação de 11 clusters. As cepas de referência *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, GAI 97124 e *Escherichia coli* ATCC 25922, foram agrupadas nos cluster I, IV e XI respectivamente. A distribuição das cepas no dendograma permitiu distinguir os isolados bacterianos analisados, sendo possível observar a presença de cepas clonais provenientes do mesmo paciente (cluster IA, V, XI e X) e também de pacientes distintos (cluster IB e IIA2).

Interessantemente não foi observado a formação de cluster com a presença de cepas provenientes de pacientes com câncer e sem câncer. Além disso o cluster IA agrupou a cepa de referência *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 (NTBF) juntamente com 3 cepas provenientes do paciente com câncer retal (R23) e o cluster IV, que foi subdividido em IVA e IVB, agrupou a cepa de referência GAI 97124 (ETBF) e a cepa R9C proveniente do paciente com câncer. Esse dados corroboram com os achados prévios mostrando alta diversidade entre as amostras avaliadas (NAKANO *et al.*, 2007; SARMA *et al.*, 2000).

Diversos fatores podem ter influenciado a variedade genética das cepas de *Bacteroides fragilis* nesse estudo, como o processo inflamatório intestinal presente nos pacientes com CR, as demais bactérias do trato intestinal, alimentação, exposição bacteriana domiciliar e/ou hospitalar e uso de antimicrobianos (HASAN, NIHAL; YANG, 2019).

Outra bactéria presente na microbiota comensal humana que pode desempenhar potencial patogênico via expressão de genes toxigênicos é a espécie *Clostridium perfringens*. (NAVARRO; MCCLANE; UZAL, 2018; UZAL, F. A., 2013). Essa bactéria possui a capacidade de produzir mais de 20 toxinas, incluindo a toxina: alfa, beta, epsilon, iota, NetB, BEC e também a enterotoxina (CPE). A presença ou ausência dessas toxinas permite a classificação das cepas de *Clostridium perfringens* em toxinotipos A-G (ROOD *et al.*, 2018).

Nossos resultados mostraram que 5 cepas de *C. perfringens* isoladas de paciente com câncer, abrigaram os genes *plc* e *netB* sendo considerados do tipo G, enquanto que 80 cepas isoladas de paciente com câncer e todos os isolados dos pacientes sem câncer, abrigaram apenas o gene *plc*, sendo classificados como tipo A. Sabe-se que, o toxinotipo A é observado comumente na microbiota intestinal de humanos (CARMAN *et al.*, 2008) e é responsável pela produção da gangrena

gasosa, enquanto que o tipo G esta relacionado com enterite necrótica em frangos (KEYBURN *et al.*, 2008).

As cepas de *C. perfringens* que abrigam o gene *netB*, são cepas que fazem parte do grupo de toxinas formadoras de poros, possuindo a capacidade de lisar a membrana celular de humanos e animais, o que pode levar a lise celular, contribuindo dessa forma para a virulência bacteriana (POPOFF, 2014; ROOD; KEYBURN; MOORE, 2016).

A nova classificação da toxinotipagem de *C. perfringens* foi realizada por Rood *et al.*, (2018), que incluíram 2 novos toxinotipos (F e G), através da presença ou ausência dos genes *cpe* (responsável pela intoxicação alimentar no homem) e *netB* (responsável pela enterite necrótica em frangos), que antes na classificação antiga (utilizada desde 1960) eram considerados do tipo A. Hoje através dessa atualização toxinotípica, é possível melhorar o valor epidemiológico e o diagnóstico, visto que essas duas toxinas causam doenças diferentes (ROOD *et al.*, 2018).

Clostridium perfringens produz também toxinas com elevado potencial virulento, como a toxina TpeL, associada principalmente a enterite necrótica em frangos; e em humanos ainda não existem relatos de patologias envolvidas com essa toxina. Das 25 amostras de pacientes com câncer analisadas, somente 4 abrigaram este gene. Interessantemente, nenhuma das cepas dos pacientes sem câncer abrigou esse gene. Isto pode sugerir, embora que parcialmente, que as cepas *tpeL* positivas possam ter alguma participação na gravidade no processo cancerígeno, visto que estudos já mostram que essa toxina em processo *in vitro*, possui a capacidade de modificar as proteínas oncogênicas RAS (SCHORCH *et al.*, 2018).

É importante ressaltar que outras toxinas como BecA/B que têm uma elevada participação nas gastroenterites agudas (YONOGI *et al.*, 2014), assim como os genes associados a síndrome hemorrágica em cães e a necrose enterocolítica em cavalos, os genes *netF* e *netG*, não foram observados em nenhum das cepas analisadas. Isto pode ser explicado, devido à especificidade desses genes nos respectivos processos em que eles participam (GOHARI *et al.*, 2015; SINDERN *et al.*, 2019). Das 85 cepas isoladas de pacientes com câncer, somente 6 abrigaram o gene *netE*. Segundo Gohari *et al.*, (2015) esse gene precisa realizar sinergismo com outras toxinas para ativar o seu efeito citotóxico. Nenhuma das 47 cepas de pacientes sem câncer abrigou esses genes.

Todas as cepas avaliadas nesse estudo de ambos os grupos, abrigaram os genes *nanI* e *nanJ* que mediam a produção das neuraminidases. Entretanto, nenhuma das cepas analisadas abrigaram o gene *nanH*. Isto pode indicar que a presença de um dos três genes é suficiente para que o microrganismo possa expressar a produção da enzima, o que corrobora com os achados em frangos com enterite necrótica de Llanco et al., (2015). As sialidades ou neuraminidases são produzidas por diversas bactérias, incluindo *C. perfringens*, e cumprem um papel importante na adesão bacteriana aos tecidos, principalmente, às células epiteliais intestinais (LI; MCCLANE, 2014).

A utilização da técnica PFGE (*Pulsed-field gel electrophoresis*), para determinar a diversidade genética das cepas toxigênicas de *C. perfringens* isoladas de pacientes com e sem câncer de reto, permitiu distinguir os isolados bacterianos analisados. Esta técnica é conhecida como padrão ouro para análise filogenética de bactérias, devido principalmente ao seu alto poder discriminatório e de reprodutibilidade, moderada interpretação dos resultados e grande desempenho (MAGALHÃES et al., 2016; MAGALHÃES et al., 2005).

Alguns estudos tem avaliado a diversidade genética de cepas de *C. perfringens* de humanos em surtos de intoxicação alimentar (FERREIRA et al., 2012; YADAV et al., 2018). É importante ressaltar que este trabalho é o primeiro a avaliar a diversidade de cepas de *C. perfringens* provenientes de amostras fecais de pacientes com câncer de reto.

Neste estudo, através da análise do gel, foi observado que dos 66 isolados de *C. perfringens*; 1 paciente apresentou 2 pulsotipos distintos; isso se deve possivelmente ao fato que essas cepas se encontram em nichos diferentes no próprio organismo (Figura 13). Por outro lado isolados de um mesmo paciente podem apresentar o mesmo pulsotipo, como pode ser observado na Figura 13.

Na análise do dendograma foi observada a presença de 30 pulsotipos (Figura 14) todos os pulsotipos apresentaram os genes para neuraminidase (*nanI*, *nanJ*) e não apresentaram os genes para a neuraminidase (*nanH*) bem como os genes responsáveis pelas toxinas formadoras de poros (gene *netF* e *netG*), toxina binária (*becA* e *becB*), as consideradas letais (*cpb*, *etx*, *cpj*), e a enterotoxina (*cpe*).

Pode-se evidenciar uma grande divergência entre os pulsotipos de *C. perfringens* provenientes de pacientes com câncer e sem câncer, esta observação é muito similar a outro estudo realizado por Warren et al., (2013) onde estudaram

Fusobacterium e *Campylobacter* e encontraram divergências genéticas dessas bactérias provenientes da cavidade oral em relação as provenientes de câncer colorretal (WARREN *et al.*, 2013).

Os resultados deste estudo mostraram que utilizando a técnica de PFGE pode-se encontrar uma grande diversidade de pulsotipos (30). Sendo importante ressaltar que as toxinas (*netB*, *netE* e *tpeL*) só foram encontradas em cepas provenientes de pacientes com câncer de reto. Entranto, mais estudo são necessários para comprovar a relação dessas toxinas e o papel delas com o câncer retal.

Pacientes com neoplasias colorretais podem desenvolver bacteremias (SHARMA; MADHUSUDHAN; AHUJA, 2016). As infecções sanguíneas são tipicamente infecções temporárias que podem ser tratadas com antibióticos adequados (CANZONERI *et al.*, 2017).

Segundo Wiggers *et al.*, (2016), as bacteremias podem ter origens em infecções endovasculares, extravasculares ou de origem desconhecida. A determinação da origem das infecções é fundamental para um correto diagnóstico e tratamento da bacteremia e origem da infecção (WIGGERS; XIONG; DANEMAN, 2016). Em pacientes com câncer de cólon e/ou reto pode haver a quebra da barreira intestinal devido à formação do tumor o que facilitaria a introdução de bactérias intestinais tais como: *E. coli*, *B. fragilis* e *C. perfringens* (DE CAMPOS *et al.*, 2013; FURTADO *et al.*, 2014).

Em nosso estudo, dois pacientes com câncer retal apresentaram bacteremia por bactérias anaeróbias (*B. fragilis*) e por bactérias facultativas (*E. coli* e *E. faecalis*), devido a coleta do material fecal ser realizada antes da realização do exame de colonoscopia foi descartada a possibilidade da bacteremia ser consequência da lesão gerada pelo procedimento (CASTRO *et al.*, 2017), indicando que essas bactérias foram capazes de infiltrar a corrente sanguínea via lesão tumoral. O teste quantitativo da PCR em tempo real mostrou que esses mesmos pacientes (PR01 e PR13) apresentaram positividade para o Grupo *B. fragilis*, apesar de poucas cópias; *E. coli* não foi detectada nessas amostras provavelmente pela baixa concentração e *E. faecalis* não foi avaliado. As demais amostras de sangue proveniente de pacientes com câncer ou sem câncer não apresentaram positividade para a detecção de bactéria intestinais ou orais. Sabe-se que o teste de PCR em

tempo real quantitativo é sensível e específico, contudo como qualquer teste analítico possui suas limitações e o limite de detecção é um deles.

Tjasma et al. (2012) propuseram um modelo denominado *driver-passenger* direcionado ao envolvimento microbiano no desenvolvimento e progressão do câncer colorretal. Este modelo consiste na presença de alguns microrganismos realizando o papel *driver*, os quais seriam encarregados de danificar o DNA das células epiteliais do cólon. Outro grupo de bactérias denominadas *passenger* se encarregaria de invadir e proliferar nesse microambiente criado pelas bactérias *driver*. Essas bactérias *passenger* iniciam a sua proliferação levando a redução ou desaparecimento das bactérias *driver* que iniciaram o processo neoplásico (TJALSMA et al., 2012).

Esses autores também indicam que, alguns microrganismos como, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis* enterotoxigênicos (ETBF) seriam candidatos fortes a serem considerados como microrganismos *driver*. Por outro lado, também mencionam que *Streptococcus gallolyticus* e *Fusobacterium nucleatum* (produtora da toxina FadA) seriam candidatas a serem consideradas bactérias *passenger* (TJALSMA et al., 2012).

É sabido que, a microbiota intestinal e oral é diversa e complexa. Abrangendo a possível associação de algumas bactérias predominantes da cavidade bucal no processos de câncer de cólon e reto (KOLIARAKIS et al., 2019), neste estudo investigou-se a presença de ambos os tipos bactérias. Das seis bactérias orais analisadas observou-se que: *Dialister pneumosintes* e *Fusobacterium nucleatum*, mostraram dados estatisticamente significativos entre os pacientes com e sem câncer. Esses resultados corroboram com a literatura, que mostra a possível participação de *F. nucleatum* no processo de câncer colorretal, e que cepas produtoras de adesinas FadA estariam fortemente implicadas nesses processos carcinogênicos (EKLÖF et al., 2017; STRAUSS et al., 2011), uma vez que ela se liga à E-caderina ativando β -catenina, estimulando assim o crescimento de células cancerígenas (RUBINSTEIN et al., 2013; YU et al., 2017). No nosso estudo não foi avaliada a presença da adesina FadA, porque não foi realizado o isolamento de *F. nucleatum*. Sua presença foi verificada nas fezes e tecido através de PCR quantitativo.

A presença de *D. pneumosintes* em valores significativos (Tabela 8), mostra que esse microrganismo da microbiota bucal, pode estar presentes em maior

quantidade no material fecal de pacientes sem câncer. Essa bactéria já foi positivamente correlacionada com o câncer oral (GALLIMIDI *et al.*, 2015) e gástrico (COKER *et al.*, 2018), até o momento não foi associada ao desenvolvimento de câncer retal.

Por outro lado, das nove bactérias intestinais avaliadas, somente o *Clostridioides difficile* não foi detectado nas amostras tecido e sangue de pacientes com e sem câncer. Entretanto, a análise da presença bacteriana nas fezes verificou um aumento do Filo *Bacteroidetes* e *Escherichia coli* nos pacientes com câncer de reto em comparação com os pacientes sem câncer de reto; o que com corrobora com os dados da literatura (GAO *et al.*, 2017; GAO *et al.*, 2015).

As espécies do filo *Bacteroidetes*, embora façam parte da microbiota oral, intestinal humana e genitourinária, possuem a capacidade de produzir compostos bioativos que podem ter efeitos cancerígenos, podendo levar ao desenvolvimento de câncer de colorretal (GAGNIÈRE *et al.*, 2016).

Neste estudo foi encontrado um aumento significativo da espécie *E. coli* nas amostras de fezes dos pacientes com câncer de reto quando comparados ao saudáveis. Essa bactéria possui a capacidade de produzir a colibactina, uma toxina que danifica o DNA, aumentando dessa forma a taxa de mutações de células infectadas (CUEVAS-RAMOS *et al.*, 2010; EKLÖF *et al.*, 2017). O aumento dessa espécie pode estar relacionado com o desenvolvimento da doença, visto que essa espécie é considerada uma bactéria *driver* (TJALSMA *et al.*, 2012).

Em corroboração com nossos resultados, Sobhani *et al.*, (2011) verificou diferença nos grupos *Bacteroides/Prevotella* nas amostras fecais dos pacientes com CCR quando comparadas aos sadios, e não verificou diferenças entre *Lactobacillus* e *E. coli* (SOBHANI *et al.*, 2011).

O lúmen e o tecido intestinal possuem microbiota diferentes (CHEN *et al.*, 2012). As bactérias e os seus compostos, presentes nesses ambientes, possuem uma relação direta com o hospedeiro. Chen *et al.*, (2012) observaram que a microbiota presente na mucosa intestinal tem a capacidade de interagir com o hospedeiro e com a microbiota fecal. Esse resultados corroboraram com a hipótese conhecida como “*Alpha-bug*” em que membros da microbiota associada à mucosa não são apenas pró-oncogênicos mas possuem a capacidade de modificar a microbiota fecal para conseguir a progressão do câncer de colorretal (SEARS; PARDOLL, 2011).

Yoon et al. (2017), compararam amostras de tecido saudável de pacientes sem câncer e tecido sadios adjacentes de tumor de reto, de pacientes com adenoma serrilhado séssil, câncer colorretal e neoplasia avançada colorretal. Entretanto, devido à grande variabilidade dos dados, nenhuma associação entre a composição bacteriana dos tecidos e o câncer foi determinada (YOON *et al.*, 2017).

No nosso estudo através das análises da mucosa, observamos diferenças estatisticamente significativa somente no *Clostridium* Cluster I que apresentou maior abundância no tecido adjacente ao tumor quando comparado ao tecido dos pacientes sem câncer. *Clostridium* Cluster I é grupo numeroso de *Clostridium* spp. classificados em termos filogenéticos, e algumas bactérias patogênicas fazem parte deste cluster como: *C. tetani*, *C. botulinum* e *C. perfringens* (DOHRMANN *et al.*, 2015). Foi avaliado também a quantificação da espécie *C. perfringens*, porém não foi verificada diferença estatística entre os grupos.

Foi verificado aumento do Filo *Bacteroidetes*, *Lactobacillus* spp. e *Escherichia coli*, nos tecidos dos pacientes saudáveis em comparação com o tecido adjacente ao tumor. *Lactobacillus* spp. é considerada uma bactéria com associação negativa com o desenvolvimento de câncer (CHOI *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2019), entretanto o Filo *Bacteroidetes* e *Escherichia coli* estão associados com processos inflamatórios e tumorais (LIU *et al.*, 2019; SWIDSINSKI *et al.*, 1998), porém fazem parte da microbiota comensal de humanos e animais (RINNINELLA *et al.*, 2019).

Na comparação do tecido tumoral com o tecido sadio dos pacientes sem câncer verificou-se um aumento do Filo *Firmicutes* e a espécie *Porphyromonas gingivalis* no tecido tumoral, esses resultados não corroboram com estudos prévios em câncer colorretal, onde o tecido não comprometido apresentou maior prevalência do que o tecido tumoral (GAO *et al.*, 2015).

Normalmente os estudos têm investigado a microbiota do tecido de lesões tumorais, comparando com as bactérias teciduais de pacientes saudáveis (PAGNINI *et al.*, 2011). Entretanto, este tipo de análise não considera a individualidade microbiana de cada hospedeiro, sendo necessário avaliar o respectivo tecido tumoral juntamente com o tecido sadio adjacente a essa região (SOBHANI *et al.*, 2013).

Estudos têm investigado a microbiota de tecidos tumorais e tecidos sadios adjacentes a esses tumores; corroborando com nossos resultados, têm sido observado que bactérias do Filo *Firmicutes* participam dos processos tumorais de

câncer de cólon e reto, enquanto que, nos sítios sadios desses pacientes, essas bactérias estão ausentes ou em menor quantidade (GAO *et al.*, 2015; PAGNINI *et al.*, 2011).

Recentemente Wassenaar (2018), apresentou a hipótese que algumas bactérias como *Escherichia coli* colonizam preferencialmente tecidos lesionados e tumorais, não sendo considerados necessariamente a causa da lesão (WASSENAAR, 2018).

Verificou-se também um aumento de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* no tecido tumoral em comparação com o tecido adjacente. Essa bactéria pode secretar diversas toxinas (MILELLA, 2015), que influenciam no desenvolvimento da resistência a insulina, acúmulo de gordura no fígado (KOMAZAKI *et al.*, 2017), e lesionar células teciduais, além de já ter sido associada com câncer pancreático (FAN *et al.*, 2018).

Foi detectado que existe colonização do ecossistema intestinal por bactérias orais e intestinais, indicando uma possível convivência harmônica entre ambos os grupos de bactérias, e não pode ser descartada a possível associação sinérgica entre esses microrganismos; entretanto, esta hipótese necessita de maiores estudos para melhor esclarecimento da sua participação no trato gastrointestinal.

Nossos resultados evidenciaram a diversidade bacteriana presente nos diferentes materiais clínicos derivados de pacientes com e sem carcinoma retal, correlação pouco abordada na literatura. Assim, a compreensão da presença de determinadas bactérias e suas associações com o câncer retal, podem ser fundamentais para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas baseadas no controle dos microrganismos envolvidos nesses processos.

7. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos neste estudo permite-se concluir que:

- Pacientes com câncer de reto apresentaram maior idade média que os pacientes sem câncer de reto;
- Os isolados de *Clostridium perfringens* das amostras de fezes analisadas, apresentaram toxinotipo A e G; e a presença de cepas albergando genes das toxinas TpeL, NetB e NetE foi verificada apenas nos isolados de pacientes com câncer;
- Verificou-se a alta diversidade genética dos isolados de *Clostridium perfringens* e *Bacteroides fragilis*;
- A bacteremia foi observada em dois pacientes com câncer de reto;
- Na análise quantitativa utilizando o qPCR:
 - Nas amostras fecais foi possível verificar diferença estatística no Filo *Bacteroidetes*, *Escherichia coli*, *Dialister pneumosintes* e *Fusobacterium nucleatum*;
 - Na comparação dos tecidos saudáveis do paciente com câncer (adjacente) e do paciente sem câncer, houve diferença estatística no Filo *Bacteroidetes*; *Clostridium* Cluster I, *Lactobacillus* spp. e *Escherichia coli*;
 - Já em relação ao tecido tumoral comparado com o tecido sadio dos pacientes sem câncer, foi observado diferença estatística no Filo *Firmicutes* e *Porphyromonas gingivalis*;
 - No tecido tumoral com o tecido adjacente do paciente com câncer foi possível verificar diferença estatística no Filo *Firmicutes*, *Clostridium* Cluster I, *Lactobacillus* spp., *Escherichia coli* e *A. actinomycetemcomitans*;
 - Em duas amostras de sangue de pacientes com câncer retal (os mesmos da hemocultura positiva) foi verificada a presença de bactérias do Grupo *B. fragilis* em baixa concentração. E nas demais amostras de ambos os grupos selecionados não foi detectado nenhum microrganismo avaliado nesse estudo.

Resumindo, o câncer de reto é uma patologia multifatorial e a influência das bactérias da microbiota fecal nesse quadro parece ser portador dependente. São necessários mais estudos para clarificar o real papel desses microrganismos no desenvolvimento, manutenção ou agravamento dessa doença.

REFERÊNCIAS

- AAGAARD; MA; ANTONY; et al. The placenta harbors a unique microbiome. **Science Translational Medicine**, v. 6, 2014.
- ABU-GHAZALEH; CHUA; GOPALAN. Intestinal microbiota and its association with colon cancer and red/processed meat consumption. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, 2020.
- AHN; SEGERS; HAYES. Periodontal disease, Porphyromonas gingivalis serum antibody levels and orodigestive cancer mortality. **Carcinogenesis**, 2012.
- ALBENBERG; ESIPOVA; JUDGE; et al. Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota. **Gastroenterology**, v. 147, p. 1055- 1063.e8, 2014.
- ALBERTS; JOHNSON; LEWIS; et al. **Biologia Molecular da Célula 6th**, 2017.
- ALVES; PERES; GONÇALVES; et al. Anaerobic bacteria with clinical relevance: morphologic and taxonomic classification, distribution among human microbiota and microbiologic diagnosis. **Acta Medica Portuguesa**, 2017.
- Anaerobic Bacteria in Human Disease. **Annals of Internal Medicine**, v. 87, p. 501, 1977.
- ANTONIO HERNÁNDEZ-LUNA; LAGUNES-SERVIN; LOPEZ-BRIONES. The Role of Escherichia coli in the Development and Progression of Cancer. **ARC Journal of Cancer Science**, v. 3, n. 1, p. 2455–6009, 2016.
- ARRIETA; STIEMSMA; AMENYOGBE; et al. **The intestinal microbiome in early life: Health and disease. Frontiers in Immunology** 2014.
- ARTHUR; PEREZ-CHANONA; MÜHLBAUER; et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. **Science**, v. 338, p. 120–123, 2012.
- AVILA-CAMPOS; LIU; SONG; et al. Determination of bft gene subtypes in Bacteroides fragilis clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, 2007.
- BAKER; CHASE; HERBST-KRALOVETZ. **Uterine microbiota: Residents, tourists, or invaders? Frontiers in Immunology** 2018.
- BAKTHAVATCHALU; WERT; FENG; et al. Cytotoxic Escherichia coli strains encoding colibactin isolated from immunocompromised mice with urosepsis and meningitis. **PLoS ONE**, v. 13, 2018.
- BALAGAMWALA; AMARNATH. Rectal Cancer. **Essentials of Clinical Radiation Oncology**, 2018.
- BARDOU; BARKUN; MARTEL. Obesity and colorectal cancer. **Gut**, v. 62, p. 933–947, 2013.
- BEDANI; PAULY-SILVEIRA; ROSELINO; et al. Effect of fermented soy product on the fecal microbiota of rats fed on a beef-based animal diet. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2010.
- BELKAID; NAIK. **Compartmentalized and systemic control of tissue immunity by commensals. Nature Immunology** 2013.
- BENSON; VENOOK; AL-HAWARY; et al. Rectal cancer, version 2.2018 clinical practice guidelines in Oncology. **JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, 2018.
- BINGHAM. High-meat diets and cancer risk. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 58, p. 243–248, 1999.

- BISCHOFF. "Gut health": A new objective in medicine? **BMC Medicine**, 2011.
- BLACHER; LEVY; TATIROVSKY; et al. Microbiome-Modulated Metabolites at the Interface of Host Immunity. **The Journal of Immunology**, 2017.
- BLATTNER. **Human retroviruses: Their role in cancer. Proceedings of the Association of American Physicians** 1999.
- BOLAND; GOEL. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. **Gastroenterology**, v. 138, 2010.
- BOLEIJ; HECHENBLEIKNER; GOODWIN; et al. The bacteroides fragilis toxin gene is prevalent in the colon mucosa of colorectal cancer patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, p. 208–215, 2015.
- BOTTERI; IODICE; BAGNARDI; et al. **Smoking and colorectal cancer: A meta-analysis. JAMA - Journal of the American Medical Association** 2008.
- BOUTRON-ROUAULT; MESRINE; PIERRE. Meat Consumption and Health Outcomes. *In: Vegetarian and Plant-Based Diets in Health and Disease Prevention*, p. 197–214
- BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM; et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, p. 394–424, 2018.
- BRENNER; KLOOR; POX. Colorectal cancer. *In: THE LANCET* 2014.
- BRÜCHER; JAMALL. Epistemology of the origin of cancer: A new paradigm. **BMC Cancer**, v. 14, 2014.
- CAI; LI; DING; et al. Alcohol drinking and the risk of colorectal cancer death: A meta-analysis. **European Journal of Cancer Prevention**, 2014.
- CANI; AMAR; IGLESIAS; et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, p. 1761–1772, 2007.
- CANZONERI; AKHAVAN; TOSUR; et al. Follow-up Blood Cultures in Gram-Negative Bacteremia: Are They Needed? **Clinical Infectious Diseases**, 2017.
- CARETHERS; JUNG. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. **Gastroenterology**, v. 149, p. 1177- 1190.e3, 2015.
- CARMAN; SAYEED; LI; et al. Clostridium perfringens toxin genotypes in the feces of healthy North Americans. **Anaerobe**, 2008.
- CARR; WEIGL; JANSEN; et al. Healthy Lifestyle Factors Associated With Lower Risk of Colorectal Cancer Irrespective of Genetic Risk. **Gastroenterology**, v. 155, p. 1805- 1815.e5, 2018.
- CASTRO; FREIRE ALBERCA; FREIRE; et al. Bloodstream Infection due to Bacterial Co-Infection in Patients with Rectal Carcinoma: Report of Two Cases. **Colorectal Cancer: Open Access**, 2017.
- CERATO; CERATO; MEURER; et al. Variabilidade interobservador no diagnóstico histológico dos pólipos colorretais. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 27, p. 7–15, 2007.
- CHEN; LIU; LING; et al. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. **PLoS ONE**, 2012.
- CHEN; MCCLANE. Characterization of clostridium perfringens TpeL toxin gene carriage, production, cytotoxic contributions, and trypsin sensitivity. **Infection and Immunity**, 2015.
- CHEN; VAN MEERBEKE; ALBESIANO; et al. Fecal detection of enterotoxigenic Bacteroides fragilis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, 2015.

CHO; SMITH-WARNER; RITZ; et al. Alcohol Intake and Colorectal Cancer: A Pooled Analysis of 8 Cohort Studies. **Annals of Internal Medicine**, 2004.

CHOI; KIM; HAN; et al. Effects of Lactobacillus strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro. **Letters in Applied Microbiology**, 2006.

CHU; MA; PRINCE; et al. Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. **Nature Medicine**, 2017.

CHUNG; THIELE ORBERG; GEIS; et al. Bacteroides fragilis Toxin Coordinates a Pro-carcinogenic Inflammatory Cascade via Targeting of Colonic Epithelial Cells. **Cell Host and Microbe**, 2018.

CIANCHI; CORTESINI; FANTAPPIÈ; et al. Cyclooxygenase-2 Activation Mediates the Proangiogenic Effect of Nitric Oxide in Colorectal Cancer. **Clinical Cancer Research**, 2004.

CIHAN; YALCIN; MECITOGLU; et al. Outbreak of malignant oedema in sheep following vaccination with a multivalent clostridial bacterin-toxoid. **Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Großtiere / Nutztiere**, 2010.

CIMOLAI. Anaerobic infections. *In*: **Laboratory Diagnosis of Bacterial Infections**. CRC Press, p. 705–746, 2001.

CLEMENTE; URSELL; PARFREY; et al. **The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view. Cell** 2012.

COKER; DAI; NIE; et al. Mucosal microbiome dysbiosis in gastric carcinogenesis. **Gut**, 2018.

COLLINS; LAWSON; WILLEMS; et al. The phylogeny of the genus Clostridium: Proposal of five new genera and eleven new species combinations. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 1994.

CONLIN; SMITH; CAREY; et al. The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. **Gut**, v. 54, p. 1283–1286, 2005.

CONLON; BIRD. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. **Nutrients** 2015.

COURA; ASHTON-PROLLA; PROLLA. Hereditary non-polipomatous colorectal cancer: Hereditary predisposition, diagnosis and prevention. **Arquivos de Gastroenterologia**, 2005.

CROSBIE; EINSTEIN; FRANCESCHI; et al. Human papillomavirus and cervical cancer. **The Lancet** 2013.

CUEVAS-RAMOS; PETIT; MARCQ; et al. Escherichia coli induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2010.

DA SILVA; WERNHOFF; DOMINGUEZ-BARRERA; et al. Update on hereditary colorectal cancer. **Anticancer Research** 2016.

DE ALMEIDA; LEITAO; REINA; et al. Cancer and cell cycle-specific and cell cycle nonspecific anticancer DNA-interactive agents: An introduction. **Quimica Nova**, 2005.

DE CAMPOS; SOUZA; DA SILVA; et al. Resistência antimicrobiana em Enterococcus faecalis e Enterococcus faecium isolados de carcaças de frango. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 5, p. 575–580, 2013.

DE MARCHIS; TONELLI; QUARESMINI; et al. Desmoid tumors in familial adenomatous polyposis. **Anticancer Research** 2017.

DE VOGEL; DINDORE; VAN ENGELAND; et al. Dietary Folate, Methionine, Riboflavin, and Vitamin

B-6 and Risk of Sporadic Colorectal Cancer. **The Journal of Nutrition**, 2008.

DE VOS; GARRITY; JONES; et al. Bergey's manual of systematic bacteriology Volume Three The Firmicutes, 2009.

DEBERARDINIS; LUM; HATZIVASSILIOU; et al. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. **Cell Metabolism** 2008.

DEKKER; TANIS; VLEUGELS; et al. Colorectal cancer. **The Lancet** 2019.

DENG. Rectal Cancer in Asian vs. Western Countries: Why the Variation in Incidence? **Current Treatment Options in Oncology** 2017.

DENG; LI; TAN; et al. A novel strain of *Bacteroides fragilis* enhances phagocytosis and polarises M1 macrophages. **Scientific Reports**, 2016.

DENIPOTE; TRINDADE; BURINI. [Probiotics and prebiotics in primary care for colon cancer]. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 47, n. 1, p. 93–98, 2010.

DESTEFANO SHIELDS; VAN MEERBEKE; HOUSSEAU; et al. Reduction of Murine Colon Tumorigenesis Driven by Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* Using Cefoxitin Treatment. **Journal of Infectious Diseases**, 2016.

DEWHIRST; CHEN; IZARD; et al. The human oral microbiome. **Journal of Bacteriology**, v. 192, p. 5002–5017, 2010.

DI DOMENICO; CAVALLO; PONTONE; et al. Biofilm producing *Salmonella typhi*: Chronic colonization and development of gallbladder cancer. **International Journal of Molecular Sciences** 2017.

DIGIULIO; ROMERO; AMOGAN; et al. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: A molecular and culture-based investigation. **PLoS ONE**, v. 3, 2008.

DINO; D'ANNA; SANGIORGI; et al. Cigarette smoke extract modulates E-Cadherin, Claudin-1 and miR-21 and promotes cancer invasiveness in human colorectal adenocarcinoma cells. **Toxicology Letters**, 2019.

DOHRMANN; WALZ; LÖWEN; et al. Clostridium cluster I and their pathogenic members in a full-scale operating biogas plant. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2015.

DOMINGUEZ-BELLO; BLASER; LEY; et al. Development of the human gastrointestinal microbiota and insights from high-throughput sequencing. **Gastroenterology**, v. 140, p. 1713–1719, 2011.

DRELL; ŠTŠEPETOVA; SIMM; et al. The Influence of Different Maternal Microbial Communities on the Development of Infant Gut and Oral Microbiota. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

DULAL; KEKU. Gut microbiome and colorectal adenomas. **Cancer Journal (United States)** 2014.

EGGERT. The Biology of Cancer: What Do Oncology Nurses Really Need to Know. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 27, p. 3–12, 2011.

EKLÖF; LÖFGREN-BURSTRÖM; ZINGMARK; et al. Cancer-associated fecal microbial markers in colorectal cancer detection. **International Journal of Cancer**, 2017.

ELINAV; NOWARSKI; THAISS; et al. Inflammation-induced cancer: Crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. **Nature Reviews Cancer** 2013.

FAÏS; DELMAS; BARNICH; et al. Colibactin: More than a new bacterial toxin. **Toxins** 2018.

FALLANI; AMARRI; UUSIJARVI; et al. Determinants of the human infant intestinal microbiota after the

introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres. **Microbiology**, v. 157, p. 1385–1392, 2011.

FAN; ALEKSEYENKO; WU; et al. Human oral microbiome and prospective risk for pancreatic cancer: A population-based nested case-control study. **Gut**, 2018.

FANG; KLUG; ORTIZ; et al. Correlation between rectal sensitivity and anorectal inhibitory reflex with defecography in the functional evaluation of acquired megacolon. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, 2008.

FARAN ALI; TANWIR. Oral microbial habitat a dynamic entity. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research** 2012.

FAZELI; KERAMATI. Rectal cancer: A review. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran* 2015.

FERLAY; COLOMBET; SOERJOMATARAM; et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer* 2019.

FERREIRA-HALDER; FARIA; ANDRADE. Action and function of *Faecalibacterium prausnitzii* in health and disease. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology** 2017.

FERREIRA; MORENO; ALMEIDA; et al. Molecular typing of *Clostridium perfringens* isolated from swine in slaughterhouses from São Paulo State, Brazil. **Ciência Rural**, 2012.

FLEMING; RAVULA; TATISHCHEV; et al. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. **Journal of Gastrointestinal Oncology** 2012.

FRATTINI; BALESTRA; SUARDI; et al. Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 4015–4021, 2004.

FREEDMAN; MCCLANE; UZAL. New insights into *Clostridium perfringens* epsilon toxin activation and action on the brain during enterotoxemia. **Anaerobe**, 2016.

FREEDMAN; SHRESTHA; MCCLANE. *Clostridium perfringens* enterotoxin: Action, genetics, and translational applications. **Toxins** 2016.

FURTADO; XAVIER; TAVARES; et al. *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in blood of newborns with suspected nosocomial infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 2014.

GAGNIÈRE; RAISCH; VEZIANI; et al. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology** 2016.

GALLIMIDI; FISCHMAN; REVACH; et al. Periodontal pathogens *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* promote tumor progression in an oral-specific chemical carcinogenesis model. **Oncotarget**, 2015.

GAO; GAO; HUANG; et al. **Gut microbiota and colorectal cancer. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases** 2017.

GAO; GUO; GAO; et al. Microbiota dysbiosis is associated with colorectal cancer. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. February, p. 1–9, 2015.

GARRETT. Cancer and the microbiota. **Science (New York, N.Y.)** 2015.

GOHARI; PARREIRA; NOWELL; et al. A novel pore-forming toxin in type A *Clostridium perfringens* is associated with both fatal canine hemorrhagic gastroenteritis and fatal foal necrotizing enterocolitis. **PLoS ONE**, 2015.

GOMES; MALCATA. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: Biological, biochemical,

technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, 1999.

GOMEZ; NELSON. The Oral Microbiome of Children: Development, Disease, and Implications Beyond Oral Health. **Microbial Ecology** 2017.

GONÇALVES; MARTEL. Butyrate and Colorectal Cancer: The Role of Butyrate Transport. **Current Drug Metabolism**, v. 14, p. 994–1008, 2013.

GRASS; GOULD; MAHON. Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by clostridium perfringens, United States, 1998-2010. **Foodborne Pathogens and Disease**, 2013.

GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell** 2010.

GU; WANG; WEI; et al. Diagnosis and treatment of Gardner syndrome with gastric polyposis: A case report and review of the literature. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, p. 2121–2123, 2008.

GUPTA; GAO. Phylogenomic analyses of clostridia and identification of novel protein signatures that are specific to the genus *Clostridium sensu stricto* (cluster I). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2009.

HAN; IKEGAMI; RAJANNA; et al. Identification and characterization of a novel adhesin unique to oral fusobacteria. **Journal of Bacteriology**, 2005.

HAN; KIM; PARK; et al. Location of rectal cancer as determined using rectal magnetic resonance imaging, and its relationship with pulmonary metastasis. **Turkish Journal of Gastroenterology**, v. 25, p. 661–668, 2014.

HAN; WANG. Mobile microbiome: Oral bacteria in extra-oral infections and inflammation. **Journal of Dental Research** 2013.

HARKNESS; LI; MCCLANE. Identification of a lambda toxin-negative *Clostridium perfringens* strain that processes and activates epsilon prototoxin intracellularly. **Anaerobe**, 2012.

HARNACK; JACOBS; NICODEMUS; et al. Relationship of folate, vitamin B-6, vitamin B-12, and methionine intake to incidence of colorectal cancers. **Nutrition and Cancer**, 2002.

HASAN; POLLACK; CHO. Infectious Causes of Colorectal Cancer. **Infectious Disease Clinics of North America** 2010.

HASAN; YANG. Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. **PeerJ**, 2019.

HECHT. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. **Journal of the National Cancer Institute** 1999.

HECHT. Lung carcinogenesis by tobacco smoke. **International Journal of Cancer**, 2012.

HEINTZ-BUSCHART; WILMES. Human Gut Microbiome: Function Matters. **Trends in Microbiology** 2018

HELMINK; KHAN; HERMANN; et al. The microbiome, cancer, and cancer therapy. **Nature Medicine** 2019.

HENTGES. **Anaerobes: General Characteristics**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21413255>>.

HO; WANG; GUNTER; et al. Adipokines linking obesity with colorectal cancer risk in postmenopausal women. **Cancer Research**, v. 72, p. 3029–3037, 2012.

HOLDEMAN; CATO; MOORE. **Anaerobe Laboratory manual**. 4th ed. v.1, Blacksburg: The Laboratory, 1977.

HOLGERSON; ÖHMAN; RÖNNLUND; et al. Maturation of oral microbiota in children with or without dental caries. **PLoS ONE**, 2015.

HOLMES; CHEW; COLAKOGLU; et al. Diet-Microbiome Interactions in Health Are Controlled by Intestinal Nitrogen Source Constraints. **Cell Metabolism**, 2017.

HOLMES; LI; MARCHESI; et al. Gut microbiota composition and activity in relation to host metabolic phenotype and disease risk. **Cell Metabolism** 2012.

HORNEF; PENDERS. Does a prenatal bacterial microbiota exist? **Mucosal Immunology** 2017.

HOTZE; TWETEN. Membrane assembly of the cholesterol-dependent cytolysin pore complex. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, 2012.

HOUSSEAU; SEARS. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF)-mediated colitis in Min (Apc^{+/-}) mice: A human commensal-based murine model of colon carcinogenesis. **Cell Cycle** 2010.

HUANG. Bacterial colonization and intestinal mucosal barrier development. **World Journal of Clinical Pediatrics**, v. 2, p. 46, 2013.

HUANG; FAN; WANG; et al. Identification of helicobacter species in human liver samples from patients with primary hepatocellular carcinoma. **Journal of Clinical Pathology**, 2004.

HUANG; LEE; MAZMANIAN. The human commensal *Bacteroides fragilis* binds intestinal mucin. **Anaerobe**, 2011.

HUANG; MARS LAND; BUNYAVANICH; et al. The microbiome in allergic disease: Current understanding and future opportunities PRACTALL document of the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology and the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2017.

HUNTER; BROWN; OYSTON; et al. Molecular genetic analysis of beta-toxin of *Clostridium perfringens* reveals sequence homology with alpha-toxin, gamma-toxin, and leukocidin of *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, 1993.

HUSE; YE; ZHOU; et al. A core human microbiome as viewed through 16S rRNA sequence clusters. **PLoS ONE**, 2012.

HUYCKE; GASKIN. Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: Mechanisms and models. **Experimental Biology and Medicine** 2004.

IACOPETTA. Are there two sides to colorectal cancer? **International Journal of Cancer** 2002.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estatísticas de câncer | INCA - Instituto Nacional de Câncer**. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de e Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância-Rio de Janeiro.. **INCA**, p. 1–130, 2018.

JAHANI-SHERAFAT; ALEBOUYEH; MOGHIM; et al. Role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer; A review article. **Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench** 2018.

JANDHYALA; TALUKDAR; SUBRAMANYAM; et al. Role of the normal gut microbiota. **World Journal of Gastroenterology**, 2015.

JASPERSON; TUOHY; NEKLASON; et al. Hereditary and Familial Colon Cancer

GASTROENTEROLOGY. **Gastroenterology**, v. 138, p. 2044–2058, 2010.

JEWELL; TITBALL; HUYET; et al. Clostridium perfringens α -toxin interaction with red cells and model membranes. **Soft Matter**, 2015.

JIMÉNEZ; FERNÁNDEZ; MARÍN; et al. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. **Current Microbiology**, v. 51, p. 270–274, 2005.

JOHNSON; HUG. Distribution of reactive oxygen species defense mechanisms across domain bacteria. **Free Radical Biology and Medicine** 2019.

JUGE; TAILFORD; OWEN. Sialidases from gut bacteria: A mini-review. **Biochemical Society Transactions**, 2016.

JUNIOR; SILVA; LOBATO; et al. Gas gangrene in mammals: a review. **Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 32, n. 2, 2020.

KALLUS; BRANDT. The intestinal microbiota and obesity. **Journal of Clinical Gastroenterology** 2012.

KATO; LIU; KATO; et al. A new subtype of the metalloprotease toxin gene and the incidence of the three bft subtypes among Bacteroides fragilis isolates in Japan. **FEMS Microbiology Letters**, v. 182, p. 171–176, 2000.

KAWAHARA; YONOOGI; MUNETOMO; et al. Crystal structure of the ADP-ribosylating component of BEC, the binary enterotoxin of Clostridium perfringens. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2016.

KEENAN; AITCHISON; PEARSON; et al. Detection of the Bacteroides fragilis toxin gene in sheep with and without small intestinal adenocarcinoma. **New Zealand Veterinary Journal**, 2019.

KEYBURN; BANNAM; MOORE; et al. NetB, a Pore-Forming Toxin from Necrotic Enteritis Strains of Clostridium Perfringens. **Toxins**, v. 2, p. 1913–1927, 2010.

KEYBURN; BOYCE; VAZ; et al. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by Clostridium perfringens. **PLoS Pathogens**, 2008.

KIU; HALL. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. **Emerging Microbes and Infections** 2018.

KOLENBRANDER; PALMER; PERIASAMY; et al. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. **Nature Reviews Microbiology** 2010.

KOLIARAKIS; MESSARITAKIS; NIKOLOUZAKIS; et al. Oral bacteria and intestinal dysbiosis in colorectal cancer. **International Journal of Molecular Sciences** 2019.

KOMAZAKI; KATAGIRI; TAKAHASHI; et al. Periodontal pathogenic bacteria, Aggregatibacter actinomycetemcomitans affect non-alcoholic fatty liver disease by altering gut microbiota and glucose metabolism. **Scientific Reports**, 2017.

KOSTIC; GEVERS; PEDAMALLU; et al. Genomic analysis identifies association of Fusobacterium with colorectal carcinoma. **Genome Research**, 2012.

KRAVOCHUCK; CHURCH. Hereditary non-polyposis colorectal cancer/Lynch syndrome in three dimensions. **ANZ Journal of Surgery**, v. 87, p. 1006–1010, 2017.

KUNE; WATSON. Colorectal cancer protective effects and the dietary micronutrients folate, methionine, vitamins B6, B12, C, E, selenium, and lycopene. **Nutrition and Cancer**, 2006.

LANGE; DEN DULK; BOSSEMA; et al. Risk factors for faecal incontinence after rectal cancer treatment. **British Journal of Surgery**, v. 94, p. 1278–1284, 2007.

LANGFELDT; NEULINGER; HEUER; et al. Composition of microbial oral biofilms during maturation in young healthy adults. **PLoS ONE**, v. 9, 2014.

LAO; GRADY. Epigenetics and colorectal cancer. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology** 2011.

LAUBY-SECRETAN; DOSSUS; MARANT-MICALLEF; et al. Obesity and Cancer. **Bulletin du Cancer** 2019.

LAUBY-SECRETAN; SCOCCIANI; LOOMIS; et al. Body fatness and cancer - Viewpoint of the IARC working group. **New England Journal of Medicine** 2016.

LE CHATELIER; NIELSEN; QIN; et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. **Nature**, v. 500, p. 541–546, 2013.

LEE; LEE; KIM; et al. Characterization of the anti-cancer activity of the probiotic bacterium *Lactobacillus fermentum* using 2D vs. 3D culture in colorectal cancer cells. **Biomolecules**, 2019.

LEY; TURNBAUGH; KLEIN; et al. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. **Nature**, 2006.

LI; MCCLANE. Contributions of NanI sialidase to Caco-2 cell adherence by *Clostridium perfringens* type A and C strains causing human intestinal disease. **Infection and Immunity**, 2014.

LI; MIYAMOTO; MCCLANE. Comparison of virulence plasmids among *Clostridium perfringens* type E isolates. **Infection and Immunity**, 2007.

LI; MIYAMOTO; SAYEED; et al. Organization of the cpe locus in CPE-positive *Clostridium perfringens* type C and D isolates. **PLoS ONE**, 2010.

LITTMAN; PAMER. Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses. **Cell Host and Microbe** 2011.

LIU; HUANG; LIAO; et al. Increasing trends in antimicrobial resistance among clinically important anaerobes and *Bacteroides fragilis* isolates causing nosocomial infections: Emerging resistance to carbapenems. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2008.

LIU; LI; GUAN; et al. Dysbiosis of the gut microbiome is associated with tumor biomarkers in lung cancer. **International Journal of Biological Sciences**, 2019.

LIU; NICOLAIDES; MARKOWITZ; et al. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. **Nature Genetics**, v. 9, p. 48–55, 1995.

LIU; ZHANG; SHANG; et al. Intestinal bacteria detected in cancer and adjacent tissue from patients with colorectal cancer. **Oncology Letters**, v. 17, p. 1115–1127, 2019.

LLANCO; NAKANO; AVILA-CAMPOS. Sialidase production and genetic diversity in *Clostridium perfringens* type a isolated from chicken with necrotic enteritis in Brazil. **Current Microbiology**, 2014.

LLANCO; NAKANO; MORAES; et al. Adhesion and invasion of *Clostridium perfringens* type A into epithelial cells. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2017.

LOSSO; MORAES; GENTILI; et al. Instabilidade de microssatélite - MSI nos marcadores (BAT26, BAT25, D2s123, D5S346, D17S250) no câncer de reto. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 25, p. 240–244, 2012.

LOUIS; HOLD; FLINT. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. **Nature**

Reviews Microbiology 2014.

LUCAS; BARNICH; NGUYEN. Microbiota, inflammation and colorectal cancer. **International Journal of Molecular Sciences** 2017.

LYNCH; LYNCH; LYNCH. Toward a consensus in molecular diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch Syndrome). **Journal of the National Cancer Institute**, v. 99, p. 261–263, 2007.

MA; YANG; WANG; et al. Obesity and Risk of Colorectal Cancer: A Systematic Review of Prospective Studies. **PLoS ONE** 2013.

MAGALHÃES; FERREIRA; BARELLI; et al. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica Pulsed field gel electrophoresis use in bacteriology – a technical review. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, 2005.

MAGALHÃES; PONTES; SERRA; et al. Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* survey in a stream receiving effluents from ineffective wastewater hospital plants. **BMC Microbiology**, 2016.

MAINIL. *Escherichia coli* virulence factors. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 2013.

MAO; PARK; HASEGAWA; et al. Intrinsic apoptotic pathways of gingival epithelial cells modulated by *Porphyromonas gingivalis*. **Cellular Microbiology**, 2007.

MATAMOROS; GRAS-LEGUEN; LE VACON; et al. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. **Trends in Microbiology** 2013.

MATSUDA; OKADA; INAGI; et al. Enteritis necroticans “pigbel” in a Japanese diabetic adult. **Pathology International**, 2007.

MCCOY; ARAÚJO-PÉREZ; AZCÁRATE-PERIL; et al. *Fusobacterium* Is Associated with Colorectal Adenomas. **PLoS ONE**, 2013.

MCGARR; RIDLON; HYLEMON. Diet, anaerobic bacterial metabolism, and colon cancer: A review of the literature. **Journal of Clinical Gastroenterology** 2005.

MICHOR; IWASA; NOWAK. **Dynamics of cancer progression. Nature Reviews Cancer** 2004

MILELLA. The negative effects of volatile sulphur compounds. **Journal of Veterinary Dentistry**, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Abc Do Câncer**, 2013.

MIYAKI; YAMAGUCHI; IJIMA; et al. Difference in characteristics of APC mutations between colonic and extracolonic tumors of FAP patients: Variations with phenotype. **International Journal of Cancer**, v. 122, p. 2491–2497, 2008.

NAKANO; GOMES; VIEIRA; et al. bft gene subtyping in enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* isolated from children with acute diarrhea. **Anaerobe**, v. 13, p. 1–5, 2007.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **Cancer Statistics - National Cancer InstituteNIH.Gov**, 2017. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>>.

NAVARRO; MCCLANE; UZAL. Mechanisms of action and cell death associated with *Clostridium perfringens* toxins. **Toxins** 2018.

NELSON-FILHO; BORBA; DE MESQUITA; et al. Dynamics of microbial colonization of the oral cavity in newborns. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, p. 415–419, 2013.

NIBBE; CHANCE. Approaches to biomarkers in human colorectal cancer: Looking back, to go

forward. **Biomarkers in Medicine** 2009.

NUNEZ; NAIR-SHALLIKER; EGGER; et al. Physical activity, obesity and sedentary behaviour and the risks of colon and rectal cancers in the 45 and up study. **BMC Public Health**, v. 18, 2018.

OBISO, JR.; BEVAN; WILKINS. Molecular Modeling and Analysis of Fragilysin, the *Bacteroides fragilis* Toxin. . **Clinical Infectious Diseases**, 1997.

PAGNINI; CORLETO; MANGONI; et al. Alteration of local microflora and α -defensins hyperproduction in colonic adenoma mucosa. **Journal of Clinical Gastroenterology**, 2011.

PARREIRAS; SANTIAGO; COSTA; et al. Genetic aspects of colorectal cancer and its impact on disease management. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 23, 2013.

PASCHKE; JAFAROV; STAIB; et al. Are colon and rectal cancer two different tumor entities? A proposal to abandon the term colorectal cancer. **International Journal of Molecular Sciences** 2018.

PEREZ-MUÑOZ; ARRIETA; RAMER-TAIT; et al. A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: Implications for research on the pioneer infant microbiome. **Microbiome**, 2017.

PIERCE; BERNSTEIN. Genomic diversity of enterotoxigenic strains of *Bacteroides fragilis*. **PLoS ONE**, 2016.

PINHO; FRANÇA-JUNIOR. Prevenção do câncer de colo do útero: um modelo teórico para analisar o acesso e a utilização do teste de Papanicolaou. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, 2003.

PISCHON; NIMPTSCH. Obesity and risk of cancer: An introductory overview. *In: Recent Results in Cancer Research*, . 208p. 1–15, 2016.

POPOFF. Epsilon toxin: A fascinating pore-forming toxin. **FEBS Journal** 2011.

POPOFF. Clostridial pore-forming toxins: Powerful virulence factors. **Anaerobe**, 2014.

POSTHAUS; KITTL; TAREK; et al. Clostridium perfringens type C necrotic enteritis in pigs: diagnosis, pathogenesis, and prevention. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 32, n. 2, p. 203–212, 2020.

PURCELL; PEARSON; AITCHISON; et al. Colonization with enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* is associated with early-stage colorectal neoplasia. **PLoS ONE**, v. 12, 2017

RAFTER. Probiotics and colon cancer. **Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology** 2003.

RAWLA; SUNKARA; BARSOUK. Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors. **Przegląd Gastroenterologiczny** 2019.

REA; COPPOLA; PALMA; et al. Microbiota effects on cancer: From risks to therapies. **Oncotarget** 2018.

REDONDO; CARRASCO; REDONDO; et al. Clostridium perfringens type E virulence traits involved in gut colonization. **PLoS ONE**, 2015.

REVITT-MILLS; ROOD; ADAMS. Clostridium perfringens extracellular toxins and enzymes: 20 and counting. **Microbiology Australia**, 2015.

RINNINELLA; RAOUL; CINTONI; et al. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. **Microorganisms**, 2019.

RONCUCCI; PEDRONI; MARIANI. Attenuated adenomatous polyposis of the large bowel: Present and future. **World Journal of Gastroenterology** 2017.

ROOD; ADAMS; LACEY; et al. Expansion of the Clostridium perfringens toxin-based typing scheme. **Anaerobe**, 2018.

ROOD; KEYBURN; MOORE. NetB and necrotic enteritis: the hole movable story. **Avian Pathology** 2016.

ROOKS; GARRETT. Bacteria, food, and cancer. **F1000 Biology Reports** 2011.

ROSENBLATT; STEINBERG; MANKUTA; et al. Acquired Oral Microflora of Newborns During the First 48 Hours of Life. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 39, p. 442–446, 2015.

RUAN; ENGEVIK; SPINLER; et al. Healthy Human Gastrointestinal Microbiome: Composition and Function After a Decade of Exploration. **Digestive Diseases and Sciences** 2020.

RUBINSTEIN; BAIK; LAGANA; et al. Fusobacterium nucleatum promotes colorectal cancer by inducing Wnt/ β -catenin modulator Annexin A1. **EMBO reports**, 2019.

RUBINSTEIN; WANG; LIU; et al. Fusobacterium nucleatum Promotes Colorectal Carcinogenesis by Modulating E-Cadherin/ β -Catenin Signaling via its FadA Adhesin. **Cell Host and Microbe**, 2013.

SACK; ALBERT; ALAM; et al. Isolation of enterotoxigenic Bacteroides fragilis from Bangladeshi children with diarrhea: A controlled study. **Journal of Clinical Microbiology**, 1994.

SAKAMOTO; BENNO. Reclassification of Bacteroides distasonis, Bacteroides goldsteinii and Bacteroides merdae as Parabacteroides distasonis gen. nov., comb. nov., Parabacteroides goldsteinii comb. nov. and Parabacteroides merdae comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2006.

SAMPAIO-MAIA; CALDAS; PEREIRA; et al. The Oral Microbiome in Health and Its Implication in Oral and Systemic Diseases. **Advances in Applied Microbiology**, 2016.

SARMA; TANG; PRINDIVILLE; et al. Genotyping of Bacteroides fragilis isolates from stool specimens by arbitrarily-primed-PCR. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 2000.

SAROWSKA; FUTOMA-KOLOCH; JAMA-KMIECIK; et al. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic Escherichia coli isolated from different sources: Recent reports. **Gut Pathogens** 2019.

SAVVA; CLARK; NAYLOR; et al. The pore structure of Clostridium perfringens epsilon toxin. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2019.

SCHORCH; HENI; ZAHAF; et al. Targeting oncogenic Ras by the Clostridium perfringens toxin TpeL. **Oncotarget**, 2018.

SCHWABE; JOBIN. The microbiome and cancer. **Nature Reviews Cancer** 2013.

SEARS. Enterotoxigenic Bacteroides fragilis: A rogue among symbiotes. **Clinical Microbiology Reviews** 2009.

SEARS; GEIS; HOUSSEAU. Bacteroides fragilis subverts mucosal biology: From symbiont to colon carcinogenesis. **Journal of Clinical Investigation** 2014.

SEARS; PARDOLL. Perspective: Alpha-bugs, their microbial partners, and the link to colon cancer. **Journal of Infectious Diseases** 2011.

SEIFERT; DALHOFF. German multicentre survey of the antibiotic susceptibility of Bacteroides fragilis group and Prevotella species isolated from intra-abdominal infections: Results from the PRISMA study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2010.

SENDER; FUCHS; MILO. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the

Body. **PLoS Biology**, 2016.

SHAH. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal** 2007.

SHAH; OSMON; TANDE; et al. Clinical and Microbiological Characteristics of Bacteroides Prosthetic Joint Infections . **Journal of Bone and Joint Infection**, 2017.

SHARMA; MADHUSUDHAN; AHUJA. Intestinal tuberculosis versus Crohn's disease: Clinical and radiological recommendations. **Indian Journal of Radiology and Imaging**, 2016.

SHAUKAT; DOSTAL; MENK; et al. BMI Is a Risk Factor for Colorectal Cancer Mortality. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 62, p. 2511–2517, 2017.

SHIRYAEV; REMACLE; CHERNOV; et al. Substrate cleavage profiling suggests a distinct function of bacteroides fragilis metalloproteinases (fragilysin and metalloproteinase ii) at the microbiome-inflammation-cancer interface. **Journal of Biological Chemistry**, 2013.

SILVA; UZAL; OLIVEIRA; et al. Gas Gangrene (Malignant Edema). *In: Clostridial Diseases in Animals*, 2016.

SIMON. Colorectal cancer development and advances in screening. **Clinical Interventions in Aging** 2016.

SINDERN; SUCHODOLSKI; LEUTENEGGER; et al. Prevalence of Clostridium perfringens netE and netF toxin genes in the feces of dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 2019.

SINGH; BABY; RAJGURU; et al. Inflammation and cancer. **Annals of African Medicine**, 2019.

SINICROPE; RODDEY; MCDONNELL; et al. Increased apoptosis accompanies neoplastic development in the human colorectum. **Clinical Cancer Research**, v. 2, p. 1999–2006, 1996.

SLAVIN. Fiber and prebiotics: Mechanisms and health benefits. **Nutrients** 2013.

SOBHANI; AMIOT; BALEUR; et al. Microbial dysbiosis and colon carcinogenesis: Could colon cancer be considered a bacteria-related disease? **Therapeutic Advances in Gastroenterology** 2013.

SOBHANI; TAP; ROUDOT-THORAVAL; et al. Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. **PLoS ONE**, v. 6, 2011.

SOMMER; BÄCKHED. The gut microbiota-masters of host development and physiology. **Nature Reviews Microbiology** 2013.

SONG; LIU; YANG; et al. Dietary fibre and the risk of colorectal cancer: A case-control study. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, p. 3747–3752, 2015.

SONGER. Infections by Clostridium perfringens Type E. *In: Clostridial Diseases in Animals*. p. 173–176, 2016.

SOONG; MUIR; GOMEZ; et al. Bacterial neuraminidase facilitates mucosal infection by participating in biofilm production. **Journal of Clinical Investigation**, 2006.

STRAUSS; KAPLAN; BECK; et al. Invasive potential of gut mucosa-derived fusobacterium nucleatum positively correlates with IBD status of the host. **Inflammatory Bowel Diseases**, 2011.

SULYANTO; THOMPSON; BEALL; et al. The Predominant Oral Microbiota Is Acquired Early in an Organized Pattern. **Scientific Reports**, 2019.

SUMMANEN. Recent taxonomic changes for anaerobic gram-positive and selected gram-negative organisms. **Clinical Infectious Diseases**, 1993.

SWIDSINSKI; KHILKIN; KERJASCHKI; et al. Association between intraepithelial Escherichia coli and colorectal cancer. **Gastroenterology**, 1998.

TAMAS; WALENKAMP; DE VRIES; et al. Rectal and colon cancer: Not just a different anatomic site. **Cancer Treatment Reviews** 2015.

THANIKACHALAM; KHAN. Colorectal cancer and nutrition. **Nutrients** 2019. THIEL; MOGEL; BRUGGISSER; et al. Effect of Clostridium perfringens β -Toxin on Platelets. **Toxins**, v. 9, n. 10, p. 336, 2017.

THOMAS; JESUS; LOPES; et al. Tissue-associated bacterial alterations in rectal carcinoma patients revealed by 16S rRNA community profiling. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2016.

TJALSMA; BOLEIJ; MARCHESI; et al. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: Beyond the usual suspects. **Nature Reviews Microbiology** 2012.

TORRAZZA; NEU. The developing intestinal microbiome and its relationship to health and disease in the neonate. **Journal of Perinatology**, v. 31, p. S29–S34, 2011.

TORRES NETO; ARCIERI; TEIXEIRA. Aspectos epidemiológicos dos pólipos e lesões plano-elevadas colorretais Epidemiological aspects of colorectal polyps and flat adenomas. **Rev bras Coloproct**, v. 30, p. 419–429, 2010.

TREMAROLI; BÄCKHED. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature** 2012.

TWETEN. Clostridium perfringens beta toxin and Clostridium septicum alpha toxin: Their mechanisms and possible role in pathogenesis. **Veterinary Microbiology** 2001.

ULGER TOPRAK; YAGCI; GULLUOGLU; et al. A possible role of Bacteroides fragilis enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 8, p. 782–786, 2006.

UZAL. Clostridium Perfringens Toxins Involved in Mammalian Veterinary Diseases. **The Open Toxinology Journal**, 2013.

UZAL; FREEDMAN; SHRESTHA; et al. Towards an understanding of the role of Clostridium perfringens toxins in human and animal disease. **Future Microbiology** 2014.

VAAHTOVUO; MUNUKKA; KORKEAMÄKI; et al. Fecal microbiota in early rheumatoid arthritis. **Journal of Rheumatology**, 2008.

VACANTE; BORZÌ; BASILE; et al. Biomarkers in colorectal cancer: Current clinical utility and future perspectives. **World Journal of Clinical Cases** 2018.

VALDES; WALTER; SEGAL; et al. Role of the gut microbiota in nutrition and health. **BMJ (Online)**, v. 361, p. 36–44, 2018.

VALENTINI; SCHMOLL; VAN DE VELDE. Multidisciplinary management of rectal cancer: **Questions and answers, 2018**.

VAN BEST; HORNEF; SAVELKOUL; et al. On the origin of species: Factors shaping the establishment of infant's gut microbiota. **Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews**, v. 105, p. 240–251, 2015.

VIVARELLI; SALEMI; CANDIDO; et al. **Gut microbiota and cancer: From pathogenesis to therapy. Cancers** 2019.

VOGELSTEIN; PAPADOPOULOS; VELCULESCU; et al. Cancer genome landscapes. **Science** 2013.

- WADE. The oral microbiome in health and disease. **Pharmacological Research** 2013.
- WAGLEY; BOKORI-BROWN; MORCLETTE; et al. Evidence of Clostridium perfringens epsilon toxin associated with multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis Journal**, 2019.
- WANG; CAI; QIU; et al. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. **ISME Journal**, v. 6, p. 320–329, 2012.
- WANG; MENG; WANG; et al. Helicobacter pylori-induced gastric inflammation and gastric cancer. **Cancer Letters** 2014.
- WARREN; FREEMAN; PLEASANCE; et al. Co-occurrence of anaerobic bacteria in colorectal carcinomas. **Microbiome**, 2013.
- WASSENAAR. E. coli and colorectal cancer: a complex relationship that deserves a critical mindset. **Critical Reviews in Microbiology** 2018.
- WEI; CAO; LIU; et al. Could gut microbiota serve as prognostic biomarker associated with colorectal cancer patients' survival? A pilot study on relevant mechanism. **Oncotarget**, 2016.
- WEI; GIOVANNUCCI; WU; et al. Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. **International Journal of Cancer**, v. 108, p. 433–442, 2004.
- WELSH; MCCLELLAND. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, 1990.
- WEXLER. Bacteroides: The good, the bad, and the nitty-gritty. **Clinical Microbiology Reviews** 2007.
- WHO. Latest global cancer data. **International Agency for Research on Cancer**, 2018.
- WIGGERS; XIONG; DANEMAN. Sending repeat cultures: Is there a role in the management of bacteremic episodes? (SCRIBE study). **BMC Infectious Diseases**, 2016.
- WILLIAMS; KUBELIK; LIVAK; et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 990.
- WIOLAND; DUPONT; BOSSU; et al. Attack of the nervous system by clostridium perfringens epsilon toxin: From disease to mode of action on neural cells. **Toxicon**, 2013.
- WONG; YU. Gut microbiota in colorectal cancer: mechanisms of action and clinical applications. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology** 2019.
- WRIGHT. Building a Model of Tumorigenesis: A small group activity for a cancer biology/cell biology course. **CourseSource**, 2015.
- WU; LIM; HUANG; et al. Bacteroides fragilis enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1998.
- WU; RHEE; ZHANG; et al. Bacteroides fragilis toxin stimulates intestinal epithelial cell shedding and γ -secretase-dependent E-cadherin cleavage. **Journal of Cell Science**, 2007.
- XU; XU; TONG; et al. Meta-analysis: Circulating adiponectin levels and risk of colorectal cancer and adenoma. **Journal of Digestive Diseases**, v. 12, p. 234–244, 2011.
- YADAV; DAS; DHAKA; et al. Pulsed-field gel electrophoresis of enterotoxic Clostridium perfringens type A isolates recovered from humans and animals in Kolkata, India . **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, 2018.
- YAMANE; SCAPULATEMPO-NETO; REIS; et al. Serrated pathway in colorectal carcinogenesis.

World Journal of Gastroenterology 2014.

YIN; GRANDI; RAUM; et al. Meta-analysis: Longitudinal studies of serum vitamin D and colorectal cancer risk. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, 2009.

YONOJI; MATSUDA; KAWAI; et al. BEC, a novel enterotoxin of clostridium perfringens found in human clinical isolates from acute gastroenteritis outbreaks. **Infection and Immunity**, 2014.

YOON; KIM; PARK; et al. Comparisons of Gut Microbiota Among Healthy Control, Patients With Conventional Adenoma, Sessile Serrated Adenoma, and Colorectal Cancer. **Journal of Cancer Prevention**, 2017.

YOUSSEF; LAHTI; KOKKOLA; et al. Stool Microbiota Composition Differs in Patients with Stomach, Colon, and Rectal Neoplasms. **Digestive Diseases and Sciences**, 2018.

YU. Microbiota dysbiosis and barrier dysfunction in inflammatory bowel disease and colorectal cancers: exploring a common ground hypothesis. **Journal of biomedical science** 2018.

YU; GUO; YU; et al. Fusobacterium nucleatum Promotes Chemoresistance to Colorectal Cancer by Modulating Autophagy. **Cell**, 2017.

ZENG; INOHARA; NUÑEZ. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. **Mucosal Immunology** 2017.

ZHANG; WANG; LI; et al. Human oral microbiota and its modulation for oral health. **Biomedicine and Pharmacotherapy** 2018.

ZHANG; WEINTRAUB. Prevalence of Enterotoxigenic Bacteroides fragilis in Adult Patients with Diarrhea and Healthy Controls. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, p. 590–594, 1999.

ZHOU; GAO; MIHINDUKULASURIYA; et al. Biogeography of the ecosystems of the healthy human body. **Genome Biology**, 2013.

ZINATIZADEH; KHALILI; FALLAH; et al. Potential preventive effect of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus plantarum in patients with polyps or colorectal cancer. **Arquivos de Gastroenterologia**, 2018.

ZSCHÄBITZ; CHENG; NEUHOUSER; et al. B vitamin intakes and incidence of colorectal cancer: Results from the Women's Health Initiative Observational Study cohort. **American Journal of Clinical Nutrition**, 2013.

ANEXO I**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: Frequente (); Nunca ()

DROGAS: SIM (); NÃO (); QUAL: _____, ORAL/INJETAVEL: _____

CONSUMO DE ÁLCOOL: Diariamente (); Socialmente (); Nunca ().

**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: _____

ANEXO II- Artigo publicado

Case Report

iMedPub Journals
<http://www.imedpub.com>

DOI: 10.21767/2471-9943.100029

Colorectal Cancer: Open Access
ISSN 2471-9943

2016

Vol. 2 No. 4: 22

Bloodstream Infection due to Bacterial Co-Infection in Patients with Rectal Carcinoma: Report of Two Cases**Rosa L Solis Castro¹,
Gabriela G Freire Alberca¹,
Claudia A Freire¹,
Viviane Nakano¹,
Luis A Lianco Alborno¹,
Adriana V Safatle Ribeiro²,
Ulysses R Junior² and
Mario J Avila-Campos¹****Abstract**

In this study, we reported the bacterial co-infection causing bacteremia in two of 38 patients diagnosed with rectal carcinoma. 10 mL of blood of each patient were cultured in BHI broth. From positive blood cultures, aliquots were streaked on MacConkey agar (aerobiosis), and Bacteroides-bile-esculin agar and kanamycin-blood agar (anaerobiosis). Bacteria were identified by using API-20A kit and confirmed by 16s rDNA sequencing. The bacterial identification showed the presence of *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis* and *Enterococcus faecalis*. The use of DNA sequencing showed to be a tool for rapid screening of blood infections than the classic microbiological methods, and provides an accurate and effective microbial identification in sepsis process. Patients with intestinal malignancy can produce bacteremia with nonspecific or atypical symptoms.

Keywords: Bacteremia; Rectal carcinoma; Bacterial co-infection; Sepsis

Received: October 21, 2016; Accepted: October 26, 2016; Published: November 01, 2016

Introduction

Colorectal carcinoma (CRC) is one of the most commonly diagnosed malignancies and has highly mortality worldwide. This carcinoma has a high incidence in developed countries, and it has increased in Brazilian population, being the second cancer type in women and the third in men [1]. The colorectal cancer affects a segment of large intestine, colon and/or rectum, and most of these tumors begin from polyps growing in the inner layer of the large intestine.

Bacterial sepsis is one of the main causes of morbidity and mortality around the world, and its incidence has increased during the last years in different countries [2]. Aerobic or facultative Gram-positive and Gram-negative bacteria are the most frequent causative agents of bloodstream infection followed by fungal infection [3], and the rapid detection of pathogens in blood of septic patients is essential for adequate treatment and diagnosis.

Currently, blood culture is the standard method for the diagnosis of bacteremia and the final results require at least 48 to 72 hours for aerobic or facultative bacteria. However, anaerobic bacteria require long periods of growing using from 72 hours to 7 days. Moreover, the conventional aerobic culture may cause false-negative results when fastidious or slowly growing organisms are the causative pathogens, such as anaerobes.

Nowadays, molecular methods for rapid identification of pathogens in positive blood culture samples has been used, including conventional and quantitative PCR, DNA microarray, RNA hybridization probes and sequencing [4].

In this study, we reported two cases of bacterial co-infection causing bacteremia in two women with rectal carcinoma.

Case Presentation**Case No. 1**

A 70-years-old female patient, smoking, living in Sao Paulo city, Brazil, was diagnosed with rectal cancer by colonoscopy. At the time of their diagnosis both women presented aqueous diarrhea and bleeding but not fever. Her demographic data showed no

1 Anaerobe Laboratory, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

2 Instituto do Cancer do Estado de Sao Paulo- ICESP, Sao Paulo, SP, Brazil

Corresponding author:
Mario J Avila Campos

mariojac@usp.br

Anaerobe Laboratory, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Science, University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil.

Citation: Castro RLS, Alberca GGF, Freire CA, et al. Bloodstream Infection due to Bacterial Co-Infection in Patients with Rectal Carcinoma: Report of Two Cases. Colorec Cancer 2016, 2:4.

use of illicit drugs, alcohol consumption nor antibiotic therapy, but with familiar history of cancer, mother with stomach cancer and father with lung cancer.

Case No. 2

A 75-years-old female patients, smoking, living in Sao Paulo city, Brazil, was diagnosed with rectal cancer by colonoscopy. At the time of their diagnosis both women presented light diarrhea and no bleeding. This patient showed no use of illicit drugs or antibiotic therapy. Never used alcohol, and her mother developed stomach cancer.

In both cases, patients were attended at the Instituto do Cancer do Estado de Sao Paulo - ICESP (Sao Paulo, SP, Brazil).

In both patients, few minutes before colonoscopy, 10 mL of blood were drawn from cubital vein and immediately inoculated in 100 mL of Brain Heart Infusion (BHI) and incubated in anaerobic conditions (85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂) at 37°C for 7 days. After growing period, aliquots of 0.1 mL were immediately transferred to MacConkey agar and incubated in aerobiosis (37°C, 24 h), and Bacteroides-bile-esculin (BBE) agar and kanamycin-blood agar incubated in anaerobiosis (37°C, for 72 h).

On MacConkey agar, lactose-positive colonies of *Escherichia coli* were isolated and identified by conventional PCR using 16S rRNA primers [5]. Media incubated with anaerobic atmosphere showed different types of colonies and they were analyzed by their respiratory type to confirm the presence of anaerobic bacteria. Each characteristic colony obtained from each medium were isolated and identified by using API-20A kit (BioMérieux, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and confirmed by partial sequencing of the 16s DNA gene using standard method with universal primers (Uni-F: 5'-CGC TAG TAA TOG TGG ATC AGA ATG-3' and Uni-R: 5'-TGT GAC GGG CGG TGTGTA-3'). Bacterial DNA from the bacteria was extracted using a QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions.

Patients did not show gas gangrene, necrosis or soft tissue infection. The bacterial identification showed the presence of *E. coli*, *Bacteroides fragilis* and *Enterococcus faecalis* (Case No. 1), and *Bacteroides fragilis* and *Enterococcus faecalis* (Case No. 2). The results of sequencing indicated closely related species with identity > 99%.

This study was approved by the Ethics Committee of the Medical School of the University of Sao Paulo, SP, Brazil (Process No. 321/14).

Discussion

Hemoculture or blood culture is the current gold standard method for detecting microbial pathogens from blood infections, but this method presents several limitations. Because of their

fastidious characteristic of anaerobic bacteria, their growth takes more time than aerobic or facultative.

Herein, we report a blood co-infection by the three intestinal microorganisms causing bacteremia in two patients with rectal carcinoma. It is of interest since few or no report has been observed in literature. Interestingly, blood sample was obtained before colonoscopy and it is suggested that these microorganisms were able to achieve bloodstream through tumor tissue and they may remain in state of bacteremia for long period [6]. In this case, the infection in rectal cancer involves disruption of the normal barrier due to tumor-induced ulceration, followed by bloodstream invasion, in accordance with Mirza [7] Bacteremia caused by anaerobic bacteria represents from 0.5% to 12% of the total of bacteremia, and the mortality is approximately between 25% and 44% [8]. Studies have shown that bacterial community in an individual is relatively stable along the distal digestive tract [9]. However, bacterial composition changes in rectal mucosal associated with colorectal adenomas may have an influence in the adenoma formation. In addition, with the mucosal disruption bacteria can be spread hematogenously.

Historically, *E. faecalis* was responsible for the majority of clinical enterococcal infections [10] however, Gudiol [11] reported the high prevalence of *Enterococcus faecium* and a low frequency of *E. faecalis* in blood infection from patients with cancer. In both reported cases, *E. faecium* was not detected.

In many cases conventional blood cultures are negative in the face of strong clinical indicators of sepsis and further examinations are required. If laboratories do not receive the indications of a possible suspect of anaerobic infections, it can lead to lack of positive results.

The presence of *E. coli*, *B. fragilis*, and *E. faecalis* in blood suggests that these resident bacteria of the intestinal microbiota were able to achieve the bloodstream through tumor lesion. Interestingly, the patients did not show apparently discomfort, such as fever or body pain. Since malignant tumors can occur as long as several years after infection its evaluation is imperative, in accordance with Wentling [12] the use of DNA sequencing showed to be an effective tool for rapid screening of blood infections than the classic microbiological methods, giving an accurate, rapid and effective microbial identification in sepsis process for choosing an adequate therapy. In conclusion, patients displaying intestinal malignancy can produce bacteremia with atypical symptoms.

Acknowledgements

This study was supported by Grant from FAPESP 2013/13652-6. The authors thank Mrs. Marcia Harumi Fukugaiti for her technical support.

References

1. Bedani R, Rossi EA (2009) Microbiota intestinal e probióticos: Implicações sobre o câncer de colon. *Journal Portugues de Gastroenterologia* 16: 19-28.
2. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, et al. (2007) Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Medicine* 33: 606-618.
3. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM (2005) Septic shock. *Lancet* 365: 63-78.
4. Wang HY, Kim S, Kim H, Kim J, Kim Y, et al. (2014) Real-time PCR TaqMan assay for rapid screening of bloodstream infection. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 13: 3.
5. Malinen E, Kassinem A, Rinttilä T, Palva A (2003) Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology* 149: 269-277.
6. Narayanan V, Peppelenbosch MP, Konstantinov SR (2014) Human Fecal Microbiome-Based Biomarkers for Colorectal Cancer. *Cancer Prevention Research* 7: 1108-1111.
7. Mirza NN, McCloud JM, Cheetham MJ (2009) Clostridium septicum sepsis and colorectal cancer—a reminder. *World Journal of Surgical Oncology* 7: 73.
8. Salonen JH, Eerola E, Meurman O (1998) Clinical significance and outcome of anaerobic bacteremia. *Clinical Infectious Diseases* 26: 1413-1417.
9. Cherif H, Kronvall G, Björkholm M, Kalin M (2003) Bacteremia in hospitalized patients with malignant blood disorders: a retrospective study of causative agents and their resistance profiles during a 14-year period without antibacterial prophylaxis. *The Hematology Journal* 4: 420-426.
10. Gudíol C, Ayats J, Camoiez M, Domínguez MA, García-Vidal C, et al. (2013) Increase in bloodstream infection due to vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* in cancer patients: risk factors, molecular epidemiology and outcomes. *PLoS ONE* 8: e74734.
11. Balish E, Warner T (2002) *Enterococcus faecalis* induces inflammatory bowel disease in interleukin-10 knockout mice. *American Journal Pathology* 160: 2253-2257.
12. Wentling GK, Metzger PP, Dozois EJ, Chus HK, Krishna M (2006) Unusual bacterial infections and colorectal carcinomas—*Streptococcus bovis* and *Clostridium septicum*: report of three cases. *Diseases of the Colon & Rectum* 49: 1223-1227.