

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso de Biomedicina

Ana Beatriz Deleame Medeiros

**POTENCIAL DE APLICAÇÃO CLÍNICA DAS ASSINATURAS MUTACIONAIS
GERADAS PELA EXPOSIÇÃO À COLIBACTINA PRODUZIDA POR CEPAS DE
ESCHERICHIA COLI PKS+**

São Paulo

2022

Ana Beatriz Deleame Medeiros

**POTENCIAL DE APLICAÇÃO CLÍNICA DAS ASSINATURAS MUTACIONAIS
GERADAS PELA EXPOSIÇÃO À COLIBACTINA PRODUZIDA POR CEPAS DE
ESCHERICHIA COLI PKS+**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pela Prof^a Dr^a Dyana Alves Henriques, como requisito parcial para obtenção do título de Biomédica.

São Paulo

2022

Ficha catalográfica elaborada pelas Bibliotecas São Camilo

Medeiros, Ana Beatriz Deleame

Potencial de aplicação clínica das assinaturas mutacionais geradas pela exposição à colibactina produzida por cepas de escherichia COLI PKS+ / Ana Beatriz Deleame Medeiros. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2022.

82 p.

Orientação de Dyana Alves Henriques.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2022.

1. Análise mutacional de DNA 2. Disbiose 3. Escherichia coli 4. Microbiota 5. Neoplasias colorretais I. Henriques, Dyana Alves II. Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 616.992

**TERMO DE AUTORIZAÇÃO
ENTREGA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
GRADUAÇÃO**

Eu, Dyana Alves Henriques, curso Biomedicina, orientador do Trabalho de Conclusão do Curso, título “Potencial de aplicação clínica das assinaturas mutacionais geradas pela exposição à colibactina produzida por cepas de Escherichia coli pks+” da aluna Ana Beatriz Deleame Medeiros, turma 8ASMI, autorizo a entrega oficial através do Portal Acadêmico da versão final corrigida.

Caso o trabalho envolva aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CoEP), ou Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA), o parecer de aprovação deverá também ser anexado ao protocolo.

Assinatura do docente orientador:
(Somente assinatura manual)



Data: 18/11/2022

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro câncer mais comum no mundo e é a segunda causa de morte associada a neoplasias, possuindo, como uma de suas causas, cepas patogênicas de *Escherichia coli*, a principal bactéria residente do intestino grosso e componente da microbiota. Dentre as cepas, *E. coli* pks+ têm chamado atenção, visto que são produtoras da colibactina, toxina que gera quebras de fita-dupla no DNA, ativação de vias de reparo e interrupção do ciclo celular. Estudos recentes demonstram que a colibactina gera assinaturas mutacionais específicas nos tumores de pacientes com CCR. O objetivo do trabalho é avaliar o potencial de aplicação das assinaturas mutacionais geradas pela exposição à colibactina produzida por cepas de *Escherichia coli* pks+ no âmbito clínico. Para isso, foi realizada uma revisão bibliográfica integrativa de artigos, livros e teses produzidos entre os anos de 2015 a 2022, nos idiomas português e inglês, em bases de dados como Google Scholar, Pubmed e Lilacs. A assinatura específica de colibactina é caracterizada por um padrão de substituição de base única em sequências ATA, ATT ou TTT (SBS88) além de deleções de timina em homopolímeros T (ID18). Observou-se que estes padrões estão presentes em organoides intestinais humanos, tecidos de pacientes com doenças inflamatórias intestinais e metástases de câncer colorretal. As assinaturas mutacionais fornecem informações sobre a etiologia do tumor e identificam processos mutagênicos na célula neoplásica, atuando como biomarcadores para determinados tipos de cânceres e como preditores de terapia. Apesar das desvantagens, novos estudos e ferramentas de bioinformática têm sido desenvolvidos a fim de se aprimorar e baratear a aplicação de novas assinaturas na clínica. As assinaturas mutacionais geradas por colibactina podem, portanto, fazer com que abordagens melhores relacionadas à dieta e à administração de fármacos ao paciente sejam tomadas para se obter uma resposta e/ou prognóstico mais adequados, bem como servirem como biomarcadores para identificação de lesões e, futuramente, orientar decisões de tratamento.

Palavras-chave: *Escherichia coli*; Microbiota; Disbiose; Neoplasias Colorretais; Análise Mutacional de DNA.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer in the world and the second cause of death associated with neoplasms, having, as one of its causes, *Escherichia coli* pathogenic strains, the main resident bacteria in the large intestine and component of microbiota. Among strains, *E. coli* pks+ have been getting the attention since they are producers of colibactin, a toxin that generates double-strand breaks in DNA, activation of repair pathways and cell cycle arrest. Recent studies have shown that colibactin generates specific mutational signatures in CRC's patients tumors. The aim of the study is to evaluate the potential application of mutational signatures generated by colibactin's exposure produced by *Escherichia coli* pks+ strains in the clinical setting. For this, an integrative literature review of articles, books and thesis produced between 2015 and 2022, in portuguese and english, in databases such as Google Scholar, Pubmed and Lilacs was made. Colibactin's specific signature is characterized by a single base substitution pattern in ATA, ATT or TTT (SBS18) sequences, in addition to thymine deletions in T homopolymers (ID18). It was observed that these patterns are present in human bowel organoids, tissues from patients with inflammatory bowel diseases and colorectal cancer metastasis. Mutational signatures provide informations about tumor etiology and identify mutagenic processes in the neoplastic cell, acting as biomarkers for certain types of cancers and as therapy predictors. Despite disadvantages, new studies and bioinformatics tools have been developed in order to improve and cheapen the clinical application of new signatures. Colibactin's mutational signature may, therefore, turn possible that better approaches related to patients' diet and drug administration be taken to obtain a better outcome and/or prognosis, as well as serve as a biomarker to identify lesions and, in the future, guide treatment decisions.

Keywords: *Escherichia coli*; Microbiota; Dysbiosis; Colorectal Neoplasms; DNA Mutational Analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Microbiota do trato gastrointestinal	6
Figura 2 - Funções da microbiota na homeostase do hospedeiro.....	8
Figura 3 - Doenças relacionadas com a microbiota e bactérias prevalentes	10
Figura 4 - Papel de <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> e <i>Fusobacterium nucleatum</i> no desenvolvimento neoplásico	11
Figura 5 - Incidências do câncer colorretal por gênero nas regiões do Brasil	13
Figura 6 - Incidências e mortalidades do câncer colorretal e de outros tipos de cânceres prevalentes na população mundial	13
Figura 7 - Etapas de desenvolvimento do câncer	15
Figura 8 - Open Reading Frames da ilha genômica pks	25
Figura 9 - Biossíntese da colibactina e formação de adutos de adenina	28
Figura 10 - Pré-colibactinas isoladas e estrutura proposta da colibactina.....	29
Figura 11 - Fatores produzidos no fenótipo secretor associado à senescência (SASP) e como atuam no desenvolvimento tumoral	33
Figura 12 - Assinaturas mutacionais específicas de exposição ao tabaco, luz UV e defeitos na via de <i>mismatch repair</i> , respectivamente.....	40
Figura 13 - Assinaturas de substituição de base única (SBS) e suas frequências encontradas em relação ao tipo de câncer	41
Figura 14 - Alterações que ocorrem nos nucleotídeos em cada uma das quatro assinaturas possíveis	43
Figura 15 - Assinatura mutacional específica de colibactina.....	45
Figura 16 - SBS88 e ID18 como assinaturas geradas pela exposição à colibactina	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Características das ciclomodulinas de <i>E. coli</i>	23
Quadro 2 - Classificações atuais de assinaturas mutacionais, bem como suas definições, contextos e exemplos.....	42
Quadro 3 - Mutações específicas, impacto na seleção de terapias e assinaturas relacionadas.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

AGCC Ácidos graxos de cadeia curta

CCR Câncer colorretal

CDT Toxina distensora citoletal

CHK2 Quinase de checkpoint 2

CIMP Fenótipo metilador da ilha CpG

CN/CNV Variação do número de cópias

DII Doença inflamatória intestinal

DNA Ácido desoxirribonucleico

DSB Substituição de bases duplas

ExPEC *Escherichia coli* patogênica extraintestinal

GOS Galacto-oligossacarídeo

ICL Ligação cruzada entre cadeias

ID Indel

IDH Índice de desenvolvimento humano

mRNA Ácido ribonucleico mensageiro

MSI Instabilidade de microssatélites

PAI Ilha de patogenicidade

PCR Reação em cadeia da polimerase

RNA Ácido ribonucleico

ROS Espécies reativas de oxigênio

SBS Substituição de base única

SNV Variação de nucleotídeo único

TGI Trato gastrointestinal

WES Sequenciamento de exoma completo

WGS Sequenciamento de genoma completo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	4
3	METODOLOGIA	5
4	MICROBIOTA	6
4.1	O QUE É A MICROBIOTA.....	6
4.2	MICROBIOTA E A INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS	9
4.3	MICROBIOTA E O CÂNCER COLORRETAL	10
5	CÂNCER COLORRETAL	12
5.1	EPIDEMIOLOGIA	12
5.2	TRATAMENTO	13
5.3	DESENVOLVIMENTO.....	13
5.4	INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA.....	15
6	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	20
6.1	VISÃO GERAL	20
6.2	<i>E. COLI</i> PATOGÊNICAS	22
7	COLIBACTINA	25
7.1	DEFINIÇÃO E ESTRUTURA QUÍMICA.....	25
7.2	MECANISMO DE AÇÃO E EFEITOS NO DNA.....	30
7.3	RELAÇÃO COM O DESENVOLVIMENTO TUMORAL	32
7.4	FORMA DE INFECÇÃO E PREVALÊNCIA.....	35
8	ASSINATURAS MUTACIONAIS	39
8.1	CONCEITO.....	39
8.2	ASSINATURAS DE COLIBACTINA.....	43
8.3	PREVALÊNCIA	47
8.4	APLICAÇÕES ATUAIS.....	48
8.5	COMO O DIAGNÓSTICO CORROBORADO PELA ASSINATURA MUTACIONAL DE COLIBACTINA BENEFICIARIA PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL	50
8.6	DESVANTAGENS	53
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

A microbiota pode ser denominada como a população de micro-organismos que compõem um indivíduo, sendo uma das partes do corpo mais povoadas o trato gastrointestinal (DALMASSO *et al.*, 2014). As diferentes bactérias que ali habitam influenciam o metabolismo do organismo, a síntese de nutrientes e até mesmo a resposta imune. Em contrapartida, são influenciadas por fatores individuais, sejam ambientais ou genéticos (SILVESTRE, 2016; WONG *et al.*, 2019; SONG, CHAN, SUN, 2020). As bactérias são as mais abordadas devido ao desenvolvimento de tecnologias que as detectam e quantificam e há falta de estudos e compreensão sobre os outros micro-organismos presentes (GOMAA, 2020; JOHNS, PETRELLI, 2021).

Quando a microbiota se encontra em equilíbrio, isto é, com maior abundância de micro-organismos benéficos e menor de patogênicos, a homeostase é garantida (DUBINSKY, DOTAN, GOPHNA, 2020). Porém, quando esta relação se inverte, a disbiose (ou desregulação da microbiota) aparece como um fator relevante no desenvolvimento de diversas doenças gastrointestinais e prejuízo das funções que uma microbiota saudável desempenha (SILVESTRE, 2016; WONG, YU, 2019). Com o aumento de estudos que relacionam a disbiose com patologias, um dos focos hoje é seu papel na carcinogênese, tendo como fatores causatórios metabólitos que causam dano do DNA, ativação de vias que promovem proliferação das células e desencadeamento de inflamação (LI *et al.*, 2022). As bactérias mais relacionadas hoje com o desenvolvimento neoplásico incluem *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides fragilis* enterotoxigênico, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*, foco central do trabalho (ALHINAI, WALTON, COMMANE, 2019; JOHNS, PETRELLI, 2021).

A *Escherichia coli* (*E. coli*) é uma bactéria Gram-negativa, flagelada, não-formadora de esporo e anaeróbia facultativa que gera bastante interesse mundial pela alta diversidade, abundância nos humanos, fatores de patogenicidade e resistência a antimicrobianos (VILA *et al.*, 2016; JANG *et al.*, 2017; MUELLER, TAINTER, 2022). Ademais, é a principal residente no intestino grosso e pode causar doença quando há imunocomprometimento presente, estando envolvida em cerca

de 2 milhões de mortes anuais (SALVATIERRA, 2014; GARCÍA *et al.*, 2016). As patologias mais relacionadas a essa bactéria incluem diarreia, colite, infecções urinárias, sepse e câncer, principalmente o colorretal (WASSENAAR; POIREL *et al.*, 2018; MUELLER, TAINTER, 2022).

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro câncer mais comum no mundo e é a segunda causa de morte associada a neoplasias (JIN *et al.*, 2020; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022). Seu desenvolvimento é multifatorial, tendo como fatores predisponentes o tabagismo, dieta, obesidade, diabetes, genética e a própria microbiota. Esta última pode atuar na carcinogênese de diversas formas, incluindo inflamação crônica e produção de toxinas que danificam a célula e seu material genético (WONG, YU; SAUS *et al.*, 2019). Por ser um tecido com alta exposição à microbiota, a prevalência de cânceres que envolvem o cólon e reto acaba sendo considerável (COUGNOUX *et al.*, 2014; VEZIAN *et al.*, 2016).

Apesar da variada gama de opções de tratamento, o fato de ser um câncer silencioso e inicialmente assintomático prejudica seu diagnóstico, possuindo um mau prognóstico e baixa taxa de sobrevivência (DEKKER *et al.*, 2019; STRAKOVA, KORENA, KARPISKOVA, 2021; LI *et al.*, 2022). Além disso, embora vários testes de rastreio disponíveis atualmente apresentem boa eficácia, muitos são invasivos, de alto custo e possuem baixa sensibilidade (SAUS *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2021). Dessa forma, marcadores microbianos surgiram como indicadores promissores (WONG, YU, 2019; VEZIAN *et al.*, 2021).

Estes marcadores estão relacionados com cepas patogênicas, as quais possuem o que chamamos de ilhas de patogenicidade (PAIs). As PAIs são grandes regiões genômicas com genes que codificam fatores patogênicos, sendo os mais discutidos as ciclomodulinas, toxinas que possuem como mecanismo de ação principalmente o dano ao DNA (SARSHAR *et al.*, 2017; AUVRAY, 2021). Este dano leva a mutações genéticas que influenciam no desenvolvimento tumoral, com atenção ao câncer colorretal, já que a microbiota é bastante abundante no cólon. A *E. coli*, por ser uma das principais residentes do intestino grosso e pela produção de toxinas com capacidade carcinogênica, tem sido altamente estudada no desenvolvimento de adenomas e carcinomas (DALMASSO *et al.*, 2014; SILVESTRE, 2016; WASSENAAR, 2018). Uma de suas toxinas mais estudadas

atualmente é a colibactina, a qual é produzida, entre outras cepas, por *E. coli* pks+ (KHAN, CASH, 2013; WASSENAAR, 2018).

A colibactina é uma genotoxina que causa quebras na fita-dupla no DNA, ativação de vias de reparo, aberrações cromossômicas e interrupção do ciclo celular, estando relacionada com doenças inflamatórias intestinais e cânceres colorretais e sendo encontrada em cerca de 55-66,7% de tecidos advindos desses tumores (DALMASSO *et al.*, 2014; WILSON *et al.*, 2019; IFTEKHAR *et al.*; VILLARIBA-TOLENTINO, 2021). A relação com o desenvolvimento do CCR se dá principalmente por conta da expressão de um fenótipo senescente, o qual induz proliferação celular por meio de fatores de crescimento. Porém, outras hipóteses como manutenção de um ambiente inflamatório e papel de mutações genéticas na iniciação e promoção do tumor também têm sido discutidas (COUGNOUX *et al.*, 2014; STRAKOVA, KORENA, KARPISKOVA; VEZIAN, 2021).

Estudos recentes observaram que tecidos infectados por cepas de *E. coli* produtoras de colibactina apresentam padrões mutacionais únicos, denominados de assinaturas mutacionais, as quais são caracterizadas por substituições de base única em sequências ATA, ATT ou TTT e deleções de timina em homopolímeros T, formando uma “impressão digital” que identifica células expostas à colibactina (LEESIX *et al.*, 2019; WERNKE; PLEGUEZUELOS-MANZANO *et al.*; YANG, JOBIN, 2020). As assinaturas mutacionais estão sendo cada vez mais estudadas para uma maior aplicação na clínica, incluindo no diagnóstico precoce e prevenção de indivíduos, detecção da etiologia neoplásica, rastreamento familiar de mutações hereditárias e direcionamento de tratamentos específicos (KOH *et al.*, 2021). Dessa forma, as assinaturas mutacionais recém-descobertas geradas pela colibactina poderiam influenciar no diagnóstico e/ou tratamento dos indivíduos com CCR.

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é avaliar o potencial de aplicação das assinaturas mutacionais geradas pela exposição à colibactina produzida por cepas de *Escherichia coli* pks+ no âmbito clínico.

3 METODOLOGIA

O trabalho foi desenvolvido através de uma revisão bibliográfica integrativa de artigos, livros e teses, pesquisados nos bancos de dados Google Scholar, Pubmed e Lilacs. As referências estavam nos idiomas português e/ou inglês e foram encontradas por meio dos seguintes descritores: “*Escherichia coli* pks+”, “Colibactina/Colibactin”, “Assinaturas Mutacionais/Mutational Signatures”, “Câncer Colorretal/Colorectal Cancer” e “Microbiota/Microbiota”. Os estudos encontrados foram filtrados para somente possuírem, como data de publicação, os anos de 2012 a 2022, a fim de garantir que fossem estudos relativamente recentes e com informações atualizadas, garantindo a qualidade dos dados coletados e aqui descritos.

O critério definido de análise dos artigos e teses foi a leitura e coleta de dados da introdução, desenvolvimento (quando presente), discussão e conclusão, onde os autores apresentam e sintetizam os estudos que realizaram, bem como os resultados que obtiveram. O critério definido para os livros foi a busca de informações nos capítulos referentes ao tema escolhido, os quais abrangiam tópicos sobre microbiota, bactérias e câncer. O progresso do estudo foi monitorado buscando informações e confeccionando os parágrafos continuamente, durante todos os meses de produção do trabalho.

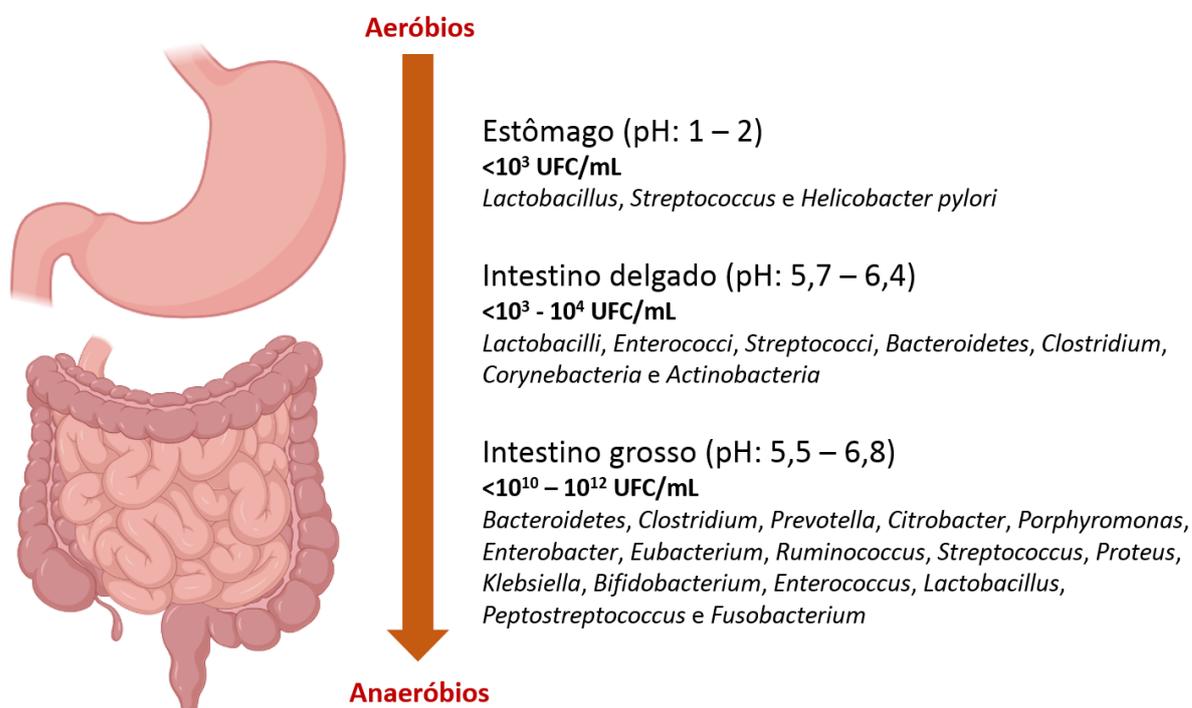
4 MICROBIOTA

4.1 O QUE É A MICROBIOTA

A microbiota é considerada um ecossistema de mais de 100 trilhões de microrganismos constituído por vírus, fungos, protozoários e bactérias, os quais habitam diversas regiões do organismo humano. Seu desenvolvimento se dá a partir do nascimento e sua composição é determinada pela genética, ambiente, dieta e tipo de parto. Mais de 70% da microbiota vive no trato gastrointestinal, aumentando sua proporção do lúmen gástrico para o intestino delgado até o cólon e reto, onde atinge sua concentração máxima (PASCALE *et al.*, 2018).

A microbiota intestinal é composta por cerca de 500 espécies bacterianas, sendo metade do peso de todo o conteúdo do cólon (porção mais densamente povoada) e 10x superior ao número total de células que compõem o organismo humano. O intestino grosso, particularmente, contém o maior número de microrganismos residentes devido à disponibilidade de umidade e nutrientes, apesar do muco com suas substâncias antimicrobianas e a descamação periódica do órgão previnirem a colonização de muitos micro-organismos (SILVESTRE, 2016; TORTORA, 2017; ADAK, KHAN, 2018). A quantidade dos principais gêneros e espécies ao longo do trato gastrointestinal (TGI) e no intestino grosso pode ser encontrada na figura abaixo (figura 1):

Figura 1 – Microbiota do trato gastrointestinal



Fonte: adaptado de Tortora, 2017.

Esse ambiente é demarcado por diferentes bactérias graças à influência de fatores fisiológicos como o peristaltismo, a acidez gástrica e o estilo de vida do indivíduo, como por exemplo, a dieta que ele consome. A colonização é garantida graças à disponibilidade de enzimas que permitem a utilização de certos nutrientes, fixação em superfícies celulares específicas, capacidade de evitar bacteriófagos, escape do sistema imune do hospedeiro e estresse físico-químico. Essa relação microbiota-hospedeiro é comensal, onde um lado se beneficia e o outro não é afetado negativamente (ADAK, KHAN, 2018). Seu início é demarcado pelo contato com os micro-organismos maternos. Posteriormente, o ambiente passa a ser determinante no perfil de colonização da criança, sendo influenciado por desde o estado de saúde materno, até o estilo de vida do indivíduo nos anos seguintes ao seu nascimento (BARKO *et al.*, 2017).

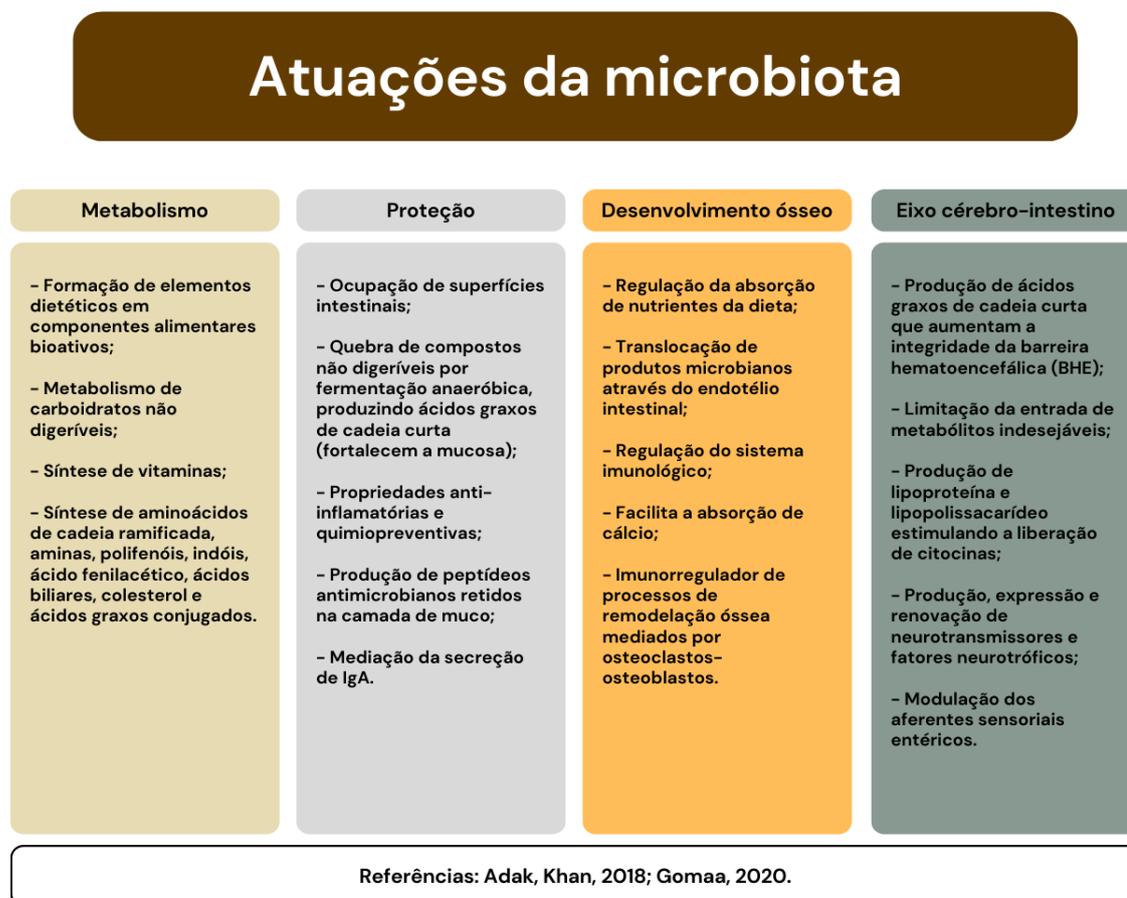
Apesar da diversidade, cada hospedeiro possui uma microbiota própria com um padrão bacteriano exclusivo (SILVESTRE, 2016). Alguns fatores são considerados na modulação da microbiota de cada indivíduo, como dieta (alto consumo de carne vermelha e baixo consumo de fibras), idade, genética, prática física, ato de fumar e até mesmo o ambiente geográfico (HADJIPETROU *et al.*,

2017;SONG, CHAN, SUN; GOMAA, 2020). A modulação clínica da microbiota para fins terapêuticos pode ser feita através da ingestão de prebióticos, probióticos, antibióticos e transplante de microbiota fecal (BARKO *et al.*, 2017; ADAK, KHAN, 2018).

Sua composição conta, principalmente, com bactérias de sete divisões predominantes (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* e *Cyanobacteria*), sendo que *Bacteroidetes* (Gram-negativos) e *Firmicutes* (Gram-positivos) constituem mais de 90% da população total saudável (ADAK, KHAN, 2018; ALHINAI, WALTON, COMMANE, 2019). Muito se fala sobre as bactérias no tocante à microbiota porque pouco se sabe sobre os outros micro-organismos presentes, tais como fungos, protistas, *Archea* e vírus (GOMAA, 2020).

Dado o seu lugar significativo ocupado nos humanos, sua importância nos mais diversos estudos das áreas da saúde têm aumentado, incluindo até mesmo estudos de microbioma (genoma da microbiota) e metagenoma (genoma conjunto de humanos e microbiota), visto que pelo menos 600.000 genes que existem nos indivíduos são oriundos destes micro-organismos (SILVESTRE, 2016). O microbioma é, inclusive, cerca de 150 vezes maior que o genoma humano (ADAK, KHAN, 2018). Com estes estudos, a função da microbiota também foi mais esclarecida, descobrindo-se que sua atuação envolve o metabolismo de nutrientes da dieta, síntese de nutrientes essenciais ao organismo, modulação da resposta imune, e outras que podem ser observadas na figura abaixo (figura 2) (BARKO *et al.*, 2017; WONG, YU, 2019; SONG; CHAN, SUN, 2020):

Figura 2 – Funções da microbiota na homeostase do hospedeiro



Antigamente, a grande dificuldade em torno de se estudar a microbiota/microbioma era o fato de apenas métodos de cultivo estarem disponíveis, os quais eram demorados e não forneciam dados de tamanho populacional. Depois de vários estudos, outras duas técnicas utilizadas hoje facilitaram consideravelmente a abordagem metagenômica: amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) de RNA ribossômico 16S e sequenciamento de genoma completo (WGS), ambos por sequenciamento de nova geração. O primeiro é mais barato e é realizado para executar estudos em larga escala para identificação de bactérias; o segundo, apesar de mais caro, permite uma identificação mais precisa do gênero e espécie microbianas, possui maior sensibilidade e está se tornando o escolhido para análises metagenômicas (JOHNS; PETRELLI, 2021).

O que se considera uma microbiota saudável é o equilíbrio entre as espécies de micro-organismos, contribuindo para a homeostase do indivíduo. Em grande

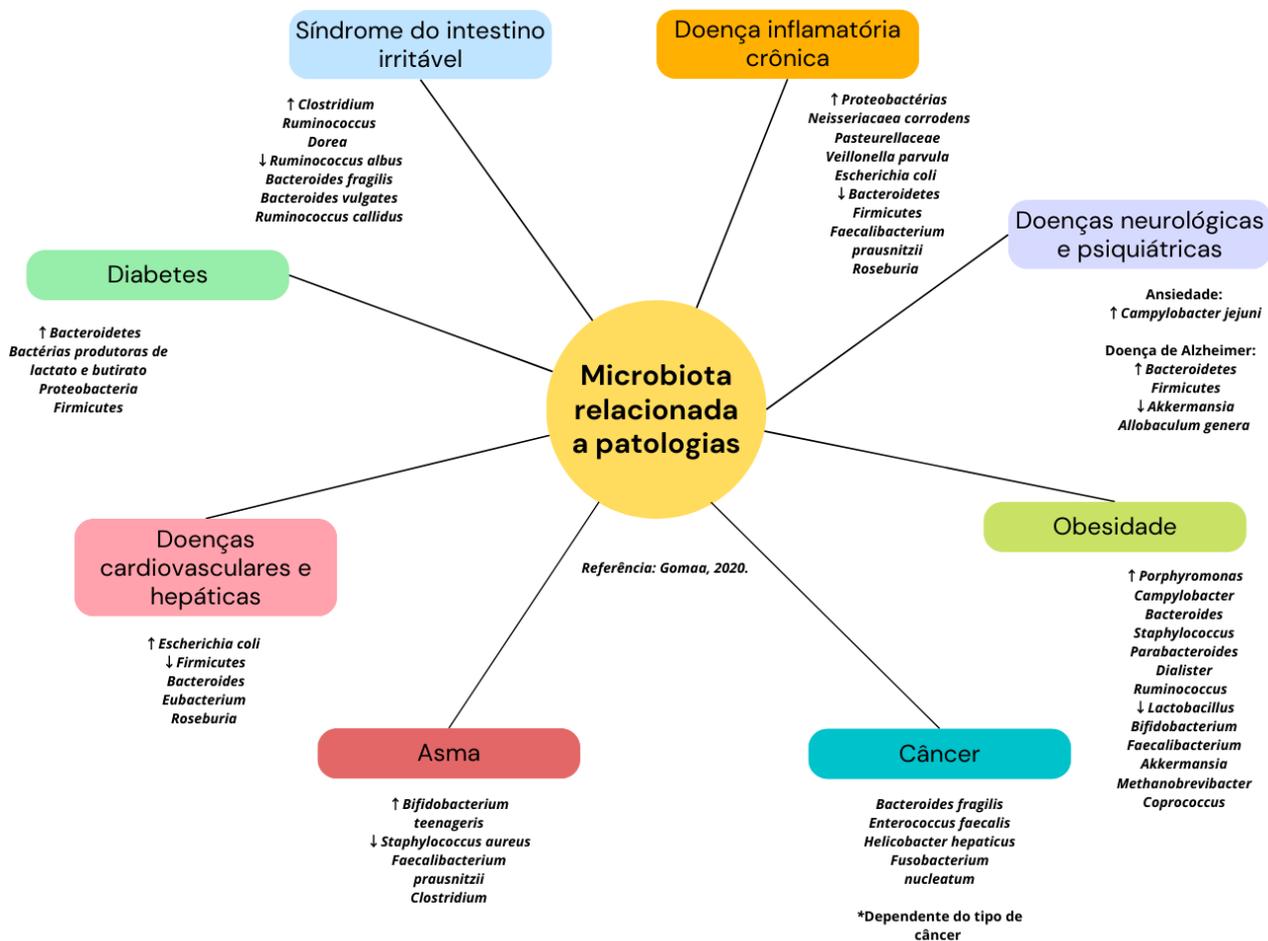
parte da vida de um adulto saudável, a microbiota intestinal é considerada regular. O intestino humano fornece um ambiente propício para o crescimento bacteriano, principalmente por ser protegido e rico em nutrientes. Essa relação hospedeiro-microbiota tem chamado a atenção de pesquisadores que tentam desvendar os mecanismos complexos atuantes, bem como o papel da disbiose na patogênese de doenças e na iniciação, desenvolvimento e resposta a tratamentos de diversos cânceres, principalmente aqueles em tecidos ricos em microbiota e expostos constantemente a micro-organismos (SILVESTRE, 2016; LI, 2022).

4.2 MICROBIOTA E A INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS

Há um estabelecimento crescente da relação entre microbiota/microbioma e doenças humanas. Desde 2008, quando foi criado, o Projeto Microbioma Humano se esforça para conseguir representar a diversidade do microbioma humano e analisar sua influência na saúde e doenças humanas (JOHNS; PETRELLI, 2021). Estudos observaram que pacientes com certas doenças intestinais possuem, na sua microbiota, uma maior abundância de bactérias patogênicas e redução de benéficas, sendo que as patogênicas contribuem para o desenvolvimento e progressão das doenças (DUBINSKY; DOTAN; GOPHNA, 2020). Ademais, pacientes saudáveis possuem outro perfil de bactérias que hospedam, apresentando um maior equilíbrio, variedade e menor atuação de patogênicas (WONG, YU, 2019; SONG; CHAN; SUN, 2020).

A disbiose prejudica uma variedade de papéis que a microbiota desempenha, tais como absorção de nutrientes, biossíntese de vitaminas, desenvolvimento do sistema imunológico, manutenção da integridade da mucosa e resistência contra patógenos. Sua relação se dá não apenas com doenças do trato gastrointestinal, mas também cardiovasculares, metabólicas e neuropsiquiátricas (figura 3) (WONG, YU, 2019). Pode, também, promover a carcinogênese, com trabalhos demonstrando a associação entre ciclos repetidos de antibióticos e o desenvolvimento de diversos tumores. Dentre os observados, encontram-se o CCR, carcinoma hepatocelular e câncer de mama (VEZIAN, 2021).

Figura 3 – Doenças relacionadas com a microbiota e bactérias prevalentes

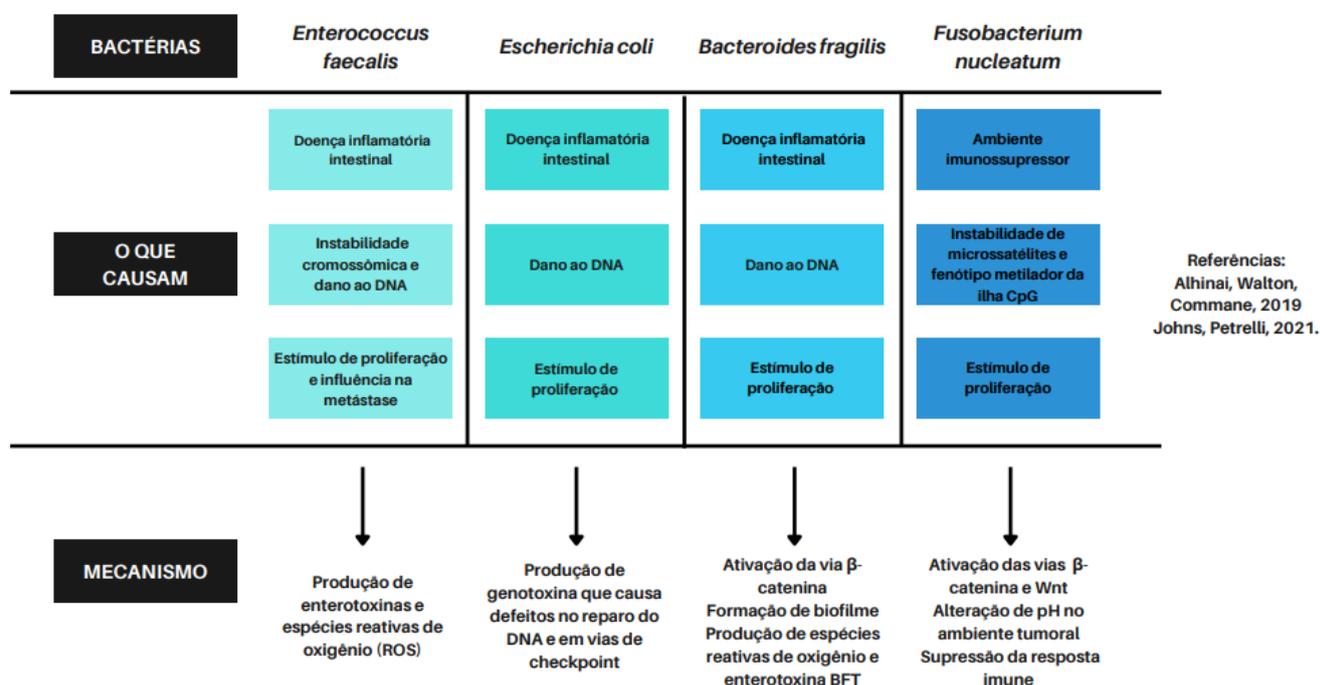


4.3 MICROBIOTA E O CÂNCER COLORRETAL

A primeira investigação que relacionou câncer colorretal e bactérias do trato gastrointestinal foi feita em 1969, comparando culturas de fezes de populações consideradas de “alta incidência” e “baixa incidência” e analisando a prevalência de certos gêneros e espécies. Posteriormente, metabólitos bacterianos e outras substâncias passaram a ser alvo de investigação, como ácidos biliares e ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) (JOHNS; PETRELLI, 2021). A patogênese que essas bactérias estão envolvidas em relação ao desenvolvimento tumoral se dá por várias razões, incluindo: secreção de toxinas que levam ao dano do DNA, ativação de vias de sinalização que promovem proliferação celular, desencadeamento da liberação de citocinas pró-inflamatórias e aumento da expressão de genes relacionados à autofagia (LI *et al.*, 2022).

Ademais, há indícios de influência da microbiota no sucesso de terapias antitumorais. Estudos demonstraram que as bactérias podem interferir negativamente nos inibidores de checkpoint imunológico na imunoterapia, bem como em quimioterapias como as baseadas em ciclofosfamida, oxaliplatina e gencitabina, e cirurgia, principalmente no tocante ao desenvolvimento de uma complicação pós-operatória conhecida como fístula anastomótica. Ademais, demonstra influência prognóstica de sobrevivência ao câncer, principalmente o CCR, sendo as mais relacionadas com um mau prognóstico a *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides fragilis* enterotoxigênico, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* (WONG, YU, 2019; SONG, CHAN, SUN, 2020; VEZIAN *et al.*, 2021). Os mecanismos de ação das bactérias citadas podem ser observados na figura abaixo (figura 4):

Figura 4 – Papel de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis* e *Fusobacterium nucleatum* no desenvolvimento neoplásico



5 CÂNCER COLORRETAL

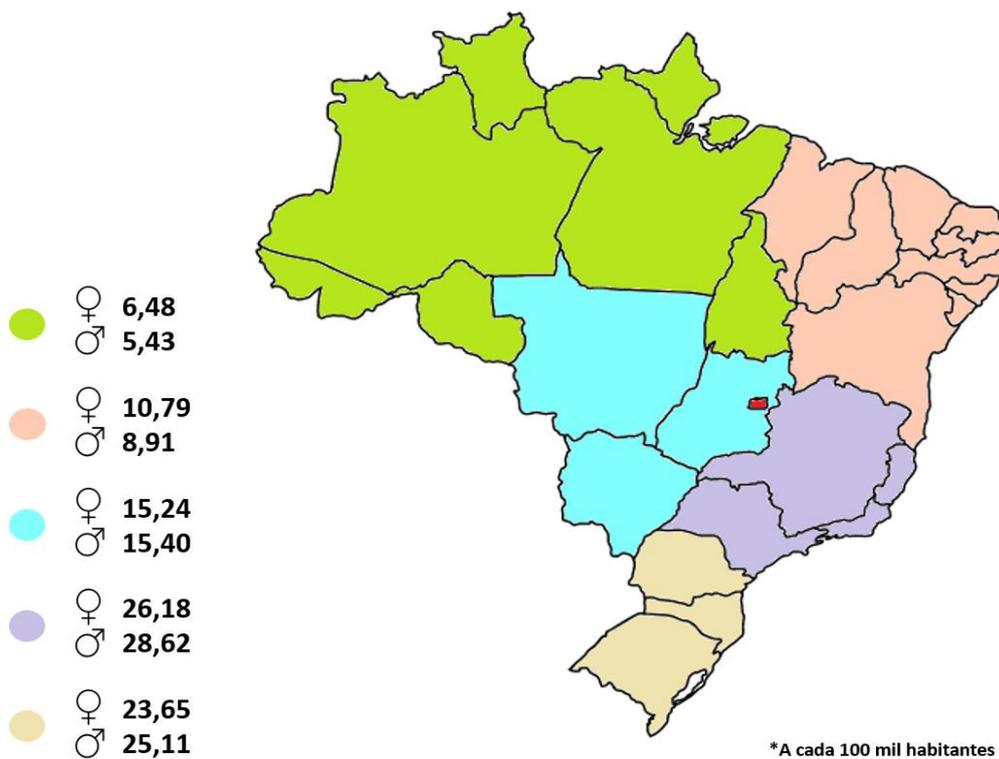
5.1 EPIDEMIOLOGIA

As doenças gastrointestinais têm uma das maiores taxas de incidência em todo o mundo, dividindo-se, basicamente, em dois grupos: doenças inflamatórias intestinais e cânceres (STRAKOVA; KORENA; KARPISKOVA, 2021). Segundo a Organização Mundial da Saúde (2022) e Jinet *et al.*, (2020), o câncer é a principal causa de morte ao redor do mundo, contando com cerca de 10 milhões de mortes em 2020. O câncer colorretal, especificamente, é o terceiro mais comum (cerca de 1.93 milhões de casos no mesmo ano), atrás apenas do câncer de mama (2.26 milhões) e de pulmão (2.21 milhões de casos), e é a segunda causa de morte associada ao câncer (916.000 mortes em 2020). Há uma média de mais de 600.000 mortes por ano, sendo que, em 2030, há previsão desse número ultrapassar 1.100.000 (Llet *et al.*, 2022).

No Brasil, a incidência maior é na população que possui entre 50 a 70 anos, com possibilidade de desenvolvimento neoplásico aumentado a partir dos 40. O sudeste e sul do país apresentam incidência similar a de países industrializados, provavelmente pela semelhança entre seus hábitos de dieta e estilo de vida (RODRIGUES *et al.*, 2016). Os países industrializados, inclusive, conhecidos como possuintes de um nível alto/muito alto do índice de desenvolvimento humano (IDH), apresentam maior taxa de incidência de CCR em comparação com países com um baixo IDH. Porém, é importante ressaltar que essas discrepâncias não envolvem apenas mudanças na dieta (como o fato de que países ricos possuem como dieta predominante o consumo de carne vermelha), mas também a baixa disponibilidade de testes de triagem em países pobres, bem como um menor índice de remoção de pólipos pré-cancerosos e uma expectativa média de vida menor em comparação a países de alto IDH (BAIDOUN *et al.*, 2020).

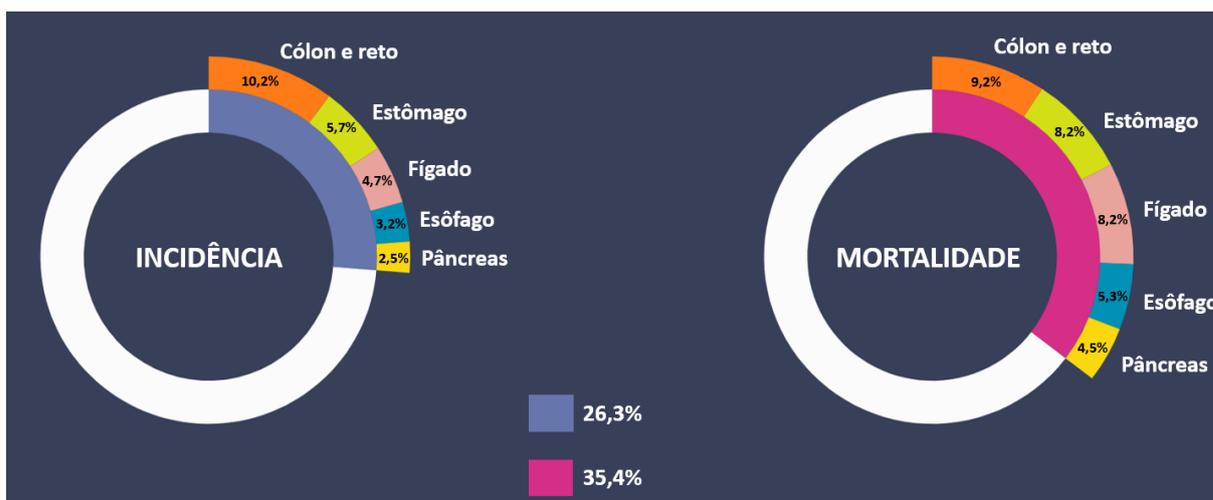
Em relação ao gênero, os homens são mais propensos a desenvolver CCR, com risco aumentado após os 50 anos. A taxa de incidência e mortalidade varia dependendo do país, tendo como explicação o efeito da exposição dietética e ambiental e a predisposição genética individual (JINet *et al.*, 2020). Os dados de incidência e mortalidade por gênero e região do país podem ser observados na figura abaixo (figura 5), bem como por tipo de câncer, presentes na figura 6.

Figura5 – Incidências do câncer colorretal por gênero nas regiões do Brasil



Fonte: INCA, 2020.

Figura6 – Incidências e mortalidades do câncer colorretal e de outros tipos de cânceres prevalentes na população mundial



Fonte: adaptado de World Health Organization, 2020.

5.2 TRATAMENTO

A primeira escolha de tratamento para casos de câncer colorretal comumente é a cirurgia, sendo realizada em conjunto a uma quimioterapia adjuvante quando o estágio tumoral se encontra em níveis mais avançados. Dentre os alvos dos medicamentos utilizados na quimioterapia, encontram-se biomarcadores moleculares tumorais e o perfil farmacogenômico do paciente, de forma a garantir a melhor resposta possível (DALMASSO, 2014). Normalmente, os medicamentos utilizados incluem fluoropirimidina, oxaliplatina, irinotecano e capecitabina. Outras abordagens incluem radioterapia e imunoterapia. Todas elas demonstraram aumentar a sobrevida dos pacientes com doença avançada em até três anos, porém, a doença continua estando relacionada a um mau prognóstico e baixa sobrevida a longo prazo (STRAKOVA, KORENA, KARPISKOVA, 2021; LI *et al.*, 2022).

A sobrevida dos pacientes com câncer colorretal é altamente dependente do estágio tumoral. O estágio I comumente apresenta um bom prognóstico após a ressecção cirúrgica, enquanto no estágio IV, quando há metástase, as taxas de sobrevida em cinco anos são inferiores a 10%. O diagnóstico precoce, portanto, entra como peça fundamental para garantir a sobrevivência e qualidade de vida dos pacientes (SAUS *et al.*, 2019; LA VECCHIA; SEBASTIÁN, 2020; LIU *et al.*, 2021).

O aumento de programas de triagem são algumas das razões pelas quais se prevê que, em países desenvolvidos, a prevalência de CCR tenderá a ser estabilizada, em contraste com os países em desenvolvimento, com 2,5 milhões de casos até 2035. Um aumento de pacientes com menos de 50 anos diagnosticados com a doença e a baixa taxa de sobrevida também têm sido preocupantes (DEKKER *et al.*, 2019). Este último ocorre quando a doença é descoberta tardiamente, pois vários dos tratamentos utilizados acabam enfrentando resistência por parte do câncer e, muitas vezes, são combinados com a presença de metástases (LA VECCHIA; SEBASTIÁN, 2020). A mortalidade pode ser diminuída por exames preventivos, visto que é considerado um câncer de desenvolvimento lento (VILLARIBA-TOLENTINO, 2021; LI *et al.*, 2022).

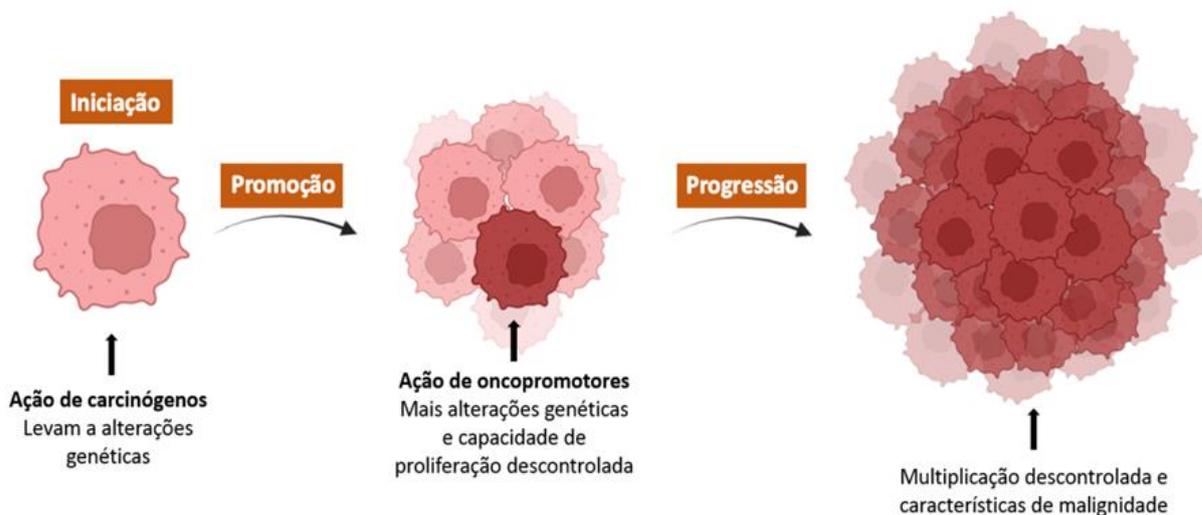
Os testes de rastreio do CCR incluem colonoscopia, enema de bário com duplo contraste, colonografia por tomografia computadorizada, sigmoidoscopia

flexível, endoscopia de cápsula do cólon, e testes de triagem como os de visualização indireta e direta, os baseados em sangue, e os baseados em fezes (HADJIPETROU *et al.*, 2017; KANTH, INADOMI, 2021). Estes incluem, principalmente, o teste imunológico fecal atual e o teste de DNA de fezes multialvo. Ambos possuem uma sensibilidade abaixo do ideal, principalmente para adenomas colorretais avançados. A colonoscopia, por sua vez, apresenta um alto custo, desconforto para o paciente e riscos de perfurações e sangramentos (SAUS *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2021). Os marcadores microbianos surgiram, recentemente, como indicadores promissores no diagnóstico precoce do câncer colorretal, já que são fatores de predisposição ao CCR e servem para avaliar cepas presentes em amostras fecais, tais como *Bacteroides fragilis*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis* e outras, e quantificando-as (WONG, YU, 2019; VEZIANI, 2021).

5.3 DESENVOLVIMENTO

O câncer se inicia a partir de várias alterações genéticas e epigenéticas que vão se acumulando nas células somáticas. Essas alterações levam a um ganho de função que pode gerar uma proliferação celular descontrolada, levando à formação de um tecido tumoral heterogêneo (figura 7). Este tecido mantém uma interação com outras células tumorais, permitindo sua sobrevivência e invasão (JIN; DARIYA *et al.*, 2020). Em estágios iniciais, o câncer colorretal é considerado um câncer silencioso, permanecendo assintomático até estágios mais avançados da doença. Sinais e sintomas incluem sangramento retal oculto ou manifesto, alteração nos hábitos intestinais, anemia e dor abdominal (DEKKER *et al.*, 2019).

Figura 7 – Etapas de desenvolvimento do câncer



Referência: Compton, 2020.

O aparecimento do CCR geralmente segue o modelo de patogênese Adenoma-Carcinoma, o qual envolve a presença de pólipos: lesões precursoras neoplásicas que podem evoluir para CCR em cerca de 10 a 15 anos. A célula originária provavelmente são células-tronco cancerosas, residentes na base das criptas colônicas e resultantes de um acúmulo de alterações genéticas que afetam oncogenes e genes supressores de tumor. As duas vias principais que geram lesões precursoras são: via tradicional adenoma-carcinoma (representa cerca de 60-70% dos cânceres colorretais) e via serrilhada (15-30%) (HADJIPETROU, 2017; JIN, 2020; KANTH, INADOMI, 2021). A primeira normalmente se inicia com uma mutação no gene APC, comumente envolvido em CCR, seguido por ativação de oncogenes RAS ou inativação do gene supressor de tumor TP53. A segunda normalmente está associada a mutações em genes RAS e RAF e instabilidade epigenética, caracterizada por instabilidade cromossômica, fenótipo metilador da ilha CpG (CIMP), instabilidade de microssatélites (MSI) e/ou hipometilação global do DNA (LEE-SIX *et al.*; DEKKER *et al.*, 2019; JIN *et al.*, 2020).

O desenvolvimento carcinogênico no intestino grosso é multifatorial e vários fatores genéticos e ambientais contribuem para o seu aparecimento. Alterações genéticas e epigenéticas em proto-oncogenes, genes supressores de tumor e/ou genes de reparo podem levar à tumorigênese (SAUS *et al.*, 2019). Apesar das síndromes de predisposição ao câncer colorretal serem bem definidas, como por

exemplo, a síndrome de Lynch, polipose adenomatosa familiar e síndrome de Peutz-Jeghers, elas representam uma minoria de todos os casos de CCR. Os CCRs de origem hereditária representam cerca de 10-20% de todas as causas, podendo ser uma síndrome genética polipose ou não polipose (DEKKER *et al.*, 2019). Este baixo número chama a atenção para fatores ambientais, os quais parecem desempenhar um maior papel na tumorigênese (WONG, YU, 2019).

Dentre os fatores predisponentes de causa não genética, encontram-se o tabagismo, consumo de álcool, obesidade, diabetes edieta rica em alimentos industrializados, gorduras, carne vermelha e baixo consumo de fibras (SAUS *et al.*, 2019). Ademais, cerca de 15-20% são relacionados a micro-organismos e infecções, sendo um dos exemplos mais conhecidos na literatura a atuação da *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) no desenvolvimento do câncer gástrico, além do câncer hepatocelular (vírus da hepatite B e C) e cervical (papilomavírus humano) (COUGNOUX *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*; VEZIAN *et al.*, 2016; WONG, YU, 2019). As bactérias possuem mecanismos de carcinogênese distintos, como geração de inflamação crônica por ativação de cascatas inflamatórias, atuação de receptores de reconhecimento de padrões e produção de toxinas que causam danos ao DNA, como a toxina distensora citoletal (CDT) e a colibactina (WONG, YU, 2019).

Tecidos com alta exposição à microbiota, como o cólon humano, abrigam certos tipos de câncer. A existência de 10^{13} micro-organismos no cólon em contraste com 10^2 no duodeno e 10^8 no íleo distal explicam o maior risco de câncer no intestino grosso do que no delgado (COUGNOUX *et al.*, 2014; VEZIAN *et al.*, 2016). Estudos utilizando camundongos modificados susceptíveis ao CCR ou com inflamação crônica induzida desenvolveram menos tumores quando livres da colonização por micro-organismos do que os que mantiveram sua microbiota normal (COUGNOUX *et al.*, 2014).

5.4 INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA

Quando *Helicobacter pylori* passou a ser investigada como um fator de risco para o desenvolvimento do câncer de estômago, a microbiota e bactérias patogênicas que poderiam eventualmente infectar o ser humano passaram a ser enxergadas com outros olhos (DALMASSO *et al.*, 2014; WASSENAAR, 2018). A microbiota de indivíduos saudáveis é relativamente similar à de pacientes com

CCR;entretanto, micro-organismos específicos se mostram de forma significativamente enriquecida nos doentes, ocorrendo o que chamamos de disbiose (VEZIAN *et al.*, 2016; SAUS *et al.*, 2019).

Na disbiose (desequilíbrio da microbiota), a permeabilidade intestinal é aumentada, estando relacionada a várias doenças inflamatórias intestinais, incluindo CCR. Uma das causas são os metabólitos que ativam fatores inflamatórios e vias pró-carcinogênicas, envolvendo, por exemplo, citocinas, interleucina-6 e fator de necrose tumoral- α , danificando o epitélio e suas junções; e metabólitos que danificam diretamente as células, como os produzidos por certos micro-organismos patogênicos oportunistas pró-inflamatórios (COUGNOUX *et al.*, 2014; SAUS *et al.*, 2019).

Estes micro-organismos são encontrados em maior quantidade em comparação com bactérias benéficas à homeostase intestinal. Exemplos de pró-inflamatórios incluem *S. gallolyticus* e *bovis*, *F. nucleatum*, *B. fragilis*, *E. faecalis*, *C. septicum* e *E. coli*; exemplos de benéficas incluem gêneros como *Roseburia*, *Clostridium*, *Faecalibacterium* e *Bifidobacterium*. Alguns vírus, como citomegalovírus e bacteriófagos, e fungos, como *Malassezia*, também demonstraram uma maior abundância em indivíduos com CCR em relação a controles saudáveis (WONG, YU, 2019). As diferentes combinações e composições de bactérias da microbiota atuam sinergicamente na carcinogênese (VEZIAN *et al.*, 2016; SAUS *et al.*, 2019; OLIERO *et al.*, 2021).

O ambiente tumoral, quando instalado, pode propiciar a proliferação de certas espécies bacterianas. A maioria das neoplasias contém regiões sujeitas à hipóxia devido à proliferação intensa de células, vascularização aberrante e suprimento sanguíneo deficiente no tecido canceroso. Este microambiente propicia a proliferação de micro-organismos anaeróbios obrigatórios, como *Clostridium sp.*, e *Bifidobacterium sp.*, e anaeróbios facultativos, como *Pseudomonas sp.* e *Escherichia coli* (Drózdź *et al.*, 2020).

Porém, questões focadas em qual seria o papel das bactérias especificamente no desenvolvimento do tumor, sem que ele esteja presente previamente, começaram a aparecer, e entre essas bactérias, o envolvimento de *E. coli* começou a ser questionado, principalmente para o câncer colorretal. Isso porque

o fato de *E. coli* ser frequentemente encontrada e acumulada em lesões tumorais do cólon (algumas vezes sendo até o único micro-organismo encontrado ali) chamou atenção. Diversos estudos a fim de detectar a quantidade dessa bactéria em tecidos foram realizados, e a maior parte deles detectou um número relativamente maior da presença da bactéria em adenomas, carcinomas e biópsias de pacientes com Doença de Crohn, CCR, diverticulose e colite ulcerativa, em comparação a controles (DALMASSO *et al.*, 2014; WASSENAAR, 2018).

A *E. coli* está presente, hoje, em 90% dos indivíduos, sendo as primeiras colonizadoras poucas horas após o nascimento do indivíduo (MARTINSON, WALK, 2020). O termo “patobionte” passou a ser designado para ela por ser uma espécie bacteriana que pode causar doença quando o hospedeiro se encontra em disbiose ou imunidade baixa. Uma das razões para sua designação é o fato da bactéria ser capaz de regular negativamente a expressão de proteínas de reparo do DNA e pela produção de toxinas com capacidade carcinogênica, causando estresse e dano celular (DALMASSO *et al.*, 2014; SILVESTRE, 2016). Além disso, desempenham um papel na formação de mediadores da inflamação e espécies reativas de oxigênio (ROS), induzindo estresse oxidativo e aumento na atividade da mieloperoxidase, os quais foram observados em estágios iniciais da formação tumoral (VEZIAN *et al.*, 2016).

As toxinas produzidas incluem ciclomodulinas, classe de toxinas conhecidas como moduladoras da diferenciação, proliferação celular e apoptose. A colibactina, uma das mais estudadas atualmente, está incluída nessa classe, causando quebras na fita-dupla do DNA e interrupção transitória do ciclo celular na fase G2-M. Essa toxina é frequentemente associada ao câncer colorretal humano, sendo encontrada em sua maioria (cerca de 55-66,7%) nos tumores em comparação ao tecido saudável de controles (19-21%). As células infectadas pelas linhagens produtoras possuem probabilidade de sobrevivência, mas defeitos nas vias de reparo aumentam as chances de mutações irreversíveis contribuintes para o desenvolvimento tumoral (DALMASSO *et al.*, 2014; VILLARIBA-TOLENTINO *et al.*, 2021). Dentre as linhagens, encontram-se cepas patogênicas de *Escherichia coli* (NOWROUZIAN, OSWALD, 2012; IFTEKHAR *et al.*, 2021).

6 *ESCHERICHIA COLI*

6.1 VISÃO GERAL

A *Escherichia coli* foi descrita pela primeira vez em 1885, quando o pediatra alemão Theodor Escherich isolou-a das fezes de uma criança acometida por diarreia (MAINIL, 2013). É uma bactéria de bastante interesse mundialmente principalmente por sua alta diversidade genética e fenotípica, a qual ocorre por sua capacidade de transferência horizontal de genes, adaptação ao hospedeiro e expansão do nicho ecológico, garantindo a existência de pelo menos oito grupos filogenéticos (A, 1, B2, C, D, E, F e G) e subgrupos (A0, A1, B1, B22, B23, D1 e D2). O grupo B2 é o maior responsável por doenças extra-intestinais e o que mais possui genes associados à virulência; o filogrupo D é considerado o que possui esses fatores em menor grau (GARCÍA *et al.*, 2016; SARSHAR *et al.*, 2017; AUVRAY *et al.*, 2021). Os genes que determinam a virulência e/ou colonização são contabilizados em cerca de 3.000 genes de um total de 4 a 5 mil do genoma da bactéria (POIREL *et al.*, 2018).

A *E. coli* é uma bactéria Gram-negativa, flagelada, não-formadora de esporo e anaeróbia facultativa que pertence à família *Enterobacteriaceae*, dentro da classe *Gamaprotobacteria* e do filo *Protobacteria* (JANG *et al.*, 2017; MUELLER, TAINTER; DOUGHERTY, JOBIN, 2022). Apesar de possuir uma relação de simbiose com o hospedeiro, sendo a principal residente do intestino grosso, em indivíduos com a imunidade comprometida ou inadequabilidade das barreiras gastrointestinais, mesmo as cepas não patogênicas podem causar infecções em humanos e animais (SALVATIERRA, 2014). Possui forma de bastonete e capacidade de replicar-se a cada, em média, 20 minutos. Cerca de 2 milhões de mortes por ano são causadas por cepas patogênicas de *E. coli* (GARCÍA *et al.*, 2016).

Dentre os patótipos intestinais mais estudados, encontram-se: *E. coli* enteropatogênica, enterotoxigênica, enteroagregativa, enteroinvasora e enterohemorrágica, as quais diferenciam-se entre si de acordo com fatores de virulência e fisiopatologia (GARCÍA *et al.*, 2016). Dentro dos patótipos, há cerca de 700 sorotipos que levam nomes com base em três antígenos do micro-organismo: antígenos somáticos (O – determinado por cadeias de polissacarídeos repetitivos no lipopolissacarídeo), capsulares (K) e flagelares (H) (MAINIL, 2013; JANG *et al.*, 2017; MUELLER, TAINTER, 2022). Alguns possuem mais atenção mundial, como *E. coli*

O157:H7, um sorotipo enterohemorrágico que gera doenças graves transmitidas por água e alimentos contaminados. Ademais, há cepas que causam doenças não relacionadas ao TGI, sendo consideradas *E. coli* patogênicas extraintestinais (ExPEC) (JANG *et al.*, 2017).

Essa bactéria também acaba sendo um alarmante por conta da sua frequente resistência a antibióticos. Os isolados de *E. coli* resistentes e multirresistentes têm aumentado nos últimos anos, desenvolvendo resistências como β -lactamases de espectro estendido, carbapenemases e mecanismos de resistência a quinolonas mediada por plasmídeo, além de clones que apresentam resistência a fluoroquinolonas e cefalosporinas de espectro estendido (VILA *et al.*, 2016).

Vários fatores contribuem para essa característica, incluindo o aumento do uso desses medicamentos indiscriminadamente durante a pandemia de COVID-19, tratamento com antibiótico em animais de sangue quente (os quais são hospedeiros de *E. coli*) que servem à população como alimento, e constante compartilhamento genético entre cepas distintas por meio de plasmídeos e transposons. Este último é o que define que *E. coli* seja tão diversificada, seja fenotipicamente como genotipicamente, variando em características como capacidade de formar biofilme, utilização de fontes de carbono, etc. (JANG *et al.*, 2017; ROTH *et al.*, 2019; LIVERMORE, 2021).

Sua infecção possui, como primeiro obstáculo, a acidez do estômago, onde não há crescimento significativo. Apenas no cólon a bactéria consegue sair da fase *lag* e ir para a fase exponencial. A colonização depende da microbiota instalada no hospedeiro, com a qual os nutrientes são competidos, e também de fatores como a ultrapassagem da mucosa e o escape do sistema imune. Quando se instala no epitélio, seu crescimento continua, com algumas células e bactérias sendo eliminadas pelas fezes e outras permanecendo ali, além da ocorrência de novas infecções que fecham o ciclo, tanto para patogênicas, como para comensais (CONWAY, COHEN, 2015).

O manejo de tratamento varia de acordo com a cepa, gravidade da doença e condições de saúde do indivíduo. A reidratação é a terapia principal para casos de diarreia e muitas vezes a única, já que muitas infecções tendem a ser autolimitadas

e combatidas pelo sistema imune do hospedeiro. Dessa forma, antibióticos não são preferencialmente usados (MUELLER, TAINTER, 2022).

6.2 *E. COLI* PATOGÊNICAS

As *E. coli* patogênicas que infectam os indivíduos causam doenças que variam de diarreia leve à colite grave, enquanto os ExPEC são, normalmente, colonizadores assintomáticos do TGI que apenas causam doença quando migram para outros locais do corpo, causando infecções urinárias, nosocomiais, meningite, sepse, insuficiência renal e outros. Sua detecção se dá por meios de cultura, sendo o MacConkey o mais comumente utilizado, e por testes bioquímicos que confirmarão características como fermentação de lactose, produção de indol, catalase positiva e oxidase negativa (POIREL *et al.*, 2018; MULLER, TAINTER, 2022).

Cepas patogênicas de *E. coli* também têm o que chamamos de ilha de patogenicidade, que são grandes regiões genômicas compostas por genes relacionados à patogenicidade (AUVRAY *et al.*, 2021). Já foram identificadas *E. coli* que promovem, por exemplo, a regulação negativa de proteínas de reparo de incompatibilidade ao DNA e toxinas que modulam o ciclo celular, tais como fator necrosante citotóxico, fator inibidor do ciclo, ligação dependente de intimina codificada por EAE, toxinas de distensão citoletal e colibactina (quadro 1). Essas toxinas são chamadas de ciclomodulinas. Cerca de 30% de todo o genoma da bactéria é representado por PAIs (KHAN, CASH, 2013; COUGNOUX *et al.*, 2014; VILA *et al.*, 2016; WASSENAAR, 2018).

Quadro 1 – Características das ciclomodulinas de *E. coli*

CICLOMODULINAS	GENE CODIFICANTE	SÍTIO DE AÇÃO	FUNÇÃO
Fator necrozante citotóxico	cnf1	Família de proteínas Rho	Inibidor da apoptose, modulando a homeostase mitocondrial e estimulando o ciclo celular pela indução da replicação do DNA e transição G1/S. A desaminação da Rho-GTPase resulta na ativação do citoesqueleto de actina, resultando em multinucleação.
Toxina distensora citoletal	cdtA, cdtB, and cdtC	DNA	Interrupção do ciclo celular por causar quebras de fita-dupla no DNA.
Fator de inibição do ciclo	cif	Cinase 1 dependente de ciclina e enzimas ativadoras de NEDD8	Inibição do ciclo celular por acúmulo de p21 e p27.
Ligação dependente de intimina	eae e Sistema de Secreção tipo III	DNA	O efector eae é introduzido na célula hospedeira por meio do sistema de secreção tipo III e regula negativamente o sistema de reparo de incompatibilidade de DNA (<i>mismatch repair</i>), resultando em quebras de fita-dupla na molécula.
Colibactina	Lócus pks	DNA	O anel de ciclopropano da molécula gera quebras de fita-dupla no DNA por alquilação e formação de adutos de adenina.

Fonte: Khan, Cash, 2013; Wassenaar; NG, Gan, Hagen, 2018; Morgan et al., 2022.

Muitas das cepas virulentas de *E. coli* são classificadas como pertencentes ao grupo B2 e possuem relação com o desenvolvimento tumoral, principalmente com o câncer colorretal. O filogrupo B2 é constantemente associado, pois sua frequência no intestino de pessoas submetidas a dietas ocidentais aumentou, em conjunto com o aumento de casos de CCR. Ademais, *E. coli* B2 são colonizadores de longo prazo no intestino humano, fazendo com que os fatores de virulência que essas cepas produzem atuem por bastante tempo no tecido intestinal, resultando em uma resposta inflamatória crônica e maior risco de desenvolvimento de câncer (WASSENAAR,2018).

A patogênese do filotipo B2 está associada com a interrupção de ciclo celular e indução de senescência causados pelas ciclomodulinas. Ademais, *E. coli* provavelmente reduz a capacidade de outros micro-organismos de converterem agentes carcinogênicos em metabólitos inofensivos, além da própria cepa ter pouca ou nenhuma capacidade dessa conversão. Dentro deste filogrupo, encontra-se a *E. coli* pks+/*E. coli* clb+, bactéria patogênica e virulenta encontrada no TGI de portadores assintomáticos desde os primeiros dias após o nascimento (KHAN, CASH, 2013; WASSENAAR,2018; BOOT *et al.*, 2020).

Essa cepa é considerada possuínte de uma baixa resistência a antimicrobianos em comparação com cepas negativas para a ilha, sendo alguns dos fatores de resistência encontrados as bombas de efluxo e genes como *bacA* (resistência contra bacitracina), *pmrE*, *pmrC* e *pmrF*, envolvidos na resistência contra polimixina. Outros fatores bastante recorrentes são os sistemas de secreção tipo VI, sistemas relacionados à produção de sideróforos (incluindo os genes *yersiniabactin*, *enterobactin*, *salmochelins* e *chuASTUVWXY*) e sistema hemolisina (*hly*) (SARSHAR *et al.*, 2017; SURESH *et al.*, 2021).

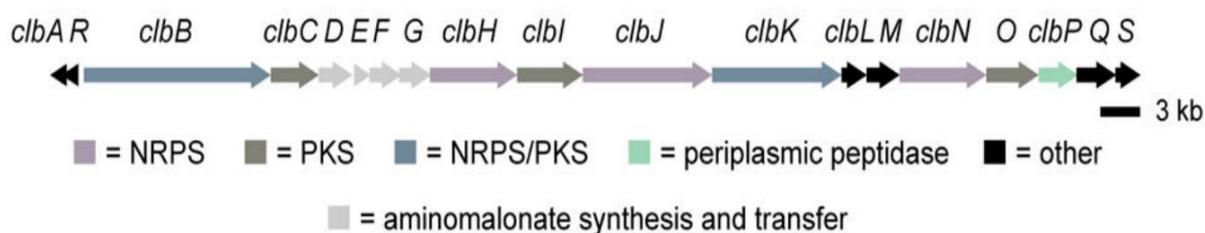
A alta variabilidade genética demonstrou que cepas de *E. coli* *clb+* estão constantemente adquirindo fatores de virulência, seja por elementos genéticos móveis, ilhas genômicas, fagos ou plasmídeos. Essa transferência não ocorre apenas entre cepas da mesma espécie, mas também para outras que já foram isoladas e classificadas como semelhantes à ilha *pkS* de *E. coli*, tais como *K. aerogenes*, *K. pneumoniae* e *C. koseri* (SARSHAR *et al.*, 2017; SURESH *et al.*, 2021). Essa transferência pode ser observada pela análise da semelhança de fatores genéticos entre as espécies. Um exemplo semelhante entre elas é a ilha *pkS*, região genômica responsável pela produção da genotoxina colibactina, a qual será detalhada a seguir (BOOT *et al.*, 2020).

7 COLIBACTINA

7.1 DEFINIÇÃO E ESTRUTURA QUÍMICA

A colibactina é produzida em um cluster de genes de 54kb conhecido como ilha pks (figura8), o qual é composto por genes que codificam para vários peptídeos (NRPS-PKS). Essa ilha de patogenicidade foi identificada, primeiramente, em 2006, no genoma do protótipo ExPEC da cepa de *E. coli* de meningite IHE3034 (SARSHAR *et al.*, 2017; BOSSUET-GREIF *et al.*, 2018; VEZIAN *et al.*, 2021; Llet *et al.*, 2022). É considerada simbiótica e intrigante para os cientistas, pois, apesar de estar relacionada com doenças intestinais conhecidas, tais como polipose adenomatosa familiar, câncer colorretal e doenças inflamatórias, sua estrutura química e atividade biológica necessitam de mais entendimento. O que se sabe, hoje, é que sua atividade genotóxica é dependente de contato e que provavelmente ela se trata de uma toxina instável quando ativa (WILSON *et al.*, 2019; Llet *et al.*, 2022).

Figura8 – Open Reading Frames da ilha genômica pks



Fonte: Wilson *et al.*, 2019.

Essa ilha de patogenicidade se associa a um gene de integrase (o qual provavelmente mediou sua inserção no cromossomo da bactéria) e está localizada em um locus de RNA transportador, flanqueada por duas repetições diretas curtas de 17pb. Essa ilha conservada não é encontrada apenas em *E. coli*, mas também em outros membros da família *Enterobacteriaceae*, tais como *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter koseri* e *Enterobacter aerogenes*, além de outras cepas de *E. coli*, como *E. coli* Nissle 1917 e *E. coli* B2 associada à meningite (GARCÍA *et al.*, 2016; BOSSUET-GREIF *et al.*, 2018; XUE *et al.*, 2019; AUVRAY *et al.*, 2021).

A produção da toxina colibactina envolve a ação de algumas proteínas codificadas por 19 genes que incluem megassintases peptídicas não ribossomais (NRPS, clbH, clbJ e clbN), megassintases de policetídeos (PKS, clbC, clbI, e clbO),

duas NRPS-PKS híbridas (clbB e clbK), e nove enzimas acessórias e de adaptação (JANG *et al.*, 2017; WERNKE *et al.*, 2020; STRAKOVA; KORENA, KARPISKOVA, 2021). A pré-colibactina é considerada uma pró-droga que depende da clivagem da cadeia lateral de N-miristoil-d-asparagina (C14-Asn) para que a colibactina seja ativada e liberada. A região genômica de PKS-NRPS não produz apenas a colibactina, mas também lipopeptídeos analgésicos (como o C12-Asn-GABA), que se difundem para neurônios sensoriais a fim de diminuir a algia do hospedeiro, sideróforos (elementos de captação exógena de ferro extremamente importantes para o metabolismo e replicação bacteriana), antibióticos e confere proteção contra a degradação nucleolítica por nucleases (AUVRAY *et al.*; DOUGHERTY, JOBIN, 2021; MARTINS, 2022).

Os NRPSs e PKSs são modificados depois de sua tradução para funcionar como uma linha de montagem que produz as pré-colibactinas inativas. Os intermediários biossintéticos de pré-colibactina são retirados da linha de montagem pela tioesterase ClbQ, seguindo para a bomba ClbM para serem transportadas para o periplasma bacteriano. Junto com o papel do clbS, o fato da toxina ser transportada também garante uma proteção para a célula bacteriana (BOSSUET-GREIF *et al.*, 2018; STRAKOVA; KORENA, KARPISKOVA, 2021).

Apesar de mais comum à cepa B2, a colibactina não está presente apenas neste filogruppo. A ilha pks foi adquirida de formas diferentes em alguns subgrupos, sendo ou pelo mais recente ancestral comum, que é o caso de cepas B2, ou por eventos esporádicos de transferência lateral, como ocorrido nas cepas A e B1, ou até mesmo por ação da transferência horizontal de genes, quando cepas distintas de B2 são pks+ e apresentam sequência genética similar. Inclusive, a sequência genética da ilha pks é altamente conservada, apresentando mais de 99% de similaridade entre a população de *E. coli*. Ademais, a ilha pks é evolutivamente interessante à bactéria, fato que é reforçado pela energia despendida e espaço ocupado em seu genoma para transcrever e traduzir uma ilha genômica de 54kb e 19 genes (AUVRAY *et al.*; VEZIAN *et al.*, 2021).

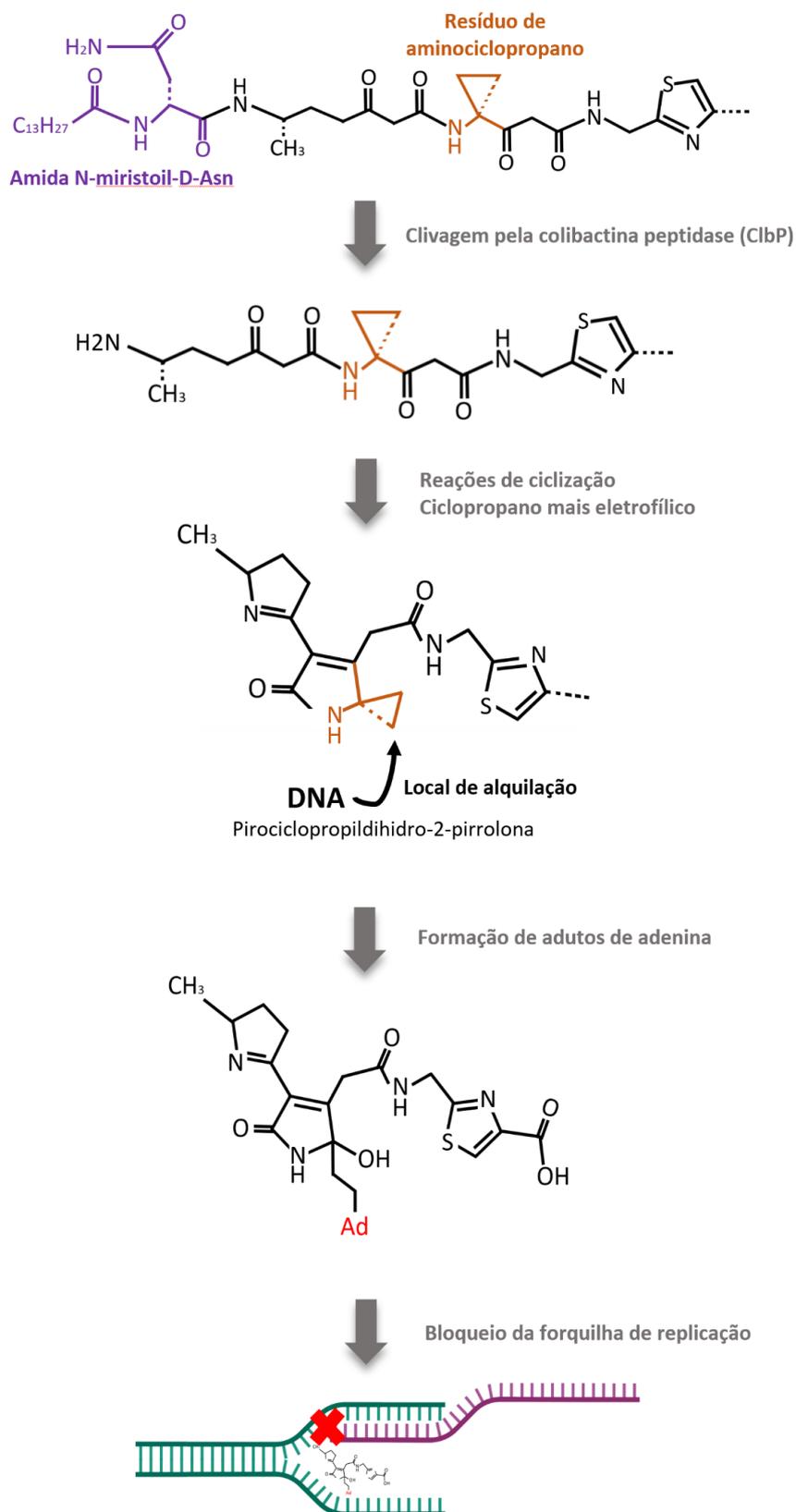
Havia uma grande dificuldade em torno do descobrimento do mecanismo de ação da colibactina pela falta de se conseguir isolar a molécula para realizar estudos mais profundos. Dessa forma, outras abordagens foram e têm sido aplicadas para

este fim, tais como análises de enzimologia, bioinformática, caracterização de intermediários biossintéticos, entre outros. Todos os dados alcançados deram uma idealização do que seria a estrutura e a bioatividade da colibactina (XUE *et al.*, 2019).

Porém, por conta de seu papel na carcinogênese colorretal, muitos estudos com foco na estrutura química e mecanismo de ação da colibactina e outros metabólitos da ilha pks passaram a ser desenvolvidos (WERNKE *et al.*, 2020). Foi observado que esses metabólitos, em sua maioria, contêm um anel de ciclopropano, característica estrutural encontrada em agentes alquilantes do DNA. Esses agentes atuam como eletrófilos em direção aos nucleotídeos da molécula, gerando modificações covalentes denominadas adutos. Essa descoberta propôs que o mecanismo de ação da colibactina envolve, portanto, a alquilação do DNA *in vivo*, processo que gera mutações em oncogenes e genes supressores de tumor e que, por sua vez, contribui para a tumorigênese (WILSON *et al.*, 2019; VEZIAN *et al.*, 2021).

O processo de alquilação causado pela colibactina pode ser observado abaixo (figura9). A colibactina é formada a partir da pré-colibactina, a qual que tem, como principais grupos estruturais, amida Nmiristoil-D-Asn terminal e um resíduo de aminociclopropano. A amida terminal é clivada no periplasma bacteriano por uma serina protease conhecida como colibactina peptidase (CibP), gerando uma amina resultante que sofre uma série de reações de ciclização para gerar o que chamamos de pirociclopropildihidro-2-pirrolona. Essas ciclizações fazem com que o ciclopropano se conjugue com uma imina e uma amida, tornando o ciclopropano eletrofílico (ou seja, apresentando afinidade por elétrons) e capaz de alquilar o DNA. Essa alquilação ocorre principalmente com adeninas da molécula, formando adutos de adenina que impedem o prosseguimento da forquilha de replicação. Estudos recentes propõem um segundo local reativo ao DNA além dos adutos de adenina, mas essa segunda alquilação ainda não foi elucidada (XUE *et al.*; THAKUR, MALAISÉ, MARTIN, 2019).

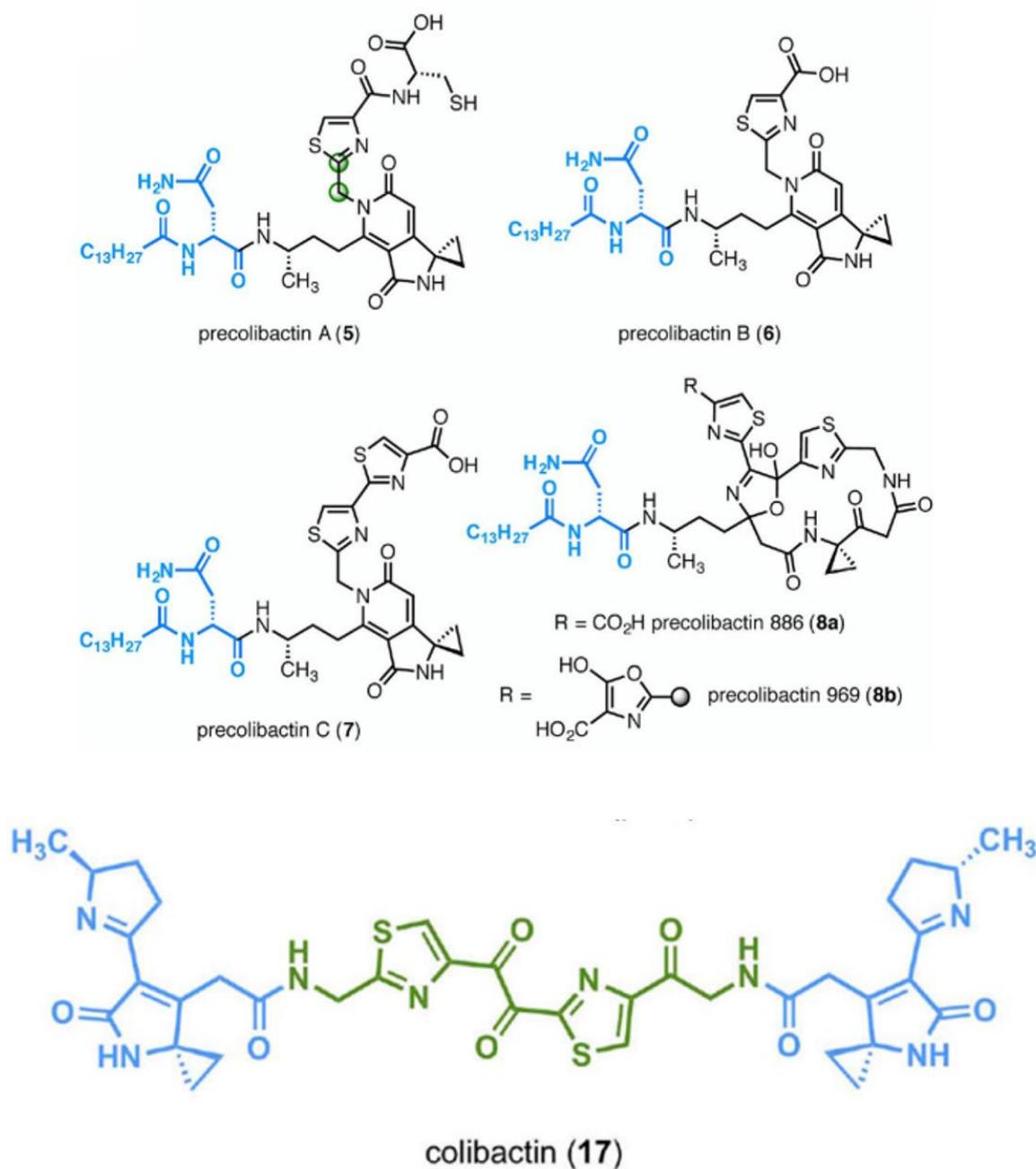
Figura9 – Biossíntese da colibactina e formação de adutos de adenina



Fonte: Xue *et al.*; Thakur, Malaisé, Martin, 2019.

Pelo fato de uma das principais etapas bioquímicas ser a clivagem pela ClbP, muitas mutações têm sido geradas nela a fim de se tentar isolar as pré-colibactinas e estudar a estrutura. Algumas das pré-colibactinas isoladas podem ser observadas abaixo, além da estrutura final proposta como a verdadeira colibactina (figura10) (XUE *et al.*, 2019):

Figura 10 – Pré-colibactinas isoladas e estrutura proposta da colibactina



Fonte: adaptado de Xue *et al.*, 2019.

7.2 MECANISMO DE AÇÃO E EFEITOS NO DNA

O principal mecanismo de dano pode ser explicado pela própria ação da estrutura química da molécula da colibactina quando alquila o DNA. A alquilação promove quebras de dupla-fita, provavelmente por consequência dos próprios mecanismos celulares de reparo ativados, como a ativação da via de ponto de checagem de dano ao DNA G2-M (THAKUR, MALAISÉ, MARTIN; KAWANISHI *et al.*, 2019; DZIUBAŃSKA-KUSIBAB *et al.*, 2020; IFTEKHAR *et al.*, 2021).

Após a formação dos adutos de adenina, as ligações cruzadas do DNA da colibactina sofrem depurinação via β -eliminação, provavelmente por ação de glicosilases (DZIUBAŃSKA-KUSIBAB *et al.*, 2020). A depurinação é a liberação de bases púricas de ácidos nucleicos formando sítios apurínicos, nos quais a estrutura covalente do DNA torna-se mais suscetível a mutações, carcinogênese e destruição espontânea (AN *et al.*, 2014). Nesses sítios, DNAs polimerase de translesão e a via de excisão de nucleotídeos de adeninas alquiladas podem atuar, sendo propensos a erros e levando a quebras (DZIUBAŃSKA-KUSIBAB *et al.*, 2020).

Além da alquilação, foi observado também que a colibactina apresenta capacidade de realizar ligações cruzadas entre cadeias no DNA (ICLs). Essa característica não se aplica apenas à colibactina, pois quando outros genes do cluster se encontram mutados, a propriedade de gerar ligações cruzadas se perde. O único gene que, quando mutado, não afeta na atividade genotóxica da molécula de colibactina, é o *clbS*, uma ciclopropano hidrolase que serve para inativar as colibactinas da bactéria produtora, a fim de protegê-la da autotoxicidade (BOSSUET-GREIF *et al.*, 2018).

As ICLs geram uma resposta de reparo dependente de ATR (quinase relacionada ao Rad3) ao bloquear o avanço da forquilha de replicação. Essa via de reparo inclui a convergência de dois garfos de replicação na região das ligações cruzadas, desmontagem do replissoma e ativação do ATR, gerando parada do ciclo celular antes mesmo de se iniciar a mitose e quebras de dupla-fita (WERNKE, 2020). Ocorre, assim, a fosforilação da quinase de checkpoint 2 (CHK2), da proteína de replicação Ae da histona γ H2AX pela quinase mutada de ataxia-telangiectasia. A CHK2 fosforilada, então, fosforila e inativa a quinase CDC25C, ficando incapaz de ativar CDK1/ciclina B, levando à interrupção do ciclo celular resultando na parada do

ciclo celular G2. A ativação da resposta dependente de dano promove o recrutamento da proteína de reparo de ligação cruzada entre fitas FANCD2 para locais γ H2AX fosforilados, sugerindo o envolvimento da via da anemia de Fanconi na reparação de ligações cruzadas geradas por colibactina (SARSHAR *et al.*, 2017; BOSSUET-GREIF *et al.*, 2018; DOUGHERTY, JOBIN; STRAKOVA, KORENA, KARPISKOVA, 2021).

As células com alto número de bactérias, após parada do ciclo, sofrem um processo que chamamos de senescência. O estudo de Dalmasso *et al.* (2014), comparou os comportamentos de xenoinxertos entre enterócitos de *E. coli* que não produzem colibactina (cepas *E. coli* pks-) e *E. coli* pks+ em camundongos. Uma única exposição desses xenoinxertos foi associada a um aumento no crescimento tumoral, indicando um papel importante na proliferação celular.

Dentre as possíveis explicações, incluem-se a indução de perfil de senescência celular. A senescência é um estado irreversível de parada de proliferação gerada por uma gama de estresses celulares, tais como ativação de oncogenes, encurtamento e/ou disfunção de telômeros e danos genotóxicos. Seu fenótipo tem sido associado à ativação tumoral principalmente devido à secreção de mediadores pró-inflamatórios (SECHER *et al.*, 2013).

As células de mamíferos expostas a *E. coli* pks+ exibem algumas características do fenótipo senescente, como por exemplo, megalocitose, parada de ciclo, acúmulo de proteínas como B-galactosidase, proteínas conjugadas com SUMO, fosfo-p53, p21Cip e Retinoblastoma – Rb – e diminuição na expressão de E2F-1 e SENP1) em combinação com a alta expressão de fatores de crescimento como HGF, FGF e GM-CSF, os quais estimulam a proliferação de células vizinhas, mesmo não estando infectadas. A junção dessas duas características é considerada chave no estímulo do crescimento tumoral. O HGF é, inclusive, determinante na progressão do câncer de cólon, além de ser um marcador de mau prognóstico, indutor de invasão celular e alvo para o tratamento de CCR (SECHER *et al.*, 2013; DALMASSO *et al.*, 2014; GARCÍA *et al.*, 2016; SARSHAR *et al.*, 2017; BOSSUET-GREIF *et al.*, 2018; STRAKOVA, KORENA, KARPISKOVA, 2021).

Outro efeito celular causado pela colibactina são as aberrações cromossômicas, as quais incluem perda heterozigótica de miR-34a (suprime a

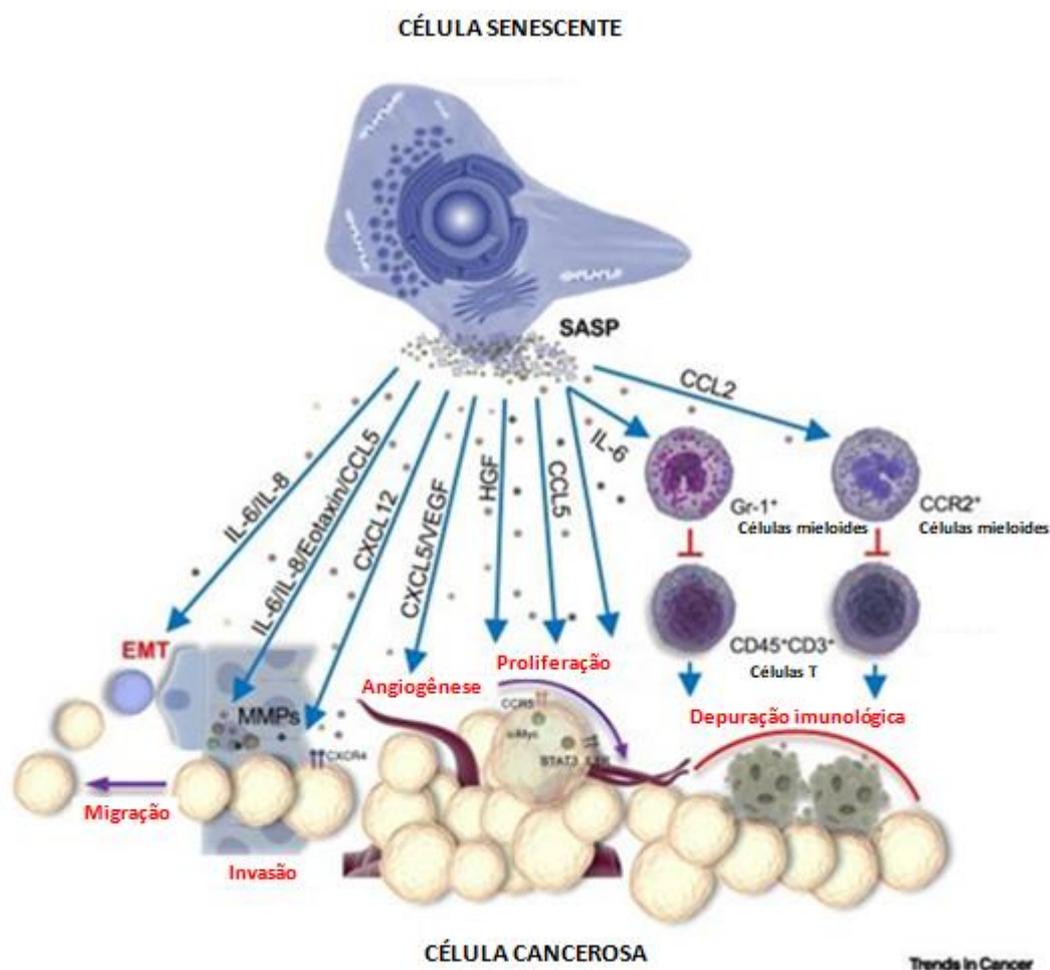
formação tumoral e contribui para a apoptose mediada por p53), variações de nucleotídeo único (SNVs) e variações de número de cópias (CNVs), como células multinucleadas e aneuploidia. Essas mutações são consideradas resultado de um longo processo de dano e perda de reparo por vias celulares, além de serem características (principalmente as CNVs) de estágios iniciais de malignidade do tumor. Apesar de muitas das células afetadas com aberrações cromossômicas terem destinos de parada mitótica ou morte celular forçada, muitas podem sobreviver e permanecer se replicando (DOUGHERTY, JOBIN; IFTEKHAR *et al.*, 2021). Há uma sugestão que as lesões induzidas por colibactina possam levar a mutações em oncogenes e genes supressores de tumor, mas esta é uma evidência que ainda precisa de estudo (THAKUR, MALAISÉ, MARTIN, 2019).

Por fim, outro dano relevante são os causados pela oxidação de adutos de colibactina, os quais podem gerar peróxidos reativos que contribuem ainda mais para o processo danoso ao DNA (BOSSUET-GREIF *et al.*, 2018). Esse estresse oxidativo também ocorre *in vitro*, levando à diminuição da expressão de proteínas de reparo do DNA, como MLH1 e MSH2, aumentando a instabilidade genômica (VEZIAN *et al.*, 2021).

7.3 RELAÇÃO COM O DESENVOLVIMENTO TUMORAL

O microambiente dos tumores necessita que as células tumorais formem uma rede dinâmica onde fatores solúveis e insolúveis (como fatores de crescimento, por exemplo) circundem as células para poderem se regular. A *E. coli* produtora de colibactina, dentro desse contexto, induz a secreção de fatores de crescimento de perfil de células senescentes, promovendo o crescimento tumoral. Apesar de algumas terapias contra o câncer induzirem senescência, esta é feita de forma maciça, diferentemente da gerada por *E. coli pks+*, a qual é direcionada a uma porção do tumor e promove a tumorigênese pela indução da produção de fatores de crescimento que são difundidos a células tumorais não infectadas pela bactéria (figura 11) (COUGNOUX *et al.*; DALMASSO *et al.*, 2014; VEZIAN *et al.*, 2021).

Figura 11 – Fatores produzidos no fenótipo secretor associado à senescência (SASP) e como atuam no desenvolvimento tumoral



Fonte: adaptado de Wang, Kohli, Demaria, 2020.

Dentre os fatores SASP, IL-6 e IL-8 promovem a transição epitélio-mesenquimal; IL-6–IL-6R–STAT3/CCL5–CCR5–c-Myc/HGF contribuem para a proliferação celular; CXCL5 e VEGF promovem angiogênese; CXCL12–CXCR4/IL-6/IL-8/eotaxin/CCL5/MMPs promovem invasão e migração celular; e IL-6 suprime a depuração imune mediada por células T CD45+ CD3+ de células cancerosas pela ativação de células mieloides Gr-1+ (WANG, KOHLI, DEMARIA, 2020).

A patogênese ainda não é um mecanismo muito bem esclarecido, porém, acredita-se que o processo se inicia a partir do contato direto de *E. coli* clb+ com as células intestinais. A partir do contato, a bactéria consegue se aderir e invadir a

célula epitelial do cólon por meio de um receptor chamado molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembrionário 6, e, a partir da invasão, libera a toxina colibactina no tecido (IYADORA *et al.*, 2020). Modelos de xenoenxerto demonstraram que um curto período de contato entre células tumorais e as cepas produtoras de colibactina é suficiente para estimular o crescimento tumoral, sugerindo que mesmo colonizações transitórias podem definir o desenvolvimento do câncer (COUGNOUX *et al.*, 2014).

O contato célula a célula entre bactéria e epitélio intestinal provavelmente ocorre graças às adesinas fimbriais de *E. coli*, as quais promovem ligação e internalização na mucosa colônica e alta afinidade às células secretoras de muco. Dentro da mucosa, essas bactérias podem se encapsular em forma de biofilme, a fim de se proteger das variações do ambiente e da resposta imune do hospedeiro (DOUGHERTY, JOBIN, 2021). Essas estruturas, segundo Dougherty e Jobin (2021), são frequentemente encontradas em pacientes com doenças intestinais, aumentando a profundidade de invasão e facilitando a passagem da genotoxina. Ademais, cepas de *E. coli* invasivas são mais encontradas em tecidos de CCR do que tecidos saudáveis. A camada de muco que compõe a superfície das células colônicas é extremamente importante na diminuição na atividade genotóxica da colibactina, diminuindo a probabilidade de formação de quebras de fita dupla (STRAKOVA, KORENA, KARPISKOVA, 2021).

Cougnoux *et al.* (2014) ressaltaram que provavelmente a *E. coli* pks+ não induza carcinogênese no epitélio do cólon saudável, visto que este possui barreiras de proteção tais como a camada de muco e a produção de peptídeos antibacterianos, o que dificultaria a adesão dessas cepas. Uma das probabilidades citadas foi o papel da inflamação, que, junto com mutações genéticas, impulsionam a promoção do tumor; porém, o estudo em questão não conseguiu provar, por meio de seus experimentos, um aumento do escore de inflamação que poderia comprovar sua ação carcinogênica referente a cepas *E. coli* pks+. O estudo de Strakova, Korena e Karpiskova (2021) observou, porém, que bactérias pks+ podem promover um ambiente imunológico pró-carcinogênico através do comprometimento da resposta antitumoral das células T, levando à resistência tumoral à imunoterapia anti-PD-1.

Além do papel da senescência e inflamação, as aberrações cromossômicas também podem desempenhar um papel no desenvolvimento tumoral. A etapa de iniciação, anteriormente discutida, necessita de mutações genéticas para o desenvolvimento neoplásico e é satisfeita com os danos ao DNA causados pela colibactina de *E. coli*. Outra característica encontrada é que *E. coli* carreadora da ilha pks foi mais frequentemente associada a um fenótipo de CCR estável de microssatélites do que a um fenótipo instável, cujo prognóstico é considerado melhor a longo prazo para os pacientes (VEZIAN *et al.*, 2021).

Ainda assim, os outros papéis envolvidos na tumorigênese precisam ser desvendados, pois não se pode atribuir como causa apenas a presença de cepas de *E. coli* clb+. Uma questão adicional a isso é o fato de *E. coli* Nissle 1917, cepa probiótica que carrega a ilha de patogenicidade pks, ter um histórico confirmado de segurança para tratamento de humanos. Este contexto sugere que a atividade genotóxica da colibactina dependa de contextos ainda não muito bem desvendados, ou que a cepa probiótica possa, a longo prazo, levar a um aumento no risco de desenvolvimento de câncer para o indivíduo que está sob tratamento (YANG, JOBIN, 2020).

Outra questão a ser levantada é a atuação de outras enterobactérias que abrigam a mesma ilha genômica para a colibactina, como a *Klebsiella pneumoniae*, as quais também podem estar envolvidas na tumorigênese do câncer colorretal. Ainda não se sabe exatamente o papel dessas bactérias no desenvolvimento neoplásico, mas acredita-se que possam estar relacionadas com uma contribuição no quadro de inflamação intestinal crônica. A *K. pneumoniae*, particularmente, demonstrou aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias e estar presente em tecidos de pacientes com colite ulcerativa e Doença de Crohn (DZIUBAŃSKA-KUSIBAB *et al.*, 2020; STRAKOVA, KORENA, KARPISKOVA, 2021).

Por fim, apesar dos organoides serem sistemas muito eficazes para o estudo de interações moleculares bacterianas com o tecido humano, muitas outras interações acabam não sendo levadas em consideração, como a ação do sistema imunológico, da inflamação, de outros micro-organismos residentes, da sinergia com assinaturas geradas por outras bactérias, interações celulares, entre outros (YANG, JOBIN, 2020).

7.4 FORMA DE INFECÇÃO E PREVALÊNCIA

Outro problema a ser discutido é a rota de infecção de indivíduos por *E. coli* pks+ e onde ela se iniciaria, visto que sua identificação ainda é limitada e seria de extrema importância para prevenir a infecção (TSUNEMATSU *et al.*, 2021). Foi demonstrado, anteriormente, em modelos de rato, que cepas comensais de *E. coli* pks+ podem ser transmitidas de mães a filhos, e que essa infecção poderia influenciar na homeostase intestinal da criança quando adulta. Sabe-se, hoje, que os recém-nascidos iniciam sua microbiota após a exposição às microbiotas da pele vaginal e materna durante o nascimento, o que explicaria a transmissão. Dessa maneira, este indivíduo poderia, no futuro, ser propenso ao desenvolvimento de câncer colorretal (PAYROSE *et al.*, 2014; SARSHAR *et al.*, 2017; TSUNEMATSU *et al.*, 2021).

Alguns estudos utilizando técnicas de PCR a fim de detectar genes específicos da ilha pks foram feitos. O estudo de Tsunematsuet *al.*, (2021), com o objetivo de confirmar o proposto por Payroset *al.*, (2014), utilizou sondas fluorescentes que são ativadas pela ClbP (enzima que ativa a pró-droga) como forma de detectar as cepas produtoras de colibactina em amostras fecais de indivíduos saudáveis e recém-nascidos. A pesquisa chegou em 15,5% de crianças que abrigavam *E. coli* pks+ imediatamente após o nascimento e 31,4% após um mês, sendo semelhante à porcentagem encontrada em indivíduos saudáveis. Considerando que, uma vez infectado, as cepas permanecem no organismo do indivíduo, foi sugerido que os indivíduos saudáveis se infectem com essas bactérias muito cedo em sua vida, além de que o aumento de cepas pks em praticamente o dobro dentro de apenas um mês mostra que as crianças estão sendo expostas a fontes de *E. coli* pks+ continuamente.

Ademais, o estudo também observou que 87,5% das crianças nascidas de parto natural eram colibactina +, em contraste com 12,5% de crianças nascidas de cesárea. Em relação à amamentação, 26,9% das crianças amamentadas com leite materno tornaram-se colibactina + um mês após o nascimento, contrapondo-se a apenas 5,9% das alimentadas com uma mistura de leite formulado e materno. Apesar de a alimentação ter sido avaliada, o estudo demonstrou que a *E. coli* pks+ provavelmente não é transmitida por alimentos contaminados, e sim pelo contato

direto pele a pele e/ou pele a boca entre mãe e bebê, envolvido na amamentação (TSUNEMATSU *et al.*, 2021).

Outros estudos com o mesmo intuito, como o de Nowrouzian e Oswald (2012), também chegaram a resultados semelhantes. 130 bebês suecos saudáveis foram acompanhados durante os seus primeiros 18 meses de vida para serem avaliados quanto à prevalência da ilha pks no organismo e sua capacidade de persistir na microbiota intestinal. Trinta e três por cento (33%) das cepas avaliadas possuíam a ilha pks, a qual também estava presente, em maior quantidade, em cepas de bactérias colonizadoras de longo prazo. Estas possuem certos fatores de virulência acumulados que favorecem sua colonização persistente, tais como adesinas (fímbrias P e tipo 1), antígenos capsulares, aerobactina, hemolisina, entre outros. Além disso, há teorias de que a ilha pks é utilizada por essas bactérias colonizadoras para diminuir a velocidade de renovação de enterócitos, bloqueando o ciclo celular e promovendo a persistência das cepas.

Os dados apresentados pelos estudos acima reforçam a ideia de que a infecção se inicia a partir da microbiota materna, chamando a atenção para a implementação de medidas que possam reduzir a sua transmissão. Esta poderia ser atingida por meio de procedimentos que prevenissem a infecção durante o parto, pela modulação da microbiota e pela escolha preferencial por cesárea, além de por possíveis futuros tratamentos que visem à erradicação de *E. coli* colibactina + (NOWROUZIAN, OSWALD, 2012; PAYROS *et al.*, 2014; TSUNEMATSU *et al.*, 2021).

Em questões de prevalência, as cepas de *E. coli* pks+ estão presentes em cerca de 20% dos indivíduos saudáveis, 40% com doença inflamatória intestinal e 60% com polipose adenomatosa familiar ou câncer colorretal (PLEGUEZUELOS-MANZANO *et al.*, 2020). Ademais, estudos mostram que a quantidade de cepas *E. coli* pks+ em tecidos humanos saudáveis é consideravelmente menor quando em comparação a tecidos com doenças inflamatórias do TGI, como por exemplo, a colite ulcerativa, e tecidos tumorais, como lesões pré-cancerosas, pólipos e tecidos de câncer colorretal (VILLARIBA-TOLENTINO *et al.*, 2021). O estudo de Lee e Lee (2018) detectou que 32,9% das cepas de *E. coli* isoladas de indivíduos com bacteremia apresentavam a ilha genômica pks. Também foi isolada de pacientes com meningite uropatogênica, infecção sistêmica e linfopenia (SURESH *et al.*, 2021).

Dados metagenômicos fecais de bancos de dados analisados pelo estudo de Dubinsky, Dotan e Gophna (2020) observaram um aumento no gene representativo do agrupamento de biossíntese de colibactina (clbB) em pacientes com doenças inflamatórias intestinais (como a colite ulcerativa, por exemplo) do que em indivíduos saudáveis, sendo que praticamente todas as cópias detectadas de clbB foram produzidas por *E. coli*. É importante recordar que essas doenças inflamatórias estão associadas a um maior risco, para o indivíduo afetado, de desenvolvimento de câncer colorretal em idade jovem, causado, principalmente, pelo longo tempo ao qual o tecido foi submetido à inflamação crônica (DUBINSKY, DOTAN, GOPHNA, 2020).

O estudo de Iyadorai *et al.* (2020), por sua vez, detectou que a presença de *E. coli* foi mais comum em pacientes com câncer colorretal (14,7%) em comparação com controles saudáveis (4,3%), sendo encontrada na lesão tumoral e nos tecidos adjacentes. Outras características encontradas incluíram tumores mais presentes no cólon distal (podendo ser por conta de variedade da microbiota e origem embrionária diferente, diferenciando o metabolismo epitelial) e maior frequência de isolamento em pacientes com câncer em estágio II, explicada, pelos autores, como sendo devido ao acometimento dos linfonodos, o qual pode levar à linfangiogênese e remoção de bactérias indesejadas, como a própria *E. coli* pks+.

Em suma, o estudo de Dougherty e Jobin (2021) avaliou que *E. coli* pks foi isolada de pacientes com doença inflamatória intestinal e câncer colorretal em 13% e 26% de todas as cepas de *E. coli* encontradas, respectivamente, sugerindo um enriquecimento dessa cepa bacteriana nos locais de tumorigênese. Neste mesmo contexto, o estudo de Iftekhar *et al.* (2021) observou que a assinatura específica de colibactina é encontrada apenas em 2,4-10% dos pacientes com CCR, enquanto a *E. coli* produtora de colibactina é encontrada em 67% dos pacientes com CCR. O conceito de assinatura mutacional será detalhada na próxima seção.

8 ASSINATURAS MUTACIONAIS

8.1 CONCEITO

Atualmente, a genética do câncer tem apresentado maior importância nas decisões de diagnóstico e tratamento. O uso de testes moleculares que detectam alterações genéticas e pesquisas que tentam desvendar como elas promovem a carcinogênese e se podem ser utilizados como alvos terapêuticos têm sido cada vez mais aplicados e desenvolvidos, exigindo uma melhor caracterização molecular dos tumores (VAN HOECK *et al.*, 2019).

Recentemente, foi descoberto que as mutações genéticas podem ser utilizadas para fornecer informações sobre a etiologia tumoral e identificar processos mutagênicos que estão ocorrendo na célula neoplásica, servindo como biomarcadores para determinados tipos de cânceres e preditores de terapia. À medida que os custos de sequenciamento diminuem e mais algoritmos de bioinformática para análise de dados vão sendo desenvolvidos, a análise de assinaturas mutacionais aparece como mais uma ferramenta benéfica com potencial uso no câncer (VAN HOECK *et al.*, 2019).

De acordo com o COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer), banco de dados referência em assinaturas mutacionais:

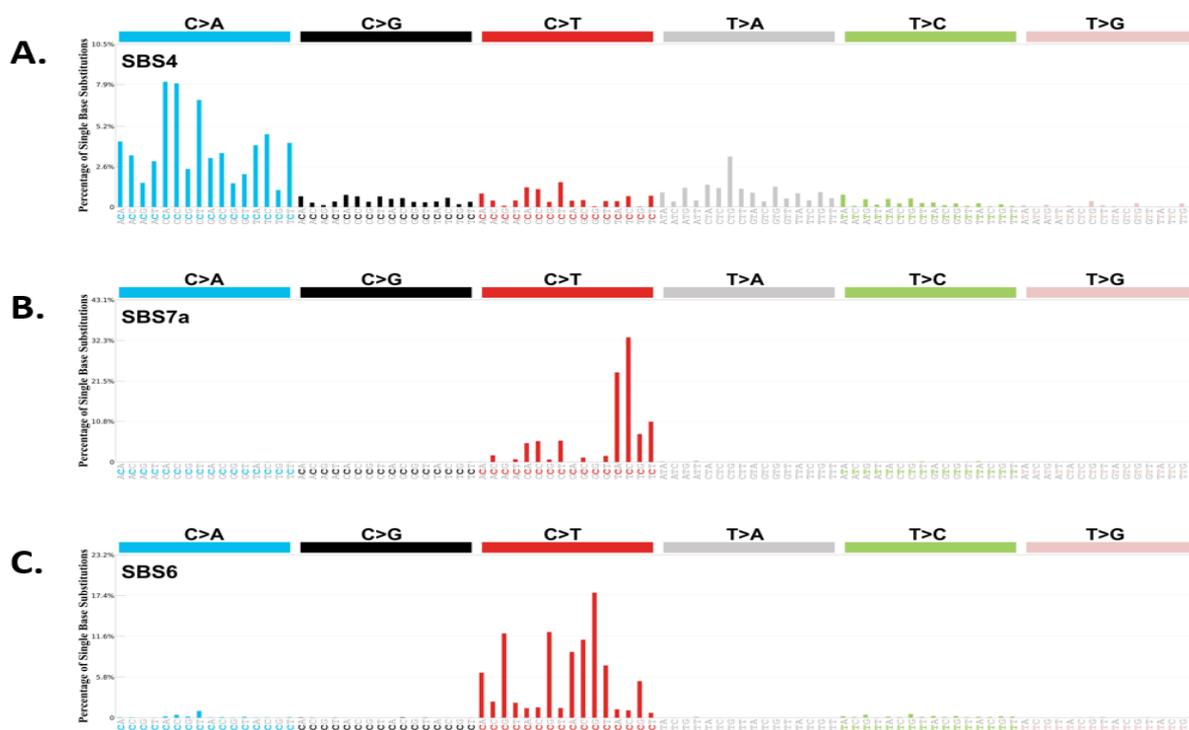
As mutações somáticas estão presentes em todas as células do corpo humano e ocorrem ao longo da vida. Eles são a consequência de múltiplos processos mutacionais [...]. Diferentes processos mutacionais geram combinações únicas de tipos de mutação, denominadas “Assinaturas Mutacionais”.

Ou seja, assinaturas mutacionais são como marcas, impressões digitais deixadas no tumor por conta de tipos específicos de mutação e atividade no genoma que ocorrem por causa definida ou não (COSMIC, 2022).

Graças a novos métodos tecnológicos de sequenciamento em conjunto com parâmetros matemáticos e organoides, as assinaturas mutacionais somáticas de tumores vêm sendo definidas. Hoje, temos mais de 50 assinaturas definidas para etiologias específicas, como por exemplo, assinaturas para quem usa tabaco, quem foi exposto à luz UV ou para alguns defeitos genéticos de reparo do DNA (figura 12) (VAN HOECK *et al.*, 2019; PLEGUEZUELOS-MANZANO *et al.*, 2020; ROSENDAHL-HUBE, PLEGUEZUELOS-MANZANO; PUSCHHOF, 2021). Essas assinaturas podem ser constantes (estando ativas e presentes na maior parte de células normais

e malignas) ou intermitentes (ativas e presentes em momentos específicos, a depender do mecanismo de sua ativação) (BRADY, GOUT, ZHANG, 2021).

Figura 12 – Assinaturas mutacionais específicas de exposição ao tabaco, luz UV e defeitos na via de *mismatch repair*, respectivamente



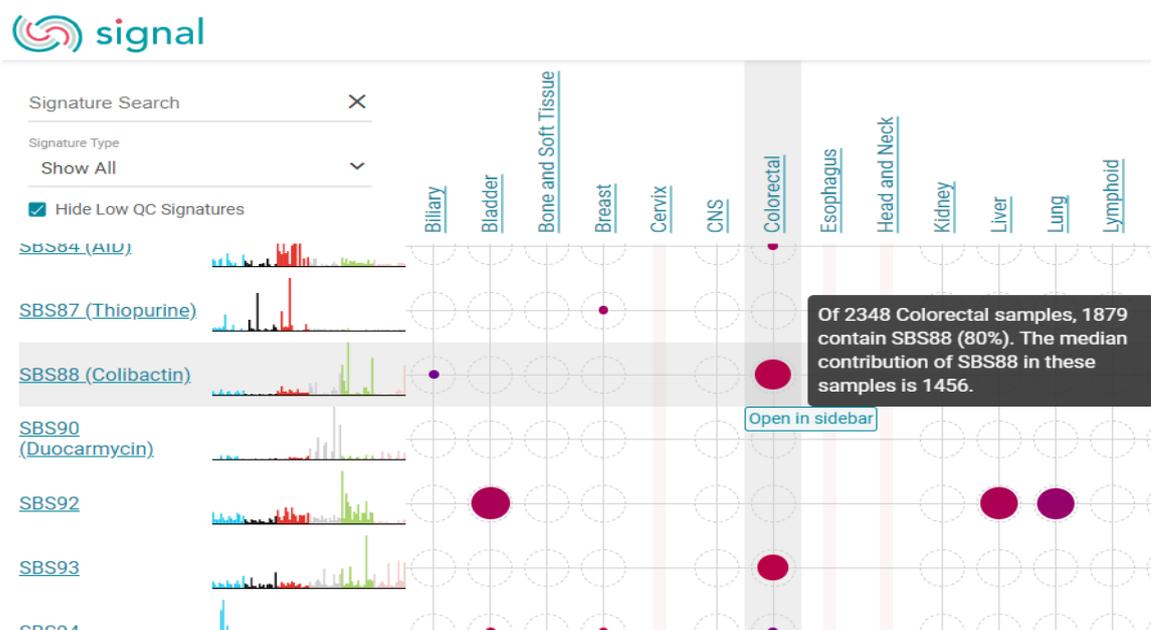
Fonte: COSMIC, 2022.

Nota: A imagem demonstra as assinaturas mutacionais de exposição ao tabaco (A), de exposição à luz UV (B) e de defeitos na via de *mismatch repair* (C). Na horizontal, na região superior das três assinaturas, podemos observar algumas possíveis substituições de base única (SBS); na região inferior, observamos diversos códons. Na vertical, por sua vez, está sinalizada a frequência de substituições de base única, representadas pelos picos na imagem. Os picos estão localizados nos códons e trocas mais frequentes observados.

Assinaturas mutacionais podem ser definidas como padrões específicos de substituições de base única (SBS) ou inserções/deleções curtas (indels) no DNA genômico de células e tumores. Esses padrões refletem a atividade de processos mutagênicos endógenos ou a exposição a ambientais, e, quando associados à atuação de um agente específico, podem ser utilizados para pressupor a carga de mutação induzida por esse agente nos tumores (DÍAZ-GAY *et al.*, 2018; ROSENDAHL-HUBE, PLEGUEZUELOS-MANZANO; PUSCHHOF, 2021). A base de dados Signal, da Universidade de Cambridge, possui dados que relacionam

assinaturas mutacionais com tipos de cânceres específicos, como pode ser observado na figura abaixo (figura 13) (SIGNAL, 2022):

Figura 13 – Assinaturas de substituição de base única (SBS) e suas frequências encontradas em relação ao tipo de câncer



Fonte: SIGNAL, 2022.

Nota: A base de dados mostra diferentes tipos de câncer e assinaturas. O tamanho de cada círculo colorido representa a frequência encontrada daquela assinatura no câncer em questão. Na imagem, o exemplo da assinatura SBS88 em relação ao câncer colorretalé mostrado, com uma frequência de 80% em 1879 amostras analisadas.

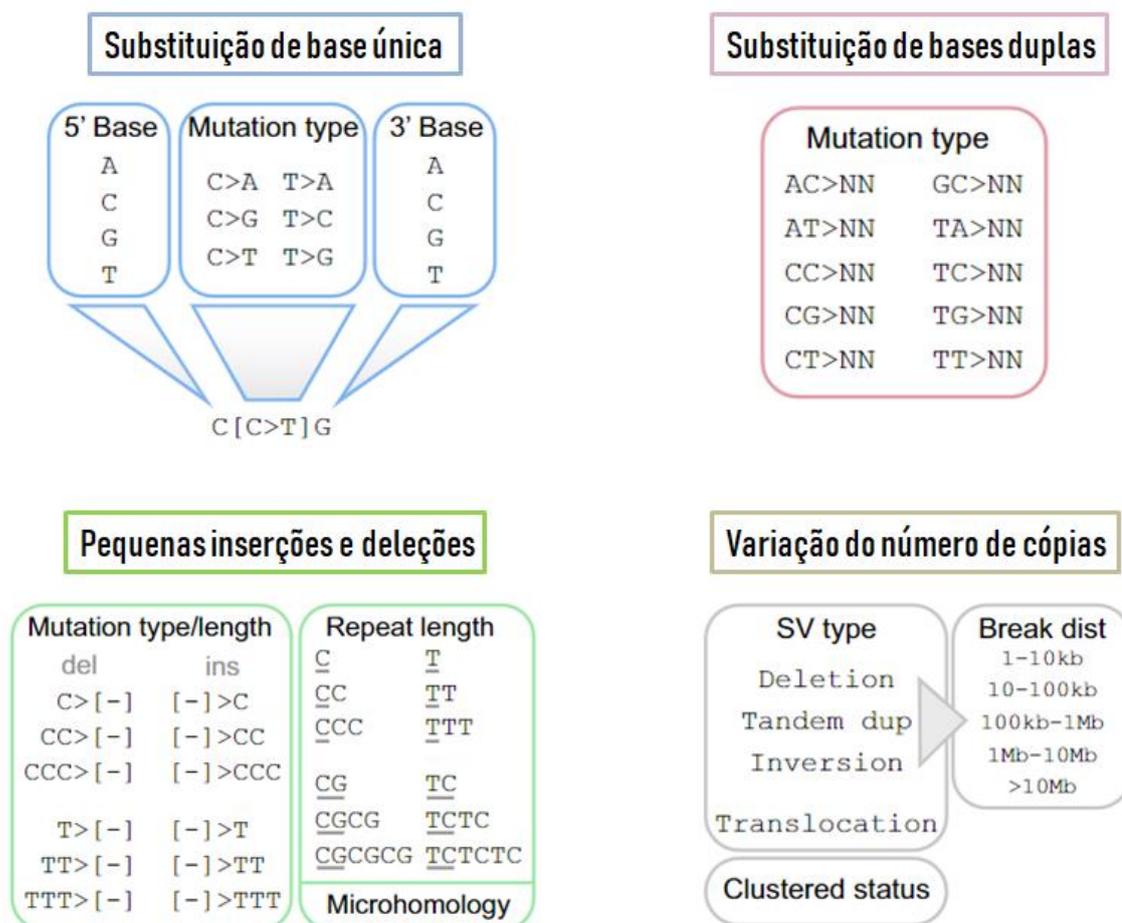
As assinaturas mutacionais são classificadas em quatro tipos (quadro 2 e figura 14):

Quadro 2 – Classificações atuais de assinaturas mutacionais, bem como suas definições, contextos e exemplos

	Definição	Contextos	Exemplos
Substituição de base única (SBS)	Substituição de uma determinada base de nucleotídeo	96 contextos	SBS1 (desaminação de 5-metilcitosina); SBS7 (UV), SBS90 (duocarmicina)
Substituição de bases duplas (DSB)	Modificação simultânea de duas bases consecutivas	78 contextos	DBS5 (exposição à platina); DBS7 e DBS10 (defeitos na via de <i>mismatch repair</i>)
Pequenas inserções e deleções (ID)	Inserção ou deleção de fragmentos curtos de DNA (entre 1 e 50 pares de bases)	83 contextos	ID6 (mutações em BRCA1 e 2). ID3 (tabagismo); ID13 (exposição à UV)
Variação do número de cópias (CN)	Variações do número padrão de cópias para determinado alelo	48 contextos	CN13 (perda de heterozigosidade); CN1 (diploidia); CN2 (tetraploidia)

Fonte: Van Hoeck, 2019; Koh *et al.*, 2021; COSMIC; SIGNAL, 2022.

Figura 14 – Alterações que ocorrem nos nucleotídeos em cada uma das quatro assinaturas possíveis



Fonte: adaptado de Brady, Gout, Zhang, 2021.

A análise de uma assinatura mutacional envolve três etapas principais: chamada de variantes somáticas; extração de assinaturas para comparação com bases de dados (como o COSMIC) por meio de ferramentas de bioinformática; e determinação do nível de sua atividade em amostras de tumor individuais (BRADY, GOUT, ZHANG, 2021).

8.2 ASSINATURAS DE COLIBACTINA

As assinaturas mutacionais causadas pela colibactina de *E. coli* pks+ foram observadas, pela primeira vez, em um estudo que utilizou microinjeções repetidas dessas cepas para inocular em organoides intestinais humanos. Após a retirada de células específicas desses organoides para analisar os subclones por meio de sequenciamento de genoma completo, verificou-se um padrão de substituição de base única (SBS - T>N) em sequências ATA, ATT ou TTT (mutação na timina do meio), além de deleções de timina em homopolímeros T (indel/ID). As células com

quebras de fita-dupla (DSB) eram particularmente enriquecidas com os hexanucleotídeos AAATTT, AAAATT e AATATT (LEE-SIX *et al.*, 2019; YANG, JOBIN, 2020 *et al.*, DOUGHERTY, JOBIN, 2021; LI *et al.*, 2022). Posteriormente, em outros estudos confirmatórios, observou-se que essa assinatura mutacional estava presente de forma enriquecida em organoides intestinais humanos e, também, em metástases de câncer colorretal. Em suma, as mutações observadas formam uma “impressão digital” que identifica células expostas à colibactina (PLEGUEZUELOS-MANZANO; WERNKE, 2020; ROSENDAHL-HUBER, PLEGUEZUELOS-MANZANO, PUSCHHOF, 2021; CLAY, FONSECA-PEREIRA, GARRETT, 2022).

O estudo de Terlouw *et al.* (2020), por exemplo, avaliou 201 pacientes com polipose inexplicada (isto é, sem história familiar), chegando em 36 pacientes com uma variante de efeito em splicing localizada no íntron 8 do gene APC (NM_000038.5: c.835-8A>G). Esta variante é caracterizada por uma sequência de 5'TTAATTTTT3', onde a adenina sublinhada é substituída por uma guanina. A assinatura mutacional causada por *E. coli* pks+ é caracterizada, por sua vez, por substituições de base única principalmente no contexto ATN e TTT com forte enriquecimento de adeninas 3 e 4 pares de base 5' do sítio de mutação. O complemento reverso da mutação gerada pela variante c.835-8A>G é 3'AATTAAAA5'. Comparando ambas, a sequência de nucleotídeos afetada pela variante em questão é também uma sequência característica de ser afetada pela assinatura mutacional gerada por *E. coli* pks+ (figura 15).

Figura 15 – Assinatura mutacional específica de colibactina

acontecem, preferencialmente, quando enriquecidos de adenina também a montante, sendo um comprimento de cinco ou mais nucleotídeos A/T. Ademais, o padrão da assinatura SBS-pks tende a apresentar uma maior taxa de fitas transcrpcionais (PLEGUEZUELOS-MANZANO *et al.*, 2020).

Essas regiões ricas em tratos poli(dA:dT) são regiões pelas quais a colibactina possui afinidade para a formação de adutos de adenina, como as assinaturas mutacionais mostram (DZIUBAŃSKA-KUSIBAB *et al.*, 2020). Esses tratos são conhecidos como um dos sítios frágeis do DNA, ou seja, locais em que um estresse na replicação do DNA causa instabilidade genômica. Essa instabilidade está relacionada a um colapso da forquilha de replicação e à formação de quebras de fita dupla em regiões de início de replicação delimitados por tratos poli(dA) no sítio 3' e poli(dT) no sítio 5', justamente onde ocorre os danos gerados pela exposição à colibactina (ZLOTORYNSKI, 2018).

Ademais, essa fragilidade também estaria relacionada ao formato do DNA, pois alguns dos hexanucleotídeos afetados pela colibactina demonstraram características como sulcos menores mais estreitos, maior potencial eletrostático negativo e alta rigidez intrínseca. Esses sulcos são, inclusive, um sítio de ligação bem estável para a colibactina, estabilidade essa que também é contribuída por uma distância de cerca de quatro pares de base entre adeninas e o centro de massa do ciclopropano, e a presença de A:T centrais (DZIUBAŃSKA-KUSIBAB *et al.*, 2020).

O estudo de Terlow *et al.* (2019) também observou que muitas mutações ocorridas nas assinaturas de *E. coli* pks+ são mutações driver que podem levar a mutações oncogênicas. Mutações drivers são alterações genéticas que, quando presentes, ativam cascatas de sinalização intracelular que promovem proliferação e invasão celular (BALDOTTO *et al.*, 2016; PLEGUEZUELOS-MANZANO *et al.*, 2020). Das 4.712 mutações observadas em uma coorte de pacientes com câncer colorretal, 112 (2,4%) correspondiam a mutações geradas pela exposição à colibactina.

Um dos genes supressores de tumor analisados no estudo, o APC, continha o maior número de mutações driver que correspondiam com sítios SBS-pks ou ID-pks (52/983 – 5,3%) (LEE-SIX *et al.*, 2018; DUBINSKY, DOTAN, GOPHNA; PLEGUEZUELOS-MANZANO *et al.*, 2020; ROSENDAHL HUBER, PLEGUEZUELOS-MANZANO, PUSCHHOF, 2021). Outro estudo avaliou mutações

de colibactina envolvendo genes da via p53 (CLAY, FONSECA-PEREIRA, GARRETT, 2022). Dessa forma, pôde-se inferir que mutações individuais que combinam com os padrões de assinaturas da colibactina estão contribuindo para mutações causadoras de câncer em genes drive do CCR (ROSENDAHL-HUBER, PLEGUEZUELOS-MANZANO, PUSCHHOF, 2021).

8.3 PREVALÊNCIA

Lee-Six e colaboradores (2019) descreveram assinaturas mutacionais SBS-pks e ID-pks em criptas primárias de cólon saudável humano, demonstrando que essas assinaturas causaram milhares de mutações em apenas um subconjunto de criptas, e que provavelmente foram induzidas na primeira década de vida. Isso propõe que os indivíduos que abrigam cepas de *E. coli* pks+ podem apresentar um maior risco de desenvolvimento de câncer colorretal, e que a identificação dessas assinaturas de forma precoce poderia ser utilizada para evitar um possível desenvolvimento tumoral (LEE-SIX *et al.*, 2019; ROSENDAHL-HUBER, PLEGUEZUELOS-MANZANO, PUSCHHOF, 2021; CLAY, FONSECA-PEREIRA, GARRETT, 2022).

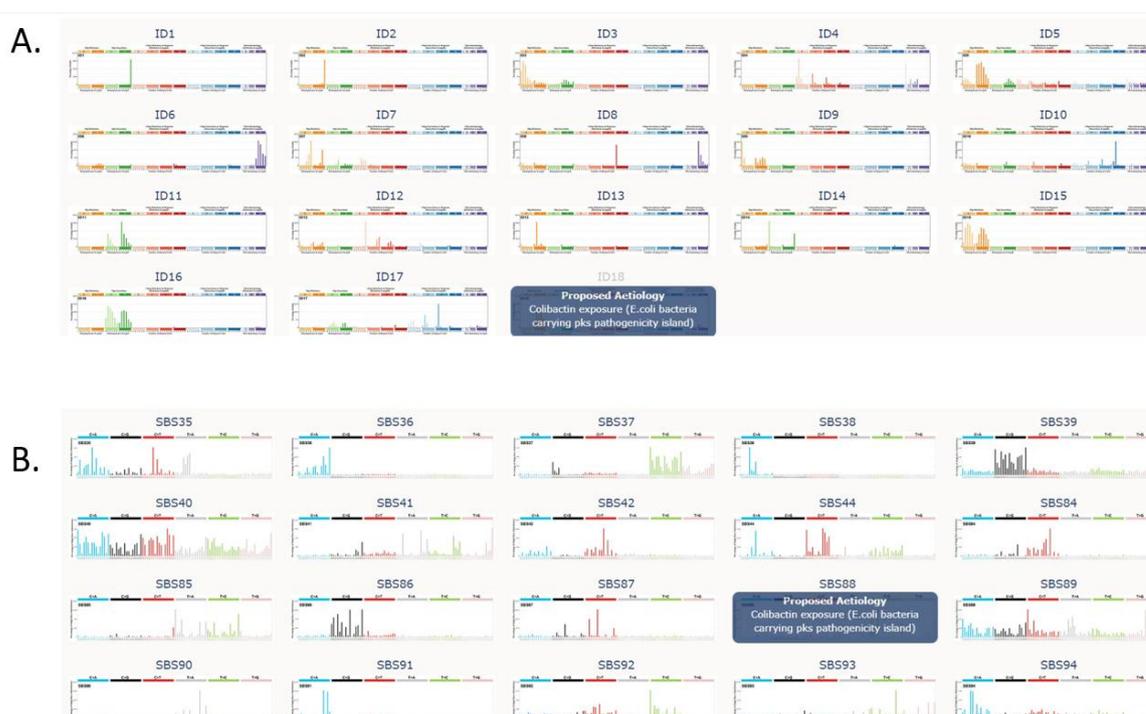
O estudo de Olafsson *et al.* (2020), por sua vez, avaliou que, dentre as assinaturas mutacionais detectadas em tecidos de pacientes com doença inflamatória intestinal (DII), houve a detecção das assinaturas características de exposição à colibactina, mesmo sendo tecidos não neoplásicos. Essas descobertas destacam a importância de se estudar métodos que possam modular a microbiota humana para remover essas cepas, bem como de se reavaliar o uso de certas cepas probióticas (tais como *E. coli* Nissle 1917) que demonstraram induzir padrões mutacionais SBS-pks e ID-pks (PLEGUEZUELOS-MANZANO *et al.*, 2020).

Pesquisadores analisaram um conjunto de dados de sequências de genoma completo de 496 tumores colorretais humanos que formaram metástases. As mutações SBS-pks e ID-pks estavam presentes em 7,5% e 8,8%, respectivamente, das metástases de CCR, o que é mais frequente do que nas metástases de cânceres de outras origens primárias. Encontraram, também, em 2,1% e 4,2%, respectivamente, de metástases de câncer do trato urinário e em 1,6% e 1,6%, respectivamente, de metástases de tumores de cabeça e pescoço (YANG, JOBIN, 2020). Por fim, o estudo de Boot *et al.* (2020) encontrou as assinaturas mutacionais

relacionadas à colibactina em uma de 36 amostras de carcinoma oral de células escamosas, sendo que apenas duas destas estavam relacionadas com altos níveis de infecção bacteriana no tecido.

As assinaturas mutacionais características de *E. coli* pks+ já foram incluídas no banco de dados COSMIC, denominadas como SBS88 e ID18, e podem ser observadas nas imagens abaixo (figura 16):

Figura 16 – SBS88 e ID18 como assinaturas geradas pela exposição à colibactina



Fonte: COSMIC, 2022.

8.4 APLICAÇÕES ATUAIS

Muitas assinaturas podem ser encontradas em tecidos normais e pré-cancerosos, demonstrando como as células humanas possuem a capacidade de tolerar processos mutacionais relativamente intensos, que ainda não levaram ao desenvolvimento de um câncer. Este fato chama a atenção para uma possível aplicação das assinaturas, desde que sejam biologicamente definidas como associadas a determinado fator causador, no diagnóstico precoce e prevenção de

indivíduos, direcionando sua etiologia e tratamentos específicos que representem um melhor desfecho clínico para o paciente (KOH*et al.*, 2021).

O desenvolvimento de bancos de dados de assinaturas mutacionais como o Cosmic e o Signal e de dados genômicos pan-câncer, como o Cancer Genome Atlas (TCGA), o Cancer Genome Project e o International Cancer Genome Consortium (ICGC), foram fundamentais para as análises mutacionais e serão úteis na aplicação clínica (VAN HOECK*et al.*, 2019).

Outra aplicação é o rastreamento de mutações hereditárias, as quais representam 10% dos casos totais de cânceres e envolvem alterações em genes de predisposição. Assinaturas mutacionais de início precoce poderiam ser utilizadas como um teste de triagem para avaliar o acúmulo de mutações específicas que podem predispor ao aparecimento de determinado tumor no paciente. Ademais, o benefício não seria aplicado apenas ao paciente, mas também a toda sua família, visto que as variantes genéticas são herdadas e podem representar riscos para seus familiares, incluindo a possibilidade de um acompanhamento multidisciplinar e prevenção mais adequados (VAN HOECK*et al.*, 2019).

As assinaturas mutacionais poderiam, também, apoiar o descobrimento do sítio do tumor, visto que algumas já foram detectadas como prevalentes em determinados tecidos, como CS-12 e CS-16, relacionadas ao câncer hepático e ovariano. Hoje, cerca de 3% dos tumores são classificados como câncer primário desconhecido, o que prejudica o direcionamento de terapias adequadas (VAN HOECK*et al.*, 2019). Por fim, assinaturas mutacionais detectadas em determinados pacientes identificam mutações específicas que podem servir como alvo para tratamentos mais direcionados e com melhor resposta, bem como contraindicação para alguns tratamentos e marcador de prognóstico geral e específico (quadro 3) (VAN HOECK*et al.*, 2019; KOH*et al.*; BRADY, GOUT, ZHANG, 2021):

Quadro 3 – Mutações específicas, impacto na seleção de terapias e assinaturas relacionadas

<p>Deficiência na via de recombinação homóloga (HDR)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Impacta a seleção de inibidores de PARP (poli ADP-ribose polimerase) para tratar tumores deficientes em <i>BRCA1</i> ou <i>BRCA2</i> • Ex: SBS3 	<p>Deficiência na via de reparo de incompatibilidade (MMR)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Relação com altas taxas de mutação em repetições em tandem curtas ou instabilidade de microssatélites (MSI) • Tumores com deficiência de MMR apresentam sensibilidade à terapia de bloqueio de checkpoint • Ex: DBS10 	<p>Desregulação da polimerase</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mutações no gene <i>POLE</i> • Apresentam sensibilidade à terapia de bloqueio de checkpoint • Ex: SBS10 	<p>Deficiência nas vias de reparo por excisão de bases (BER) e de nucleotídeos (NER)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Vias associadas ao reparo de danos ao DNA • Defeitos em genes como <i>SMUG1</i>, <i>OGG1</i>, <i>NTHL1</i> e <i>MUTYH</i> • Boa resposta à terapia baseada em cisplatina • Ex: SBS18/SBS36 (<i>MUTYH</i>)
--	---	--	--

Fonte: Van Hoeck et al., 2019; Koh et al., Brady, Gout, Zhang, 2021.

Alguns algoritmos de bioinformática têm sido desenvolvidos para facilitar e baratear a detecção de assinaturas mutacionais em amostras de câncer. Um exemplo é o Mutational Signatures in Cancer (MuSiCa), o qual possui como objetivo quantificar a contribuição de assinaturas mutacionais em amostras a fim de se poder identificar processos mutacionais subjacentes, por meio de informações advindas diretamente do COSMIC (DÍAZ-GAY *et al.*, 2018). Outros incluem o mSignatureDB (base de dados que categoriza assinaturas de amostras baseando-se em informações do COSMIC), mutREAD e pacotes de R para análise e quantificação como o MutSignatures, Sigflow e decompTumor2Sig (HUANG *et al.*, 2018; KRÜGER, PIRO, 2019; FANTINI *et al.*, 2020; BRADY, GOUT, ZHANG; WANG *et al.*, 2021).

8.5 COMO O DIAGNÓSTICO CORROBORADO PELA ASSINATURA MUTACIONAL DE COLIBACTINA BENEFICIARIA PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL

Assim como assinaturas características de mutações específicas direcionam tratamentos, como visto na seção anterior, a assinatura mutacional gerada por colibactina pode fazer com que diferentes abordagens sejam tomadas para se obter uma melhor resposta e/ou prognóstico do paciente. Essa abordagem, segundo vários estudos recentes, tem sido feita estudando o impacto da modulação da dieta e da administração de probióticos na expressão da toxina.

O estudo de Oliero *et al.* (2021) analisou os efeitos de dois probióticos utilizados na regulação de *E. coli* no intestino humano: inulina e GOS (galactooligosacarídeos), combinados com suplementação com ferro (regulador da colibactina). Esses probióticos são fibras fermentáveis, que incluem oligossacarídeos, os quais causam benefícios ao passo que mantêm a integridade da mucosa e promovem a proliferação de bactérias benéficas que se alimentam deles para gerar ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Os resultados demonstraram que os probióticos em questão promoveram o crescimento de cepas de *E. coli* clb+, exacerbaram o dano ao DNA e elevaram a expressão de genes relacionados à biossíntese da toxina, como o clbA. Ademais, a suplementação com ferro inibiu a expressão desses genes, bem como aboliu o aumento da transcrição de clbA induzida por inulina e GOS.

A relação de inibição da colibactina com a suplementação por ferro também foi proposta em outros estudos. A transcrição de um dos genes-chaves para a síntese de colibactina e a própria produção da toxina são reguladas por fatores importantes para as bactérias conhecidos como Fur e RyhB. O Fur é uma proteína reguladora da captação férrica, o qual regula a transcrição de mais de 90 genes envolvidos na captação, armazenamento e metabolismo férrico; o RyhB, por sua vez, é um RNA regulador não codificante. Ambos os fatores estão presentes em bactérias como *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes* e *E. coli* (TRONNET *et al.*, 2017; DOUGHERTY, JOBIN, 2021). Essa regulação provavelmente ocorre através de uma via não clássica mediada por Fur/RyhB, onde um alto teor de ferro diminui a transcrição de clbA e, conseqüentemente, a produção de colibactina (TRONNET *et al.*, 2017).

Recentemente, também foi descoberto que o uso de compostos à base de ácido bórico pode inibir a genotoxicidade induzida por colibactina. Isso porque a ClbP é uma enzima serina ativa, enquanto o boro pode formar uma ligação dativa com nucleófilos biológicos, como a serina, sem causar dano ao hospedeiro. Essa ligação se dá na extremidade N-terminal da fita β 11 e envolve ligações de Van Der Waals e de hidrogênio. Dessa forma, o boro pode se ligar ao sítio ativo da ClbP prevenindo suas ações danosas ao DNA, e, conseqüentemente, a carcinogênese do cólon (COUGNOUX *et al.*, 2016; VEZIAN *et al.*, 2021).

Outras abordagens alimentares incluíram a administração de canela e cinamaldeído, os quais demonstraram inibir a expressão do gene *clbB*, e a administração de compostos de tanino e quercetina de extratos de plantas medicinais de *Terminalia catappa*, *Psidium guajava* e *Sandoricum koetjape*, os quais inibiram o crescimento e a transcrição de genes de colibactina (VEZIAN*et al.*, 2021).

Uma abordagem diferente e recém-descoberta traz a mesalamina (análogo estrutural da Aspirina®), um conhecido fármaco anti-inflamatório, como um influente na expressão da colibactina. Foi demonstrado que a mesalamina é um inibidor da polifosfato quinase bacteriana, reduzindo a atividade promotora da *clbB* e diminuindo o nível de produção da genotoxina. Ademais, a mesalamina demonstrou inibir o crescimento de *E. coli* pks+ em condições aeróbicas e é previamente conhecida como um inibidor de cascatas inflamatórias no hospedeiro, podendo ser uma abordagem interessante na redução da atividade carcinogênica da bactéria (TANG-FICHAUX*et al.*, 2021).

Além das abordagens citadas acima, a partir do momento que a assinatura fosse identificada, fatores relacionados à *E. coli* pks+ também poderiam ser utilizados como biomarcadores. A ilha pks, por exemplo, poderia ser um parâmetro diagnóstico para CCR com especificidade de 63,1% e sensibilidade de 84,6%, de acordo com Veziante*et al.* (2021). Já segundo Dubinsky, Dotan e Gophna (2020), os próprios genes da colibactina poderiam ser utilizados como biomarcadores diagnósticos. Identificando os biomarcadores, indivíduos com amostras suspeitas poderiam ser encaminhados para o acompanhamento multidisciplinar e exames confirmatórios, permitindo que o diagnóstico seja feito de maneira mais precoce.

Estudos que desvendem o papel dos probióticos como moduladores da expressão e produção de colibactina, assim como fez Oliero e colaboradores (2021), são de extrema importância para regularmos o seu uso, caso necessário, principalmente para indivíduos portadores dessas cepas. Probióticos baseados na suplementação de *E. coli* Nissle 1917, por exemplo, necessitam ser melhor estudados, visto que a bactéria possui a ilha pks e pode representar um perigo aos pacientes a longo prazo (NOUGAYRÈDE*et al.*, 2021).

Poucos processos tumorais no CCR podem ser evitados mesmo após a causa ser identificada, porém, a assinatura causada pela colibactina pode direcionar abordagens terapêuticas que visem à depleção de espécies bacterianas genotóxicas e/ou interferências diretas na colibactina (seja no tocante a sua ação ou a sua produção), podendo ser uma chave para controlar o ambiente tumoral pró-inflamatório e mutacional (ROSENDAHL-HUBER, PLEGUEZUELOS-MANZANO, PUSCHHOF, 2021).

8.6 DESVANTAGENS

Como todo método, as assinaturas mutacionais também apresentam contras em relação a sua aplicação na clínica. Como primeiro motivo, há algumas discrepâncias entre assinaturas derivadas de sequenciamento de exoma complexo (WES) e genoma completo (WGS), pois o segundo envolve também elementos não codificantes. Porém, essas discrepâncias poderiam ser eliminadas definindo assinaturas específicas de WES e de WGS (principalmente de WES, visto seu menor custo) (VAN HOECK *et al.*, 2019).

Outro motivo é a existência de assinaturas de baixa contribuição, as quais podem ser confundidas com artefatos de sequenciamento ou sofrerem sobreposição de outras assinaturas que possuem maior contribuição. Dessa forma, se faz necessário definir melhor o que realmente é assinatura e artefato e qual a importância, no cenário clínico, das assinaturas de baixa contribuição, a fim de se otimizar a sensibilidade e especificidade do uso de assinaturas na clínica (VAN HOECK *et al.*, 2019).

Por fim, outros contras incluem: a presença de assinaturas que não levam a direcionamento e/ou aconselhamento clínico; a diminuição da precisão de se detectar uma assinatura mutacional quando vários processos mutacionais estão/estiveram ativos ou quando o número de mutações é baixo; menor sensibilidade e especificidade dos algoritmos atuais para detectar assinaturas derivadas de mutações indel e estruturais; alto custo, apesar de este estar sendo reduzido graças ao desenvolvimento de abordagens bioinformáticas; falta da inclusão do impacto da epigenética nas assinaturas; necessidade de um maior aprimoramento das abordagens algorítmicas de bioinformática; e a presença de assinaturas intermitentes, as quais não podem sempre serem utilizadas para definir

tratamentos na clínica justamente pelos processos mutacionais não serem constantes no tecido tumoral (VAN HOECK *et al.*, 2019; BRADY, GOUT, ZHANG; KOH *et al.*, 2021).

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A alta prevalência de *E. coli* pks+ em amostras de tumores colorretais chama a atenção para a produção da genotoxina e consequente geração das assinaturas específicas nos pacientes afetados, as quais já se encontram em bancos de dados conhecidos, como o COSMIC e o Signal. Hoje, assinaturas previamente detectadas já estão sendo implementadas na clínica para diversos tipos de tumores, tendo impacto na tomada de decisão do corpo clínico em relação aos tratamentos que devem ser utilizados e apresentarão melhor resposta.

Apesar dos contras, principalmente em relação àqueles que envolvem falta de dados (discrepâncias entre técnicas, falta de diferenciação de assinaturas de baixa contribuição e artefatos, necessidade de aprimoramento de detecção de assinaturas indel, estruturais e efeitos epigenéticos, e, por fim, maior entendimento da aplicação de assinaturas intermitentes), o problema pode ser resolvido com o desenvolvimento de mais estudos sobre assinaturas mutacionais, os quais já estão sendo realizados. O custo também é um contra significativo, visto que a necessidade de técnicas como a de WES e a de WGS exigem um investimento financeiro que ainda não é viável na clínica. Porém, o contínuo desenvolvimento de ferramentas e *pipelines* de bioinformática, tais como o MuSiCa, mutREAD e Sigflow, estão facilitando o manejo e análise de dados, reduzindo consideravelmente os custos.

As assinaturas mutacionais específicas de colibactina teriam um benefício expressivo para os pacientes, visto que o câncer colorretal apresenta, como uma das principais causas, a microbiota (tendo como principal residente cepas de *E. coli*), e que o diagnóstico precoce e baixa sobrevida dos pacientes são obstáculos que ainda necessitam ser superados. O direcionamento da etiologia e o uso como biomarcador garantem um melhor desfecho clínico, podendo-se utilizar de estudos realizados hoje, os quais são focados na definição de melhores dietas e na descoberta da influência de probióticos, alimentos e fármacos na expressão da toxina, como uma forma de controle do ambiente pró-inflamatório e mutacional. Ademais, a assinatura como um biomarcador pode direcionar pacientes para um acompanhamento multidisciplinar adequado, a fim de que se realizem técnicas diagnósticas que possam identificar doenças inflamatórias intestinais e até mesmo o próprio CCR.

Por fim, por mais que ainda não haja estudos ou testes clínicos publicados atualmente que demonstrem o uso das assinaturas mutacionais geradas por colibactina como uma direção para definir tratamento, estes podem vir a ser desenvolvidos, principalmente quando houver melhor compreensão dos mecanismos genéticos e inflamatórios, como eles atuam na carcinogênese e se existe a possibilidade de serem, futuramente, alvo de terapias.

REFERÊNCIAS

ADAK, Atanu; KHAN, Mojibur R. An insight into gut microbiota and its functionalities. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s.l.], v. 76, n. 3, p. 473-493, oct. 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-018-2943-4> Acesso em: 31 jul. 2022

ALHINAI, Eiman A.; WALTON, Gemma E.; COMMANE, Daniel M. The role of the gut microbiota in colorectal cancer causation. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 20, n. 21, p. 5295, oct. 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/21/5295> Acesso em: 05 ago. 2022

AN, Ran *et al.* Non-enzymatic depurination of nucleic acids: factors and mechanisms. **PloS one**, [s.l.], v. 9, n. 12, p. e115950, dec. 2014. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0115950> Acesso em: 09 mai. 2022

AUVRAY, Frédéric *et al.* Insights into the acquisition of the pks island and production of colibactin in the Escherichia coli population. **Microbial genomics**, [s.l.], v. 7, n. 5, may 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8209727/> Acesso em: 04 abr. 2022

BAIDOUN, Firas *et al.* Colorectal cancer epidemiology: recent trends and impact on outcomes. **Current Drug Targets**, [s.l.], v. 22, n. 9, p. 998-1009, 2021. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cdt/2021/00000022/00000009/art00005> Acesso em: 11 nov. 2022

BALDOTTO, Clarissa *et al.* Mutações drivers em câncer de pulmão não-pequenas células (CPNPC). **Pulmão RJ**, Rio de Janeiro (RJ), v. 25, n. 2, p. 23-28, 2016. Disponível em: http://www.sopterj.com.br/wp-content/themes/_sopterj_redesign_2017/_revista/2016/n_02/7-mutacoes-drivers-em-cancer-de-pulmao-nao-pequenas-celulas-cpnpc.pdf Acesso em: 17 abr. 2022

BARKO, P. C. *et al.* The gastrointestinal microbiome: a review. **Journal of veterinary internal medicine**, [s.l.], v. 32, n. 1, p. 9-25, nov. 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jvim.14875> Acesso em: 29 jul. 2022

BOOT, Arnoud *et al.* Characterization of colibactin-associated mutational signature in an Asian oral squamous cell carcinoma and in other mucosal tumor types. **Genome research**, [s.], v. 30, n. 6, p. 803-813, jul. 2020. Disponível em: <https://genome.cshlp.org/content/30/6/803.short> Acesso em: 13 ago. 2022

BOSSUET-GREIF, Nadège *et al.* The colibactin genotoxin generates DNA interstrand cross-links in infected cells. **MBio**, [s.], v. 9, n. 2, p. e02393-17, mar. 2018. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/mBio.02393-17> Acesso em: 04 jul. 2022

BRADY, Samuel W.; GOUT, Alexander M.; ZHANG, Jinghui. Therapeutic and prognostic insights from the analysis of cancer mutational signatures. **Trends in Genetics**, [s.], v. 38, n. 2, p. 194-208, feb. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168952521002316> Acesso em: 20 ago. 2022

CLAY, Slater L.; FONSECA-PEREIRA, Diogo; GARRETT, Wendy S. Colorectal cancer: The facts in the case of the microbiota. **Journal of Clinical Investigation**, [s.], v. 132, n. 4, p. e155101, feb. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8843708/> Acesso em: 18 jul. 2022

COMPTON, Carolyn. Cancer initiation, promotion, and progression and the acquisition of key behavioral traits. **Cancer: The Enemy from Within**, [s.], Springer, Cham, may 2020. p. 25-48. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-40651-6_2 Acesso em: 10 ago. 2022

CONWAY, Tyrrell; COHEN, Paul S. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* metabolism in the gut. **Metabolism and bacterial pathogenesis**, [s.], p. 343-362, aug. 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1128/9781555818883.ch16> Acesso em: 18 jul. 2022

COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. Reino Unido, 2022. Disponível em: <https://cancer.sanger.ac.uk/signatures/> Acesso em: 17. abr 2022

COUGNOUX, Antony *et al.* Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. **Gut**, [s./], v. 63, n. 12, p. 1932-1942, mar. 2014. Disponível em: https://gut.bmj.com/content/63/12/1932.short?casa_token=-V1mF8QwnaMAAAAA:4U-jgw-XKAFcixiZyawBkrv8yEtLQLWLRyTIEzt4alJz2ko_8bV5zAvV9uE2SgOUQ1hueXjcr0Br9w Acesso em: 29 abr. 2022

COUGNOUX, Antony *et al.* Small-molecule inhibitors prevent the genotoxic and protumoural effects induced by colibactin-producing bacteria. **Gut**, [s./], v. 65, n. 2, p. 278-285, 2016. Disponível em: https://gut.bmj.com/content/65/2/278.short?casa_token=EvkrhWYc9M4AAAA:UCPjx0io_3FgWx6_nS4CkkmnONBt1Zv_pdM2B3MiAjjB29y1BfyH96DFCpSXw4d4bloOs3ne91ejZQ Acesso em: 02 jun. 2022

DALMASSO, Guillaume *et al.* The bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumor growth by modifying the tumor microenvironment. **Gut microbes**, [s./], v. 5, n. 5, p. 675-680, jan. 2014. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/19490976.2014.969989> Acesso em: 02 mar. 2022

DARIYA, Begum *et al.* Colorectal cancer biology, diagnosis, and therapeutic approaches. **Critical Reviews™ in Oncogenesis**, [s./], v. 25, n. 2, 2020. Disponível em: <https://www.dl.begellhouse.com/journals/439f422d0783386a,005bc32d2128ffd5,1e539f2f554332cc.html> Acesso em: 05 ago. 2022

DEKKER, Evelien *et al.* Colorectal cancer. **Lancet**. [s./], v. 394, p. 1467-1480, oct. 2019. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(19\)32319-0/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(19)32319-0/fulltext) Acesso em: 30 jul. 2022

DÍAZ-GAY, Marcos *et al.* Mutational Signatures in Cancer (MuSiCa): a web application to implement mutational signatures analysis in cancer samples. **BMC bioinformatics**, [s./], v. 19, n. 1, p. 1-6, jun. 2018. Disponível em: <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12859-018-2234-y> Acesso em: 13 jul. 2022

DOUGHERTY, Michael W.; JOBIN, Christian. Shining a light on colibactin biology. **Toxins**, [s.], v. 13, n. 5, p. 346, may 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/13/5/346> Acesso em: 08 jul. 2022

DRÓŹDŹ, Mateusz *et al.* Obligate and facultative anaerobic bacteria in targeted cancer therapy: Current strategies and clinical applications. **Life sciences**, [s.], v. 261, p. 118296, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320520310481> Acesso em: 10 nov. 2022

DUBINSKY, Vadim; DOTAN, Iris; GOPHNA, Uri. Carriage of colibactin-producing bacteria and colorectal cancer risk. **Trends in Microbiology**, [s.], v. 28, n. 11, p. 874-876, nov. 2020. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X20301426?casa_token=fsBFyw9PpmsAAAAA:gX_WM1RsFfVQ9jKr-iwY6k9Eks9RjqpQTPwGjkBrr_IJUnz8Rp8KllpW61LmBp7vFbnukWDzP1wHMQ Acesso em: 21 mai. 2022

DZIUBAŃSKA-KUSIBAB, Paulina J. *et al.* Colibactin DNA-damage signature indicates mutational impact in colorectal cancer. **Nature Medicine**, [s.], v. 26, n. 7, p. 1063-1069, jun. 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41591-020-0908-2> Acesso em: 08 mai. 2022

FANTINI, Damiano *et al.* MutSignatures: an R package for extraction and analysis of cancer mutational signatures. **Scientific reports**, [s.], v. 10, n. 1, p. 1-12, oct. 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-75062-0> Acesso em: 20 ago. 2022

GARCÍA, Alexis *et al.* Cytotoxic *Escherichia coli* strains encoding colibactin colonize laboratory mice. **Microbes and infection**, [s.], v. 18, n. 12, p. 777-786, dec. 2016. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457916300995?casa_token=iVLCUMSTv2kAAAAA:gul3euxouVgOPJ8eMTbnDENRwoROJPuNVaYb5x8EreQ7ou0-5RE-rlkQqYHyhel-h5-1SbzKEld6Mg Acesso em: 07 jul. 2022

GOMAA, Eman Zakaria. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. **Antonie Van Leeuwenhoek**, [s.], v. 113, n. 12, p. 2019-2040, nov. 2020.

Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10482-020-01474-7> Acesso em: 29 jul. 2022

HADJIPETROU, Athanasios *et al.* Colorectal cancer, screening and primary care: a mini literature review. **World journal of gastroenterology**, [s.], v. 23, n. 33, p. 6049, sept. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5597496/> Acesso em: 31 jul. 2022

HUANG, Po-Jung *et al.* mSignatureDB: a database for deciphering mutational signatures in human cancers. **Nucleic acids research**, [s.], v. 46, n. D1, p. D964-D970, jan. 2018. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/46/D1/D964/4626771> Acesso em: 20 ago. 2022

IFTEKHAR, Amina *et al.* Genomic aberrations after short-term exposure to colibactin-producing *E. coli* transform primary colon epithelial cells. **Nature communications**, [s.], v. 12, n. 1, p. 1-15, feb. 2021. Disponível: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-21162-y> Acesso em: 05 abr. 2022

IYADORAI, Thevambiga *et al.* Prevalence and association of pks+ *Escherichia coli* with colorectal cancer in patients at the University Malaya Medical Centre, Malaysia. **PloS one**, [s.], v. 15, n. 1, p. e0228217, jan. 2020. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0228217> Acesso em: 04 jul. 2022

JANG, Jeonghwan *et al.* Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. **Journal of applied microbiology**, [s.], v. 123, n. 3, p. 570-581, apr. 2017. Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jam.13468> Acesso em: 01 jul. 2022

JIN, Ketao *et al.* An update on colorectal cancer microenvironment, epigenetic and immunotherapy. **International Immunopharmacology**, [s.], v. 89, p. 107041, dec. 2020. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576920327016?casa_token=vpoyJF7TkH0AAAAA:ofQ4BvnYKWpPCjYtWU6cP81IzTtFT21UgJQGZODpgophR85XNSZToqoH1BO2yC3EYxhh_BbKvZ9hYA Acesso em: 30 jul. 2022

JIN, Ketao *et al.* An update on colorectal cancer microenvironment, epigenetic and immunotherapy. **International Immunopharmacology**, [s.l.], v. 89, p. 107041, dec. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576920327016> Acesso em: 04 ago. 2022

JOHNS, Michael S.; PETRELLI, Nicholas J. Microbiome and colorectal cancer: A review of the past, present, and future. **Surgical Oncology**, [s.l.], v. 37, p. 101560, jun. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960740421000499> Acesso em: 03 ago. 2022

KANTH, Priyanka; INADOMI, John M. Screening and prevention of colorectal cancer. **Bmj**, [s.l.], v. 374, sept. 2021. Disponível em: <https://www.bmj.com/content/374/bmj.n1855.abstract> Acesso em: 31 jul. 2022

KAWANISHI, Masanobu *et al.* In vitro genotoxicity analyses of colibactin-producing *E. coli* isolated from a Japanese colorectal cancer patient. **The Journal of Toxicological Sciences**, [s.l.], v. 44, n. 12, p. 871-876, sept. 2019. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jts/44/12/44_871/_article/-char/ja/ Acesso em: 11 jun. 2022

KHAN, Abdul Arif; CASH, Phillip. *E. coli* and colon cancer: is mutY a culprit?. **Cancer letters**, [s.l.], v. 341, n. 2, p. 127-131, dec. 2013. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383513005764?casa_token=PaR8R-PKCs8AAAAA:Pewsdvani2-NSCDENPyhzTj4KjLFUUFhSASlwfUmOwO9VcV_f0kYMRJVVfosN-sLDiR4hGjMXPLo6w Acesso em: 30 mai. 2022

KOH, Gene *et al.* Mutational signatures: emerging concepts, caveats and clinical applications. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 21, n. 10, p. 619-637, jul. 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41568-021-00377-7> Acesso em: 08 jul. 2022

KRÜGER, Sandra; PIRO, Rosario M. decompTumor2Sig: identification of mutational signatures active in individual tumors. **BMC bioinformatics**, [s.l.], v. 20, n. 4, p. 1-15, apr. 2019. Disponível em:

<https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12859-019-2688-6>

Acesso em: 20 ago. 2022

LA VECCHIA, Sofia; SEBASTIÁN, Carlos. Metabolic pathways regulating colorectal cancer initiation and progression. In: **Seminars in cell & developmental biology**, [s.], v. 98, p. 63-70, feb. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S108495211830168X> Acesso em: 03 ago. 2022

LEE, Eunyoung; LEE, Yangsoon. Prevalence of Escherichia coli carrying pks islands in bacteremia patients. **Annals of laboratory medicine**, [s.], v. 38, n. 3, p. 271-273, may 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5820074/?report=reader> Acesso em: 11 jun. 2022

LEE-SIX, Henry *et al.* The landscape of somatic mutation in normal colorectal epithelial cells. **Nature**, [s.], v. 574, n. 7779, p. 532-537, oct. 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-019-1672-7> Acesso em: 29 abr. 2022

LI, Sha *et al.* Tumorigenic bacteria in colorectal cancer: mechanisms and treatments. **Cancer Biology & Medicine**, [s.], v. 19, n. 2, p. 147, feb. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8832957/> Acesso em: 15 jul. 2022

LIU, Kaixi *et al.* The Role of Fecal Fusobacterium nucleatum and Pks+ Escherichia coli as Early Diagnostic Markers of Colorectal Cancer. **Disease Markers**, [s.], v. 2021, nov. 2021. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/dm/2021/1171239/> Acesso em: 24 jul. 2022

LIVERMORE, David M. Antibiotic resistance during and beyond COVID-19. **JAC-antimicrobial Resistance**, [s.], v. 3, n. Supplement_1, p. i5-i16, jun. 2021. Disponível em: https://academic.oup.com/jacamr/article/3/Supplement_1/i5/6299850?login=false Acesso em: 01 jul. 2022

MAINIL, Jacques. Escherichia coli virulence factors. **Veterinary immunology and immunopathology**, [s.], v. 152, n. 1-2, p. 2-12, mar. 2013. Disponível em:

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242712003625?casa_token=8xqqzJa2IPEAAAAA:PD82WkcGic62xqCCxJL1FX2H5ZiVnfrl1g9X2mifTZIPf0lpSVK D8tDPFaMa9pxCOjl42rstRxISJQ Acesso em: 02 jul. 2022

MARTINS, Lorryne De Souza Araújo. **Etiologia microbiana de infecções umbilicais em bezerros e fatores de virulência extraentéricos em isolados de Escherichia coli**. 2022. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade do Estado de São Paulo, Botucatu, 2022. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/234708> Acesso em: 04 abr. 2022

MARTINSON, Jonathan NV; WALK, Seth T. Escherichia coli residency in the gut of healthy human adults. **EcoSal plus**, [s.], v. 9, n. 1, sept. 2020. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/ecosalplus.ESP-0003-2020> Acesso em: 08 ago. 2022

MORGAN, Radwa N. *et al.* Bacterial cyclomodulins: types and roles in carcinogenesis. **Critical Reviews in Microbiology**, [s.], v. 48, n. 1, p. 42-66, jul. 2022. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/1040841X.2021.1944052> Acesso em: 02 jun. 2022

MUELLER Matthew; TAINTER, Christopher. R.STATPEARLS. Treasure Island: **StarPearls Publishing**, jan. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298/> Acesso em: 02 jul. 2022

NG, Mei Ying; GAN, Yunn-Hwen; HAGEN, Thilo. Characterisation of cellular effects of Burkholderia pseudomallei cycle inhibiting factor (Cif). **Biology Open**, [s.], v. 7, n. 7, p. bio028225, jul. 2018. Disponível em: <https://journals.biologists.com/bio/article/7/7/bio028225/1289/Characterisation-of-cellular-effects-of> Acesso em: 02 jun. 2022

NOUGAYRÈDE, Jean-Philippe *et al.* A toxic friend: Genotoxic and mutagenic activity of the probiotic strain Escherichia coli Nissle 1917. **MSphere**, [s.], v. 6, n. 4, p. e00624-21, aug. 2021. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/mSphere.00624-21> Acesso em: 10 ago. 2022

NOWROUZIAN, Forough L.; OSWALD, Eric. Escherichia coli strains with the capacity for long-term persistence in the bowel microbiota carry the potentially genotoxic pks island. **Microbial pathogenesis**, [s.l.], v. 53, n. 3-4, p. 180-182, jun. 2012. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401012001143> Acesso em: 10 mar. 2022

OLAFSSON, Sigurgeir *et al.* Somatic evolution in non-neoplastic IBD-affected colon. **Cell**, [s.l.], v. 182, n. 3, p. 672-684. e11, aug. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420308138> Acesso em: 08 jul 2022

OLIERO, Manon *et al.* Oligosaccharides increase the genotoxic effect of colibactin produced by pks+ Escherichia coli strains. **BMC cancer**, [s.l.], v. 21, n. 1, p. 1-10, feb. 2021. Disponível em: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-021-07876-8> Acesso em: 21 mai. 2022

PASCALE, Alessia *et al.* Microbiota and metabolic diseases. **Endocrine**, [s.l.], v. 61, n. 3, p. 357-371, mai 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12020-018-1605-5> Acesso em: 10 nov. 2022

PAYROS, Delphine *et al.* Maternally acquired genotoxic Escherichia coli alters offspring's intestinal homeostasis. **Gut microbes**, [s.l.], v. 5, n. 3, p. 313-512, jun. 2014. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/gmic.28932> Acesso em: 10 mar. 2022

PLEGUEZUELOS-MANZANO, Cayetano *et al.* Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks+ E. coli. **Nature**, [s.l.], v. 580, n. 7802, p. 269-273, feb. 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2080-8> Acesso em: 17 abr. 2022

POIREL, Laurent *et al.* Antimicrobial resistance in Escherichia coli. **Microbiology Spectrum**, [s.l.], v. 6, n. 4, p. 6.4. 14, jul. 2018. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017> Acesso em: 01 jul. 2022

RODRIGUES, Andrea B. *et al.* **Oncologia multiprofissional**: patologias, assistência e gerenciamento. São Paulo: Manole, 2016. 312 p. v.16. *E-book*. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788520447079> Acesso em: 01 jul. 2022

ROSENDAHL-HUBER, Axel; PLEGUEZUELOS-MANZANO, Cayetano; PUSCHHOF, Jens. A bacterial mutational footprint in colorectal cancer genomes. **British Journal of Cancer**, [s.l.], v. 124, n. 11, p. 1751-1753, mar. 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41416-021-01273-5> Acesso em: 30 mai. 2022

ROTH, Nataliya *et al.* The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. **Poultry science**, [s.l.], v. 98, n. 4, p. 1791-1804, apr. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579119301099> Acesso em: 01 jul. 2022

SALVATIERRA, Clabijo M. **Microbiologia**: Aspectos morfológicos, bioquímicos e metodológicos. São Paulo: Érica, 2014. *E-book*. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788536530550> Acesso em: 04 abr. 2022

SARSHAR, Meysam *et al.* Genetic diversity, phylogroup distribution and virulence gene profile of pks positive *Escherichia coli* colonizing human intestinal polyps. **Microbial pathogenesis**, [s.l.], v. 112, p. 274-278, nov. 2017. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401017304953?casa_token=wVyXx4jzwAcAAAAA:kMYTvKQOMjn5LR-hLdk1DBn6nYQmUmVJalpwDWJ6tZJrcnHD_GvbX2UGtml-zMIL0VA3cS03Ajf0eA Acesso em: 11 jun. 2022

SAUS, Ester *et al.* Microbiome and colorectal cancer: Roles in carcinogenesis and clinical potential. **Molecular aspects of medicine**, [s.l.], v. 69, p. 93-106, oct. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098299719300329> Acesso em: 24 jul. 2022

SECHER, Thomas *et al.* *Escherichia coli* producing colibactin triggers premature and transmissible senescence in mammalian cells. **PloS one**, [s.l.], v. 8, n. 10, p. e77157,

2013. Disponível em:
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0077157> Acesso em: 10 nov. 2022

SIGNAL. [S.], 2022. Disponível em:
<https://signal.mutationalsignatures.com/explore/cancer> Acesso em: 09 jul. 2022

SILVESTRE, Carina Maria Rôlo Ferreira. **O diálogo entre o cérebro e o intestino: qual o papel dos probióticos?: revisão de literatura**. 2016. Tese (Mestrado Integrado em Medicina) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2016. Disponível em:
<https://repositorio.ul.pt/handle/10451/26287> Acesso em: 02 mar. 2022

SONG, Mingyang; CHAN, Andrew T.; SUN, Jun. Influence of the gut microbiome, diet, and environment on risk of colorectal cancer. **Gastroenterology**, [s.], v. 158, n. 2, p. 322-340, jan. 2020. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508519413693> Acesso em: 29 jul. 2022

STRAKOVA, Nicol; KORENA, Kristyna; KARPISKOVA, Renata. Klebsiella pneumoniae producing bacterial toxin colibactin as a risk of colorectal cancer development-A systematic review. **Toxicon**, [s.], v. 197, p. 126-135, jul. 2021. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010121001112> Acesso em: 09 mai. 2022

SURESH, Arya *et al.* Evolutionary dynamics based on comparative genomics of pathogenic Escherichia coli lineages harboring polyketide synthase (Pks) island. **MBio**, [s.], v. 12, n. 1, p. e03634-20, mar. 2021. Disponível em:
<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/mBio.03634-20> Acesso em: 01 jul. 2022

TANG-FICHAUX, Min *et al.* Tackling the threat of cancer due to pathobionts producing colibactin: is mesalamine the magic bullet?. **Toxins**, [s.], v. 13, n. 12, p. 897, dec. 2021. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8703417/> Acesso em: 13 ago. 2022

TERLOUW, Diantha *et al.* Recurrent APC splice variant c. 835-8A> G in patients with unexplained colorectal polyposis fulfilling the colibactin mutational

signature. **Gastroenterology**, [s.], v. 159, n. 4, p. 1612-1614. 5th ed., jun. 2020. Disponível em: [https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(20\)34859-9/fulltext](https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(20)34859-9/fulltext) Acesso em: 23 mar. 2022

THAKUR, Bhupesh K.; MALAISÉ, Yann; MARTIN, Alberto. Unveiling the mutational mechanism of the bacterial genotoxin colibactin in colorectal cancer. **Molecular cell**, [s.], v. 74, n. 2, p. 227-229, apr. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276519302771> Acesso em: 17 abr. 2022

TORTORA, Gerard J. **Microbiologia**. 12. ed. Porto alegre: ArtMed, 2017. *E-book*. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/activate/9788582713549> Acesso em: 03 mar. 2022

TRONNET, Sophie *et al.* High iron supply inhibits the synthesis of the genotoxin colibactin by pathogenic *Escherichia coli* through a non-canonical Fur/RyhB-mediated pathway. **Pathogens and Disease**, [s.], v. 75, n. 5, p. ftx066, jul. 2017. Disponível em: <https://academic.oup.com/femspd/article/75/5/ftx066/3871353?login=false> Acesso em: 30 mai. 2022

TSUNEMATSU, Yuta *et al.* Mother-to-infant transmission of the carcinogenic colibactin-producing bacteria. **BMC microbiology**, [s.], v. 21, n. 1, p. 1-7, aug. 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12866-021-02292-1> Acesso em: 03 mar. 2022

VAN HOECK, Arne *et al.* Portrait of a cancer: mutational signature analyses for cancer diagnostics. **BMC cancer**, [s.], v. 19, n. 1, p. 1-14, may 2019. Disponível em: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-019-5677-2> Acesso em: 13 jul. 2022

VEZIAN, Julie *et al.* Association of colorectal cancer with pathogenic *Escherichia coli*: focus on mechanisms using optical imaging. **World journal of clinical oncology**, [s.], v. 7, n. 3, p. 293, jun. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4896897/> Acesso em: 04 jul. 2022

VEZIAN, Julie *et al.* Gut microbiota as potential biomarker and/or therapeutic target to improve the management of cancer: focus on colibactin-producing *Escherichia coli* in colorectal cancer. **Cancers**, [s.l.], v. 13, n. 9, p. 2215, may 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/9/2215> Acesso em: 15 jul. 2022

VILA, Julien *et al.* *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. **FEMS microbiology reviews**, [s.l.], v. 40, n. 4, p. 437-463, jul. 2016. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsre/article/40/4/437/2197819?login=false> Acesso em: 02 jul. 2022

VILLARIBA-TOLENTINO, Carmina *et al.* pks+ *Escherichia coli* more prevalent in benign than malignant colorectal tumors. **Molecular Biology Reports**, [s.l.], v. 48, n. 7, p. 5451-5458, jul. 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11033-021-06552-1> Acesso em: 21 mai. 2022

WANG, Boshi; KOHLI, Jaskaren; DEMARIA, Marco. Senescent cells in cancer therapy: friends or foes?. **Trends in cancer**, [s.l.], v. 6, n. 10, p. 838-857, oct. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S240580332030159X> Acesso em: 10 ago. 2022

WANG, Shixiang *et al.* Sigflow: an automated and comprehensive pipeline for cancer genome mutational signature analysis. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 37, n. 11, p. 1590-1592, jun. 2021. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-abstract/37/11/1590/5926972> Acesso em: 20 ago. 2022

WASSENAAR, Trudy M. E. coli and colorectal cancer: a complex relationship that deserves a critical mindset. **Critical reviews in microbiology**, [s.l.], v. 44, n. 5, p. 619-632, jun. 2018. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1040841X.2018.1481013> Acesso em: 30 mai. 2022

WERNKE, Kevin M. *et al.* Structure and bioactivity of colibactin. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, [s.l.], v. 30, n. 15, p. 127280, aug. 2020. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X20303905?casa_token=

qPCemDMzZUYAAAAA:fVbtDizk2IKkeNhVckWTbYuIMF2RnX5u8tE18E5_vO98YjWdt54arCQxBuLgx1Gc6Nsg4IcAtz1v6w Acesso em: 05 abr. 2022

WILSON, Matthew R. *et al.* The human gut bacterial genotoxin colibactin alkylates DNA. **Science**, [s.l.], v. 363, n. 6428, p. eaar7785, feb. 2019. Disponível em: https://www.science.org/doi/full/10.1126/science.aar7785?casa_token=MSZP1MM8X-UAAAAA%3AxvF4vZW0U6DVgSK25GxZx-_Sim_D_L-hGouQhKg0fwyrEqqi-KZslyICD7O2MKg4Cg_MBFyBjt5Dyr02s Acesso em: 03 mar. 2022

WONG, Sunny H.; YU, Jun. Gut microbiota in colorectal cancer: mechanisms of action and clinical applications. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [s.l.], v. 16, n. 11, p. 690-704, sept. 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41575-019-0209-8> Acesso em: 18 jul. 2022

WORLD HEALTH ORGANIZATION. [S.l.], 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> Acesso em: 21 mai. 2022

XUE, Mengzhao *et al.* Structure elucidation of colibactin and its DNA cross-links. **Science**, [s.l.], v. 365, n. 6457, p. eaax2685, aug. 2019. Disponível em: https://www.science.org/doi/full/10.1126/science.aax2685?casa_token=1Bd1nzkpPxQAAAAA%3AmNpTMuoi7ePAEONr-nHNmIDKLa6zOME9SPDKbDLuRo3aancz0-vitVQsBGd_wWyl3JCGauU4x3Jk2mzn Acesso em: 29 abr. 2022

YANG, Ye; JOBIN, Christian. A mutational signature that can be made by a bacterium arises in human colon cancer. **Nature**, [s.l.], v. 580, p. 194-195, mar. 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/d41586-020-00818-7> Acesso em: 08 mai. 2022

ZLOTORYNSKI, Eytan. Poly (dA: dT) make it and break it. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s.l.], v. 19, n. 10, p. 619-619, aug. 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41580-018-0054-6> Acesso em: 08 mai. 2022