

## CAPÍTULO 2

# PERFIL FENOTÍPICO DA VIRULÊNCIA DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE PACIENTES COM CÂNCER DE RETO

*Data de submissão : 09/06/2023*

*Data de aceite: 03/07/2023*

### **Filipe Menezes**

Laboratório de Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo  
<http://lattes.cnpq.br/1857769250721550>

### **Rosa Liliana Solis Castro**

Laboratório de Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo  
<http://lattes.cnpq.br/0899037377396906>

### **Gabriela Gama Freire Alberca**

Laboratório de Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo  
<http://lattes.cnpq.br/0958803779904788>

### **Patrícia Lima Falcão**

Centro de Biotecnologia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo  
<http://lattes.cnpq.br/4014111088312457>

### **Amanda Palermo Nunes**

Centro de Biotecnologia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo  
<http://lattes.cnpq.br/8854848436796574>

### **Dino Seigo Gushiken Junior**

Centro de Biotecnologia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo  
<http://lattes.cnpq.br/8399960698307010>

### **Stephanie Angelo Pomin**

Centro de Biotecnologia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo  
<http://lattes.cnpq.br/5516242393511713>

### **Larissa Andrade Almeida**

Centro de Biotecnologia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo  
<http://lattes.cnpq.br/9566598831396569>

### **Ariane Cristina Nicolau Torres**

Hospital Paulista de Medicina, Departamento de Ginecologia, Universidade Federal de São Paulo  
<http://lattes.cnpq.br/3534698387975900>

### **Carlos Roberto Jorge Soares**

Centro de Biotecnologia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo  
<http://lattes.cnpq.br/3805602544840562>

**RESUMO:** Neste estudo foram avaliados alguns fatores de virulência de cepas de *E. coli* isoladas de fezes de pacientes com câncer de reto (CR) e indivíduos sadios (PS). Foi observada uma diferença estatística na resistência a 60°C por 30 e 60 minutos em cepas de pacientes com CR. A maioria das cepas de ambos os pacientes, resistentes à temperatura, foram móveis e todas as cepas de CR resistentes a 60°C por 60 minutos produziram motilidade. A produção de bacteriocinas foi observada nas cepas isoladas de ambos os grupos de pacientes, com uma tendência maior para inibir cepas de CR. A maioria de cepas foram sensíveis aos antibióticos, mas resistentes aos metais pesados testados. É importante, notar que as cepas de CR resistentes a antibióticos foram mais produtoras de neuraminidase em relação às cepas isoladas de PS. A associação da resistência ao trimetoprima, sulfametoxazol e bicloreto de mercúrio foi observado na concentração de 16 µg. O fenótipo para α-hemólise foi detectado predominantemente entre as cepas de CR.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Escherichia coli*; Câncer de reto; Perfil fenotípico de virulência.

#### PHENOTYPIC PROFILE OF THE VIRULENCE OF *Escherichia coli* ISOLATED FROM PATIENTS WITH RECTAL CANCER

**ABSTRACT:** In this study, were evaluated some virulence factors of *E. coli* strains isolated from feces of patients with rectal cancer (RC) and healthy patients (HP). A statistical difference was observed in strains isolated from RC patients, who were resistant at 60 ° C for 30 and 60 minutes. Most of the strains of both patients, resistant to temperature were mobile, and all RC strains resistant at 60 ° C for 60 minutes produced motility. The production of bacteriocins was observed in both groups with a greater tendency to inhibit RC strains. Most were sensitive to antibiotics but resistant to the heavy metals tested. It is important to note that antibiotic-resistant RC strains were more neuraminidase-producing than HP isolates. The resistance association to trimethoprim, sulfamethoxazole and mercuric bichloride was observed at the concentration of 16 µg. The phenotype for α-hemolysis was detected predominantly among RC strains.

**KEYWORDS:** *Escherichia coli*; Rectal cancer; Phenotypic profile.

## INTRODUÇÃO

*Escherichia coli* é uma bactéria pertencente à Família *Enterobacteriaceae*. É um bacilo Gram-negativo, facultativo, não esporulado e geralmente móvel com flagelos peritríquios, crescendo em temperaturas ótima entre 35 – 40°C (Bell e Kyriakides, 2002), além de possuir estratégias para sobreviver em temperaturas críticas (Murata et al., 2011).

Normalmente, interage de forma benéfica com o hospedeiro e é considerada membro da microbiota residente do intestino. Entretanto, existem cepas envolvidas em processos diarréicos (Kaper et al., 2004).

Os diferentes fatores de virulência expressos, tais como a resistência a ambientes estressantes (Kaur et al., 1998), fatores de colonização, produção de hemolisina, capacidade de invadir células epiteliais do intestino, produção de toxinas (Bell e Kyriakides, 2002) e resistência antimicrobiana (Al-Otaibi et al., 2016), permitem a associação dessas bactérias a uma grande variedade de doenças. Já foi demonstrado que enterobactérias, especialmente *E. coli*, são encontradas em abundância nas doenças inflamatórias do trato gastrointestinal (Winter et al., 2013).

Processos inflamatórios por períodos longos podem resultar em danos ao DNA facilitando a instalação e desenvolvimento de células degenerativas que precedem o aparecimento de algum tipo de câncer (Sjöqvist et al., 2005). Martin et al. (2004), observaram que em pacientes com câncer colorretal (CCR), *E. coli* estava mais associada e internalizada à mucosa em relação aos controles. No entanto, não está definido se o CCR é promovido pela inflamação causada pela *E. coli* ou outros microrganismos ou mesmo pela alteração na expressão de genes microbianos específicos (Michaud et al., 2004).

Estudos recentes demonstraram forte associação entre o desenvolvimento do CCR e bactérias intestinais, onde danos no DNA causados por radicais superóxido, formação de genotoxinas, aumento da proliferação das células T e outros fatores, contribuiriam para o desenvolvimento do câncer (Toprak et al., 2006; Ramos et al., 2010).

Dentre os diferentes tipos de câncer que acometem a espécie humana, o CCR é o terceiro em maior incidência e o segundo em termos de mortalidade. Estima-se que até o ano de 2035, o número total de mortes por câncer retal e de cólon aumentará 60% e 71,5% respectivamente (Douaiher et al., 2017). A maioria dos casos de CCR se dá de forma esporádica, surgindo mutações somáticas e clones tumorais que podem ser causados por infecções bacterianas. Existem indícios que fatores de virulência estão envolvidos diretamente como desenvolvimento do CCR (Cuevas-Ramos et al., 2010), pois se verifica uma enorme variabilidade das características fenotípicas e genotípicas bacterianas, sendo de interesse avaliar o perfil virulento de bactérias participando desses processos.

Tendo em vista a importância de *Escherichia coli* no ecossistema intestinal e pela sua possível associação como desenvolvimento do CCR, neste estudo se propôs determinar o perfil fenotípico de alguns fatores de virulência em cepas isoladas de pacientes diagnosticados com câncer de reto (CR).

## MATERIAL E MÉTODOS

1. **Cepas bacterianas.** Foram usadas 23 cepas de *E. coli* isoladas e identificadas no Laboratório de Anaeróbios do Departamento de Microbiologia do ICB, USP. Foram

obtidas de fezes coletadas de 13 pacientes diagnosticados com câncer de reto. Também, foram usadas 16 cepas obtidas de 10 indivíduos sadios sem câncer de reto, conforme determinado por exame de colonoscopia. Esses indivíduos foram atendidos no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP). Todos os participantes assinaram o Termo de Livre Consentimento aprovados pelos Comitês de Ética do ICB (Proc. No. 1236/CEPSH) e da Faculdade de Medicina (Proc. No. 321/14) da Universidade de São Paulo.

**2. Testes Fenotípicos.** As cepas foram reativadas em Agar MacConkey e incubadas a 37 °C por 18 a 24 horas, e mantidas em ágar Luria para a realização dos testes bioquímicos.

**2.1. Resistência à Temperatura (Holdeman et al., 1977).** Alíquotas de 0,1 ml de culturas de 24 horas em caldo BHI suplementado foram transferidas para tubos contendo 5ml do mesmo meio e levados a banho-maria, a 60°C, por 30 e 60 minutos, e a 100°C, por 1 e 10 minutos. Decorridos esses tempos os tubos foram incubados em aerobiose, a 37°C, por 24 horas. A turvação do meio foi indicativa de crescimento bacteriano e interpretado como resistência ao calor. Tubos com caldo BHI inoculados, não expostos ao calor, foram usados como controle de viabilidade celular bacteriana.

**2.2. Produção de Motilidade, H<sub>2</sub>S e Indol (Holdeman et al., 1977).** Foi utilizado o meio Sulfide Indole Motility (SIM, Difco). Esse meio foi inoculado em picada e incubado em condições de aerobiose, a 37°C, por 24 horas. Após incubação foi observada a motilidade, e o enegrecimento do meio indicou a produção de sulfeto de hidrogênio. A produção de indol foi detectada pela cor púrpura na superfície do meio, após a adição do reativo de Kovacs. A cepa *E. coli* ATCC25922 foi usada como controle positivo.

**2.3. Determinação da susceptibilidade a antibióticos e a metais pesados (Sutter et al., 1979; Riley e Mee, 1982; CLSI, 2016).** A susceptibilidade aos antibióticos e metais pesados foi determinada pelo método de disco difusão, usando-se o meio Müller-Hinton. Os antibióticos testados foram: ampicilina (10 µg), amoxicilina + ácido clavulânico (10 µg), cefalotina (30 µg), cefazolina (30 µg), cefotaxima (30 µg), cefuroxima (30 µg), ceftriaxona (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefepime (30 µg), meropenem (10 µg), aztreonam (30 µg), ácido nalidíxico (30 µg), nitrofurantoína (30 µg), norfloxacina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), ofloxacina (5 µg), levofloxacina (5 µg), estreptomicina (10 µg), amicacina (30 µg), gentamicina (10 µg), azitromicina (15 µg), cloranfenicol (30 µg), tetraciclina (30 µg), trimetoprima/sulfametoxazol (5 µg), polimixina b (300 UI). A cepa *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle. Para a colistina foi utilizado o método de microdiluição em caldo Muller Hinton ajustado com cálcio em concentrações do antimicrobiano variando de 0,125 a 128 µg/ml. Como cepa controle foi utilizada a bactéria *Proteus mirabilis* ATCC 25933 resistente à colistina. Para verificar a concentração inibitória mínima (CIM), foi usado o corante resazurina (azul) e a mudança de cor para rosa, nos poços com as concentrações da droga, indicou o crescimento bacteriano e resistência bacteriana à referida concentração.

O método de diluição em ágar foi utilizado para os íons metálicos: bicloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ), nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ), sulfato de níquel ( $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de cádmio ( $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ) e cloreto de chumbo ( $\text{PbCl}_2$ ). As concentrações dos metais variaram de 1 a 32  $\mu\text{g/ml}$ . Meios sem agentes antimicrobianos foram usados como controle. O inóculo foi padronizado para  $1,5 \times 10^8$  células/ml com auxílio da escala 0,5 de McFarland. As placas foram inoculadas, em duplicata, usando-se o replicador Steers e incubadas a 37 °C, por 24 horas. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de cada agente capaz de inibir totalmente o crescimento macroscópico dos organismos. O ponto crítico usado foi de 2  $\mu\text{g/ml}$ .

#### **2.4. Detecção da Produção da Enzima $\beta$ -Lactamase (Booth et al., 1977).**

As espécies resistentes à penicilina G foram utilizadas para verificar a produção da enzima  $\beta$ -lactamase. 20  $\mu\text{l}$  das bactérias foram inoculadas, em duplicata, em Agar BHI com 8 e 32  $\mu\text{g/ml}$  de penicilina e incubados (37°C, 24 h). Em seguida, o crescimento bacteriano foi exposto a vapores de clorofórmio durante 20 minutos, deixando posteriormente as placas entreabertas para a evaporação do clorofórmio, por mais 20 minutos. Então, foi adicionada uma camada de 3 ml de meio BHI semi-sólido (0,7% de ágar) inoculado com a cepa reveladora de *E. coli* sensível à penicilina, e após nova incubação, o aparecimento de um halo de crescimento foi considerado como produção da enzima.

**2.5. Produção de Bacteriocinas (Booth et al., 1977).** Foi verificada pelo método da dupla camada, em placas contendo ágar BHI (Brain Heart Infusion, Difco) suplementado com extrato de levedura (0,5%). As bactérias produtoras foram semeadas em spot com alça de platina, e incubadas em aerobiose, a 37°C, por 24 horas. Após o tempo de incubação, as culturas foram submetidas à ação do vapor de clorofórmio, por 20 minutos. Decorrido esse período, as placas permaneceram entreabertas, por 20 minutos, para eliminação dos resíduos de clorofórmio. Em seguida, o crescimento bacteriano foi coberto com 3,0 ml de BHI semi-sólido (0,7% de ágar) inoculado com 0,1 ml de uma cultura líquida de 24 horas (cepa reveladora com  $1,5 \times 10^8$  células/ml). As placas foram incubadas em aerobiose, a 37°C, por 24 horas, observando-se a presença ou a ausência de halos de inibição da bactéria reveladora. Todas as espécies foram testadas contra elas mesmas. Foi definida como auto-antagonismo a produção de bacteriocina por uma espécie contra ela mesma; iso-antagonismo, a produção por uma espécie contra outra espécie do mesmo gênero; e hetero-antagonismo, a produção por uma espécie contra outra de gênero diferente, neste caso foi usada a cepa *Proteus mirabilis* ATCC 25933.

**2.6. Detecção da produção e da inibição da atividade da enzima neuraminidase (Holdeman et al., 1977).** Foi determinada em placas de microtitulação, utilizando-se sangue de humano coletado em solução Alsever e mantido a 4 °C, até uma semana. As células bacterianas foram cultivadas em caldo BHI (37 °C, 24 h), lavadas três vezes em PBS (0,01M, pH 7,3) (12.000 g, 10 minutos) e ressuspensas a  $1,5 \times 10^8$  bactérias/ml. Em seguida, 1 ml do inóculo bacteriano foi misturado com 10  $\mu\text{l}$  de hemácias (1%) previamente levadas, sendo essa mistura cuidadosamente

homogeneizada e incubada a 37 °C, por uma noite. Em seguida, nas microplacas, foram realizadas diluições seriadas, em base 2, adicionando-se 18 µl de PBS e 2 µl de lectina de amendoim (*Arachis hypogaea* PNA, Sigma Chemical Co., USA). Posteriormente, a cada diluição foram adicionados 20 µl da mistura bactérias-eritrócitos (1%), sendo homogeneizados e incubados a 37°C, por 1 hora, seguido de incubação a 4°C, por uma noite. A produção da neuraminidase foi considerada quando houve aglutinação (bactéria-lectina-eritrócitos). Em cada ensaio foi utilizada a mistura de bactérias e de eritrócitos, sem a adição de lectina como controle negativo da reação (precipitação).

A inibição da produção em placas de microtitulação, como anteriormente descrito, e tratando-se as bactérias com 1 ml de galactose (1mM). Assim, a mistura foi cuidadosamente homogeneizada e incubada à temperatura ambiente, por 30 minutos, para a sensibilização das células bacterianas. Em seguida, a mistura foi concentrada por centrifugação (12.000 g, 10 minutos), e lavada uma vez, em PBS.

Em seguida, foram adicionados nas microplacas 18 µl de PBS e 2 µl de lectina realizando-se diluições seriadas, em base 2. Posteriormente, a cada diluição foram adicionados 20 µl de bactérias sensibilizadas com galactose e 20 µl de uma suspensão de eritrócitos (1%). As placas foram homogeneizadas e incubadas a 37 °C, por 1 hora e a inibição da enzima foi observada pela inibição da aglutinação dos eritrócitos. Em cada ensaio foi utilizado como controle negativo uma mistura de bactéria-eritrócito-lectina.

**2.7. Produção de Hemolisinas (Avila-Campos, 1995).** Foi determinada em placas contendo ágar com 5% de sangue desfibrinado de cavalo e foi realizado outro teste com sangue de carneiro. As placas foram inoculadas em duplicata com o replicador de Steers (Cefar LTDA., São Paulo, SP), transferindo um inóculo final de 10<sup>5</sup> células/ml/ponto, a partir da cultura padronizada em 1,5x 10<sup>8</sup> células/ml ( $A_{550nm} = 0,4$ ). A formação de halo claro ao redor do crescimento indicou hemólise total.

**3. Análise estatística.** Os dados foram avaliados com o teste Chi-Square. Nível de significância de  $P \leq 0,05$  (\*).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as cepas avaliadas foram sensíveis à temperatura de 100°C, porém a 60 °C por 30 minutos 52,2 % das cepas CR e 18,8% das cepas de PS foram resistentes. Somente cepas de CR foram resistentes a 60°C por 60 minutos, sendo 50% das resistentes por 30 minutos. Quando foi realizado o teste de Chi-square, houve diferença estatística significativa das cepas de ambos os grupos em relação à resistência a 60°C/30min e 60°C/60min (Gráfico 1). Jenkins, Schultz e Martin (1988) demonstraram uma proteção cruzada em *E. coli* produtora de proteínas de choque térmico quando submetida a inanição à glicose e exposta ao peróxido de hidrogênio. O microambiente do câncer apresenta elevada taxa de consumo de glicose pelas células cancerígenas e produzem

grande quantidade de peróxido de hidrogênio (Szatrowski e Nathan, 1991; Fang e Fang, 2016), isso poderia explicar porque apenas as cepas de CR foram resistentes por um tempo maior de exposição à temperatura.

A motilidade foi observada em 60,9% das cepas de CR e 75% das cepas de PS e não foi observada diferenças estatística entre elas ( $P = 0,357$ ), baseado no Chi-square test ( $\alpha=95\%$ ;  $P < 0,05$ ). No entanto, a produção de motilidade parece estar relacionada com a resistência a temperatura, pois 67% das cepas resistentes a 60°C por 30 minutos em ambos os pacientes e todas as seis cepas de CR resistentes a 60°C por 60 minutos produziram motilidade. A bioestabilidade da motilidade pode permitir que as bactérias realizem uma divisão do trabalho, onde células com motilidade contribuem para a infecção, enquanto as células imóveis sirvam como reservatório (Saini et al., 2008; Stewart e Cookson, 2014). Samanta et al. (2013) informaram que a expressão do regulador flagelar (*FlhD/FlhC*) em *E. coli* era limitada ao biofilme em momentos específicos da sua formação, enquanto, Horne et al. (2016) demonstraram que com o tempo, cepas de *E. coli* altamente móveis produziam biomassa com cada vez menos isolados móveis. Também tem sido detectada a presença de biofilme em tecidos adjacentes ao tumor quando esse era coberto por biofilme (Dejea et al., 2014). Isso pode levar a hipótese de que um ambiente estressante, como o do tecido cancerígeno, levaria as cepas a migrar para o ao redor desse ambiente, onde possivelmente encontrariam biofilmes com menos cepas móveis, aumentando dessa forma o volume e a estabilidade desse biofilme.

A Tabela 1 apresenta o perfil de susceptibilidade aos antibióticos, onde é possível visualizar que os antibióticos que foram mais eficientes contra todas as cepas de ambos os pacientes foram: ceftriaxona, norfloxacin, ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina, amicacina, gentamicina e colistina, pois nenhuma cepa testada ficou na zona intermediária e foram sensíveis. A resistência foi observada contra algumas das drogas testadas, 13% das cepas de CR e o 18,5% das cepas de PS foram Multi Droga Resistentes (MDR).

Sensibilidade para Trimetoprima Sulfametoxazol foi observada em 87% das cepas de CR e 68,8% de PS. Um número expressivo de cepas ficou na zona intermediária para alguns dos antibióticos. Todas as cepas que apresentaram resistência a algum dos  $\beta$ -lactâmicos foram positivas para a produção da enzima  $\beta$ -lactamase.

A presença de metais pesados nas indústrias, na agricultura e em hospitais tem colaborado para a seleção e disseminação de cepas resistentes a metais pesados, e essa resistência pode estar intimamente relacionada à resistência aos antibióticos (Smith, 1967; Ahonkai; Pugh; Russell, 1984). Todas as cepas testadas foram resistentes à maioria dos metais testados na concentração usada de 2  $\mu\text{g/mL}$ . Para o bicloreto de mercúrio foi observada resistência na concentração de 16  $\mu\text{g/mL}$ . Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada na susceptibilidade ao  $\text{HgCl}_2$  ( $P = 0,802$ ).

Todas as cepas resistentes a  $\text{HgCl}_2$  (16  $\mu\text{g/mL}$ ), também foram resistentes à Trimetoprima Sulfametoxazol, conforme observado na Tabela 2. O determinante da

resistência ao mercúrio pode ser de origem plasmidial o cromosomal, sendo codificada pelo gene *mer*, podendo coexistir com genes de resistência a algum antibiótico nos plasmídios (Nascimento, Chartone-Souza, 2003). A correlação entre a trimetoprima, sulfametoxazol e tetraciclina com o bicloreto de mercúrio tem sido observado em *E. coli* (Silva et al., 2006).

No geral, o resultado do teste de susceptibilidade a antibióticos foi intrigante, revelando mais cepas sensíveis em CR (60,9%), quando comparado a PS (43,8%). Além disso, foram encontradas mais cepas produtoras de  $\beta$ -lactamase em PS do que em CR. Não obstante, as cepas de PS também foram mais resistentes aos metais pesados. Esse resultado pode ter relação com a competição entre as bactérias, devido à produção de bacteriocinas.

A produção de bacteriocinas foi observada em 13% das cepas de pacientes com CR e 18,8% das cepas de PS. Na Tabela 3 é possível visualizar que elas foram capazes de inibir cepas de ambos os grupos, com uma tendência maior para a inibição das cepas de CR. A cepa CR20 e a de PS36, se destacaram por inibir um número elevado das cepas testadas. Todas as cepas produtoras de bacteriocinas foram sensíveis aos antibióticos testados, exceto pela cepa PS36 que foi MDR. Em contrapartida, a maior parte das cepas resistentes aos antibióticos de ambos os pacientes foram inibidas pela maioria das cepas produtoras de bacteriocina, o que poderia favorecer a colonização por cepas sensíveis aos antibióticos, inibindo o crescimento das cepas resistentes aos antibióticos nos pacientes com CR.

Os estudos que determinam o perfil de susceptibilidade a antibióticos da *E. coli* em pacientes com infecção sanguínea, apontam maior resistência entre as isoladas de pacientes com CCR do que de pacientes sem câncer (Al-Otaibi et al., 2016; Magalhães et al., 2014). É importante lembrar que, esses isolados de pacientes com infecção, geralmente são isolados de hemoculturas e de pacientes que já estão em tratamento, diferente do nosso trabalho, onde os isolados são de fezes e de pacientes que ainda não receberam o tratamento. Autores evidenciaram que as bactérias produtoras de  $\beta$ -glucuronidases como a *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* encontram-se aumentadas após a quimioterapia com o Irinotecano, um quimioterápico muito usado em tratamento de câncer colorretal (Stringer et al., 2007).

Um estudo realizado com ratos portadores de tumores demonstrou após a análise de amostras fecais, que o irinotecano foi capaz de alterar a microbiota intestinal, aumentando os *Clostridium* cluster XI e *Enterobacteriaceae*, particularmente após a terapia em dose intensiva (Lin et al., 2012). Esse aumento de *E. coli* após o tratamento, poderia retomar as bactérias resistentes aos antibióticos, mas novos estudos avaliando os isolados de pacientes antes e depois do tratamento devem ser realizados para elucidar essa e outras questões.

Não houve distinção na produção da neuraminidase ( $P = 0,818$ ) nem na inibição da atividade da enzima ( $P = 0,778$ ) entre as cepas de ambas as origens. Os ácidos siálicos

estão amplamente distribuídos na superfície de todas as células eucarióticas para o reconhecimento célula-célula, sendo também alvos para os microrganismos patogênicos (Severi; Hood; Thomas, 2007). As células do câncer são conhecidas por apresentarem um aumento expressivo de ácido siálico em sua superfície, o que confere grandes vantagens às células tumorais (Pearce e Läubli, 2016), que vão desde inibição de apoptose à resistência à terapia do câncer. Sialidasas bacterianas ou Neuraminidase, que removem ácidos siálicos de superfície foram usadas na terapia contra o câncer, mas com sucesso limitado (Bull et al., 2014). Em nosso estudo, foi observada uma diferença significativa na produção da enzima neuraminidase nas cepas de ambos os pacientes.

Entretanto, uma aparente relação entre cepas produtoras de neuraminidase e com resistência a drogas foi notada. Considerando as cepas resistentes para estreptomicina e cefalotina, 100% das cepas de CR foram produtoras de neuraminidase e nenhuma cepa de PS produziu a enzima. Ainda, usando a ampicilina, a taxa de produção da enzima em cepas CR subiu para 75% e em cepas PS caiu para 0% após o teste. Com exceção de uma cepa de CR (CR-21), todas as que produziram  $\beta$ -lactamase, também foram positivas para a produção da enzima neuraminidase, enquanto nenhuma das cepas de PS a produziu. A mesma tendência foi observada contra os demais antibióticos que selecionaram cepas produtoras da enzima Neuraminidase, exceto no caso do sulfametoxazol + trimetoprima, que selecionou 33,3% de cepas produtoras em CR e 60% em PS. Embora os ácidos siálicos confirmem grandes vantagens às células tumorais e a enzima neuraminidase seja capaz de remover os ácidos siálicos de superfície, o real efeito do uso desses antibióticos em pacientes com CR deve ser mais bem esclarecido.

A  $\alpha$ -hemolisina de *E. coli* é uma toxina formadora de poros, que gera pequenos canais permeáveis aos cátions na membrana celular do hospedeiro, induzindo “vazamentos focais”, nas células e nos tecidos do cólon, dentro dos quais a *E. coli* hemolítica se acumula (Troeger et al., 2007; Bucker et al., 2014). Halos que indicaram  $\alpha$ -hemólise foram visíveis em 1 (6,3%) das cepas de PS e 3 (13%) das cepas de CR ( $P = 0,492$ ), destacando que todas elas eram ExPEC. Exclusivamente dentre as de CR, duas foram resistentes a 60°C por 30 e 60 minutos.

Em estudo com cepas obtidas de urosepsis e fezes de pacientes saudáveis, o grupo filogenético B2, altamente virulento, esteve fortemente associado ao abrigo da ilha PKS (associada a aberrações cromossômicas e progressão do CCR) e ao fator citotóxico necrozante (CNF1). Todas as cepas positivas para o CNF1 apresentaram o fenótipo para  $\alpha$ -hemólise e, apenas 8% das cepas que apresentaram o fenótipo para  $\alpha$ -hemólise foram negativas para CNF1 (Dubois et al., 2010). Outra forte associação entre a  $\alpha$ -hemólise e o CCR foi relatado por Jin et al. (2016), que observaram que a *E. coli*  $\alpha$ -hemolítica foi significativamente associada ao adenoma e CCR em mulheres, mas não em homens. Em nosso estudo, somente a cepa PS-25 pertenceu ao sexo feminino.

## CONCLUSÃO

As cepas avaliadas neste estudo apresentaram uma ampla variedade de características fenotípicas. As cepas isoladas de CR, especialmente, apresentaram característica relacionada à proteção, mas sugere-se maiores estudos dessas características as quais podem apresentar alguma relação com o desenvolvimento do CR.

## REFERÊNCIAS

1. Ahonkhai, I; Pugh, W; Russell, A. 1984. Sensitivity to antimicrobial agents of some mercury-sensitive and mercury-resistant strains of Gram-negative bacteria. **Current. Microbiol.** **11**: 183-186.
2. Al-Otaibi, F. et al. 2016. Prevalence and risk factors of Gram-negative bacilli causing blood stream infection in patients with malignancy. **Saudi Med.** **37**: 979-984.
3. Avila-Campos, M.J. 1995. Haemolytic activity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains on different blood types. **Rev.Inst.Med.Trop.** **37**:215- 217.
4. Bell, C; Kyriakides, A. 2002. Pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Path.**, **10**: 293-320.
5. Booth, S; Johnson, J; Wilkins, T. 1977. Bacteriocin production by strains of *Bacteroides* isolated from human feces and the role of these strains in the bacterial ecology of the colon. **Antimicrob. Agents Chemother.** **11**:718-724
6. Bücker, R. et al. 2014. alpha-Haemolysin of *Escherichia coli* in IBD: a potentiator of inflammatory activity in the colon. **Gut.** **63**: 1893-1901.
7. Büll, C. et al. 2014. Sialic acids sweeten a tumor's life. **Cancer Research.** **74**: 3199-3204.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2016. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 26<sup>th</sup> ed. CLSI supplement M100S (ISBN 1-56238-923-8)
9. Cuevas-Ramos, G. et al. 2010. *Escherichia coli* induce DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. **PNAS.** **107**:11537-11542.
10. Dejea, C. et al. 2014. Microbiota organization is a distinct feature of proximal colorectal cancers. **Proc Natl Acad Sci U S A.** **51**: 18321-6.
11. Douaiher, J; Ravipati, A; Grams, B; Chowdhury, S; Alatis, O; Are, C. 2017. Colorectal cancer-global burden, trends, and geographical variations. **J. Surg. Oncol.** **115**: 619–630.
12. Dubois, D. et al. 2010. Cyclomodulins in urosepsis strains of *Escherichia coli*. **J Clin Microbiol.** **48**: 2122-29.
13. Fang, S; Fang, X. 2016. Advances in glucose metabolism research in colorectal cancer (Review). **Biomedical Reports.** **5**: 289-295.
14. Holdeman, L; Cato, E; Moore, W. 1977. Anaerobic Laboratory Manual 4<sup>ed</sup>. **Virginia Polytechnic Institute, Blackburg, VA.**
15. Horne, S. et al. 2016. Spontaneous mutations in the *flhD* operon generate motility heterogeneity in *Escherichia coli* biofilm. **BMC Microbiology.** **16**: 262.

16. Jenkins, D; Schultz, J; Martin, A. 1988. Starvation-Induced Cross Protection against Heat or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Challenge in *Escherichia coli*. **J Bacteriol.** **170**: 3910-3914.
17. Jin, Y; et al. 2016. Hemolytic *Escherichia coli* Promotes Colonic Tumorigenesis in Females. **Cancer Research.** **76**: 2891-2900.
18. Kaper, J; Nataro, J; Mobley, H. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Rev.** **2**:123-140.
19. Kaur, J. et al. 1998. Factors affecting the heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7. **Lett Appl Microbiol.** **4**: 325-30
20. Lin, X. et al. 2012. Irinotecan (CPT-11) Chemotherapy Alters Intestinal Microbiota in Tumor Bearing Rats. **PLoS ONE.** **7**: e39764.
21. Magalhães, L. et al. 2014. Incidência e perfil de sensibilidade e resistência das estirpes bacterianas isoladas das hemoculturas de um hospital oncológico. **Revista Científica da Faminas.** **10**: 40-53.
22. Martin, M. et al. 2004. Enhanced *Escherichia coli* Adherence and Invasion in Crohn's Disease and Colon Cancer. **Gastroenterol.** **127**:80-93.
23. Michaud, A. et al. 2004. High Prevalence of Adherent-Invasive *Escherichia coli* Associated With Ileal Mucosa in Crohn's Disease. **Gastroenterol.** **127**: 412-421.
24. Murata, M. et al. 2011. Molecular Strategy for Survival at a Critical High Temperature in *Escherichia coli*. **PLoS ONE.** **6**: e20063.
25. Nascimento, A.; Chartone-Souza, E. 2003. Operon *mer*: Bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. **Genet. Mol. Res.** **2**: 92-101.
26. Pearce, O.; Läubli, H. 2016. Sialic acids in cancer biology and immunity. **Glycobiology,** **26**: 111–128
27. Riley, G; Mee, B. 1982. Susceptibility of *Bacteroides* spp. to heavy metals. **Antimicrob. Agents Chemother.** **22**: 889-892.
28. Saini, S. et al. 2008. Is a posttranslational activator of FlhD4C2-dependent flagella gene expression? **J. Bacteriol.** **190**: 4979–88.
29. Samanta, P. et al. 2013. OmpR and RcsB Abolish temporal and spatial changes in expression of flhD in *Escherichia coli* biofilm. **BMC Microbiol.** **13**:182.
30. Severi, E.; Hood, D.; Thomas, G. 2007. Sialic acid utilization by bacterial pathogens. **Microbiology,** **153**: 2817–2822
31. Silva, M. et al. 2006. Antimicrobial resistance patterns in *Enterobacteriaceae* isolated from urban wastewater treatment plant. **FEMS Microbiol Ecol.** **60**: 166-176.
32. Sjöqvist, U. et al. 2005. Colorectal Cancer in Colonic Crohn's Disease – High Frequency of DNA-Aneuploidy. **Anticancer Res.** **25**:4393-4398.
33. Smith, D. 1967. Factors mediate resistance to mercury, nickel, and cobalt. **Science.** **156**: 1114-1116.
34. Stewart M.K.; Cookson, B.T. 2014. Mutually repressing repressor functions and multilayered cellular heterogeneity regulate the bistable *Salmonella* fliC census. **Mol Microbiol.** **94**:1272–84.

35. Stringer, A. et al. 2007. Chemotherapy-induced mucositis: the role of gastrointestinal microflora and mucins in the luminal environment. **J Support Oncol.**5: 259-67.
36. Sutter, V. et al. 1979. Collaborative evaluation of a proposed dilution method of susceptibility testing of anaerobic bacteria. **Antimicrob. Agents Chemother.** 16: 495- 502.
37. Szatrowski, T; Nathan, C. 1991. Production of Large Amounts of Hydrogen Peroxide by Human Tumor Cells. **Cancer Research.** 51: 794-798.
38. Toprak,U. et al. 2006. A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. **Clin. Microbiol. Infec.** 12:782-786.
39. Troeger H. et al. 2007. *Escherichia coli* alpha-haemolysin induces focal leaks in colonic epithelium: a novel mechanism of bacterial translocation. **Cell Microbiol.** 9: 2530-2540.
40. Winter, S; Lopez, C; Bäumlér, A. 2013. The dynamics of gut-associated microbial communities during inflammation. **EMBO reports.** 14:319-327.

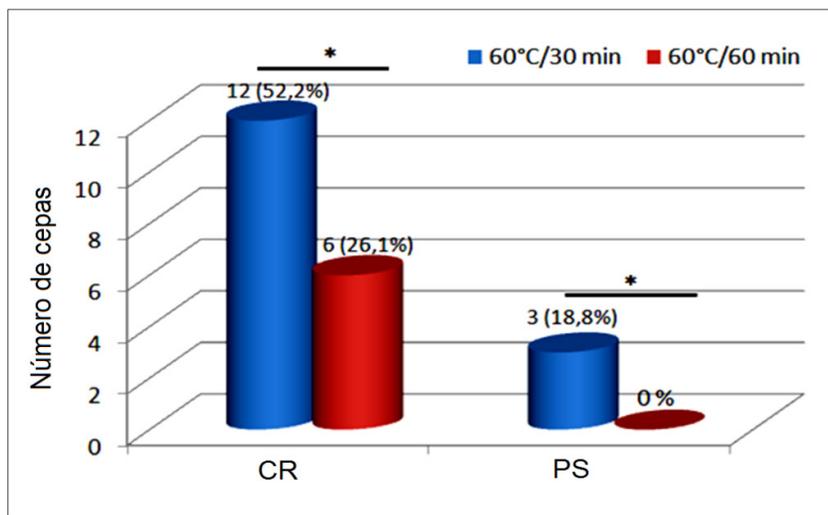


Gráfico 1. Resistência a Temperatura

Antibióticos	CR (n = 23)			PS (n = 16)		
	S	I	R	S	I	R
Ampicilina	15	4	4	9	3	4
Amoxicilina/Ác.Clav	23	0	0	155	1	0
Cefalotina	3	18	2	6	9	1
Cefazolina	23	0	0	15	0	1
Cefotaxima	20	3	0	14	2	0
Cefuroxima	5	18	0	4	12	0
Ceftriaxona	23	0	0	16	0	0
Ceftazidima	21	2	0	15	1	0
Cefepime	20	3	0	15	1	0
Meropenem	22	1	0	16	0	0
Aztreonam	22	1	0	16	0	0
Ácido Nalidixico	22	0	1	16	0	0
Nitrofurantoína	23	0	0	15	0	1
Norfloxacin	23	0	0	16	0	0
Ciprofloxacina	23	0	0	16	0	0
Ofloxacin	23	0	0	16	0	0
Levofloxacin	23	0	0	16	0	0
Estreptomicina	27	4	2	12	2	2
Amicacina	23	0	0	16	0	0
Gentamicina	23	0	0	16	0	0
Azitromicina	22	0	1	14	0	2
Cloranfenicol	23	0	0	15	1	0
Tetraciclina	20	0	3	15	0	1
Sulfametoxazol/Trim	20	0	3	11	0	5
Polimixina	4	17	2	0	15	1

AMP: Ampicilina (14-16), AMC: Amoxicilina/ÁcClav (14-17), CFL: Cefalotina (15-17), CFZ: Cefazolina (>15 <14), CFX: Cefotaxima (23-25), CRX: Cefuroxima (15-22), CRO: Ceftriaxona (20-22), CAZ: Ceftazidima (18-20), CPM: Cefepime (19-24), MER: Meropenem (20-22), AZT: Aztreonam (18-20), NAL: Ácido Nalidixico (14-18), NIT: Nitrofurantoína (15-16), NOR: Norfloxacin (13-16), CIP: Ciprofloxacina (16-20), OFL: Ofloxacin (13-15), LVX: Levofloxacin (14-16), EST: Estreptomicina (12-14), AMI: Amicacina (15-16), GEN: Gentamicina (13-14), AZI: Azitromicina (>13 <12), CLO: Cloranfenicol (13-17), TET: Tetraciclina (12-14), STX: Sulfametoxazol/Trim (11-15), POL B: Polimixina B (12-16), COL: Colistina (<2 >4).

Tabela 1. Suscetibilidade aos antibióticos

### Perfil de resistência

Cepas CR		Cepas PS	
1	AMP, CFL, TET	25	AMP
2	POL B	26	AMP
6	STX	28	STX, TET
7	STX	29	HgCl <sub>2</sub> ***, STX
9	HgCl <sub>2</sub> *	30	HgCl <sub>2</sub> ***, STX
10	HgCl <sub>2</sub> ***, STX, AMP, EST, TET	31	HgCl <sub>2</sub> *
11	HgCl <sub>2</sub> *	33	HgCl <sub>2</sub> *
12	HgCl <sub>2</sub> *, AZI	35	HgCl <sub>2</sub> *, AZI
13	HgCl <sub>2</sub> *, CFL	36	HgCl <sub>2</sub> *, AMP, CFL, CFZ, EST
14	AMP, EST, POL B	37	HgCl <sub>2</sub> ***, STX, NIT, AZI
15	NAL	38	HgCl <sub>2</sub> *
16	HgCl <sub>2</sub> *	39	HgCl <sub>2</sub> ** , STX, AMP, EST, TET, POL B
17	HgCl <sub>2</sub> *		
18	HgCl <sub>2</sub> **		
19	HgCl <sub>2</sub> *		
20	HgCl <sub>2</sub> *		
21	AMP, TET		
22	HgCl <sub>2</sub> *		
23	HgCl <sub>2</sub> *		

AMP: Ampicilina (10 µg), CFL: Cefalotina (30 µg), CFZ: Cefazolina (30 µg), NAL: Ácido Nalidixico (30 µg), NIT: Nitrofurantoina (30 µg), EST: Estreptomicina (10 µg), AZI: Azitromicina (15 µg), TET: Tetraciclina (30 µg), STX: Trimetoprim/Sulfametoxazol (5 µg), POL B: Polimixina B (300 UI), \*HgCl<sub>2</sub>(2 µg/mL), \*\*HgCl<sub>2</sub>(8 µg/mL), \*\*\*HgCl<sub>2</sub>(16 µg/mL).

Tabela 2. Perfil de resistência a antibióticos e metais pesados.

Cepa produtora de bacteriocina	Cepas Inibidas				Valor de P
	CR		PS		
	(n=23)	(%)	(n=15)	(%)	
<b>CR</b>					
CR 8	8	34,8	2	12,5	0,117
CR 9	8	34,8	2	12,5	0,117
CR 20	15	65,2	9	56,3	0,571
<b>PS</b>					
PS 31	1	4,3	0	0	0,398
PS 34	1	4,3	0	0	0,398
PS 36	19	82,6	11	68,8	0,312

Chi-Square test (α = 95%; P < 0,05).

Tabela 3. Produção de Bacteriocinas.