

**José Guilherme Datorre**

APLICAÇÃO DE DROPLET DIGITAL PCR NA DETECÇÃO DE *FUSOBACTERIUM NUCLEATUM* EM  
TECIDO E BIÓPSIA LÍQUIDA PARA PROGNÓSTICO E RASTREAMENTO DE CÂNCER  
COLORRETAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

**Orientador:** Dr<sup>o</sup> Rui Manuel Reis

**Coorientadoras:** Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina de Carvalho Peters / Dr<sup>a</sup>. Denise Peixoto Guimarães

**Barretos**

**2021**

**José Guilherme Datorre**

APLICAÇÃO DE DROPLET DIGITAL PCR NA DETECÇÃO DE *FUSOBACTERIUM NUCLEATUM* EM  
TECIDO E BIÓPSIA LÍQUIDA PARA PROGNÓSTICO E RASTREAMENTO DE CÂNCER  
COLORRETAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

**Orientador:** Dr<sup>o</sup> Rui Manuel Reis

**Coorientadoras:** Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina de Carvalho Peters / Dr<sup>a</sup>. Denise Peixoto Guimarães

**Barretos**

**2021**

## **SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO**

Este trabalho recebeu apoio do Ministério Público do Trabalho em Campinas – PRT 15ª Região por meio de financiamento de pesquisa e da CAPES por meio de bolsa de auxílio à pesquisa.

Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas, não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

Embora o Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística do Hospital de Câncer de Barretos tenha auxiliado nas análises estatísticas e orientado sua interpretação, a descrição da metodologia estatística, a apresentação dos resultados e suas conclusões são de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.

Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo.

*À minha querida e amada mãe  
Elza Poiati Garcia Datorre (in memoriam), cujo empenho  
em me educar sempre veio em primeiro lugar. Aqui estão  
os resultados dos seus esforços. Com muita gratidão.*

## AGRADECIMENTOS

**Ao Prof. Drº Rui Manuel Reis** pela orientação desde minha residência, todo ensinamento compartilhado em todas as etapas do meu processo de construção profissional e pessoal, contribuindo muito em cada detalhe com muita orientação, dedicação e conselhos. Obrigado pela oportunidade de realizar este estudo e fazer parte do seu grupo de alunos, que com toda certeza orgulham-se em tê-lo por perto.

**À Prof. Dra. Ana Carolina de Carvalho Peters** pelo seu apoio e orientação. Agradeço pela oportunidade, por me ensinar a ser crítico durante os experimentos de bancada e em cada trabalho escrito, além de me contagiar com seu entusiasmo em cada descoberta na pesquisa. Obrigado por me ouvir e aconselhar principalmente nos momentos difíceis pelos quais passei em minha vida pessoal.

**À Prof. Dra. Denise Peixoto Guimarães** pela orientação, apoio, oportunidade e discussões para elaboração e conclusão deste trabalho. Obrigado pelos momentos de descontração que faziam muitas vezes os encontros mais leves.

Aos assessores externo e interno, o **Prof. Drª. Beatriz Carvalho** e **Prof. Dr. José Humberto Fregnani**, pelas valiosas contribuições durante as bancas de acompanhamento e qualificação do mestrado.

Ao Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos por incentivar a pesquisa, CAPES e Ministério Público do Trabalho pelo auxílio para prover este estudo.

Ao NEB (Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística) pelo auxílio durante a realização das análises estatísticas deste estudo.

À secretaria do Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio-XII pela seriedade e eficiência na realização de seus trabalhos.

Aos companheiros de laboratório e biólogos que se fizeram presentes durante toda a minha trajetória, em especial a **Gabriella, Tiago e Lázaro** meus queridos companheiros de residência e para vida, e aquele que além do laboratório tornou-se parte da minha vida, **Murilo**, obrigado por fazer parte da minha vida amigo.

A todos os colegas e amigos do grupo de pesquisa translacional em Câncer Colorretal que sempre me ajudaram, em especial a **Drª Mariana Bisarro, Adhara** e **Jean**

pela amizade ao longo do mestrado, obrigado por estarem ao meu lado sempre. Vocês são especiais.

Aos meus amigos que são a família que Deus nos coloca próximos na vida, mesmo que distante fisicamente, jamais saíram do meu pensamento e coração, não citarei nomes para não correr o risco de esquecer alguém, pois todos são essenciais, e sabem que são.

E em especial à Deus, a minha família, prima **Jéssica, Luma, Hellen e Aline**, meu irmão **Wilian Rafael Datorre** e meu pai **José Datorre** pelo incentivo, companheirismo, compreensão, amor, não apenas durante o mestrado, mas por todos os anos juntos nesta jornada da vida. Obrigado pela paciência, por não soltarem minha mão e entenderem minha ausência. Obrigado por acreditarem em mim, até quando eu mesmo não acreditei. Obrigado tios, tias e avó. Eu amo vocês.

*“Nunca se esqueça de como sonhar.”*

*Madonna*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 CÂNCER COLORRETAL.....	1
1.2 <i>Fusobacterium nucleatum</i> E CÂNCER COLORRETAL.....	3
1.3 <i>Fusobacterium nucleatum</i> E CÂNCER COLORRETAL NA POPULAÇÃO BRASILEIRA	6
1.4 DETECÇÃO DE <i>Fusobacterium nucleatum</i> .....	9
1.5 DETECÇÃO DE <i>Fusobacterium nucleatum</i> NA VIGILÂNCIA E RASTREAMENTO DE CCR .....	9
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>12</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
3.1 DELINEAMENTO E LOCAL DO ESTUDO.....	13
3.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO - CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	14
3.3 EXTRAÇÃO DE DNA .....	14
3.4 DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA E DOS NÍVEIS DE <i>Fusobacterium nucleatum</i> .....	15
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	16
<b>4. ASPECTOS ÉTICOS.....</b>	<b>17</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>18</b>
5.1 PADRONIZAÇÃO DA DETECÇÃO DE <i>Fn</i> POR ddPCR .....	18
5.1.1 EFICIÊNCIA DOS PRIMERS E SONDA .....	18
5.1.2 GRADIENTE DE TEMPERATURA PARA DETECÇÃO <i>F. nucleatum</i> EM ddPCR .....	20
5.1.3 LIMITE DE BRANCO (LoB) E LIMITE DE DETECÇÃO (LoD) .....	21
5.2 ANÁLISE DA DETECÇÃO DE <i>FN</i> NA POPULACACÃO COM CÂNCER COLORRETAL	23
5.2.1 DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	23
5.2.2 TESTE CONCORDÂNCIA DA DETECÇÃO DE <i>F. NUCLEATUM</i> EM TECIDO TUMORAL PARAFINADO DE CCR POR qPCR vs. ddPCR.....	25

5.2.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE STATUS DE <i>Fn</i> E CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E MOLECULARES .....	27
5.2.4 PERFORMANCE DE DDPCR PARA DETECÇÃO DE <i>F. nucleatum</i> NO TECIDO DE CCR EM FFPE .....	31
5.3 ANÁLISE DA DETECÇÃO DE <i>Fn</i> EM AMOSTRAS DE FIT DE PARTICIPANTES DE RASTREAMENTO DE CÂNCER COLORRETAL .....	32
5.3.1 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS DE FIT.....	32
5.3.2 DETECÇÃO DE <i>Fn</i> EM AMOSTRAS DE FIT DOS PARTICIPANTES DO PROGRAMA DE RASTREAMENTO DE CÂNCER COLORRETAL POR ddPCR....	32
5.3.3 RESULTADO DA DETECÇÃO DE FN NAS AMOSTRAS DE FIT POSITIVO DOS PACIENTES DE ACORDO COM A PIOR LESÃO ENCONTRADA NA COLONOSCOPIA .....	35
5.3.4 DETECÇÃO DE FN EM AMOSTRAS DE BIÓPSIA INCLUIDA EM PARAFINA DOS INDIVÍDUOS COM FIT POSITIVO SUBMETIDOS A COLONOSCOPIA.....	42
5.3.5 COMPARAÇÃO DOS RESULTADO DA DETECÇÃO DE FN NAS AMOSTRAS DE FIT POSITIVO E DAS BIÓPSIAS E PEÇA CIRURGICA DOS MESMOS PACIENTES.	47
5.4 PERFORMANCE DE <i>F. nucleatum</i> NO FIT PARA DETECÇÃO DE LESÕES SIGNIFICANTES DOS PACIENTES COM FIT POSITIVO.....	48
5.4.1 PERFORMANCE DE <i>F. nucleatum</i> NO FIT PARA DETECÇÃO DE ADENOMA PRECOCE .....	48
5.4.2 PERFORMANCE DE <i>F. nucleatum</i> NO FIT PARA DETECÇÃO DE ADENOMA AVANÇADO .....	49
5.4.3 PERFORMANCE DE <i>F. nucleatum</i> NO FIT PARA DETECÇÃO DE CÂNCER	49
5.4.4 PERFORMANCE DE <i>F. nucleatum</i> NO FIT PARA DETECÇÃO DE QUALQUER LESÃO SIGNIFICATIVA.....	50
5.4.5 PERFORMANCE DE <i>F. nucleatum</i> NO FIT PARA DETECÇÃO DE QUALQUER ADENOMA .....	51
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>61</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>70</b>

<b>Anexo A - Parecer CEP.....</b>	<b>70</b>
<b>Anexo B - Artigo publicado.....</b>	<b>79</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Evolução de células epiteliais normais para adenocarcinoma..	2
<b>Figura 2:</b> Disbiose e potenciais mecanismos de <i>Fn</i> no CCR..	4
<b>Figura 3:</b> Perfil taxonômico da microbiota ao nível de filo identificado no tecido de carcinoma colorretal e nos tecidos normais adjacentes.	7
<b>Figura 4 adaptada:</b> Quantidade relativa de <i>F. nucleatum</i> em pacientes com câncer colorretal.	8
<b>Figura 5:</b> Fluxograma do plano de trabalho.	13
<b>Figura 6:</b> Curvas de amplificação (A) e curva padrão (B)	19
<b>Figura 7:</b> Gráfico unidimensional gerados pelo software QuantaSoft (BioRad)	20
<b>Figura 8:</b> Diluição seriada de DNA de <i>Fn</i> em DNA de <i>E. coli</i> .	22
<b>Figura 9:</b> Quantidade de <i>F. nucleatum</i> em 139 amostras de tumor de CCR em FFPE de acordo com cada método de detecção utilizado.	26
<b>Figura 10:</b> Curvas de sobrevida global feitas pelo Método de Kaplan-Meier de acordo com o método de detecção e a quantidade de DNA de <i>Fn</i> em amostras de tecido de CRC em FFPE.	30
<b>Figura 11:</b> Receiver operator characteristic (Curvas ROC) para avaliar a precisão discriminatória da detecção de DNA de <i>Fn</i> por (A) ddPCR e (B) qPCR.	31
<b>Figura 12:</b> Quantidade absoluta de <i>Fn</i> dado pelo número de cópias de DNA por reação....	34
<b>Figura 13:</b> Fluxograma dos resultados de ddPCR separados em 2 grupos.....	35
<b>Figura 14:</b> Distribuição da pior lesão encontrada na colonoscopia, nos pacientes que obtiveram um resultado positivo no teste de FIT.....	36
<b>Figura 15:</b> Quantidade absoluta de <i>Fn</i> no FIT dado pelo número de cópias de DNA por reação de acordo com a pior lesão encontrada na colonoscopia. ....	38
<b>Figura 16:</b> Quantidade absoluta de <i>Fn</i> no FIT dado pelo número de cópias de DNA por reação distribuída pela pior lesão de acordo com a localização em cólon direito e esquerdo, encontrada na colonoscopia.....	41
<b>Figura 17:</b> Quantidade absoluta de <i>Fn</i> na biópsia dado pelo número de cópias de DNA por reação distribuída pela pior lesão encontrada na colonoscopia. ....	43

<b>Figura 18:</b> Quantidade absoluta de <i>Fn</i> na biópsia dos pacientes com FIT positivo, dado pelo número de cópias de DNA por reação distribuída pela localização da pior lesão em cólon direito e esquerdo, encontrada na colonoscopia.. .....	45
<b>Figura 19:</b> Quantidade absoluta em cópias/reação de <i>F. nucleatum</i> encontrada no FIT em comparação com a biópsia do mesmo paciente. ....	47
<b>Figura 20:</b> Curva ROC (Receiver operator characteristic) para avaliar a precisão discriminatória de <i>Fn</i> na detecção de adenoma precoce vs sem lesão considerada....	48
<b>Figura 21:</b> Curva ROC (Receiver operator characteristic) para avaliar a precisão discriminatória de <i>Fn</i> na detecção de adenoma avançado vs sem lesão considerada. ....	49
<b>Figura 22:</b> Curva ROC (Receiver operator characteristic) para avaliar a precisão discriminatória de <i>Fn</i> na detecção de câncer vs sem lesão considerada. ....	50
<b>Figura 23:</b> Curva ROC (Receiver operator characteristic) para avaliar a precisão discriminatória de <i>Fn</i> na detecção qualquer lesão significativa vs sem lesão considerada. ....	51
<b>Figura 24:</b> Curva ROC (Receiver operator characteristic) para avaliar a precisão discriminatória de <i>Fn</i> na detecção qualquer adenoma vs sem lesão considerada. ....	52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Pontos de diluição construídos para as análises de sensibilidade, especificidade e limite de detecção de <i>Fn</i> .....	21
<b>Tabela 2:</b> Caracterização da população de pacientes com câncer colorretal. ....	24
<b>Tabela 3:</b> Concordância dos resultados de detecção de <i>Fusobacterium nucleatum</i> em casos de CCR em FFPE pelos métodos ddPCR e qPCR . ....	26
<b>Tabela 4:</b> Características clínico-patológicas e moleculares de acordo com a quantidade de DNA de <i>Fusobacterium nucleatum</i> em tecido em FFPE de CRC detectado por ddPCR e qPCR. ....	28
<b>Tabela 5:</b> Quantidade de cópias/reação de <i>F. nucleatum</i> encontrada no FIT de acordo com a pior lesão encontrada na colonoscopia dos pacientes com FIT positivo. ....	37
<b>Tabela 6:</b> Quantidade de cópias/reação de <i>F. nucleatum</i> encontrada no FIT de acordo com a localização entre cólon direito e esquerdo da pior lesão encontrada na colonoscopia dos pacientes com FIT positivo. ....	40
<b>Tabela 7:</b> Quantidade de cópias/reação de <i>F. nucleatum</i> encontrada na biópsia da pior lesão encontrada na colonoscopia dos pacientes com FIT positivo. ....	43
<b>Tabela 8:</b> Quantidade de cópias/reação de <i>F. nucleatum</i> encontrada na biópsia da pior lesão de acordo com a localização entre cólon direito e esquerdo encontrada na colonoscopia dos pacientes com FIT positivo.....	45
<b>Tabela 9:</b> Comparação das curvas ROC para detecção de lesões significativas de acordo com o tipo de lesão encontrada na colonoscopia dos pacientes com FIT positivo.....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS

CCR	<i>Câncer Colorretal</i>
<i>Fn</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
ddPCR	<i>droplet digital PCR</i>
qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
HCB	<i>Hospital de Câncer de Barretos</i>
FIT	<i>fecal immunochemical test</i>
MSI	<i>microsatellite instability</i>
BRAF	<i>V-raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
MLH1	<i>MutL Homolog 1</i>
MSH2	<i>MutS Homolog 2</i>
PMS2	<i>PMS1 Homolog 2</i>
MSH6	<i>MutS Homolog 6</i>
MMR	<i>Mismatch repair</i>
AUC	<i>Area under the curve</i>
ROC	<i>receiver operating characteristic</i>
INCA	<i>Instituto Nacional de Câncer</i>
CIN	<i>Chromosomal instability</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
NRAS	<i>neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>
KRAS	<i>Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
CIMP	<i>CpG island methylator phenotype</i>
CpG	<i>Ilhas CpG</i>
CTNNB1	<i>Catenin beta-1</i>

PIK3CA	<i>phosphoinositide-3-kinase</i>
TGFBR2	<i>Transforming Growth Factor Beta Receptor 2</i>
LRP5	<i>LDL Receptor Related Protein 5</i>
FZD10	<i>Frizzled Class Receptor 10</i>
SFRP	<i>Secreted frizzled-related protein 1</i>
FAM123B	<i>APC Membrane Recruitment Protein 1</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
ERBB2	<i>Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2</i>
ERBB3	<i>Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 3</i>
PTEN	<i>Phosphatase And Tensin Homolog</i>
TP53	<i>tumor protein p53</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
CMS	<i>Consenso de Subtipos Moleculares</i>
TGF- $\beta$ 1	<i>Transforming growth factor beta 1</i>
FadA	<i>Fusobacterium nucleatum protein adesin A</i>
Fap2	<i>Fusobacterium nucleatum autotransporter protein</i>
LPS	<i>lipopolissacarídeos</i>
MYD88	<i>myeloid differentiation primary response 88</i>
NF-KB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
TLR4	<i>toll like receptor 4</i>
T-CD3+	<i>anticorpos anti CD3</i>
Gal/GalNAc	<i>galactose-/N-acetylgalactosamine</i>
NGS	<i>Next generation sequence</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
FFPE	<i>Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded</i>
ACS	<i>American Cancer Society</i>
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>

CEP	<i>Comitê de Ética em Pesquisa</i>
CAAE	<i>Certificado de Apresentação de Apreciação Ética</i>
CPOM	<i>Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular</i>
μL	<i>Microlitro</i>
pb	<i>pares de base</i>
μM	<i>Micromolar</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
LoB	<i>Limit of blank</i>
LoD	<i>Limit of detection</i>
SPSS	<i>Statistical Product and Service Solutions</i>
p	<i>Probabilidade de Significância</i>
n	<i>Número</i>
χ <sup>2</sup>	<i>Qui-quadrado</i>
IC	<i>Intervalo de confiança</i>
R <sup>2</sup>	<i>R quadrado</i>
Ct	<i>Cycle of quantification/qualification</i>
NTC	<i>No template control</i>
T	<i>Temperatura</i>
DP	<i>Desvio padrão</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ng	<i>nanogramas</i>
TNM	<i>Classification of Malignant Tumors</i>
MSS	<i>Microsatellite Stable</i>
vs	<i>Versus</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
=	Igual
>	Maior
<	Menor
μ	Micro
°C	Grau Celsius
~	Aproximadamente

## RESUMO

**JUSTIFICATIVA:** O papel da microbiota no processo de carcinogênese tem ganhado grande destaque nos últimos anos. Diversos grupos incluindo o nosso, tem mostrado seu impacto no desenvolvimento e progressão do câncer colorretal (CCR); destacando a presença da bactéria *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*) nestes tumores, que tem se mostrado associada a um pior prognóstico e menor sobrevida, indicando um importante papel na carcinogênese colorectal. A detecção de *Fn* ainda é um desafio, e métodos recentes e altamente sensíveis, como a droplet digital PCR (ddPCR), tem mostrado potencial para a detecção de *Fn* em materiais degradados ou com baixas quantidades da bactéria. **OBJETIVO:** Avaliar a acurácia da detecção de *Fn* por ddPCR em tecido parafinado e amostras de fezes de indivíduos com lesões precursoras ou tumores invasivos e sua utilidade para prognóstico e rastreamento de CCR. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Após otimização da técnica de ddPCR, utilizando *primers*/sondas específicas para detecção de DNA de *Fn*, esta metodologia foi aplicada para identificar e quantificar os níveis desta bactéria em uma série de amostras de tumor colorretal incluído em parafina de pacientes tratados no Hospital de Câncer de Barretos. Em seguida, a concordância da taxa de positividade para presença de *Fn* nestas amostras com resultados obtidos a partir da ddPCR e qPCR foi testada. A presença de *Fn* foi também avaliada em amostras de fezes coletadas de participantes do Programa de Rastreamento de CCR do HCB e os resultados foram comparados aos dados referentes ao teste imunológico de sangue oculto nas fezes e resultados de colonoscopia realizado nos casos de FIT (*fecal immunochemical test* – teste imunológico de sangue oculto nas fezes) positivo. **RESULTADOS:** A presença de *Fn* foi avaliada por ddPCR em 139 pacientes diagnosticados com CCR cujo tecido tumoral parafinado havia sido previamente caracterizado clinicamente e molecularmente por qPCR para a presença de *Fn*. Foi observado que 20.1% dos casos eram *Fn*-alto e 79.9% *Fn* baixo/negativo (categorizados de acordo com a mediana do nível de *Fn*), em comparação com 2.9% de *Fn*-alto e 97.1% de *Fn*-baixo/negativo quando os mesmos casos foram avaliados por qPCR, resultando em baixa concordância entre as metodologias (Cohen's Kappa test = 0.210). O grupo *Fn*-alto por ddPCR foi significativamente associado à localização proximal do tumor ( $p = 0,04$ ), tumores histologicamente pouco diferenciados ( $p = 0,02$ ), status de MSI-alto ( $p < 0,001$ ), tumores com mutação em *BRAF* ( $p = 0,003$ ) e com perda de expressão das proteínas de reparo de danos no DNA MLH1 ( $p < 0,001$ ) e PMS2 ( $p < 0,001$ ). Relativamente à sobrevida global em 5

anos, pacientes com *Fn*-alto apresentaram tendência a uma menor sobrevida quando comparados a pacientes com *Fn*-baixo/negativo (58,3% vs 76,8% em 5 anos; log-rank  $p = 0,15$ ). Em relação à população de rastreamento, a mediana do número de cópias de DNA por reação de *Fn* no grupo de FIT negativo ( $n=166$ ) foi de 12,0 cópias/reação e de 43 cópias/reação no grupo de FIT positivo ( $n=82$ ;  $p < 0,001$ ). Níveis de *Fn*-alto por ddPCR foram encontrados em 52,7% das amostras de FIT positivo, e em 14,3% dos FIT negativos. A presença de *Fn*-alto foi mais prevalente nas amostras de FIT dos pacientes com câncer ( $n=8$ ) quando comparada com pacientes com adenoma precoce ( $n=37$ ;  $p = 0,008$ ) e sem lesão significativa ( $n=19$ ;  $p = 0,047$ ). A presença de *Fn* por ddPCR também foi avaliada em amostras de biópsias incluídas em parafina de 74/82 pacientes com FIT positivo. Foi observado que 33% (1/3) das amostras de pólipos hiperplásicos foi *Fn*-alto, 19% (7/37) dos adenomas precoces, e 37,5% (3/8) dos cânceres. A análise comparativa dos resultados de *Fn* no FIT e na biópsia parafinada do mesmo paciente mostra que os níveis de *Fn* no FIT é significativamente maior do que na biópsia ( $p < 0,001$ ). Na análise de performance de *F. nucleatum* para detecção de lesões significativas dos pacientes com FIT positivo, observou-se que os níveis de *Fn* no FIT mostraram um AUC de 0,829 (IC: 0,679-0,983) com alta sensibilidade (100%) e especificidade (73,7%) para detectar câncer, valor preditivo positivo de 61,53%, valor preditivo negativo de 100% e acurácia de 81,48%. **CONCLUSÃO:** O presente trabalho mostra a viabilidade de detecção de *F. nucleatum* intratumoral utilizando a técnica de droplet digital PCR. Nossos resultados também destacam sua relevância clínica da detecção de *Fn* intratumoral em um cenário de rotina de câncer colorretal, além do potencial do teste de DNA de *Fusobacterium nucleatum* em material fecal para detectar indivíduos com tumores colorretais.

**PALAVRAS-CHAVE:** Câncer colorretal; *Fusobacterium nucleatum*, ddPCR; FIT; Biomarcador

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** The role of the microbiota in the carcinogenesis process has gained great emphasis in recent years. Several groups, including ours, have shown the microbiota impact on the development and progression of colorectal cancer (CRC); highlighting the presence of *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*) in these tumors, which has been shown to be associated with patient's worse prognosis and shorter overall survival, indicating an important role in colorectal carcinogenesis. The detection of *Fn* is still been a challenge, and recent and highly sensible methods, such as the digital droplet PCR (ddPCR), have shown great potential for the detection of *Fn* in degraded materials or with low amounts of this bacteria. **AIM:** To evaluate the accuracy of *Fn* detection by ddPCR in paraffin tissue and stool samples from individuals with precursor lesions or invasive tumors and its usefulness for prognosis and screening for CRC detection. **MATERIALS AND METHODS:** After optimizing the ddPCR technique, using specific primers/probes to detect *Fn* DNA, this methodology was applied to identify and quantify the levels of this bacterium in a series of formalin-fixed paraffin-embedded colorectal tumor samples from patients treated at Barretos Cancer Hospital. Then, the agreement of the positivity rate for the presence of *Fn* in these samples with results obtained by ddPCR and qPCR was tested. The presence of *Fn* was also evaluated in stool samples collected from participants from Barretos Cancer Hospital CRC Screening Program and the results were compared to data from the fecal occult blood immunochemical test (FIT) and colonoscopy results performed in cases of FIT positive. **RESULTS:** The presence of *Fn* was assessed by ddPCR in 139 patients diagnosed with CRC whose paraffin tumor tissue had been previously characterized clinically and molecularly by qPCR for the presence of *Fn*. It was observed that 20.1% of cases were *Fn*-high and 79.9% *Fn* low/negative (categorized according to the median *Fn* level), compared to 2.9% *Fn*-high and 97.1% *Fn*-low/negative when the same cases were evaluated by qPCR, resulting in low agreement between methodologies (Cohen's Kappa test = 0.210). The *Fn*-high group by ddPCR was significantly associated with proximal tumor location ( $p = 0.04$ ), histologically poorly differentiated tumors ( $p = 0.02$ ), MSI-high status ( $p < 0.001$ ), tumors with mutation in *BRAF* ( $p = 0.003$ ) and with loss of expression of DNA damage mismatch repair proteins MLH1 ( $p < 0.001$ ) and PMS2 ( $p < 0.001$ ). Regarding the 5-year overall survival, patients with *Fn*-high tended to have a lower survival when compared to patients with *Fn*-low/negative (58.3% vs 76.8% at 5 years; log-rank  $p = 0, 15$ ). Regarding the

screening population, the median DNA copy number per *Fn* reaction in the FIT negative group (n=166) was 12.0 copies/reaction and 43 copies/reaction in the FIT positive group (n=82; p < 0.001). High *Fn* levels by ddPCR were found in 52.7% of FIT-positive samples, and in 14.3% of FIT-negative samples. The presence of high-*Fn* was more prevalent in FIT samples from cancer patients (n=8) when compared to patients with early adenoma (n=37; p = 0.008) and no significant lesion (n=19; p = 0.047 ). The presence of *Fn* by ddPCR was also evaluated in formalin-fixed paraffin-embedded biopsy samples from 74/82 FIT-positive patients. It was observed that 33% (1/3) of the hyperplastic polyp samples were *Fn*-high, 19% (7/37) of the early adenomas, and 37.5% (3/8) of the cancers. Comparative analysis of *Fn* results in FIT and in paraffin biopsy from the same patient shows that *Fn* levels in FIT are significantly higher than in biopsy (p < 0.001). In the analysis of the performance of *F. nucleatum* to detect significant lesions in patients with positive FIT, it was observed that *Fn* levels in FIT showed an AUC of 0.829 (CI: 0.679-0.983) with high sensitivity (100%) and specificity (73.7%) to detect cancer, positive predictive value of 61.53%, negative predictive value of 100% and accuracy of 81.48%. **CONCLUSION:** The present study shows the feasibility of detecting intratumoral *F. nucleatum* using the PCR digital droplet technique. Our results also highlight its clinical relevance for detecting intratumoral *Fn* in a routine colorectal cancer setting, as well as the potential of DNA testing for *Fusobacterium nucleatum* in fecal material to detect individuals with colorectal tumors.

**KEYWORDS:** Colorectal cancer; *Fusobacterium nucleatum*, ddPCR; FIT; Biomarker

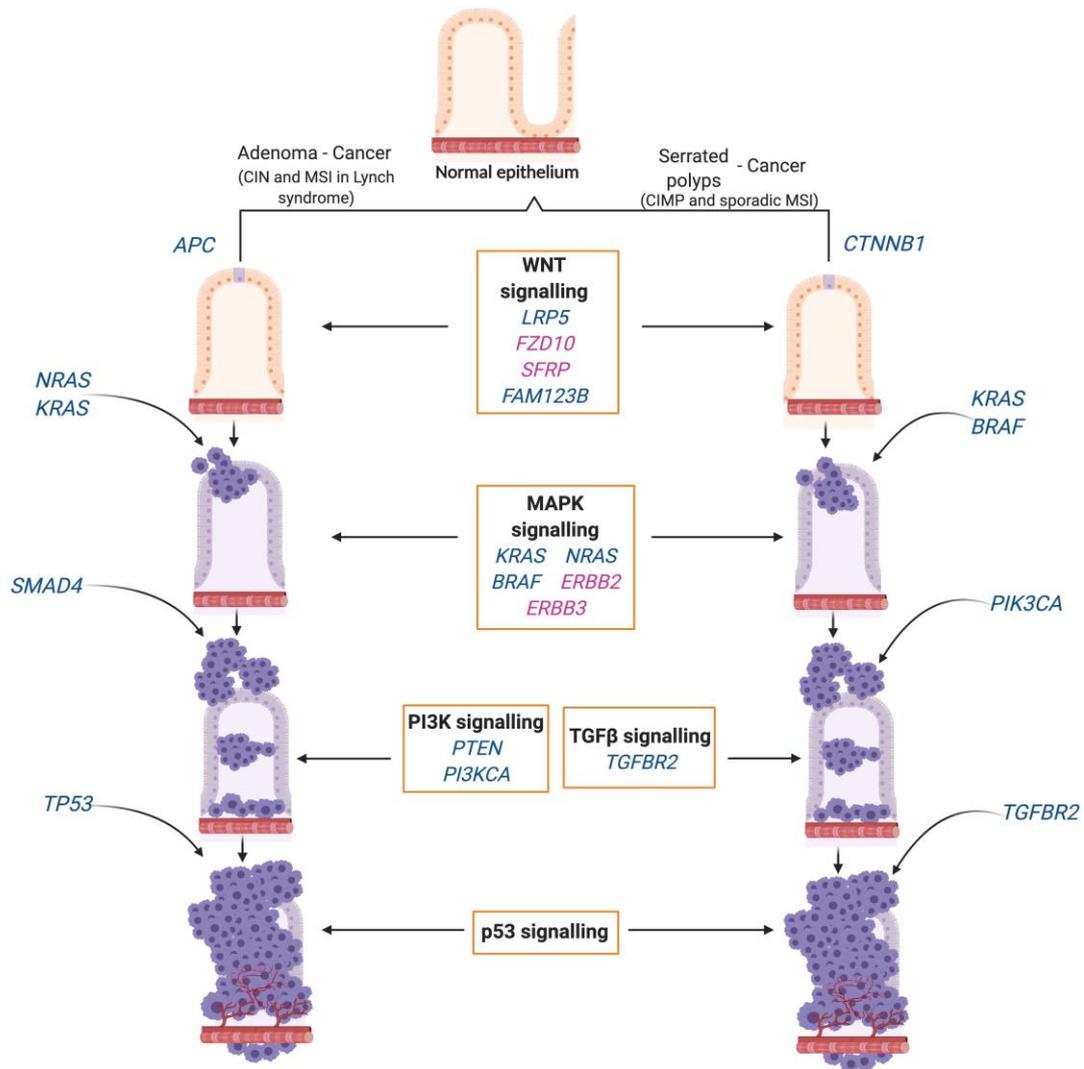
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 CÂNCER COLORRETAL

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais comumente diagnosticado em homens e o segundo em mulheres, com 1,9 milhão de casos e 935,000 mortes ocorrendo em 2020 no mundo<sup>1</sup>. Um aumento nas taxas de mortalidade e incidência destes tumores tem sido observado em muitos países da Europa Oriental, Sudeste e Centro-sul da Ásia e América do Sul, incluindo o Brasil, refletindo a mudança no estilo de vida e alimentação nestas populações, enquanto as tendências estão se estabilizando ou diminuindo em países desenvolvidos, como Canadá e norte da Europa, onde as taxas permanecem entre as mais altas do mundo<sup>1,2</sup>. Estimou-se para cada ano do triênio 2020-2022 no Brasil, de acordo com o INCA, 20.520 novos casos de CCR em homens e 20.470 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 19,63 casos novos a cada 100 mil homens e 19,03 para cada 100 mil mulheres<sup>3</sup>

Os fatores etiológicos já bem estabelecidos para o carcinoma colorretal (CCR) são: idade avançada (> 50 anos), histórico pessoal de câncer colorretal ou pólipos, condições inflamatórias intestinais, predisposição genética, dieta pobre em fibras e alta em gorduras e carne vermelha, sedentarismo, diabetes, obesidade, tabagismo, álcool e radioterapia<sup>4</sup>.

O CCR surge de uma transição da mucosa normal para lesões pré-malignas, com progressão para adenomas colorretais e CCR ocorrendo ao longo de vários anos<sup>5</sup> (Figura 1). A via mais frequente é conhecida como sequência adenoma-carcinoma, mas o CCR também pode evoluir por meio de uma via alternativa na qual pólipos serrilhados, incluindo lesão serrilhada séssil e adenoma serrilhado tradicional, substituem o adenoma convencional como lesão precursora do CCR<sup>5</sup> (Figura 1). Alterações genéticas e epigenéticas conduzem ambas as vias, e subtipos moleculares distintos são descritos (Figura 1)



**Figura 1:** Evolução de células epiteliais normais para adenocarcinoma. Duas vias principais foram descritas, do cólon normal ao câncer colorretal. Ambos envolvem a progressão de células epiteliais normais do cólon para cripta aberrante, iniciada por pólipos iniciais e avançados com progressão posterior para câncer inicial e, em seguida, câncer avançado. A via da esquerda é a tradicional que envolve o desenvolvimento de adenomas que evoluem para adenocarcinomas. A da direita é uma via alternativa e envolve pólipos serrilhados. Os genes alterados geneticamente (representados em azul escuro) ou epigeneticamente (representados em roxo) são representados em cada sequência; alguns genes são compartilhados entre as duas vias, enquanto outros são únicos (as mutações *BRAF* e o fenótipo metilador da ilha CpG (CIMP) ocorrem apenas na via serrilhada). As vias de

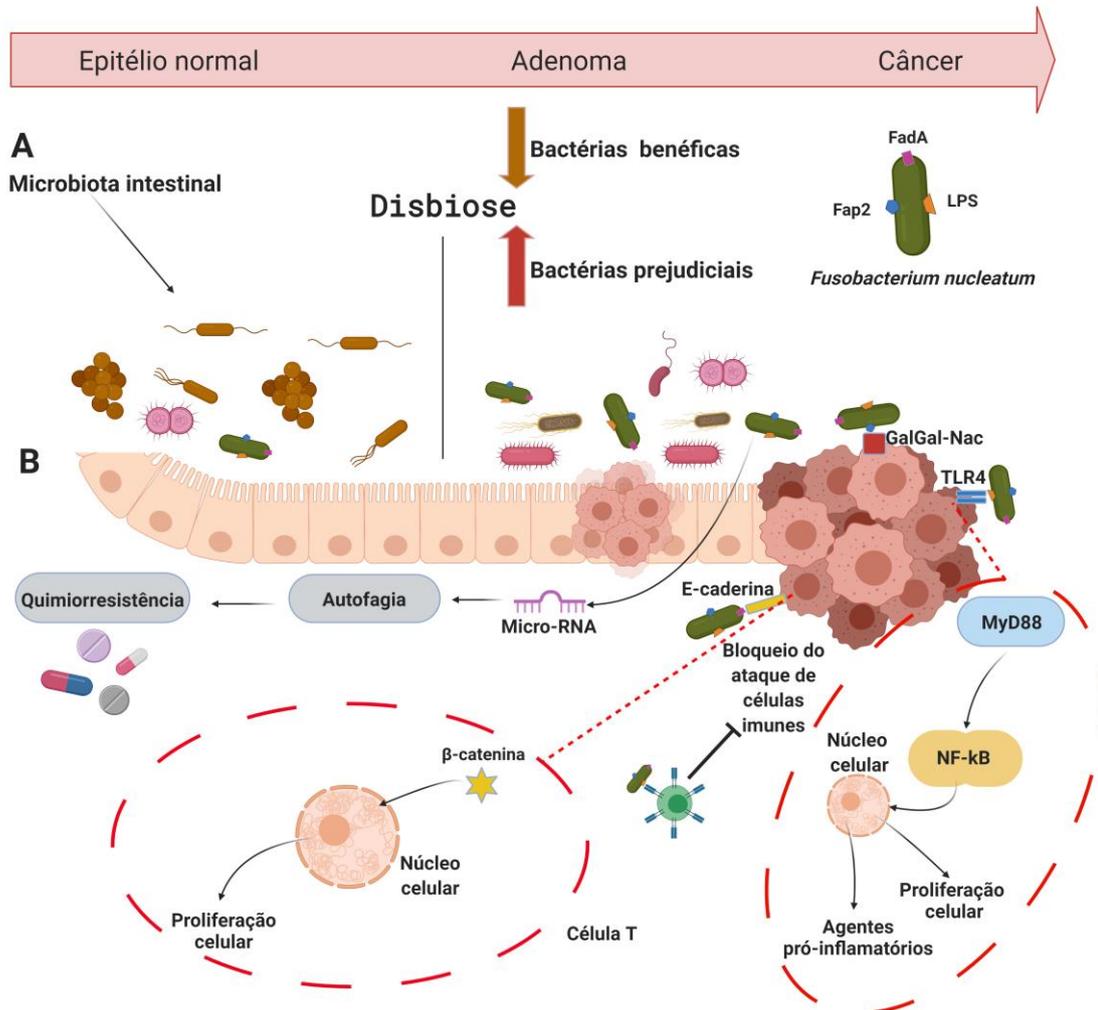
sinalização que são desreguladas durante a sequência de progressão também são mostradas (Adaptado de<sup>6</sup>).

Molecularmente o CCR ocorre a partir de complexos eventos genéticos e epigenéticos, que estão hoje organizados em distintos subgrupos<sup>7</sup>. A partir de resultados do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) o CCR foi classificado em dois grupos principais consistentes com sistemas de classificação anteriores: (1) cânceres hipermutados com instabilidade de microssatélites (MSI) devido a defeitos em genes relacionados ao *mismatch repair* ou cânceres ultramutados com mutações na DNA polimerase epsilon; e (2) cânceres não-hipermutados, com estabilidade de microssatélites (MSS) com uma alta frequência de alterações no número de cópias somáticas do DNA, e frequentes mutações em *APC*, *TP53*, *KRAS*, *SMAD4* e *PIK3CA*<sup>8</sup>. O recente Consenso de Subtipos Moleculares (CMS) incluiu resultados da análise dos níveis de expressão de genes específicos em CCR obtidos de múltiplos estudos, descrevendo quatro grupos: (1) CMS1 (MSI-imune) onde estão incluídos quase todos os cânceres MSI, hipermutados e com ativação imune bem definida, com o restante dos cânceres MSS subcategorizado em três grupos; (2) CMS2 (canônico) epitelial, cromossomicamente instável, com ativação de sinalização WNT e MYC; (3) CMS3 (metabólico) epitelial e com evidente desregulação metabólica; e (4) CMS4 (mesenquimais), com proeminente invasão estromal e angiogênese, associada ao TGF-beta<sup>9</sup>. A grande maioria dos estudos abordam outras populações, no entanto os escassos trabalhos que analisaram pacientes Brasileiros evidenciam um perfil molecular semelhante ao descrito internacionalmente<sup>10-13</sup>.

## **1.2 *Fusobacterium nucleatum* E CÂNCER COLORRETAL**

Além dos fatores de risco anteriormente descritos, surge um paradigma em que a saúde intestinal é mantida e promovida por uma comunidade "saudável" de bactérias comensais, enquanto perturbações na comunidade microbiana desse estado saudável e equilibrada - uma condição conhecida como disbiose - resultam em doença intestinal, incluindo o câncer colorretal (Figura 2A)<sup>14</sup>. Vários microorganismos têm sido associados à

carcinogênese colorretal, incluindo *Enterococcus spp.*, *Helicobacter pylori*, *Bacteroides fragilis* e *Escherichia coli*, e mais recentemente a *Fusobacterium nucleatum (Fn)* <sup>15</sup>.



**Figura 2:** Disbiose e potenciais mecanismos de *Fn* no CCR. (A) Em um epitélio saudável da mucosa colorretal, a maioria das bactérias endógenas em adultos desempenha um papel benéfico, de proteção, contribuindo para o metabolismo, absorção de nutrientes e ajudando a manter a estrutura e a função imunológica (seta marrom). Foi demonstrado que várias espécies bacterianas tem propriedades pró-inflamatórias e pró-carcinogênicas, que podem consequentemente ter um impacto na carcinogênese colorretal (seta vermelha). A mucosa intestinal de pacientes com CCR pode ser colonizada por um ou vários micróbios com propriedades pró-carcinogênicas, como produção de compostos prejudiciais ao DNA, indução da proliferação celular, causando permeabilização da barreira intestinal e indução de inflamação crônica, levando ao início da CCR. (B) Biomoléculas (LPS, FadA e Fap2) estão localizadas na superfície de *Fn*. LPS quebra a mucosa da barreira intestinal e facilita o

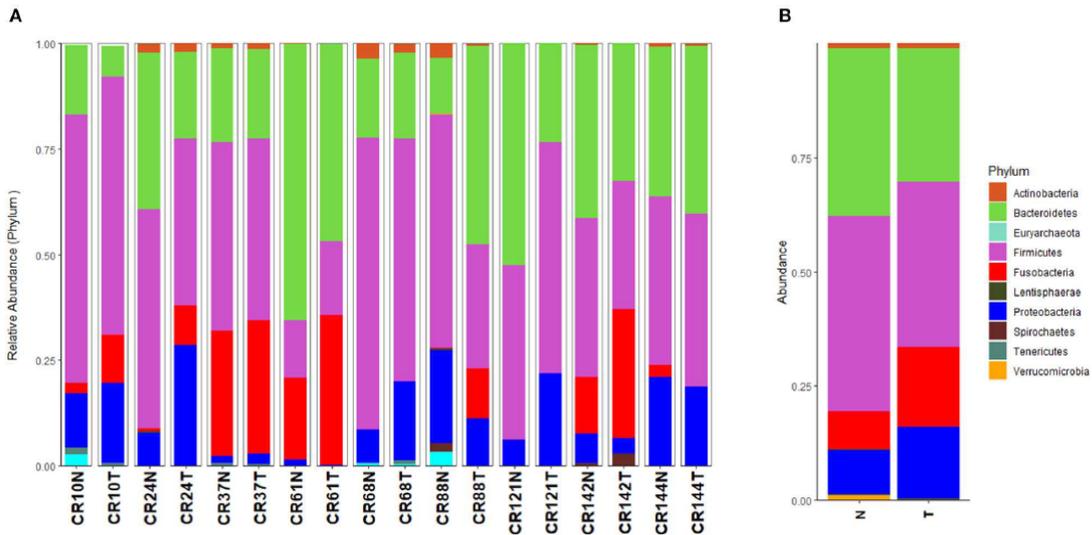
contato de *Fn* com as células epiteliais. *F. nucleatum* pode se ligar diretamente através de Fap2 a Gal-GalNAc que é superexpressa em células de CCR. E através de FadA ela ativa MYD88 por TLR4, que posteriormente ativa a cascata pró-inflamatória NF- $\kappa$ B, tornando o microambiente tumoral propício para a ocorrência de CCR. FadA ativa a via de sinalização E-caderina/ $\beta$ -catenina, que também contribui para a proliferação de células tumorais. *F. nucleatum* também pode bloquear a ação de células do sistema imune e modular a autofagia das células epiteliais intestinais ativando microRNAs reguladores, que estão correlacionados com mecanismos de quimiorresistência a quimioterápicos. (Adaptado de <sup>6</sup>).

*F. nucleatum* é uma espécie bacteriana anaeróbica invasiva, aderente e pró-inflamatória, comum na placa dentária, e existe uma associação bem estabelecida entre *F. nucleatum* e periodontite <sup>16, 17</sup>. Um amplo número de estudos tem evidenciado modificações significativas na presença de *F. nucleatum* quando se compara tumor e tecido normal de pacientes com CCR <sup>6, 18, 19</sup>, tumores distais versus proximais e em toda a progressão neoplásica de adenoma e adenocarcinoma <sup>6, 20-23</sup>. Há também evidências de associação com pior prognóstico e presença de metástases nos linfonodos <sup>17, 24</sup>, diminuição de células T-CD3+ e instabilidade de microssatélites (MSI) <sup>6, 24, 25</sup>.

A carcinogênese da *F. nucleatum* parece estar associada à expressão de proteínas que facilitam a sua adesão às células epiteliais, tais como a Fap2 que se liga à Gal-GalNAc (frequentemente super expressa nas células de CCR), e a FadA que se liga à E-caderina das células epiteliais intestinais <sup>26</sup>(Figura 2B). Assim, *F. nucleatum* a coloniza seletivamente células do tecido de CCR, ativando a via  $\beta$ -catenina e levando ao crescimento celular descontrolado. Outras moléculas, como lipopolissacarídeos (LPS) também encontradas na superfície de *F. nucleatum* contribuem para a colonização, pois rompem a barreira intestinal e facilitam sua entrada nas células epiteliais<sup>26</sup>, O principal meio de disseminação desta bactéria para outras partes do corpo (como para o intestino) se dá por deglutição e/ou via hematogênica, aderida ou não a células epiteliais, encontrando um microambiente favorável para seu desenvolvimento e levando ao surgimento de infecções intestinais e potencialmente ao desenvolvimento de CCR <sup>27, 28</sup>.

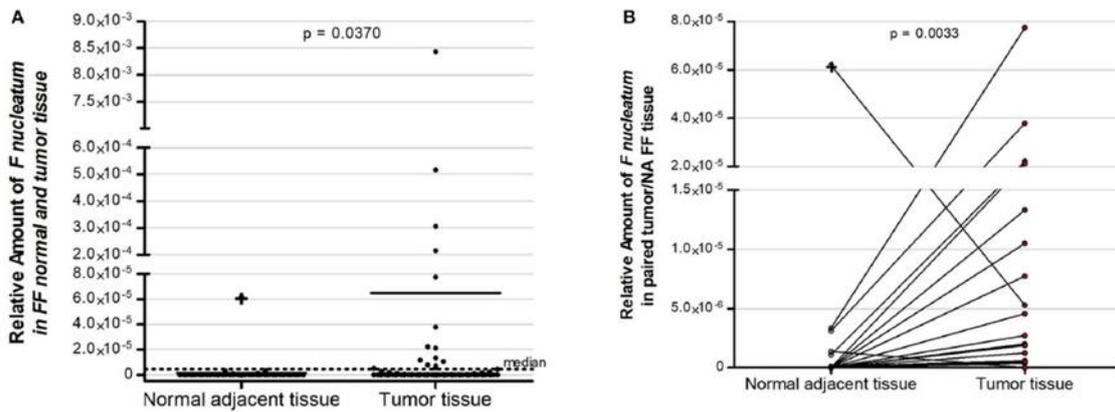
### **1.3 *Fusobacterium nucleatum* E CÂNCER COLORRETAL NA POPULAÇÃO BRASILEIRA**

Neste contexto, o grupo translacional de pesquisa em câncer colorretal do Hospital de Câncer Colorretal explorou o papel da *F. nucleatum* em pacientes brasileiros com câncer colorretal. Utilizando sequenciamento de nova geração, se comparou o microbioma de amostras de tecido tumoral colorretal e tecido normal adjacente e se identificou um enriquecimento do gênero *Fusobacterium* em amostras de tecido tumoral quando comparadas com tecido normal adjacente (Figura 3)<sup>24</sup>.



**Figura 3:** Perfil taxonômico da microbiota ao nível de filo identificado no tecido de carcinoma colorretal e nos tecidos normais adjacentes (A) e agrupados por tipo de amostra (tumor vs. normal) (B). T, carcinoma colorretal; N, tecido adjacente normal. (Adaptada de <sup>24</sup>)

Como o gênero *Fusobacterium* foi encontrado com maior abundância no tecido tumoral do que no tecido normal adjacente, estes achados foram validados em uma série maior contendo 152 amostras de tecido tumoral e 57 amostras de tecido normal adjacente por PCR em tempo real (Figura 4). Observou-se, mais uma vez, um maior nível de *F. nucleatum* em amostras de CCR em relação a amostras de tecido normal adjacente e o DNA de *F. nucleatum* foi detectado em 35 (23,0%) das 152 amostras de CCR e em 6 (10,5%) das 57 amostras de tecido normal adjacente.



**Figura 4 adaptada:** Quantidade relativa de *F. Nucleatum* em pacientes com câncer colorretal. (A) amostras de tecidos normais adjacentes congelados e amostras de tecidos de câncer colorretal congelados. Os gráficos *dotplots* representam amostras e a linha pontilhada representa a quantidade mediana do ponto de corte ao redor do qual as amostras foram classificadas como tendo alta (acima da mediana) ou baixa (abaixo da mediana) quantidade de *F. Nucleatum*. (B) Representação de *F. Nucleatum* nas amostras de tecido de carcinoma colorretal em comparação ao tecido adjacente normal em casos pareados. FF, tecido a fresco congelado; NA, tecido normal adjacente. (Adaptada de <sup>24</sup>)

Também se encontrou uma associação da presença de *F. nucleatum* com importantes características clínicas e moleculares (status MSI, mutações em *BRAF*, localização tumoral, tumores mais invasivos, pouco diferenciados, pior estadiamento clínico do paciente e a perda de expressão de proteínas de reparo do DNA – MLH1, MSH2 e PMS2) e com menor taxa de sobrevida, tanto câncer-específica quanto sobrevida global. A detecção de tumores e a classificação com base no microbioma intestinal, como *Fusobacterium nucleatum*, pode fornecer uma abordagem promissora para avaliar a evolução prognóstica destes pacientes

#### 1.4 DETECÇÃO DE *Fusobacterium nucleatum*

A detecção de *Fusobacterium nucleatum* pode ser feita através de distintas metodologias, tais como sequenciamento de nova geração - NGS<sup>17</sup>, hibridização fluorescente *in situ* (FISH)<sup>29</sup>, PCR em tempo real (qPCR)<sup>30</sup> e mais recentemente droplet digital PCR (ddPCR)<sup>17, 29-31</sup>. No trabalho prévio do nosso grupo utilizando qPCR se observou uma taxa de positividade muito menor de *Fn* nas amostras em FFPE (Fixado em Formalina e Embebido em Parafina), com baixa concordância comparando os resultados de tecido tumoral a fresco congelado dos mesmos pacientes<sup>24</sup>. O uso de tecido em FFPE para detectar microrganismos, desde procedimentos histopatológicos de rotina como fixação tecidual, incorporação da parafina e armazenamento podem influenciar no resultado de qPCR<sup>24, 32</sup>. Além disso, sabe-se que no tecido em FFPE, pode ocorrer fragmentação/degradação do DNA genômico ao longo do tempo, diminuindo ainda mais a sensibilidade da identificação de organismos<sup>33</sup>. No entanto, as amostras em FFPE são frequentemente o único tipo de material disponível para testes moleculares. Por esse motivo, faz-se necessário o desenvolvimento de uma técnica altamente sensível e com melhor acurácia para detectar este tipo de alvo neste tipo de amostra.

A droplet digital PCR (ddPCR) é uma tecnologia recente que oferece a vantagem da quantificação direta e independente de curvas padrão, fornecendo dados mais precisos e reprodutíveis do que a qPCR, além da vantagem de ser usada para quantificação de moléculas com baixo número de cópias<sup>34-36</sup>. A ddPCR tem a capacidade de detectar concentrações extremamente baixas (inclusive amostras degradadas e/ou de baixa qualidade) de sequências específicas do DNA, com alta precisão<sup>37</sup>.

#### 1.5 DETECÇÃO DE *Fusobacterium nucleatum* NA VIGILÂNCIA E RASTREAMENTO DE CCR

A *American Cancer Society* (ACS) recomenda que adultos com 45 anos ou mais e com risco médio/alto de câncer colorretal (isso inclui indivíduos com histórico de pólipos adenomatosos, histórico pessoal e/ou familiar de CCR, pólipos adenomatosos diagnosticados em familiar antes dos 60 anos, histórico pessoal de doença inflamatória intestinal, síndrome hereditária confirmada ou suspeita de CCR ou histórico de radiação

abdominal ou pélvica para um câncer anterior) sejam submetidos a exames regulares com um teste de sangue oculto nas fezes ou com colonoscopia, dependendo da preferência do paciente e da disponibilidade do teste. Como parte do processo de triagem, todos os resultados positivos nos testes de triagem nas fezes devem ser acompanhados com colonoscopia<sup>38</sup>. Entretanto, atualmente, no Brasil é recomendado que o rastreamento seja iniciado aos 50 anos<sup>39</sup>. O rastreamento permite a detecção e remoção de lesões precoces ou CCR assintomáticos em estágios iniciais, reduzindo a mortalidade causada por este tipo de câncer<sup>40</sup>.

No Hospital de Câncer de Barretos (HCB), em 2015, iniciou-se o programa de rastreamento de CCR, tendo como exame primário o teste imunoquímico de sangue oculto nas fezes<sup>41</sup>, seguido da colonoscopia nos casos de resultado positivo. A escolha do teste FIT (*fecal immunochemical test* – teste imunoquímico de sangue oculto nas fezes) para o programa seguiu diversos fatores, sendo o principal considerado, o FIT ser um teste não invasivo, de baixo custo, e aparentemente, de mais fácil aceitação pela população brasileira. A população alvo é constituída de indivíduos entre 50 e 65 anos e sem história pessoal de CCR, de pólipos no intestino, de doença inflamatória intestinal e colonoscopia ou retossigmoidoscopia nos últimos 5 anos<sup>42</sup>.

Evidências sugerem que o rastreamento do câncer colorretal pode ser aprimorado monitorando a composição e função microbiana. Por exemplo, a detecção de genes microbianos pode ser utilizada como biomarcador para identificar indivíduos com maior risco de desenvolvimento de câncer, além de serem úteis na predição do prognóstico destes tumores e da eficiência na resposta do paciente a algum tratamento quimioterápico, associando com outros exames rotineiramente utilizados durante o rastreamento, diagnóstico e seguimento<sup>43</sup>. Se o CCR for diagnosticado precocemente, quando ainda estiver localizado (estágio 0, I ou II), a taxa de sobrevivência em 5 anos é > 80%, mas diminui para < 10% com diagnóstico tardio de câncer metastático, no estágio IV de acordo com *American Joint Committee on Cancer* (AJCC)<sup>44</sup>.

Portanto, programas de triagem e prevenção em toda a população são recomendados em muitos países. O FIT é atualmente o teste de triagem padrão para rastreamento não invasivo<sup>45, 46</sup>. Contudo, este teste tem sensibilidade e especificidade limitadas para CCR e não detecta com segurança lesões pré-malignas<sup>47, 48</sup>. Sendo assim, há

urgência por uma triagem mais precisa utilizando testes que podem ser associados para identificar pacientes que devem ser submetidos a colonoscopia, considerando o método diagnóstico mais eficaz <sup>49, 50</sup>

Amostras de material fecal coletadas de pacientes que se submetem a triagem anual de FIT podem ser usadas para monitorar mudanças na microbiota, tornando possível detectar mudanças associadas à doença. Recentemente, as fontes de "biópsias líquidas" se expandiram além do sangue para incluir outros fluidos corporais, incluindo fezes como o material proveniente do FIT <sup>51, 52</sup>.

Os resultados obtidos através de sequenciamento nos estudos de Baxter e colaboradores mostraram que o DNA obtido a partir do material fecal, contido na solução tampão do FIT foi representativo em relação ao perfil e abundância de bactérias encontradas quando comparadas com fezes dos mesmos indivíduos <sup>53</sup>. Zeller e colaboradores, avaliando material fecal e tecido tumoral de pacientes com CCR chegou ao mesmo resultado <sup>54</sup>. Como os FIT são atualmente utilizados para rastreamento de CCR, e testes moleculares baseados em fezes têm excelentes perspectivas sendo possivelmente a futura ferramenta de triagem para detecção de CCR, os estudos podem validar métodos de rastreamento baseados na microbiota e detecção de bactérias específicas como *F. nucleatum* no câncer colorretal, aumentando a sensibilidade quando os testes são associados em mais de 45% na detecção do CCR <sup>53, 54</sup>.

O FIT é um método de rastreamento com muitos casos falso-positivo/falso-negativo. Esse exame detecta a presença de sangue nas fezes por meio de uma reação química, entretanto, não se pode afirmar que o sangue é do cólon ou de outra parte do aparelho digestivo. Existe um crescimento significativo buscando por métodos de triagem para câncer colorretal menos invasivos e capazes de detectar com precisão tumores em estágio inicial, com isto a detecção de *Fusobacterium nucleatum* pode complementar o teste imunoquímico fecal, aumentando a acurácia do teste. E sabendo que a detecção da bactéria em FFPE não se dá de forma tão consistente quanto em tecido congelado, faz-se necessário o desenvolvimento de uma técnica mais sensível e reprodutível.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Aplicar a droplet digital PCR na detecção de *Fusobacterium nucleatum* em biópsia líquida e tecido parafinado para rastreamento e prognóstico de câncer colorretal.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

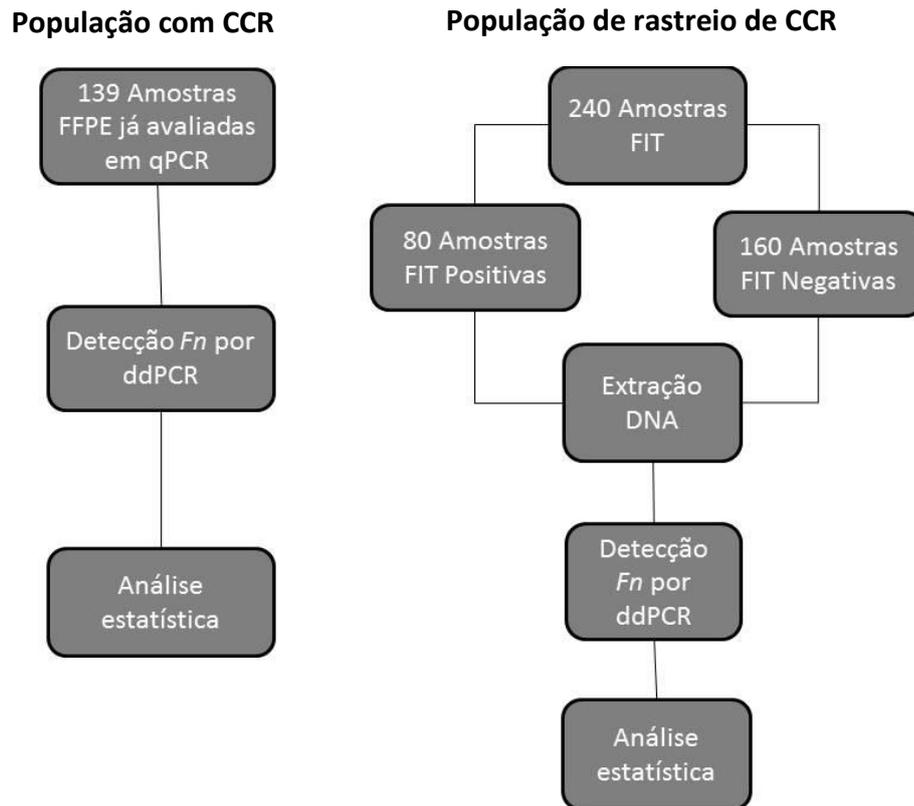
Especificamente, pretendemos:

- i. Otimizar a técnica de droplet digital PCR para detecção da bactéria *Fusobacterium nucleatum* em amostras de tecido parafinado e de material fecal;
- ii. Testar a concordância da taxa de positividade de *F. nucleatum* em amostras tumorais incluídas em parafina entre resultados obtidos a partir da droplet digital PCR e qPCR,
- iii. Avaliar a associação de *Fn* por ddPCR com prognóstico dos pacientes com CCR;
- iv. Determinar a presença e os níveis da bactéria *Fusobacterium nucleatum* em amostras de material fecal obtidas de indivíduos participantes do programa de rastreamento de câncer colorretal desta instituição e associar com os resultados do FIT e da colonoscopia nos casos com FIT positivo.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 DELINEAMENTO E LOCAL DO ESTUDO

Estudo transversal com coleta retrospectiva que foi desenvolvido no Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) e na Unidade de Prevenção da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos (Barretos, SP). A figura 5 apresenta um fluxograma do delineamento do estudo para melhor compreensão dos métodos.



**Figura 5:** Fluxograma do plano de trabalho. (A) A população com câncer colorretal (CCR) corresponde a pacientes admitidos no Departamento de Cirurgia de Digestivo Baixo, dos quais amostras de DNA extraído de tecidos incluídos em parafina (FFPE) foram avaliadas por ddPCR para a presença de *Fn* e os resultados foram comparados a dados de qPCR previamente publicados<sup>24</sup>. (B) A população de estudo de rastreio de câncer colorretal (CCR) corresponde a indivíduos participantes do Programa de Rastreamento de Câncer Colorretal do Hospital de Câncer de Barretos, com resultado de FIT (teste imunológico fecal) disponível e amostras fecais. A detecção de *Fn* foi feita por droplet digital PCR (ddPCR) como descrito nos métodos.

### 3.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO - CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

i) População de pacientes com câncer colorretal: estudo retrospectivo no qual foi estudado o material parafinado de 139 pacientes diagnosticados com câncer colorretal submetidos à cirurgia no Hospital de Câncer de Barretos no Departamento de Cirurgia de Digestivo Baixo, e cuja descrição clínica, molecular de presença de *Fn* por qPCR foi previamente publicada <sup>24</sup>. A inclusão destes pacientes no presente estudo foi previamente aprovada após emenda ao projeto intitulado: “Avaliação da presença e do impacto molecular e clínico da microbiota intestinal em pacientes com carcinoma colorretal do Hospital de Câncer de Barretos.” (CEP: 1402/2017). O DNA tumoral desta população foi isolado para utilização em estudos prévios e as análises da presença da bactéria *Fusobacterium nucleatum* foram realizadas por droplet digital PCR no material remanescente do projeto supracitado. Nos casos com ausência de DNA, novos cortes de bloco de parafina foram realizados para extração de DNA.

ii) População de rastreamento de câncer colorretal: Foram incluídos 240 indivíduos participantes do programa de rastreamento do câncer colorretal, sem história familiar e pessoal de câncer colorretal, com idade entre 50 e 65 anos que realizaram o teste imunológico de sangue oculto nas fezes, e cujos dados completos foram previamente publicados <sup>42</sup>. O DNA foi extraído utilizando kit específico (conforme descrito abaixo) a partir de amostras de fezes destes indivíduos armazenadas em solução tampão contida no tubo de coleta para FIT no Biobanco desta instituição. Dos 240 indivíduos, 80 eram FITs positivos e 160 negativos.

### 3.3 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA das amostras de tumor em tecido parafinado já estava extraído e armazenado em nossa instituição <sup>55</sup>. Quando necessário uma nova aliquota de DNA foi extraída utilizando o kit de extração QIAamp® DNA Micro kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

O DNA das amostras de FIT foi obtido através da extração utilizando o QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. O tubo contendo

material fecal proveniente do teste de FIT foi homogeneizado por vortex e posteriormente foi retirado 100 µl deste material e transferido para um microtubo de 1,5 ml. Em seguida foi adicionado 1 ml do buffer InhibitEX e seguiu-se com as etapas posteriores para extração de DNA de acordo com o manual de instruções do fabricante. O DNA obtido através do processo de extração foi eluído em 32 µl de água ultrapura.

O DNA extraído foi posteriormente quantificado utilizando o equipamento Qubit Fluorometer – Qubit Double-Stranded DNA High kit (ThermoFisher Scientific) e armazenado a -30°C para as análises posteriores.

### **3.4 DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA E DOS NÍVEIS DE *Fusobacterium nucleatum***

A determinação da presença e dos níveis de *Fusobacterium nucleatum*, foi avaliada por droplet digital PCR utilizando *primers* e sondas específicas que detectam uma sequência de DNA contendo o gene do RNA ribossomal 16S desta bactéria, de acordo com a metodologia descrita por Yamaoka e colaboradores<sup>31</sup>. Após padronização dos ensaios por PCR em Tempo Real, os experimentos foram otimizados para análise em droplet digital PCR. A reação de PCR foi realizada com 20 ng de DNA, 1x ddPCR Supermix for Probes (BioRad, Hercules, CA, EUA), 0,25 µM de cada primer, e 0,125 µM de sonda em um volume total de 22 µL, por amostra, seguido por geração de gotículas usando um gerador automático de gotículas (BioRad). O comprimento do fragmento de PCR é de 108 pb (NCBI NC\_003454.1) (*F. nucleatum subsp. nucleatum* ATCC 25586 *chromosome, complete genome*). As etapas do ciclo para PCR incluíram pré-aquecimento a 95°C por 10 min seguido por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, *annealing* a 60°C por 60 s, e aquecimento final a 98°C por 10 min. Após amplificação, a placa de PCR foi transferida para um leitor de gotas QX100 (BioRad) e os dados da leitura de amplitude de fluorescência foram obtidos pelo QuantaSoft software (BioRad).

O controle positivo utilizado foi DNA extraído da cepa de *F. nucleatum subsp. nucleatum*, cedido pelo Prof. Mário Júlio Ávila-Campos, colaborador do Laboratório de Anaeróbios do Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo. Como controle negativo foi utilizado DNA extraído da cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) cedido pelo grupo de estudos em sepse do HCB, além do *No Template Control* (NTC), amostra sem DNA. Foram consideradas positivas as amostras que geraram resultado acima do LoD (2,7

cópias/reação) para a bactéria, e a quantidade de DNA bacteriano presente na amostra foi dada em cópias por reação com base nos dados gerados pelo software.

Posteriormente as amostras foram classificadas em 2 grupos de acordo com a quantidade de DNA bacteriano presente na amostra, com base na mediana do número de cópias/reação de todas as amostras positivas: *Fn*-alto as amostras que apresentaram valores acima da mediana e *Fn*-baixo/negativo amostras que geraram valores abaixo da mediana. A partir de cada população descrita nos métodos acima foi obtida uma mediana diferente: 69 cópias/reação para população de paciente com câncer colorretal, e de 26 cópias/reação para a população de rastreamento de câncer colorretal.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O levantamento dos dados clínicos e moleculares (sexo, idade, localização do tumor, estadiamento clínico, status de MSI, genes MSI-ativos, *BRAF* e expressão das proteínas de reparo de danos no DNA) dos pacientes com CCR já foi realizado e os registros e informações foram arquivados em banco de dados específico em SPSS. Para os indivíduos assintomáticos do programa de rastreamento, foram levantados dados demográficos e clínicos relacionados ao resultado do teste FIT, exame de colonoscopia e resultado de biópsias (quando realizadas).

A análise de detecção da bactéria em diferentes amostras por diferentes métodos foi realizada através de medidas de acurácia (sensibilidade, especificidade, curva ROC e AUC).

Para testar a associação entre a presença de bactérias nas amostras de tumor colorretal e de material fecal provenientes do FIT de indivíduos assintomáticos e as características clínicas dos pacientes, foi utilizado o teste de  $\chi^2$  ou teste exato de Fisher. O coeficiente Kappa foi realizado para avaliar a concordância entre os resultados obtidos na população com CCR por qPCR e no presente estudo por ddPCR. O método de Kaplan-Meier foi realizado para construção e comparação das curvas de sobrevida global de acordo com o método de detecção e da quantidade de DNA de *Fn* em amostras de tecido de CRC em FFPE. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para avaliar a quantidade de *Fn* nos diferentes subgrupos de acordo com resultado da colonoscopia dos pacientes com FIT positivo. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0.05$ . Todas as análises estatísticas

foram realizadas no programa IBM SPSS para Windows, versão 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

#### **4. ASPECTOS ÉTICOS**

O projeto atual foi aprovado pelo ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos (CEP: 1402/2017). CAAE: 70048117.7.0000.5437.

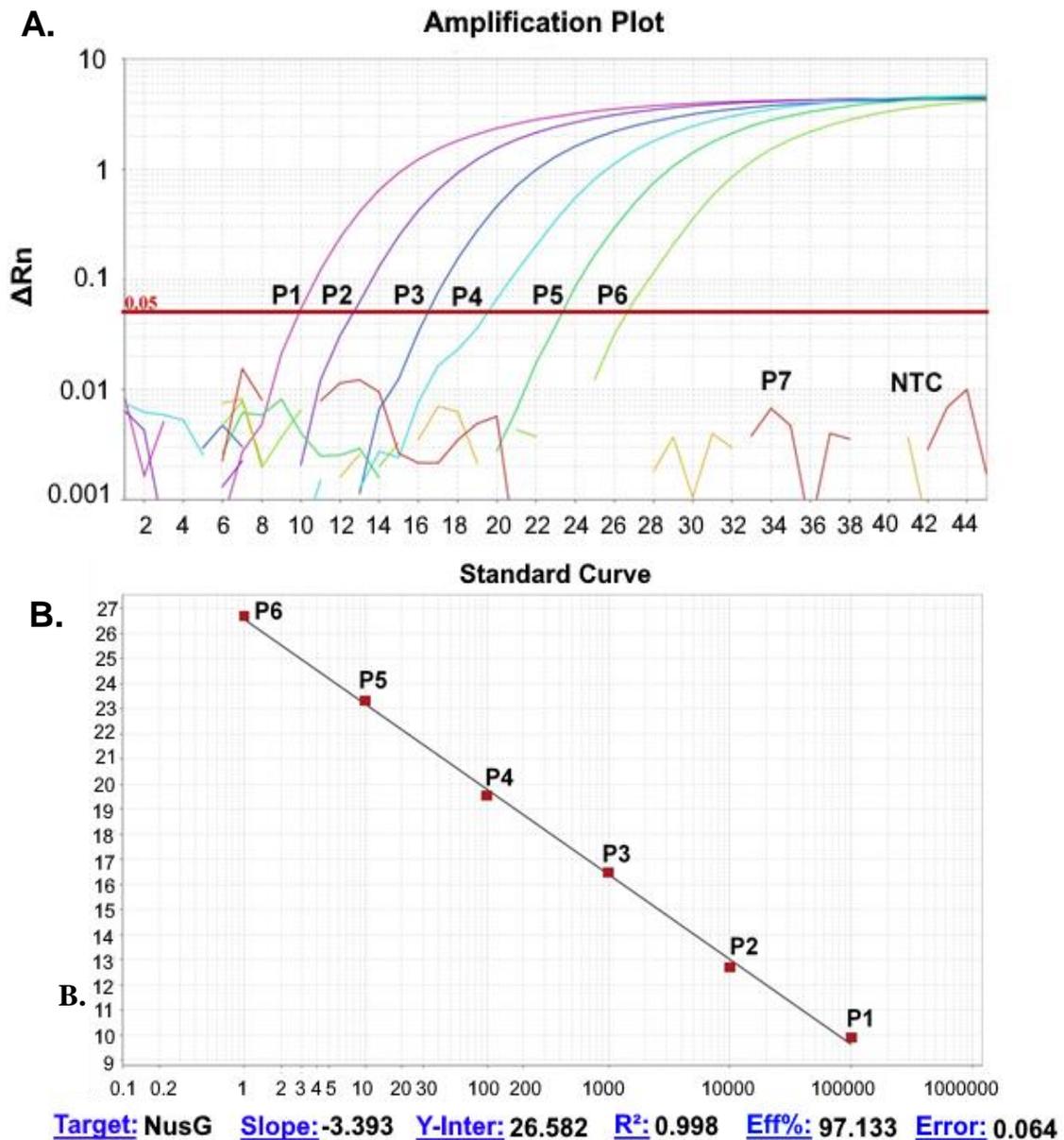
## 5. RESULTADOS

### 5.1 PADRONIZAÇÃO DA DETECÇÃO DE *Fn* POR ddPCR

#### 5.1.1 EFICIÊNCIA DOS PRIMERS E SONDA

Para o teste de eficiência dos *primers* e sonda, se utilizou os pontos de diluição seriada (Tabela 1 – item 5.1.3) e a detecção foi realizada por qPCR primeiramente, onde se observou a amplificação do DNA de *Fn* nos 6 primeiros pontos de diluição. No ponto 7 que havia apenas DNA de *E. coli* não houve amplificação, também não houve amplificação no NTC (Figura 6A).

Uma reação é considerada 100% eficiente quando todos os pontos da curva estiverem condizentes com o Ct esperado, gerando uma curva padrão com inclinação de -3,3, e um coeficiente de correlação ( $R^2$ ) = 1. O valor de  $R^2$  fornece o fator de correlação entre os pontos de diluição e o Ct obtido. Baseado nos resultados obtidos através da curva padrão da qPCR, um  $R^2$  de 0.998 e eficiência de 97.133%. Podemos, então, afirmar que o ensaio é eficiente, específico e sensível para detectar *Fn* (Figura 6B).

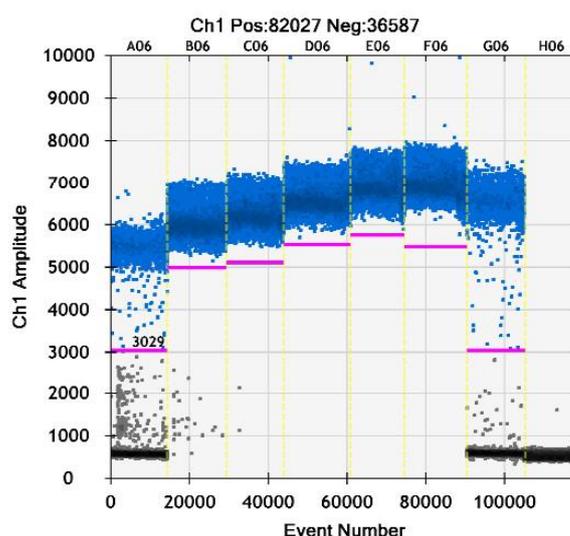


**Figura 6:** Curvas de amplificação (A) e curva padrão (B); feitas em qPCR confirmando a eficiência dos *primers* e sonda, de acordo com os valores apresentados no coeficiente de correlação ( $R^2$ ) e eficiência, nos pontos de diluição com mix de DNA de *Fusobacterium nucleatum* e *E. coli*, diluindo 10x menos a quantidade de DNA de *F. nucleatum* do que *E. coli* a cada ponto.

### 5.1.2 GRADIENTE DE TEMPERATURA PARA DETECÇÃO DE *Fusobacterium nucleatum* EM ddPCR

Após o teste de eficiência realizado por qPCR, os ensaios foram otimizados para análise por ddPCR. Dentro do processo de otimização da reação devemos considerar a temperatura de anelamento, de forma que ofereça condição ótima de reação, como um pré-requisito para resultados seguros a partir da amplificação eficiente da sequência alvo específica. Baseado em artigos que utilizaram a mesma técnica, estabelecemos uma temperatura intermediária de 60°C e foi testado com 3 temperaturas inferiores e 3 temperaturas superiores, para definir a melhor temperatura para realização dos experimentos em ddPCR: T1: 54,6°C, T2: 55,9°C, T3: 57,8°C, T4: 60,0°C, T5: 61,9°C, T6: 63,8°C. Nos resultados de ddPCR, se espera que as populações de *droplets* positivas para *F. nucleatum* estejam bem agrupadas e numa amplitude de fluorescência alta (representada no eixo y do gráfico) quando visualizadas nos gráficos de amplitude de fluorescência gerados pelo software QuantaSoft (BioRad) (Figura 7).

Diante dos resultados observados, levando em consideração o bom resultado do teste e baseado nos resultados obtidos em outros trabalhos, que utilizaram a mesma técnica em outras populações<sup>31, 56</sup>, foi verificado que a temperatura ótima de reação para este ensaio em ddPCR é de 60°C.



**Figura 7:** Gráfico unidimensional gerados pelo software QuantaSoft (BioRad) mostrando o ensaio de gradiente de temperatura. A06: Temperatura de 63,8°C; B06: 63,2°C; C06:61,9°C; D06:60°C; E06:57,8°C; F06:55,9°C; G06:54,6°C e H06: NTC.

### 5.1.3 LIMITE DE BRANCO (LoB) E LIMITE DE DETECÇÃO (LoD)

Para garantir que a reação fosse adequada para a detecção de *F. Nucleatum* por ddPCR, foi necessário definir a sensibilidade: que é a capacidade de detectar pequenas quantidades do alvo com precisão; a especificidade: que é detecção específica do alvo pretendido, sem detectar outros organismos e diminuir o número de falsos positivos; limite de branco (LoB), que é a maior concentração do alvo que se espera encontrar quando réplicas de uma amostra em branco, que não contem o alvo nas reações, são testados<sup>57</sup>; e o limite de detecção (LoD): que é a menor concentração do alvo detectado com segurança a partir do limite de branco e o limite de branco (LoB)<sup>57</sup>.

Para os testes de sensibilidade, especificidade e limite de detecção foi preparada uma curva de diluição seriada de DNA de *F. nucleatum* em *E. coli* com diluições representadas em sete pontos, onde o ponto 1 continha apenas DNA de *F. nucleatum*, os pontos de 2 a 6 DNA de *F. nucleatum* diluído em DNA de *E. coli*, com um fator de diluição de 10x menor a cada ponto, e o ponto 7 apenas DNA de *E. coli*. Utilizou-se também na reação o *No Template control* (NTC, P8), que contém todos os reagentes utilizados para realização de ddPCR, sem material genético, onde não se espera observar amplificação (Tabela 1).

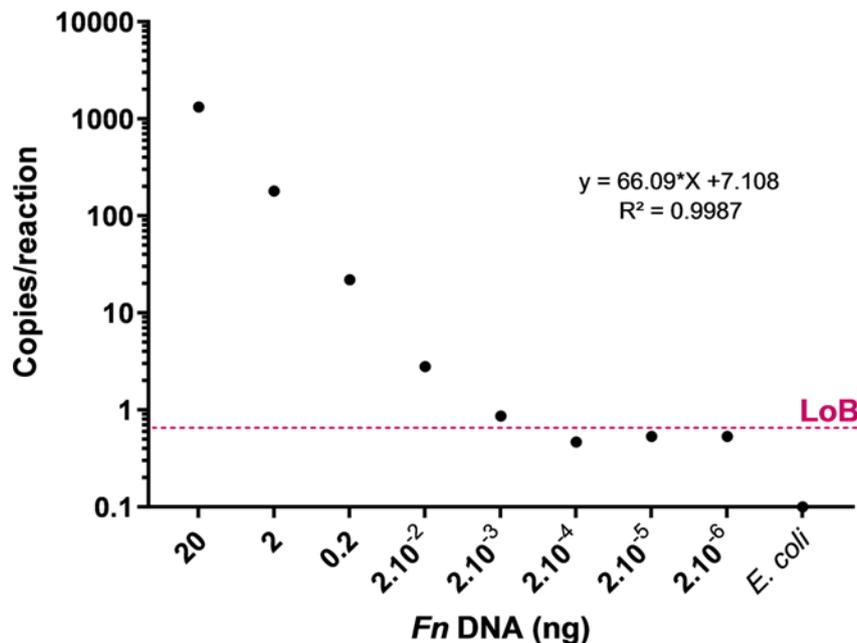
**Tabela 1:** Pontos de diluição construídos para as análises de sensibilidade, especificidade e limite de detecção de *Fn*.

Ponto de diluição	DNA de <i>E.coli</i>	DNA de <i>Fn</i>	% de DNA de <i>Fn</i>
P1	00 ng / 09µl de água	1 µl de <i>Fn</i> DNA a 10 ng	100%
P2	09 µl / 90 ng	1 µl P1 - 1 ng/ul	~1%
P3	09 µl / 90 ng	1 µl P2 - 0.1 ng/ul	~0.1%
P4	09 µl / 90 ng	1 µl P3 - 0.01 ng/ul	~0.01%
P5	09 µl / 90 ng	1 µl P4 - 0.001 ng/ul	~0.001%
P6	09 µl / 90 ng	1 µl P5 - 0.0001 ng/ul	~0.0001%
P7	10 µl / 100 ng	0 µl - 0 ng	0%
NTC	0	0	0%

Para o limite de branco, utilizou-se 20 ng de DNA do controle negativo (DNA de *E. coli*) aplicados em 20 réplicas (20 ng *E. coli* em cada), contendo o mix, primers e sonda para detecção de *Fn* descritos no item 3.5, além do controle positivo (DNA de *Fn*) e o NTC. A média e o desvio padrão (DP) dos valores do número de cópias obtidos com as réplicas de controle negativo foram determinados para calcular o LoB:  $\text{LoB} = \text{média do branco} + 1,645 * (\text{DP branco})$ . Depois de estabelecer o LoB, foi calculada a menor concentração de *Fn* que provavelmente seria distinguida de forma confiável do *background*. Para isso, foram realizadas três réplicas independentes de ddPCR da mesma diluição seriada contendo *Fn* DNA em um *background* de DNA de *E. coli* descrito acima. O LoD foi calculado como  $\text{LoD} = \text{LoB} + 1,645 * (\text{DP da amostra menos concentrada})^{57}$ .

Ao final do experimento com 40 réplicas do controle negativo, baseado nas informações acima foi determinado o LoB com 0,5 cópias / reação.

A seguir, a linearidade do ensaio e a sensibilidade analítica da reação foram avaliadas por diluição seriada. Uma alta linearidade entre a fração esperada e observada de DNA de *Fn* foi observada com um  $R^2 = 0,9987$  (Figura 8).



**Figura 8:** Diluição seriada de DNA de *Fn* em DNA de *E. coli*. O número de cópias de DNA de *Fn* determinado por ddPCR foi plotado com as diluições correspondentes.

As réplicas da diluição da amostra de concentração mais baixa, acima do LoB, foram usadas para determinar o LoD ( $2,10^{-3}$  ng) obtendo um LoD de 2,7 cópias / reação. Foram consideradas positivas para *Fn* todas as amostras que geraram cópias acima de 2,7 cópias/reação.

Com este ensaio os resultados de detecção de *Fn* baseado em ddPCR foi sensível e específico para controles positivos com um limite de branco (LoB) de 0,5 cópias / reação e um limite de detecção (LoD) de 2,7 cópias / reação.

## **5.2 ANÁLISE DA DETECÇÃO DE *Fn* NA POPULACACÃO COM CÂNCER COLORRETAL**

### **5.2.1 DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO**

A população de estudo avaliada foi composta por 139 pacientes diagnosticados com CCR e submetidos à cirurgia no Hospital de Câncer de Barretos no Departamento de Digestivo Baixo, e cuja descrição clinicopatológica, molecular e de expressão de *Fn* por qPCR foi previamente reportada <sup>24</sup>.

A maioria dos pacientes incluídos tinha a média de idade de 60,65 anos ( $\pm$  13.49) e eram do sexo masculino 53,2% (74/139). Em relação às características tumorais, 69,6% (98/139) apresentaram estadiamento clínico II/III ao diagnóstico, 51,8% (72/139) dos tumores primários estavam localizados no cólon esquerdo e 68,3% (95/139) foram categorizados como TNM - T3/T4 (a b). Histologicamente, 92,0% (126/137) dos tumores tinham grau histológico bem ou moderadamente diferenciado e análises moleculares mostraram que 15,1% dos pacientes eram MSI-H (21/139) e 8,0% tinham *BRAF* mutado (11/139). Com relação a expressão de proteínas de reparo de dano ao DNA, 13,9% (17/139) apresentaram ausência de expressão da proteína MLH1, 2,1% (3/139) da proteína MSH2, 0,7% (1/139) da proteína MSH6 e 12,3% (15/139) da PMS2. (Tabela 2). De acordo com o último follow-up realizado em Março de 2021, 56% (78/139) dos pacientes estavam vivos sem câncer, 5% (7/139) vivos com câncer, 27,3% (38/139) morreram em consequência do câncer e 10,8% (15/139) morreram decorrentes de outras causas (Tabela 2).

**Tabela 2:** Caracterização da população de pacientes com câncer colorretal.

Características		Número de casos (n)	%
<b>Média de idade 60.65 ± 13.49</b>			
<b>Sexo</b>	Feminino	65	46.5
	Masculino	74	53.2
<b>Estadiamento clínico(ao diagnóstico)</b>	0/I	36	26.1
	II/III	98	69.6
	IV	6	4.3
<b>Localização tumoral</b>	Cólon proximal	38	27.3
	Cólon distal	72	51.8
	Reto	29	20.9
<b>Tumor primário (T)</b>	Tis/T1/T2	44	31.7
	T3/T4 (a b)	95	68.3
<b>Diferenciação tumoral</b>	Bem a moderadamente diferenciadoo	126	92.0
	Pouco diferenciado	11	8.0
<b>Status MSI#</b>	MSS/MSI-baixo	118	84.9
	MSI-alto	21	15.1
<b>Mutação BRAF #</b>	Mutado	11	8.0
	Não mutado	127	92.0
<b>Expressão da proteína MLH1 #</b>	Positivo	105	86.1
	Negativo	17	13.9
<b>Expressão da proteína MSH2#</b>	Positivo	119	97.9
	Negativo	3	2.1
<b>Expressão da proteína MSH6#</b>	Positivo	121	99.3
	Negativo	1	0.7
<b>Expressão da proteína PMS2#</b>	Positivo	107	87.7
	Negativo	15	12.3
<b>Status de sobrevida</b>	Vivo com cancer	78	56.1
	Vivo sem cancer	7	5.0
	Morte por câncer	38	27.3
	Morte por outras causas	15	10.8

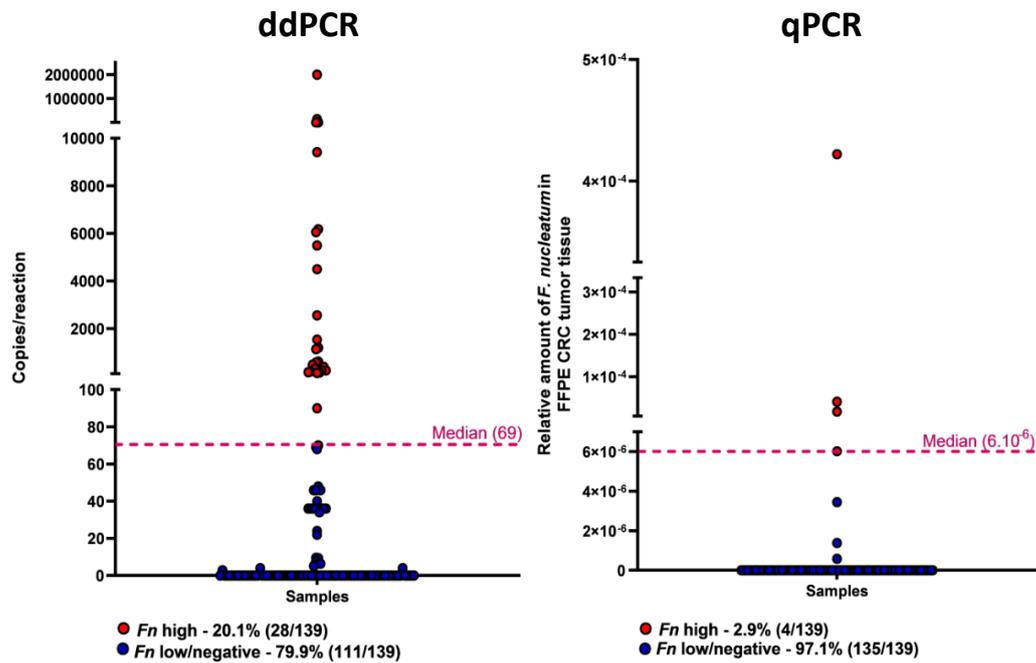
#Dados reportados previamente por de Carvalho e colaboradores, 2019 [24]; MSI = instabilidade de microssatélite.

### 5.2.2 TESTE CONCORDÂNCIA DA DETECÇÃO DE *Fusobacterium nucleatum* EM TECIDO TUMORAL PARAFINADO DE CCR POR qPCR vs. ddPCR

A presença de *Fn* em 139 amostras tumorais incluídas em parafina foi avaliada previamente por qPCR, e obtivemos uma frequência de 5,8% de positividade<sup>24</sup>.

Estas mesmas 139 amostras tumorais incluídas em parafina foram avaliadas pelo método de ddPCR descrito e otimizado na sessão anterior. Os casos foram classificados de acordo com o número de cópias/reação considerando a mediana de 69 cópias/reação dos casos positivos como *Fn*-alto (acima da mediana) e baixo/negativo (abaixo da mediana), como descrito nos materiais e métodos no item 3.5. Seguindo a mesma metodologia, os resultados de qPCR foram reclassificados também com base na mediana ( $6 \times 10^{-6}$ ) dos casos positivos como *Fn*-alto e *Fn* baixo/negativo.

Com base nesta classificação, para a expressão avaliada por ddPCR, se observou que 20,1% (28/139) dos casos eram *Fn*-alto e 79,9% (111/139) *Fn* baixo/negativo. Para os resultados do qPCR 2,9% (4/139) foram *Fn*-alto e 97,1% (135/139) *Fn*-baixo/negativo (Figura 9). Os 4 casos *Fn*-alto por qPCR foram todos *Fn*-alto por ddPCR (Figura 9). Não houve concordância entre a detecção por ddPCR e qPCR (Cohen's Kappa test = 0,210) visto que a detecção por qPCR mostrou uma baixa taxa de sensibilidade (Tabela 3)



**Figura 9:** Quantidade de *F. nucleatum* em 139 amostras de tumor de CCR em FFPE de acordo com cada método de detecção utilizado. Os gráficos de *dotplots* representam amostras e a linha pontilhada representa a mediana da quantidade definido como ponto de corte em torno da qual as amostras foram classificadas como tendo quantidade alta (acima da mediana) ou baixa / negativa (abaixo da mediana) de *Fn*. À esquerda a distribuição do DNA de *Fn* em cópias / reação detectada por ddPCR (mediana = 69 cópias / reação). À direita a distribuição da quantidade relativa de DNA de *Fn* detectado por qPCR (mediana =  $6 \times 10^{-6}$ ).

**Tabela 3:** Concordância dos resultados de detecção de *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*) em casos de CCR em FFPE pelos métodos ddPCR e qPCR.

	Taxa de concordância % (n)	Cohen's Kappa
FFPE ddPCR x FFPE qPCR	82.8% (115/139)	0.210

FFPE: fixada em formalina embebida em parafina

### 5.2.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE STATUS DE *Fn* E CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E MOLECULARES

O próximo passo foi avaliar se existe associação entre o status de *Fn* por ddPCR e qPCR com as características clínico-patológicas e moleculares dos pacientes (Tabela 4). A quantidade elevada de *Fn* detectada por ddPCR foi associada à localização proximal do tumor ( $p = 0,04$ ), tumores histologicamente pouco diferenciados ( $p = 0,02$ ), status de MSI-alto ( $p < 0,001$ ), tumores com mutação em *BRAF* ( $p = 0,003$ ) e com a perda de expressão das proteínas de reparo de danos no DNA MLH1 ( $p < 0,001$ ) e PMS2 ( $p < 0,001$ ) (Tabela 4). Em relação aos resultados de qPCR, foi observada apenas a associação com tumores que tinham mutação em *BRAF* ( $p = 0,03$ ) (Tabela 4).

**Tabela 4:** Características clínico-patológicas e moleculares de acordo com a quantidade de DNA de *Fusobacterium nucleatum* (Fn) em tecido em FFPE de CRC detectado por ddPCR e qPCR.

Variáveis#	Todos os casos (%)	Quantidade de DNA de <i>F. nucleatum</i> por ddPCR			Quantidade de DNA de <i>F. nucleatum</i> por qPCR			
		Baixo/Neg. n=111 (79,9)	Alto n=28 (20,1)	p-valor*	Baixo/Neg. n=135 (97,1)	Alto n=4 (2,9)	p-valor*	
<b>Idade</b>	<b>Média 60,65 ± 13,49</b>							
<b>Gênero</b>	<b>Feminino</b>	65(46.8)	49 (75,4)	16 (24,6)	0,2	65(48,1)	0(0,0)	0,1
	<b>Masculino</b>	74(53.2)	62 (83,8)	12 (16,2)		70(51,9)	4(100,0)	
<b>Localização tumoral</b>	<b>Cólon proximal</b>	38(27.3)	26 (23,4)	12 (42,9)	<b>0,04</b>	36(26,7)	2(50,0)	0,6
	<b>Cólon distal</b>	72(58.1)	58 (52,3)	14 (50,0)		70(51,9)	2(50,0)	
	<b>Reto</b>	29(20.9)	27(24,3)	2(7,1)		29(21,5)	0(0,0)	
<b>Tumor (T)</b>	<b>Tis/T1/T2</b>	44(31.7)	36 (32,4)	8 (28,6)	0,6	42(31,1)	2(50,0)	0,5
	<b>T3/T4 (a b)</b>	95(68.3)	75 (67,6)	20 (71,4)		90(68,9)	2(50,0)	
<b>Estadiamento clínico</b>	<b>0/I</b>	37(26.6)	30 (27,0)	7 (25,0)	1,0	35(25,9)	2(50,0)	0,3
	<b>II/III</b>	96(69.1)	76 (68,5)	20 (71,4)		94(69,6)	2(50,0)	
	<b>IV</b>	6(4.3)	5 (4,5)	1 (3,6)		6(4,4)	0(0,00)	
<b>Diferenciação tumoral</b>	<b>Bem a moderado</b>	126(92.0)	104 (94,5)	22 (81,5)	<b>0,02</b>	124(92,5)	2(66,7)	0,2
	<b>Pouco</b>	11(8.0)	6 (5,5)	5 (18,5)		10(7,5)	1(33,3)	
<b>Status -MSI</b>	<b>MSS/MSI-Baixo</b>	118(84.9)	101 (91,0)	17 (60,7)	<b>&lt;0,001</b>	116(85,9)	2(50,0)	0,1
	<b>MSI-Alto</b>	21(15.1)	10 (9,0)	11 (39,3)		19(14,1)	2(50,0)	

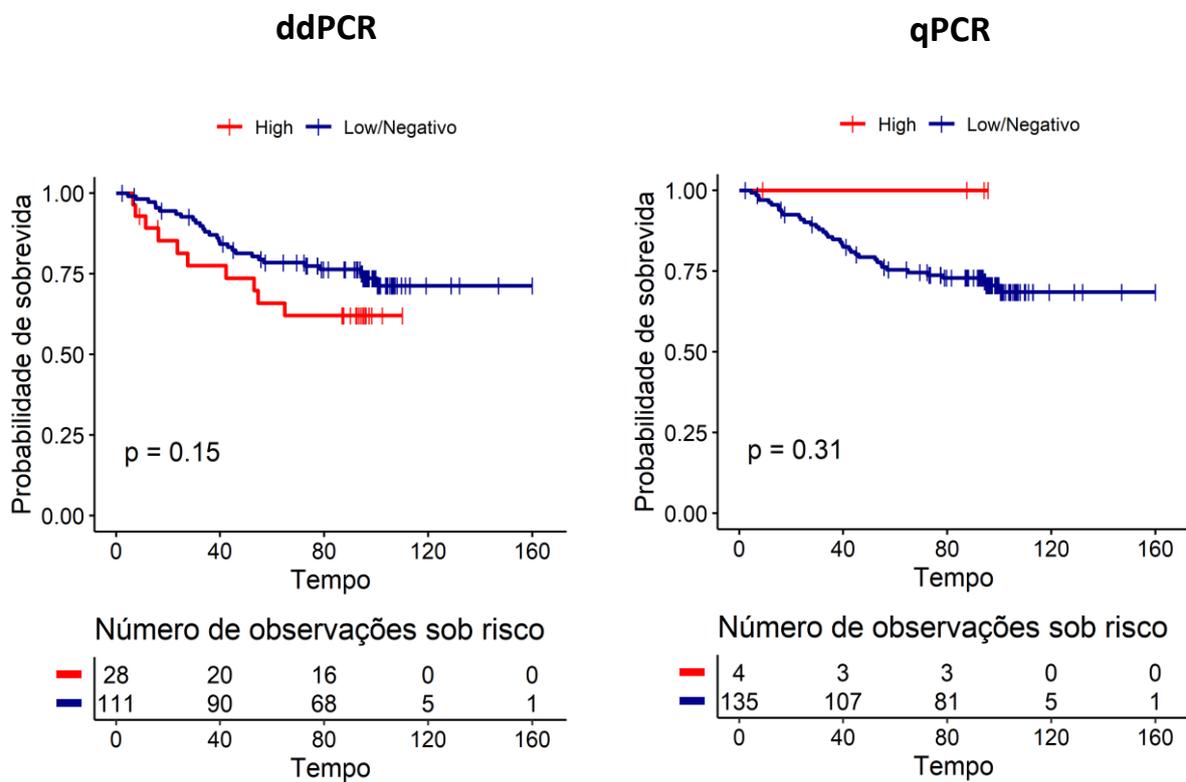
Continua na próxima página...

**Tabela 4 (continuação):** Características clínico-patológicas e moleculares de acordo com a quantidade de DNA de *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*) em tecido em FFPE de CRC detectado por ddPCR e qPCR.

Variáveis#		Todos os casos (%)	Quantidade de DNA de <i>F. nucleatum</i> por ddPCR			Quantidade de DNA de <i>F. nucleatum</i> por qPCR		
			Baixo/Neg. n=111 (79,9)	Alto n=28 (20,1)	<i>p</i> -valor*	Baixo/Neg. n=135 (97,1)	Alto n=4 (2,9)	<i>p</i> -valor*
<b>Mutação <i>BRAF</i></b>	<b>Mutado</b>	11(8.0)	5 (4,5)	6 (21,4)	<b>0,003</b>	9(6,7)	2(50,0)	<b>0,03</b>
	<b>Não mutado</b>	127(92.0)	105 (95,5)	22 (78,6)		125(93,3)	2(50,0)	
<b>Expressão proteína MLH1</b>	<b>Positivo</b>	105(86.1)	90 (92,8)	15 (60,0)	<b>&lt;0,001</b>	103(89,6)	2(50,0)	0,09
	<b>Negativo</b>	17(13.9)	7 (7,2)	10 (40,0)		12(10,4)	2(50,0)	
<b>Expressão proteína MSH2</b>	<b>Positivo</b>	119(97.5)	95(97,9)	24(96,4)	0,5	115(97,5)	4(100,0)	1,0
	<b>Negativo</b>	3(2.5)	2(2,1)	1(4,0)		3(2,5)	0(0,0)	
<b>Expressão proteína MSH6</b>	<b>Positivo</b>	121(99.2)	96(99,0)	25(100,0)	1,0	117(99,2)	4(100,0)	1,0
	<b>Negativo</b>	1(0.8)	1(1,0)	0(0,0)		1(0,8)	0(0,0)	
<b>Expressão proteína PMS2</b>	<b>Positivo</b>	107(87.7)	91 (93,8)	16 (64,0)	<b>&lt;0,001</b>	105(87,3)	2(50,0)	0,07
	<b>Negativo</b>	15(12.3)	6 (6,2)	9 (36,0)		15(12,7)	2(50,0)	

A porcentagem indica a proporção de casos com uma variável clínico-patológica ou molecular específica de acordo com a quantidade de DNA *Fn* no tecido de CRC em FFPE. \* A associação entre a quantidade (Alto vs. Baixo/Neg.) de DNA de *Fn* no tecido de CRC em FFPE, o teste exato de Fisher foi realizado. # Relatado anteriormente por de Carvalho *et al.*, 2019; MSI: instabilidade de microsatelidade.

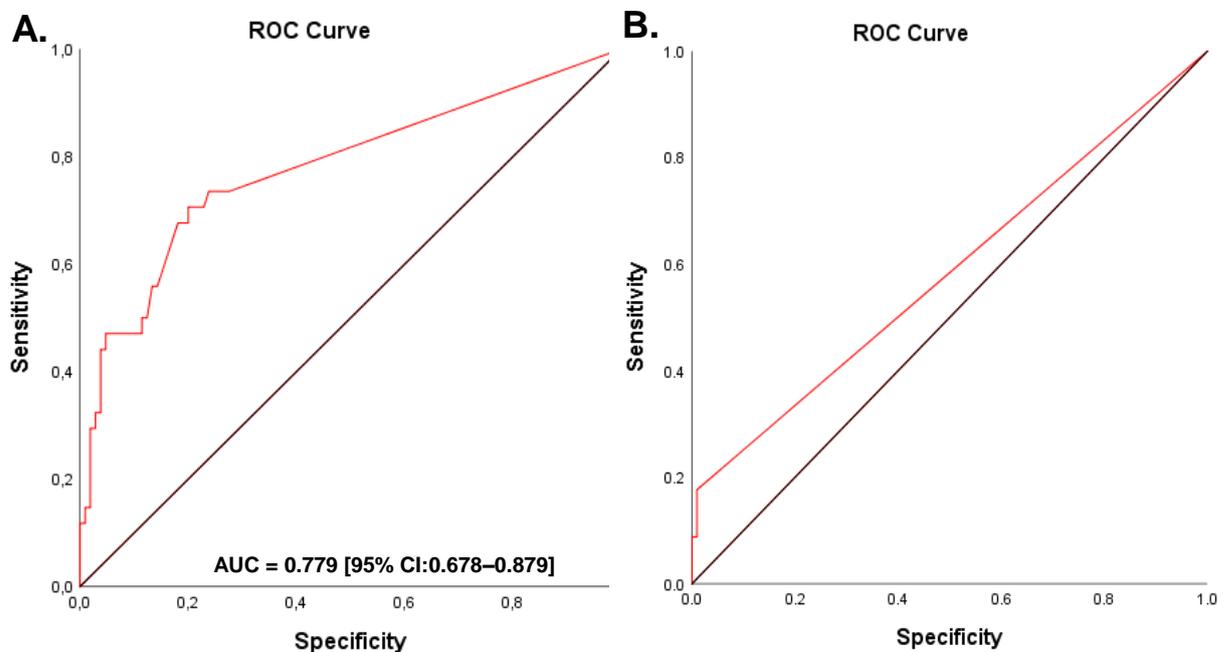
Além disso, também foi determinado o impacto de *Fn* na sobrevida dos pacientes. Aqueles que tiveram quantidade elevada de *Fn* detectado por ddPCR tenderam a ter sobrevida global menor quando comparados a pacientes com quantidade baixa / negativa de *Fn*, porém não atingindo significância estatística (58,3% vs 76,8% em 5 anos; log-rank  $p = 0,15$ ) (Figura 10A). Da mesma forma, nenhuma significância foi observada ao analisar status de *Fn* por qPCR em relação à sobrevida (60,0% vs 75,0% em 5 anos; log-rank  $p = 0,31$ ; Figura 10B).



**Figura 10:** Curvas de sobrevida global feitas pelo Método de Kaplan-Meier de acordo com o método de detecção e a quantidade de DNA de *Fn* em amostras de tecido de CRC em FFPE. À esquerda a sobrevida global em cinco anos foi de 58,3% em maior quantidade (*Fn*-alto) vs 76,8% em menor quantidade e pacientes negativos (*Fn*-baixo/negativo) detectado por ddPCR (log-rank  $p = 0,15$ ). À direita a sobrevida global em cinco anos foi de 60,0% para menor quantidade e pacientes negativos (*Fn*-baixo/negativo) vs 75,0% para maior quantidade (*Fn*-alto) detectado por qPCR (log-rank  $p = 0,31$ )

#### 5.2.4 PERFORMANCE DE ddPCR PARA DETECÇÃO DE *Fusobacterium nucleatum* NO TECIDO DE CCR EM FFPE

Consturimos curvas ROC e calculamos os valores de AUC para obter a precisão da detecção de *Fn* em tecido FFPE de CRC. Por ddPCR, o valor de AUC para detecção de *Fn* por ddPCR foi de 0,779 [intervalo de confiança de 95% (CI) 0,678–0,879] com sensibilidade de 70,6% e especificidade de 80,0%, e valor preditivo positivo de 53,3%, valor preditivo negativo de 89,4% e acurácia de 77,7%. Devido ao baixo número de casos *Fn*-alto identificados por qPCR, a curva ROC e os níveis de AUC não puderam ser determinados (Figura 11).



**Figura 11:** Receiver operator characteristic (Curvas ROC) para avaliar a precisão discriminatória da detecção de DNA de *Fn* por (A) ddPCR e (B) qPCR.

### **5.3 ANÁLISE DA DETECÇÃO DE *Fn* EM AMOSTRAS DE FIT DE PARTICIPANTES DE RASTREAMENTO DE CÂNCER COLORRETAL**

Dos 248 indivíduos participantes do programa de rastreamento do câncer colorretal, 69% (171/248) dos participantes eram do sexo feminino e 31% (77/248) do sexo masculino com a média de idade foi de  $57,01 \pm 4,46$  anos, sendo selecionados 82 foram FITs positivos e 166 FITs negativos.

#### **5.3.1 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS DE FIT**

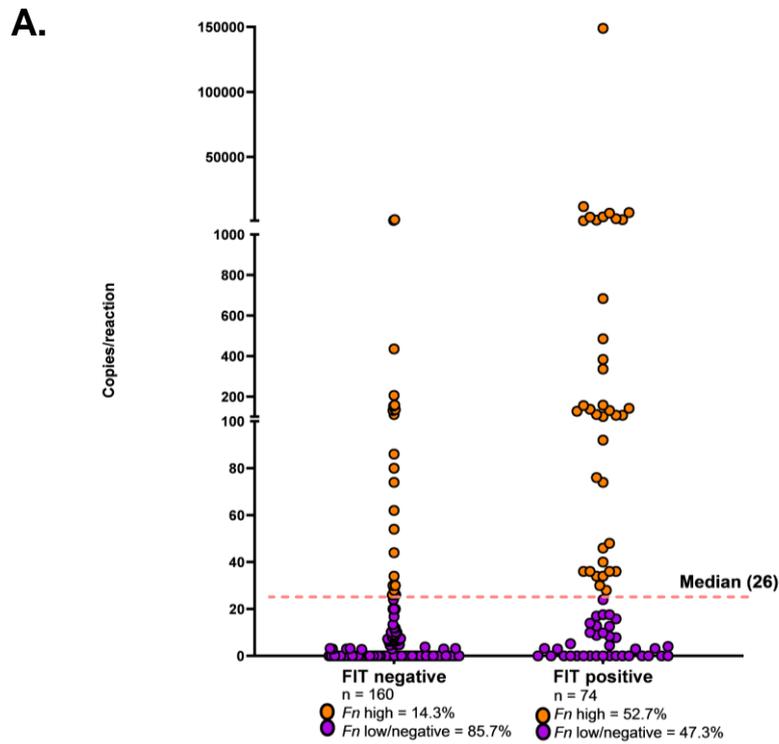
Foi realizada a extração de DNA das 248 amostras de FIT de acordo com protocolo descrito acima no item 3.3. A quantificação do DNA obtido pelo Qubit<sup>®</sup> mostrou um resultado semelhante para todas as amostras, com uma média de concentração total de massa de DNA de 47,36 ng em 32  $\mu$ l de eluição [Mín. 3,2 ng - Máx. 1332,8 ng]. Especificamente para os 82 FITs positivos a média de concentração de DNA foi de 69,76 ng [Mín. 3,2 ng - Máx. 359,04 ng] e para os 166 FITs negativos, a média foi de 36,8 ng/ $\mu$ l [Mín. 3,2 ng - Máx. 1332,8 ng].

Por sua vez, a quantificação realizada por Nanodrop<sup>®</sup> nos deu uma média de concentração de massa de DNA de 266,88 ng em 32  $\mu$ l de eluição [Mín. 44,8 ng - Máx. 2073,6 ng]. Especificamente para os 82 FITs positivos a média foi de 373,76 ng [Mín. 115,2 ng - Máx. 1308,8 ng] e para os 166 FITs negativos a média foi de 217,6 ng [Mín. 44,8 ng - Máx. 2073,6 ng]. As razões de pureza do DNA das 248 amostras de FIT foram avaliadas por Nanodrop<sup>®</sup>, e tivemos uma média da razão 260/280 de 2,57 e da razão 260/230 de 0,44.

#### **5.3.2 DETECÇÃO DE *Fn* EM AMOSTRAS DE FIT DOS PARTICIPANTES DO PROGRAMA DE RASTREAMENTO DE CÂNCER COLORRETAL POR ddPCR**

A detecção de *Fn* no FIT dos indivíduos participantes do programa de rastreamento de câncer colorretal, por ddPCR foi realizada em 248 amostras, uma vez que 13 amostras (7 FITs positivos e 6 FITs negativos) tiveram um resultado considerado inconclusivo, e 1 amostra positiva foi retirada da análise pois o paciente não fez colonoscopia. Os resultados

observados estão sumarizados na figura 12. Foi encontrada uma quantidade significativamente mais elevada de  $F_n$  no grupo FIT positivo (figura 12).



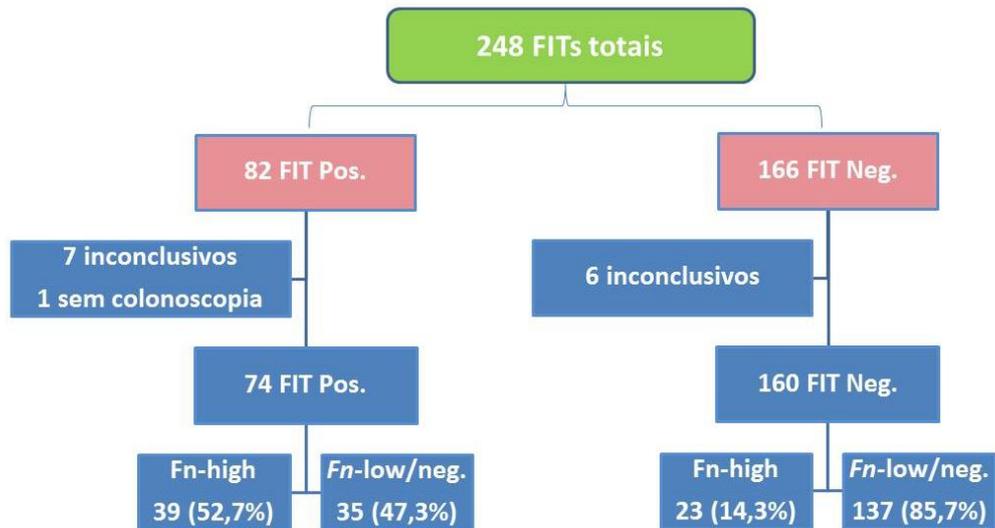
**B.**

	<i>Fn</i> -high	<i>Fn</i> -low/negative	<i>p</i> -valor*
<b>FIT Positivo</b>	52,7%	14,3%	<0,001
<b>FIT Negativo</b>	47,3%	85,7%	

**Figura 12:** Quantidade absoluta de *Fn* dado pelo número de cópias de DNA por reação. A) Representação gráfica onde os pontos representam as amostras agrupadas de acordo com resultado de FIT e a linha tracejada a mediana de cópias/reação de todas as amostras *Fn* positivas. B) Tabela descritiva das frequências encontradas de casos *Fn* positivos de acordo com o resultado de FIT. \*Teste de Qui-quadrado.

Após a comparação dos níveis de *Fn* em cópias/reação entre as amostras de FIT negativo e FIT positivo, as amostras foram classificadas em 2 grupos de acordo com a mediana (26 cópias/reação) de cópias/reação de todas as amostras *Fn* positivas, sendo um grupo *Fn*-alto (valores de *Fn* acima da mediana) e *Fn* baixo/negativo (valores de *Fn* abaixo da mediana ou negativos).

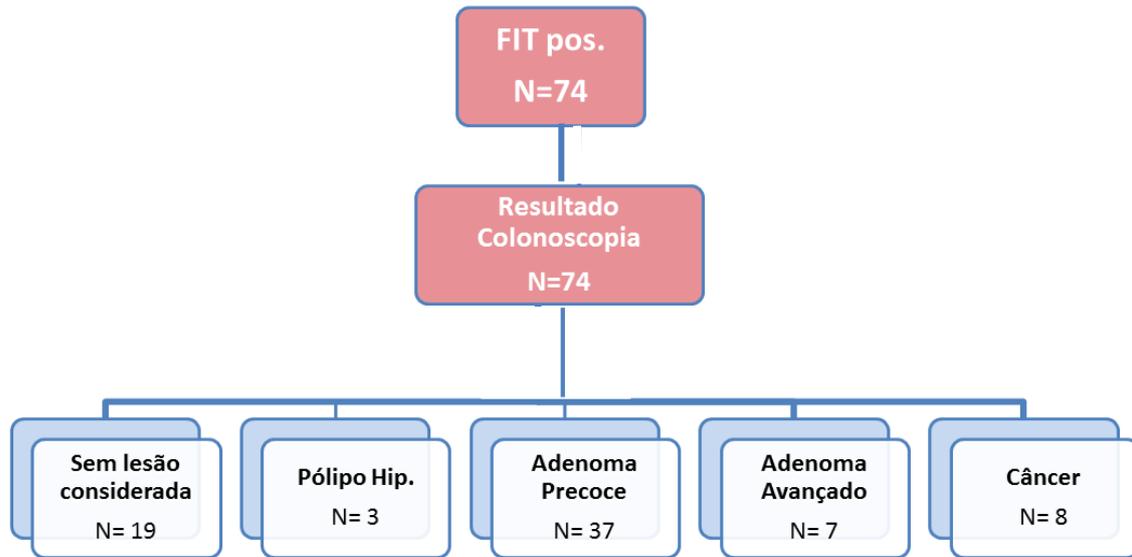
Baseado nesta classificação, dentro dos casos FIT positivos, *Fn*-alto foi detectado em 52,7% (39/74) das amostras e *Fn*-baixo/negativo em 47,3% (35/72). Já nos FIT negativos, *Fn*-alto foi detectado em 14,3% (23/160) das amostras e *Fn*-baixo em 85,7% (137/160) (Figura 12). A mediana do número de cópias de DNA por reação de *Fn* no grupo de FIT negativo foi de 12,0 cópias/reação [Máx. 1842,0 – Mín. 2,8] e de 43 [Máx. 149000,0 – Mín 3,0] no grupo de FIT positivo,  $p < 0,001$  (Figura 13).



**Figura 13:** Fluxograma dos resultados de ddPCR separados em 2 grupos. À esquerda, grupo dos FIT positivos e à direita grupo dos FIT negativos.

### 5.3.3 RESULTADO DA DETECÇÃO DE *Fn* NAS AMOSTRAS DE FIT POSITIVO DOS PACIENTES DE ACORDO COM A PIOR LESÃO ENCONTRADA NA COLONOSCOPIA

Nos casos FIT positivos, as amostras foram posteriormente agrupadas de acordo com a pior lesão encontrada na colonoscopia dos pacientes (Figura 14). Deste grupo, 19 pacientes não tiveram lesões encontradas na colonoscopia, 3 pacientes apresentaram pólipos hiperplásicos, 37 pacientes com adenoma precoce, 7 com adenoma avançado e 8 pacientes com câncer (Figura 14).

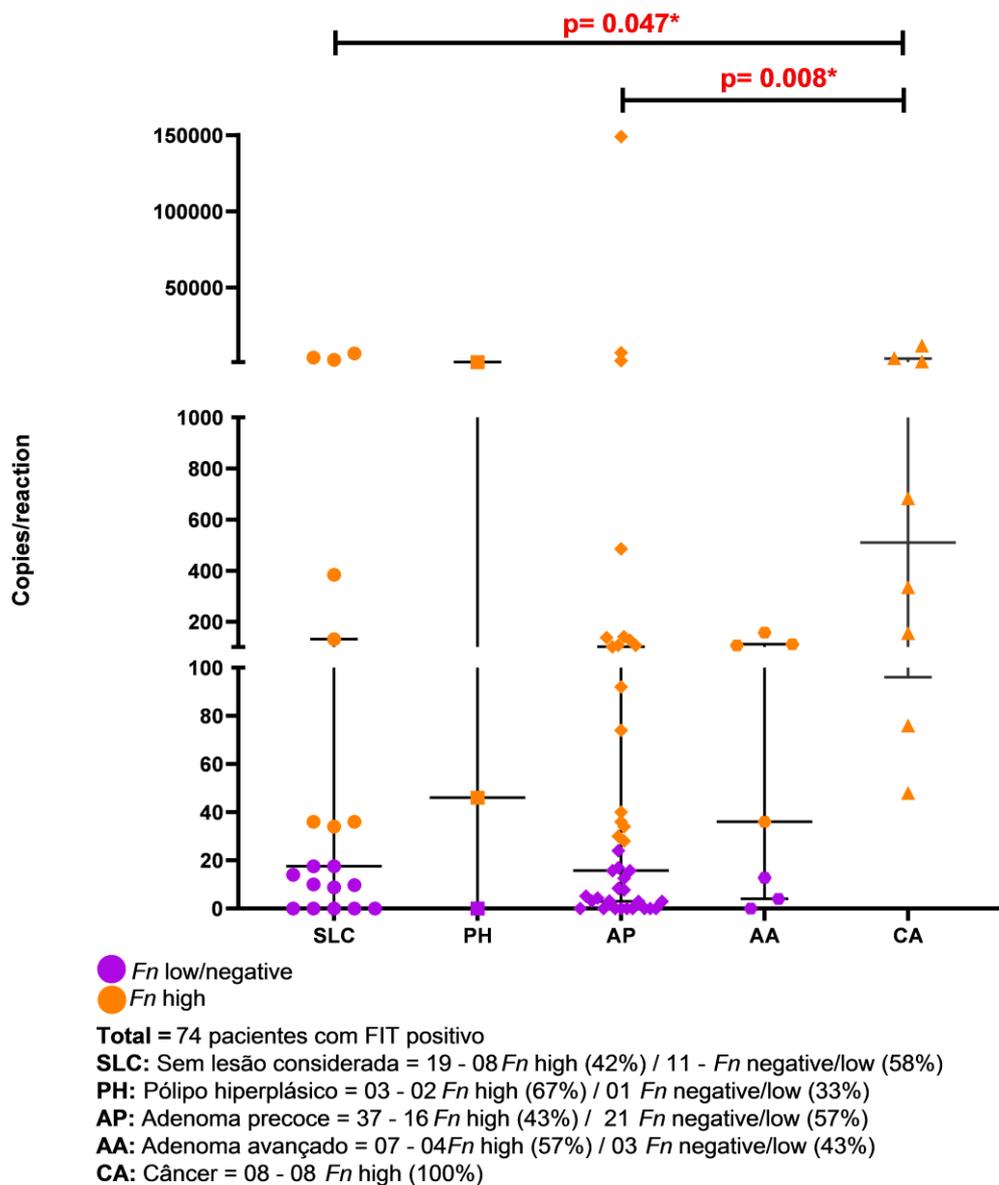


**Figura 14:** Distribuição da pior lesão encontrada na colonoscopia, nos pacientes que obtiveram um resultado positivo no teste de FIT.

Em seguida avaliamos se existe associação entre os níveis de *Fn* e os tipos de lesões encontradas no exame de colonoscopia (Tabela 5 e Figura 15). A mediana do número de cópias de DNA por reação de *Fn* no FIT do grupo dos pacientes sem lesão identificada na colonoscopia foi de 35,0 cópias/reação [Mín. 8,8 - Máx. 6820,0], no grupo que foi identificado pólipos hiperplásicos a mediana de *Fn* no FIT foi de 525,0 cópias/reação [Mín. 46,0 - Máx. 1004,0], no grupo de adenomas precoces a mediana foi de 32,0 cópias/reação [Mín. 3,0 - Máx. 149000,0], no FIT dos adenomas avançados a mediana de cópias/reação de *Fn* foi de 72,0 cópias/reação [Mín. 4,0 - Máx. 158,0] e no grupo onde foi determinada a presença de câncer a mediana de *Fn* no FIT foi de 510,0 cópias/reação [Mín. 48,0 - Máx. 11980,0]. A presença de *Fn*-alto foi significativamente associada aos FIT dos pacientes com câncer quando comparada com pacientes com adenoma precoce ( $p = 0.008$ ) e sem lesão significativa ( $p = 0.047$ ) (Tabela 5) (Figura 15).

**Tabela 5:** Quantidade de cópias/reação de *F. nucleatum* encontrada no FIT de acordo com a pior lesão encontrada na colonoscopia dos pacientes com FIT positivo.

<b>Cópias/reação de <i>Fn</i></b>			
<b>Pior lesão (n)</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
Sem lesão considerada (19)	35,0	8,80	6820,0
Pólipo hiperplásico (03)	525,0	46,0	1004,0
Adenoma precoce (37)	32,0	3,0	149000,0
Adenoma avançado (07)	72,0	4,0	158,0
Câncer (08)	510,0	48,0	11980,0



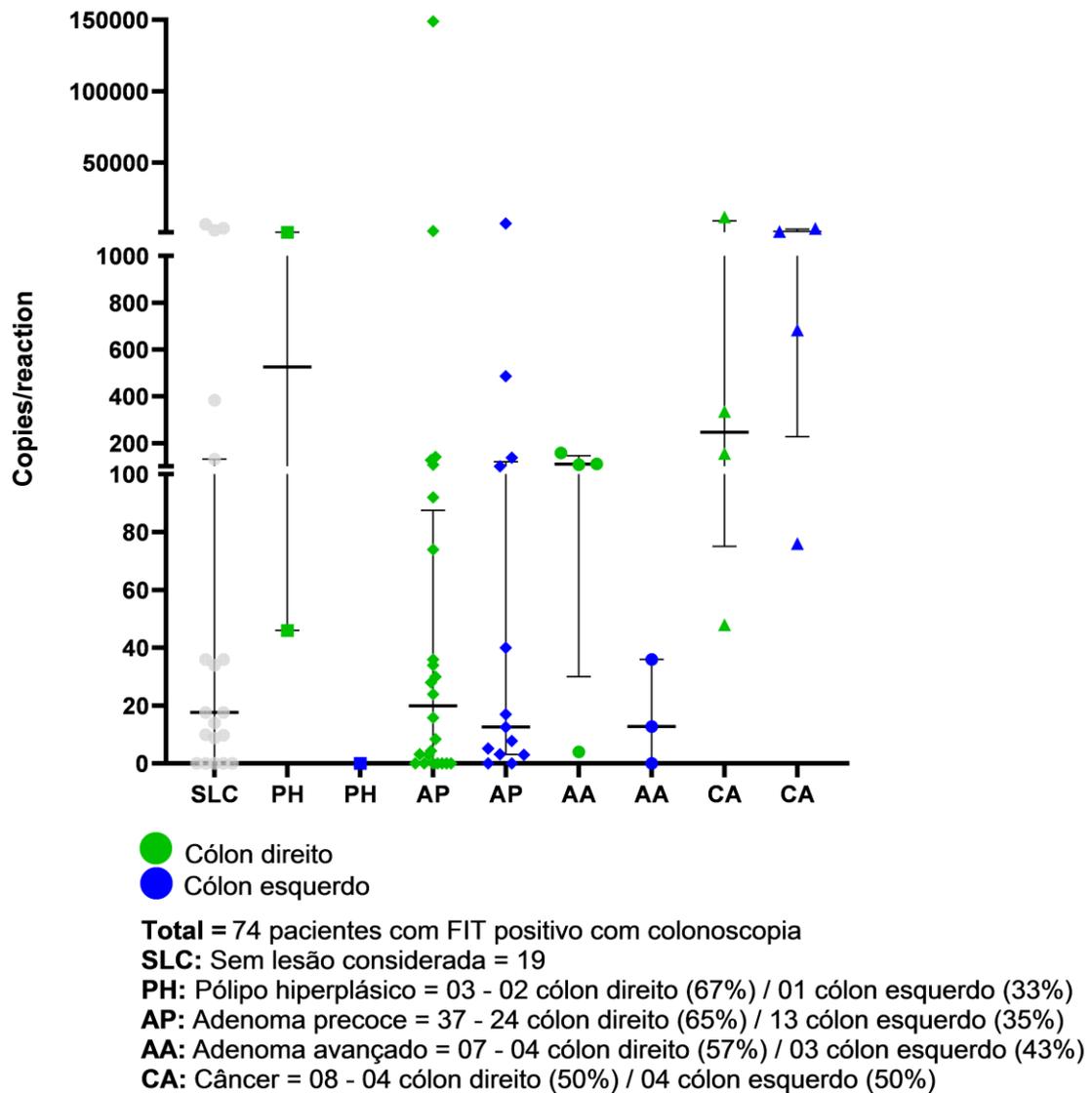
**Figura 15:** Quantidade absoluta de *Fn* no FIT dado pelo número de cópias de DNA por reação de acordo com a pior lesão encontrada na colonoscopia. Os pontos representam as amostras agrupadas de acordo com a pior lesão e as linhas representam a mediana e desvio padrão de cópias/reação. \*Teste de Kruskal-Wallis.

Uma vez que a *Fn* está frequentemente associada à localização da lesão (cólون proximal), foi comparado os níveis de expressão com a localização da pior lesão em cólon direito ou esquerdo (Tabela 6, Figura 16). Dos 3 casos com pólipos hiperplásicos, 33% (1/3) estavam no cólon direito e eram *Fn* negativo no FIT e 67% (2/3) estavam localizados no cólon esquerdo com mediana de cópias por reação de *Fn* no FIT de 526,0 cópias/reação [Mín. 46,0

- Máx. 1004,0]. Dos 37 adenomas precoces, 65% (24/37) estavam localizados no cólon direito com mediana de cópias por reação de *Fn* no FIT de 34 cópias/reação [Mín. 3,0 - Máx. 149000,0 ] e 35% (13/37) estavam no cólon esquerdo com mediana de cópias por reação de *Fn* no FIT de 17 cópias/reação [Mín. 3,0 - Máx. 7320,0]. Dos adenomas avançados, 57% (4/7) estavam no cólon direito com mediana de cópias por reação de *Fn* no FIT de 110,0 cópias/reação [Mín. 4,0 - Máx. 158,0] e 43% (3/7) no cólon esquerdo com mediana de cópias por reação de *Fn* no FIT de 24,4 cópias/reação [Mín. 12,8 - Máx. 36,0]. Finalmente, dos 8 casos com câncer, 50% (4/8) estavam no cólon direito com mediana de cópias por reação de *Fn* no FIT de 246,0 cópias/reação [Mín. 48,0 - Máx. 11980,0] e 50% (4/8) no cólon esquerdo com mediana de cópias por reação de *Fn* no FIT de 1132,0 cópias/reação [Mín. 76,0 - Máx. 3820,0]. De acordo com os resultados não observamos nenhuma associação estatisticamente significativa entre a quantidade de *Fn* no FIT de acordo com a lesão encontrada e a localização entre cólon direito e esquerdo. A tabela 6 resume e a figura 16 representa os resultados obtidos.

**Tabela 6:** Quantidade de cópias/reação de *F. nucleatum* encontrada no FIT de acordo com a localização entre cólon direito e esquerdo da pior lesão encontrada na colonoscopia dos pacientes com FIT positivo.

Pior lesão (n)	Localização (n)	Cópias/reação de <i>Fn</i>		
		Mediana	Mínimo	Máximo
Pólipo hiperplásico (03)	Cólon direito (02)	526,0	46,0	1004,0
	Cólon esquerdo (01)	-	-	-
Adenoma precoce (37)	Cólon direito (24)	34,0	3,0	149000,0
	Cólon esquerdo (13)	17,0	3,0	7320,0
Adenoma avançado (07)	Cólon direito (04)	110,0	4,0	158,0
	Cólon esquerdo (03)	24,40	12,8	36,0
Câncer (08)	Cólon direito (04)	246,0	48,0	11980,0
	Cólon esquerdo (04)	1132,0	76,0	3820,0



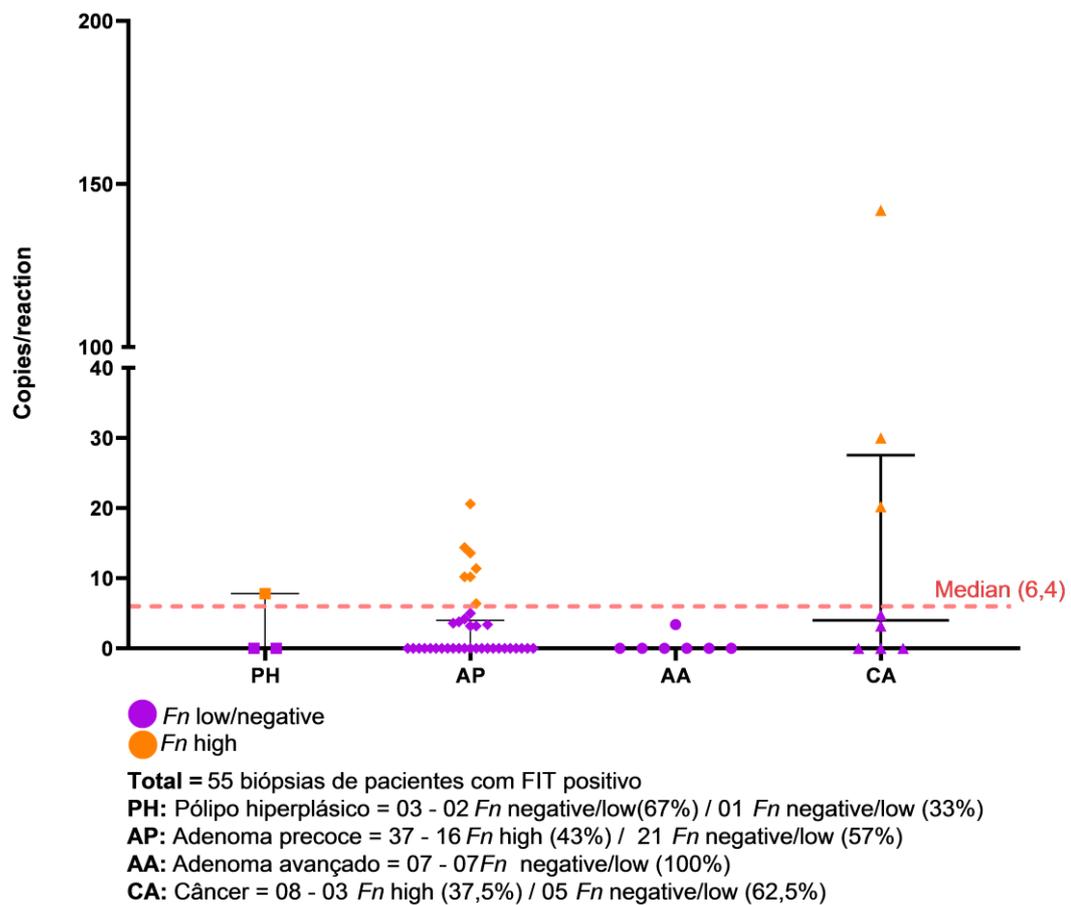
**Figura 16:** Quantidade absoluta de *Fn* no FIT dado pelo número de cópias de DNA por reação distribuída pela pior lesão de acordo com a localização em cólon direito e esquerdo, encontrada na colonoscopia. Os pontos representam as amostras agrupadas de acordo com a pior lesão e localização e as linhas representam a mediana e desvio padrão de cópias/reação do grupo

#### 5.3.4 DETECÇÃO DE *Fn* EM AMOSTRAS DE BIÓPSIA INCLUIDA EM PARAFINA DOS INDIVÍDUOS COM FIT POSITIVO SUBMETIDOS A COLONOSCOPIA

A detecção de *Fn* por ddPCR foi também realizada nas biópsias dos indivíduos participantes do programa de rastreamento de câncer colorretal com FIT positivo submetidos a colonoscopia e biópsia diagnóstica. Das 55 amostras de 74 pacientes que realizaram a colonoscopia, foram identificados 3 casos com pólipos hiperplásicos, 37 adenomas precoces, 7 adenomas avançados e 8 tumores. O resultado de *Fn* avaliados por ddPCR no DNA extraído das biópsias foi dado em *Fn*-alto e *Fn*-baixo/negativo, com base na mediana das cópias/reação de todas as biópsias com *Fn* positivo (mediana de 6,4 cópias/reação), amostras acima da mediana foram determinados como *Fn*-alto e abaixo da mediana como *Fn*-baixo/negativo. Portanto dos 3 pólipos hiperplásicos, 33% (1/3) eram *Fn*-alto com valor de 7,8 cópias/reação e 67% (2/3) *Fn*-baixo/negativo. Dos 37 adenomas precoces, 19% (7/37) eram *Fn*-alto e 81% (30/37) eram *Fn*-baixo/negativo com mediana no número de cópias/reação de *Fn* de 5,7 cópias/reação [Mín. 3,2 - Máx. 20,6]. Dos 7 adenomas avançados, 100% (7/7) eram *Fn*-baixo/negativo com mediana de 3,40 cópias/reação, e dos 8 cânceres, 37,5% (3/8) eram *Fn*-alto e 62,5% (5/8) *Fn*-baixo/negativo com mediana no número de cópias/reação de *Fn* de 20,20 cópias/reação [Mín. 3,2 - Máx. 142,0](Tabela 7) (Figura 17).

**Tabela 7:** Quantidade de cópias/reação de *F. nucleatum* encontrada na biópsia da pior lesão encontrada na colonoscopia dos pacientes com FIT positivo.

de <i>Fn</i>			
Pior lesão	Mediana	Mínimo	Máximo
Pólipo hiperplásico	7,8	7,8	7,8
Adenoma precoce	5,7	3,2	20,6
Adenoma avançado	3,4	3,4	3,4
Câncer	20,20	3,2	142,0

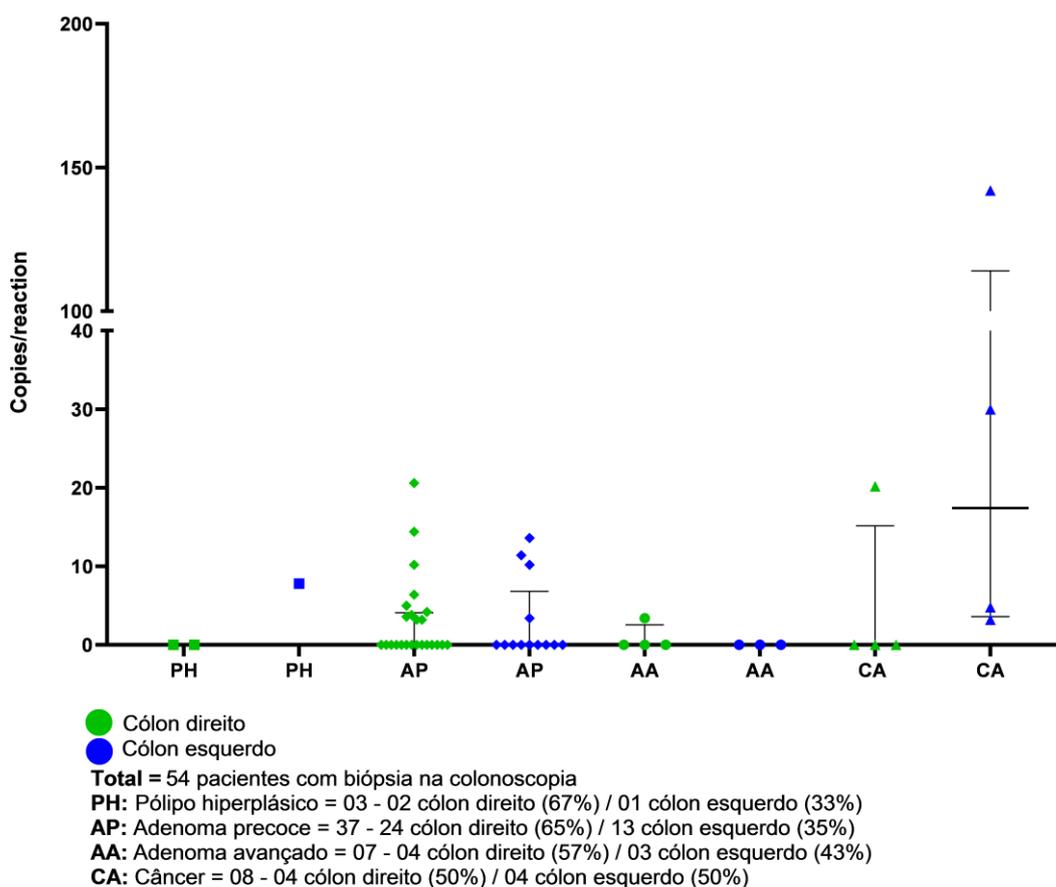


**Figura 17:** Quantidade absoluta de *Fn* na biópsia dado pelo número de cópias de DNA por reação distribuída pela pior lesão encontrada na colonoscopia. Os pontos representam as amostras agrupadas de acordo com a pior lesão e as linhas representam a mediana e desvio padrão de cópias/reação.

Da mesma forma, também foi realizada uma análise comparativa dos resultados de *Fn* na biópsia dos pacientes com FIT positivo de acordo com a localização da pior lesão em cólon direito e esquerdo, dos 3 pólipos hiperplásicos, 67% (2/3) estavam localizados no cólon direito *Fn* negativo na biópsia e 33% (1/3) estavam localizados no cólon esquerdo *Fn* positivo com 7,8 cópias/reação,. Dos 37 adenomas precoces, 65% (24/37) estavam no cólon direito com mediana de cópias/reação de *Fn* nas biópsias de 4,6 cópias/reação [Mín. 3,2 - Máx. 20,6] e 35% (13/37) no cólon esquerdo com mediana 10,8 cópias/reação [Mín. 3,4 - Máx. 13,6]. Dos adenomas avançados, 57% (4/7) estavam no cólon direito e apenas 1 foi *Fn* positivo com 3,4 cópias/reação e 43% (3/7) no cólon esquerdo todos *Fn* negativo na biópsia. E dos 8 cânceres, 50% (4/8) estavam no cólon direito com apenas 1 biópsia *Fn* positivo com 20,20 cópias/reação e 50% (4/8) no cólon esquerdo com mediana de cópias/reação de *Fn* nas biópsias de 17,4 cópias/reação [Mín. 3,2 - Máx. 142,0]. De acordo com os resultados não se obteve nenhum valor de associação estatisticamente significativo entre a quantidade de *Fn* na biópsia de acordo com a lesão encontrada por localização entre cólon direito e esquerdo, a tabela 8 resume e figura 18 representa os resultados.

**Tabela 8:** Quantidade de cópias/reação de *F. nucleatum* encontrada na biópsia da pior lesão de acordo com a localização entre cólon direito e esquerdo encontrada na colonoscopia dos pacientes com FIT positivo

Pior lesão (n)	Localização (n)	Cópias/reação de <i>Fn</i>		
		Mediana	Mínimo	Máximo
Pólipo hiperplásico (03)	Cólon direito (02)	-	-	-
	Cólon esquerdo (01)	7,8	7,8	7,8
Adenoma precoce (37)	Cólon direito (24)	4,6	3,2	20,6
	Cólon esquerdo (13)	10,8	3,4	13,6
Adenoma avançado (07)	Cólon direito (04)	3,4	3,4	3,4
	Cólon esquerdo (03)	-	-	-
Câncer (08)	Cólon direito (04)	20,2	20,2	20,2
	Cólon esquerdo (04)	17,4	3,2	142,0

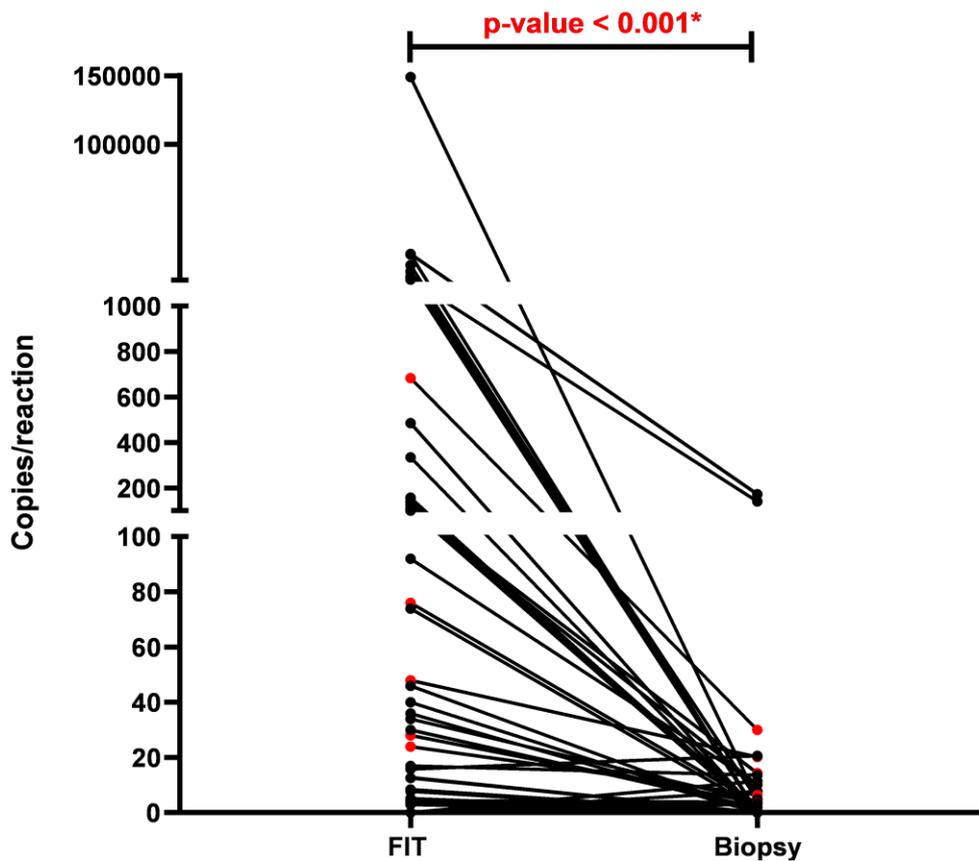


**Figura 18:** Quantidade absoluta de *Fn* na biópsia dos pacientes com FIT positivo, dado pelo número de cópias de DNA por reação distribuída pela localização da pior lesão em cólon direito e esquerdo, encontrada na colonoscopia. Os pontos representam as amostras

agrupadas de acordo com a pior lesão e localização e as linhas representam a mediana e desvio padrão de cópias/reação do grupo.

### 5.3.5 COMPARAÇÃO DOS RESULTADO DA DETECÇÃO DE *Fn* NAS AMOSTRAS DE FIT POSITIVO E DAS BIÓPSIAS E PEÇA CIRURGICA DOS MESMOS PACIENTES.

Na etapa seguinte, foi feita uma comparação dos resultados da quantidade de cópias/reacção de *Fn* no FIT e na biópsia do mesmo paciente, a mediana de cópias por reacção de *Fn* no FIT foi de 26 cópias/reacção [Mín. 2,8 - Máx. 149000,0] e nas biópsias, a mediana foi de 6,4 [Mín. 3,2 - Máx. 142,0]. Podemos observar que a quantidade de *Fn* encontrados no FIT é significativamente maior do que na biópsia do mesmo paciente ( $p < 0,001$ ) (Figura 19).



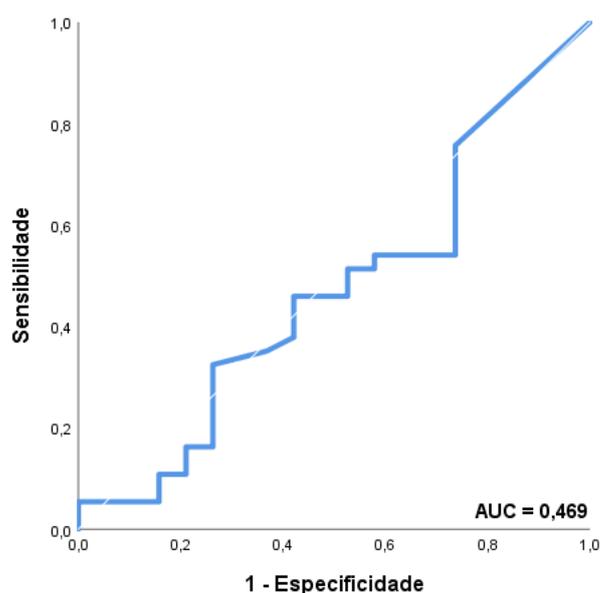
**Figura 19:** Quantidade absoluta em cópias/reacção de *F. nucleatum* encontrada no FIT em comparação com a biópsia do mesmo paciente. Em vermelho estão representados os 8 pacientes diagnosticados com câncer colorretal.\*Teste de Wilcoxon

#### 5.4 PERFORMANCE DE *Fusobacterium nucleatum* NO FIT PARA DETECÇÃO DE LESÕES SIGNIFICANTES DOS PACIENTES COM FIT POSITIVO

Como *Fn* foi identificado estando significativamente aumentado em pacientes com câncer ainda foi examinado o desempenho diagnóstico de *Fn* em um contexto específico de cada grupo de lesão e posteriormente em algumas combinações agrupando as lesões, sempre tendo aqueles pacientes sem lesão considerada como controle.

##### 5.4.1 PERFORMANCE DE *Fusobacterium nucleatum* NO FIT PARA DETECÇÃO DE ADENOMA PRECOCE

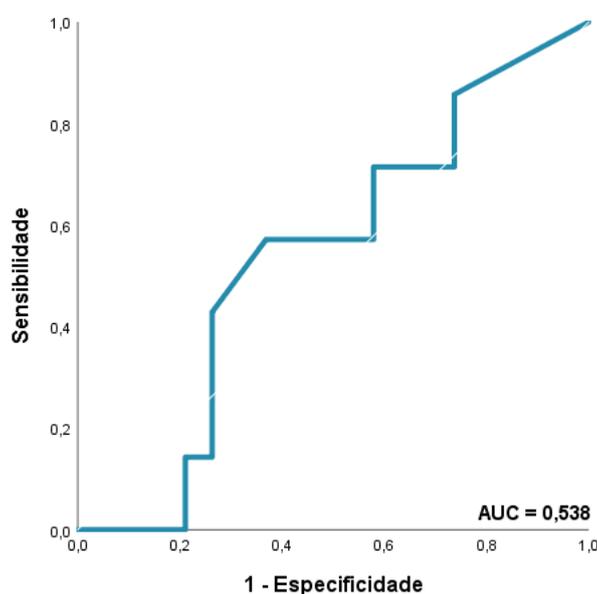
Em relação aos 37 pacientes diagnosticados com adenoma precoce, quando considerado qualquer nível de número de cópias de *Fn*-DNA acima do LoD como positivo, o valor de AUC foi de 0,469 [intervalo de confiança (IC) de 95% 0,306–0,632; Figura 20] para detecção de adenoma precoce. Quando foi calculado o ponto de corte para cálculo de sensibilidade e especificidade, o ponto de corte na curva foi de 7070,0 cópias/reação, dando uma sensibilidade de 54,0% e especificidade de 26,0%



**Figura 20:** Curva ROC (Receiver operator characteristic) para avaliar a precisão discriminatória de *Fn* na detecção de adenoma precoce vs sem lesão considerada.

#### 5.4.2 PERFORMANCE DE *Fusobacterium nucleatum* NO FIT PARA DETECÇÃO DE ADENOMA AVANÇADO

Foram diagnosticados 7 pacientes com adenoma avançado, quando considerado qualquer nível de número de cópias de *Fn*-DNA acima do LoD como positivo, o valor de AUC foi de 0,538 [intervalo de confiança (IC) de 95% 0,295–0,780; Figura 21] para detecção de adenoma avançado. Quando calculado o ponto de corte para cálculo de sensibilidade e especificidade, o ponto de corte na curva foi de 35,0 cópias/reação, dando uma sensibilidade de 57,0% e especificidade de 63,0%.

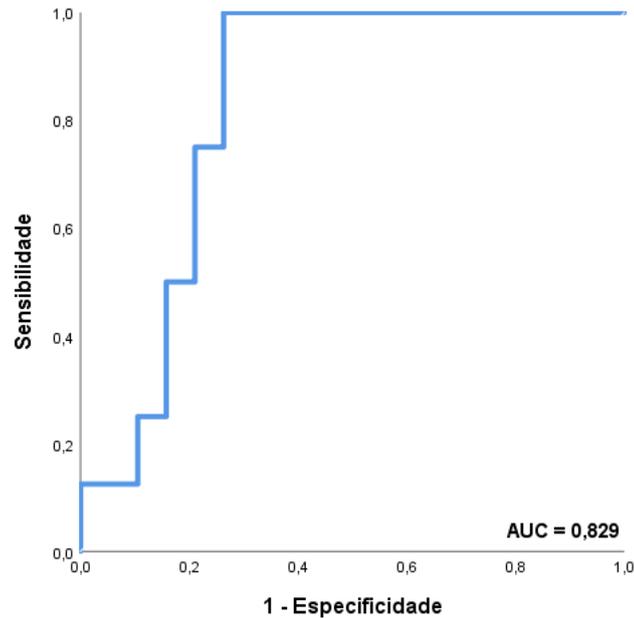


**Figura 21:** Curva ROC (Receiver operator characteristic) para avaliar a precisão discriminatória de *Fn* na detecção de adenoma avançado vs sem lesão considerada.

#### 5.4.3 PERFORMANCE DE *Fusobacterium nucleatum* NO FIT PARA DETECÇÃO DE CÂNCER

Foram diagnosticados 8 pacientes com câncer, quando considerado qualquer nível de número de cópias de *Fn*-DNA acima do LoD como positivo, o valor de AUC foi de 0,829 [intervalo de confiança (IC) de 95% 0,679–0,983; Figura 22] para detecção de câncer. Quando se calculou o ponto de corte para cálculo de sensibilidade e especificidade, o ponto de corte na curva foi de 42,0 cópias/reação, dando uma sensibilidade de 100% e especificidade de 73,7%. Baseado nos resultados encontrados foi calculado o valor preditivo

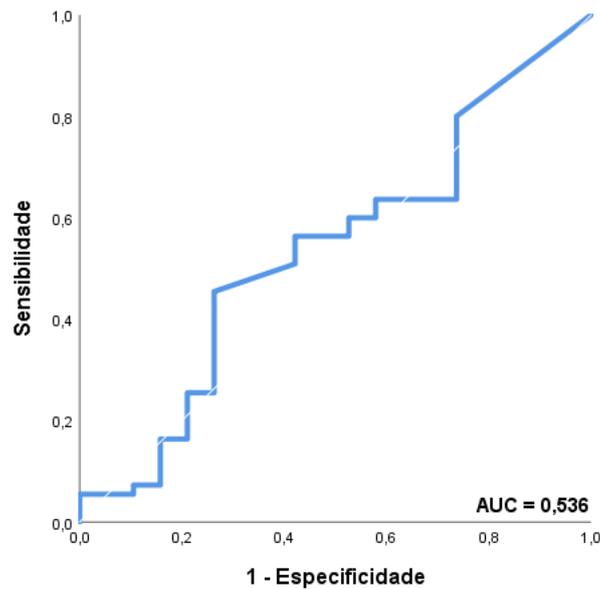
positivo que foi de 61,53% e o valor preditivo negativo de 100%, com uma acurácia de 81,48%.



**Figura 22:** Curva ROC (Receiver operator characteristic) para avaliar a precisão discriminatória de *Fn* na detecção de câncer vs sem lesão considerada.

#### 5.4.4 PERFORMANCE DE *Fusobacterium nucleatum* NO FIT PARA DETECÇÃO DE QUALQUER LESÃO SIGNIFICATIVA

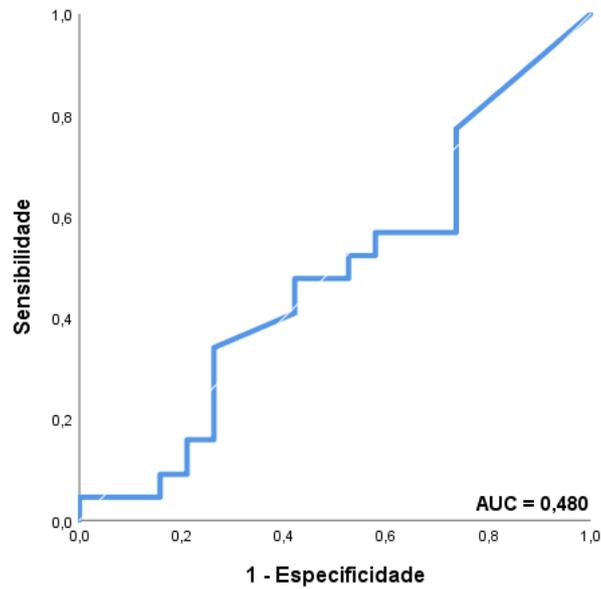
Foram diagnosticados 55 pacientes com alguma lesão significativa: 37 tinham adenomas precoces, 7 adenomas avançados e 8 cânceres. Quando considerado qualquer nível de número de cópias de *Fn*-DNA acima do LoD como positivo, o valor de AUC foi de 0,536 [intervalo de confiança (IC) de 95% 0,383–0,689; Figura 23] para detecção de qualquer lesão significativa. Quando calculado o ponto de corte para cálculo de sensibilidade e especificidade, o ponto de corte na curva foi de 38,0 cópias/reação, dando uma sensibilidade de 45,5% e especificidade de 73,7%.



**Figura 23:** Curva ROC (Receiver operator characteristic) para avaliar a precisão discriminatória de *Fn* na detecção qualquer lesão significativa vs sem lesão considerada.

#### 5.4.5 PERFORMANCE DE *Fusobacterium nucleatum* NO FIT PARA DETECÇÃO DE QUALQUER ADENOMA

Foram diagnosticados 44 pacientes com alguma lesão definida como adenoma: 37 adenomas precoces e 7 adenomas avançados. Quando considerado qualquer nível de número de cópias de *Fn*-DNA acima do LoD como positivo, o valor de AUC foi de 0,480 [intervalo de confiança (IC) de 95% 0,320–0,640; Figura 24] para detecção de qualquer adenoma. Quando calculado o ponto de corte para cálculo de sensibilidade e especificidade, o ponto de corte na curva foi de 8,6 cópias/reação, dando uma sensibilidade de 56,8% e especificidade de 26,3%.



**Figura 24:** Curva ROC (Receiver operator characteristic) para avaliar a precisão discriminatória de *Fn* na detecção qualquer adenoma vs sem lesão considerada.

Baseado nas informações encontradas podemos verificar que a performance do teste de detecção de *Fn* em amostras de FIT é melhor para detectar câncer, com AUC de 0,829 (IC: 0,679-0,983), sensibilidade de 100% e especificidade de 73,7% quando comparado com as outras lesões. O valor preditivo positivo observado foi de 61,53% e o valor preditivo negativo de 100%, com uma acurácia de 81,48%.

**Tabela 9:** Comparação das curvas ROC para detecção de lesões significativas de acordo com o tipo de lesão encontrada na colonoscopia dos pacientes com FIT positivo.

Variáveis	AP	AA	CA	LS	AP+AA
<b>AUC</b>	0,469	0,538	0,829	0,536	0,480
<b>95% IC</b>	0,306–0,632	0,295–0,780	0,679–0,983	0,383–0,689	0,320–0,640
<b>Sensibilidade</b>	54,0%	57%%	100%	45,5%	56,8%
<b>Especificidade</b>	26,0%	63,0%.	73,7%.	73,7%.	26,3%.

AP: Adenoma precoce; AA: Adenoma avançado; CA: câncer; LS: lesões significativas; AUC: área sob a curva e IC: intervalo de confiança

## 6. DISCUSSÃO

O CCR é a segunda causa de morte relacionada ao câncer em todo o mundo e sua incidência está aumentando, principalmente em indivíduos com menos de 50 anos <sup>58, 59</sup>. Com base nestas informações, novas opções de rastreamento, diagnóstico e tratamento são necessárias <sup>60</sup>. A identificação de biomarcadores que possam com precisão identificar indivíduos em risco de desenvolvimento de lesões precursoras ou câncer, principalmente em estágios iniciais é extremamente importante para aumentar as chances de detecção precoce e sucesso do tratamento, melhorando assim as taxas de sobrevida <sup>61</sup>.

Evidências cumulativas tem demonstrado o papel do microbioma humano na patogênese de várias neoplasias, incluindo o CCR <sup>62-66</sup>. Estudos que demonstram a presença e os níveis de DNA de *F. nucleatum* em tecido tumoral e até mesmo em amostras de fezes levantaram sua possível aplicação na clínica, como um biomarcador valioso para diagnóstico, prognóstico e manejo no tratamento de CCR <sup>6, 67</sup>.

O presente estudo objetivou avaliar a acurácia da detecção de *Fn* por ddPCR em biópsia líquida e tecido incluído em parafina de indivíduos com lesões precursoras ou CCR e sua utilidade para rastreamento e determinação de prognóstico de CCR.

Primeiramente foi realizada a otimização de uma metodologia baseada em ddPCR para detectar e quantificar *Fn* no tecido tumoral de CCR em FFPE. O método de ddPCR como uma nova tecnologia que baseada no particionamento do DNA alvo em milhares de gotículas e com múltiplas amplificações de PCR independentes acontecendo fornece como vantagem uma detecção absoluta do número de cópias genômicas e quantificação precisa do DNA alvo, sendo possível a detecção de alvos raros ou com baixo números de cópias <sup>68</sup>.

Para a otimização e posterior implementação de um método baseado em ddPCR para detectar *Fn* em tecido tumoral de CCR em FFPE, foi essencial caracterizar o desempenho analítico deste ensaio para compreender sua capacidade de detecção e as suas limitações <sup>57</sup>. LoB e LoD são necessários para a discriminar entre a presença ou ausência do alvo <sup>57</sup>. Com os resultados foi definido o LoD utilizado para este ensaio, portanto para que fosse considerada uma amostras *Fn* positiva, a amostra precisou ter uma quantidade igual ou superior a 2,7 cópias / reação. Assim identificamos 20% dos casos de CCR com uma quantidade elevada de *Fn* (*Fn*-alto), enquanto apenas 2,9% dos casos eram *Fn*-alto quando detectado por qPCR. *Fn*-alto no tecido tumoral foi associado a características previamente

conhecidas de casos CCR com *Fn* positivo, como a localização proximal, tumores pouco diferenciados, MSI-alto e pacientes com mutação no gene *BRAF*<sup>24</sup>.

O uso de tecido em FFPE para detecção de microrganismos é desafiador e sua precisão depende muito da metodologia utilizada<sup>69</sup>. Sabe-se que em tecido fixado em formalina ocorre a fragmentação / degradação do DNA genômico ao longo do tempo, diminuindo ainda mais a sensibilidade de identificação de organismos como bactérias por técnicas baseadas em PCR<sup>33</sup>. No entanto, o tecido em FFPE é frequentemente o único material disponível. A principal técnica utilizada atualmente para a detecção de *Fn* tem sido qPCR, mas nosso grupo de estudo e outros grupos de diferentes regiões, tem relatado as limitações desta metodologia para tecidos em FFPE<sup>6, 24, 25, 32, 70, 71</sup>. Para contornar essa limitação, outras metodologias, como ddPCR, foram desenvolvidas. ddPCR é uma técnica de quantificação *end-point* que permite a contagem direta e absoluta do número de cópias por reação do alvo pretendido, sem a necessidade de curvas padrão, levando a maior precisão e reprodutibilidade<sup>72</sup>. O ensaio de ddPCR também tem menor influência da presença de inibidores de PCR que se ligam ao DNA, tornando o alvo indisponível para amplificação, ou interferindo na DNA polimerase, reduzindo a eficiência da amplificação da PCR; ambas as ações subestimam os valores dados como resultado ao utilizar qPCR<sup>41, 73</sup>. Além disso, o ddPCR sendo um ensaio com resultado *end-point* é menos afetado pela eficiência da amplificação durante o processo, impedindo que o sinal de fluorescência fique abaixo do limite determinado<sup>73, 74</sup>. Os resultados das reações de PCR indicam que ddPCR pode ser vantajoso em comparação ao qPCR lidando com amostras complexas, como material degradado (FFPE)<sup>73, 74</sup>.

No presente estudo, a detecção de *Fn* por ddPCR em tecido de CCR em FFPE teve uma prevalência semelhante de resultados *Fn* positivos (28/139; 20,1%) aos resultados da detecção em tecido congelado realizado por qPCR (34/139; 24,4%)<sup>24</sup>. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores que utilizaram tecido de CCR congelado e que relataram frequências de positividade de *Fn* variando entre 8,6% e 87,1%<sup>17, 24, 25, 32, 75-78</sup>.

Foi observado que a maior presença de *Fn* intratumoral detectado por ddPCR no tecido em FFPE foi associada a várias características clínicas e moleculares do CCR, como localização proximal do tumor, tumores mais invasivos, pouco diferenciados, com status de MSI-positivo, com mutação em *BRAF*, e com a perda de proteínas MMR. Esses resultados

concordam com os achados de estudos anteriores realizados em outras populações, sugerindo que a presença de *Fn* fosse relacionada com um subtipo de CCR mais agressivo e que apresenta um pior prognóstico dos pacientes<sup>6, 25, 30, 75, 79-81</sup>.

Também se pode verificar que os pacientes com uma quantidade elevada de DNA de *Fn* detectado por ddPCR no tecido parafinado tiveram uma sobrevida global menor do que pacientes com uma quantidade baixa / negativa de DNA de *Fn*, a mesma tendência observada em estudos anteriores<sup>6, 25, 30, 75, 79-81</sup>. No entanto, com os resultados obtidos por qPCR, foi demonstrado que os pacientes com uma quantidade baixa / negativa de DNA de *Fn* tiveram sobrevida global mais curta, e isso mostra o oposto de outros estudos<sup>17, 24, 25, 75-77, 79</sup>, uma possível explicação se deve à baixa detecção de *Fn*-alto (4/139; 2,9%) realizada por qPCR. Além disso, o teste de Cohen's Kappa demonstrou ausência de correlação entre os resultados de qPCR e ddPCR (Choen's Kappa = 0,210).

Existe uma alta demanda para validar a presença de determinadas bactérias como *Fn* para biomarcadores de desenvolvimento e progressão de CCR e investigar seus valores de aplicação clínica por métodos de quantificação que sejam simples e econômicos, como ddPCR<sup>82</sup>. Nosso estudo também definiu a curva ROC e o valor de AUC para analisar a *performance* da detecção de *Fn* em tecido de CCR em FFPE por ddPCR. O valor de AUC foi de 0,779 [intervalo de confiança de 95% (IC) 0,678–0,879] com sensibilidade de 70,6% e especificidade de 80,0%, e valor preditivo positivo de 53,3%, valor preditivo negativo de 89,4% com acurácia de 77,7%.

Atualmente, as principais desvantagens do uso da ddPCR são os custos ainda maiores do que o qPCR, a falta de métodos padronizados e o número limitado de laboratórios equipados com os instrumentos necessários<sup>83</sup>. No entanto, algumas aplicações para as quais a ddPCR têm desempenho superior do que qPCR deve ser considerado para alguns ensaios que requerem alta precisão para medição de carga bacteriana<sup>84</sup>.

Além das possíveis aplicações descritas, como um indicador de prognóstico, o presente trabalho também objetivou o desenvolvimento de uma metodologia mais sensível para detecção de *Fn* explorando o seu papel no rastreamento e detecção precoce de CCR.

A quantificação de DNA de *Fn* em fezes pode servir como um biomarcador promissor para detecção de CCR ou de indivíduos com lesões pré-malignas como adenomas<sup>56</sup>. Neste contexto, amostras de material fecal coletadas de participantes do rastreamento do câncer

colorretal com FIT (teste imunoquímico de sangue oculto nas fezes) anual podem ser utilizadas para monitorar mudanças na microbiota, tornando possível detectar um maior risco de presença de lesões colorretais potencialmente malignas <sup>54</sup> Como o FIT é amplamente utilizado para rastreamento de CCR, e testes moleculares baseados em fezes têm excelentes perspectivas como uma futura ferramenta de triagem para aumentar a detecção de CCR e lesões precursoras, estudos futuros podem validar métodos de rastreamento baseados em organismos componentes da microbiota como *Fusobacterium nucleatum* no câncer colorretal <sup>85, 86</sup>

Suehiro e colaboradores, demonstraram que a quantidade de DNA de *Fn* no FIT foi significativamente maior no grupo de 11 pacientes com adenomas não avançados, no grupo de 19 pacientes com adenomas avançados / carcinoma in situ e no grupo de 158 pacientes com câncer colorretal, em comparação com a análise nas fezes provenientes do FIT do grupo de 60 participantes considerados saudáveis, evidenciando o potencial do teste de quantificação de DNA de *Fn* nas fezes por ddPCR para detectar indivíduos com tumores colorretais e lesões pré malignas em uma população japonesa <sup>56</sup>.

Em nossa população também conseguimos demonstrar que a quantidade de DNA de *Fn* foi significativamente maior nas fezes do grupo de pacientes com câncer colorretal em comparação com adenomas precoces e em comparação com pacientes sem lesão considerada encontrada na colonoscopia. Observações semelhantes foram relatadas em amostras de fezes de outras populações, sugerindo a detecção de *Fn* como um potencial biomarcador não invasivo para rastreamento de CCR e lesões pré-malignas em indivíduos assintomáticos. Nove estudos que fizeram a análise e detecção de *Fn* totalizaram 863 pacientes com CCR, 238 pacientes com lesões pré-malignas e 608 controles (participantes considerados saudáveis) onde demonstraram níveis elevados de *Fn* nas fezes de pacientes com CCR e lesões pré-malignas quando comparado com os controles <sup>6, 56, 76, 87-92</sup>. Em um destes estudos citados anteriormente, Liu e colaboradores além de encontrarem níveis mais elevados de DNA de *Fn* nas fezes de pacientes com CCR do que indivíduos saudáveis, também observaram níveis plasmáticos aumentados de biomarcadores de disfunção da barreira muscular intestinal, sugerindo seu potencial para monitorar o desenvolvimento e progressão do CCR <sup>91</sup>.

Em nosso estudo também se avaliou os níveis e a presença de *Fn* no tecido da biópsia realizada por colonoscopia dos pacientes com resultado de FIT positivo. Das 55 amostras de 74 pacientes que realizaram a colonoscopia, foram avaliadas 37 adenomas precoces, 7 adenomas avançados e 8 tumores colorretais. O resultado mostrou que apesar do número de casos de câncer ser menor comparado as outras lesões, a mediana no número de cópias/reação de *Fn* foi maior (20,20 cópias/reação) do que dos adenomas precoces (5,7 cópias/reação) e dos adenomas avançados (3,40 cópias/reação). Baseado nos nestes resultados encontrados, buscando na literatura foi encontrado seis estudos que avaliaram lesões pré-malignas de um total de 624 pacientes e que sugerem *Fn* como um biomarcador promissor para o risco de desenvolvimento de CCR, uma vez que altos níveis de *Fn* foram relatados de forma consistente em adenomas quando comparados a indivíduos considerados saudáveis<sup>56, 76, 78, 80, 87, 92</sup>. Ito e colaboradores investigou a presença de *Fn* em lesões colorretais pré-malignas e CCR e encontrou níveis crescentes de *Fn* de lesões pré-malignas a tecido de CCR<sup>80</sup>.

Além disto, nosso estudo também demonstrou que existe uma frequência significativamente maior de DNA de *Fn* no material fecal do que nas biópsias dos mesmos pacientes quando comparados. Em conjunto, esses resultados indicam que a quantificação de *Fn* nas fezes pode ter um impacto maior no diagnóstico, servindo como novos biomarcadores diagnósticos não invasivos para CCR<sup>61, 90</sup>.

Com relação a *performance* diagnóstica da utilização de *Fn* obteve se resultados melhores de acurácia para detecção de CCR. Partindo do princípio de que o teste imunológico fecal é recomendado como um teste de triagem não invasivo; no entanto, mostra baixa sensibilidade para adenoma avançado<sup>93</sup>.

Nossos resultados mostraram um valor de AUC de 0,829 para detecção de CCR, possibilitando uma sensibilidade de 100% e especificidade de 73,7%. Baseado nos resultados encontrados foi calculado um valor preditivo positivo de 61,53% e um valor preditivo negativo de 100%, com uma acurácia de 81,48%. O estudo de Suehiro e colaboradores reportou um valor de AUC de 0,75, resultando em uma sensibilidade de 54% e especificidade de 90%, com valor preditivo positivo de 93% e preditivo negativo de 42%, não descrevendo o valor de acurácia<sup>56</sup>. Com relação as lesões pré-malignas avaliadas, nosso estudo mostrou um valor de AUC para diagnóstico de adenomas avançados de 0,53 com a sensibilidade 57,0% e

sensibilidade de 63,0%. Wong e colaboradores detectando *Fn* por qPCR em fezes, forneceu com valor de AUC de 0,59 uma sensibilidade de 32,7% e especificidade de 87,0% para adenoma avançado. Já para CCR um AUC de 0,83 uma sensibilidade de 72,1% e uma especificidade de 91,0%<sup>94</sup>. Em um outro estudo Liang e colaboradores através da detecção de *Fn* em fezes por qPCR, demonstraram um valor de AUC para *Fn* na detecção de CCR de 0,86 com uma sensibilidade de 77,8% e especificidade de 78,5% com acurácia de 78,2%. Já para adenomas (precoce e avançado juntos) um valor de AUC de 0,62, com sensibilidade de 33,8% e especificidade de 78,5%<sup>95</sup>.

Wong e colaboradores, além de mostrar uma abundância significativamente maior de *Fn* em amostras fecais de pacientes com CCR ou adenoma avançado do que no grupo de controle, também mostraram que a combinação da positividade de *Fn* com resultados de FIT aumentou significativamente a sensibilidade para adenomas avançados e detecção de CRC<sup>94</sup>. Guo e colaboradores mostraram que *Fn* pode desempenhar um papel na disbiose da microbiota, secretando substâncias contra bactérias probióticas, e descobriram que a proporção alterada de *Fn* para bactérias probióticas importantes foi identificada como um biomarcador valioso para a triagem, aumentando sensibilidade e especificidade para detecção precoce de CCR<sup>89</sup>. Além disso, Grobbee e colaboradores encontraram níveis elevados de *Fn* de pacientes com CCR e aqueles com lesões de displasia de alto grau, do que aqueles que tinham uma mucosa normal sob exame de colonoscopia<sup>90</sup>.

Nosso estudo demonstra o potencial uso de *Fn* ser um biomarcador de rastreamento e diagnóstico precoce de CCR. Encontramos também uma quantidade relativamente grande de *Fn* nas fezes de indivíduos que não tinham lesões significativas durante a colonoscopia e também nas fezes de pacientes com FIT negativo que não foram submetidos a colonoscopia, portanto, não podemos excluir a possibilidade de desenvolvimento CCR no futuro e isto também foi reportado em um estudo parecido de Suehiro e colaboradores<sup>56</sup>. Um limitante de nosso estudo foi que não foi possível a reconvocação destes pacientes FIT negativos para reavaliação tanto de novos FITs como de possíveis colonoscopias. Também como apenas sujeitos FIT-positivos são encaminhados para colonoscopia, não foi possível avaliar indicadores de desempenho diagnóstico combinando *Fn* e FIT para detecção de lesões pré-malignas ou até mesmo câncer, incluindo sensibilidade, especificidade e curva AUC. No entanto, considerando a análise de apenas FITs positivos se justificam, pois no final, esta é o

população para a qual biomarcadores seriam benéficos evitando colonoscopia de triagem desnecessária.

## **7. CONCLUSÃO**

Em conclusão, o presente trabalho mostra a viabilidade de detecção de *F. nucleatum* intratumoral utilizando a técnica de droplet digital PCR. Nossos resultados também destacam a relevância clínica da detecção de *Fn* intratumoral de CCR em FFPE em um cenário de rotina. Onde pudemos sustentar os achados já pré-estabelecidos em estudos anteriores utilizando tecido congelado da associação de *Fn* com tumores com características mais agressivas e que apresentam pior prognóstico para o paciente com CCR. Avaliamos também um teste de detecção de DNA de *Fn* em fezes e descobrimos que o nível de *Fn* nas fezes era significativamente mais alto em pacientes com tumores colorretais do que no grupo de pacientes com adenomas precoces e sem lesão significativa. Como este estudo sugere que o teste de *Fn* nas fezes pode ser útil para o rastreamento e detecção precoce de indivíduos com tumores colorretais. Futuros estudos que empreguem um número maior de participantes são necessários para ampliar e corroborar nossos achados na população Brasileira.

## 8. REFERÊNCIAS

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL. *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. 2021;71(3):209-49.
2. Arnold M, Abnet CC, Neale RE, Vignat J, Giovannucci EL, McGlynn KA, et al. *Global Burden of 5 Major Types of Gastrointestinal Cancer*. **Gastroenterology**. 2020;159(1):335-49.e15.
3. Estimativa I. *Estimativa 2020/Incidência de Câncer no Brasil*. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. 2020. . 2020.
4. Ponnusamy K, Choi JN, Kim J, Lee S-Y, Lee CH. *Microbial community and metabolomic comparison of irritable bowel syndrome faeces*. **Journal of medical microbiology**. 2011;60(6):817-27.
5. Dickinson BT, Kisiel J, Ahlquist DA, Grady WM. *Molecular markers for colorectal cancer screening*. **Gut**. 2015;64(9):1485-94.
6. Datorre JG, de Carvalho AC, Guimarães DP, Reis RM. *The Role of Fusobacterium nucleatum in Colorectal Carcinogenesis*. **Pathobiology**. 2021;88(2):127-40.
7. Sveen A, Bruun J, Eide PW, Eilertsen IA, Ramirez L, Murumagi A, et al. *Colorectal Cancer Consensus Molecular Subtypes Translated to Preclinical Models Uncover Potentially Targetable Cancer Cell Dependencies*. **Clin Cancer Res**. 2018;24(4):794-806.
8. Cancer Genome Atlas N. *Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer*. **Nature**. 2012;487(7407):330-7.
9. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. *The consensus molecular subtypes of colorectal cancer*. 2015;21(11):1350-6.
10. dos Santos W, Sobanski T, de Carvalho AC, Evangelista AF, Matsushita M, Berardinelli GN, et al. *Mutation profiling of cancer drivers in Brazilian colorectal cancer*. **Scientific Reports**. 2019;9(1):13687.
11. Yamane LS, Scapulatempo-Neto C, Alvarenga L, Oliveira CZ, Berardinelli GN, Almodova E, et al. *KRAS and BRAF mutations and MSI status in precursor lesions of colorectal cancer detected by colonoscopy*. **Oncol Rep**. 2014;32(4):1419-26.
12. Berardinelli GN, Scapulatempo-Neto C, Durães R, Antônio de Oliveira M, Guimarães D, Reis RM. *Advantage of HSP110 (T17) marker inclusion for microsatellite instability (MSI) detection in colorectal cancer patients*. **Oncotarget**. 2018;9(47):28691-701.

13. Araujo LH, Souza BM, Leite LR, Parma SAF, Lopes NP, Malta FSV, et al. *Molecular profile of KRAS G12C-mutant colorectal and non-small-cell lung cancer*. **BMC Cancer**. 2021;21(1):193.
14. Chen GY. *The role of the gut microbiome in colorectal cancer*. **Clinics in colon and rectal surgery**. 2018;31(03):192-8.
15. Cani PD, Jordan BF. *Gut microbiota-mediated inflammation in obesity: a link with gastrointestinal cancer*. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**. 2018;15(11):671-82.
16. Signat B, Roques C, Poulet P, Duffaut D. *Fusobacterium nucleatum in periodontal health and disease*. **Curr Issues Mol Biol**. 2011;13(2):25-36.
17. Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, Dreolini L, Krzywinski M, Strauss J, et al. *Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma*. **Genome research**. 2012;22(2):299-306.
18. Marchesi JR, Dutilh BE, Hall N, Peters WH, Roelofs R, Boleij A, et al. *Towards the human colorectal cancer microbiome*. **PLoS One**. 2011;6(5):e20447.
19. Pevsner-Fischer M, Tuganbaev T, Meijer M, Zhang SH, Zeng ZR, Chen MH, et al. *Role of the microbiome in non-gastrointestinal cancers*. **World J Clin Oncol**. 2016;7(2):200-13.
20. Feng Q, Liang S, Jia H, Stadlmayr A, Tang L, Lan Z, et al. *Gut microbiome development along the colorectal adenoma-carcinoma sequence*. **Nat Commun**. 2015;6:6528.
21. Nakatsu G, Li X, Zhou H, Sheng J, Wong SH, Wu WK, et al. *Gut mucosal microbiome across stages of colorectal carcinogenesis*. **Nat Commun**. 2015;6:8727.
22. Tilg H, Adolph TE, Gerner RR, Moschen AR. *The Intestinal Microbiota in Colorectal Cancer*. **Cancer Cell**. 2018;33(6):954-64.
23. Koliarakis I, Psaroulaki A, Nikolouzakakis TK, M NS, Goulielmos G, Androutsopoulos VP, et al. *Intestinal microbiota and colorectal cancer: a new aspect of research*. **J BUON**. 2018;23(5):1216-34.
24. de Carvalho AC, de Mattos Pereira L, Datorre JG, dos Santos W, Berardinelli GN, Matsushita MdM, et al. *Microbiota Profile and Impact of Fusobacterium nucleatum in Colorectal Cancer Patients of Barretos Cancer Hospital*. **Frontiers in Oncology**. 2019;9(813).
25. Mima K, Sukawa Y, Nishihara R, Qian ZR, Yamauchi M, Inamura K, et al. *Fusobacterium nucleatum and T cells in colorectal carcinoma*. **JAMA oncology**. 2015;1(5):653-61.

26. Casasanta MA, Yoo CC. *Fusobacterium nucleatum* host-cell binding and invasion induces IL-8 and CXCL1 secretion that drives colorectal cancer cell migration. 2020;13(641).
27. Sears CL, Garrett WS. *Microbes, microbiota, and colon cancer*. **Cell Host Microbe**. 2014;15(3):317-28.
28. McCoy AN, Araújo-Pérez F, Azcárate-Peril A, Yeh JJ, Sandler RS, Keku TO. *Fusobacterium* is associated with colorectal adenomas. **PLoS One**. 2013;8(1):e53653.
29. Li Y-Y, Ge Q-X, Cao J, Zhou Y-J, Du Y-L, Shen B, et al. *Association of Fusobacterium nucleatum* infection with colorectal cancer in Chinese patients. **World journal of gastroenterology**. 2016;22(11):3227.
30. Nosho K, Sukawa Y, Adachi Y, Ito M, Mitsuhashi K, Kurihara H, et al. *Association of Fusobacterium nucleatum* with immunity and molecular alterations in colorectal cancer. **World journal of gastroenterology**. 2016;22(2):557.
31. Yamaoka Y, Suehiro Y, Hashimoto S, Hoshida T, Fujimoto M, Watanabe M, et al. *Fusobacterium nucleatum* as a prognostic marker of colorectal cancer in a Japanese population. **Journal of gastroenterology**. 2018;53(4):517-24.
32. Hussan H, Clinton SK, Roberts K, Bailey MT. *Fusobacterium's link to colorectal neoplasia sequenced: A systematic review and future insights*. **World J Gastroenterol**. 2017;23(48):8626-50.
33. Imrit K, Goldfischer M, Wang J, Green J, Levine J, Lombardo J, et al. *Identification of bacteria in formalin-fixed, paraffin-embedded heart valve tissue via 16S rRNA gene nucleotide sequencing*. **J Clin Microbiol**. 2006;44(7):2609-11.
34. Devonshire AS, Sanders R, Whale AS, Nixon GJ, Cowen S, Ellison SL, et al. *An international comparability study on quantification of mRNA gene expression ratios: CCQM-P103.1*. **Biomol Detect Quantif**. 2016;8:15-28.
35. Racki N, Dreo T, Gutierrez-Aguirre I, Blejec A, Ravnkar M. *Reverse transcriptase droplet digital PCR shows high resilience to PCR inhibitors from plant, soil and water samples*. **Plant Methods**. 2014;10(1):42.
36. Taylor SC, Carbonneau J, Shelton DN, Boivin G. *Optimization of Droplet Digital PCR from RNA and DNA extracts with direct comparison to RT-qPCR: Clinical implications for quantification of Oseltamivir-resistant subpopulations*. **J Virol Methods**. 2015;224:58-66.
37. Huggett JF, Foy CA, Benes V, Emslie K, Garson JA, Haynes R, et al. *The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments*. **Clin Chem**. 2013;59(6):892-902.

38. Wolf AMD, Fontham ETH, Church TR, Flowers CR, Guerra CE, LaMonte SJ, et al. *Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society*. **CA Cancer J Clin**. 2018;68(4):250-81.
39. Mota AdS, Silva VR. *Câncer do colorretal: uma revisão de literatura acerca do rastreamento, prevenção e controle da doença*. 2019.
40. Ladabaum U, Dominitz JA, Kahi C, Schoen RE. *Strategies for Colorectal Cancer Screening*. **Gastroenterology**. 2020;158(2):418-32.
41. Cao Y, Griffith JF, Dorevitch S, Weisberg SB. *Effectiveness of qPCR permutations, internal controls and dilution as means for minimizing the impact of inhibition while measuring Enterococcus in environmental waters*. **J Appl Microbiol**. 2012;113(1):66-75.
42. Guimarães DP, Mantuan LA, de Oliveira MA, Junior RL, Costa AMD. *The Performance of Colorectal Cancer Screening in Brazil: The First Two Years of the Implementation Program in Barretos Cancer Hospital*. 2021;14(2):241-52.
43. Tsilimigras MC, Fodor A, Jobin C. *Carcinogenesis and therapeutics: the microbiota perspective*. **Nature Microbiology**. 2017;2:17008.
44. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. *Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging*. **J Natl Cancer Inst**. 2004;96(19):1420-5.
45. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Smith RA, Brooks D, Andrews KS, et al. *Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology*. **CA Cancer J Clin**. 2008;58(3):130-60.
46. Zavoral M, Suchanek S, Zavada F, Dusek L, Muzik J, Seifert B, et al. *Colorectal cancer screening in Europe*. **World J Gastroenterol**. 2009;15(47):5907-15.
47. Allison JE, Fraser CG, Halloran SP, Young GP. *Population screening for colorectal cancer means getting FIT: the past, present, and future of colorectal cancer screening using the fecal immunochemical test for hemoglobin (FIT)*. **Gut and liver**. 2014;8(2):117.
48. Piette C, Durand G, Bretagne J-F, Faivre J. *Additional mailing phase for FIT after a medical offer phase: The best way to improve compliance with colorectal cancer screening in France*. **Digestive and Liver Disease**. 2017;49(3):308-11.

49. Levin TR, Jamieson L, Burley DA, Reyes J, Oehrli M, Caldwell C. *Organized colorectal cancer screening in integrated health care systems*. **Epidemiologic reviews**. 2011;33(1):101-10.
50. Zeller G, Tap J, Voigt AY, Sunagawa S, Kultima JR, Costea PI, et al. *Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer*. **Molecular systems biology**. 2014;10(11).
51. Shigeyasu K, Toden S, Zumwalt TJ, Okugawa Y, Goel A. *Emerging Role of MicroRNAs as Liquid Biopsy Biomarkers in Gastrointestinal Cancers*. **Clin Cancer Res**. 2017;23(10):2391-9.
52. Cai X, Janku F, Zhan Q, Fan JB. *Accessing Genetic Information with Liquid Biopsies*. **Trends Genet**. 2015;31(10):564-75.
53. Baxter NT, Koumpouras CC, Rogers MA, Ruffin MTt, Schloss PD. *DNA from fecal immunochemical test can replace stool for detection of colonic lesions using a microbiota-based model*. **Microbiome**. 2016;4(1):59.
54. Zeller G, Tap J, Voigt AY, Sunagawa S, Kultima JR, Costea PI, et al. *Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer*. **Mol Syst Biol**. 2014;10:766.
55. Berardinelli GN. *Elucidação do impacto molecular e clínico da instabilidade de microssatélite em pacientes com câncer colorretal do hospital de câncer de barretos*. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do título de Doutor em Oncologia: Fundação Pio XII; 2017.
56. Suehiro Y, Sakai K, Nishioka M, Hashimoto S, Takami T, Higaki S, et al. *Highly sensitive stool DNA testing of *Fusobacterium nucleatum* as a marker for detection of colorectal tumours in a Japanese population*. **Ann Clin Biochem**. 2017;54(1):86-91.
57. Armbruster DA, Pry T. *Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation*. **Clin Biochem Rev**. 2008;29 Suppl 1(Suppl 1):S49-52.
58. Keum N, Giovannucci E. *Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies*. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**. 2019;16(12):713-32.
59. *The global, regional, and national burden of colorectal cancer and its attributable risk factors in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017*. **Lancet Gastroenterol Hepatol**. 2019;4(12):913-33.
60. Janney A, Powrie F. *Host-microbiota maladaptation in colorectal cancer*. 2020;585(7826):509-17.

61. Liang Q, Chiu J, Chen Y, Huang Y, Higashimori A, Fang J, et al. *Fecal Bacteria Act as Novel Biomarkers for Noninvasive Diagnosis of Colorectal Cancer*. **Clin Cancer Res**. 2017;23(8):2061-70.
62. Thomas AM, Manghi P, Asnicar F. *Metagenomic analysis of colorectal cancer datasets identifies cross-cohort microbial diagnostic signatures and a link with choline degradation*. 2019;25(4):667-78.
63. Chen J, Domingue JC, Sears CL. *Microbiota dysbiosis in select human cancers: Evidence of association and causality*. **Semin Immunol**. 2017;32:25-34.
64. Gopalakrishnan V, Helmink BA, Spencer CN, Reuben A, Wargo JA. *The Influence of the Gut Microbiome on Cancer, Immunity, and Cancer Immunotherapy*. **Cancer Cell**. 2018;33(4):570-80.
65. Morgillo F, Dallio M, Della Corte CM, Gravina AG, Viscardi G, Loguercio C, et al. *Carcinogenesis as a Result of Multiple Inflammatory and Oxidative Hits: a Comprehensive Review from Tumor Microenvironment to Gut Microbiota*. **Neoplasia**. 2018;20(7):721-33.
66. Rajpoot M, Sharma AK, Sharma A, Gupta GK. *Understanding the microbiome: Emerging biomarkers for exploiting the microbiota for personalized medicine against cancer*. **Semin Cancer Biol**. 2018;52(Pt 1):1-8.
67. Sun CH, Li BB, Wang B, Zhao J, Zhang XY, Li TT, et al. *The role of Fusobacterium nucleatum in colorectal cancer: from carcinogenesis to clinical management*. **Chronic Dis Transl Med**. 2019;5(3):178-87.
68. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, et al. *High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number*. **Anal Chem**. 2011;83(22):8604-10.
69. Lee SA, Liu F, Riordan SM, Lee CS, Zhang L. *Global Investigations of Fusobacterium nucleatum in Human Colorectal Cancer*. **Front Oncol**. 2019;9:566.
70. Mima K, Cao Y, Chan AT, Qian ZR, Nowak JA, Masugi Y, et al. *Fusobacterium nucleatum in Colorectal Carcinoma Tissue According to Tumor Location*. **Clin Transl Gastroenterol**. 2016;7(11):e200.
71. Dai Z, Coker OO, Nakatsu G, Wu WKK, Zhao L, Chen Z, et al. *Multi-cohort analysis of colorectal cancer metagenome identified altered bacteria across populations and universal bacterial markers*. 2018;6(1):70.

72. Cao L, Cui X, Hu J, Li Z, Choi JR, Yang Q, et al. *Advances in digital polymerase chain reaction (dPCR) and its emerging biomedical applications*. **Biosens Bioelectron**. 2017;90:459-74.
73. Yuan D, Cui M, Yu S, Wang H, Jing R. *Droplet digital PCR for quantification of PML-RAR $\alpha$  in acute promyelocytic leukemia: a comprehensive comparison with real-time PCR*. **Anal Bioanal Chem**. 2019;411(4):895-903.
74. Dingle TC, Sedlak RH, Cook L, Jerome KR. *Tolerance of droplet-digital PCR vs real-time quantitative PCR to inhibitory substances*. **Clin Chem**. 2013;59(11):1670-2.
75. Tahara T, Yamamoto E, Suzuki H, Maruyama R, Chung W, Garriga J, et al. *Fusobacterium in colonic flora and molecular features of colorectal carcinoma*. **Cancer Res**. 2014;74(5):1311-8.
76. Flanagan L, Schmid J, Ebert M, Soucek P, Kunicka T, Liska V, et al. *Fusobacterium nucleatum associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer and disease outcome*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 2014;33(8):1381-90.
77. Lee DW, Han SW, Kang JK, Bae JM, Kim HP, Won JK, et al. *Association Between Fusobacterium nucleatum, Pathway Mutation, and Patient Prognosis in Colorectal Cancer*. **Ann Surg Oncol**. 2018;25(11):3389-95.
78. Proença MA, Biselli JM, Succi M, Severino FE, Berardinelli GN, Caetano A, et al. *Relationship between Fusobacterium nucleatum, inflammatory mediators and microRNAs in colorectal carcinogenesis*. **World J Gastroenterol**. 2018;24(47):5351-65.
79. Mima K, Nishihara R, Qian ZR, Cao Y, Sukawa Y, Nowak JA, et al. *Fusobacterium nucleatum in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis*. **Gut**. 2016;65(12):1973-80.
80. Ito M, Kanno S, Nosho K, Sukawa Y, Mitsushashi K, Kurihara H, et al. *Association of Fusobacterium nucleatum with clinical and molecular features in colorectal serrated pathway*. **Int J Cancer**. 2015;137(6):1258-68.
81. Park HE, Kim JH. *Intratumoral Fusobacterium nucleatum abundance correlates with macrophage infiltration and CDKN2A methylation in microsatellite-unstable colorectal carcinoma*. 2017;471(3):329-36.
82. Rezasoltani S, Sharafkhah M, Asadzadeh Aghdai H, Nazemalhosseini Mojarad E, Dabiri H, Akhavan Sepahi A, et al. *Applying simple linear combination, multiple logistic and factor analysis methods for candidate fecal bacteria as novel biomarkers for early detection of adenomatous polyps and colon cancer*. **J Microbiol Methods**. 2018;155:82-8.

83. Cilloni D, Petiti J. *Digital PCR in Myeloid Malignancies: Ready to Replace Quantitative PCR?* 2019;20(9).
84. Kuypers J, Jerome KR. *Applications of Digital PCR for Clinical Microbiology.* **J Clin Microbiol.** 2017;55(6):1621-8.
85. Zackular JP, Rogers MA, Ruffin MTt, Schloss PD. *The human gut microbiome as a screening tool for colorectal cancer.* **Cancer Prev Res (Phila).** 2014;7(11):1112-21.
86. Yu J, Feng Q, Wong SH, Zhang D, Liang QY, Qin Y, et al. *Metagenomic analysis of faecal microbiome as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for colorectal cancer.* **Gut.** 2017;66(1):70-8.
87. Kostic AD, Chun E, Robertson L, Glickman JN, Gallini CA, Michaud M, et al. *Fusobacterium nucleatum potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment.* **Cell Host Microbe.** 2013;14(2):207-15.
88. Fukugaiti MH, Ignacio A, Fernandes MR, Ribeiro Júnior U, Nakano V, Avila-Campos MJ. *High occurrence of Fusobacterium nucleatum and Clostridium difficile in the intestinal microbiota of colorectal carcinoma patients.* **Braz J Microbiol.** 2015;46(4):1135-40.
89. Guo S, Li L, Xu B, Li M, Zeng Q, Xiao H, et al. *A Simple and Novel Fecal Biomarker for Colorectal Cancer: Ratio of Fusobacterium Nucleatum to Probiotics Populations, Based on Their Antagonistic Effect.* **Clin Chem.** 2018;64(9):1327-37.
90. Grobbee EJ, Lam SY, Fuhler GM, Blakaj B, Konstantinov SR, Bruno MJ, et al. *First steps towards combining faecal immunochemical testing with the gut microbiome in colorectal cancer screening.* **United European Gastroenterol J.** 2020;8(3):293-302.
91. Liu X, Cheng Y. *Alterations of the Predominant Fecal Microbiota and Disruption of the Gut Mucosal Barrier in Patients with Early-Stage Colorectal Cancer.* 2020;2020:2948282.
92. Tunsjø HS, Gundersen G, Rangnes F, Noone JC, Endres A, Bemanian V. *Detection of Fusobacterium nucleatum in stool and colonic tissues from Norwegian colorectal cancer patients.* **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 2019;38(7):1367-76.
93. Davies RJ, Miller R, Coleman N. *Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis.* **Nat Rev Cancer.** 2005;5(3):199-209.
94. Wong SH, Kwong TNY, Chow TC, Luk AKC, Dai RZW, Nakatsu G, et al. *Quantitation of faecal Fusobacterium improves faecal immunochemical test in detecting advanced colorectal neoplasia.* **Gut.** 2017;66(8):1441-8.

95. Liang JQ, Li T, Nakatsu G, Chen YX, Yau TO, Chu E, et al. *A novel faecal Lachnoclostridium marker for the non-invasive diagnosis of colorectal adenoma and cancer.* 2020;69(7):1248-57.

## **9. ANEXOS**

### **ANEXO A – Parecer do CEP**



HOSPITAL DO CÂNCER DE  
BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO  
XII



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Avaliação da presença e do impacto molecular e clínico da microbiota intestinal em pacientes com carcinoma colorretal do Hospital de Câncer de Barretos.

**Pesquisador:** Rui Manuel Vieira Reis

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 70048117.7.0000.5437

**Instituição Proponente:** Fundação Pio XII

**Patrocinador Principal:** Fundação Pio XII

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.594.065

#### Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos denominados "apresentação do projeto", "objetivos" e "avaliação dos riscos e benefícios" foram retiradas do documento intitulado "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_1088193\_E2.pdf" (submetido na Plataforma Brasil em 17/03/2018)

#### RESUMO:

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais comumente diagnosticado, e a quarta causa mais comum de morte relacionada ao câncer no mundo. No Brasil, estima-se que em 2016, o CCR também seja o terceiro câncer mais frequente entre os homens e o quarto entre as mulheres. Para alterar este cenário e possibilitar melhores abordagens de prevenção e tratamento destes pacientes, é necessário compreender as diferentes alterações que acometem a mucosa intestinal e que contribuem para o desenvolvimento destes tumores. A carcinogênese colorretal é caracterizada por uma série de alterações genéticas (mutações e instabilidade de microssatélites) e epigenéticas (metilação). Apesar da susceptibilidade genética ter um papel importante em um subgrupo de tumores colorretais, a maior parte dos casos segue um padrão esporádico comumente associado a fatores de risco como: dieta ocidental, tabagismo, obesidade, diabetes, etilismo, e exposição a carcinógenos. Mais recentemente, diversos trabalhos têm explorado a influência da composição microbiana do intestino (microbiota intestinal) na iniciação e progressão

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

**Bairro:** Dr. Paulo Prata

**CEP:** 14.784-400

**UF:** SP

**Município:** BARRETOS

**Telefone:** (17)3321-0347

**Fax:** (17)3321-6600

**E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br



## HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 2.594.065

da carcinogênese colorretal. Bactérias anaeróbias obrigatórias são comumente encontradas no cólon de humanos e animais saudáveis. Evidências sugerem que alterações na composição e atividade da microbiota intestinal, criam um microambiente que promove inflamação, proliferação e progressão neoplásica. Sendo assim, este estudo terá como objetivos: i) determinar o perfil taxonômico e funcional da comunidade microbiana através de metabarcoding; ii) determinar a abundância relativa de *Fusobacterium nucleatum* e a diversidade microbiana presentes nas amostras incluídas no estudo; iii) correlacionar os resultados de diversidade microbiana encontrados com os dados moleculares (status de MSI, genes MSI-alvos, BRAF e perfil de ancestralidade) já avaliados nesta população; iv) Avaliar o padrão de enterotipos associados ao câncer de colon retal nos diferentes estadiamentos e populações; v) correlacionar os achados anteriores com as características clínico-patológicas dos pacientes.

### INTRODUÇÃO:

O câncer colorretal (CRC) é uma das neoplasias mais comuns em países desenvolvidos e está associado a taxas significativas de morbidade e mortalidade nos Estados Unidos (EUA) e em todo o mundo. Globalmente, o CRC é o terceiro câncer mais comum em homens e o segundo em mulheres (Siegel et al., 2016). A incidência global de CRC estimada para 2012 foi de 1.360.602 novos casos com 693.933 mortes (Douaiher et al., 2017). O CRC é menos comum em países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, no entanto, as taxas estão em ascensão, talvez devido ao envelhecimento da população, tabagismo, alterações na dieta e falta de programas de rastreamento (Jemal et al., 2011; Meyerhardt and Mayer, 2005). No Brasil, a estimativa para 2016 segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), foi de cerca de 16.660 casos novos de câncer de cólon e reto em homens e de 17.620 em mulheres (INCA/MS). Há três vias conhecidas na patogênese da CRC: instabilidade cromossômica (CIN), instabilidade de microssatélites (MSI), e o fenótipo metilante (CIMP) (Boland and Goel, 2010; Markowitz and Bertagnolli, 2009). Estas três vias são intimamente relacionadas e, ocasionalmente, os tumores apresentam características de múltiplos caminhos. A maioria dos casos de CCR surge através da via CIN: por exemplo, através de rearranjos estruturais, ampliações e deleções, onde as variações do número de cópias são um achado comum (Boland and Goel, 2010; Markowitz and Bertagnolli, 2009). Como consequência, a CIN leva a perda de genes supressores de tumor e amplificação de oncogenes nas regiões afetadas. Em contraste, a MSI é menos comum e é mais provável estar associada com CRC hereditário e um melhor prognóstico (Boland and Goel, 2010; Markowitz and Bertagnolli, 2009). Acredita-se que CIN e MSI são dois caminhos distintos no desenvolvimento do CRC (Boland and Goel, 2010; Markowitz and

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400  
 UF: SP Município: BARRETOS  
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



## HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 2.594.065

Bertagnolli, 2009). Uma série de alterações genéticas (mutações e instabilidade de microssatélites) e epigenéticas (metilação) são acumuladas na mucosa intestinal ano após ano, levando a um ganho de função de oncogenes e perda de função de genes supressores tumorais à medida que o tecido normal segue os passos já bem estabelecidos da carcinogênese colorretal de transformação em adenomas e por fim em carcinomas invasivos. (Fearon and Vogelstein, 1990; Wood et al., 2007). Apesar da susceptibilidade genética ter um papel importante em um subgrupo de tumores colorretais, a maior parte dos casos segue um padrão esporádico comumente associado a fatores de risco como: dieta ocidental, tabagismo, obesidade, diabetes, etilismo, e exposição a carcinógenos. Mais recentemente, diversos trabalhos têm explorado a influência da composição microbiana do intestino (microbiota intestinal) na iniciação e progressão da carcinogênese colorretal (Drewes et al., 2016). O microbioma intestinal é composto por cerca de 100 trilhões de microrganismos (Louis et al., 2014) que atuam em diferentes processos relacionados à inflamação e imunidade (Ahn et al., 2013; Arthur et al., 2012; Belcheva et al., 2014; Bonnet et al., 2014; Grivennikov et al., 2012; Louis et al., 2014). Estes microrganismos podem induzir inflamação crônica e ativar o sistema imune através da adesão ao epitélio, ligação a receptores Toll-like e/ou ativação de células T regulatórias (Treg), síntese e secreção de biomoléculas ou metabólitos citotóxicos, ou através da translocação pelo corpo (Greer and O'Keefe, 2011; Vippera and O'Keefe, 2016). Os filos Firmicutes e Bacteroidetes constituem os grupos dominantes na microbiota intestinal (Zoetendal et al., 2008, Eckburg et al., 2005). Em 2011, Arumugam e colaboradores postularam que a população (Americanas, Europeias e Asiáticas) humana saudável pode ser estratificada em três principais Enterotipos (Bacteroides: Enterotipo 1, Prevotella: Enterotipo 2 e Ruminococcus: Enterotipo 3) presentes no intestino (Arumugam et al., 2011). Este conceito é baseado nos filos e os gêneros mais prevalentes na população humana saudável ou doente. Porém, a presença de Enterotipos na população saudável ainda é uma matéria de debate na comunidade científica (Knights et al., 2013, Knights et al., 2014), não existe um consenso se a comunidade microbiana interindividual se manifesta como diferenças contínuas ou se comunidade microbiana se manifesta por composições microbianas equilibradas e estáveis. Os estudos de associação metagenômica tem demonstrado a associação entre Enterotipos e doenças tais como diabetes do tipo 2, obesidade, artrite reumatoide e câncer de colorretal (Wang e Jia, 2016). Apesar de esforços recentes tentarem identificar um único organismo capaz de contribuir para a carcinogênese colorretal, evidências sugerem que alterações na composição e atividade da microbiota intestinal, criando um microambiente que promove inflamação, proliferação e progressão neoplásica parecem formar o cenário mais comumente observado (Vipperla and

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400  
 UF: SP Município: BARRETOS  
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



## HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 2.594.065

O'Keefe, 2016). Uma revisão de 31 artigos que investigaram o papel da microbiota do cólon no câncer colorretal em humanos e modelos animais identificou algumas bactérias frequentemente encontradas em níveis elevados em amostras de câncer (*Fusobacteria*, *Alistipes*, *Porphyromonadaceae*, *Coriobacteridae*, *Staphylococcaceae*, *Akkermansia* spp. and *Methanobacteriales*), enquanto outras foram observadas em níveis reduzidos nestas amostras (*Bifidobacterium*, *Lacto bacillus*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium* spp., *Roseburia* and *Treponema*) (Borges-Canha et al., 2015). Apesar deste perfil complexo de alterações no equilíbrio da microbiota intestinal, análises metagenômicas têm mostrado um enriquecimento da bactéria *Fusobacterium nucleatum* em adenomas e carcinomas colorretais em comparação com amostras de mucosa normal adjacente (Castellarin et al., 2012; Kostic et al., 2013; Kostic et al., 2012, Nakatsu et al., 2015). Nos últimos anos, a imunidade adaptativa mediada por células T tem se mostrado um mecanismo relevante de regulação da evolução tumoral em diversos tipos de câncer (Sharma and Allison, 2015; Vanneman and Dranoff, 2012), e o status de instabilidade de microssatélites (MSI) tem papel importante na regulação de processos relacionados a este mecanismo (Alexander et al., 2001; Llosa et al., 2015; Ogino et al., 2009; Tougeron et al., 2009; Xiao and Freeman, 2015). Estudo realizado em um modelo murino *ApcMin/+* de tumorigênese intestinal sugere que *F nucleatum* promove a carcinogênese no cólon através da inibição da proliferação e indução de apoptose de células T, e indução de progressão através do recrutamento de células mieloides que infiltram o tumor (Kostic et al., 2013; Ogino et al., 2005). Outros estudos mostram que níveis elevados de *F nucleatum* em tecido proveniente de tumores colorretais está inversamente associado com a densidade de células T CD3+ e uma forte associação com instabilidade de microssatélites e fenótipo metilador de ilhas CpG (Mima et al., 2015; Tahara et al., 2014). Estes estudos mostram as interações complexas que ocorrem entre microrganismos, imunidade, predisposição genética e câncer colorretal. Recentemente, um estudo comparou a diversidade bacteriana encontrada em amostras de fezes pareadas com amostras de material fecal obtido a partir de resíduos presentes no tampão conservado utilizado nos tubos de coleta para teste imunológico de sangue oculto nas fezes (FIT). Os resultados mostraram que O DNA obtido a partir do FIT foi extremamente representativo em relação ao perfil e abundância de bactérias encontrados quando as amostras de fezes foram avaliadas. O estudo demonstrou o potencial de utilização deste material para o rastreamento de CCR baseado em microbiota, reduzindo a necessidade de coleta, armazenamento e processamento de fezes (Baxter et al., 2016). Sendo assim, um melhor entendimento da relação entre a presença de microrganismos, e as características moleculares já avaliadas nesta população ((status de MSI, genes MSI-alvos, BRAF e

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331			
Bairro: Dr. Paulo Prata	CEP: 14.784-400		
UF: SP	Município: BARRETOS		
Telefone: (17)3321-0347	Fax: (17)3321-8600	E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br	



## HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 2.594.065

perfil de ancestralidade), aliado às informações clínicas destes pacientes, pode fornecer informações úteis sobre características relevantes do processo de carcinogênese destes tumores. Além disso, a melhor caracterização do papel de bactérias na carcinogênese de tumores colorretais, pode viabilizar a utilização de estratégias de prevenção baseadas no manejo do microbioma intestinal e identificação de Enterotipos como um possível método de prognóstico ou biomarcador para uso em diagnóstico e rastreamento molecular do CCR.

### HIPÓTESE:

Espera-se elucidar o perfil de microbioma e a frequência de infecções por bactérias específicas na população colorretal Brasileira e qual o seu impacto clínico-patológico. Iremos também avaliar qual o seu impacto molecular ao nível dos genes MSI-alvos alterados, e possibilitar correlacionar com a ancestralidade dos pacientes. Dado o número de pacientes que iremos incluir, poderemos obter poder estatístico para compreender o papel das infecções por bactérias específicas na carcinogênese colorretal no Brasil.

### Objetivo da Pesquisa:

#### OBJETIVO PRIMÁRIO:

O objetivo geral deste projeto é elucidar o impacto molecular e clínico da microbiota intestinal em pacientes com carcinoma colorretal esporádico do Hospital de Câncer de Barretos.

#### OBJETIVO SECUNDÁRIO:

i) determinar o perfil taxonômico e funcional da comunidade microbiana através de metabarcoding; ii) determinar a abundância relativa de *Fusobacterium nucleatum* e a diversidade microbiana presentes nas amostras incluídas no estudo; iii) correlacionar os resultados de diversidade microbiana encontrados com os dados moleculares (status de MSI, genes MSI-alvos, BRAF e perfil de ancestralidade) já avaliados nesta população; iv) Avaliar o padrão de enterotipos associados ao câncer de colon retal nos diferentes estadiamentos e populações; v) correlacionar os achados anteriores com as características clínico-patológicas dos pacientes; vi) determinar a abundância relativa de *Fusobacterium nucleatum* e a diversidade microbiana presentes em amostras de material fecal obtidas a partir de FIT de indivíduos participantes do programa de rastreamento de câncer colorretal desta instituição e correlacionar com os resultados do FIT e de achados histológicos nos indivíduos submetidos à colonoscopia.

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400  
 UF: SP Município: BARRETOS  
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-8600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



## HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 2.594.065

### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

#### RISCOS:

Sob o ponto de vista ético, o estudo confere risco mínimo, caracterizado pela quebra eventual de sigilo. Entretanto, os pesquisadores se comprometem a não divulgar esses dados e manter total sigilo, utilizando medidas de segurança quanto à confidencialidade, privacidade e armazenamento de dados.

#### BENEFÍCIOS:

Não há benefício direto para o paciente participante do estudo. O potencial benefício do estudo para a sociedade é a melhor caracterização do papel de bactérias na carcinogênese de tumores colorretais, podendo viabilizar a utilização de estratégias de prevenção baseadas no manejo do microbioma intestinal.

### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A presente submissão trata-se de E2 ao projeto para aprovação dos seguintes documentos:

- Projeto\_02\_Metabarcoding\_MSI\_07\_03\_2018.docx;
- formulario\_emenda.pdf;
- formulario\_emenda\_07\_03\_2018.docx;
- Mabin.pdf;
- Folha\_de\_rosto\_17\_03.pdf;
- Lista\_Tecido\_Congelado\_Biobanco.pdf;
- Pesquisa\_FIT\_Biobanco.pdf;
- PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_1088193\_E2.pdf

Emenda solicitada: "Tendo em vista as diferenças já descritas na literatura na taxa de detecção da bactéria *Fusobacterium nucleatum* e no perfil de diversidade microbiana quando são comparadas amostras pareadas de tecido tumoral congelado e incluído em parafina, solicitamos a possibilidade de avaliar a presença da bactéria *F. nucleatum* e o perfil de diversidade microbiana nas amostras de tecido congelado armazenadas em Biobanco que esteja disponíveis dos 1000 casos inicialmente incluídos no estudo. A busca no Biobanco indica que das 1000 amostras incluídas no estudo, há disponibilidade de tecido congelado para 644.

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331	CEP: 14.784-400
Bairro: Dr. Paulo Prata	
UF: SP	Município: BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347	Fax: (17)3321-6600
	E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE  
BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO  
XII



Continuação do Parecer: 2.594.065

Além disso, visto que trabalho anterior mostrou a possibilidade de análise do perfil de diversidade microbiana em amostras de FIT, como uma alternativa viável em comparação com amostras de fezes, solicitamos a possibilidade de avaliar este perfil em amostras de FIT armazenadas no Biobanco do hospital. Até o momento, existem 436 amostras de FIT armazenadas no Biobanco. Considerando que as coletas iniciaram em junho/2017, esperamos checar aos 1000 casos até o final deste ano, possibilitando a inclusão de todos no projeto".

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos foram adequadamente apresentados.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem óbices éticos.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos analisou o(s) seguinte(s) documento(s) do projeto 1402/2017, e:

- Aprovou a emenda ao estudo, submetida em 17/03/2018;

Após análise do(s) documento(s) supracitado(s), o Comitê faz a seguinte recomendação:

- ( x ) O Estudo deve Continuar;
- ( ) O Estudo dever ser Interrompido;
- ( ) O Estudo está Finalizado;
- ( ) Solicita-se Esclarecimento;

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_108819_3_E2.pdf	17/03/2018 14:09:00		Aceito
Outros	Pesquisa_FIT_Biobanco.pdf	17/03/2018 14:07:10	Ana Carolina de Carvalho	Aceito

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400  
UF: SP Município: BARRETOS  
Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-8600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 2.594.065

Outros	Lista_Tecido_Congelado_Biobanco.pdf	17/03/2018 14:06:13	Ana Carolina de Carvalho	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_17_03.pdf	17/03/2018 14:05:46	Ana Carolina de Carvalho	Aceito
Outros	Mabin.pdf	17/03/2018 14:04:45	Ana Carolina de Carvalho	Aceito
Outros	formulario_emenda_07_03_2018.docx	17/03/2018 14:04:08	Ana Carolina de Carvalho	Aceito
Outros	formulario_emenda.pdf	17/03/2018 14:03:08	Ana Carolina de Carvalho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_02_Metabarcoding_MSI_07_03_2018.docx	17/03/2018 14:01:39	Ana Carolina de Carvalho	Aceito
Outros	formulario_emenda_01.docx	31/08/2017 07:57:43	Ana Carolina de Carvalho	Aceito
Outros	formulario_emenda_01.pdf	30/08/2017 15:45:01	Ana Carolina de Carvalho	Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto_02_Metabarcoding_MSI_RR_23_08.docx	30/08/2017 15:40:18	Ana Carolina de Carvalho	Aceito
Declaração do Patrocinador	financiamento_MBC_diretoria.pdf	21/06/2017 11:10:07	Ana Carolina de Carvalho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_02_Metabarcoding_MSI_RR_21_06.docx	21/06/2017 08:35:08	Ana Carolina de Carvalho	Aceito
Outros	Mabin_MBC.pdf	21/06/2017 08:34:26	Ana Carolina de Carvalho	Aceito
Outros	termo_ciencia_MBC.pdf	21/06/2017 08:34:10	Ana Carolina de Carvalho	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo_responsabilidade_MBC.pdf	21/06/2017 08:32:52	Ana Carolina de Carvalho	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BARRETOS, 11 de Abril de 2018

Assinado por:  
Maicon Fernando Zanon da Silva  
(Coordenador)

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400  
UF: SP Município: BARRETOS  
Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-8600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br

**ANEXO B – Artigo publicado**

<https://www.karger.com/Article/FullText/512175>

# The Role of *Fusobacterium nucleatum* in Colorectal Carcinogenesis

José Guilherme Datorre<sup>a</sup> Ana Carolina de Carvalho<sup>a</sup>  
Denise Peixoto Guimarães<sup>a, b</sup> Rui Manuel Reis<sup>a, c, d</sup>

<sup>a</sup>Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Barretos, Brazil; <sup>b</sup>Department of Prevention, Barretos Cancer Hospital, Barretos, Brazil; <sup>c</sup>Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Medicine, University of Minho, Braga, Portugal; <sup>d</sup>ICVS/3B's-PT Government Associate Laboratory, Braga, Portugal

## Keywords

*Fusobacterium nucleatum* · Colorectal cancer · Carcinogenesis · Microbioma

## Abstract

Colorectal cancer (CRC) is one of the most frequent and deadly neoplasms worldwide. Genetic factors, lifestyle habits, and inflammation are important risk factors associated with CRC development. In recent years, growing evidence has supporting the significant role of the intestinal microbiome in CRC carcinogenesis. Disturbances in the healthy microbial balance, known as dysbiosis, are frequently observed in these patients. Pathogenic microorganisms that induce intestinal dysbiosis have become an important target to determine the role of bacterial infection in tumorigenesis. Interestingly, the presence of different bacterial strains, such as *Fusobacterium nucleatum*, has been detected in tissue and stool from patients with CRC and associated with substantial clinical and molecular features, as well as with patient therapy response. Therefore, understanding how the presence and levels of *F. nucleatum* strains in the gut affect the risk of CRC onset and progression may inform suitable candidates for interventions focused on modulation of this bacteria.

Here we review new insights into the role of gut microbiota in CRC carcinogenesis and the clinical utility of using the detection of *F. nucleatum* in different settings such as screening, prognosis, and microbiota modulation as a means to prevent cancer, augment therapies, and reduce adverse effects of treatment.

© 2020 S. Karger AG, Basel

## Colorectal Cancer

Colorectal cancer (CRC) is the third most commonly diagnosed cancer in men and the second most commonly diagnosed cancer in women, with 1.8 million cases and 881,000 deaths occurring in 2018 worldwide [1]. Many studies have shown a decrease in CRC mortality rates in high-income regions such as in Northern America, Oceania, and Northern and Western Europe [2, 3]. However, an increase in both the incidence and the mortality of this tumor has been observed in less developed countries with more limited resources in Asia, Africa, and Latin America, as well as in some Eastern European countries [2, 4–7]. Several reasons have been proposed to explain this behavior in the incidence of CRC. A best treatment approach

for the screening tests, early diagnosis, and removal of preneoplastic lesions in the USA have been implicated [2]. In rapidly transitioning countries, changes in exposure to risk factors in Latin American countries with “life style westernization,” inadequate access to early detection and treatment, and delay in the diagnosis are reasons for the increase in incidence and mortality [2].

The well-established etiologic factors for CRC are: advanced age (>50 years), a personal history of CRC or adenoma, inflammatory intestinal conditions, a genetic predisposition, a diet low in fiber and high in fat and red meat, a sedentary lifestyle, diabetes, obesity, smoking, alcohol, and radiotherapy [8]. Recent and exciting studies are also reporting the importance of the gut microbiome (a collection of microorganisms, and their genes and genomes, living in association with the human gut) in this complex multifactorial disease [9–11].

The prognosis and treatment of CRC currently depend on the clinicopathological stage of the disease at the time of diagnosis. If CRC is diagnosed early (stage 0, I, or II) the 5-year survival rate is >80%, but it decreases to <10% with a late diagnosis of metastatic cancer [1]. However, the disease stage alone does not allow accurate prediction of the outcome for individual patients [12]. Therefore, a more accurate outcome prediction can contribute to personalized treatment to avoid undertreatment of patients destined to relapse or overtreatment of patients who would benefit just from surgical treatment [13].

Prognostic factors are related to the natural history of CRC that influence the recurrence rates and are frequently used to categorize patients into subgroups with different baseline relapse risks [12]. The most established clinicopathological risk factors for disease progression and death are: stage (node-positive disease), histological grade, vascular invasion, and pT4 classification. According to major guidelines, all of these variables are taken into account for selecting patients for adjuvant chemotherapy in stage II and III diseases [14]. In metastatic CRC, the extent of cancer and the aim of therapy (operable vs. inoperable metastases), and with the knowledge of CRC biology and molecular pathways, genetic and epigenetic profiles also guide the choice of systemic therapy [8].

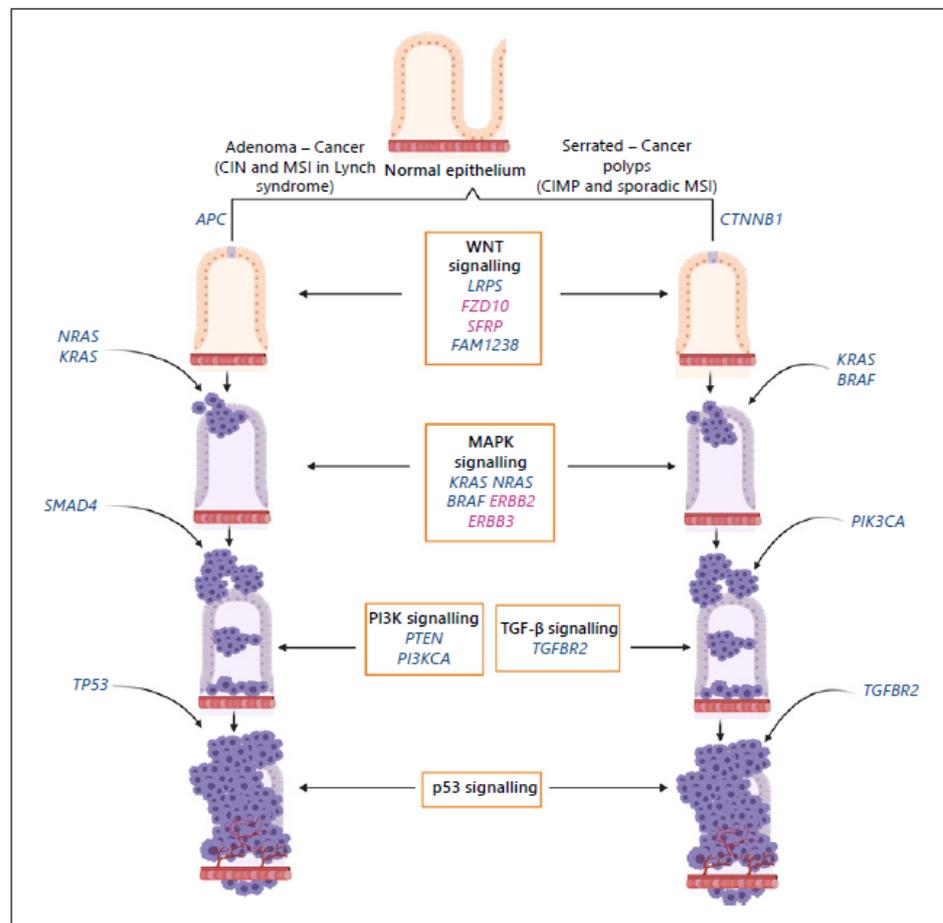
The location of the primary tumor also seems to influence the outcome. Weiss et al. [15] showed a better outcome for left-sided diseases compared to right-sided ones in stage III but not in stage II CRC. Similarly, metastatic left-sided CRC exhibited a better outcome than right-sided CRC in previously untreated patients [16]. Apart from having a different embryological origin – proximal colon

from the midgut and distal colon and rectum from the hindgut – the right colon displays peculiar differences in mucosal immunology, probably owing to differences in gut microbiota [17]. A higher concentration of eosinophils and intraepithelial T cells in the proximal colon compared with the distal colorectum has been reported [18–20]. It has been hypothesized that this could be the result of the delicate balance that immune cells have to maintain immunogenicity against pathogens and tolerance for the commensal microbiota, which is much more represented in the distal colorectum. This observation could also explain the differences in the immunological response to tumors developing in the proximal colon characterized by increased immune activity and, in turn, reflect specific differences in pathogenesis and outcomes [21–26].

CRC arises from a transition from normal mucosa to premalignant lesions, with progression to colorectal adenomas and CRC occurring over several years (Fig. 1). The most frequent path is known as the adenoma-carcinoma sequence, but CRC can also evolve through an alternative pathway in which serrated polyps, including a sessile serrated lesion and a traditional serrated adenoma replace the conventional adenoma as the precursor lesion to CRC (Fig. 1). Genetic and epigenetic alterations drive both pathways, and distinct molecular subtypes are described (Fig. 1) [8, 27–30].

Concerning the adenoma-carcinoma pathway, the initial mutations most often occur in the *adenomatous polyposis coli* (*APC*) tumor suppressor gene. Further mutations in the *KRAS* oncogene promote rapid clonal growth and an increase in cell number [8]. Additional mutations followed by clonal expansion continue, and mutations in genes such as *PIK3CA*, *SMAD4*, *TP53*, *CTNNB1*, and *BRAF* eventually result in malignancy [8, 27, 28] (Fig. 1). Not all adenomas progress to invasive cancer, although all adenomas have the capacity for malignant transformation. The pathological features of adenomas (e.g., size, type, histological grade, and the presence of dysplastic foci) are all predictive of their malignant potential; however, it is still unclear why some adenomas progress to malignancy whereas others stabilize or even regress. Noteworthy, adenomas harbor increased numbers of inflammatory cells, which are much higher than those expected in healthy colonic tissue [29].

In the serrated polyp pathway, genetic alterations involve *BRAF* and *KRAS* mutations (Fig. 1). Both *KRAS* and *BRAF* encode kinases that belong to the mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade that mediates cellular signaling involving cell proliferation, apoptosis, and dif-



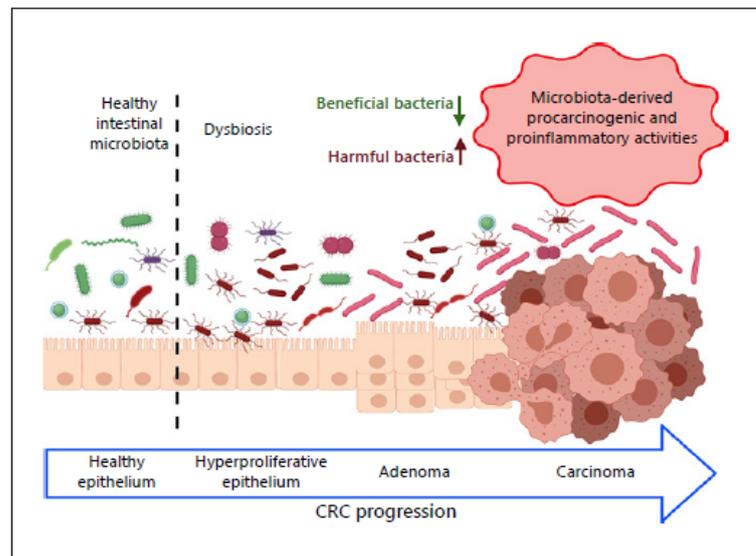
**Fig. 1.** Evolution of normal epithelial cells to adenocarcinoma. Two major pathways have been described from normal colon to CRC. Both involve the progression of normal colon epithelial cells to aberrant crypt foci, initiated by early and advanced polyps with later progression to early cancer and then advanced cancer. The left pathway is the traditional one, which involves the development of adenomas that progress to adenocarcinomas. The right is an al-

ternative pathway and involves serrated polyps. The genetically (in dark blue) or epigenetically (in purple) altered genes are represented in each sequence; some genes are shared between the 2 pathways, while others are unique (*BRAF* mutations and CIMP only occur in the serrated pathway). The signalling pathways that are deregulated during the progression sequence are also shown.

ferentiation [31]. Mutations in both oncogenes are frequently found as mutually exclusive events in serrated adenocarcinoma and the precursor serrated lesions [27, 31–33]. Another molecular alteration described in serrated lesions is microsatellite instability (MSI), that is caused by the loss of mismatch repair genes, which leads to an increased susceptibility to accumulation of mutations in genes with microsatellite regions [34]. Moreover, the

CpG island methylator phenotype (CIMP) is also strongly related to the serrated colorectal carcinogenesis. CpG island methylation may cause transcriptional silencing and inhibit gene expression by the binding of methyl groups to repetitive cytosine-guanine dinucleotides sequences, commonly in the promoter region [27, 31]. This epigenetic event is observed in the precursor serrated lesions and colorectal polyps [27, 31, 35] (Fig. 1).

**Fig. 2.** CRC progression in association with gut microbial dysbiosis. In healthy epithelium of the colorectal mucosa, the majority of the endogenous bacteria in adults play a beneficial role, contributing to metabolism and nutrient absorption, and help to maintain immune structure and function (in green). Several bacterial species have been shown to exhibit proinflammatory and procarcinogenic properties, which could consequently have an impact on colorectal carcinogenesis (in red). The intestinal mucosa of CRC patients could be colonized by one or several microbes with procarcinogenic properties such as production of DNA-damaging compounds and induction of cellular proliferation, causing permeabilization of the intestinal barrier and induction of chronic inflammation, leading to the initiation of CRC.



Recently another classification was reported by the CRC Subtyping Consortium [36]. Accordingly, 4 consensus molecular subtypes (CMS) of CRC were described to resolve inconsistencies among the reported gene expression-based CRC classifications and facilitate clinical translation [36]. The classification is: CMS1, enriched for tumors with MSI, overexpression of DNA damage repair proteins, widespread hypermethylation, and high immune activation; CMS2, tumors with chromosomal instability and activation of the WNT and MYC signaling pathways; CMS3, tumors with epithelial and metabolic dysregulation; and CMS4, tumors with transforming growth factor (TGF)- $\beta$  activation, stromal infiltration, and angiogenesis. Proximal CRC are enriched for CMS1 tumors, and, inversely, distal CRC are enriched for CMS2 tumors [36].

### Microbiome and CRC

Recent advances in the composition and metabolism of the human microbiota have established its influence on human health [10, 37, 38]. Importantly, accumulating data suggest that the microbiota has a role in the etiology of several types of cancer by influencing inflammation, DNA damage, and apoptosis. Therefore, the involvement of the gut microbiota in CRC is an active area of research [10, 37, 38].

The majority of microorganisms are in the gut, particularly in the large intestine (colon and rectum). Different regions of the gastrointestinal tract vary widely in terms of transit time, pH, exposure to oxygen, nutrient availability, host secretions (such as bile acids and digestive enzymes), mucosal surfaces, and interactions with the immune system, with different effects on microbial colonization [39]. The large intestine contains the densest and most metabolically active microbial community ( $>10^{11}$  cells per g of contents) in healthy adults, which is dominated by anaerobic bacteria that belong to 2 phyla – Firmicutes and Bacteroidetes – in addition to Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia [40].

Despite substantial interindividual variation within the microbial community's composition, human studies have shown that dietary composition has an important effect on the gut microbiota [37]. Changes in fecal microbiota are detectable as early as a few days after switching between carefully controlled diets [39]. These changes can cause dysbiosis, an imbalance of the intestinal microbiome that reduces the nutrient and vitamin absorption capacity, caused by a decrease in the number of beneficial gut bacteria and an increase in disease-causing bacteria (Fig. 2) [40–42]. Compositional changes in the microbiome were recently reported in response to a switch between extreme plant-based diets (high levels of fiber and low levels of fat and protein, comprising 32 and 10% of the caloric intake, respectively) and animal-based diets

(that contained no fiber and had high levels of fat and protein, comprising 70 and 30% of the caloric intake, respectively) [43]. In response to the animal-based diet, the abundance of members of the Bacteroidetes phylum (such as *Bacteroides* spp. and *Alistipes* spp.) and *Bilophila wadsworthia* increased, whereas the number of several members of the Firmicutes phylum decreased [42].

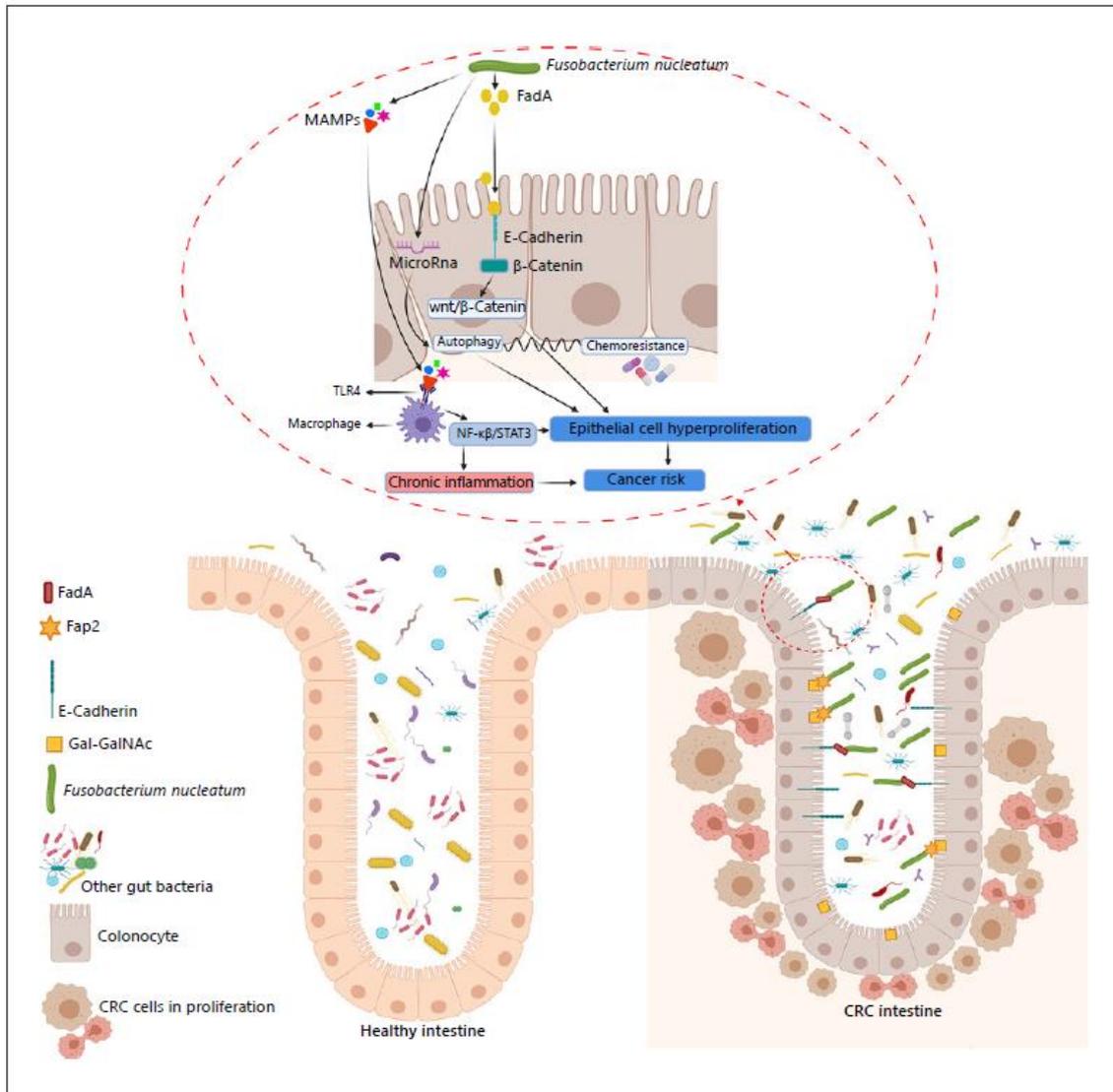
Diet has a significant impact on the composition of the gut microbiota (besides the use of antibiotics and radiation), so dietary interventions are likely to influence the susceptibility to diseases that have a microbial component, such as CRC [42]. Although the link between fiber intake and cancer risk has been debated, recent meta-analysis studies indicate that a high-fiber intake, particularly of cereals and whole grains, is associated with a decreased risk of CRC [43]. Moreover, patients with advanced colorectal adenomas (CRC precursor lesions) are reported to have a low intake of fiber compared to healthy controls [44]. By contrast, diets rich in red and processed meat, fat, and alcohol are associated with an increased risk of CRC [45]. The lower incidence of CRC in rural native Africans compared to African Americans corresponds to a higher dietary intake of nondigestible carbohydrates relative to protein and fat, as well as major differences in the fermentation capacity of the gut microbiota [46].

Studies comparing the composition of the microbial community in patients with CRC to that of healthy subjects have been published to determine whether changes in the gut microbiota cause the disease [38]. However, as CRC develops over many years, it is a challenge to determine whether the associated changes in the gut microbiota are a consequence of diet alterations or physiology or whether they are causative. A “driver-passenger” model for CRC was proposed to distinguish between causative organisms and those that respond to disease progression [47]. The analysis of fecal samples from patients with CRC using 16S ribosomal RNA gene sequencing has shown that *Bacteroides fragilis* and several enterobacterial operational taxonomic units are enriched compared to those from healthy controls. In contrast, levels of 5 operational taxonomic units that correspond to butyrate-producing Lachnospiraceae were reduced [47]. Changes also occur in the tumor-associated microbiota, in which an increase in *Fusobacterium* spp. seems to be consistent between studies [47, 48]. Deep metatranscriptomic sequencing has more recently shown that *Leptotrichia* spp. and *Campylobacter* spp. cooccur with *Fusobacterium* spp. [49, 50]. Using a similar approach, our group recently described the richness and abundance of the microbial com-

munity in Brazilian colorectal tumor samples in comparison to adjacent normal mucosa in a small cohort of patients [49]. The results indicated a transition in the abundance of specific genera between the healthy microbiome present in normal tissue to potential oncogenic associated bacteria in CRC [49]. An increase in Fusobacteria and Proteobacteria phyla, previously associated with dysbiosis, inflammation, and CRC was observed [49, 50]. At the family level, the Enterobacteriaceae, Fusobacteriaceae, and Streptococcaceae families were distinctly enriched in CRC [49]. The CRC microbiome was also enriched by the genera *Cetobacterium*, *Odoribacter*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Campylobacter*, *Aeromonas*, *Clostridium*, and *Parvimonas*. Our study corroborates the *Fusobacterium* enrichment in human CRC tissue in comparison with adjacent normal tissue, specifically, *Fusobacterium nucleatum* [49]. A recent review collected and analyzed all reliable 16S rDNA sequencing studies of intestinal microbiota from CRC patients, and found that the abundance of 32 genera belonging to the Bacteroidetes, Fusobacteria, Verrucomicrobia, Proteobacteria, Firmicutes, and Actinobacteria phyla varied significantly. Among them, 12 are genera belonging to the Bacteroidetes, Fusobacteria, Verrucomicrobia, Proteobacteria, and Firmicutes phyla, which are significantly enriched in CRC patients or tissues [51]. Among the findings, they reported a group of bacteria enriched in the CRC microenvironment such as *F. nucleatum*, *S. gallolyticus*, *C. difficile*, and *P. anaerobius*, that can directly participate in CRC development [52].

Animal models also support this link between microbiota and CRC. Clear differences in the composition of the gut microbiota have been reported in mice following tumor induction using carcinogenic agents; compared to untreated mice, *Bacteroides* spp., *Akkermansia* spp., and *Odoribacter* spp. increased, whereas *Prevotella* spp. and *Porphyromonas* spp. decreased [53]. The growing list of potentially carcinogenic bacteria provides support for the hypothesis that tumorigenesis is driven by mechanisms and/or pathways that are common to many bacterial groups rather than a single organism [51].

A decrease in microbial diversity, including a reduction of specific bacterial genera like *Clostridium* and *Bacteroides*, has been observed in CRC tissues [48]. This major shift in the microbial community structure may be due to the inhospitable tumor environment in which the rapidly growing tumor cells are competing for nutrients and the infiltrating immune cells are producing inflammatory compounds, like reactive nitrogen stress and reactive oxygen stress, that can be toxic to microbes. On the



**Fig. 3.** *F. nucleatum*-associated mechanisms involved in the development and progression of CRC. *F. nucleatum* can directly bind through its surface protein Fap2 to Gal-GalNAc that is overexpressed in CRC cells, and *F. nucleatum* adhesin-A (FadA) can help *Fn* adhere to E-cadherin of intestinal epithelial cells, resulting in specific *F. nucleatum* accumulation in CRC tissues; binding to E-cadherin activates  $\beta$ -catenin, and the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway,

leading to uncontrolled cell growth. *F. nucleatum* also contributes to proinflammatory effects via the recognition of microbe-associated molecular patterns (MAMP) by TLR, leading to activation of the NF- $\kappa$ B or STAT3 pathway and accelerating CRC development and progression. *F. nucleatum* can also modulate autophagy of intestinal epithelial cells by activation of regulatory microRNA, which is interconnected with a chemoresistance mechanism.

other hand, enrichment in the highly heterogeneous *Fusobacterium* genera has also been observed in various independent studies in CRC-involved tissue relative to adjacent nonneoplastic tissue [48, 54, 55]. The dysbiosis, the decrease in beneficial gut bacteria, and the increase in harmful bacteria, which exhibit proinflammatory and procarcinogenic properties during the colorectal carcinogenesis process, is illustrated in Figure 2.

### ***F. nucleatum* and Colorectal Carcinogenesis**

*F. nucleatum* is a gram-negative bacteria and a normal constituent of the human oral cavity [56]. As a resident member of the oral microbiota, *F. nucleatum* has been primarily studied for its role in periodontal health and disease [56] and its many adhesins that mediate binding to abiotic surfaces, host cells, or other microorganisms [57–61]. This species has been recognized as an opportunistic pathogen involved not only in inflammation process such as periodontitis, inflammatory bowel disease, pancreatic abscess, premature, and hepatic abscess but also in cancer development and progression including CRC and oral cancer [51].

While *Fusobacterium* spp. are rarely detected in the gut of healthy individuals, they can be isolated from patients with inflammatory bowel disease [61], further supporting a link between fusobacteria and an inflamed colonic environment. Some studies in human CRC samples have revealed that *Fusobacterium* spp. often cooccur with other gram-negative anaerobes, including *Campylobacter* spp., creating what is called a biofilm [57]. Biofilm is a microbial-derived sessile community characterized by cells irreversibly attached to a substratum or interface to each other, embedded in a matrix of extracellular polymeric substances that they have produced [61]. *F. nucleatum* seems to have an essential role in oral cavity biofilms and may be a pioneer microbe that creates a physical and metabolic structure that supports wide microbial shifts in evolving tumors over time [57]. Recent work examining microbial community changes across CRC progression has sought to identify strong microbial networks that might function together at different stages during tumor formation [61].

The role of *F. nucleatum* in colonic carcinogenesis has been implicated in progression of advanced colorectal carcinoma. Previous studies have suggested that this species promotes colon carcinogenesis through inhibition of proliferation and induction of apoptosis in T cells [62]. Other studies revealed that elevated levels of *F. nucleatum*

in colon tissue are inversely correlated with the density of T CD3+ cells and strongly associated with MSI and a CpG methylator phenotype [49, 50, 63].

One recurrent question is: how can *Fusobacterium* colonize colorectal tissues, being an oral bacteria? Some studies have suggested a mechanism involving an *F. nucleatum* adhesion protein called Fap2 that binds to D-galactose- $\beta$ (1–3)-N-acetyl-D-galactosamine (GalGalNAc), which is over-represented in CRC cells [62]. Further, *Fusobacterium* adhesin A (FadA) can help *F. nucleatum* adhere to E-cadherin of intestinal epithelial cells [64]. *F. nucleatum* can thus selectively colonize CRC tissues through Fap2 and FadA and, when in contact with intestinal epithelial cells, activate  $\beta$ -catenin, leading to uncontrolled cell growth and acquisition of a stem cell-like phenotype (Fig. 3) [51, 64, 65]. Experimentally, when injected into the tail veins of precancerous and malignant CRC mouse models, *F. nucleatum* was also found to colonize colorectal tissue, suggesting that *F. nucleatum* uses a hematogenous route to reach colorectal tissue from the oral cavity [65]. In ApcMin/+ mouse models, *F. nucleatum* increased tumor multiplicity, activated the nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway, and drove myeloid cell infiltration into tumors, generating a proinflammatory environment that promoted CRC development [62]. Moreover, *F. nucleatum* could increase the proliferation of CRC cells and tumor development via TLR4 signaling activation [66].

Several studies show *F. nucleatum* enrichment in colorectal tissues with high-grade dysplasia and adenomas [55, 67]. The virulence factor FadA can promote E-cadherin-mediated tumor growth and induce the host to produce proinflammatory cytokines, with *fadA* gene levels in colon tissues from patients with adenomas and adenocarcinomas being >10–100 folds higher than those in healthy individuals [64]. The Fap2 protein of *F. nucleatum* can also directly interact with the T-cell immunoreceptor with the Ig and ITIM domains (TIGIT) protein, inhibiting natural killer cell cytotoxicity [68].

### **Potential Use of *F. nucleatum* in CRC Management**

Studies demonstrating the presence and levels of *F. nucleatum* DNA in tumor tissue and even in stool samples have raised its application in a clinical setting, as a valuable biomarker for CRC diagnosis, prognosis, and treatment management. Next, we describe and exemplify some of these possible applications; they are summarized in Table 1.

**Table 1.** Summary of studies that reported the association between *F. nucleatum* and CRC risk, prognostication, or therapy response

Study	Population	Methodology	Sample size	Specimen type	Findings
<b>Risk factor</b>					
Castellarin et al. [52]	Canada	qPCR	99 CRC and ANT	FFT	<i>Fn</i> 415× ↑ in CRC than in ANT
Kostic et al. [62]	USA and UK	qPCR	27 CRC, 28 AD, and 31 HC	FFT and ST	<i>Fn</i> ↑ in FFT AD than in HC <i>Fn</i> ↑ in FFT CCR than in AD <i>Fn</i> ↑ in ST of AD than in HC
Flanagan et al. [67]	Europe (IE, CZ, DE)	qPCR	122 CRC, 52 AD, and 25 HC	FFT and ST	<i>Fn</i> ↑ in FFT AD than in HC <i>Fn</i> ↑ in ST of CRC than in AD <i>Fn</i> ↑ in ST of AD than in HC
Ito et al. [70]	Japan	qPCR	511 CRC, 343 serrated lesions, and 122 nonserrated adenomas	FFPE	<i>Fn</i> positivity ↑ in CIMP-H lesions <i>Fn</i> positivity ↑ according to a ↑ histological grade
Fukugaiti et al. [75]	Brazil	qPCR	7 CRC and 10 HC	ST	<i>Fn</i> ↑ in ST of CRC than in HC
Li et al. [74]	China	qPCR and FISH	101 CRC and 101 NAT	FFT and FFPE	<i>Fn</i> ↑ in CRC than in NAT
Wong et al. [71]	China	qPCR	104 CRC, 103 AD, and 102 HC	ST	<i>Fn</i> ↑ in ST CRC than in AD <i>Fn</i> ↑ in ST CRA than in HC <i>Fn</i> + FIT ↑ sensitivity than FIT for AD and CRC detection
Suehiro et al. [58]	Japan	ddPCR	60 HC, 30 AD/CIS, and 158 CRC	ST	<i>Fn</i> ↑ in nonadvanced AD than in HC <i>Fn</i> ↑ in advanced AD/CIS than in HC <i>Fn</i> ↑ in the CRC group than in HC
Guo et al. [76]	China	qPCR	367 CRC, 100 NGC, and 258 HC	ST	<i>Fn</i> ↑ sensitivity and specificity to CRC <i>Fn</i> / probiotic bacteria, ↑ CRC diagnostic
Proença et al. [72]	Brazil	qPCR	27 AD/NAT and 43 CRC/NAT	FFT	<i>Fn</i> ↑ in FFT AD than in NAT <i>Fn</i> ↑ in FFT CRC than in NAT <i>Fn</i> ↑ in FFT CRC than in AD
Tunnsjø et al. [73]	Norway	qPCR	25 CRC, 25 AD, and 22 HC	ST and FFT	<i>Fn</i> ↑ in ST CRC than in AD and HC <i>Fn</i> ↑ in FFT CRC than in AD and HC
de Carvalho et al. [49]	Brazil	NGS and qPCR	152 CRC and 57 NAT	FFT and FFPE	<i>Fn</i> ↑ in CRC than in NAT
Butt et al. [81]	Europe	Flow cytometry	485 CRC and 485 HC	SR	No <i>Fn</i> protein antibody associations to CRC
Liu et al. [78]	China	qPCR	53 CRC and 45 HC	ST and Blood	<i>Fn</i> ↑ CRC than in HC
Grobbee et al. [77]	The Netherlands	qPCR	200 FIT +	ST	<i>Fn</i> ↑ CRC and high-grade dysplasia
<b>Prognostic factor</b>					
Flanagan et al. [67]	Europe (IE, CZ, DE)	qPCR	122 CRC, 52 AD, 31 ST, and 25 HC	FFT and ST	CRC patients with ↓ <i>Fn</i> levels had a longer OS than patients with ↑ <i>Fn</i> levels
Mima et al. [84]	USA	qPCR	1,069 CRC	FFPE	<i>Fn</i> ↑ with a ↑ cancer-specific mortality <i>Fn</i> ↑ in MSI-H, CIMP, and <i>BRAF</i> mutation
Li et al. [74]	China	qPCR and FISH	101 CRC and 101 NAT	FFT and FFPE	<i>Fn</i> ↑ with lymph node metastasis
Sun et al. [88]	China	qPCR	152 CRC/NAT	FFT	<i>Fn</i> ↑ with CRC tissue, poorer tumor differentiation, deeper tumor invasion, lymph node metastasis, distant metastasis, and an advanced TNM stage
Yu et al. [91]	China	qPCR	296 CRC	FFT and FFPE	<i>Fn</i> ↑ in recurrent vs. nonrecurrent patients
Suehiro et al. [58]	Japan	ddPCR	60 HC, 30 AD/CIS, and 158 CRC	ST	<i>Fn</i> ↑ in CRC stages I–IV than in stage I
Yan et al. [87]	Japan	qRT-PCR	280 stage III/IV CRC	FFPE	<i>Fn</i> ↑ with tumor invasion, lymph node metastasis status, and distant metastasis
Lee et al. [83]	Korea	qPCR	242 CRC/NAT	FFT and FFPE	<i>Fn</i> ↑ in MSI-H and CIMP-H <i>Fn</i> ↑ with a ↓ survival in metastatic CRC
Yamaoka et al. [89]	Japan	ddPCR	100 CRC and 72 NAT	FFT	<i>Fn</i> ↑ in stage IV CRC than in NAT

**Table 1** (continued)

Study	Population	Methodology	Sample size	Specimen type	Findings
Chen et al. [86]	China	qPCR	91 CRC	FFPE	<i>Fn</i> ↑ lymph node metastasis, neurological invasion, vascular tumor, and MSI <i>Fn</i> ↑ associated with a shorter survival time
Kunzmann et al. [85]	Czech Republic	qPCR	190 CRC/NAT	FFT	<i>Fn</i> ↑ associated with a poorer prognosis and OS
de Carvalho et al. [49]	Brazil	NGS and qPCR	152 CRC/57 NAT	FFT and FFPE	<i>Fn</i> ↑ in proximal, depth of invasion, ↑ clinical stages, poor differentiation, MSI-H and <i>BRAF</i> mutation <i>Fn</i> ↑ correlated with a worse patient OS
Serna et al. [99]	Spain	RNA-ISH and qPCR	143 RCA	FFPE	<i>Fn</i> ↑ risk of relapse in nCRT
<b>Therapy response</b>					
Yu et al. [91]	China	qPCR	296 CRC, cell lines and mice	FFT and FFPE	<i>Fn</i> contributed to chemoresistance to oxaliplatin and 5-fluorouracil
Yan et al. [87]	Japan	qRT-PCR	280 stage III/IV CRC	FFPE	<i>Fn</i> ↓ patients benefit from chemotherapy (FOLFOX scheme)
Zhang et al. [92]	China	qPCR	94 CRC, cell lines and mice	FFPE	<i>Fn</i> ↑ <i>BIRC3</i> via the TLR4/NF-κB pathway <i>Fn</i> ↑ resistance to 5-fluorouracil by ↑ of <i>BIRC3</i> preclinically <i>Fn</i> ↑ resistance to 5-fluorouracil CRC patients

*Fn*, *F. nucleatum*; AD, adenomas; CIS, carcinoma in situ; HC, healthy controls; ANT, adjacent normal tissue; FFT, fresh frozen tissue; NGC, nongastrointestinal cancer; FFPE, formalin-fixed and paraffin-embedded; FIT, fecal immunochemical test; ST, stool (fecal); qPCR, quantitative real time polymerase chain reaction; FISH, fluorescence in situ hybridization; ddPCR, droplet digital polymerase chain reaction, qRT-PCR, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction; NGS, next-generation sequencing (16S rRNA sequencing); SR, serum; RNA-ISH, RNA in situ hybridization; RCA, rectal cancer; rDNA, ribosomal DNA; AUC, area under the curve; OS, overall survival; MMR, mismatch repair; nCRT, postneoadjuvant chemoradiotherapy.

#### *Fn* as a Risk Factor and Marker to Improve Diagnostic Efficiency

The identification of biomarkers that can accurately identify individuals at risk for development of precursor lesions or cancer is extremely important to increase the chances of early detection and treatment success, thus improving survival rates [69]. Besides, the identification of noninvasive cancer biomarkers is highly needed to decrease costs and discomfort for patients [9]. In this scenario, fecal samples, which can provide information of the mucosal microbial environment without the need for invasive procedures such as colonoscopies, seem to be an exciting approach [67, 68]. The identification of *F. nucleatum* enrichment during the premalignant stage of colorectal carcinogenesis begins to build a case for *F. nucleatum* as a pathogenic gut bacteria and a risk factor for CRC.

Six studies evaluating premalignant lesions from a total of 624 patients have suggested *Fn* as a promising biomarker for CRC development risk, since high levels of *Fn* have been consistently reported in patients with adeno-

mas compared to healthy subjects [58, 62, 67, 70–73]. Furthermore, 9 studies including a total of 1,238 CRC also showed high levels of *Fn* in CRC tissue compared to normal adjacent tissue from the same patients or compared to tissue from healthy subjects [49, 52, 58, 62, 67, 70, 72–74] (Table 1). The seminal study of Ito et al. [70] investigated the presence of *Fn* in premalignant colorectal lesions and CRC and found increasing levels of *Fn* from premalignant to cancer lesions and from the sigmoid colon to the cecum and in higher histological grades. Moreover, *Fn* was more frequently detected in CIMP-high premalignant lesions than in CIMP-low/zero lesions, suggesting that it may contribute to the progression of colorectal neoplasia [70]. This trend was consistently observed in different populations from different parts of the world and using distinct methodologies (Table 1).

Importantly, similar observations have been reported not only in preneoplastic and neoplastic tissue but also in stool samples, suggesting *Fn* detection as a potential non-invasive marker for CRC screening. Stool analyses from 9 studies with 863 CRC patients, 238 premalignant le-

sions patients, and 608 controls (no CRC patients or healthy subjects) revealed significant high *Fn* levels in stool from patients with CRC and premalignant lesions compared to controls [58, 62, 67, 71, 73, 75–78] (Table 1).

Particularly, in the subset of the 8 previous mentioned studies, the authors investigated *Fn* levels in DNA isolated directly from stool samples and demonstrated that *Fn* was significantly present at higher levels in samples from subjects with premalignant lesions than in samples from healthy subjects [58, 62, 71, 73, 76, 78] and in stool from CRC patients compared to stool from those with adenomas or controls [67, 75]. Liu et al. [78], besides finding higher levels of *Fn* DNA in stool from CRC patients than healthy subjects, also observed increased plasma levels of biomarkers of gut mucosal barrier dysfunction, suggesting their potential to monitor the development and progression of CRC [78] (Table 1).

A fecal immunochemical test is recommended as a noninvasive screening test; however, it shows a low sensitivity for advanced adenoma [30]. Wong et al. [71], besides showing a significant higher abundance of *Fn* in fecal samples from CRC or advanced adenoma patients compared to the control group, also showed that combining *Fn* positivity with fecal immunochemical test results significantly increased the sensitivity for advanced adenomas and CRC detection. Also, in the same line, Guo et al. [76] showed that *Fn* could play a role in microbiota dysbiosis by secreting antagonistic substances against probiotics bacteria and found that the altered ratio of *Fn* to important probiotic bacteria was identified as a valuable biomarker for screening, increasing the sensitivity and specificity for CRC early detection. Moreover, Grobbee et al. [77] found higher levels of *Fn* in CRC patients and those with high-grade dysplasia lesions compared to those who had normal mucosa under colonoscopy examination (Table 1).

Altogether, these results indicate that stool-based quantification of *Fn* might have an impact on the diagnostic, serving as a novel noninvasive diagnostic biomarker for CRC [69]. However, the feasibility of using the detection of *Fusobacteria* in fecal samples for early detection of colorectal lesions requires further validation. Similarly, other screening approaches, such as detection of antibodies that may arise in response to *F. nucleatum*-specific antigens, may allow paths for more studies to benefit patients with CRC [10, 79, 80]. Accordingly, Butt et al. [81] showed no *Fn* protein antibodies in the blood of CRC patients, suggesting that future prospective studies, specifically detecting *F. nucleatum* in stool or tissue biopsies, are needed to complement their findings (Table 1).

#### *FN as a Prognostic Factor*

Besides finding significant changes between normal and cancer tissue, as well as premalignant lesions, an array of studies consistently showed the potential prognostic biomarker utility of *F. nucleatum* (Table 1).

The association between *Fn* levels and a more aggressive disease was recently confirmed by a meta-analysis that depicted previous findings of a poorer survival rate in CRC patients with a high versus a low *F. nucleatum* abundance [82]. Lee et al. [83] found high *Fn* levels to be an independent negative prognostic factor for OS in metastatic CRC. Similarly, Flanagan et al. [67] found that patients with low *F. nucleatum* levels had a significantly longer overall survival than patients with moderate and high *Fn* levels, highlighting the potential of *Fn* detection as a prognostic determinant in CRC patients (Table 1). Mima et al. [84] assayed a large cohort of CRC patients ( $n = 1,069$ ) for the presence of *F. nucleatum* DNA in cancer tissue and observed that the amount of *F. nucleatum* was associated with a shorter survival, suggesting its role as a potential prognostic biomarker. Although they also found an association between high levels of *F. nucleatum* in colorectal tumor tissues with poorer overall survival, Kunzmann et al. [85] observed that the inclusion of *F. nucleatum* in risk prediction models did not improve the ability to identify patients who died, with disease pathology staging playing a more important role.

Besides investigating the association of *Fn* levels with patient survival, similar studies also measured the impact in other molecular and clinicopathological variables (Table 1). *Fn* was consistently associated with MSI-H [51, 84, 86], CIMP [83, 84], and *BRAF* mutations [51, 84]. Additionally, higher *Fn* levels were also associated with patients with positive lymph nodes metastases [74, 86–88], neurological invasion [86] and vascular tumor thrombus [86], a higher stage disease, and distant metastasis [58, 87–89] (Table 1).

These studies comprehensively show the impact of high levels of *F. nucleatum* on the prognosis of CRC, suggesting its use as a biomarker to anticipate patient outcomes (Table 1).

#### *FN and Therapy Response Prediction and Perspectives for Treatment Approaches*

Importantly, some studies are addressing the impact of *Fn* in CRC patient response to adjuvant therapies [90] (Table 1).

Evidence suggest a potential relationship between *Fn* and resistance to 5-fluorouracil chemotherapy (which is a standard treatment for advanced CRC patients) and ox-

aliplatin and no response to immunotherapy [91–94]. Zhang et al. [92] also observed, in advanced CRC patients who received standard 5- fluorouracil-based adjuvant chemotherapy, that a high *Fn* abundance is an independent risk factor for recurrence. Yan et al. [87] observed that patients with low levels of *Fn* benefit from adjuvant chemotherapy more than those with high *Fn* levels, in terms of disease-free survival, and it may be an effective adjuvant approach for preventing CRC metastasis and chemotherapy resistance (Table 1).

Other studies also investigated pathways that are activated by *Fn* and could be targets for treatment of *Fn*-related CRC [94, 95]. The development of anti-Fap2 antibodies could be used to treat *Fn*-positive tumors and may allow restoration of antitumoral immune detection and response [10, 68]. Moreover, *Fn*-enriched tumors demonstrate increased myeloid cells; this treatment would block myeloid cell migration and differentiation and can drive myeloid infiltration and intratumoral function, reducing inflammation and the development of CRC [10].

In addition to these strategies, modification of the tumor microenvironment by methods which stimulate the patient's own immune system to fight tumor cells by fecal transplantation is a novel and important topic that will shape CRC management in the future [10, 96–98].

## Conclusion

It is clear that the bacteria on the surface of the gastrointestinal mucosa dramatically influence the development and progression of CRC. However, its contribution to carcinogenesis remains complex. Herein, we gave special attention to *F. nucleatum* and addressed how it can modulate CRC development and alter the immune re-

sponse against cancer. The directions for future research will aim to understand the diverse contributions of bacteria and their metabolites to carcinogenesis. Modulation of the microbiota has already been proven to be of high clinical relevance and it will continue to open new paths for the prevention and treatment of CRC.

## Acknowledgment

We thank the Barretos Cancer Hospital, Public Ministry of Labor, for funding the present study.

## Statement of Ethics

This work is exempt from the requirement of ethical committee approval because it is a review article.

## Conflict of Interest Statement

The authors have no conflict of interests to declare.

## Funding Sources

A.C.C. is supported by the Public Ministry of Labor Campinas (Research, Prevention, and Education of Occupational Cancer) in Campinas, SP, Brazil. J.G.D. is supported by CAPES, and R.M.R. is the recipient of a CNPq Productivity (Brazil) fellowship.

## Author Contributions

R.M.R. conceived the original idea and led the writing. J.G.D. wrote this article and made the figures. A.C.C., D.P.G., and R.M.R. contributed with ideas, editing, and review of this paper. All of the authors critically reviewed and approved the final version of this work.

## References

- 1 Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394–424.
- 2 Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017 Apr;66(4):683–91.
- 3 Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RG, Barzi A, et al. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017 May;67(3):177–93.
- 4 Bosetti C, Bertuccio P, Malvezzi M, Levi F, Chatenoud L, Negri E, et al. Cancer mortality in Europe, 2005–2009, and an overview of trends since 1980. *Ann Oncol*. 2013 Oct;24(10):2657–71.
- 5 Bosetti C, Malvezzi M, Chatenoud L, Negri E, Levi F, La Vecchia C. Trends in colorectal cancer mortality in Japan, 1970–2000. *Int J Cancer*. 2005 Jan;113(2):339–41.
- 6 Chatenoud L, Bertuccio P, Bosetti C, Malvezzi M, Levi F, Negri E, et al. Trends in mortality from major cancers in the Americas: 1980–2010. *Ann Oncol*. 2014 Sep;25(9):1843–53.
- 7 Souza DL, Jerez-Roig J, Cabral FJ, de Lima JR, Rotalira MK, Costa JA. Colorectal cancer mortality in Brazil: predictions until the year 2025 and cancer control implications. *Dis Colon Rectum*. 2014 Sep;57(9):1082–9.
- 8 Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, et al. Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2015 Nov;1(1):15065.
- 9 Yu J, Feng Q, Wong SH, Zhang D, Liang QY, Qin Y, et al. Metagenomic analysis of faecal microbiome as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for colorectal cancer. *Gut*. 2017 Jan;66(1):70–8.

- 10 Brennan CA, Garrett WS. Gut microbiota, inflammation, and colorectal cancer. *Annu Rev Microbiol.* 2016 Sep;70(1):395–411.
- 11 Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome.* 2015 Jul;3(1):31.
- 12 O'Shannessy DJ, Nicolaides NC, Somers EB. Eisai Inc. Methods for determining prognosis of colorectal cancer. United States patent US 10,539,565. 2020 Jan 21.
- 13 Nekarda H, Friederichs J, Holzmann B, Rosenberg R, Reeve AE, Black MA, et al. PACIFIC EDGE Ltd. Methods for treating colorectal cancer using prognostic genetic markers. United States patent application US 16/552,737. 2020 May 7.
- 14 Petrelli F, Tomasello G, Borgonovo K, Ghidini M, Turati L, Dallera P, et al. Prognostic Survival Associated With Left-Sided vs Right-Sided Colon Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol.* 2017 Feb; 3(2):211–9.
- 15 Weiss JM, Pfau PR, O'Connor ES, King J, LoConte N, Kennedy G, et al. Mortality by stage for right- versus left-sided colon cancer: analysis of surveillance, epidemiology, and end results—Medicare data. *J Clin Oncol.* 2011 Nov; 29(33):4401–9.
- 16 Loupakis F, Yang D, Yau L, Feng S, Cremolini C, Zhang W, et al. Primary tumor location as a prognostic factor in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2015 Feb; 107(3):dju427. <https://doi.org/10.1093/jnci/dju427>.
- 17 Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science.* 2006 Jun;312(5778):1355–9.
- 18 Kirby JA, Bone M, Robertson H, Hudson M, Jones DE. The number of intraepithelial T cells decreases from ascending colon to rectum. *J Clin Pathol.* 2003 Feb;56(2):158.
- 19 Lowichik A, Weinberg AG. A quantitative evaluation of mucosal eosinophils in the pediatric gastrointestinal tract. *Mod Pathol.* 1996 Feb;9(2):110–4.
- 20 Selby WS, Janosy G, Jewell DP. Immunohistological characterisation of intraepithelial lymphocytes of the human gastrointestinal tract. *Gut.* 1981 Mar;22(3):169–76.
- 21 Tran B, Kopetz S, Tie J, Gibbs P, Jiang ZQ, Lieu CH, et al. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer.* 2011 Oct;117(20): 4623–32.
- 22 Bufill JA. Colorectal cancer: evidence for distinct genetic categories based on proximal or distal tumor location. *Ann Intern Med.* 1990 Nov;113(10):779–88.
- 23 Distler P, Holt PR. Are right- and left-sided colon neoplasms distinct tumors? *Dig Dis.* 1997 Jul-Oct;15(4-5):302–11.
- 24 Hutchins G, Southward K, Handley K, Magill L, Beaumont C, Stahlschmidt J, et al. Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2011 Apr;29(10):1261–70.
- 25 Iacopetta B. Are there two sides to colorectal cancer? *Int J Cancer.* 2002 Oct;101(5):403–8.
- 26 Sears CL, Garrett WS. Microbes, microbiota, and colon cancer. *Cell Host Microbe.* 2014 Mar;15(3):317–28.
- 27 Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science.* 2013 Mar; 339(6127):1546–58.
- 28 Dos Santos W, Sobanski T, de Carvalho AC, Evangelista AF, Matsushita M, Berardinelli GN, et al. Mutation profiling of cancer drivers in Brazilian colorectal cancer. *Sci Rep.* 2019 Sep;9(1):13687.
- 29 Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990 Jun; 61(5):759–67.
- 30 Davies RJ, Miller R, Coleman N. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. *Nat Rev Cancer.* 2005 Mar;5(3): 199–209.
- 31 Yamane I, Scapulatempo-Neto C, Reis RM, Guimarães DP. Serrated pathway in colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol.* 2014 Mar;20(10):2634–40.
- 32 McLean MH, Murray GI, Stewart KN, Norrie G, Mayer C, Hold GL, et al. The inflammatory microenvironment in colorectal neoplasia. *PLoS One.* 2011 Jan;6(1):e15366.
- 33 Yang S, Farraye FA, Mack C, Posnik O, O'Brien MJ. BRAF and KRAS Mutations in hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colorectum: relationship to histology and CpG island methylation status. *Am J Surg Pathol.* 2004 Nov;28(11):1452–9.
- 34 Stefanius K, Ylitalo L, Tuomisto A, Kuivila R, Kantola T, Sirmio P, et al. Frequent mutations of KRAS in addition to BRAF in colorectal serrated adenocarcinoma. *Histopathology.* 2011 Apr;58(5):679–92.
- 35 Vilar E, Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer—the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010 Mar;7(3):153–62.
- 36 Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015 Nov;21(11):1350–6.
- 37 Singh RK, Chang HW, Yan D, Lee KM, Ucmak D, Wong K, et al. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J Transl Med.* 2017 Apr;15(1):73.
- 38 Louis P, Hold GL, Flint HJ. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat Rev Microbiol.* 2014 Oct;12(10):661–72.
- 39 Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012 Sep;9(10):577–89.
- 40 Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano GA, Gasbarrini A, et al. What is the healthy gut microbiota composition? a changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms.* 2019 Jan; 7(1):14.
- 41 Walker AW, Ince J, Duncan SH, Webster LM, Holtrop G, Ze X, et al. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J.* 2011 Feb; 5(2):220–30.
- 42 David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature.* 2014 Jan;505(7484): 559–63.
- 43 Aune D, Chan DS, Lau R, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, et al. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ.* 2011 Nov;343 nov10 1:d6617.
- 44 Chen HM, Yu YN, Wang JL, Lin YW, Kong X, Yang CQ, et al. Decreased dietary fiber intake and structural alteration of gut microbiota in patients with advanced colorectal adenoma. *Am J Clin Nutr.* 2013 May;97(5):1044–52.
- 45 Marmot M, Atinmo T, Byers T, Chen J, Hirohata T, Jackson A, et al. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington: AICR; 2007.
- 46 Ou J, Carbonero F, Zoetendal EG, DeLany JP, Wang M, Newton K, et al. Diet, microbiota, and microbial metabolites in colon cancer risk in rural Africans and African Americans. *Am J Clin Nutr.* 2013 Jul;98(1):111–20.
- 47 Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR, Dutilh BE. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat Rev Microbiol.* 2012 Jun;10(8):575–82.
- 48 Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, Michaud M, Duke F, Earl AM, et al. Genomic analysis identifies association of Fusobacterium with colorectal carcinoma. *Genome Res.* 2012 Feb;22(2):292–8.
- 49 de Carvalho AC, de Mattos Pereira L, Datorre JG, Dos Santos W, Berardinelli GN, Matsushita MM, et al. Microbiota profile and impact of Fusobacterium nucleatum in colorectal cancer patients of Barretos Cancer Hospital. *Front Oncol.* 2019 Aug;9:813.
- 50 Mima K, Sukawa Y, Nishihara R, Qian ZR, Yamauchi M, Inamura K, et al. Fusobacterium nucleatum and T cells in colorectal carcinoma. *JAMA Oncol.* 2015 Aug;1(5):653–61.
- 51 Xu S, Yin W, Zhang Y, Lv Q, Yang Y, He J. Foes or Friends? Bacteria Enriched in the Tumor Microenvironment of Colorectal Cancer. *Cancers (Basel).* 2020 Feb;12(2):372.
- 52 Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, Drolini L, Krzywinski M, Strauss J, et al. Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res.* 2012 Feb;22(2):299–306.

- 53 Zackular JP, Baxter NT, Iverson KD, Sadler WD, Petrosino JF, Chen GY, et al. The gut microbiome modulates colon tumorigenesis. *MBio*. 2013 Nov;4(6):e00692–13.
- 54 McCoy AN, Araújo-Pérez F, Azcárate-Peril A, Yeh JJ, Sandler RS, Keku TO. Fusobacterium is associated with colorectal adenomas. *PLoS One*. 2013;8(1):e53653.
- 55 Lucas C, Barnich N, Nguyen HT. Microbiota, inflammation and colorectal cancer. *Int J Mol Sci*. 2017 Jun;18(6):1310.
- 56 Signat B, Roques C, Poulet P, Duffaut D. Fusobacterium nucleatum in periodontal health and disease. *Curr Issues Mol Biol*. 2011;13(2): 25–36.
- 57 Warren RL, Freeman DJ, Pleasance S, Watson P, Moore RA, Cochrane K, et al. Co-occurrence of anaerobic bacteria in colorectal carcinomas. *Microbiome*. 2013 May;1(1):16.
- 58 Suehiro Y, Sakai K, Nishioka M, Hashimoto S, Takami T, Higaki S, et al. Highly sensitive stool DNA testing of Fusobacterium nucleatum as a marker for detection of colorectal tumours in a Japanese population. *Ann Clin Biochem*. 2017 Jan;54(1):86–91.
- 59 Copenhagen-Glazer S, Sol A, Abed J, Naor R, Zhang X, Han YW, et al. Fap2 of Fusobacterium nucleatum is a galactose-inhibitable adhesin involved in coaggregation, cell adhesion, and preterm birth. *Infect Immun*. 2015 Mar;83(3):1104–13.
- 60 Han YW, Ikegami A, Rajanna C, Kawsar HI, Zhou Y, Li M, et al. Identification and characterization of a novel adhesin unique to oral fusobacteria. *J Bacteriol*. 2005 Aug;187(15): 5330–40.
- 61 Brennan CA, Garrett WS. Fusobacterium nucleatum - symbiont, opportunist and onco-bacterium. *Nat Rev Microbiol*. 2019 Mar; 17(3):156–66.
- 62 Kostic AD, Chun E, Robertson L, Glickman JN, Gallini CA, Michaud M, et al. Fusobacterium nucleatum potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe*. 2013 Aug;14(2):207–15.
- 63 Tahara T, Yamamoto E, Suzuki H, Maruyama R, Chung W, Garriga J, et al. Fusobacterium in colonic flora and molecular features of colorectal carcinoma. *Cancer Res*. 2014 Mar; 74(5):1311–8.
- 64 Rubinstein MR, Wang X, Liu W, Hao Y, Cai G, Han YW. Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ $\beta$ -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe*. 2013 Aug; 14(2):195–206.
- 65 Abed J, Emgård JE, Zamir F, Faroja M, Al-mogy G, Grenov A, et al. Fap2 mediates Fusobacterium nucleatum colorectal adenocarcinoma enrichment by binding to tumor-expressed Gal-GalNAC. *Cell Host Microbe*. 2016 Aug;20(2):215–25.
- 66 Yang Y, Weng W, Peng J, Hong L, Yang L, Toyama Y, et al. Fusobacterium nucleatum Increases Proliferation of Colorectal Cancer Cells and Tumor Development in Mice by Activating Toll-Like Receptor 4 Signaling to Nuclear Factor- $\kappa$ B, and Up-regulating Expression of MicroRNA-21. *Gastroenterology*. 2017 Mar;152(4):851–866.e24.
- 67 Flanagan L, Schmid J, Ebert M, Soucek P, Kunicka T, Liska V, et al. Fusobacterium nucleatum associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer and disease outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014 Aug;33(8):1381–90.
- 68 Gur C, Ibrahim Y, Isaacson B, Yamin R, Abed J, Gamliel M, et al. Binding of the Fap2 protein of Fusobacterium nucleatum to human inhibitory receptor TIGIT protects tumors from immune cell attack. *Immunity*. 2015 Feb; 42(2):344–55.
- 69 Liang Q, Chiu J, Chen Y, Huang Y, Higashimori A, Fang J, et al. Fecal bacteria act as novel biomarkers for noninvasive diagnosis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2017 Apr; 23(8):2061–70.
- 70 Ito M, Kanno S, Noshio K, Sukawa Y, Mitsuhashi K, Kurihara H, et al. Association of Fusobacterium nucleatum with clinical and molecular features in colorectal serrated pathway. *Int J Cancer*. 2015 Sep;137(6):1258–68.
- 71 Wong SH, Kwong TN, Chow TC, Luk AK, Dai RZ, Nakatsu G, et al. Quantitation of faecal Fusobacterium improves faecal immunochemical test in detecting advanced colorectal neoplasia. *Gut*. 2017 Aug;66(8):1441–8.
- 72 Proença MA, Biselli JM, Succi M, Severino FE, Berardinelli GN, Caetano A, et al. Relationship between Fusobacterium nucleatum, inflammatory mediators and microRNAs in colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2018 Dec;24(47):5351–65.
- 73 Tunsjø HS, Gundersen G, Rangnes F, Noone JC, Endres A, Bemanian V. Detection of Fusobacterium nucleatum in stool and colonic tissues from Norwegian colorectal cancer patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019 Jul;38(7):1367–76.
- 74 Li YY, Ge QX, Cao J, Zhou YJ, Du YL, Shen B, et al. Association of Fusobacterium nucleatum infection with colorectal cancer in Chinese patients. *World J Gastroenterol*. 2016 Mar;22(11):3227–33.
- 75 Fukugaiti MH, Ignacio A, Fernandes MR, Ribeiro Júnior U, Nakano V, Avila-Campos MJ. High occurrence of Fusobacterium nucleatum and Clostridium difficile in the intestinal microbiota of colorectal carcinoma patients. *Braz J Microbiol*. 2015 Oct-Dec;46(4):1135–40.
- 76 Guo S, Li L, Xu B, Li M, Zeng Q, Xiao H, et al. A simple and novel fecal biomarker for colorectal cancer: ratio of Fusobacterium nucleatum to probiotics populations, based on their antagonistic effect. *Clin Chem*. 2018 Sep;64(9):1327–37.
- 77 Grobbee EJ, Lam SY, Fuhler GM, Blakaj B, Konstantinov SR, Bruno MJ, et al. First steps towards combining faecal immunochemical testing with the gut microbiome in colorectal cancer screening. *United European Gastroenterol J*. 2020 Apr;8(3):293–302.
- 78 Liu X, Cheng Y, Shao L, Ling Z. Alterations of the Predominant Fecal Microbiota and Disruption of the Gut Mucosal Barrier in Patients with Early-Stage Colorectal Cancer. *BioMed Res Int*. 2020 Mar;2020:2948282.
- 79 Wang HF, Li LF, Guo SH, Zeng QY, Ning F, Liu WL, et al. Evaluation of antibody level against Fusobacterium nucleatum in the serological diagnosis of colorectal cancer. *Sci Rep*. 2016 Sep;6(1):33440.
- 80 Waniczek D, Lorenc Z, Śnietura M, Wesecki M, Kopec A, Muc-Wierzgoń M. Tumor-associated macrophages and regulatory T cells infiltration and the clinical outcome in colorectal cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2017 Oct;65(5):445–54.
- 81 Butt J, Jenab M, Pawlita M, Overvad K, Tjonneland A, Olsen A, et al. Antibody Responses to Fusobacterium nucleatum Proteins in Pre-diagnostic Blood Samples are Not Associated with Risk of Developing Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2019 Sep;28(9):1552–5.
- 82 Gethings-Behncke C, Coleman HG, Jordao HW, Longley DB, Crawford N, Murray LJ, et al. Fusobacterium nucleatum in the colorectum and its association with cancer risk and survival: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2020 Mar;29(3):539–48.
- 83 Lee DW, Han SW, Kang JK, Bae JM, Kim HP, Won JK, et al. Association between Fusobacterium nucleatum, pathway mutation, and patient prognosis in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2018 Oct;25(11):3389–95.
- 84 Mima K, Nishihara R, Qian ZR, Cao Y, Sukawa Y, Nowak JA, et al. Fusobacterium nucleatum in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. *Gut*. 2016 Dec;65(12): 1973–80.
- 85 Kunzmann AT, Proença MA, Jordao HW, Jiraskova K, Schneiderova M, Levy M, et al. Fusobacterium nucleatum tumor DNA levels are associated with survival in colorectal cancer patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019 Oct;38(10):1891–9.
- 86 Chen Y, Lu Y, Ke Y, Li Y. Prognostic impact of the Fusobacterium nucleatum status in colorectal cancers. *Medicine (Baltimore)*. 2019 Sep;98(39):e17221.
- 87 Yan X, Liu L, Li H, Qin H, Sun Z. Clinical significance of Fusobacterium nucleatum, epithelial-mesenchymal transition, and cancer stem cell markers in stage III/IV colorectal cancer patients. *OncoTargets Ther*. 2017 Oct; 10:5031–46.

- 88 Sun Y, An QM, Tian XY, Wang ZL, Guan XY, Dong B, et al. *Fusobacterium nucleatum* infection is correlated with tumor metastasis and postoperative survival of colorectal cancer patients in China. *Transl Cancer Res.* 2016;5(5):579–88.
- 89 Yamaoka Y, Suehiro Y, Hashimoto S, Hoshida T, Fujimoto M, Watanabe M, et al. *Fusobacterium nucleatum* as a prognostic marker of colorectal cancer in a Japanese population. *J Gastroenterol.* 2018 Apr;53(4):517–24.
- 90 Chen S, Su T, Zhang Y, Lee A, He J, Ge Q, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal cancer metastasis by modulating KRT7-AS/KRT7. *Gut Microbes.* 2020 May; 11(3):511–25.
- 91 Yu T, Guo F, Yu Y, Sun T, Ma D, Han J, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes chemoresistance to colorectal cancer by modulating autophagy. *Cell.* 2017 Jul;170(3):548–563.e16.
- 92 Zhang S, Yang Y, Weng W, Guo B, Cai G, Ma Y, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes chemoresistance to 5-fluorouracil by upregulation of BIRC3 expression in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019 Jan;38(1):14.
- 93 Temraz S, Nassar F, Nasr R, Charafeddine M, Mukherji D, Shamseddine A. Gut microbiome: a promising biomarker for immunotherapy in colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2019 Aug;20(17):4155.
- 94 Chen Y, Peng Y, Yu J, Chen T, Wu Y, Shi L, et al. Invasive *Fusobacterium nucleatum* activates beta-catenin signaling in colorectal cancer via a TLR4/P-PAK1 cascade. *Oncotarget.* 2017 May;8(19):31802–14.
- 95 Haruki K, Kosumi K, Hamada T, Twombly TS, Väyrynen JP, Kim SA, et al. Association of autophagy status with amount of *Fusobacterium nucleatum* in colorectal cancer. *J Pathol.* 2020 Apr;250(4):397–408.
- 96 Chen D, Wu J, Jin D, Wang B, Cao H. Fecal microbiota transplantation in cancer management: current status and perspectives. *Int J Cancer.* 2019 Oct;145(8):2021–31.
- 97 Shang FM, Liu HL. *Fusobacterium nucleatum* and colorectal cancer: A review. *World J Gastrointest Oncol.* 2018 Mar;10(3):71–81.
- 98 Fong W, Li Q, Yu J. Gut microbiota modulation: a novel strategy for prevention and treatment of colorectal cancer. *Oncogene.* 2020 Jun;39(26):4925–43.
- 99 Serna G, Ruiz-Pace F, Hernando J, Alonso L, Fasani R, Landolfi S, et al. *Fusobacterium nucleatum* persistence and risk of recurrence after preoperative treatment in locally advanced rectal cancer. *Ann Oncol.* 2020 Oct;31(10):1366–75.