



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
Campus de São José do Rio Preto

Programa de Pós-Graduação em Biociências

Marcela Alcântara Proença

Avaliação da influência de *Fusobacterium nucleatum* na  
modulação de citocinas e microRNAs em adenoma e câncer  
colorretal

São José do Rio Preto, SP  
2017

Marcela Alcântara Proença

Avaliação da influência de *Fusobacterium nucleatum* na  
modulação de citocinas e microRNAs em adenoma e câncer  
colorretal

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, área de concentração em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Elizabete Silva

Co-orientador: Dr. David J. Hughes

São José do Rio Preto, SP  
2017

Proença, Marcela Alcântara.

Avaliação da influência de *Fusobacterium nucleatum* na modulação de citocinas e microRNAs em adenoma e câncer colorretal / Marcela Alcântara Proença. -- São José do Rio Preto, 2017  
131 f. : il., tabs.

Orientador: Ana Elizabete Silva

Coorientador: David J. Hughes

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética humana. 2. Cólon (Anatomia) - Câncer. 3. *Fusobacterium nucleatum*. 4. Adenocarcinoma. 5. Inflamação. 6. Citocinas. 7. MicroRNAs.  
I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 616-006.6

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Marcela Alcântara Proença

Avaliação da influência de *Fusobacterium nucleatum* na  
modulação de citocinas e microRNAs em adenoma e câncer  
colorretal

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Comissão Examinadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Elizabete Silva  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientadora

Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro  
USF – Bragança Paulista

Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis  
HC - Barretos

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Débora Aparecida Pires de Campos Zuccari  
FAMERP – Rio Preto

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília De Freitas Calmon Saiki  
UNESP – Rio Preto

São José do Rio Preto  
03 de março de 2017

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Humana, do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) de São José do Rio Preto - SP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Elizabete Silva e no *Laboratory of Physiology & Medical Physics Department of RCSI - Royal College of Surgeons in Ireland*, em Dublin (Irlanda), sob co-orientação do Dr. David J. Hughes, com o apoio financeiro em forma de bolsa de estudos fornecida pela Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) e auxílio à pesquisa da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (Processo n.º 2012/15036-8) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq (Processo n.º 474776/2013-1).

*“À minha mãe, Maria  
Angélica, por seu amor  
incondicional, à minha irmã,  
Maíra, por todo seu apoio,  
cumplicidade e amizade, e ao  
meu namorado, Renato, por  
todo amor, companheirismo e  
compreensão. Vocês são a base  
de tudo e essenciais em cada  
etapa da minha vida.  
Amo vocês!”*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por seu amor e graça infinitos e por ter me dado este presente maravilhoso que é a vida. Agradeço por estar sempre comigo, me proporcionando saúde, força, sabedoria e discernimento, sempre me guiando para que eu pudesse chegar até aqui. Obrigada também por ter colocado pessoas em meu caminho que me inspiraram, ajudaram e encorajaram a ser quem eu sou hoje.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Elizabete Silva pela orientação, por tudo que me ensinou durante esses anos, pelos momentos de dedicação, paciência, compreensão e incentivo, e pelo apoio à minha formação acadêmica e profissional, contribuindo significativamente para que eu desenvolvesse um pensamento crítico e uma visão científica.

Ao Dr. David J. Hughes pela co-orientação e conhecimento compartilhado, apoio, incentivo, acolhimento e disponibilização do *Laboratory of Physiology & Medical Physics Department of RCSI - Royal College of Surgeons in Ireland*, em Dublin (Irlanda) para realização de análises moleculares, importante para minha formação.

À banca examinadora Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro, Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Débora Aparecida Pires de Campos Zuccari e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marília de Freitas Calmon Saiki por terem aceitado participar desta análise e principalmente por contribuírem para o enriquecimento deste trabalho.

À banca examinadora do exame geral de qualificação Profa. Dra. Marília de Freitas Calmon Saiki e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Flávia Cristina Rodrigues Lisoni pelas suas valiosas sugestões que permitiram melhorar esse trabalho.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biociências do IBILCE / UNESP, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Claudia Márcia Aparecida Carareto, por todo apoio, possibilitando a realização desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências - IBILCE / UNESP, bem como a todos os professores, alunos e funcionários, os quais contribuíram de maneira importante para minha formação.

À agência de fomento CAPES pelo apoio financeiro na forma de bolsa de estudos e às agências de fomento FAPESP e CNPq que contribuíram e apoiaram financeiramente a execução dessa pesquisa.

À instituição IBILCE / UNESP que forneceu o espaço físico e todo o apoio necessário, possibilitando o desenvolvimento dessa pesquisa.

À toda equipe do *Laboratory of Physiology & Medical Physics Department of RCSI - Royal College of Surgeons in Ireland*, em Dublin (Irlanda) que me acolheu durante minha estadia, me apoiando e auxiliando sempre que necessário.

Ao Prof. Dr. Fábio Eduardo Severino pela análise de redes de interação de proteínas e disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

Ao Prof. Dr. Lucas Trevizani Rasmussen por gentilmente doar algumas sondas de miRNAs.

À toda a equipe de profissionais (médicos, enfermeiros e demais funcionários) do serviço de atendimento ambulatorial, clínico e cirúrgico da Proctologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto, pelas amostras de biópsias e/ou fragmentos cirúrgicos intestinais.

Aos pacientes que indiretamente participaram desta pesquisa.

Às queridas amigas do Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Humana, onde este trabalho foi realizado: Aline, Ana Flávia, Ayla, Fernanda, Joice e Nathália, que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho. Agradeço a todas de coração pela amizade, convivência e conhecimento compartilhados, que fizeram desta etapa da minha vida muito mais agradável. Tenham certeza que sem o apoio de vocês eu não teria conseguido. Amizades que levarei para a vida toda!

À todos os meus amigos que participaram de alguma forma desta etapa, proporcionando momentos de descontração e alegrias, tornando esta jornada muito mais agradável. Difícil citar os nomes de todos, mas sintam-se presentes neste momento da minha vida.

À minha mãe Maria Angélica que é o meu exemplo de vida. Uma mulher guerreira, que sempre esteve ao meu lado, me proporcionando todo apoio necessário para que eu finalizasse mais essa etapa. Sempre me incentivando com muito amor, paciência e extrema dedicação. Não tenho palavras para descrever sua importância em minha vida. Agradeço pela educação de qualidade que me proporcionou chegar até aqui, pelo incentivo, compreensão, amizade e principalmente por seu amor incondicional, que foram essenciais para essa conquista. Mãe, amo você!

À minha irmã Maíra, que me surpreende a cada dia com sua determinação, força e coragem. Sempre ao meu lado, me apoiando e aconselhando com muito amor e paciência. Agradeço pelo incentivo, compreensão, momentos de cumplicidade, amizade e amor, que foram essenciais para que eu chegasse até aqui. Sei que posso contar com ela sempre que precisar, e ela comigo. Amo você!

Ao meu namorado Renato, por todo amor, apoio, incentivo, compreensão, por estar sempre ao meu lado me amparando e me proporcionando segurança. Eu sei que sempre poderei contar com ele, e ele comigo. Agradeço a Deus todos os dias por tê-lo colocado em minha vida. Obrigada por tudo meu amor, seu apoio foi essencial para que eu conseguisse finalizar mais essa etapa. Amo você!

Ao meu Pai, que mesmo longe, fez parte dessa conquista, me proporcionando educação de qualidade que possibilitou minha chegada até aqui. Amo você!

À toda minha família que sempre esteve presente nas minhas decisões e sempre me incentivou e torceu pelo meu sucesso.

Enfim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para a minha formação, seja pela ajuda constante ou por uma palavra de amizade.

*“A convicção de ignorância é a porta de  
entrada do templo da sabedoria.”*

*C. H. Spurgeon*

## RESUMO

O câncer colorretal (CCR) está associado à patógenos como *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*), que podem proporcionar um microambiente favorável para a tumorigênese em decorrência de alterações inflamatórias. Visando compreender o efeito de *Fn* no microambiente de lesões intestinais, avaliou-se a quantificação relativa (RQ) dessa bactéria em amostras de tecido de adenoma colorretal (ACR) e CCR, bem como sua correlação com a expressão de RNAm de mediadores inflamatórios (*TLR2*, *TLR4*, *NFKB1*, *TNF*, *IL1B*, *IL6* e *IL8*) e de microRNAs (miRNAs) (*miR-21-3p*, *miR-22-3p*, *miR-28-5p*, *miR-34a-5p* e *miR-135b-5p*) envolvidos na resposta inflamatória e carcinogênese. Também delineou-se uma rede de interação miRNA:RNAm para auxiliar na compreensão da participação dos miRNAs no processo carcinogênico. Foram extraídos o DNA e o RNA de 27 amostras de tecido fresco de ACR e 43 de CCR e suas respectivas normais adjacentes. Os níveis de DNA de *Fn* e de RNAm dos mediadores inflamatórios e miRNAs foram quantificados por PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Níveis elevados de *Fn* foram detectados em ACR (RQ=5,64) e mais acentuadamente em CCR (RQ=8,67). Observou-se expressão elevada do RNAm de *TLR4*, *IL1B*, *IL8* e *miR-135b* em ACR, e de *TLR2*, *IL1B*, *IL6*, *IL8*, *miR-34a* e *miR-135b* em CCR em comparação com seus respectivos tecidos normais. Além disso, *miR-22* e *miR-28* foram encontrados com expressão reduzida em CCR. A expressão de RNAm de *IL1B*, *IL6*, *IL8* e *miR-22* foi positivamente correlacionada com a quantificação de *Fn* em CCR. A expressão de RNAm de *miR-135b* e *TNF* foi inversamente correlacionada no tecido tumoral, sugerindo *TNF* como um possível alvo deste miRNA em CCR. As interações miRNA:RNAm sugerem que a expressão aumentada de *miR-34a* em CCR regula *TLR4* favorecendo o reconhecimento de *Fn* por *TLR2*, que encontra-se mais expresso no

tecido tumoral, enquanto em ACR este reconhecimento deve ser principalmente via *TLR4*. Esses resultados sugerem um aumento da colonização de *Fn* durante a progressão da via adenoma-adenocarcinoma indicando-a como um fator de risco para a carcinogênese colorretal. A abundância dessa bactéria no intestino promove o aumento da expressão de mediadores inflamatórios como *IL1B*, *IL6* e *IL8* através do seu reconhecimento por *TLR2* ou *TLR4*, conforme a interação com miRNAs diferentemente expressos.

Palavras-chave: Câncer Colorretal; Adenoma Colorretal; *Fusobacterium nucleatum*; Inflamação; Citocinas; microRNAs.

## **ABSTRACT**

*Colorectal cancer (CRC) is associated with pathogens such as Fusobacterium nucleatum (Fn), which can provide a favorable microenvironment for tumorigenesis due to inflammatory changes. In order to understand the effect of Fn on the microenvironment of intestinal lesions, the relative quantification (RQ) of this bacterium was evaluated in samples of colorectal adenoma tissue (CRA) and CRC, as well as its correlation with the mRNA expression of inflammatory mediators (TLR2, TLR4, NFKB1, TNF, IL1B, IL6 e IL8), and microRNAs (miR-21-3p, miR-22-3p, miR-28-5p, miR-34a-5p e miR-135b-5p) involved in the inflammatory response and carcinogenesis. A miRNA: mRNA interaction network was also delineated to aid in the understanding of miRNA participation in the carcinogenic process. DNA and RNA were extracted from 27 fresh tissue samples of CRA and 43 of CRC and their respective adjacent normal ones. Fn and mRNA levels of the inflammatory mediators and miRNAs were quantified by quantitative real-time PCR (qPCR). Elevated levels of Fn were detected in CRA (RQ=5.64 and more markedly in CRC (RQ=8.67). High mRNA expression of TLR4, IL1B, IL8 and miR-135b in CRA, and of TLR2, IL1B, IL6, IL8, miR-34a and miR-135b in CRC were observed in comparison with their respective normal tissues. In addition, miR-22 and miR-28 were found downregulated in CRC. The mRNA expression of IL1B, IL6, IL8 and miR-22 was positively correlated with the quantification of Fn in CRC. The mRNA expression of miR-135b and TNF was inversely correlated in tumor tissue, suggesting TNF as a possible target of this miRNA in CRC. The interaction miRNA:mRNA network suggest that the increased expression of miR-34a in CRC can regulates TLR4 favoring the recognition of Fn by TLR2, which is upregulated in tumor tissue, whereas in CRA this recognition must be mainly via TLR4. These results suggest an increase in Fn colonization during the*

*progression of the adenoma-adenocarcinoma pathway, indicating it as a risk factor for colorectal carcinogenesis. The abundance of this bacterium in the gut promotes increased expression of inflammatory mediators such as IL1B, IL6 and IL8 through their recognition by TLR2 or TLR4, depending on the interaction with differentially expressed miRNAs.*

*Keywords: Colorectal Cancer; Colorectal Adenoma; Fusobacterium nucleatum; Inflammation; Cytokines; microRNAs.*

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Mecanismo de desenvolvimento de câncer colorretal causado por um acúmulo de mutações em oncogenes e genes supressores de tumor. Mutações em *APC* (*adenomatous polyposis coli*), *B-catenina* ou outros componentes dessa via, medeiam a transição de células pré-neoplásicas únicas para *ACF* (*aberrant crypt foci*) e, em seguida, para adenoma e carcinoma colorretal. A inflamação crônica, caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias podem induzir mutações em oncogenes e genes supressores de tumor (*APC*, *p53*, *K-ras*) e instabilidade genômica por meio de vários mecanismos. A inflamação persistente facilita a promoção do tumor ativando a proliferação e as propriedades anti-apoptóticas das células pré-malignas, bem como a progressão do tumor e metástases (modificado de TERZIC et al., 2010).....**27**

**Figura 2.** Interação entre a microbiota e o hospedeiro na tumorigênese. Em estado saudável, a microbiota intestinal está em “Eubiose”, mantendo a homeostase intestinal pela produção de vários metabólitos e produtos bacterianos, que promovem o equilíbrio imune. Vários fatores ambientais como dieta, inflamação, estresse ou genética do hospedeiro influenciam a composição microbiana e podem causar “Disbiose microbiana”. Esta microbiota pode favorecer a progressão neoplásica através de várias atividades carcinogênicas (liberação de toxinas e metabólitos), que afetam a integridade do DNA das células epiteliais e a transformação celular. Com isso, a integridade da barreira epitelial é comprometida, aumentando ainda mais a captação bacteriana, a ativação das células imunes e a liberação de mediadores inflamatórios, contribuindo assim para a progressão neoplásica. ROS: *Reactive oxygen species*, RNS: *Reactive nitrogen species* (modificado de ALLEN-VERCOE; JOBIN 2014).....**30**

**Figura 3.** Mecanismo pelo qual *F. nucleatum* pode promover a carcinogênese. A: *F. nucleatum* (vermelho) é um organismo invasivo que utiliza uma adesina superficial, FadA, para entrar nas células hospedeiras. FadA liga-se à E-caderina na superfície das células epiteliais e ativa as vias de sinalização da B-catenina que, pode aumentar a expressão de oncogenes. Além disso, *F. nucleatum* é um organismo invasivo que pode sobreviver dentro das células hospedeiras, sendo capaz de liberar RNA no citoplasma da célula hospedeira ativando NFkB. B: *F. nucleatum* também pode se agregar com outros microrganismos não relacionados, como *Streptococcus* (azul) e *Campylobacter* (laranja), que podem ter atividade pró-inflamatória próprias. *F. nucleatum* também pode transportar outras bactérias não invasivas para o citoplasma da célula hospedeira (modificado de ALLEN-VERCOE; JOBIN, 2014).....**33**

**Figura 4.** Via de sinalização de receptores *Toll-like* na membrana celular. TLR4 reconhecendo LPS (lipopolissacarídeos) e TLR2 reconhecendo LP (lipoproteínas) de microrganismos, ativando a via do NFkB, liberando citocinas pró-inflamatórias (modificado de DE KONING et al., 2012).....**35**

**Figura 5:** Papel das citocinas na carcinogênese. (a) Na presença de uma lesão ou infecção, a resposta imune ativa a expressão de mediadores pró-inflamatórios, como TNF, IL6 e IL8. (b) Na inflamação crônica, citocinas pró-inflamatórias podem induzir danos no DNA, levando ao início do tumor. (c) O crescimento e invasão tumoral são favorecidos por citocinas pró-inflamatórias que estimulam a proliferação celular, reduzem a apoptose e aumentam a angiogênese. (d) Os macrófagos associados a tumores (TAM), linfócitos infiltradores de tumores (TIL) e fibroblastos associados a câncer (CAF) contribuem para o crescimento tumoral e metástase (modificado de LANDSKRON et al., 2014).....**39**

**Figura 6.** Biogênese de miRNAs. Os genes de miRNAs são transcritos em pri-miRNAs, que são clivados no núcleo pelo heterodímero nuclear Drosha, liberando um pre-miRNA. Este é transportado para o citoplasma pela exportina-5 e clivado perto de seu *loop* terminal pela *Dicer*, liberando um miRNA de fita dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos. Uma das fitas se associa com proteínas formando o complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*) como um miRNA maduro (fita guia), enquanto a outra fita é degradada. Os miRNAs se dirigem para os RNAm alvo promovendo a repressão da tradução, ou a degradação do RNAm (modificado de CRETOIU et al., 2016).....**41**

**Figure 1.** Relative Quantification (RQ) of *Fn NusG* gene. in adenoma (CRA) and colorectal cancer (CRC) samples compared to adjacent normal tissue (Normal Reference RQ=1), and CRC compared to CRA tissue (CRC/CRA). Statistically significant difference, according to the Wilcoxon signed rank test (CRA: \*\*\*p= 0.0002, CRC: \*\*\*p= 0.0002, CRC/CRA: \*\*\*p < 0.0001). Median with interquartile range graph.....**78**

**Figure 2.** Relative Quantification (RQ) of inflammatory genes: (A) Adenoma (CRA) and (B) colorectal tumor tissue samples (CRC) compared to a pool of respective adjacent normal tissue samples, and (C) CRC compared to CRA samples (CRC / CRA). All samples was normalized for reference genes *ACTB* and *GAPDH*. Normal Reference RQ=1. Statistically significant difference, according to the Wilcoxon signed rank test \*\* p≤0.01; \*\*\* p≤0.001). Median with interquartile range graph.....**79**

**Figure 3.** Relative Quantification (RQ) of miRNA genes: (A) Adenoma (CRA) and (B) colorectal tumor tissue samples (CRC) compared to a pool of respective adjacent normal tissue samples, and (C) CRC compared to CRA samples (CRC / CRA). Normal Reference RQ=1. Statistically significant difference, according to the Wilcoxon signed rank test (\*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ). Median with interquartile range graph.....**80**

**Figure 4.** Protein interaction network showing miRNAs and their predicted gene targets. The protein interaction network (gray lines) shows the interaction between proteins encoded by target genes that are predicted to be regulated by miRNAs. Predicted interactions between miRNAs and target genes are shown by the black lines. The dashed black line represents the possible interaction suggested in this study for miR-135b-5p and TNF. Ellipses represent target genes/proteins; red triangles represent upregulated miRNAs; green triangles represent downregulated miRNAs.....**81**

**Figura A1.** Quantificação Relativa (RQ) do gene *NusG* de *F. nucleatum*. Em amostras de câncer colorretal europeias (CCR) em comparação com tecido normal adjacente (RQ de referência normal = 1). Diferença estatisticamente significativa, de acordo com o teste de Wilcoxon (\*\*\* $p < 0,0001$ ). Mediana com gráfico de intervalo interquartil.....**124**

**Figura A2.** Sobrevida global de pacientes com câncer colorretal (CCR) não está associada a quantificação de *F. nucleatum*. As curvas de Kaplan-Meier mostram a sobrevida global de indivíduos com C dicotomizados em grupos de quantificação de *F. nucleatum* em “RQ  $\geq 1$ ” (linha azul) e “RQ  $< 1$ ” (linha vermelha) ( $p=0,0944$ ).....**126**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> MiRNAs selecionados para este estudo, com atuação na carcinogênese colorretal e inflamação.....	<b>43</b>
<b>Table 1.</b> Relative quantification (RQ) of mRNA expression of the inflammatory genes in adenoma (CRA) and colorectal carcinoma (CRC) samples compared with adjacent normal tissue samples as calibrator in an unpaired way, and using the adenoma samples as calibrator (CRC/CRA).....	<b>82</b>
<b>Table 2.</b> Relative quantification (RQ) of mRNA of the miRNAs in adenoma (CRA) and colorectal carcinoma (CRC) samples compared with adjacent normal tissue samples as calibrator, and using the adenoma samples as calibrator (CRC/CRA).....	<b>83</b>
<b>Table 3.</b> Correlation analysis between the relative quantification (RQ) of the inflammatory genes and of the miRNAs with the levels of the <i>F. nucleatum</i> gene in adenoma (CRA) and colorectal carcinoma (CRC) samples. Table color-coded represents a range from green (positive correlations) over yellow to red (negative correlations).....	<b>84</b>
<b>Table 4.</b> Correlation analysis between the relative quantification (RQ) of the miRNAs with the inflammatory genes in adenoma (CRA) and colorectal cancer (CRC) samples. Table color-coded represents a range from green (positive correlations) over yellow to red (negative correlations).....	<b>85</b>
<b>Table S1.</b> Characteristics of colorectal adenoma (CRA) and cancer (CRC) patients and relative quantification (RQ) of <i>F. nucleatum</i> according to gender, age and location of lesion.....	<b>86</b>
<b>Tabela A1.</b> Características das amostras de câncer colorretal europeias e quantificação relativa (RQ) de <i>F. nucleatum</i> de acordo com sexo, idade e localização tumoral.....	<b>125</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACF	Do inglês, <i>aberrant crypt foci</i>
ACR	Adenoma colorretal
ACTB	Do inglês, <i>Actin beta</i>
Ago	Proteína Argonauta
APC	Do inglês, <i>adenomatous polyposis coli</i>
BiNGO	Do inglês, <i>Biological Network Gene Ontology tool</i>
bp	Do inglês, <i>base pairs</i>
CA	Estado da Califórnia
CAF	Fibroblastos associados a câncer
CCND1	Ciclina D1
CCR	Câncer colorretal
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CRA	Do inglês, <i>colorectal adenoma</i>
CRC	Do inglês, <i>colorectal cancer</i>
Ct	Do inglês, <i>cycle threshold</i>
DAPK1	Do Inglês, <i>death associated protein kinase 1</i>
DCC	Do inglês, <i>Deleted in Colorectal Carcinoma</i>
DGCR8	Do inglês, <i>DiGeorge syndrome critical region 8</i>
DNA	Do inglês, <i>desoxirribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
E2	Do inglês, <i>E receptor 2</i>
EGFR	Do inglês, <i>epidermal growth factor receptor</i>
ERK	Do inglês, <i>extracellular regulated MAP kinase</i>
et al	e outros, do latim <i>et alii</i>
<i>F. nucleatum</i> ou <i>Fn</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
FadA	Do inglês, <i>3-ketoacyl-CoA thiolase</i>
FAM	Do inglês, 6-carboxyfluorescein, acronym
FAP	Polipose Adenomatosa Familiar
FAPESP	Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo
FomA	Do inglês, <i>Fusobacterium nucleatum outer membrane protein</i>
GAPDH	Do inglês, <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>

HEK	Do inglês, <i>Human Embryonic Kidney</i>
<i>HIF-1a</i>	Do inglês, <i>hypoxia-inducible factor 1 alpha</i>
<i>HOXB3</i>	Do inglês, <i>homeobox B3</i>
hsa	<i>Homo sapiens</i> microRNAs
IBILCE	Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
IκB	Do inglês, <i>inhibitor of nuclear factor kappa B kinase</i>
IKK	Do inglês, <i>I-kappaB kinase</i>
IL10	Do inglês, <i>interleukin 10</i>
<i>IL1B</i>	Do inglês, <i>interleukin 1 beta</i>
<i>IL6</i>	Do inglês, <i>interleukin 6</i>
<i>IL8</i>	Do inglês, <i>interleukin 8</i>
IMC	Índice de massa corporal
IRAK-1	Do inglês, <i>interleukin 1 receptor associated kinase 1</i>
ISCA	Do inglês, <i>International Strategic Cooperation Award</i>
JAK	Do inglês, <i>Janus kinase</i>
KO	Do inglês, <i>knockout</i>
<i>K-ras</i>	Do inglês, <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LAST2	Do inglês, RNA methyltransferase kinase 2
LP	Lipoproteínas
LPS	Lipopolissacarídeos
MAPK	Do inglês, <i>mitogen-activated protein kinase</i>
max	Máximo
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
min	Mínimo
miR-135b	microRNA 135b
miR-21	microRNA 21
miR-22	microRNA 22
miR-28	microRNA 28
miR-34a	microRNA 34a
mirDIP	Do inglês, <i>microRNA Data Integration Portal</i>
miRNAs	microRNAs
mM	Milimolar
<i>MMP-2</i>	Do inglês, <i>matrix metalloproteinase 2</i>
<i>MMP-9</i>	Do inglês, <i>matrix metalloproteinase 4</i>
<i>MMR</i>	Do inglês, <i>Mismatch repair gene</i>
mRNA	Do inglês <i>messenger RNA</i>
<i>MUTYH</i>	Do inglês, <i>mutY DNA glycosylase</i>
MyD88	Do inglês, <i>myeloid differentiation primary response 88</i>
N	Amostras normais adjacentes

N-CRA	Do inglês, <i>Normal samples adjacent to colorectal adenoma</i>
N-CRC	Do inglês, <i>Normal samples adjacent to colorectal cancer</i>
NFKB	Do inglês <i>nuclear factor kappa B</i>
NFKB1	Do inglês, <i>nuclear factor kappa B subunit 1</i>
ng	Nanograma (unidade de massa: 10 <sup>-9</sup> grama)
nM	Nanomolar
NM23-H1	Do inglês, <i>NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 1</i>
N-ras	Do inglês, <i>neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>
NusG	Do inglês, <i>transcription termination factor</i>
p	Probabilidade
p16INK4	Do inglês, <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 4</i>
p38	Do inglês, <i>protein 38 mitogen activated protein kinase</i>
p53	Do inglês, <i>protein 53 tumor suppressor</i>
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PCR	Do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>
PGE2	Do inglês, <i>prostaglandin E receptor 3</i>
PGT	Do inglês, <i>prostaglandin transporter</i>
pre-miRNA	microRNA precursor
pri-miRNAs	microRNA primário
qPCR	Do inglês, <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
r	Coeficiente de Correlação
RISC	Do inglês, <i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Do inglês, <i>ribonucleic acid</i>
RNA pol II	RNA polimerase II
RNAm	RNA mensageiro
RNAse	Ribonuclease
ROS	Do inglês, <i>Reactive oxygen species</i>
RQ	Do inglês, <i>Relative quantification</i>
RT	Do inglês, <i>Reverse transcriptase</i>
SIRT1	Do inglês, <i>sirtuin 1</i>
SMAD2	Do inglês, <i>mothers against decapentaplegic homolog 2</i>
SMAD4	Do inglês, <i>mothers against decapentaplegic homolog 4</i>
SP	Estado de São Paulo
STAT	Do inglês, <i>sterol O-acyltransferase 1</i>
TAM	Macrófagos associados a tumores
TAMRA	Do inglês, <i>Carboxytetramethylrhodamine</i>
Taq	Do inglês <i>Thermus aquaticus</i>
TGFbR2	Do inglês, <i>transforming growth factor beta receptor 2</i>
Th17	Do inglês, <i>T helper 17 cells</i>

<i>TIAM1</i>	Do inglês, <i>T-cell lymphoma invasion and metastasis 1</i>
<i>TIL</i>	Linfócitos infiltradores de tumores
<i>TIR</i>	Do inglês, <i>toll/interleukin-1 receptor-like proten</i>
<i>TLR</i>	Do inglês, <i>Toll-like receptor</i>
<i>TLR2</i>	Do inglês, <i>Toll-like receptor 2</i>
<i>TLR4</i>	Do inglês, <i>Toll-like receptor 4</i>
<i>TNF</i>	Do inglês, <i>tumor necrosis factor alpha</i>
<i>TP53</i>	Do inglês, <i>tumor protein p53</i>
<i>TRAF6</i>	Do inglês, <i>TNF receptor associated factor 6</i>
<sup>TM</sup>	Do inglês, <i>unregistered trademark</i>
<i>UNESP</i>	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
<i>USA</i>	Do inglês, <i>United States of America</i>
<i>VEGF</i>	Do inglês, <i>vascular endothelial growth factor</i>

## SUMÁRIO

<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	24
I.1. Epidemiologia do câncer colorretal .....	24
I.2. Inflamação crônica e câncer colorretal.....	27
I.3. <i>Fusobacterium nucleatum</i> e câncer colorretal .....	31
I.4. Vias de sinalização do processo inflamatório na carcinogênese colorretal.....	33
I.5. microRNAs e câncer colorretal .....	39
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	46
II. 1. Objetivo Geral .....	46
II. 2. Objetivos Específicos.....	46
<b>III. CAPÍTULO 1: Artigo Científico</b> .....	48
ABSTRACT .....	49
INTRODUCTION .....	50
MATERIALS AND METHODS .....	52
RESULTS .....	57
DISCUSSION.....	60
CONCLUSION.....	66
ACKNOWLEDGMENTS.....	67
FUNDING INFORMATION.....	67
REFERENCES .....	67
FIGURES.....	78
TABLES .....	82
SUPPLEMENTAL MATERIAL .....	86
<b>IV. DISCUSSÃO</b> .....	88
<b>V. CONCLUSÕES</b> .....	99
<b>VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	102
<b>APÊNDICES</b> .....	121
APÊNDICE A: Estágio no <i>Laboratory of Physiology &amp; Medical Physics</i> <i>Department of RCSI - Royal College of Surgeons, Dublin, Irlanda</i> ....	121
A.1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	121
A.2. RESULTADOS .....	123
<b>ANEXOS</b> .....	128
ANEXO A: Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa Institucional.....	128
ANEXO B: Comprovante de submissão do artigo.....	131

# *Introdução*

## I. INTRODUÇÃO

### I.1. Epidemiologia do câncer colorretal

O câncer colorretal (CCR) abrange as neoplasias de intestino grosso (cólon e reto) e é considerado um sério problema de saúde, ocorrendo mundialmente como a terceira principal causa de morte relacionada ao câncer, ficando atrás apenas do câncer de pulmão e dos cânceres de mama e próstata em mulheres e homens, respectivamente (AGRAWAL et al., 2012; FERLAY et al., 2014). Esta neoplasia apresenta incidência mundial de aproximadamente 1,3 milhões de casos e mortalidade de cerca de 700.000 por ano (FERLAY et al., 2014). No Brasil a estimativa de incidência para 2016 era de 16.660 casos novos em homens e 17.620 em mulheres e mortalidade de 8.549 para homens e 9.058 para mulheres (FERLAY et al., 2014; INCA, 2016).

Mundialmente, a incidência de CCR em regiões menos desenvolvidas (623.735 casos) é consideravelmente menor do que em regiões mais desenvolvidas (736.867 casos), onde mostram uma tendência de crescimento, como na América do Norte, Austrália, Japão e Europa (ARVELO; SOJO; COTTE, 2015). Porém, a mortalidade é proporcionalmente maior em regiões menos desenvolvidas (360.768 *versus* 333.165 casos) (FERLAY et al., 2014). Nos Estados Unidos, tem havido uma diminuição da mortalidade por CCR, atribuível a maiores avanços tecnológicos e prevenção, tendo em vista que, em geral, o diagnóstico de CCR ocorre tardiamente, o que dificulta um tratamento mais eficaz (ARVELO; SOJO; COTTE, 2015). Na maioria dos casos, o CCR apresenta um bom prognóstico e pode ser tratado se diagnosticado em estágios iniciais. Portanto, avanços em pesquisas que visem a detecção de grupos de risco e diagnóstico precoce são cruciais para diminuir a mortalidade em países menos desenvolvidos.

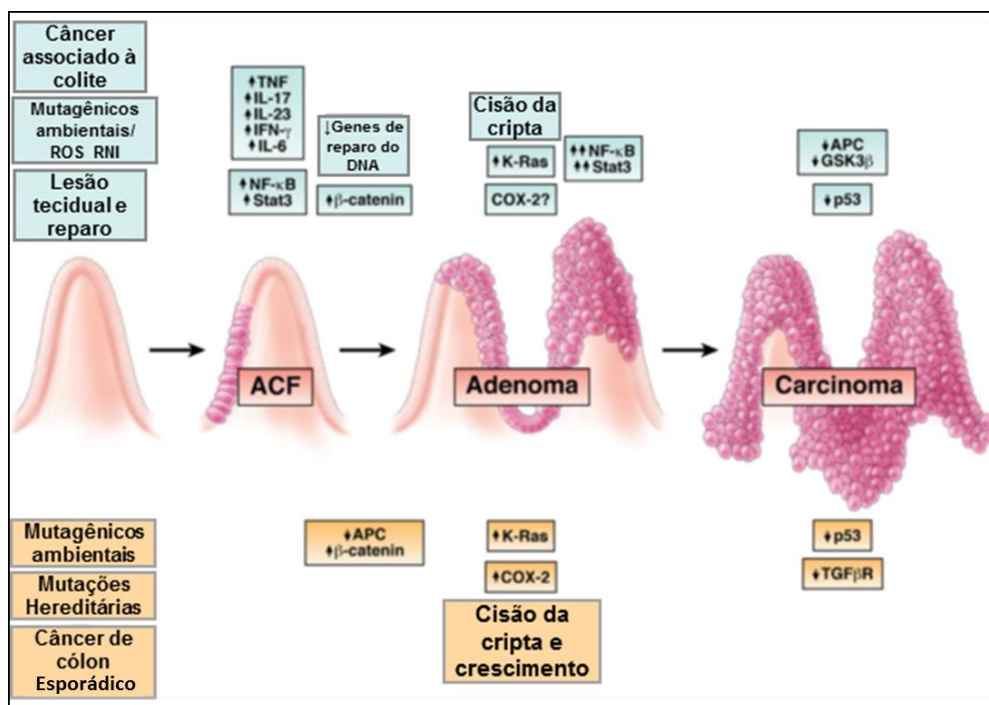
Tanto a hereditariedade como fatores ambientais contribuem para o desenvolvimento deste tipo de câncer. O CCR pode ser classificado em três tipos: esporádico (CCRE), familiar e hereditário. O CCRE corresponde a grande maioria (cerca de 80% dos casos) e ocorre em indivíduos que não apresentam mutações em genes específicos, sem ligação familiar. O tipo familiar (cerca de 15% dos casos) e o hereditário (5% dos casos) estão associados com membros da família afetados e/ou com mutações em genes específicos, em que a chance de desenvolver este tumor aumenta de duas a três vezes (ARVELO; SOJO; COTTE, 2015). Entre 2% a 5% de todos os cânceres de cólon surgem a partir de síndromes hereditárias bem definidas (RUSTGI, 2007) incluindo HNPCC (câncer colorretal hereditário não polipose) ou síndrome de Lynch, polipose adenomatosa familiar (FAP) e polipose associada a *MUTYH*. Vários genes de susceptibilidade foram identificados e relacionados com esta herança (JASPERSON et al., 2010), como genes envolvidos no sistema de reparo do DNA MMR (*mismatch repair*), mutações em *APC* e *MUTYH*.

A carcinogênese de CCR está diretamente relacionada com fatores de risco ambientais, hábitos alimentares, estilo de vida e fatores genéticos (RASKOV et al., 2014; BAROUDI; BENAMMAR-ELGAAIED, 2016; INCA, 2016). Na sequência adenoma-carcinoma, as células intestinais normais podem se tornar malignas a partir de mudanças genéticas encontradas em três categorias fundamentais de genes: genes supressores de tumor (TSG) como *APC*, *DCC*, *TP53*, *SMAD2*, *SMAD4* e *p16INK4*; protooncogenes, como *K-ras*, *N-ras*; e genes de reparo do DNA, como *MMR* e *MUTYH* (RASKOV et al., 2014; ARVELO; SOJO; COTTE, 2015). Além disso, as variações na incidência observadas em diferentes regiões geográficas podem estar relacionadas com hábitos alimentares e estilos de vida locais. Dentre os principais fatores de risco, pode-se citar dieta rica em gordura animal e carne vermelha, tabaco e ingestão de álcool, obesidade, a falta de exercícios

físicos e baixa ingestão de vegetais, frutas e fibras (TERZIC et al., 2010; RASKOV et al. 2014; ARVELO; SOJO; COTTE, 2015). Portanto, tanto os fatores genéticos quanto a alimentação são os fatores mais estudados associados com CCR (BAROUDI; BENAMMAR-ELGAAIED, 2016), e importantes na prevenção desse tipo de tumor.

O tipo histológico mais frequente é o adenocarcinoma, responsável por 90% dos casos (GIURIZATO; AREIAS, 2008), em que 60% de todos os adenocarcinomas do intestino grosso se localizam nos seus 20 centímetros terminais (sigmoide distal e reto) (SANTOS, 2007). Grande parte desses tumores se inicia a partir de pólipos e adenomas, lesões benignas que podem crescer na parede interna do intestino grosso (AGRAWAL et. al., 2012; INCA, 2016). O adenoma é considerado um dos principais precursores de CCR, sendo que este pode progredir pela via adenoma-adenocarcinoma, a partir de uma lesão hiperplásica. (NOFFSINGER, 2009; IMPERIALE; RANSOHOFF, 2012) (Figura 1). Essa via consiste em uma expansão da zona proliferativa de células na cripta colônica, provavelmente originando uma lesão polipoide. As células do adenoma vão sofrendo alterações, tornando-se menos diferenciadas e mais displásicas até adquirirem o fenótipo de um carcinoma com a capacidade de ultrapassar a barreira da lâmina própria e atingir a mucosa até que novas alterações genéticas permitam-nas adquirir a capacidade de metastização (COTTI et al., 2000). Portanto, um passo importante para reduzir a incidência de CCR é melhorar a detecção de pólipos e adenomas e assegurar sua remoção completa durante a colonoscopia (SZYLBERG et al., 2015).

**Figura 1.** Mecanismo de desenvolvimento de câncer colorretal causado por um acúmulo de mutações em oncogenes e genes supressores de tumor. Mutações em *APC* (*adenomatous polyposis coli*), *B-catenina* ou outros componentes dessa via, medeiam a transição de células pré-neoplásicas únicas para *ACF* (*aberrant crypt foci*) e, em seguida, para adenoma e carcinoma colorretal. A inflamação crônica, caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias podem induzir mutações em oncogenes e genes supressores de tumor (*APC*, *p53*, *K-ras*) e instabilidade genômica por meio de vários mecanismos. A inflamação persistente facilita a promoção do tumor ativando a proliferação e as propriedades anti-apoptóticas das células pré-malignas, bem como a progressão do tumor e metástases (modificado de TERZIC et al., 2010).



## I.2. Inflamação crônica e câncer colorretal

Além dos fatores de risco ambientais e fatores genéticos, a inflamação crônica tem-se destacado com papel importante no processo carcinogênico (TERZIC et al., 2010; MULTHOFF; RADONS, 2012; WOGAN et al., 2012; RASKOV et al. 2014). O processo inflamatório ocorre por meio de uma rede de sinais químicos que inicia e mantém a resposta imune do hospedeiro com a finalidade de cicatrizar o tecido

afetado (TERZIC et al., 2010; RASKOV et al. 2014). Em alguns órgãos, como por exemplo, esôfago, estômago, bexiga e intestino, a inflamação gera um microambiente, em grande parte controlado por células inflamatórias, propício para o desenvolvimento e progressão tumoral, promovendo a sobrevivência, proliferação e migração das células cancerígenas, aumentando as chances de desenvolvimento desta doença (TERZIC et al., 2010; TRINCHIERI, 2012). Portanto, muitos tipos de câncer surgem a partir de locais de irritação, infecção crônica e inflamação (TRINCHIERI, 2012).

O intestino grosso humano encontra-se constantemente sob um processo inflamatório devido à exposição de microrganismos e seus PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) que ativam fatores das vias inflamatórias, receptores e genes relacionados a esse processo (NIHON-YANAGI et al., 2012), reforçando as evidências de que as neoplasias de intestino grosso estão diretamente relacionadas com a inflamação (NIEDZIELSKA et al., 2009; NIHON-YANAGI et al., 2012; WOGAN et al., 2012). Assim, modificações em fatores que participam do processo inflamatório no intestino podem alterar a suscetibilidade do hospedeiro ao desenvolvimento de CCR.

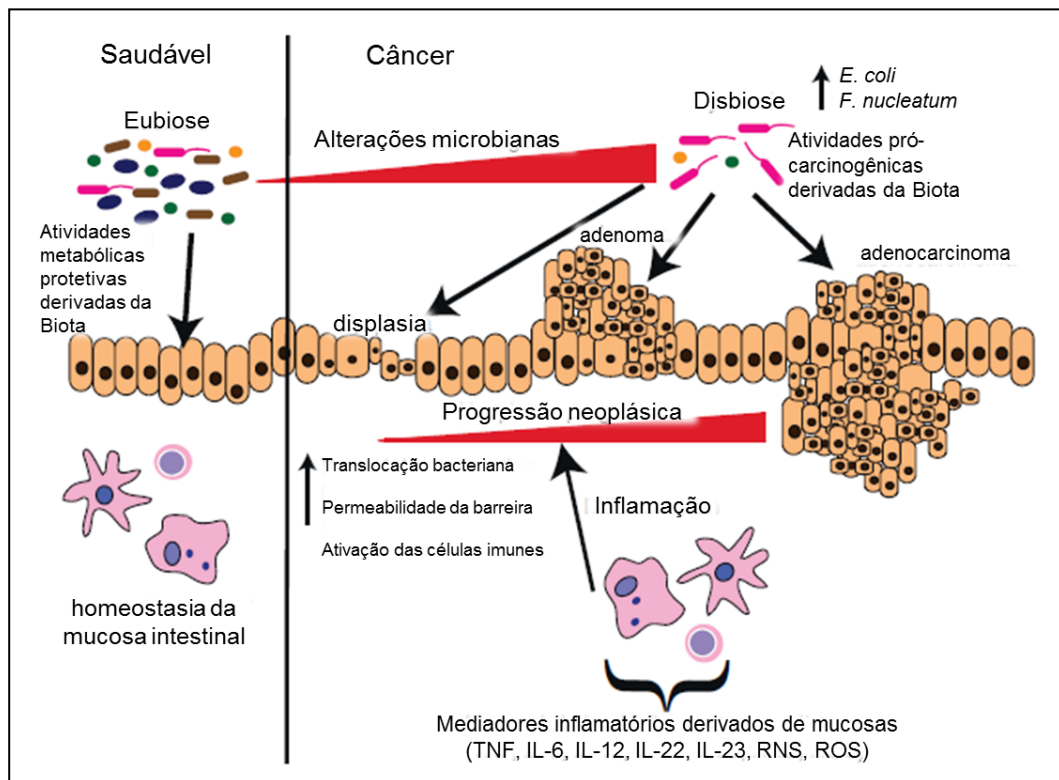
As doenças inflamatórias intestinais, como a colite ulcerativa crônica e Doença de Crohn, resultam da ativação intermitente do sistema imune das mucosas no trato gastrointestinal promovendo a inflamação crônica (WOGAN et al., 2012). A ativação do processo inflamatório e da resposta imune inata e adaptativa é um dos principais mecanismos envolvidos na alteração da homeostase causada pelos tumores nos tecidos adjacentes (FINN 2008; GARBER, 2009; CAMMAROTA et al., 2010). É conhecido que as células neoplásicas são capazes de atrair diferentes tipos celulares para o microambiente tumoral pela secreção de proteases extracelulares, fatores pró-angiogênicos e citocinas (TERZIC et al., 2010). Na carcinogênese de cólon foi descrito um modelo experimental em que a inflamação, infecção e câncer são

mecanicamente ligados, e fornece evidências de que mediadores químicos do sistema imunológico inato e toxinas bacterianas desempenham papéis fundamentais na condução do desenvolvimento desta neoplasia (MANGERICH et al., 2012; WOGAN et al., 2012). Alguns estudos indicam que o uso de drogas anti-inflamatórias reduz o risco de CCR em 40 a 50%, causa regressão de adenomas em pacientes com polipose adenomatosa familiar (FAP), e pode ser preventivo para câncer de esôfago, estômago e pulmão (TERZIC et al., 2010).

Alguns microrganismos podem alterar o processo inflamatório e estar relacionado com diversas doenças como a gastrite crônica por *Helicobacter pylori*, que é a principal causa mundial de câncer gástrico (CADAMURO et al., 2014), hepatite crônica ou cirrose por vírus da hepatite B ou C e desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, a esquistossomose (*Schistosoma haematobium*) que pode promover um aumento do risco de carcinoma de bexiga (ANTONI et al., 2017), e a doença inflamatória intestinal como risco para desenvolvimento de câncer colorretal (DYSON; RUTTER, 2012; TALEBAN et al., 2016). Assim, a inflamação causada pela interação com microrganismos tem emergido como um dos principais fatores de risco e como uma das principais características do câncer que afetam qualquer fase da tumorigênese (MULTHOFF; RADONS, 2012; CANDELA et al., 2014).

A microbiota intestinal humana é composta por várias espécies que podem exercer um papel importante no CCR (Figura 2). Recentemente foram descritos dois modelos que indicam o papel desses microrganismos na formação do tumor: 1) microrganismos induzem a inflamação crônica, levando à proliferação celular, e 2) fatores de virulência estariam induzindo diretamente a formação do tumor (LEUNG; TSOI; YU, 2015). Dentre os microrganismos que colonizam o intestino a bactéria *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) tem sido destacada como potencial biomarcador de CCR (LEUNG; TSOI; YU, 2015).

**Figura 2.** Interação entre a microbiota e o hospedeiro na tumorigênese. Em estado saudável, a microbiota intestinal está em “Eubiose”, mantendo a homeostase intestinal pela produção de vários metabólitos e produtos bacterianos, que promovem o equilíbrio imune. Vários fatores ambientais como dieta, inflamação, estresse ou genética do hospedeiro influenciam a composição microbiana e podem causar “Disbiose microbiana”. Esta microbiota pode favorecer a progressão neoplásica através de várias atividades carcinogênicas (liberação de toxinas e metabólitos), que afetam a integridade do DNA das células epiteliais e a transformação celular. Com isso, a integridade da barreira epitelial é comprometida, aumentando ainda mais a captação bacteriana, a ativação das células imunes e a liberação de mediadores inflamatórios, contribuindo assim para a progressão neoplásica. ROS: *Reactive oxygen species*, RNS: *Reactive nitrogen species* (modificado de ALLEN-VERCOE; JOBIN 2014).



### I. 3. *Fusobacterium nucleatum* e câncer colorretal

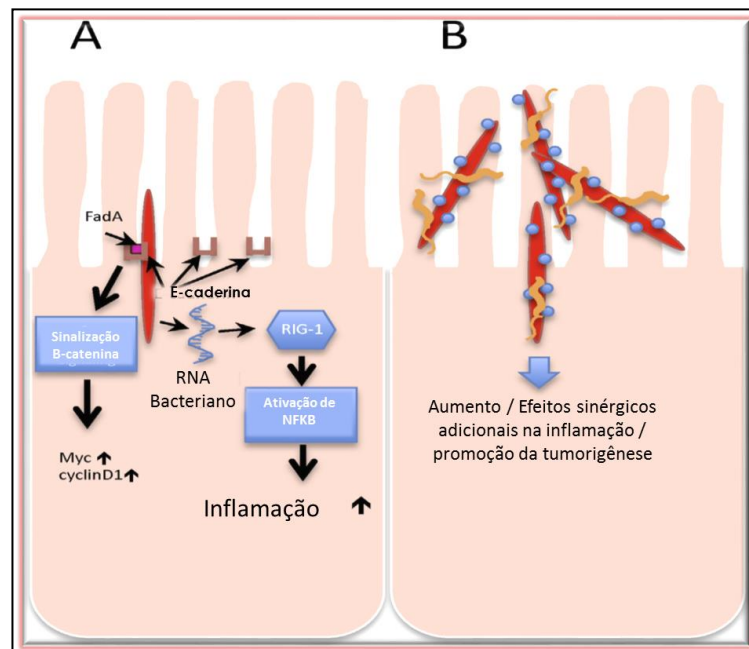
A *F. nucleatum* é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbica, comensal, descoberta inicialmente na mucosa oral e recentemente descrita na microbiota intestinal (HAN, 2015). Quando em quantidades elevadas esta bactéria pode estar associada a algumas doenças humanas como infecções na mucosa oral e doenças gastrointestinais (HAN, 2015).

Os estudos sobre a influência dessa bactéria no desenvolvimento do CCR ainda são recentes, sendo mais da metade publicados no último ano. Até o momento, apenas uma publicação refere-se a população brasileira, em que foi avaliada a abundância de *F. nucleatum* em amostras de fezes de pacientes com CCR em comparação com amostras fecais de indivíduos saudáveis. Maior abundância da bactéria foi encontrada em pacientes com CCR, apesar do pequeno tamanho amostral avaliado (FUKUGAITI et al., 2015).

Os primeiros estudos, em pacientes com CCR, descreveram maior abundância da *F. nucleatum* na região tumoral e também em adenomas em relação ao tecido normal adjacente, e sugeriram que esta bactéria pode gerar um microambiente pró-inflamatório no intestino, aumentando as chances de progressão de CCR (CASTELLARIN et al., 2012; KOSTIC et al., 2013). Mais recentemente, em população europeia, também foi encontrado uma grande quantidade de *F. nucleatum* em tecidos de CCR quando comparados com tecidos normais adjacentes, bem como em amostras de fezes de pacientes com CCR, quando comparado com adenomas ou indivíduos saudáveis (FLANAGAN et al., 2014). Estes resultados reforçam a importância de se estudar *F. nucleatum* visando uma detecção precoce e um melhor prognóstico dos pacientes com CCR, considerando que a abundância desta bactéria está associada com o desenvolvimento tumoral e metástase (LI et al., 2016b).

Dessa forma, estudos mais recentes indicam que testes de DNA em fezes para detecção de *F. nucleatum* podem ser úteis tanto para detecção de indivíduos com CCR, bem como para prevenção de pessoas com maior predisposição ao desenvolvimento desta neoplasia (LIANG et al., 2016; SUEHIRO et al., 2017). Apesar desses avanços os mecanismos de virulência envolvidos na resposta tumorigênica em consequência da abundância desta bactéria na microbiota intestinal ainda permanecem em discussão. Um dos fatores de virulência recentemente descrito como potencial marcador diagnóstico para *F. nucleatum* associada a doenças humanas é o *FadA adesina/invasina* (RUBINSTEIN et al., 2013; HAN, 2015) (Figura 3). Um dos mecanismos sugeridos para sua ação é que a *F. nucleatum* estaria induzindo a resposta inflamatória e a tumorigênese estimulando fatores de crescimento de células de CCR através de *FadA* adesina, que se liga à E-caderina e ativa a sinalização da  $\beta$ -catenina, regulando as respostas inflamatória e tumorigênica (RUBINSTEIN et al., 2013). Devido ao seu envolvimento, o gene *FadA* tem sido indicado como potencial alvo diagnóstico e terapêutico para CCR, considerando que os níveis de expressão deste gene em CCR está aumentado de 10 a 100 vezes comparado com indivíduos normais, e correlacionado com a expressão de oncogenes e genes inflamatórios (RUBINSTEIN et al., 2013).

**Figura 3.** Mecanismo pelo qual *F. nucleatum* pode promover a carcinogênese. A: *F. nucleatum* (vermelho) é um organismo invasivo que utiliza uma adesina superficial, FadA, para entrar nas células hospedeiras. FadA liga-se à E-caderina na superfície das células epiteliais e ativa as vias de sinalização da B-catenina que, pode aumentar a expressão de oncogenes. Além disso, *F. nucleatum* é um organismo invasivo que pode sobreviver dentro das células hospedeiras, sendo capaz de liberar RNA no citoplasma da célula hospedeira ativando NFKB. B: *F. nucleatum* também pode se agregar com outros microrganismos não relacionados, como *Streptococcus* (azul) e *Campylobacter* (laranja), que podem ter atividade pró-inflamatória próprias. *F. nucleatum* também pode transportar outras bactérias não invasivas para o citoplasma da célula hospedeira (modificado de ALLEN-VERCOE; JOBIN, 2014).



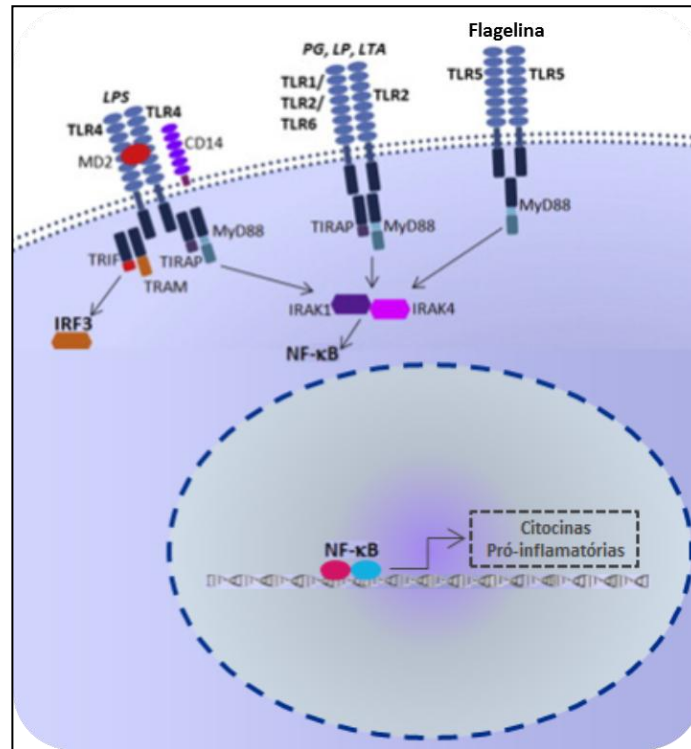
#### I. 4. Vias de sinalização do processo inflamatório na carcinogênese colorretal

Diferentes classes de genes participam ativamente do processo inflamatório, como receptores de membrana, citocinas pró- e anti-inflamatórias e microRNAs (miRNAs). Estes quando desregulados podem estar relacionados ao desenvolvimento do câncer. Por exemplo,

dentre os genes da família Toll, os receptores *Toll-like* (TLRs) de mamíferos têm um papel essencial no reconhecimento direto dos agentes infecciosos, levando à ativação das respostas imune inata e adaptativa (NIEDZIELSKA et al., 2009; HISHIDA et al., 2010; NIHON-YANAGI et al., 2012). A progressão de uma lesão pré-cancerosa, como os pólipos adenomatosos, envolve ações complexas de várias citocinas na proliferação de células T, adesão célula-célula, apoptose, e imunidade do hospedeiro (JACOBSON-BROWN; NEUMAN, 2004). No entanto, os diferentes TLRs podem ter tanto atividade anti-tumoral, induzindo a morte celular por apoptose das células neoplásicas (NIEDZIELSKA et al., 2009) ou podem aumentar a resistência celular a apoptose, estimulando sua proliferação em determinadas condições (SHCHEBLYAKOV et al., 2011), reforçando sua importância no processo carcinogênico (IOANNOU; VOULGARELIS, 2010).

Os genes da família TLRs codificam proteínas transmembranas tipo I, que respondem aos microrganismos patogênicos na matriz extracelular reconhecendo seus componentes conservados (OSPELT; GAY, 2009; ASHTON et al., 2010; HISHIDA et al., 2011). O intestino humano normal, como já destacado, encontra-se em estado de inflamação controlada, devido à presença de bactérias comensais (JUMP; LEVINE, 2004; BORASKA JELAVIĆ et al., 2006), e o primeiro passo na interação destas com o epitélio intestinal é o reconhecimento de seus PAMPs por receptores TLRs. Este processo termina com sinais provenientes de expressão do peptídeo antimicrobiano, fortificação da barreira e proliferação de células epiteliais (RAKOFF-NAHOUM et al., 2004; BORASKA JELAVIĆ et al., 2006). Os TLRs ativam o fator nuclear kappa B (NFkB), principal via de sinalização regulatória da inflamação, e sua ativação está envolvida na patogênese do CCR (BORASKA JELAVIĆ et al., 2006; SAKAMOTO; MAEDA 2010) (Figura 4).

**Figura 4.** Via de sinalização de receptores *Toll-like* na membrana celular. TLR4 reconhecendo LPS (lipopolissacarídeos) e TLR2 reconhecendo LP (lipoproteínas) de microrganismos, ativando a via do NFKB, liberando citocinas pró-inflamatórias (modificado de DE KONING et al., 2012).



Dentre os genes de receptores *Toll-like* reconhecidos até o momento, pode-se destacar o gene *TLR2*, localizado na região cromossômica 4q32, que representa um alvo interessante para elucidar seu papel no desenvolvimento do CCR (EL-OMAR; NG; HOLD, 2008; ASHTON et al., 2010). O *TLR2* é responsável por reconhecer lipoproteínas bacterianas assim como os PAMPs de uma ampla gama de patógenos (ASHTON et al., 2010; HISHIDA et al., 2011). Relatos na literatura e estudo anterior desenvolvido por nosso grupo de pesquisa indicam que, em CCR, o gene *TLR2* apresenta expressão aumentada em tecidos tumorais quando comparado com tecidos normais (NIEDZIELSKA et al., 2009; NIHON-YANAGI et al., 2012; PROENÇA et al., 2015), evidenciando sua importância para o desenvolvimento desta neoplasia.

A expressão aumentada de *TLR2* provoca um processo inflamatório acentuado, dando início a principal via de sinalização regulatória da inflamação, a do NFkB, que a partir do reconhecimento de patógenos por este receptor, recruta a molécula adaptadora MyD88 para o domínio TLR / TIR com a indução de citocinas pró-inflamatórias pela ativação da família de proteínas IKK em um processo que envolve IRAK-1 e TRAF6. O complexo IKK catalisa a fosforilação e degradação de Ikb pelo proteossomo, permitindo o deslocamento do NFkB para o núcleo. No núcleo, NFkB regula a expressão de citocinas pró-inflamatórias e a adesão de moléculas (ARANCIBIA et al., 2007; VIRTUE; WANG; YANG, 2012; DE KONING et al., 2012), facilitando assim a progressão tumoral.

Outro gene que merece ser destacado é o *TLR4*, responsável por codificar um receptor transmembrana de reconhecimento padrão que estabelece uma ligação crítica entre estimulantes do sistema imune produzidos por microrganismos, em particular lipopolissacarídeos (LPS), e o início da reação imune inata aos agentes exógenos, bem como às células tumorais (KILLEEN et al., 2009; CAMMAROTA et al., 2010). No intestino, a ativação de *TLR4* em enterócitos leva a uma inibição da migração e da proliferação, bem como a indução de apoptose, fatores que podem promover lesões intestinais quando os mecanismos de reparo são inibidos. Além disso, a sinalização de TLRs epiteliais, que atuam juntamente com a sinalização de TLRs por leucócitos, participa do desenvolvimento da inflamação intestinal (GRIBAR et al., 2008; CAMMAROTA et al., 2010). A ativação do *TLR4* leva a indução de uma resposta inflamatória mediada por múltiplas vias e estimula a produção de citocinas diversas, em especial a IL6 (ROSE-JOHN, et al., 2009; CAMMAROTA et al., 2010). Foi também demonstrado que a sinalização do *TLR4* é fundamental para a carcinogênese do cólon na colite crônica, sendo responsável pela indução da COX-2, aumento da produção de prostaglandina E2, e ativação da fosforilação do EGFR (GRAU et al., 2009; CAROTHERS et al., 2010; CAMMAROTA et al., 2010). Alguns

estudos indicam que os níveis de expressão de *TLR4* podem influenciar a resposta imune inata e potencialmente relacionaram a variação na sequência promotora de *TLR4* com a suscetibilidade a doenças humanas como o câncer (RAGNARSDÓTTIR et al., 2010).

Dentre as citocinas ativadas pela via do NFKB pode-se destacar as interleucinas pro-inflamatórias IL1B (KASZA, 2013; HAI PING et al., 2016), IL6 (WALDNER; FOERSCH; NEURATH, 2012; MORANDINI et al., 2013), IL8 (MORANDINI et al., 2013; BĂLĂȘOIU et al., 2014) e o fator de necrose tumoral alpha (TNF) (KOORTS et al., 2011; AL OBEED et al., 2014), todas com papel importante na tumorigênese (Figura 5).

A IL1B é uma citocina pro-inflamatória envolvida na progressão tumoral (KASZA, 2013). Foi relatado que a inibição de IL1B pode reduzir metástase e angiogênese em tumores *in vivo*, podendo contribuir para terapias anti-tumorais (KASZA, 2013). Esta citocina é produzida por monócitos primários do sangue, macrófagos do tecido e células dendríticas (DINARELLO, 2011), e é essencial para a resposta inata do hospedeiro contra a infecção (LOPEZ-CASTEJON; BOUGH, 2011).

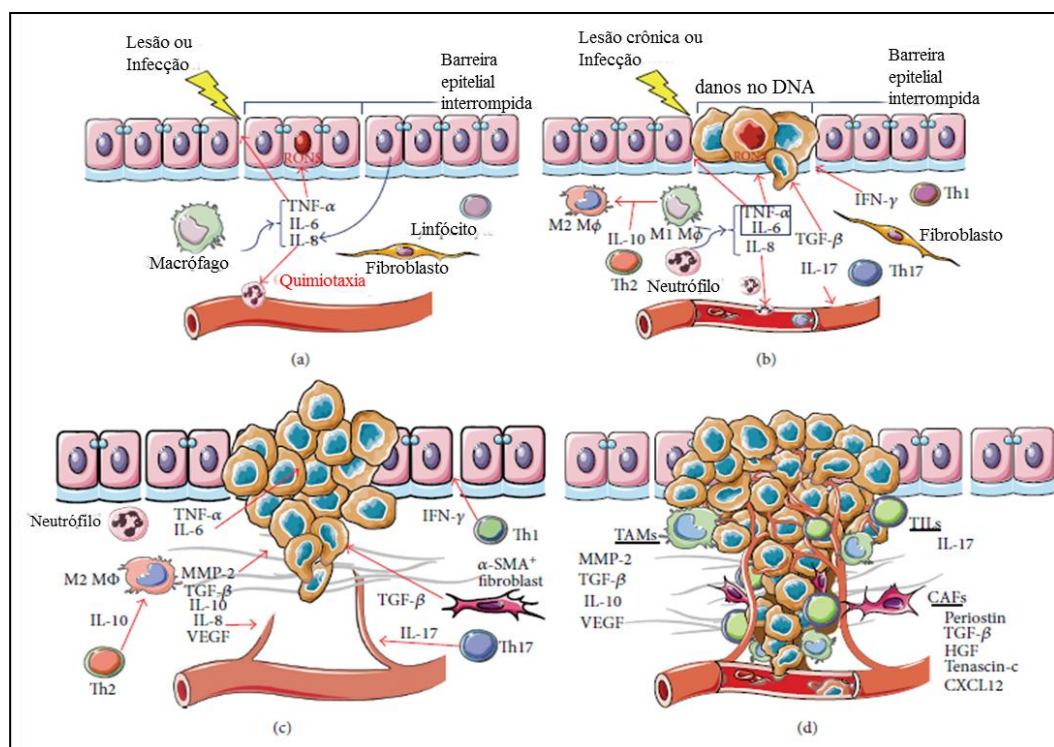
IL6 está envolvida na diferenciação de monócitos em macrófagos e na proliferação e resistência à apoptose de células T. Além disso, IL6 participa da inflamação crônica, sendo necessária para a indução de células Th17 efectoras, inibindo a diferenciação de células T reguladoras, além de reforçar a proliferação e os efeitos anti-apoptóticos em células tumorais (WALDNER; FOERSCH; NEURATH, 2012). Esta citocina é produzida por células imunes, como macrófagos, células dendríticas, mastócitos, células B e células T CD4<sup>+</sup> efectoras, além de células não imunes como células endoteliais, fibroblastos, células epiteliais e células malignas (HIRANO, 1998). IL6 é considerada uma das citocinas mais abundantes durante a ativação prolongada e descontrolada da inflamação (MAUER; DENSON; BRÜNING, 2015), sendo uma das

principais condutoras na progressão da inflamação crônica para câncer (RATH et al., 2015).

A IL8 possui efeitos pró-inflamatórios e pró-angiogênicos, contribuindo para progressão tumoral (BĂLĂȘOIU et al., 2014). Esta interleucina tem sido associada a CCR em estágio IV, evidenciando sua correlação com a progressão tumoral e com potencial de metástase, sendo considerada um biomarcador de pior prognóstico (BĂLĂȘOIU et al., 2014). Métodos terapêuticos, como a utilização de nanopartículas, tem sido sugerido para bloquear a produção de IL8 para melhorar a evolução da doença e o prognóstico (AGGARWAL, 2013). Esta citocina é produzida por diferentes tipos celulares como monócitos, macrófagos, fibroblastos e queratinócitos (DAN et al., 2010). IL8 pode estimular células que liberam enzimas proteolíticas, permitindo a digestão da matriz extracelular e providenciando uma via para a migração de células inflamatórias, crescimento tumoral e metástase. (YUAN et al., 2005)

TNF é uma citocina pró-inflamatória que atua regulando a apoptose, inflamação, proliferação e diferenciação celular. Esta proteína pode ser produzida por macrófagos e células tumorais (SZLOSAREK; BALKWILL, 2003; ZHAO et al., 2010), e sua principal função fisiológica é recrutar monócitos e neutrófilos para o sítio de infecção (ABBAS, LICHTMAN, POBER, 2003). Sua expressão elevada nos tecidos de CCR pode promover o crescimento, desenvolvimento, progressão, invasão e metástase tumoral (AL OBEED et al., 2014). *TNF* também parece estar mais expresso em fases avançadas de CCR (estádio III, IV) em comparação com estádios iniciais (estádio II), desempenhando um papel na relação entre inflamação e câncer (AL OBEED et al., 2014).

**Figura 5:** Papel das citocinas na carcinogênese. (a) Na presença de uma lesão ou infecção, a resposta imune ativa a expressão de mediadores pró-inflamatórios, como TNF, IL6 e IL8. (b) Na inflamação crônica, citocinas pró-inflamatórias podem induzir danos no DNA, levando ao início do tumor. (c) O crescimento e invasão tumoral são favorecidos por citocinas pró-inflamatórias que estimulam a proliferação celular, reduzem a apoptose e aumentam a angiogênese. (d) Os macrófagos associados a tumores (TAM), linfócitos infiltradores de tumores (TIL) e fibroblastos associados a câncer (CAF) contribuem para o crescimento tumoral e metástase (modificado de LANDSKRON et al., 2014).



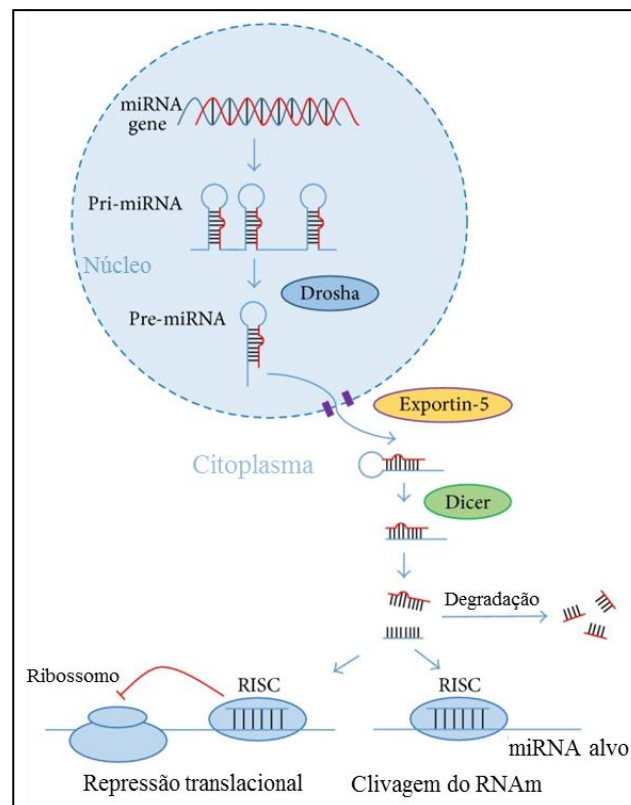
## I. 5. microRNAs e câncer colorretal

Outro fator que desempenha importante papel no processo carcinogênico são os miRNAs, que controlam mudanças nos níveis de expressão de genes relacionados ao processo inflamatório, podendo ocasionar alterações no desenvolvimento tumoral (SONKOLY; PIVARCSI, 2009; DI LEVA; GAROFALO; CROCE, 2014; LI et al., 2016a).

Os miRNAs são pequenos RNAs endógenos não-codificantes (aproximadamente 22 nucleotídeos), que quando maduros podem regular a expressão gênica por meio de repressão pós-transcricional, levando ao silenciamento gênico através da interação com seus RNAs alvos e também regulando a expressão protéica (VIRTUE; WANG; YANG, 2012).

A produção de miRNAs se inicia no núcleo e é finalizada no citoplasma. Primeiramente, os genes de miRNAs são transcritos em pri-miRNAs (precursores encapados e poliadenilados) pela RNA polimerase II. Em seguida o miRNA precursor é processado no núcleo pelo heterodímero nuclear Drosha / DGCR8 que cliva o pri-miRNAs e libera um pre-miRNA. Este é transportado para o citoplasma pela exportina-5 e clivado perto de seu *loop* terminal pela RNase III *Dicer*, liberando um miRNA de fita dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos. Este se associa com proteínas Argonauta (Ago), formando o complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*). Uma das fitas permanece em Ago como um miRNA maduro (fita guia), enquanto a outra fita é degradada. Os miRNAs dirigem as proteínas Ago para os RNAs alvo interagindo com locais de complementaridade imperfeita, promovendo a repressão da tradução, ou a degradação do RNA quando ocorre a complementariedade total. Com isso, os miRNAs exercem função de regulação gênica (DI LEVA; GAROFALO; CROCE, 2014) (Figura 6).

**Figura 6.** Biogênese de miRNAs. Os genes de miRNAs são transcritos em pri-miRNAs, que são clivados no núcleo pelo heterodímero nuclear Drosha, liberando um pre-miRNA. Este é transportado para o citoplasma pela exportina-5 e clivado perto de seu *loop* terminal pela Dicer, liberando um miRNA de fita dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos. Uma das fitas se associa com proteínas formando o complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*) como um miRNA maduro (fita guia), enquanto a outra fita é degradada. Os miRNAs se dirigem para os RNAm alvo promovendo a repressão da tradução, ou a degradação do RNAm (modificado de CRETOIU et al., 2016).



Até o momento, 1881 sequências de precursores e 2588 miRNAs maduros já foram descritos em humanos (*The miRBase Sequence Database-Release 21.0*), os quais regulam mais de 30% dos genes (ISOMOTO et al., 2012). Os miRNAs modulam várias funções celulares, como apoptose, proliferação, diferenciação e metabolismo, além de regular funções sistêmicas, como a inflamação (JIN et al., 2016, LI et al., 2016a). Em decorrência destas características, a expressão

alterada de miRNAs está associada a várias doenças inflamatórias como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, encefalomielite autoimune experimental, neoplasias inflamatórias (VIRTUE; WANG; YANG, 2012) e a diferentes tipos de cânceres humanos (DI LEVA; GAROFALO; CROCE, 2014), bem como ao CCR (LI et al., 2016a), podendo atuar como oncogenes ou supressor tumorais conforme seus genes alvos (WU et al., 2011; DI LEVA; GAROFALO; CROCE, 2014).

Alguns estudos têm sido realizados para avaliar o efeito de miRNAs na regulação das respostas imunes inata e adaptativa, bem como na via de sinalização para células inflamatórias em vários tipos de tecidos (SONKOLY; PIVARCSI, 2009). Os resultados indicam que os miRNAs possuem um importante papel na regulação da inflamação, por meio de sua ação sobre os RNAm de interleucinas (XU et al., 2011), como também por meio da regulação pós-transcricional de receptores como *TLR2* e *TLR4*, que pode afetar a via de sinalização TLR / IL1, responsável pela ativação de NFkB (VIRTUE; WANG; YANG, 2012). Além disso, a expressão dos miRNAs é tecido específica, podendo ser utilizados como biomarcadores de origem tumoral (LU et al., 2005). Em CCR, a ação dos miRNAs na regulação de genes da resposta inflamatória tornam estes importantes alvos terapêuticos e potenciais biomarcadores para este tipo de câncer (OKAYAMA; SCHETTER; HARRIS, 2012; LI et al., 2016a).

Considerando a atuação dos miRNAs em diversos processos fisiológicos e patológicos, os perfis anormais de expressão de miRNAs podem acompanhar a progressão tumoral e metastização (TOKARZ; BLASIAK, 2012), podendo desempenhar diferentes papéis no processo de metastização do CCR incluindo invasão e angiogênese (MOHAMMADI; MANSOORI; BARADARAN, 2016; LI et al., 2016a). Dessa forma podem servir como marcadores de diagnóstico, prognóstico e resposta ao tratamento para o CCR (MOHAMMADI; MANSOORI; BARADARAN et al., 2016; LI et al., 2016a). O conhecimento dos miRNAs expressos no intestino poderá ajudar a identificar seus RNAm alvos

associados com diferentes vias da carcinogênese colorretal, os quais poderiam atuar como potenciais alvos terapêuticos (LI et al., 2016a).

Vários miRNAs foram considerados importantes na carcinogênese colorretal, bem como participantes do processo inflamatório, sendo indicados como potenciais biomarcadores para diagnóstico precoce e melhora na resposta a tratamentos (LI et al., 2016a; MOHAMMADI; MANSOORI; BARADARAN, 2016). Por exemplo, o miR-22-3p e o miR-28-5p foram descritos com funções de supressores tumorais e os miR-34a-5p, miR-135b-5p e miR-21-3p com funções oncogênicas (Tabela 1).

**Tabela 1.** MiRNAs selecionados para este estudo, com atuação na carcinogênese colorretal e inflamação.

miRNAs	Associações	Referências
hsa-miR-21-3p	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Importância no diagnóstico e prognóstico no desenvolvimento de CRC.</li> <li>• Alvo predito*: receptor de TNF.</li> </ul>	WANG et al., 2016
hsa-miR-22-3p	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Contribui para diminuir metástase e invasão de células de CRC alvejando <i>TIAM1</i>, reduzindo <i>MMP-2 / MMP-9</i> e <i>VEGF</i>.</li> <li>• Alvo predito*: receptor de TNF, receptor de IL6, TLR2.</li> </ul>	LI et al., 2013
hsa-miR-28-5p	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reduz proliferação, migração e invasão celular em CCR, alvejando os oncogenes <i>CCND1</i> e <i>HOXB3</i>.</li> <li>• Alvo validado*: receptor de TNF.</li> <li>• Alvo predito*: TLR4.</li> </ul>	ALMEIDA et al., 2012
hsa-miR-34a-5p	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Relacionado com apoptose alvejando o gene anti-apoptótico <i>SIRT1</i>.</li> <li>• Alvo predito*: TLR4.</li> <li>• Alvos validados: receptores de TNF, TLR1, IL6, receptor de IL6, NFKB1.</li> </ul>	KARA et al., 2015
hsa-miR-135b-5p	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Promove progressão tumoral e diminui apoptose atuando em vias efetoras de CCR, alvejando supressores tumorais como <i>TGFbR2</i>, <i>DAPK1</i>, <i>APC</i> e <i>LAST2</i>.</li> <li>• Alvo predito*: IL6.</li> </ul>	VALERI et al., 2014 HE et al., 2015

\*Base de dados consultadas: mirBase21, TarBase v.7.0, MirDB e TargetScanHuman Release 6.2.

Além do mais a presença de microrganismos na mucosa intestinal pode ter um papel importante na modulação da expressão de miRNAs e citocinas envolvidos no processo inflamatório e resposta imune. Neste aspecto, há poucos estudos na literatura que avaliaram a associação de *F. nucleatum* com miRNAs em CCR (ITO et al., 2015, NOSHO et al., 2016; YANG et al., 2017).

Portanto, considerando os indícios do papel que *F. nucleatum* apresenta na ativação do processo inflamatório, e a importância deste como fator de risco para CCR, o presente estudo visou investigar a possível associação de *F. nucleatum* com a progressão do câncer colorretal avaliando a presença dessa bactéria em tecido de adenoma e câncer colorretal e sua influência na modulação de citocinas e miRNAs. Com isso, possibilitando uma contribuição na compreensão da ação de *F. nucleatum* na carcinogênese colorretal, bem como na identificação de grupos de risco, detecção precoce e melhor prognóstico para CCR.

*Objetivos*

## II. OBJETIVOS

### II. 1. Objetivo Geral

Tendo em vista a possível associação de *F. nucleatum* como um fator de risco para a progressão de câncer colorretal, o presente trabalho investigou a influência de *F. nucleatum* na modulação da expressão de citocinas e miRNAs e a interação entre esses fatores, para o desenvolvimento do câncer colorretal, visando auxiliar na detecção precoce e melhor prognóstico para CCR e identificação de grupos de risco para esta neoplasia.

### II. 2. Objetivos Específicos

1- Comparar os níveis de DNA de *F. nucleatum* em amostras de adenoma colorretal, adenocarcinoma colorretal e tecido normal adjacente, e avaliar se ocorre aumento da abundância dessa bactéria na via de progressão adenoma-adenocarcinoma;

2- Avaliar se a expressão gênica de mediadores inflamatórios (*TLR2*, *TLR4*, *NFKB1*, *TNFA*, *IL1B*, *IL6* e *IL8*) e de miRNAs (miR-21-3p, miR-22-3p, miR-28-5p, miR-34a-5p e miR-135b-5p) envolvidos na inflamação e carcinogênese está alterada em amostras de adenoma e adenocarcinoma colorretal, em comparação com o tecido normal adjacente e correlacionar com a abundância de *F. nucleatum* nesses tecidos.

3- Elaborar uma rede de interação miRNA:RNAm que permita evidenciar suas inter-relações e auxiliar a compreender as vias de regulação da expressão desses genes na ativação da resposta inflamatória desencadeada por *F. nucleatum* e no processo carcinogênico.

*Artigo*

### III. CAPÍTULO 1: Artigo Científico

**Title:** *Fusobacterium nucleatum* influence on inflammatory genes and microRNAs in colorectal adenoma and cancer.

**Running title:** *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinogenesis

**Authors:** Marcela Alcântara Proença<sup>1</sup>, Maysa Succi<sup>1</sup>, Joice Matos Biselli<sup>1</sup>, Fábio Eduardo Severino<sup>2</sup>, David J. Hughes<sup>3</sup>, Ana Elizabete Silva<sup>1</sup>.

**Affiliations:** <sup>1</sup>UNESP, Univ. Estadual Paulista, Department of Biology, São José do Rio Preto, SP, Brazil; <sup>2</sup>UNESP, Univ. Estadual Paulista, Faculty of Medicine, UNIPEX - Unit for Experimental Research, Botucatu, SP, Brazil, <sup>3</sup>Department of Physiology & Centre for Systems Medicine, Royal College of Surgeons in Ireland, Dublin, Ireland.

Email address:     **Marcela Alcântara Proença:** marcela-proenca@homail.com  
                          **Maysa Succi:** maysucci@hotmail.com  
                          **Joice Matos Biselli:** joice@ibilce.unesp.br  
                          **Fábio Eduardo Severino:** fabio.bjj@gmail.com  
                          **David J. Hughes:** davidhughes@rcsi.ie  
                          **Ana Elizabete Silva:** anabete@ibilce.unesp.br

**Address correspondence to** Ana Elizabete Silva

Rua Cristóvão Colombo, 2265, São José do Rio Preto, SP, CEP: 15054-000, Brazil

Artigo submetido para o periódico *Infection and Immunity* (Fator de impacto: 3,731), em 03 de fevereiro de 2017 (Anexo B).

**ABSTRACT**

Colorectal cancer (CRC) is associated with pathogens like *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*), that may provide a favorable microenvironment for tumorigenesis through inflammatory changes. To examine the effect of *Fn* on microenvironment of gut lesions, we evaluated *Fn* abundance in colorectal adenoma (CRA) and CRC tissue samples and correlated these levels with mRNA expression of inflammatory mediators (*TLR2*, *TLR4*, *NFKB1*, *TNF*, *IL1B*, *IL6* and *IL8*) and microRNAs (*miR-21-3p*, *miR-22-3p*, *miR-28-5p*, *miR-34a-5p*, *miR-135b-5p*). We delineated a miR:mRNA interaction network to investigate the participation of miRNAs in this process. *Fn* and mRNA levels were measured by qPCR in DNA/RNA extracted from the disease and adjacent normal tissues (27 CRA and 43 CRC). Over-abundance of *Fn* was detected in CRA and more markedly in CRC. We observed a significantly higher expression of *TLR4*, *IL1B*, *IL8*, and *miR-135b* in CRA, and *TLR2*, *IL1B*, *IL6*, *IL8*, *miR-34a* and *miR-135b* in CRC compared to their respective normal tissues. Furthermore, *miR-22* and *miR-28* was found downregulated only in CRC tumor samples. mRNA expression of *IL1B*, *IL6*, *IL8* and *miR-22* was positively correlated with *Fn* quantification in CRC. The mRNA expression of *miR-135b* and *TNF* was inversely correlated, suggesting *TNF* as a novel possible target of this miRNA in CRC. miR:mRNA interactions suggest that the upregulation of *miR-34a* in CRC proceeds via a *TLR2/TLR4* dependent response to *Fn*. Our findings indicate that *Fn* is a risk factor for CRC by increasing the expression of inflammatory mediators *IL1B*, *IL6* and *IL8* through a possible miRNA mediated activation of *TLR2* or *TLR4*.

**Keywords:** Colorectal Cancer, Colorectal Adenoma, *Fusobacterium nucleatum*, Inflammation, Cytokines, MicroRNAs.

## INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is one of the three leading causes of cancer-related death and the third most frequent worldwide with incidence of approximately 1.4 million cases and mortality of more than 650,000 (1, 2). In Brazil, CRC is the third most frequent cancer for both sexes (1, 2). CRC is associated with chronic inflammation that can induce malignant cell transformation and activate carcinogenic processes as proliferation, angiogenesis and apoptosis (3).

The human intestinal microbiota is composed of many species that can play an important role in inflammatory gastrointestinal diseases like inflammatory bowel disease and CRC. Among them, *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*) has emerged as a potential factor in CRC etiology (4-6). This bacterium is a Gram-negative anaerobic commensal pathogen that is associated with several human diseases, especially those related to the oral and intestinal tracts (5, 7). Some studies suggest that *Fn* can cause a pro-inflammatory microenvironment in the intestine, through deregulating inflammatory and immune responses, thereby promoting a microenvironment propitious to tumor initiation and CRC progression (5, 6). However, the mechanisms involved in this proposed tumorigenic process are still under discussion.

Studies have shown an abundance of *Fn* in tumor tissues and stool samples from CRC patients compared to adjacent normal tissues, adenomas or even healthy subjects, and this was also correlated with lower patient survival (6,

8, 9). These results reinforce the importance of *Fn* detection to assist in the identification of risk groups and early detection of CRC with implications for disease prognosis as well.

The first step in the interaction of microorganisms with the intestinal epithelium is the recognition by Toll-like receptors (*TLRs*) (10) and the activation of the nuclear factor kappa B (*NFKB*) pathway, the main signaling pathway regulating inflammatory response with implications for tumorigenesis (11). *NFKB* may facilitate tumor progression through expression of pro-inflammatory cytokines (12) which have different roles in colorectal carcinogenesis, such as interleukin (*IL*) *IL1B* (13) that can induce tumor cell proliferation, *IL6* and *IL8* (14) that are related to tumor growth, angiogenesis and metastasis, and the tumor necrosis factor A (*TNF*) (13) that can decrease cell death (15).

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding endogenous RNAs which can regulate post-transcriptional gene expression (16, 17). When deregulated, miRNAs can act as oncogenes or tumor suppressors depending on their target mRNAs. They have a well-established role in inflammatory processes and can serve as molecular markers for diagnosis, prognosis, and treatment response (17). Several miRNAs have been associated with CRC development (18, 19) including investigations of *Fn* induced inflammation and CRC (20, 21, 22).

There is a need for detailed study of the interaction networks between inflammatory genes and miRNAs in the context of potential *Fn*-induced colorectal carcinogenesis. Thus, we investigated the abundance of *Fn* in colorectal adenoma (CRA) and CRC tissues and the association with the expression of inflammatory

genes (*TLR2*, *TLR4*, *NFKB1*, *TNF*, *IL1B*, *IL6* and *IL8*) and miRNAs (*miR-21-3p*, *miR-22-3p*, *miR-28-5p*, *miR-34a-5p* and *miR-135b-5p*) selected due to their proposed involvement in the inflammatory process or colorectal carcinogenesis from the literature and public databases [TarBase v7.0 (23) and miRbase 21 (24)]. Our findings suggest the host inflammatory response to *Fn* that may contribute to the progression of CRA to CRC is mediated by *TLR2* and *TLR4*, activating pro-inflammatory cytokines *IL1B*, *IL6* and *IL8*, in a potentially miRNA dependent process.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Clinical Samples**

This study was approved by the Research Ethics Committee of IBILCE / UNESP (Brazil - number 1.452.373). The written informed consent was obtained from all individuals and all samples are coded to protect patient anonymity.

A total of 43 samples from CRC tissue and the matched adjacent normal tissue (N-CRC), and 27 samples from CRA tissue and the matched adjacent normal tissue (N-CRA) were collected by biopsies or surgical fragments from the Proctology Service of Hospital de Base in São José do Rio Preto, SP (Brazil) during the period of 2010 to 2012.

All required information on demographic and clinical histopathological parameters was obtained from the patients' medical records. The inclusion criteria were patients with a confirmed diagnosis of a pre-cancerous adenomas or sporadic

CRC by clinical histopathological parameters without previous chemotherapy or radiotherapy and without antibiotics or anti-inflammatories use at least two months prior to sample collection.

### **Acid Nucleic Extraction and cDNA reverse transcription**

Simultaneous extraction of total RNA and DNA from colorectal fresh tissue samples was performed using the Trizol® (Ambion, Carlsbad, CA, USA) reagent protocol. A reverse transcriptase reaction was performed using a High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as described previously (25). The synthesis of complementary DNA (cDNA) to the miRNAs was carried out with TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Vilnius, Lithuania), according to the manufacturer's protocol.

### **Quantification of *F. nucleatum***

Quantification of *Fn* was performed in CRA, CRC and the respective adjacent normal DNA samples by quantitative Real-Time PCR (qPCR). TaqMan® gene expression assays (Applied Biosystems) with specific probes for bacterial gene target *NusG* (5'-TCAGCAACTTGTCCCTTCTTGATCTTTAAATGAACC-3' TAMRA™ probe FAM™) and the human gene *PGT* (5'-CCATCCATGTCCTCATCTC-3' TAMRA™ probe FAM™) as a reference were assayed by StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems, Marsiling, Singapore). The reactions were performed separately for each gene in a

12 uL final volume using 20 ng of genomic DNA, 400 nM primer (*NusG* sequences: 5'-CAACCATTACTTTAACTCTACCATGTTCA-3' and 3'-GTTGACTTTACAGAAGGAGATTATGTAAAAATC-5', *PGT*: 5'-ATCCCCAAAGCACCTGGTTT-3' and 3'-AGAGGCCAAGATAGTCCTGGTAA-5') (Invitrogen), 400 nM of probe and GoTaq® probe 1x qPCR Master Mix (Promega). The reaction was subjected to temperatures of 50 °C for 2 minutes, 95 °C for 10 minutes, then 60 cycles of 95 °C for 15 seconds and 57 °C for 1 minute (8). All reactions were performed in duplicate and all experiments had a no template control that was used as confirmation of no contamination. Ct (cycle threshold) values were calculated after adjusting the threshold by StepOne™ Software program (v.2.2.2) and all samples where a Ct was detected by the equipment were considered positive. Relative quantification (RQ) for the *Fn* gene (*NusG*) was calculated based on the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (26), and it was performed in an unpaired way, using the mean of adjacent normal samples as a calibrator for each group.

### **Relative quantification of inflammatory mediators and miRNA genes**

The relative quantification of the expression of 7 inflammatory genes [*TLR2* (Hs00610101\_m1), *TLR4* (Hs01060206\_m1), *NFKB1* (Hs00765730\_m1), *IL1B* (Hs01555410\_m1), *IL6* (Hs00985639\_m1), *IL8* (Hs00174103\_m1) and *TNF* (Hs00174128\_m1)] and 5 miRNAs [hsa-*miR-21*-3p (TM002438), hsa-*miR-22*-3p (TM000398), hsa-*miR-28*-5p (TM000411), hsa-*miR-34a*-5p (TM000426), hsa-*miR-135b*-5p (TM002261)] was performed in 27 CRA and 43 CRC cDNA

samples. Two pools were prepared with the same amount of each adjacent normal cDNA sample from each lesion, forming one pool for N-CRA and one for N-CRC, and it was used as a calibrator for each analysis. All analyses were performed by qPCR technique with StepOnePlus Real-Time PCR Systems equipment (Applied Biosystems). Ct values were calculated after adjusting the threshold by StepOne™ Software program (v.2.2.2). For the mRNA analyses, the *ACTB* and *GAPDH* genes were used as the endogenous controls, as validated in a previous study (25). For the miRNAs analysis, the method of global normalization was employed (27)

The qPCR reactions were performed using the TaqMan® gene expression assays (Applied Biosystems) with specific probes for each gene according to the manufacturer's instructions, in a final volume of 10 µl, with 25 ng of cDNA for the inflammatory mediators genes and 0.66 ng for the miRNAs reactions. All reactions were made in duplicate and all experiments had a no template control. RQ was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (26) and calibrated with the Ct of a pool of the respective adjacent normal samples, or with the Ct mean of CRA samples.

### **miRNA–mRNA interaction networks**

Prediction of targets regulated by miRNAs was performed using the bioinformatics tool miRNA Data Integration Portal (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>) (28). A protein–protein interaction network was generated via the String (version 9.1) database using the target genes as input

(29). The identified miRNAs and target genes were integrated into interaction networks by Cytoscape software (version 3.1.1) (30). The biological function of the identified genes in the network was defined using the tool BiNGO in Cytoscape (version 3.0.2) (31). The Cytoscape software also enables a visualization of the network as graphs with the nodes representing the genes/miRNAs/proteins and the edges representing their interactions.

### **Statistical analyses**

The distribution of continuous data was evaluated using the D'Agostino & Pearson normality test. Wilcoxon signed-rank test was used to comparing the RQ median of gene expression between disease and normal tissues. *F<sub>n</sub>* quantification was performed in an unpaired way, using the mean of adjacent normal samples as a calibrator for each group. For inflammatory gene and miRNA expression, a pool of the RNA extracted from the adjacent normal tissue was considered as one sample for calibration. Spearman's rank correlation coefficient test was performed to compare *F<sub>n</sub>* quantification with expression of the inflammatory genes and miRNAs. For all analysis,  $p < 0.05$  was considered statically significant. The analysis was performed by GraphPad Prism software (version 6.01).

## RESULTS

### Quantification of *F. nucleatum* in adenoma and CRC tissues

Among 43 CRC and 27 CRA samples and their respective normal adjacent mucosa (N-CRC and N-CRA) quantified for *Fn* (Table S1), 33 (76.7%) CRC/ 31 (72.1%) N-CRC, and 14 (51.8%) CRA/ 13 (48.1%) N-CRA samples were positive for bacterial DNA. Of these, the presence of the bacterium was observed in the same patient in both normal mucosa and lesion in 6 CRA and 27 CRC. A significant increase of bacterial DNA was found in both CRA (RQ=5.64) and CRC (RQ=8.67) compared to the normal adjacent tissue (Figure 1).

In addition, analysis of *Fn* quantification for the CRC group was also performed in a paired way, using the respective adjacent normal of each sample as its specific calibrator. The result was consistent with the unpaired analysis showing a higher amount of *Fn* in tumor tissue (RQ=17.71,  $p=0.0002$ ). For CRA samples, this paired analysis was not worthwhile due to the low number of 6 paired samples available.

A comparison of CRC with CRA samples, using the mean Ct of CRA rather than the normal mucosa as calibrator for the analysis, estimated the quantification of *Fn* as 24.84 times higher in CRC than in CRA ( $p<0.0001$ ) (Figure 1C).

### Gene expression of inflammatory mediators

The relative gene expression of inflammatory mediators in both CRA and CRC samples was compared with a pool of the corresponding adjacent normal tissue as a calibrator. For CRA tissue samples, a significant increase of mRNA expression was detected for *TLR4* (RQ=2.27, p=0.0003), *IL1B* (RQ=2.27, p=0.0047) and *IL8* (RQ=3.33, p=0.0006) (Table 1, Figure 2A), while the CRC tumor samples showed a significant increase of mRNA for *TLR2* (RQ=2.36, p<0.0001), *IL1B* (RQ=4.13, p<0.0001), *IL6* (RQ=6.67, p<0.0001) and *IL8* (RQ=6.36, p<0.0001) (Table 1, Figure 2B).

Concordantly, using the Ct mean of CRA disease tissue samples as calibrators for the CRC tumor tissue expression again showed an increased expression of *TLR2* (RQ= 1.68, p<0.0001), *IL1B* (RQ=4.79, p<0.0001), *IL6* (RQ=9.40, p<0.0001) and *IL8* (RQ=12.12, p<0.0001) in CRC samples compared to CRA tissue (Table 1, Figure 2C).

### miRNA gene expression

A similar analysis for the calculation of the miRNA relative gene expression was performed for CRA and CRC samples, comparing each sample with a pool of the adjacent normal tissue. For the CRA group it was observed that *miR-135b* was upregulated (RQ=2.19, p=0.0074) (Table 2, Figure 3A). However, for CRC samples, while *miR-34a* (RQ=1.38, p= 0.0029) and *miR-135b* (RQ=9.31, p<0.0001) were upregulated, *miR-22* (RQ=0.27, p<0.0001) and *miR-28* (RQ=0.65, p=0.0045) were downregulated (Table 2, Figure 3B). Using the CRA

samples as calibrators for CRC again revealed a significant increase in gene expression of *miR-34a* (RQ=1.26, p=0.0101) and *miR-135b* (RQ=2.64, p<0.0001) in tumor tissue (Table 2, Figure 3C).

### **Correlation between inflammatory mediators and miRNA gene expression with *F. nucleatum* abundance**

The RQ values of inflammatory genes (*TLR2*, *TLR4*, *NFKB1*, *TNF*, *IL1B*, *IL6* and *IL8*) were correlated with *Fn* gene quantification in CRA and CRC samples. For the CRA group, the only significant finding was a negative correlation for *TLR4* with *Fn* quantification (r= - 0.62, p=0.0235). However, for CRC, a significant positive correlation for the cytokines *IL1B* (r=0.46, p=0.0066), *IL6* (r=0.47, p=0.0059) and *IL8* (r=0.54, p=0.0013) was observed with bacterial DNA levels (Table 3).

In the miRNA analysis, we evaluated the correlation between the RQ values of miRNAs (*miR-21*, *miR-22*, *miR-28*, *miR-34a* and *miR-135b*) with *Fn* quantification. While no significant correlation was observed for the CRA group, there was for CRC a significant positive correlation of *miR-22* expression with *Fn* (r=0.38, p=0.0331) (Table 3).

### **miRNA–mRNA correlation and interaction networks**

Finally, independent of considerations of *Fn* levels, we also performed the correlation analysis between the RQ values of miRNAs with the inflammatory genes in both CRA and CRC samples. For CRA, there was a positive correlation

of *IL8* with *miR-21* ( $r=0.40$ ,  $p=0.0466$ ), *miR-34a* ( $r=0.44$ ,  $p=0.0296$ ) and *miR-135b* ( $r=0.46$ ,  $p=0.0200$ ) (Table 4). Regarding CRC, several positive correlations were observed between *miR-21*, *miR-22* and *miR-28* with most of the inflammatory genes evaluated, while there was also a significant inverse correlation between *miR-135b* and *TNF* ( $r=-0.32$ ,  $p=0.0411$ ) (Table 4).

Additionally, we identified *in silico* a miRNA:mRNA interaction network that may be deregulated in CRC (Figure 4). This analysis demonstrated the interrelations of the inflammatory mediator genes alone and with their miRNAs moderators (e.g., *miR-28* and *miR-34a* targeting *TLR4*, *miR-22* targeting *TLR2* and *miR-135b* targeting *IL6*). The negative correlation of the expression of *miR-135b* and *TNF* found in this study (Table 4) is also demonstrated in this network, although not validated in our study and not yet predicted by public databases (28) (Figure 4).

## DISCUSSION

To better understand the possible link of *Fn* and the immune response in CRC development, this report evaluated *Fn* quantification in CRA and CRC tissue for the first time in a South American patient study and examined the association with expression of cytokines and miRNAs involved in the inflammatory stress response. Our results corroborate previous studies that *Fn* is present in greater amounts in tumor compared to both adenoma or matched normal tissues (5, 8, 9,

32-34). Importantly, our work further suggests that the abundance of *Fn* can affect cytokine expression possibly via recognition by *TLR4* and *TLR2* with regulation by miRNAs such as *miR-34a*, *miR-135b* and *miR-22*.

Our study demonstrated in a population sample of patients from the Southeastern region of Brazil a significantly higher over-representation of *Fn* in CRA and CRC, compared to adjacent normal tissue, which was more apparent in CRC compared to CRA. This provides more evidence of the likely increasing abundance of *Fn* in disease state through the adenoma to cancer progression. Several studies in North America, European and Asiatic populations have shown the over-abundance of *Fn* when comparing CRC with normal adjacent tissue or healthy subjects (5, 8, 9, 32-34) or with adenoma levels (8, 32). Currently, only one Brazilian study with a small sample size, also in the Southeast region, has previously shown higher levels of *Fn* in CRC (here, DNA levels in fecal samples of CRC patients were compared to those of healthy subjects) (35).

The mechanism by which *Fn* functionally contributes to colorectal tumorigenesis remains unclear. It has been shown that this bacterium causes an inflammatory microenvironment more favorable to CRC development among other bacteria that colonize the tumor site (6). A carcinogenic mechanism has also been proposed by which *Fn* stimulates growth factors to CRC cells by FadA adhesion that binds to E-cadherin and activates the B-catenin pathway thus promoting an oncogenic and inflammatory response (36). Moreover, Yu *et al.* 2015 (37) suggested that the presence of *Fn* in the gut affects tumor-related

cytokines and activates the JAK/STAT and MAPK/ERK pathways, increasing CRC tumor progression.

In CRA disease tissue we found that mRNA expression of *TLR4*, *IL1B*, and *IL8* was increased, as was the expression of *miR-135b*. In CRC tumor tissue, the *TLR2* receptor and the interleukins genes *IL1B*, *IL6* and *IL8* were significantly upregulated, as well as *miR-34a* and *miR-135b* when compared to adjacent normal tissue and to CRA, while *miR-22* and *miR-28* were downregulated. These findings indicate that several of these genes are already deregulated in early CRA stages of colorectal neoplasia as well as in CRC, so that they may be contributing to inflammatory pressures that drive the CRA to CRC progression. Higher *TLR2* expression appears to be a later event in colorectal carcinogenesis, as also indicated by our recent study showing an increased mRNA and protein expression of *TLR2* in CRC tissue (25).

A previous study demonstrates that a main *Fn* outer membrane protein (FomA) is a *TLR2* agonist (38), potentially activating inflammatory factors in the intestine and consequently increasing the risk of cancer. Moreover, the FomA protein induced the production of *IL8* in a human nonhematopoietic cell model of TLR expression (HEK cells) and of *IL6* in a purified splenic B cells from wild-type mice, but failed to activate B cells from *TLR2* KO mice (38). However some in vitro studies demonstrate the activation of both *TLR2* and *TLR4* in the immune response induced by *Fn* (39, 40). Animal models indicate this may be more important for *TLR4* as after *Fn* infection the mortality rate was reduced in *TLR4*-deficient mice, but not in *TLR2*-deficient mice (39). All together, these findings

suggest the involvement of both *TLR2* and *TLR4* for *Fn* recognition, with a possibly differential recognition by *TLR2* with more severe colorectal disease pathology, as demonstrated by our data for tumor tissue.

Correlation of inflammatory gene and miRNA expression with *Fn* level showed a positive association with *IL1B*, *IL6*, *IL8* and with *miR-22* in CRC tissue. Raised expression of *IL1B*, *IL6* and *TNF* has also been reported by in vitro and animal model studies after *Fn* infection (41, 42).

Together with exiting data, our results are consistent with a scenario where *Fn* triggers an increased expression of *IL1B*, *IL6* and *IL8* which further adds to inflammatory pressures fueling the progression of colorectal neoplasia. Our work suggests that this may proceed by an alternative pathway involving recognition by the *TLR2* receptor to that previously shown for the invasion of epithelial cells via FadA.

Currently, few studies have evaluated the abundance of *Fn* with miRNA expression in CRC (20, 21, 22). Yang *et al.* (2017) (22) demonstrated that *Fn* infected CRC cells stimulates the *TLR4*/MYD88/NFkB pathway, which participates in the upregulation of *miR-21-5p*. Moreover, this study found that treatment of *Fn* in cell lines can also induce *TLR2* expression (22).

In our study, we found a positive correlation between *miR-22* and the abundance of *Fn* in CRC. *miR-22* targets the *p38* gene and suppressed its expression, which can impair the production of dendritic cells in tumors (43). As dendritic cells are important in the recognition of microorganisms, by expressing different TLRs such as *TLR2* (44), patients with upregulated *miR-22* may have

less dendritic cells production in their immune system, favoring the proliferation of microorganisms as *Fn*. Therefore, this positive correlation observed between *miR-22* and *Fn* can be related to its role in the immune response and it should be better investigated.

Considering that miRNAs may play an important role in the regulation of gene expression related to microbial recognition, immune response and carcinogenesis, we also evaluated the correlation between expression of the miRNAs and the inflammatory mediators, and we formulated an interaction mRNA:miRNA network based on predicted database targets (28). However, most of the correlations were positive, such as *miR-21*, *miR-34a* and *miR-135b* with *IL8* in CRA, and between *miR-21*, *miR-22* and *miR-28* with most of the inflammatory mediators studied in CRC tissues. However, a negative correlation was observed between *miR-135b* and *TNF*, indicating a possible novel targeting mechanism whereby *miR-135b* binding might decrease *TNF* expression.

*miR-135b* has been previously associated with increased expression in CRC and CRA (45-47), and proposed to be an *oncomiR* targeting several tumor-suppressor genes (45, 47). Studies have proposed that the detection of *miR-135b* in stool samples can be used as a noninvasive biomarker for CRC and CRA (48), and silencing *miR-135b* may be considered a possible therapy for CRC treatment (45, 47). Data showing that *miR-135b* indirectly inhibits the production of LPS (Lipopolysaccharide)-induced *TNF* by suppressing the production of ROS (Reactive Oxygen Species) and the activation of *NFKB* in human macrophages (49) support the negative correlation found between *miR-135b* and *TNF*. Although

this proposed miRNA-mRNA relationship is not yet predicted by the major miRNA public databases (28), it would be interesting to confirm this by functional studies.

Regarding the role of *miR-34a* in CRC, studies have demonstrated it acting as both an *oncomiR* showing upregulation (50, 51) and as a tumor suppressor displaying reduced expression (52-55). According to our interaction network analysis, *miR-34a* can target *TLR4*. This may explain the low expression of *TLR4* in CRC samples and overexpression in CRA, in which *miR-34a* had a basal expression. Our data together with previous studies show an increased expression of *TLR2* in CRC. Therefore, in CRC a significant mechanism for recognition of *Fn* may be via *TLR2*, with consequent activation of interleukins *IL1B*, *IL6* and *IL8*. Moreover, *TLR2* is a predicted target of *miR-22*, which was downregulated in the CRC samples evaluated in our study.

Evidence suggests that miRNAs *miR-22* and *mir-28* function as tumor suppressors. *mir-22* can target key oncogenes for tumor invasion, metastasis and angiogenesis in CRC (56, 57). A recent study has shown a reduced expression of *miR-28* in the tissue of CRC liver metastases (58). However, the activity of this miRNA differs by 3p or 5p strand translation. *miR-28-3p* has been implicated in increased migration and invasion, while *miR-28-5p*, analyzed in our study, was reported to play a role in reducing tumor proliferation, migration and invasion in CRC (59).

Taken these data together, it can be suggested that excessive invasion of colorectal lesions by *Fn* might activate the inflammatory cascade through *TLR2* or

*TLR4* receptors. In turn, this activates the *NFKB* pathway that regulates the expression of pro-inflammatory cytokines, such as *IL1B*, *IL6* and *IL8*, which contribute to cell proliferation and tumor progression. This pathway may be modulated by *miR-135b* that we found to be deregulated in both CRA and CRC tissue and may possibly involve modifications with other upregulated (*miR-34a*) and downregulated (*miR-22* and *miR-28*) miRNAs in CRC carcinogenesis.

## CONCLUSION

Our results showed a higher level of *Fn* in CRA and CRC disease tissue which is more striking for CRC, suggesting an expansion *Fn* colonization during the adenoma – adenocarcinoma progression. Our gene expression data suggest that this may lead to increased inflammatory pressures during CRC development based on the high expression of pro-inflammatory interleukins *IL1B*, *IL6* and *IL8* and the correlation with *Fn* levels. The *Fn* recognition may be mediated by *TLR2* in CRC or *TLR4* in CRA, and dependent on interactions with differently regulated miRNAs. The upregulation of *miR-34a* in CRC could contribute to decreased *TLR4* expression thus possibly favoring the recognition of *Fn* by *TLR2*. Furthermore, we propose a model where the association of *miR-135b* with decreased expression of *TNF* in CRC tumor tissue may result from direct targeting of *TNF* by this miRNA. Together, these findings reinforce the role of *Fn* in colorectal carcinogenesis and the rationale for efforts to develop early detection

strategies for CRC based on *Fn* and its biological interactors as potential biomarkers and the analysis of both miRNA and *Fn* levels may provide an improvement in early detection of CRC.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

To Lucas Trevizani Rasmussen for kindly donating some miRNAs probes.

#### **FUNDING INFORMATION**

This work was funded by grants from Brazilian agencies: São Paulo Research Foundation (FAPESP), N° 2012/15036-8, National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), N° 474.776/2013-1, and a Science Foundation Ireland-Brazil International Strategic Co-operation Award to DJH (13/ISCA/2843).

#### **REFERENCES**

- 1. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J.** 2013. Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer* **132**(5):1133-1145.
- 2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F.** 2014. Cancer incidence and mortality

- 
- worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Intet J Cancer* doi:10.1002/ijc.29210 PMID:25220842.
3. **Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA.** 2014. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res* 2014:149185. doi: 10.1155/2014/149185.
  4. **Leung A, Tsoi H, Yu J.** 2015. *Fusobacterium* and *Escherichia*: models of colorectal cancer driven by microbiota and the utility of microbiota in colorectal cancer screening. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* **9**(5):651-7.
  5. **Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, Dreolini L, Krzywinski M, Strauss J, Barnes R, Watson P, Allen-Vercoe E, Moore RA, Holt RA.** 2012. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res* **22**(2):299-306.
  6. **Kostic, AD, Chun E, Robertson L, Glickman JN, Gallini CA, Michaud M, Clancy TE, Chung DC, Lochhead P, Hold GL, El-Omar EM, Brenner D, Fuchs CS, Meyerson M, Garrett WS.** 2013. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe* **14**(2):207-215.
  7. **Han YW.** 2015. *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen. *Curr Opin Microbiol.* **23**:141-147.
  8. **Flanagan L, Schmid J, Ebert M, Soucek P, Kunicka T, Liska V, Bruha J, Neary P, Dezeuw N, Tommasino M, Jenab M, Prehn JH, Hughes DJ.** 2014. *Fusobacterium nucleatum* associates with stages of colorectal neoplasia

- development, colorectal cancer and disease outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **33**(8): 1381-1390.
- 9. Li YY, Ge QX, Cao J, Zhou YJ, Du YL, Shen B, Wan YJ, Nie YQ.** 2016. Association of *Fusobacterium nucleatum* infection with colorectal cancer in Chinese patients. *World J Gastroenterol* **22**(11):3227-3233.
- 10. Marietta E, Rishi A, Taneja V.** 2015. Immunogenetic control of the intestinal microbiota. *Immunology* **145**(3):313-322.
- 11. Sakamoto K, Maeda S.** 2010. Targeting NF- $\kappa$ B for colorectal cancer. *Expert Opin Ther Tar* **14**(6): 593-601.
- 12. De Koning HD, Simon A, Zeeuwen PL, Schalkwijk J.** 2012. Pattern recognition receptors in infectious skin diseases. *Microbes Infect* **14**(11): 881-893.
- 13. Koorts AM, Levay PF, Becker PJ, Viljoen M.** 2014. Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines during Immune Stimulation: Modulation of Iron Status and Red Blood Cell Profile. *Mediat Inflamm* **2011**:716301.
- 14. Morandini AC, Chaves-Souza PP, Ramos-Junior ES, Brozoski DT, Sipert CR, Souza-Costa CA, Santos CF.** 2013. Toll-Like Receptor 2 Knockdown Modulates Interleukin (IL)-6 and IL-8 but not Stromal Derived Factor-1 (SDF-1/CXCL12) in Human Periodontal Ligament and Gingival Fibroblasts. *J Periodontol* **84**(4):535-544.
- 15. Mager LF, Wasmer MH, Rau TT, Krebs P.** 2016. Cytokine-Induced Modulation of Colorectal Cancer. *Front Oncol* **6**:96.

- 
16. **Di Leva, Garofalo M, Croce CM.** 2014. microRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* **9**:287–314.
  17. **Li X, Nie J, Mei Q, Han WD.** 2016. MicroRNAs: Novel immunotherapeutic targets in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* **22**(23):5317-5331.
  18. **Okayama H, Schetter AJ, Harris CC.** 2012. MicroRNAs and inflammation in the pathogenesis and progression of colon cancer. *Dig Dis* **2**:9-15.
  19. **Mohammadi A, Mansoori B, Baradaran B.** 2016. The role of microRNAs in colorectal cancer. *Biomed Pharmacother* **84**:705-713.
  20. **Ito M, Kanno S, Nosho K, Sukawa Y, Mitsuhashi K, Kurihara H, Igarashi H, Takahashi T, Tachibana M, Takahashi H, Yoshii S, Takenouchi T, Hasegawa T, Okita K, Hirata K, Maruyama R, Suzuki H, Imai K, Yamamoto H, Shinomura Y.** 2015. Association of *Fusobacterium nucleatum* with clinical and molecular features in colorectal serrated pathway. *Int J Cancer* **137**(6):1258-1268.
  21. **Nosho K, Sukawa Y, Adachi Y, Ito M, Mitsuhashi K, Kurihara H, Kanno S, Yamamoto I, Ishigami K, Igarashi H, Maruyama R, Imai K, Yamamoto H, Shinomura Y.** 2016. Association of *Fusobacterium nucleatum* with immunity and molecular alterations in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* **22**(2):557-566.
  22. **Yang Y, Weng W, Peng J, Hong L, Yang L, Toiyama Y, Gao R, Liu M, Yin M, Pan C, Li H, Guo B, Zhu Q, Wei Q, Moyer MP, Wang P, Cai S, Goel A, Qin H, Ma Y.** 2016. *Fusobacterium nucleatum* Increases Proliferation of Colorectal Cancer Cells and Tumor Development in Mice by

---

Activating Toll-Like Receptor 4 Signaling to Nuclear Factor- $\kappa$ , Up-Regulating Expression of MicroRNA-21. *Gastroenterology*. pii: S0016-5085(16)35387-2 doi:10.1053/j.gastro. 2016.11.018. [Epub ahead of print].

23. **Vlachos IS, Paraskevopoulou MD, Karagkouni D, Georgakilas G, Vergoulis T, Kanellos I, Anastasopoulos IL, Maniou S, Karathanou K, Kalfakakou D, Fevgas A, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG.** 2015. DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. *Nucleic Acids Res* **43**(Database issue):D153-D159.
24. **Kozomara A, Griffiths-Jones S.** 2013. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucl Acids Res* **42**(Database issue):D68-D73.
25. **Proença MA, de Oliveira JG, Cadamuro AC, Succi M, Netinho JG, Goloni-Bertolo EM, Pavarino ÉC, Silva AE.** 2015. *TLR2* and *TLR4* polymorphisms influence mRNA and protein expression in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* **21**(25):7730-7741.
26. **Livak KJ, Schmittgen TD.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods* **25**(4):402-408.
27. **Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J.** 2009. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol* **10**(6):R64.

28. **Shirdel EA, Xie W, Mak TW, Jurisica I.** 2011. NAViGaTing the Micronome-- Using Multiple MicroRNA Prediction Databases to Identify Signalling Pathway-Associated MicroRNAs. *PLoS ONE* **6**(2): e17429.
29. **Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, Lin J, Minguez P, Bork P, von Mering C, Jensen LJ.** 2013. STRING v9.1: protein–protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res* **41**(Database issue):D808–D815.
30. **Chen R, Mias GI, Li-Pook-Tham J, Jiang L, Lam HY, Chen R, Miriami E, Karczewski KJ, Hariharan M, Dewey FE, Cheng Y, Clark MJ, Im H, Habegger L, Balasubramanian S, O'Huallachain M, Dudley JT, Hillenmeyer S, Haraksingh R, Sharon D, Euskirchen G, Lacroute P, Bettinger K, Boyle AP, Kasowski M, Grubert F, Seki S, Garcia M, Whirl-Carrillo M, Gallardo M, Blasco MA, Greenberg PL, Snyder P, Klein TE, Altman RB, Butte AJ, Ashley EA, Gerstein M, Nadeau KC, Tang H, Snyder M.** 2012. Personal omics profiling reveals dynamic molecular and medical phenotypes. *Cell* **148**(6):1293–1307.
31. **Maere S, Heymans K, Kuiper M.** 2005. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics* **21**(16): 3448–3449.
32. **Mira-Pascual L, Cabrera-Rubio R, Ocon S, Costales P, Parra A, Suarez A, Moris F, Rodrigo L, Mira A, Collado MC.** 2014. Microbial mucosal colonic shifts associated with the development of colorectal cancer reveal the

- 
- presence of different bacterial and archaeal biomarkers. *J Gastroenterol* **50**(2):167-179.
- 33. Wei Z, Cao S, Liu S, Yao Z, Sun T, Li Y, Li J, Zhang D, Zhou Y.** 2016. Could gut microbiota serve as prognostic biomarker associated with colorectal cancer patients' survival? A pilot study on relevant mechanism. *Oncotarget* **7**(29):46158-46172.
- 34. Repass J, Maherali N, Owen K.** 2016. Registered report: *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Elife* pii: e10012. doi: 10.7554/eLife.10012.
- 35. Fukugaiti MH, Ignacio A, Fernandes MR, Ribeiro Júnior U, Nakano V, Avila-Campos MJ.** 2015. High occurrence of *Fusobacterium nucleatum* and *Clostridium difficile* in the intestinal microbiota of colorectal carcinoma patients. *Braz J Microbiol* **46**(4):1135-1140.
- 36. Rubinstein MR, Wang X, Liu W, Hao Y, Cai G, Han YW.** 2013. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ $\beta$ -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe* **14**(2): 195-206.
- 37. Yu YN, Yu TC, Zhao HJ, Sun TT, Chen HM, Chen HY, An HF, Weng YR, Yu J, Li M, Qin WX, Ma X, Shen N, Hong J, Fang JY.** 2015. Berberine may rescue *Fusobacterium nucleatum*-induced colorectal tumorigenesis by modulating the tumor microenvironment. *Oncotarget* **6**(31):32013-32026.

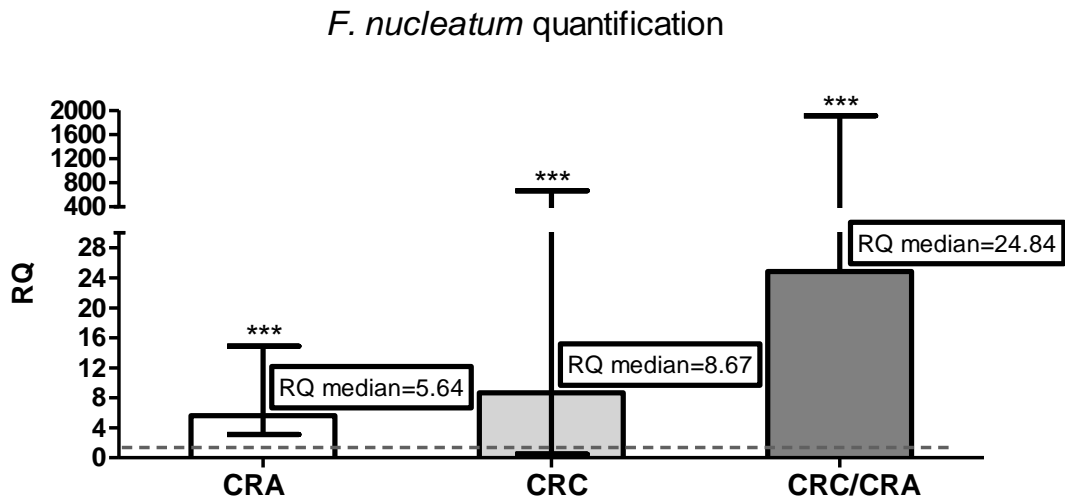
- 
- 38. Toussi DN, Liu X, Massari P.** 2012. The FomA porin from *Fusobacterium nucleatum* is a Toll-like receptor 2 agonist with immune adjuvant activity. *Clin Vaccine Immunol* **19**(7):1093-101.
- 39. Liu H, Redline RW, Han YW.** 2007. *Fusobacterium nucleatum* induces fetal death in mice via stimulation of TLR4-mediated placental inflammatory response. *J Immunol* **179**(4):2501-2508.
- 40. Park SR, Kim DJ, Han SH, Kang MJ, Lee JY, Jeong YJ, Lee SJ, Kim TH, Ahn SG, Yoon JH, Park JH.** 2014. Diverse Toll-like receptors mediate cytokine production by *Fusobacterium nucleatum* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in macrophages. *Infect Immun* **82**(5):1914-1920.
- 41. Velsko IM, Chukkapalli SS, Rivera-Kweh MF, Chen H, Zheng D, Bhattacharyya I, Gangula PR, Lucas AR, Kesavalu L.** 2015. *Fusobacterium nucleatum* Alters Atherosclerosis Risk Factors and Enhances Inflammatory Markers with an Atheroprotective Immune Response in ApoE(null) Mice. *PLoS One* **10**(6):e0129795.
- 42. Martinho FC, Leite FR, Nóbrega LM, Endo MS, Nascimento GG, Darveau RP, Gomes BP.** 2016. Comparasion of *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharides Clinically Isolated from Root Canal Infection in the Induction of Pro-Inflammatory Cytokines Secretion. *Braz Dent J* **27**(2):202-207.
- 43. Liang X, Liu Y, Mei S, Zhang M, Xin J, Zhang Y, Yang R.** 2015. MicroRNA-22 impairs anti-tumor ability of dendritic cells by targeting p38. *PLoS One* **10**(3):0121510.

- 44. Legitimo A, Consolini R, Failli A, Orsini G, Spisni R.** 2014. Dendritic cell defects in the colorectal cancer. *Hum Vaccin Immunother* **10**(11):3224-3235.
- 45. Valeri N, Braconi C, Gasparini P, Murgia C, Lampis A, Paulus-Hock V, Hart JR, Ueno L, Grivennikov SI, Lovat F, Paone A, Cascione L, Sumani KM, Veronese A, Fabbri M, Carasi S, Alder H, Lanza G, Gafa' R, Moyer MP, Ridgway RA, Cordero J, Nuovo GJ, Frankel WL, Rugge M, Fassan M, Groden J, Vogt PK, Karin M, Sansom OJ, Croce CM.** MicroRNA-135b promotes cancer progression by acting as a downstream effector of oncogenic pathways in colon cancer. *Cancer Cell* **25**(4):469-483.
- 46. Wu W, Wang Z, Yang P, Yang J, Liang J, Chen Y, Wang H, Wei G, Ye S, Zhou Y.** 2014. MicroRNA-135b regulates metastasis suppressor 1 expression and promotes migration and invasion in colorectal cancer. *Mol Cell Biochem* **388**(1-2):249-259.
- 47. He Y, Wang J, Wang J, Yung VY, Hsu E, Li A, Kang Q, Ma J, Han Q, Jin P, Xing R, Lu Y, Sheng J.** 2015. MicroRNA-135b regulates apoptosis and chemoresistance in colorectal cancer by targeting large tumor suppressor kinase 2. *Am J Cancer Res* **5**(4):1382-1395.
- 48. Wu CW, Ng SC, Dong Y, Tian L, Ng SS, Leung WW, Law WT, Yau TO, Chan FK, Sung JJ, Yu J.** 2014. Identification of microRNA-135b in stool as a potential noninvasive biomarker for colorectal cancer and adenoma. *Clin Cancer Res* **20**(11):2994-3002.

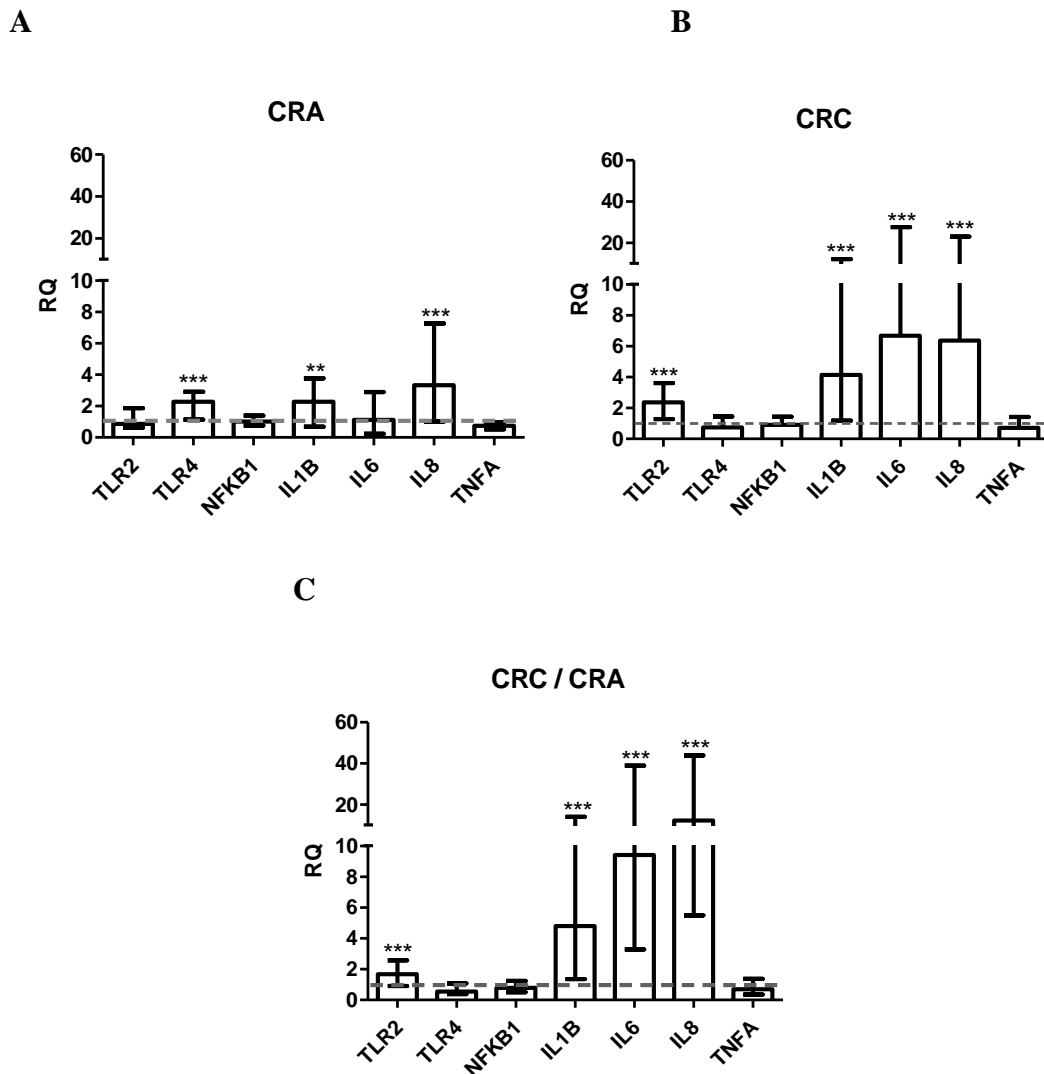
- 49. Li P, Fan JB, Gao Y, Zhang M, Zhang L, Yang N, Zhao X.** 2016. miR-135b-5p inhibits LPS-induced TNF $\alpha$  production via silencing AMPK phosphatase Ppm1e. *Oncotarget* **7**(47):77978-77986.
- 50. Kara M, Yumrutas O, Ozcan O, Celik OI, Bozgeyik E, Bozgeyik I, Tasdemir S.** 2015. Differential expressions of cancer-associated genes and their regulatory miRNAs in colorectal carcinoma. *Gene* **567**(1):81-86.
- 51. Aherne ST, Madden SF, Hughes DJ, Pardini B, Naccarati A, Levy M, Vodicka P, Neary P, Dowling P, Clynes M.** 2015. Circulating miRNAs miR-34a and miR-150 associated with colorectal cancer progression. *BMC Cancer* **15**:329.
- 52. Lai M, Du G, Shi R, Yao J, Yang G, Wei Y, Zhang D, Xu Z, Zhang R, Li Y, Li Z, Wang L.** 2015. MiR-34a inhibits migration and invasion by regulating the SIRT1/p53 pathway in human SW480 cells. *Mol Med Rep* **11**(5):3301-3307.
- 53. Li C, Wang Y, Lu S, Zhang Z, Meng H, Liang L, Zhang Y, Song B.** 2015. MiR-34a inhibits colon cancer proliferation and metastasis by inhibiting platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$ . *Mol Med Rep* **12**(5):7072-7078.
- 54. Chandrasekaran KS, Sathyanarayanan A, Karunakaran D.** 2016. Downregulation of HMGB1 by miR-34a is sufficient to suppress proliferation, migration and invasion of human cervical and colorectal cancer cells. *Tumour Biol* **37**(10):13155-13166.

- 55. Almeida AL, Bernardes MV, Feitosa MR, Peria FM, Tirapelli DP, Rocha JJ, Feres O.** 2016. Serological under expression of microRNA-21, microRNA-34a and microRNA-126 in colorectal cancer. *Acta Cir Bras* **1**:13-18.
- 56. Li B, Song Y, Liu TJ, Cui YB, Jiang Y, Xie ZS, Xie SL.** 2013. miRNA-22 suppresses colon cancer cell migration and invasion by inhibiting the expression of T-celllymphoma invasion and metastasis 1 and matrix metalloproteinases 2 and 9. *Oncol Rep* **29**(5):1932-1938.
- 57. Yamakuchi M, Yagi S, Ito T, Lowenstein CJ.** 2011. MicroRNA-22 regulates hypoxia signaling in colon cancer cells. *PLoS One* **6**(5):e20291.
- 58. Vychytilova-Faltejskova P, Pesta M, Radova L, Liska V, Daum O, Kala Z, Svoboda M, Kiss I, Slaby O.** 2016. Genome-wide microRNA Expression Profiling in Primary Tumors and Matched Liver Metastasis of Patients with Colorectal Cancer. *Cancer Genomics Proteomics* **13**(4):311-316.
- 59. Almeida MI, Nicoloso MS, Zeng L, Ivan C, Spizzo R, Gafà R, Xiao L, Zhang X, Vannini I, Fanini F, Fabbri M, Lanza G, Reis RM, Zweidler-McKay PA, Calin GA.** 2012. Strand-specific miR-28-5p and miR-28-3p have distinct effects in colorectal cancer cells. *Gastroenterology* **142**(4):886-896.

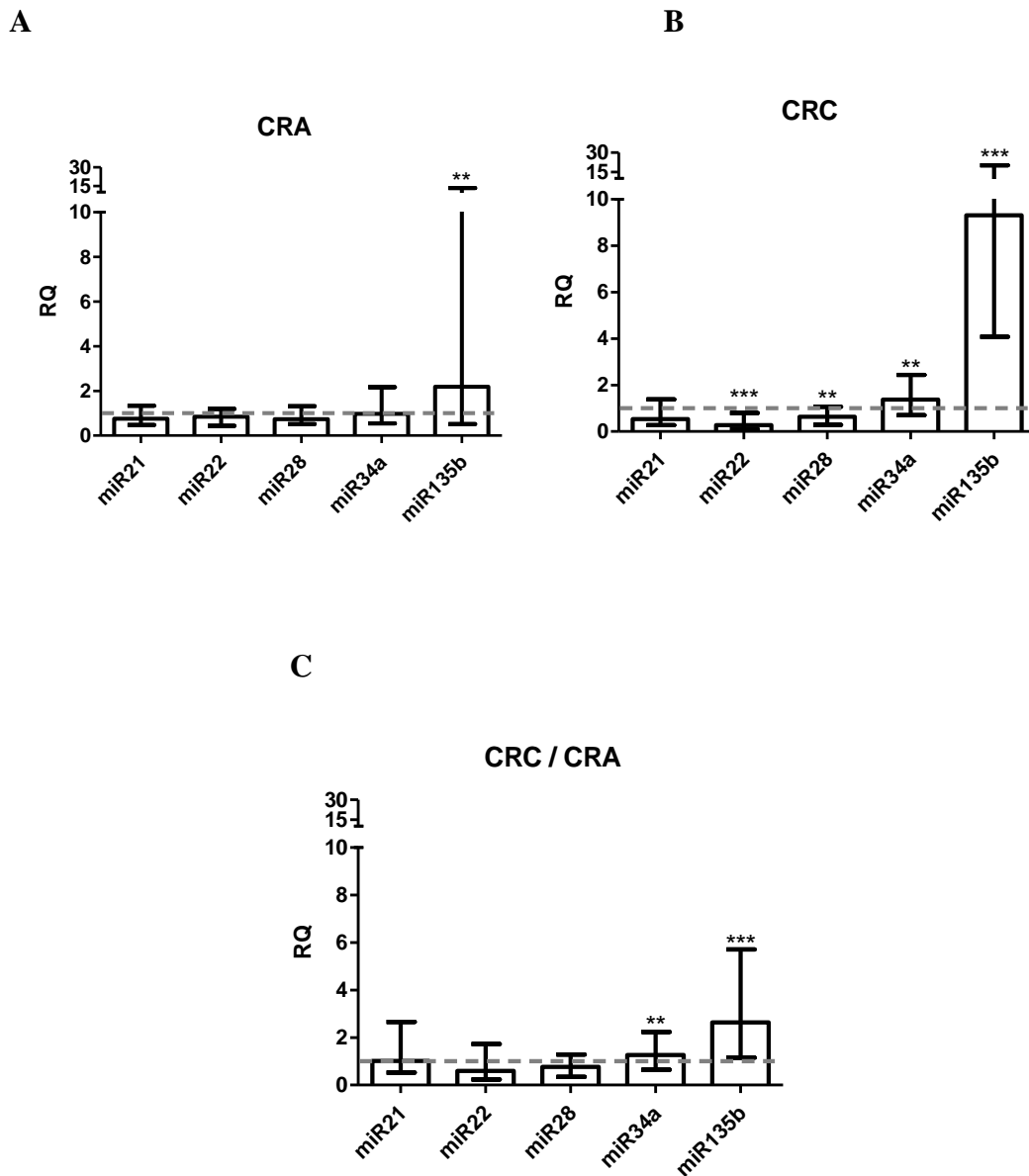
## FIGURES



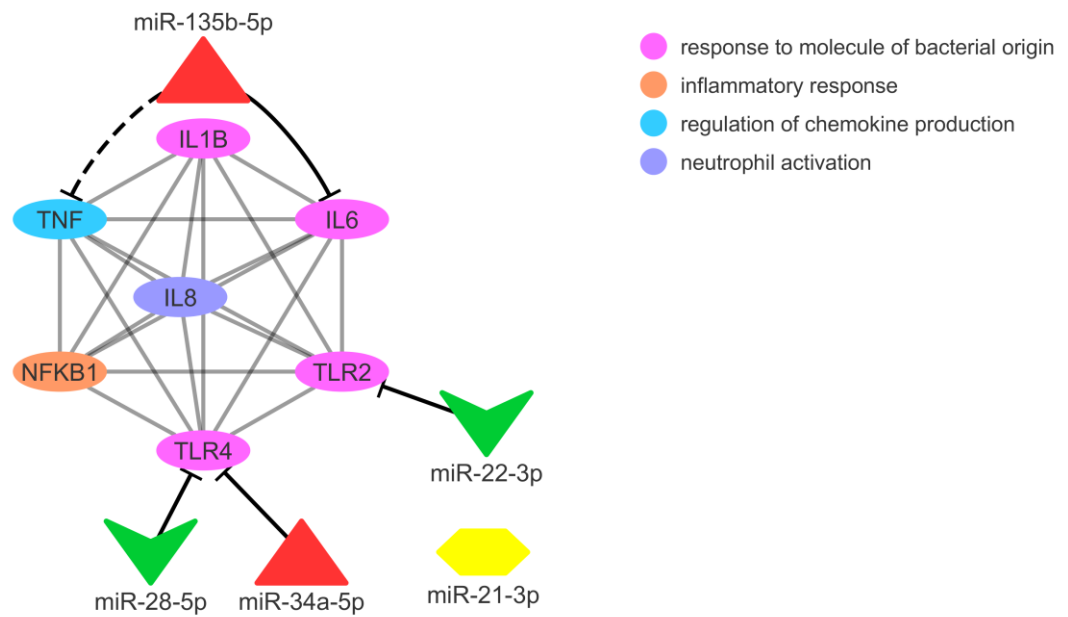
**Figure 1.** Relative Quantification (RQ) of *Fn NusG* gene. in adenoma (CRA) and colorectal cancer (CRC) samples compared to adjacent normal tissue (Normal Reference RQ=1), and CRC compared to CRA tissue (CRC/CRA). Statistically significant difference, according to the Wilcoxon signed rank test (CRA: \*\*\*p= 0.0002, CRC: \*\*\*p= 0.0002, CRC/CRA: \*\*\*p < 0.0001). Median with interquartile range graph.



**Figure 2.** Relative Quantification (RQ) of inflammatory genes: (A) Adenoma (CRA) and (B) colorectal tumor tissue samples (CRC) compared to a pool of respective adjacent normal tissue samples, and (C) CRC compared to CRA samples (CRC / CRA). All samples was normalized for reference genes *ACTB* and *GAPDH*. Normal Reference RQ=1. Statistically significant difference, according to the Wilcoxon signed rank test (\*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ). Median with interquartile range graph.



**Figure 3.** Relative Quantification (RQ) of miRNA genes: (A) Adenoma (CRA) and (B) colorectal tumor tissue samples (CRC) compared to a pool of respective adjacent normal tissue samples, and (C) CRC compared to CRA samples (CRC / CRA). Normal Reference RQ=1. Statistically significant difference, according to the Wilcoxon signed rank test (\*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ). Median with interquartile range graph.



**Figure 4.** Protein interaction network showing miRNAs and their predicted gene targets. The protein interaction network (gray lines) shows the interaction between proteins encoded by target genes that are predicted to be regulated by miRNAs. Predicted interactions between miRNAs and target genes are shown by the black lines. The dashed black line represents the possible interaction suggested in this study for miR-135b-5p and TNF. Ellipses represent target genes/proteins; red triangles represent upregulated miRNAs; green triangles represent downregulated miRNAs.

## TABLES

**Table 1.** Relative quantification (RQ) of mRNA expression of the inflammatory genes in adenoma (CRA) and colorectal carcinoma (CRC) samples compared with adjacent normal tissue samples as calibrator in an unpaired way, and using the adenoma samples as calibrator (CRC/CRA).

	<i>TLR2</i>	<i>TLR4</i>	<i>NFKB1</i>	<i>IL1B</i>	<i>IL6</i>	<i>IL8</i>	<i>TNF</i>
<b>CRA</b>							
RQ median	0.87	2.27	1.02	2.27	1.12	3.33	0.75
		0.32-	0.45-				0.14-
RQ Range	0.36-10.80	11.25	3.38	0.14-76.76	0.09-80.41	0.10-874.50	2.60
P value	0.2940	<b>0.0003*</b>	0.5360	<b>0.0047*</b>	0.2473	<b>0.0006*</b>	0.0527
<b>CRC</b>							
RQ median	2.36	0.74	0.90	4.13	6.67	6.36	0.72
		0.20-	0.31-				0.06-
RQ Range	0.31-35.80	23.42	8.49	0.13-245.70	0.09-192.80	0.16-194.20	31.76
P value	<b>&lt;0.0001*</b>	0.4476	0.9855	<b>&lt;0.0001*</b>	<b>&lt;0.0001*</b>	<b>&lt;0.0001*</b>	0.2391
<b>CRC/CRA</b>							
RQ median	1.68	0.54	0.78	4.79	9.40	12.14	0.70
		0.15-	0.27-				0.06-
RQ Range	0.22-25.49	17.22	7.35	0.15-284.80	0.13-271.80	0.31-370.60	30.77
P value	<b>&lt;0.0001*</b>	0.0608	0.1237	<b>&lt;0.0001*</b>	<b>&lt;0.0001*</b>	<b>&lt;0.0001*</b>	0.1560

Wilcoxon signed rank test. \*P-value <0.05 were considered statistically significant.

**Table 2.** Relative quantification (RQ) of mRNA of the miRNAs in adenoma (CRA) and colorectal carcinoma (CRC) samples compared with adjacent normal tissue samples as calibrator, and using the adenoma samples as calibrator (CRC/CRA).

	<i>miR-21</i>	<i>miR-22</i>	<i>miR-28</i>	<i>miR-34a</i>	<i>miR-135b</i>
<b>CRA</b>					
RQ median	0.75	0.85	0.73	0.97	2.19
RQ Range	0.15-13.91	0.10-3.05	0.08-2.17	0.12-4.74	0.10-25.13
P value	0.6349	0.1747	0.1904	0.3306	<b>0.0074*</b>
<b>CRC</b>					
RQ median	0.53	0.27	0.65	1.38	9.31
RQ Range	0.08-12.53	0.026-2.78	0.11-7.27	0.20-30.0	0.45-74.00
P value	0.1725	<b>&lt; 0.0001*</b>	<b>0.0045*</b>	<b>0.0029*</b>	<b>&lt; 0.0001*</b>
<b>CRC/CRA</b>					
RQ median	1.01	0.59	0.77	1.26	2.64
RQ Range	0.15-23.91	0.06-6.07	0.14-8.79	0.18-27.51	0.13-20.96
P value	0.0969	0.5770	0.1271	<b>0.0101*</b>	<b>&lt; 0.0001*</b>

Wilcoxon signed rank test. \*P-value <0.05 were considered statistically significant.

**Table 3.** Correlation analysis between the relative quantification (RQ) of the inflammatory genes and of the miRNAs with the levels of the *F. nucleatum* gene in adenoma (CRA) and colorectal carcinoma (CRC) samples. Table color-coded represents a range from green (positive correlations) over yellow to red (negative correlations).

Spearman correlation coefficient (r)	CRA	CRC
<b><i>TLR2</i></b>	0.42	0.09
<i>P-value</i>	0.1557	0.6335
<b><i>TLR4</i></b>	-0.62	-0.01
<i>P-value</i>	<b>0.0235*</b>	0.9587
<b><i>NFKB1</i></b>	-0.40	-0.04
<i>P-value</i>	0.1809	0.8045
<b><i>IL1B</i></b>	0.31	<b>0.46</b>
<i>P-value</i>	0.3064	<b>0.0066*</b>
<b><i>IL6</i></b>	0.01	<b>0.47</b>
<i>P-value</i>	0.9716	<b>0.0059*</b>
<b><i>IL8</i></b>	-0.07	<b>0.54</b>
<i>P-value</i>	0.8166	<b>0.0013*</b>
<b><i>TNF</i></b>	0.30	0.23
<i>P-value</i>	0.3156	0.2027
<b><i>miR-21</i></b>	-0.21	0.26
<i>P-value</i>	0.4643	0.1467
<b><i>miR-22</i></b>	0.17	<b>0.38</b>
<i>P-value</i>	0.5528	<b>0.0331*</b>
<b><i>miR-28</i></b>	0.04	0.01
<i>P-value</i>	0.8872	0.9413
<b><i>miR-34a</i></b>	0.17	0.00
<i>P-value</i>	0.5630	0.9905
<b><i>miR-135b</i></b>	-0.05	0.22
<i>P-value</i>	0.8637	0.2163

Spearman correlation test. \*P-value <0.05 were considered statistically significant.

**Table 4.** Correlation analysis between the relative quantification (RQ) of the miRNAs with the inflammatory genes in adenoma (CRA) and colorectal cancer (CRC) samples. Table color-coded represents a range from green (positive correlations) over yellow to red (negative correlations).

Spearman correlation coefficient (r)	<i>miR-21</i>	<i>miR-22</i>	<i>miR-28</i>	<i>miR-34a</i>	<i>miR-135b</i>
<b>CRA</b>					
<b><i>TLR2</i></b>	0.09	0.29	0.31	0.23	0.09
<i>P-value</i>	0,6608	0,1655	0.1266	0.2606	0.6714
<b><i>TLR4</i></b>	0.18	0.06	0.18	0.41	0.38
<i>P-value</i>	0.3892	0.7926	0.3955	0.0431	0.0598
<b><i>NFKB1</i></b>	-0.01	-0.17	-0.21	-0.19	-0.20
<i>P-value</i>	0.9796	0.4252	0.3191	0.3650	0.3454
<b><i>IL1B</i></b>	0.29	0.15	0.09	0.45	0.38
<i>P-value</i>	0.1667	0.4834	0.6555	0.0232	0.0610
<b><i>IL6</i></b>	0.30	0.08	0.05	0.26	0.24
<i>P-value</i>	0.1430	0.7148	0.8237	0.2136	0.2417
<b><i>IL8</i></b>	<b>0.40</b>	0.18	0.17	<b>0.44</b>	<b>0.46</b>
<i>P-value</i>	<b>0.0466*</b>	0.4017	0.4273	<b>0.0296*</b>	<b>0.0200*</b>
<b><i>TNF</i></b>	-0.21	-0.04	-0.03	-0.05	-0.11
<i>P-value</i>	0.3083	0.8638	0.9012	0.8152	0.6084
<b>CRC</b>					
<b><i>TLR2</i></b>	0.29	<b>0.53</b>	0.18	0.19	-0.14
<i>P-value</i>	0.0777	<b>0.0005*</b>	0.2790	0.2408	0.3923
<b><i>TLR4</i></b>	0.07	<b>0.34</b>	<b>0.33</b>	0.26	0.05
<i>P-value</i>	0.6680	<b>0.0377*</b>	<b>0.0401*</b>	0.1216	0.7586
<b><i>NFKB1</i></b>	0.18	<b>0.31</b>	0.02	-0.1	-0.3
<i>P-value</i>	0.2779	<b>0.0499*</b>	0.8958	0.5462	0.0574
<b><i>IL1B</i></b>	<b>0.53</b>	<b>0.43</b>	0.13	0.22	-0.10
<i>P-value</i>	<b>0.0004*</b>	<b>0.0055*</b>	0.4139	0.1668	0.5248
<b><i>IL6</i></b>	<b>0.54</b>	<b>0.57</b>	0.18	0.21	0.05
<i>P-value</i>	<b>0.0004*</b>	<b>0.0002*</b>	0.2813	0.2095	0.7680
<b><i>IL8</i></b>	<b>0.53</b>	<b>0.37</b>	0.09	0.23	0.13
<i>P-value</i>	<b>0.0005*</b>	<b>0.0180*</b>	0.5734	0.1506	0.4314
<b><i>TNF</i></b>	0.26	<b>0.42</b>	0.03	0.08	<b>-0.32</b>
<i>P-value</i>	0.1094	<b>0.0071*</b>	0.8406	0.6264	<b>0.0411*</b>

Spearman correlation test. P-value <0.05 were considered statistically significant.

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

**Table S1.** Characteristics of colorectal adenoma (CRA) and cancer (CRC) patients and relative quantification (RQ) of *F. nucleatum* according to gender, age and location of lesion.

	CRA		CRC	
<b>Age (years old)<sup>a</sup></b>	≤60	>60	≤60	>60
N (%)	12 (44%)	15 (56%)	19 (44%)	24 (56%)
Range	30 to 81		35 to 97	
RQ median	5.938	3.539	82.04	13.44
P-value	0.4557		0.4495	
<b>Sex<sup>a</sup></b>	Female	Male	Female	Male
N (%)	16 (59%)	11 (41%)	19 (44%)	24 (56%)
RQ median	4.44	6.08	165.52	2.63
P - value	0.9497		<b>0.0082*</b>	
<b>Location of lesion<sup>b</sup></b>				
<b>Colon</b>				
N (%)	16 (59%)		14 (33%)	
RQ median	<b>3.45</b>		50.98	
Range (min - max)	(0.52 - 6.26)		(0.04 – 12,49 x10 <sup>3</sup> )	
<b>Sigmoid</b>				
N (%)	6 (22%)		19 (44%)	
RQ median	19.89		2.91	
Range (min - max)	(19.89 - 19-89)		(8x10 <sup>-5</sup> – 62x10 <sup>3</sup> )	
<b>Rectum</b>				
N (%)	5 (19%)		10 (23%)	
RQ median	<b>18.50</b>		494.70	
Range (min - max)	(13.66 - 151.30)		(0.85 – 5x10 <sup>3</sup> )	
P-value	<b>0.0181*</b>		0.1666	

<sup>a</sup>Mann-Whitney U test, <sup>b</sup>Kruskal-Wallis test (post test: Dunn's Multiple Comparison Test).

\*P-value <0.05 were considered statistically significant.

*Discussão*

#### IV. DISCUSSÃO

Visando esclarecer a possível relação de *F. nucleatum* com a resposta inflamatória e o desenvolvimento de CCR (câncer colorretal), este trabalho investigou a abundância de *F. nucleatum* em tecido de ACR (adenoma colorretal) e CCR, pela primeira vez em população brasileira, e avaliou sua influência na expressão de citocinas e miRNAs envolvidos na resposta inflamatória e carcinogênese. Nossos resultados corroboram estudos prévios de que *F. nucleatum* está presente em maiores quantidades no tumor em comparação com adenomas ou tecidos normais adjacentes (CASTELLARIN et al., 2012; FLANAGAN et al., 2014; LI et al., 2016b; MIRA-PASCUAL et al., 2014; WEI et al., 2016; REPASS; MAHERAL; OWEN et al., 2016). Este trabalho sugere ainda que a abundância de *F. nucleatum* pode afetar a expressão de citocinas possivelmente por meio de seu reconhecimento por *TLR4* e *TLR2*, regulado por miRNAs como *miR-34a*, *miR-135b* e *miR-22*.

O presente estudo demonstrou em pacientes brasileiros uma maior abundância de *F. nucleatum* em ACR e em CCR, em comparação com o tecido normal adjacente, e essa abundância foi ainda maior em CCR. Estes dados indicam uma provável colonização crescente de *F. nucleatum* na progressão ACR - CCR. Alguns estudos têm indicado a associação de *F. nucleatum* como fator de risco para CCR em populações da América do Norte, Europa e Ásia, comparando o tecido tumoral com tecido normal adjacente, com indivíduos saudáveis (CASTELLARIN et al., 2012; FLANAGAN et al., 2014; LI et al., 2016b; MIRA-PASCUAL et al., 2014; WEI et al., 2016; REPASS; MAHERAL; OWEN et al., 2016) ou com ACR (FLANAGAN et al., 2014; MIRA-PASCUAL et al., 2014). Atualmente, apenas um estudo brasileiro com baixo número amostral, também na região Sudeste, evidenciou maior abundância de *F. nucleatum* em amostras fecais de pacientes com CCR

em comparação com amostras fecais de indivíduos saudáveis (FUKUGAITI et al., 2015).

Estudos têm demonstrado que *F. nucleatum* está presente em 8,6% de amostras de CCR do Japão (NOSHO et al., 2016) e em 13% de amostras dos Estados Unidos (MIMA et al., 2016a). Estas frequências são menores do que as observadas no presente estudo, que são similares à população chinesa, com 87,1% de frequência de *F. nucleatum* em amostras de CCR (LI et al., 2016b). Esses diferentes resultados podem estar relacionados a hábitos sociais e dietéticos que podem afetar a microbiota intestinal, como o uso de antibióticos, higiene e exposições ambientais (LOZUPONE et al., 2012). Há relatos que uma dieta rica em gordura e açúcar e ingestão de probióticos pode mudar a comunidade microbiana (ALLEN-VERCOE; JOBIN, 2014).

Conforme dados apresentados na Tabela S1 (material suplementar) do artigo, este estudo também mostrou que *F. nucleatum* parece ser mais abundante em adenomas localizados no reto do que de cólon, porém esse achado pode ser devido ao baixo número de amostras analisadas. No entanto, não houve diferença significativa quanto a localização de *F. nucleatum* nas amostras de CCR. Apenas um estudo observou que a quantidade de *F. nucleatum* aumenta linearmente ao longo do intestino a partir do reto em direção ao ceco (MIMA et al., 2016b). Contudo, outros estudos não encontraram associação desta bactéria (FLANAGAN et al., 2014) ou de outras espécies de *Fusobacterium* (TAHARA et al., 2015) com regiões específicas do intestino. Portanto, esses dados podem indicar que essa bactéria nem sempre tem uma preferência pela região intestinal para a colonização.

Com relação à idade dos pacientes, tanto no grupo ACR quanto no de CCR, não foi encontrada diferença quanto à representação bacteriana (Tabela S1, material suplementar), uma vez que todos os pacientes são adultos, onde a infecção por microrganismos não muda muito, como na infância. Sabe-se que a maioria das mudanças na

microbiota intestinal ocorre no início da vida, até que aconteça uma estabilização. Assim, as variações interpessoais na microbiota intestinal são maiores na infância do que em adultos (LOZUPONE et al., 2012). Quanto ao gênero, verificou-se em CCR uma maior quantificação de *F. nucleatum* em mulheres do que em homens (Tabela S1, material suplementar). Com relação a este aspecto, a microbiota varia com a gravidez e influências hormonais (LOZUPONE et al., 2012; GOMEZ; LUCKEY; TANEJA et al., 2015). No entanto, essas diferenças podem estar mais relacionadas a hábitos culturais específicos e estilo de vida dos diferentes sexos do que a uma resposta hormonal, considerando que estudos humanos são difíceis de se interpretar sua causalidade *versus* consequência de doenças devido a um grande número de fatores que influenciam a resposta imune (GOMEZ; LUCKEY; TANEJA et al., 2015).

Embora vários estudos tenham demonstrado a associação de *F. nucleatum* com a tumorigênese colorretal, o mecanismo pelo qual essa bactéria contribui funcionalmente para esse processo permanece incerto. Foi demonstrado que *F. nucleatum* provoca um microambiente inflamatório mais favorável ao desenvolvimento de CCR entre outras bactérias que colonizam o local do tumor (KOSTIC et al., 2013). Foi também proposto um mecanismo carcinogênico pelo qual *F. nucleatum* estimula fatores de crescimento pelas células tumorais por meio da adesina FadA que se liga a E-caderina ativando a via da B-catenina, iniciando uma resposta oncogênica e inflamatória (RUBINSTEIN et al., 2013). Além disso, Yu et al. (2015) sugeriram que a presença de *F. nucleatum* no intestino altera as citocinas relacionadas ao tumor e ativa as vias JAK / STAT e MAPK / ERK, aumentando a progressão de CCR. Um ensaio *in vitro* com a linhagem celular CaCo2 infectada com *F. nucleatum* (CASTELLARIN et al., 2012), um estudo *in vivo* utilizando camundongos HCT119 xenotransplantados (RUBINSTEIN et al., 2013) e um modelo de camundongo  $Apc^{Min+}$  (KOSTIC et al., 2013) infectados com bactérias

reforçam o papel de *F. nucleatum* em promover a inflamação na mucosa intestinal e contribuir para a carcinogênese colorretal.

Além do mais, outro estudo propõe um mecanismo que *F. nucleatum* está associada com CCR aumentando a produção de mediadores inflamatórios como IL10, PGE2 (Prostaglandina E2) e Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) (NOSHO et al., 2016). Outro papel importante de *F. nucleatum* associado à inflamação é a sua capacidade de modular alterações nas células endoteliais e promover a ativação do processo inflamatório, aumentando a vascularização do tecido durante a inflamação (MENDES et al., 2016). Foi mostrado que a infecção por *F. nucleatum* pode aumentar a progressão de CCR, regulando respostas pró-inflamatórias, oncogenes, modulando o mecanismo de defesa imune do hospedeiro e a supressão do sistema de reparo do DNA (KUMAR et al., 2016).

Considerando o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias e a importância dos miRNAs para a carcinogênese colorretal, investigamos se os níveis de *F. nucleatum* podem influenciar a produção de citocinas e a regulação de miRNA no microambiente de ACR e CCR, podendo afetar a progressão tumoral. Para tanto, avaliamos se a expressão de genes de mediadores inflamatórios da via NFkB e miRNAs relacionados à inflamação e ao câncer estão desregulados nos tecidos de ACR e CCR e se a abundância de *F. nucleatum* está associada à desregulação desses genes e miRNAs.

Sabe-se que a inflamação crônica pode ser considerada como um indutor de tumores, e que as citocinas estão envolvidas nesse processo (LANDSKRON et al., 2014; MAGER et al., 2016). Muitos mediadores pró-inflamatórias participam na iniciação e progressão de CCR, como *IL1B*, *IL6*, *IL8* e *TNF* (MAGER et al., 2016). Estas citocinas pró-inflamatórias são descritas como tendo papéis diferentes na carcinogênese colorretal, tais como *IL1B* que pode induzir a proliferação de células epiteliais do tumor, *IL6* e *IL8* que estão relacionadas com o

crescimento tumoral, angiogênese e metástase e TNF que está relacionado com uma redução da sobrevivência do paciente, diminuindo a morte celular em CCR (MAGER et al., 2016).

O presente estudo mostrou que em ACR a expressão de RNAm de *TLR4*, *IL1B* e *IL8* está aumentada, assim como de *miR-135b*. Em CCR, o receptor *TLR2*, as interleucinas *IL1B*, *IL6* e *IL8* estão com expressão gênica aumentada, como também os *miR-34a* e *miR-135b* quando comparados com tecido normal adjacente e com ACR, enquanto que *miR-22* e *miR-28* estão com expressão reduzida. Estes achados indicam que vários destes genes estão desregulados em lesões primárias como ACR e em CCR, e podem estar participando no início de vias inflamatórias, sugerindo uma contribuição para a progressão ACR-CCR. Nenhuma associação foi encontrada para o *miR-21-3p* em ambas lesões. A expressão aumentada de *TLR2* parece ser um evento mais tardio na carcinogênese colorretal, como também indicado por um estudo recente do nosso grupo de pesquisa, que mostrou expressão aumentada de ambos RNAm e proteína de *TLR2* em tecido de CCR (PROENÇA et al., 2015).

Um estudo prévio demonstrou uma proteína externa de membrana de *F. nucleatum* (FomA) como um potencial adjuvante de *TLR2* (TOUSSI; LIU; MASSARI, 2012), potencialmente ativando fatores inflamatórios no intestino e consequentemente aumentando o risco de câncer. Além disso, a proteína FomA induziu a produção de *IL8* num modelo de células não hematopoiéticas humanas para expressão de *TLR* (células HEK) e de *IL6* em células B esplênicas purificadas de camundongos do tipo selvagem, mas não conseguiram ativar células B de camundongos *TLR2-knockout* (TOUSSI; LIU; MASSARI, 2012). No entanto, alguns estudos *in vitro* demonstraram a ativação de ambos *TLR2* e *TLR4* na resposta imune induzida por *F. nucleatum* (PARK et al., 2014; LIU; REDLINE; HAN, 2007). Modelos animais indicam que este reconhecimento pode ser mais importante por *TLR4*, pois após a infecção

por *F. nucleatum*, a taxa de mortalidade de fetos foi reduzida em camundongos com deficiência de *TLR4*, mas não em camundongos com deficiência de *TLR2* (LIU; REDLINE; HAN, 2007). Portanto, esses achados sugerem o envolvimento de *TLR2* e *TLR4* para o reconhecimento de *F. nucleatum*, mas provavelmente com reconhecimento diferencial por *TLR2* em estágios mais avançados da progressão tumoral, como demonstrado pelos nossos dados para CCR.

A correlação dos genes inflamatórios e da expressão de miRNA com os níveis de *F. nucleatum* mostrou associação positiva com *IL1B*, *IL6*, *IL8* e com *miR-22* em tecido de CCR. Velsko et al. (2015) mostraram que a concentração de IL6 e IL1B aumenta significativamente em soro de camundongos após sua infecção com *F. nucleatum*. Enquanto que Martinho et al. (2016) observaram um aumento significativo de TNF e em níveis mais elevados de IL1B em cultura celular de macrófagos após tratamento com LPS isolado de *F. nucleatum*. Em conjunto, esses resultados são concordantes e indicam que *F. nucleatum* desencadeia o aumento da expressão de *IL1B*, *IL6* e *IL8*, exacerbando a resposta inflamatória, podendo contribuir para a progressão da neoplasia colorretal. Nossos dados sugerem que isto pode prosseguir por uma via alternativa que envolve o reconhecimento pelo receptor *TLR2*, além da conhecida via de invasão de células epiteliais através de FadA.

miRNAs também estão envolvidos na regulação da expressão de genes relacionados com o reconhecimento microbiano e resposta imune, e podem desempenhar um papel fundamental através de suas interações com a microbiota intestinal. Atualmente, poucos estudos avaliaram a abundância desta bactéria com expressão de miRNAs (ITO et al., 2015; NOSHO et al., 2016; YANG et al., 2017). Em diferentes linhagens celulares de CCR incubadas com *F. nucleatum* observou-se aumento de expressão de 50 miRNA, enquanto 52 apresentaram expressão reduzida, destacando-se dentre eles o *miR-21-5p* (YANG et al., 2017), ou seja, a fita mais estudada em comparação com *miR-21-3p*,

avaliado no presente estudo. Os autores também silenciaram *miR-21-5p* e mostraram que este procedimento podia aliviar a função oncogênica desta bactéria durante a carcinogênese colorretal (YANG et al., 2017). Além disso, demonstraram que a via TLR4 / MYD88 / NFkB é estimulada por *F. nucleatum* em células de CCR, e que esta via participa da regulação de *miR-21-5p*, aumentando sua expressão (YANG et al., 2017). Esta regulação de *miR-21-5p* também foi confirmada em amostras de CCR, significativamente correlacionado com grandes quantidades de *F. nucleatum* e pior prognóstico (YANG et al., 2017). Adicionalmente, este estudo também mostrou que o tratamento de *F. nucleatum* em cultura celular de CCR induziu a expressão de *TLR2* (YANG et al., 2017). Dessa forma concordando com nossos resultados que mostraram *TLR2* mais expresso que *TLR4* em amostras de CCR, e assim indicando que diferentes receptores podem reconhecer a bactéria e ativar as vias moleculares envolvidas na carcinogênese colorretal.

Nosso estudo encontrou uma correlação positiva entre o *miR-22* e a abundância de *F. nucleatum* em CCR. Um estudo recente indicou que *miR-22* tem como alvo o gene *p38*, suprimindo sua expressão, o que pode prejudicar a produção de células dendríticas em tumores (LIANG et al., 2015). Como as células dendríticas são importantes no reconhecimento de microrganismos, expressando diferentes TLRs, como *TLR2* (LEGITIMO et al., 2014), pacientes com expressão elevada de *miR-22* podem ter menos células dendríticas no seu sistema imunológico, favorecendo a proliferação de microrganismos como *F. nucleatum*. Além disso, *TLR2* é alvejado pelo *miR-22*, como mostra nossa rede de interação, podendo reduzir o reconhecimento de *F. nucleatum* pelo sistema imunológico, permitindo a proliferação da bactéria. Yang et al. (2017) também encontraram um aumento significativo de *miR-22* em diferentes linhagens celulares de CCR após tratamento com *F. nucleatum*. Portanto, esta correlação positiva

observada entre *miR-22* e *F. nucleatum* pode estar relacionada ao seu papel na resposta imune e deve ser melhor investigada.

Considerando que os miRNAs podem desempenhar um papel importante na regulação da expressão gênica relacionada ao reconhecimento microbiano, resposta imunológica e carcinogênese (LI et al., 2016a), nós também avaliamos a correlação entre a expressão dos miRNAs e os mediadores inflamatórios, e elaboramos uma rede de interação miRNA:RNAm baseada em alvos preditos conforme bases de dados públicos (SHIRDEL et al., 2011). Entretanto, a maioria das correlações foram positivas, como entre *miR-21*, *miR-34a* e *miR-135b* com *IL8* em ACR e entre *miR-21*, *miR-22* e *miR-28* com a maioria dos mediadores inflamatórios estudados em CCR. No entanto, observou-se uma correlação negativa entre *miR-135b* e *TNF*, sugerindo um novo alvo, pelo qual a ligação de *miR-135b* pode regular a expressão de *TNF*. Contudo essa relação precisa ser melhor investigada por estudos funcionais.

*miR-135b* tem sido relatado com expressão aumentada em CCR e ACR (VALERI et al., 2014; WU et al., 2014a; HE et al., 2015), e apresenta função de *oncomiR* alvejando vários genes supressores tumorais, como *TGFbR2* (fator de crescimento transformante b receptor 2), *DAPK1* (morte associada à proteína quinase 1), *APC* (polipose adenomatosa coli) (VALERI et al., 2014) e *LAST2* Quinase 2, que pode diminuir a apoptose em CCR (HE et al., 2015). Estudos têm sugerido que a detecção de *miR-135b* em amostras de fezes pode ser utilizada como um biomarcador não invasivo para CCR e ACR (WU et al., 2014b), e que o silenciamento de *miR-135b* pode ser considerado uma possível terapia para o tratamento de CCR (VALERI et al., 2014, HE et al., 2015). Foi relatado também que *miR-135b* inibe indiretamente a produção de *TNF* induzido por LPS (lipopolissacarídeo), suprimindo a produção de ROS e a ativação de NFkB em macrófagos humanos (LI et al., 2016c), suportando a correlação negativa encontrada entre *miR-135b* e *TNF*. Embora esta

relação miRNA:RNAm alvo não esteja predita em base de dados públicas, nosso estudo sugere que *TNF* pode ser um possível alvo para *miR-135b*, explicando assim a baixa expressão desta citocina nas amostras de ACR e CCR avaliadas.

Com relação ao papel do *miR-34a* em CCR, alguns estudos têm demonstrado que ele atua como um *oncomiR*, com expressão aumentada em CCR (KARA et al., 2015; AHERNE et al., 2015), enquanto outros encontraram expressão reduzida, sendo assim considerado como supressor tumoral (LAI et al., 2015; LI et al., 2015; LU et al., 2015; CHANDRASEKARAN, SATHYANARAYANAN; KARUNAGARAN, 2016; ALMEIDA et al., 2016). A ação dos miRNAs como *oncomiRs* ou supressores tumorais pode depender dos genes alvos e do tipo de tumor. De acordo com nossa análise de rede de interação, *miR-34a* pode alvejar *TLR4*. Isto pode explicar a baixa expressão de *TLR4* em amostras de CCR e a expressão aumentada em ACR, onde *miR-34a* teve uma expressão basal. Portanto, em CCR, um mecanismo alternativo para o reconhecimento de *F. nucleatum* pode ser via *TLR2*, com consequente ativação de interleucinas *IL1B*, *IL6* e *IL8*. Além disso, de acordo com nossa rede de interação, *TLR2* é um alvo predito para *miR-22*, que foi encontrado com expressão reduzida em CCR.

Evidências sugerem que *miR-22* e *miR-28*, que apresentaram expressão reduzida no presente estudo tem papel de supressor tumoral. Entre os genes alvo de *miR-22* destaca-se *TIAM1* (invasão e metástase de células de linfoma T1) (LI et al., 2013), reduzindo *MMP-2 / MMP-9* (metaloproteinases de matriz genética pró-invasivas 2 e 9) e *VEGF* (fator de crescimento endotelial vascular), que contribuem para a diminuição da metástase e invasão de células tumorais em CCR. Outros estudos indicam que *miR-22* é capaz de alvejar *HIF-1a* (fator induzível por hipoxia 1a), reprimindo a produção de *VEGF* durante a hipóxia, o que proporciona um efeito anti-angiogênico (YAMAKUCHI et al., 2011). Assim,

estes estudos demonstram a importância deste miRNA como supressor tumoral na carcinogênese intestinal.

Quanto ao *miR-28*, estudo recente também mostrou baixa expressão desse miRNA em tecido de metástases hepáticas de CCR (VYCHYTILOVA-FALTEJSKOVA et al., 2016). No entanto, há diferença na ação deste miRNA de acordo com a fita 3p ou 5p avaliada. *miR-28-3p* alveja *NM23-H1* (supressor de metástases), aumentando a migração e invasão, enquanto *miR-28-5p*, avaliado em nosso estudo, alveja *CCND1* (ciclina D1) e *HOXB3*, reduzindo a proliferação tumoral, migração e invasão em CCR (ALMEIDA et al., 2012).

Neste contexto, pode-se sugerir que a colonização excessiva pela *F. nucleatum*, em conjunto com a microbiota intestinal, pode ativar a cascata inflamatória através de receptores *TLR2* ou *TLR4*. Estes receptores regulam a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como *IL1B*, *IL6* e *IL8*, que contribuem para a proliferação celular e progressão tumoral. Esta via pode ser modulada por miRNAs, como *miR-135b*, que evidenciamos estar com expressão aumentada em ambos tecidos ACR e CCR, bem como outros miRNAs desregulados na carcinogênese colorretal, como *miR-34a*, *miR-22* e *miR-28*.

*Conclusões*

## V. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos por esse estudo é possível obter as seguintes conclusões:

- 1- *F. nucleatum* está presente em maior quantidade em adenoma e carcinoma colorretal, sendo mais abundante no tecido tumoral, sugerindo um aumento progressivo da colonização no intestino durante a via adenoma-adenocarcinoma;
- 2- Adenoma e carcinoma colorretal apresentam expressão alterada de citocinas pró-inflamatórias, receptores Toll-like e miRNAs, destacando aumento de *IL1B*, *IL8*, *TLR4* e do *miR-135b* em adenoma, e elevação de *IL1B*, *IL6*, *IL8*, *TLR2*, *miR-34a*, *miR-135b* e redução dos *miR-22* e *miR-28* em adenocarcinoma colorretal, alguns dos quais estão relacionados com a abundância da bactéria nestas lesões;
- 3- Citocinas pró-inflamatórias são reguladas a partir do reconhecimento de *F. nucleatum* por receptores *TLR2* ou *TLR4* conforme a interação com miRNAs, que se encontram desregulados na progressão adenoma-carcinoma. O aumento da expressão de *miR-34a* e a redução da expressão de *miR-22* em adenocarcinoma pode contribuir para diminuição da expressão de *TLR4* favorecendo o reconhecimento desta bactéria por *TLR2* no tumor. Além disso, a correlação negativa de *miR-135b* com *TNF* em ambas lesões sugere esta citocina como um possível alvo para *miR-135b*, regulando *TNF* tanto em adenoma quanto em câncer colorretal.

Esses achados reforçam a relação da *F. nucleatum* com a carcinogênese colorretal, desencadeando alterações de citocinas, receptores e miRNAs. Portanto, justificando maiores esforços para o desenvolvimento de estratégias de detecção precoce para o CCR com base em *F. nucleatum* e seus ativadores biológicos, como potenciais biomarcadores para proporcionar uma melhora na detecção de grupos de risco para esta neoplasia.

## *Referências Bibliográficas*

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBAS, A.K.; LICHTTMAN, A.H.; POBER, J.S. *Imunologia Celular e molecular*. 4 ed. Rio de Janeiro: **Revinter**, 2003. 544p.
2. AGGARWAL, I. Targeting the Interleukin-8 Signaling Pathway in Colorectal Cancer: A Mini-review. **Journal of Young Investigators**, v. 25, n. 8, p. 108-111, 2013.
3. AGRAWAL, D.; RANAWAT, M.S.; KHINCHI, M.P.; GUPTA, M.K.; SHARMA, N.; AVLANI, G. Diagnosis and treatment of colorectal cancer: A review. **Journal of Drug Delivery & Therapeutics**, v. 2, n. 3, p. 60-66, 2012.
4. AHERNE, S.T.; MADDEN, S.F.; HUGHES D.J.; PARDINI, B.; NACCARATI, A.; LEVY, M.; VODICKA, P.; NEARY, P.; DOWLING, P.; CLYNES, M. Circulating miRNAs miR-34a and miR-150 associated with colorectal cancer progression. **BMC Cancer**, v. 15, p. 329, 2015.
5. AL OBEED, O.A.; ALKHAYAL, K.A.; AL SHEIKH, A.; ZUBAIDI, A.M.; VAALI-MOHAMMED, M.A.; BOUSHEY, R.; MCKERROW, J.H.; ABDULLA, M.H. Increased expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  is associated with advanced colorectal cancer stages. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 48, p. 18390-18396, 2014.
6. ALLEN-VERCOE, E.; JOBIN, C. *Fusobacterium* and *Enterobacteriaceae*: important players for CRC? **Immunol Lett**, v. 162, p. 54-61, 2014.
7. ALMEIDA, A.L.; BERNARDES, M.V.; FEITOSA, M.R.; PERIA, F.M.; TIRAPELLI, D.P.; ROCHA, J.J.; FERES, O. Serological under expression of microRNA-21, microRNA-34a and microRNA-126 in colorectal cancer. **Acta Cir Bras**, v. 1, p. 13-18, 2016.
8. ALMEIDA, M.I.; NICOLOSO, M.S.; ZENG, L.; IVAN, C.; SPIZZO, R.; GAFÀ, R.; XIAO, L.; ZHANG, X.; VANNINI, I.; FANINI, F.; FABBRI, M.; LANZA, G.; REIS, R.M.; ZWEIDLER-MCKAY, P.A.; CALIN, G.A. Strand-specific miR-28-5p and miR-28-3p have distinct effects in colorectal cancer cells. **Gastroenterology**, v. 142, n. 4, p. 886-896, 2012.

9. ANTONI, S.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; ZNAOR, A.; JEMAL, A.; BRAY, F. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. **Eur Urol**, v. 71, n. 1, p. 96-108, 2017.
10. ARANCIBIA, S.A.; BELTRÁN, C.J.; AGUIRRE, I.M.; SILVA, P.; PERALTA, A.L.; MALINARICH, F.; HERMOSO, M.A. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. **Biol Res**, v. 40, p. 97-112, 2007.
11. ARVELO, F.; SOJO, F.; COTTE, C. Biology of colorectal cancer. **Ecancermedicalscience**, v. 9, p. 520, 2015.
12. ASHTON, K.A.; PROIETTO, A.; OTTON, G.; SYMONDS, I.; MCEVOY, M.; ATTIA, J.; SCOTT, R.J. Toll-Like Receptor (*TLR*) and Nucleosome-binding Oligomerization Domain (*NOD*) gene polymorphisms and endometrial cancer risk. **BMC Cancer**, v. 10, p. 382-388, 2010.
13. BĂLĂȘOIU, M.; BĂLĂȘOIU, A.T.; MOGOANTĂ, S.Ș.; BĂRBĂLAN, A.; STEPAN, A.E.; CIUREA, R.N.; ALEXANDRU, D.O.; ENESCU, A.; MOGOANTĂ, L. Serum and tumor microenvironment IL-8 values in different stages of colorectal cancer. **Rom J Morphol Embryol**, v. 55, p. 575-578, 2014.
14. BAROUDI, O.; BENAMMAR-ELGAAIED, A. Involvement of genetic factors and lifestyle on the occurrence of colorectal and gastric cancer. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 107, p. 72-81, 2016.
15. BORASKA JELAVIĆ, T.; BARISIĆ, M.; DRMIC HOFMAN, I.; BORASKA, V.; VRDOLJAK, E.; PERUZOVIĆ, M.; HOZO, I.; PULJIZ, Z.; TERZIĆ, J. Microsatellite GT polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with colorectal cancer. **Clin Genet**, v. 70, p. 156-160, 2006.
16. CADAMURO, A.C.; ROSSI, A.F.; MANIEZZO, N.M.; SILVA, A.E. Helicobacter pylori infection: host immune response, implications on gene expression and microRNAs. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 6, p. 1424-1437, 2014.

17. CAMMAROTA, R.; BERTOLINI, V.; PENNESI, G.; BUCCI, E.O.; GOTTARDI, O.; GARLANDA, C.; LAGHI, L.; BARBERIS, M.C.; SESSA, F.; NOONAN, D.M.; ALBINI, A. The tumor microenvironment of colorectal cancer: stromal *TLR-4* expression as a potential prognostic marker. **Journal of Translational Medicine**, v. 8, p. 112-127, 2010.
18. CANDELA, M.; TURRONI, S.; BIAGI, E.; CARBONERO, F.; RAMPELLI, S.; FIORENTINI, C.; BRIGIDI, P. Inflammation and colorectal cancer, when microbiota-host mutualism breaks. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 4, p. 908-922, 2014.
19. CAROTHERS, A.M.; DAVIDS, J.S.; DAMAS, B.C.; BERTAGNOLLI, M.M. Persistent cyclooxygenase-2 inhibition downregulates NF- $\kappa$ B, resulting in chronic intestinal inflammation in the min/+ mouse model of colon tumorigenesis. **Cancer Res**, v. 70, n. 11, p. 4433-4442, 2010.
20. CASTELLARIN, M.; WARREN, R.L.; FREEMAN, J.D.; DREOLINI, L.; KRZYWINSKI, M.; STRAUSS, J.; BARNES, R.; WATSON, P.; ALLEN-VERCOE, E.; MOORE, R.A.; HOLT, R.A. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. **Genome Res**, v. 22, n. 2, p. 299-306, 2012.
21. CHANDRASEKARAN, K.S.; SATHYANARAYANAN, A.; KARUNAGARAN, D. 2016. Downregulation of HMGB1 by miR-34a is sufficient to suppress proliferation, migration and invasion of human cervical and colorectal cancer cells. **Tumour Biol** **37**(10):13155-13166.
22. COTTI, G.C.C.; SANTOS, F.P.S; SEBASTIANES, F.M.; HABR-GAMA, A.; SEID, V.E.; MARTINO, R.B. Genetics of colorectal câncer. **Rev Med (São Paulo)**, v. 79, p. 45-64, 2000.
23. CRETOIU, D.; XU, J.; XIAO, J.; SUCIU, N.; CRETOIU, S.M. Circulating MicroRNAs as Potential Molecular Biomarkers in Pathophysiological Evolution of Pregnancy. **Dis Markers**, v. 2016, p. 3851054, 2016.

24. DAN, H.; LIU, W.; ZHOU, Y.; WANG, J.; CHEN, Q.; ZENG, X. Association of interleukin-8 gene polymorphisms and haplotypes with oral lichen planus in a Chinese population. **Inflammation**, v. 33, n. 2, p. 76-81, 2010.
25. DE KONING, H.D.; SIMON, A.; ZEEUWEN, P.L.; SCHALKWIJK, J. Pattern recognition receptors in infectious skin diseases. **Microbes Infect**, v. 14, n. 11, p. 881-893, 2012.
26. Di LEVA, G.; GAROFALO, M.; CROCE, C.M. microRNAs in cancer. **Annu Rev Pathol**, v. 9, p. 287-314, 2014.
27. DINARELLO, C.A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, v.117, n. 14, p. 3720-3732, 2011.
28. DYSON, J.K.; RUTTER, M.D. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: what is the real magnitude of the risk? **World J Gastroenterol**, v. 18, n. 29, p. 3839-3848, 2012.
29. EL-OMAR, E.M.; NG, M.T.; HOLD, G.L. Polymorphisms in Toll-like receptor genes and risk of cancer. **Oncogene**, v. 27, n. 2, p. 244-252, 2008.
30. FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D.M.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Intet J Cancer**, doi:10.1002/ijc.29210 PMID:25220842, 2014.
31. FINN, O.J. Cancer immunology. **N Engl J Med**, v. 358, p. 2704-2715, 2008.
32. FLANAGAN, L.; SCHMID, J.; EBERT, M.; SOUCEK, P.; KUNICKA, T.; LISKA, V.; BRUHA, J.; NEARY, P.; DEZEEUW, N.; TOMMASINO, M.; JENAB, M.; PREHN, J.H.; HUGHES, D.J. *Fusobacterium nucleatum* associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer and disease outcome. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 33, n. 8, p. 1381-1390, 2014.

33. FUKUGAITI, M.H.; IGNACIO A, FERNANDES, M.R.; RIBEIRO JÚNIOR, U.; NAKANO, V.; AVILA-CAMPOS, M.J. High occurrence of *Fusobacterium nucleatum* and *Clostridium difficile* in the intestinal microbiota of colorectal carcinoma patients. **Braz J Microbiol**, v. 46, n.4, p. 1135-1140, 2015.
34. GIURIZATO, C.S.B.; AREIAS, M.A.C. Estudo da prevalência de câncer colorretal no período de 2005 em um hospital do sistema único de saúde na cidade de Dourados-MS. **Interbio**, v. 2, n. 2, p. 21-28, 2008.
35. GOMEZ, A.; LUCKEY, D.; TANEJA, V. The gut microbiome in autoimmunity: Sex matters. **Clin Immunol**, v. 159, n. 2, p. 154-162, 2015.
36. GRAU, M.V.; SANDLER, R.S.; MCKEOWN-EYSSEN, G.; BRESALIER, R.S.; HAILE, R.W.; BARRY, E.L.; AHNEN, D.J.; GUI, J.; SUMMERS, R.W.; BARON, J.A. Nonsteroidal anti-inflammatory drug use after 3 years of aspirin use and colorectal adenoma risk: observational follow-up of a randomized study. **J Natl Cancer Inst**, v. 101, p. 267-276, 2009.
37. GRIBAR, S.C. ; ANAND, R.J.; SODHI, C.P.; HACKAM, D.J. The role of epithelial Toll-like receptor signaling in the pathogenesis of intestinal inflammation. **J Leukoc Biol**, v. 83, p. 493-498, 2008.
38. HAI PING, P.; FENG, B.O.T.; LI, L.; NAN HUI, Y.; HONG, Z. IL-1 $\beta$ /NF- $\kappa$ b signaling promotes colorectal cancer cell growth through miR-181a/PTEN axis. **Arch Biochem Biophys**, v. 604, p. 20-26, 2016.
39. HAN, Y.W. *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen. **Curr Opin Microbiol**, v. 23C, p. 141-147, 2015.
40. HE, Y.; WANG, J.; WANG, J.; YUNG, V.Y.; HSU, E.; LI, A.; KANG, Q.; MA, J.; HAN, Q.; JIN, P.; XING, R.; LU, Y.; SHENG, J. MicroRNA-135b regulates apoptosis and chemoresistance in colorectal cancer by targeting large tumorsuppressor kinase 2. **Am J Cancer Res**, v. 5, n. 4, p. 1382-1395, 2015.

41. HIRANO, T. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. **Intern Rev Immunol**, v.16, p. 249–284, 1998.
42. HISHIDA, A. MATSUO, K.; GOTO, Y.; NAITO, M.; WAKAI, K.; TAJIMA, K.; HAMAJIMA, N. No associations of *Toll-like receptor 2 (TLR2)* -196 to -174del polymorphism with the risk of *Helicobacter pylori* seropositivity, gastric atrophy, and gastric cancer in Japanese. **Gastric Câncer**, v. 13, p. 251-257, 2010.
43. HISHIDA, A.; MATSUO, K.; GOTO, Y.; NAITO, M.; WAKAI, K.; TAJIMA, K.; HAMAJIMA, N. Combined Effect of miR-146a rs2910164 G/C Polymorphism and Toll-like Receptor 4 +3725 G/C Polymorphism on the Risk of Severe Gastric Atrophy in Japanese. **Dig Dis Sci**, v. 56, p. 1131-1137, 2011.
44. IMPERIALE, T.F.; RANSOHOFF, D.F. Risk for colorectal cancer in persons with a family history of adenomatous polyps: a systematic review. **Ann Intern Med**, v. 156, n. 10, p. 703-709, 2012.
45. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Coordenação de Prevenção e Vigilância Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2016, available in: <<http://www.inca.gov.br>>, accessed in: August 10th 2016.
46. IOANNOU, S.; VOULGARELIS, M. Toll-Like Receptors, Tissue Injury, and Tumorigenesis. **Mediat Inflamm**, v. 2010, n. 2010, 9 p., pii: 581837. doi: 10.1155/2010/581837, 2010.
47. ISOMOTO, H.; MATSUSHIMA, K.; INOUE, N.; HAYASHI, T.; NAKAYAMA, T.; KUNIZAKI, M.; HIDAKA, S.; NAKAYAMA, M.; HISATSUNE, J.; NAKASHIMA, M.; NAGAYASU, T.; NAKAO, K.; HIRAYAMA, T. Interwaving MicrRNAs and Proinflammatory Cytokines in Gastric Mucosa with Reference to *H. pylori* Infection. **J Clin Immunol**, v. 32, p. 290-299, 2012.

48. ITO, M.; KANNO, S.; NOSHO, K.; SUKAWA, Y.; MITSUHASHI, K.; KURIHARA, H.; IGARASHI, H.; TAKAHASHI, T.; TACHIBANA, M.; TAKAHASHI, H.; YOSHII, S.; TAKENOUCI, T.; HASEGAWA, T.; OKITA, K.; HIRATA, K.; MARUYAMA, R.; SUZUKI, H.; IMAI, K.; YAMAMOTO, H.; SHINOMURA, Y. Association of *Fusobacterium nucleatum* with clinical and molecular features in colorectal serrated pathway. **Int J Cancer**, v. 137, n. 6, p. 1258-1268, 2015.
49. JACOBSON-BROWN, P.; NEUMAN, M. G. Colorectal polyposis and immune-based therapies. **Can J Gastroenterol**, v. 18, p. 239-249, 2004.
50. JASPERSON, K W.; TUOHY, T. M.; NEKLASON, D. W.; BURT, R. W. Hereditary and Familial Colon Cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2044-2058, 2010.
51. JIN, K.; LI, T.; SÁNCHEZ-DUFFHUES, G.; ZHOU, F.; ZHANG, L. Involvement of inflammation and its related microRNAs in hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**, 2016. doi: 10.18632/oncotarget.13530. [Epub ahead of print].
52. JUMP, R.L.; LEVINE A.D. Mechanisms of natural tolerance in the intestine: implications for inflammatory bowel disease. **Inflamm Bowel Dis**, v. 10, p. 462-478, 2004.
53. KARA, M.; YUMRUTAS, O.; OZCAN, O.; CELIK, O.I.; BOZGEYIK, E.; BOZGEYIK, I.; TASDEMIR, S. Differential expressions of cancer-associated genes and their regulatory miRNAs in colorectal carcinoma. **Gene**, v. 567, n. 1, p. 81-86, 2015.
54. KASZA, A. IL-1 and EGF regulate expression of genes important in inflammation and cancer. **Cytokine**, v. 62, n. 1, p. 22-33, 2013.
55. KILLEEN, S.D.; WANG, J.H.; ANDREWS, E.J.; REDMOND, H.P. Bacterial endotoxin enhances colorectal cancer cell adhesion and invasion through *TLR-4* and NF-kappaB-dependent activation of the urokinase plasminogen activator system. **Br J Cancer**, v. 100, p. 1589-1602, 2009.

56. KOORTS, A.M.; LEVAY, P.F.; BECKER, P.J.; VILJOEN, M. Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines during Immune Stimulation: Modulation of Iron Status and Red Blood Cell Profile. **Mediat Inflamm**, v. 2011, n. 2011, 11 p., 2011.
57. KOSTIC, A.D.; CHUN, E.; ROBERTSON, L.; GLICKMAN, J.N.; GALLINI, C.A.; MICHAUD, M.; CLANCY, T.E.; CHUNG, D.C.; LOCHHEAD, P.; HOLD, G. L.; EL-OMAR, E.M.; BRENNER, D.; FUCHS, C.S.; MEYERSON, M.; GARRETT, W.S. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. **Cell Host Microbe**, v. 14, n. 2, p. 207-215, 2013.
58. KUMAR, A.; THOTAKURA, P.L.; TIWARY, B.K.; KRISHNA, R. Target identification in *Fusobacterium nucleatum* by subtractive genomics approach and enrichment analysis of host-pathogen protein-protein interactions. **BMC Microbiol**, v. 16, p. 84, 2016.
59. LAI, M.; DU, G.; SHI, R.; YAO, J.; YANG, G.; WEI, Y.; ZHANG, D.; XU, Z.; ZHANG, R.; LI, Y.; LI, Z.; WANG, L. MiR-34a inhibits migration and invasion by regulating the SIRT1/p53 pathway in human SW480 cells. **Mol Med Rep**, v. 11, n. 5, p. 3301-3307, 2015.
60. LANDSKRON, G.; DE, L.A.; FUENTE, M.; THUWAJIT, P.; THUWAJIT, C.; HERMOSO, M.A. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. **J Immunol Res**, v. 2014, p. 149185, 2014.
61. LEGITIMO, A.; CONSOLINI, R.; FAILLI, A.; ORSINI, G.; SPISNI, R. Dendritic cell defects in the colorectal cancer. **Hum Vaccin Immunother**, v. 10, n. 11, p. 3224-3235, 2014.
62. LEUNG, A.; TSOI, H.; YU, J. *Fusobacterium* and *Escherichia*: models of colorectal cancer driven by microbiota and the utility of microbiota in colorectal cancer screening. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 9, n. 5, p. 651-657.

63. LI, B.; SONG, Y.; LIU, T.J.; CUI, Y.B.; JIANG, Y.; XIE, Z.S.; XIE, S.L. miRNA-22 suppresses colon cancer cell migration and invasion by inhibiting the expression of T-cellymphoma invasion and metastasis 1 and matrix metalloproteinases 2 and 9. **Oncol Rep**, v. 29, n. 5, p. 1932-1938, 2013.
64. LI, C.; WANG, Y.; LU, S.; ZHANG, Z.; MENG, H.; LIANG, L.; ZHANG, Y.; SONG, B. MiR-34a inhibits colon cancer proliferation and metastasis by inhibiting platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$ . **Mol Med Rep**, v. 12, n. 5, p. 7072-7078, 2015.
65. LI, X.; NIE, J.; MEI, Q.; HAN, W.D. MicroRNAs: Novel immunotherapeutic targets in colorectal carcinoma. **World J Gastroenterol**, v. 22, n. 23, p. 5317-5331, 2016a.
66. LI, Y.Y.; GE, Q.X.; CAO, J.; ZHOU, Y.J.; DU, Y.L.; SHEN, B.; WAN, Y.J.; NIE, Y.Q. Association of *Fusobacterium nucleatum* infection with colorectal cancer in Chinese patients. **World J Gastroenterol**, v. 22, n. 11, p. 3227-3233, 2016b.
67. LI, P.; FAN, J.B.; GAO, Y.; ZHANG, M.; ZHANG, L.; YANG, N.; ZHAO, X. miR-135b-5p inhibits LPS-induced TNF $\alpha$  production via silencing AMPK phosphatase Ppm1e. **Oncotarget**, v. 7, n. 47, p. 77978-77986, 2016c.
68. LIANG JQ, CHIU J, CHEN Y, HUANG Y, HIGASHIMORI A, FANG JY, BRIM H, ASHKTORAB H, NG SC, NG SS, ZHENG S, CHAN FK, SUNG JJ, YU J. Fecal Bacteria Act as Novel Biomarkers for Non-Invasive Diagnosis of Colorectal Cancer. **Clin Cancer Res**, pii: clincanres.1599.2016, doi: 10.1158/1078-0432. 2016. [Epub ahead of print].
69. LIANG, X.; LIU, Y.; MEI, S.; ZHANG, M.; XIN, J.; ZHANG, Y.; YANG, R. MicroRNA-22 impairs anti-tumor ability of dendritic cells by targeting p38. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. 0121510, 2015.
70. LIU, H.; REDLINE, R.W.; HAN, Y.W. *Fusobacterium nucleatum* induces fetal death in mice via stimulation of TLR4-mediated placental inflammatory response. **J Immunol**, v. 179, n. 4, p. 2501-2508, 2007.

71. LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
72. LOPEZ-CASTEJON, G.; BROUGH, D. Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 22, n. 4, p. 189-195, 2011.
73. LOZUPONE, C.A.; STOMBAUGH, J.I.; GORDON, J.I.; JANSSON, J.K.; KNIGHT, R. Diversity, stability, and resilience of the human gut microbiota. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 220-230, 2012.
74. LU, G.; SUN, Y.; AN, S.; XIN, S.; REN, X.; ZHANG, D.; WU, P.; LIAO, W.; DING, Y.; LIANG, L. MicroRNA-34a targets FMNL2 and E2F5 and suppresses the progression of colorectal cancer. **Exp Mol Pathol**, v. 99, n. 1, p. 173-179, 2015.
75. LU, J.; GETZ, G.; MISKA, E.A.; ALVAREZ-SAAVEDRA, E.; LAMB, J.; PECK, D.; SWEET-CORDERO, A.; EBERT, B.L.; MAK, R.H.; FERRANDO, A.A.; DOWNING, J.R.; JACKS, T.; HORVITZ, H.R.; GOLUB, T.R. MicroRNA expression profiles classify human cancers. **Nature**, v. 435, p. 834-838, 2005.
76. MAGER, L.F.; WASMER, M.H.; RAU, T.T.; KREBS, P. Cytokine-Induced Modulation of Colorectal Cancer. **Front Oncol**, v. 6, p. 96, 2016.
77. MANGERICH, A.; KNUTSON, C.G.; PARRY, N.M.; MUTHUPALANI, S.; YE, W.; PRESTWICH, E.; CUI, L.; MCFALINE, J.L.; MOBLEY, M.; GE, Z.; TAGHIZADEH, K.; WISHNOK, J.S.; WOGAN, G.N.; FOX, J.G.; TANNENBAUM, S.R.; DEDON, P.C. Infection-induced colitis in mice causes dynamic and tissue-specific changes in stress response and DNA damage leading to colon cancer. **Proc Nat Acad Sci**, v.109, n. 27, p. 1820-1829, 2012.
78. MARTINHO, F.C.; LEITE, F.R.; NÓBREGA, L.M.; ENDO, M.S.; NASCIMENTO, G.G.; DARVEAU, R.P.; GOMES, B.P. Comparasion of *Fusobacterium nucleatum* and Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharides Clinically Isolated from Root Canal Infection in the Induction of Pro-Inflammatory Cytokines Secretion. **Braz Dent J**, v. 27, n. 2, p. 202-207, 2016.

79. MAUER, J.; DENSON, J.L.; BRÜNING, J.C. Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. **Trends Immunol**, v. 36, n. 2, p. 92-101, 2015.
80. MENDES, R.T.; NGUYEN, D.; STEPHENS, D.; PAMUK, F.; FERNANDES, D.; VAN DYKE, T.E.; KANTARCI, A. Endothelial Cell Response to *Fusobacterium nucleatum*. **Infect Immun**, v. 84, n. 7, p. 2141-2148, 2016.
81. MIMA, K.; CAO, Y.; CHAN, A.T.; QIAN, Z.R.; NOWAK, J.A.; MASUGI, Y.; SHI, Y.; SONG, M.; DA SILVA, A.; GU, M.; LI, W.; HAMADA, T.; KOSUMI, K.; HANYUDA, A.; LIU, L.; KOSTIC, A.D.; GIANNAKIS, M.; BULLMAN, S.; BRENNAN, C.A.; MILNER, D.A.; BABA, H.; GARRAWAY, L.A.; MEYERHARDT, J.A.; GARRETT, W.S.; HUTTENHOWER, C.; MEYERSON, M.; GIOVANNUCCI, E.L.; FUCHS, C.S.; NISHIHARA, R.; OGINO, S. *Fusobacterium nucleatum* in Colorectal Carcinoma Tissue According to Tumor Location. **Clin Transl Gastroenterol**, v. 7, n. 11, p. e200, 2016b.
82. MIMA, K.; NISHIHARA, R.; QIAN, Z.R.; CAO, Y.; SUKAWA, Y.; NOWAK, J.A.; YANG, J.; DOU, R.; MASUGI, Y.; SONG, M.; KOSTIC, A.D.; GIANNAKIS, M.; BULLMAN, S.; MILNER, D.A.; BABA, H.; GIOVANNUCCI, E.L.; GARRAWAY, L.A.; FREEMAN, G.J.; DRANOFF, G.; GARRETT, W.S.; HUTTENHOWER, C.; MEYERSON, M.; MEYERHARDT, J.A.; CHAN, A.T.; FUCHS, C.S.; OGINO, S. *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. **Gut**, v. 65, n. 12, p. 1973-1980, 2016a.
83. MIRA-PASCUAL, L.; CABRERA-RUBIO, R.; OCON, S.; COSTALES, P.; PARRA, A.; SUAREZ, A.; MORIS, F.; RODRIGO, L.; MIRA, A.; COLLADO, M.C. Microbial mucosal colonic shifts associated with the development of colorectal cancer reveal the presence of different bacterial and archaeal biomarkers. **J Gastroenterol**, v. 50, n. 2, p. 167-179, 2014.
84. MOHAMMADI, A.; MANSOORI, B.; BARADARAN, B. The role of microRNAs in colorectal cancer. **Biomed Pharmacother**, v. 84, p. 705-713, 2016.

85. MORANDINI, F.A.C.; CHAVES-SOUZA, P.P.; RAMOS-JUNIOR, E.S.; BROZOSKI, D.T.; SIPERT, C.R.; SOUZA-COSTA, C.A.; SANTOS, C.F. Toll-Like Receptor 2 Knockdown Modulates Interleukin (IL)-6 and IL-8 but not Stromal Derived Factor-1 (SDF-1/CXCL12) in Human Periodontal Ligament and Gingival Fibroblasts. **J Periodontol**, v. 84, n. 4, p. 535-544, 2013.
86. MULTHOFF, G.; RADONS, J. Radiation, inflammation, and immune responses in cancer. **Molecular and Cellular Oncology**, v. 2, 2012.
87. NIEDZIELSKA, I.; NIEDZIELSKI, Z.; TKACZ, M.; ORAWCZYK, T.; ZIAJA, K.; STARZEWSKI, J.; MAZUREK, U.; MARKOWSKI, J. Toll-Like Receptors and The Tendency of Normal Mucous Membrane to Transform to Polyp or Colorectal Cancer. **J Physiol Pharmacol**, v. 60, p. 65-71, 2009.
88. NIHON-YANAGI, Y.; TERAJ, K.; MURANO, T.; MATSUMOTO, T.; OKAZUMI, S. Tissue expression of Toll-like receptors 2 and 4 in sporadic human colorectal cancer. **Cancer Immunol Immunother**, v. 61, p. 71-77, 2012.
89. NOFFSINGER, A. E. Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy. **Annu Rev Pathol**, v. 4, p. 343-364, 2009.
90. NOSHO, K.; SUKAWA, Y.; ADACHI, Y.; ITO, M.; MITSUHASHI, K.; KURIHARA, H.; KANNO, S.; YAMAMOTO, I.; ISHIGAMI, K.; IGARASHI, H.; MARUYAMA, R.; IMAI, K.; YAMAMOTO, H.; SHINOMURA, Y. Association of *Fusobacterium nucleatum* with immunity and molecular alterations in colorectal cancer. **World J Gastroenterol**, v. 22, n. 2, p. 557-566, 2016.
91. OKAYAMA, H.; SCHETTER, A.J.; HARRIS, C.C. MicroRNAs and inflammation in the pathogenesis and progression of colon cancer. **Dig Dis**, v. 30, n. 2, p. 9-15, 2012.
92. OSPELT, C.; GAY, S. TLRs and chronic inflammation. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 42, n. 4, p. 495-505, 2009.

93. PARK, S.R.; KIM, D.J.; HAN, S.H.; KANG, M.J.; LEE, J.Y.; JEONG, Y.J.; LEE, S.J.; KIM, T.H.; AHN, S.G.; YOON, J.H.; PARK, J.H. Diverse Toll-like receptors mediate cytokine production by *Fusobacterium nucleatum* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in macrophages. **Infect Immun**, v. 82, n. 5, p. 1914-1920, 2014.
94. PROENÇA, M.A.; DE OLIVEIRA, J.G.; CADAMURO, A.C.T.; SUCCI, M.; NETINHO, J.G.; GOLONI-BERTOLO, E.M.; PAVARINO, É.C.; SILVA, A.E. TLR2 and TLR4 polymorphisms influence mRNA and protein expression in colorectal cancer. **World J Gastroenterol**, v. 21, n. 25, p. 7730-7741, 2015.
95. RAGNARSDÓTTIR, B.; JÖNSSON, K.; URBANO, A.; GRÖNBERG-HERNANDEZ, J.; LUTAY, N.; TAMMI, M.; GUSTAFSSON, M.; LUNDSTEDT, A.C.; LEIJONHUFVUD, I.; KARPMAN, D.; WULLT, B.; TRUEDSSON, L.; JODAL, U.; ANDERSSON, B.; SVANBORG, C. Toll-Like Receptor 4 Promoter Polymorphisms: Common *TLR4* Variants May Protect against Severe Urinary Tract Infection. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10734, 2010.
96. RAKOFF-NAHOUM, S.; PAGLINO, J.; ESLAMI-VARZANEH, F.; EDBERG, S.; MEDZHITOV, R. Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. **Cell**, v. 118, p. 229-241, 2004.
97. RASKOV, H.; POMMERGAARD, H.C.; BURCHARTH, J.; ROSENBERG, J. Colorectal carcinogenesis--update and perspectives. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 48, p. 18151-18164, 2014.
98. RATH, T.; BILLMEIER, U.; WALDNER, M.J.; ATREYA, R.; NEURATH, M.F. From physiology to disease and targeted therapy: interleukin-6 in inflammation and inflammation-associated carcinogenesis. **Arch Toxicol**, v. 89, n. 4, p. 541-54, 2015.
99. REPASS, J.; MAHERALI, N.; OWEN, K. Registered report: *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. **Elife**, v. 5, pii: e10012, 2016.

100. ROSE-JOHN, S.; MITSUYAMA, K.; MATSUMOTO, S.; THAISS, W.M.; SCHELLER, J. Interleukin-6 trans-signaling and colonic cancer associated with inflammatory bowel disease. **Curr Pharm Des**, v. 15, p. 2095-2103, 2009.
101. RUBINSTEIN, M. R.; WANG, X.; LIU, W.; HAO, Y.; CAI, G.; HAN, Y. W. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ $\beta$ -catenin signaling via its FadA adhesin. **Cell Host Microbe**, v. 14, n. 2, p. 195-206, 2013.
102. RUSTGI, A. K. The genetics of hereditary colon cancer. **Genes & Dev**, v. 21, p. 2525-2538, 2007.
103. SAKAMOTO, K.; MAEDA, S. Targeting NF- $\kappa$ B for colorectal cancer. **Expert Opin Ther Tar**, v. 14, n. 6, p. 593-601, 2010.
104. SANTOS JR., J.C.M. Câncer ano-retó-cólico: aspectos atuais II – câncer colorretal – fatores de riscos e prevenção. **Rev bras Coloproct**, v. 27, n. 4, p. 459-473, 2007.
105. SHCHEBLYAKOV, D.V.; LOGUNOV, D.Y.; RAKOVSKAYA, I.V.; SHMAROV, M.M.; NARODITSKY, B.S.; GINZBURG, A.L. Triggering of Tol-like Receptor-2 in Mouse Myelomonocytic Leukaemia Cells WEHI-3B Leads to the Suppression of Apoptosis and Promotes Tumor Progression in Vivo. **Acta Nature**, v. 3, n. 4, p. 83-93, 2011.
106. SHIRDEL, E.A.; XIE, W.; MAK, T.W.; JURISICA, I. NAViGaTing the Micronome-- Using Multiple MicroRNA Prediction Databases to Identify Signalling Pathway-Associated MicroRNAs. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e17429, 2011.
107. SONKOLY, E; PIVARCSI, A. microRNAs in Inflammation. **Int Rev of Immunol**, v. 28, n. 6, p. 535-561, 2009.
108. SUEHIRO, Y.; SAKAI, K.; NISHIOKA, M.; HASHIMOTO, S.; TAKAMI, T.; HIGAKI, S.; SHINDO, Y.; HAZAMA, S.; OKA, M.; NAGANO, H.; SAKAIDA, I.; YAMASAKI, T. Highly sensitive stool DNA testing of *Fusobacterium nucleatum* as a marker for detection of colorectal tumours in a Japanese population. **Ann Clin Biochem**, v. 54, n. 1, p. 86-91, 2017.

109. SZLOSAREK, P.W.; BALKWILL, F.R. Tumor necrosis factor  $\alpha$ : a potential target for the therapy of solid tumours. **Lancet Oncol**, v. 4, n. 9, p. 565-573, 2003.
110. SZYLBERG, Ł.; JANICZEK, M.; POPIEL, A.; MARSZAŁEK, A. Serrated polyps and their alternative pathway to the colorectal cancer: a systematic review. **Gastroenterol Res Pract**, v. 2015, p. 573814, 2015.
111. TAHARA, T.; SHIBATA, T.; KAWAMURA, T.; OKUBO, M.; ICHIKAWA, Y.; SUMI, K.; MIYATA, M.; ISHIZUKA, T.; NAKAMURA, M.; NAGASAKA, M.; NAKAGAWA, Y.; OHMIYA, N.; ARISAWA, T.; HIRATA, I. *Fusobacterium* detected in colonic biopsy and clinicopathological features of ulcerative colitis in Japan. **Dig Dis Sci**, v. 60, n. 1, p 205-210, 2015.
112. TALEBAN, S.; ELQUZA, E.; GOWER-ROUSSEAU, C.; PEYRIN-BIROULET, L. Cancer and inflammatory bowel disease in the elderly. **Dig Liver Dis**, v. 48, n. 10, p. 1105-1111, 2016.
113. TERZIĆ, J.; GRIVENNIKOV, S.; KARIN, E.; KARIN, M. Inflammation and colon cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2101-2114, 2010.
114. TOKARZ, P.; BLASIAK, J. The role of microRNA in metastatic colorectal cancer and its significance in cancer prognosis and treatment. **Acta Biochim Pol**, v. 59, n. 4, p. 467-474, 2012.
115. TOUSSI, D.N.; LIU, X.; MASSARI, P. The FomA porin from *Fusobacterium nucleatum* is a Toll-like receptor 2 agonist with immune adjuvant activity. **Clin Vaccine Immunol**, v. 19, n. 7, p. 1093-1101, 2012.
116. TRINCHIERI, G. Cancer and Inflammation: An Old Intuition with Rapidly Evolving New Concepts. **Annu Rev Immunol**, v. 30, p. 677-706, 2012.

117. VALERI, N.; BRACONI, C.; GASPARINI, P.; MURGIA, C.; LAMPIS, A.; PAULUS-HOCK, V.; HART, J.R.; UENO, L.; GRIVENNIKOV, S. I.; LOVAT, F.; PAONE, A.; CASCIONE, L.; SUMANI, K.M.; VERONESE, A.; FABBRI, M.; CARASI, S.; ALDER, H.; LANZA, G.; GAFA, R.; MOYER, M. P.; RIDGWAY, R.A.; CORDERO, J.; NUOVO, G. J.; FRANKEL, W.L.; RUGGE, M.; FASSAN, M.; GRODEN, J.; VOGT, P.K.; KARIN, M.; SANSOM, O.J.; CROCE, C.M. MicroRNA-135b promotes cancer progression by acting as a downstream effector of oncogenic pathways in colon cancer. **Cancer Cell**, v. 25, n. 4, p.469-483, 2014.
118. VELSKO, I.M.; CHUKKAPALLI, S.S.; RIVERA-KWEH, M.F.; CHEN, H.; ZHENG, D.; BHATTACHARYYA, I.; GANGULA, P.R.; LUCAS, A.R.; KESAVALU, L. *Fusobacterium nucleatum* Alters Atherosclerosis Risk Factors and Enhances Inflammatory Markers with an Atheroprotective Immune Response in ApoE(null) Mice. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0129795, 2015.
119. VIRTUE, A.; WANG, H.; YANG, X.F. MicroRNAs and Toll-like Receptor/Interleukin-1 Receptor Signaling. **J Hematol Oncol**, v. 5, p. 66, 2012.
120. VYCHYTILOVA-FALTEJSKOVA, P.; PESTA, M.; RADOVA, L.; LISKA, V.; DAUM, O.; KALA, Z.; SVOBODA, M.; KISS, I.; SLABY, O. Genome-wide microRNA Expression Profiling in Primary Tumors and Matched Liver Metastasis of Patients with Colorectal Cancer. **Cancer Genomics Proteomics**, v. 13, n. 4, p. 311-316, 2016.
121. WALDNER, M.J.; FOERSCH, S.; NEURATH, M.F. Interleukin-6--a key regulator of colorectal cancer development. **Int J Biol Sci**, v. 8, n. 9; p. 1248-1253, 2012.
122. WANG, X.; CHEN, L.; JIN, H.; WANG, S.; ZHANG, Y.; TANG, X.; TANG, G. Screening miRNAs for early diagnosis of colorectal cancer by small RNA deep sequencing and evaluation in a Chinese patient population. **Oncotargets Ther**, v. 9, p. 1159-1166, 2016.
123. WEI, Z.; CAO, S.; LIU, S.; YAO, Z.; SUN, T.; LI, Y.; LI, J.; ZHANG, D.; ZHOU, Y. Could gut microbiota serve as prognostic biomarker associated with colorectal cancer patients' survival? A pilot study on relevant mechanism. **Oncotarget**, v. 7, n. 29, p 46158-46172, 2016.

124. WOGAN, G.N.; DEDON, P.C.; TANNENBAUM, S.R.; FOX, J.G. Infection, inflammation and colon carcinogenesis. **Oncotarget**, v. 3, n. 8, p. 737-738, 2012.
125. WU, C.W.; NG, S.C.; DONG, Y.; TIAN, L.; NG, S.S.; LEUNG, W.W.; LAW, W.T.; YAU, T.O.; CHAN, F.K.; SUNG, J.J.; YU, J. Identification of microRNA-135b in stool as a potential noninvasive biomarker for colorectal cancer and adenoma. **Clin Cancer Res**, v. 20, n. 11, p. 2994-3002, 2014b.
126. WU, W.; WANG, Z.; YANG, P.; YANG, J.; LIANG, J.; CHEN, Y.; WANG, H.; WEI, G.; YE, S.; ZHOU, Y. MicroRNA-135b regulates metastasis suppressor 1 expression and promotes migration and invasion in colorectal cancer. **Mol Cell Biochem**, v. 388, n. 1-2, p. 249-259, 2014a.
127. WU, W.Y.; XUE, X.Y.; CHEN, Z.J.; HAN, S.L.; HUANG, Y.P.; ZHANG, L.F.; ZHU, G.B.; SHEN, X. Potentially predictive microRNAs of gastric cancer with metastasis to lymph node. **World J Gastroenterol**, v. 17, p. 3645-3651, 2011.
128. XU, Z.; XIAO, SB; XU, P.; XIE, Q.; CAO, L.; WANG, D.; LUO, R.; ZHONG, Y.; CHEN, H.C.; FANG, L.R. miR-365, a Novel Negative Regulator of Interleukin-6 Gene Expression, Is Cooperatively Regulated by Sp1 and NF- $\kappa$ B. **J Biol Chem**, v. 286, p. 21401-21412, 2011.
129. YAMAKUCHI, M.; YAGI, S.; ITO, T.; LOWENSTEIN, C.J. MicroRNA-22 regulates hypoxia signaling in colon cancer cells. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e20291, 2011.
130. YANG, Y.; WENG, W.; PENG, J.; HONG, L.; YANG, L.; TOIYAMA, Y.; GAO, R.; LIU, M.; YIN, M.; PAN, C.; LI, H.; GUO, B.; ZHU, Q.; WEI, Q.; MOYER, M.P.; WANG, P.; CAI, S.; GOEL, A.; QIN, H.; MA, Y. *Fusobacterium nucleatum* Increases Proliferation of Colorectal Cancer Cells and Tumor Development in Mice by Activating Toll-Like Receptor 4 Signaling to Nuclear Factor- $\kappa$ , Up-Regulating Expression of MicroRNA-21. **Gastroenterology**, pii: S0016-5085(16)35387-2 doi:10.1053/j.gastro.2016.11.018 [Epub ahead of print], 2017.

131. YU, Y.N.; YU, T.C.; ZHAO, H.J.; SUN, T.T.; CHEN, H.M.; CHEN, H.Y.; AN, H.F.; WENG, Y.R.; YU, J.; LI, M.; QIN, W.X.; MA, X.; SHEN, N.; HONG, J.; FANG, J.Y. Berberine may rescue *Fusobacterium nucleatum*-induced colorectal tumorigenesis by modulating the tumor microenvironment. **Oncotarget**, v. 6, n. 31, p. 32013-32026, 2015.
132. YUAN, A.; CHEN, J.J.; YAO, P.L.; YANG, P.C. The role of interleukin-8 in cancer cells and microenvironment interaction. **Front Biosci**, v. 10, p. 853-965, 2005.
133. ZHAO, C.; LU, X.; BU, X.; ZHANG, N.; WANG, W. Involvement of tumor necrosis factor-alpha in the upregulation of CXCR4 expression in gastric cancer induced by *Helicobacter pylori*. **BMC Cancer**, v. 10, p. 419, 2010.

*Apêndices*

## APÊNDICES

**APÊNDICE A:** Estágio no *Laboratory of Physiology & Medical Physics Department of RCSI - Royal College of Surgeons*, Dublin, Irlanda

Durante o mês de Janeiro de 2015 foi desenvolvido estágio no *Laboratory of Physiology & Medical Physics Department of RCSI - Royal College of Surgeons in Ireland*, em Dublin (Irlanda), sob supervisão do Dr. David J. Hughes, para análises de quantificação de *F. nucleatum* em amostras de adenocarcinoma colorretal. A aluna foi selecionada para receber o *ISCA Brazil Funding (International Strategic Cooperation Award)*, que financiou sua ida e permanência no local do referido laboratório durante o desenvolvimento do estágio. Neste período foi estabelecido o protocolo para quantificação da bactéria, o qual foi utilizado tanto para as análises das amostras brasileiras quanto para as amostras europeias. Esses dados serão incluídos em publicação futura.

### A.1. MATERIAIS E MÉTODOS

#### A.1.1. Caracterização das amostras

Foram quantificadas 512 amostras de DNA de pacientes da República Tcheca (256 CCR e 256 de mucosa normal adjacente). Essas amostras foram coletadas no *Departments of Surgery and Oncology no Teaching Hospital and Medical School em Pilsen and Charles University (Praga – República Tcheca)* no período de 2008 a 2012, mediante aprovação do Comitê de Ética do *Medical Faculty and Teaching Hospital em Pilsen – República Tcheca*. Dessas amostras, 158 eram homens e 83 mulheres, com idade entre 38 e 91 anos. Com relação

à localização tumoral, 40% (n=93) dos tumores localizavam-se no Cólon, 33% (n=78) no Sigmóide e 27% (n=63) no Reto. Algumas informações não estavam disponíveis para todas as amostras europeias.

### A.1.2. Quantificação de *F. nucleatum* por Qpcr

A quantificação de *F. nucleatum* foi realizada em amostras de DNA extraídas a partir de tecido tumoral e respectivas amostras de DNA do tecido normal adjacente por PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR). Os ensaios de expressão de genes TaqMan® (Applied Biosystems) com sondas específicas para o gene bacteriano *NusG* (5'-TCAGCAACTTGTCTTCTTGATCTTTAAATGAACC-3' TAMRA™ sonda FAM™) e o gene humano *PGT* (5'-CCATCCATGTCCTCATCTC-3' TAMRA™ sonda FAM™) como referência. As reações foram realizadas separadamente para cada gene em um volume final de 12 uL utilizando 20 ng de DNA genômico, 400 nM de primer (sequências *NusG*: 5'-CAACCATTACTTTAACTCTACCATGTTCA-3' e 3'-GTTGACTTTACAGAAGGAGATTATGTAAAAATC-5', *PGT*: 5'-ATCCCCAAAGCACCTGGTTT-3' e 3'-AGAGGCCAAGATAGTCCTGGTAA-5') (Invitrogen), e 400 nM de sonda e 1x TaqMan® Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher). A reação foi submetida a temperaturas de 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos, e em seguida 60 ciclos de 95 °C durante 15 segundos e 57 °C durante 1 minuto. Todas as reações foram realizadas em duplicatas e para todo experimento incluía-se um controle negativo. Os valores de Ct (limiar de ciclo) foram calculados após o ajuste do limiar pelo programa StepOne™ Software (v.2.2.2) e todas as amostras as quais foram detectadas valores de Ct pelo equipamento foram consideradas positivas. A quantificação relativa (RQ) para o gene *NusG* de *F. nucleatum* foi

calculada com base no método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e foi realizada tanto análise pareada como de forma não pareada, utilizando a média de amostras normais adjacentes como calibrador.

### A.1.3. Análises estatísticas

A distribuição de dados contínuos foi avaliada utilizando o teste de normalidade de D'Agostino & Pearson. O teste de Wilcoxon foi utilizado para comparar a mediana de RQ de expressão gênica entre tumor e tecidos normais. A quantificação de *F. nucleatum* foi realizada de forma pareada, utilizando cada amostra normal adjacente como calibrador específico ao respectivo tumor do mesmo paciente. A curva de Kaplan-Meier foi realizada e o Log-rank test utilizado para verificar sua significância estatística. Para todas as análises,  $p < 0,05$  foi considerado estaticamente significativo. As análises foram realizadas pelo software GraphPad Prism (versão 6.01).

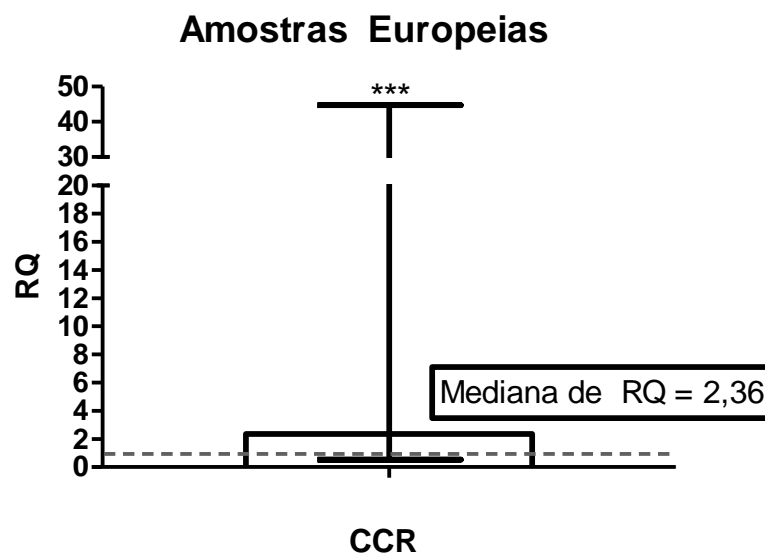
## A.2. RESULTADOS

### A.2.1. Quantificação de *F. nucleatum*

Das 512 amostras quantificadas para o gene *NusG* de *F. nucleatum*, 69,5% (n=178) de tecido tumoral e 64,1% (n=164) de amostras de tecido normal adjacentes foram positivas para a presença da bactéria. Destes, 140 amostras foram pareadas entre tumor e tecidos normais adjacentes. Nível significativamente aumentado do gene bacteriano foi observado em amostras de CRC (RQ=2,76) em comparação com o tecido normal adjacente (Figura A1). Além disso,

também foi realizada uma análise não pareada, utilizando a média das amostras normais adjacente como calibrador para todas as amostras de CRC. O resultado foi consistente com a análise pareada (RQ=3,00,  $p < 0,0001$ ).

**Figura A1.** Quantificação Relativa (RQ) do gene *NusG* de *F. nucleatum*. Em amostras de câncer colorretal europeias (CCR) em comparação com tecido normal adjacente (RQ de referência normal = 1). Diferença estatisticamente significativa, de acordo com o teste de Wilcoxon ( $***p < 0,0001$ ). Mediana com gráfico de intervalo interquartil.



Comparando-se com a frequência de *F. nucleatum* nas amostras de CCR brasileiras, cujos resultados encontram-se no artigo apresentado nesta tese (76.7% para CCR e 72.1% para N-CCR), observa-se maior frequência nas amostras brasileira, assim como maior abundância desta bactéria (RQ=17,71) em relação às amostras europeias (RQ=2,36). Quanto a este aspecto, na discussão já foram relatados alguns fatores sociais e alimentares que possam influenciar na microbiota intestinal.

### A.2.2. Associação de *F. nucleatum* com sexo, idade e localização tumoral

Para avaliar se ocorre diferença na colonização da bactéria conforme o sexo, idade ou localização do tumor foi investigada a associação dessas variáveis com os níveis de quantificação do DNA bacteriano. Contudo, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa com nenhuma dessas variáveis (Tabela A1).

**Tabela A1.** Características das amostras de câncer colorretal europeias e quantificação relativa (RQ) de *F. nucleatum* de acordo com sexo, idade e localização tumoral.

<b>Sexo</b>	<b>Amostras Europeias</b>	
	Feminino	Masculino
Mediana de RQ	2,56	2,19
p	0,3550	
<b>Idade (anos)</b>	≤60	>60
Mediana de RQ	2,60	2,35
p	0,6967	
<b>Localização tumoral</b>		
<b>Cólon</b>		
Mediana de RQ	2,35	
Variação (min - max)	(9x10 <sup>-5</sup> – 10x10 <sup>3</sup> )	
<b>Sigmoide</b>		
Mediana de RQ	1,69	
Variação (min - max)	(6x10 <sup>-8</sup> – 14x10 <sup>4</sup> )	
<b>Reto</b>		
Mediana de RQ	7,94	
Variação (min - max)	(0.003 – 12x10 <sup>8</sup> )	
p	0,1358	

Teste Mann-Whitney e teste de Kruskal-Wallis (pós-teste: comparação múltipla de Dunn).

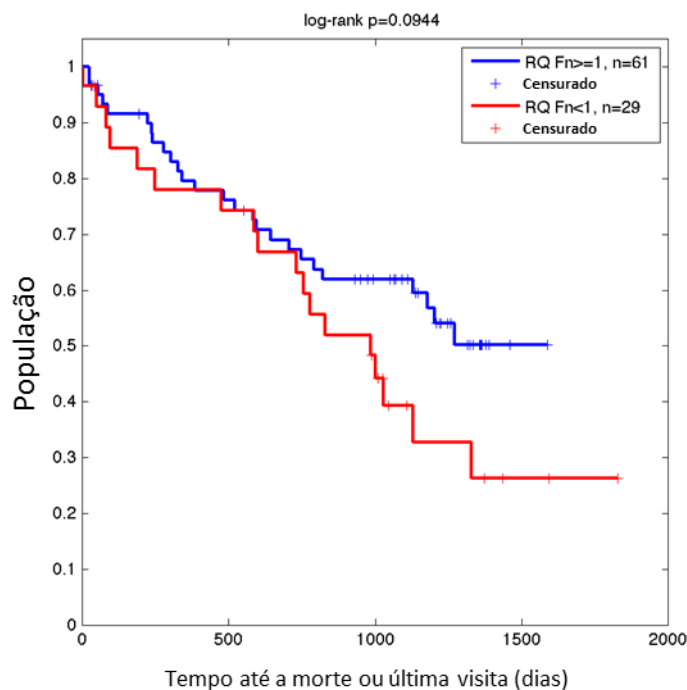
\* P < 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

### A.2.3. Curva de Sobrevida

Para avaliar o possível efeito da abundância da *F. nucleatum* na taxa de sobrevivência dos pacientes com CCR foi realizada a curva de Kaplan-Meier (Figura A2) comparando-se os pacientes com quantificação relativa (RQ) do DNA bacteriano maior ou igual a 1 *versus* menor que 1. Também não foi observada diferença estatisticamente significativa na taxa de sobrevivência dos pacientes com relação a abundância da bactéria.

Estão sendo realizadas análises adicionais para avaliar a associação de outros fatores epidemiológicos como idade, sexo, IMC (índice de massa corporal) e hábitos tabagistas e etilistas com *F. nucleatum* nas amostras europeias, visando uma publicação futura.

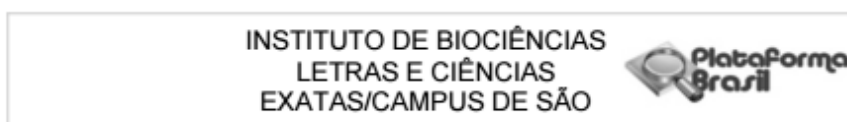
**Figura A2.** Sobrevida global de pacientes com câncer colorretal (CCR) não está associada a quantificação de *F. nucleatum*. As curvas de Kaplan-Meier mostram a sobrevida global de indivíduos com C dicotomizados em grupos de quantificação de *F. nucleatum* em “RQ  $\geq 1$ ” (linha azul) e “RQ  $< 1$ ” (linha vermelha) ( $p=0,0944$ ).



*Anexos*

## ANEXOS

## ANEXO A: Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa Institucional (CEP).



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação da infecção pela *Fusobacterium nucleatum* em câncer colorretal e sua influência na expressão de citocinas e microRNAs

**Pesquisador:** Marcela Alcântara Proença

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 52970515.8.0000.5466

**Instituição Proponente:** Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas/ Campus de São José do

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.452.373

**Apresentação do Projeto:**

O câncer colorretal (CCR), que abrange as neoplasias malignas do intestino grosso (cólon) e reto, apresenta forte associação com inflamação em consequência da exposição constante a microrganismos. No processo inflamatório observa-se a ativação de vários genes de citocinas e desregulação na expressão de microRNAs que podem estar relacionados com o desenvolvimento de CCR. Estes podem atuar em várias etapas da cascata envolvida na resposta inflamatória, oferecendo uma linha de defesa do hospedeiro contra patógenos. Recentemente tem sido descrita uma associação da *Fusobacterium nucleatum*, uma bactéria com características invasivas, aderentes e pró-inflamatórias, com risco de desenvolvimento de CCR. Porém as vias pelo qual essa bactéria ativa este processo inflamatório, e consequentemente o CCR, permanecem incertas. Os receptores Toll-like são responsáveis pelo reconhecimento de uma ampla gama de patógenos e parecem estar associados com a progressão tumoral, apoptose e proliferação celular. A partir desse reconhecimento ativa-se a via do NF- $\kappa$ B, dando início ao recrutamento de uma cascata de citocinas pró- e anti-inflamatórias, que estão diretamente relacionadas com a proliferação, sobrevivência e diferenciação celular, podendo causar doenças inflamatórias e neoplasias, como o CCR. Além do mais, as citocinas podem ter sua expressão regulada em nível pós-transcricional por meio da ação de microRNAs, que modulam várias funções celulares, como proliferação,

Endereço: CRISTOVAO COLOMBO 2265  
 Bairro: JARDIM NAZARETH CEP: 15.054-000  
 UF: SP Município: SAO JOSE DO RIO PRETO  
 Telefone: (17)3221-2428 Fax: (17)3221-2500 E-mail: liliane@bilce.unesp.br

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
LETRAS E CIÊNCIAS  
EXATAS/CAMPUS DE SÃO



Continuação do Parecer: 1.452.373

diferenciação, metabolismo e apoptose. Estes podem estar associados a doenças inflamatórias e a vários tipos de câncer. Dessa forma, alguns genes de citocinas e microRNAs, que atuam na cascata do processo inflamatório e carcinogênese, se tornam alvos importantes para avaliar o efeito que a presença da *F. nucleatum* no tecido tumoral pode provocar na modulação de suas expressões.

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar o efeito da presença de *F. nucleatum* em amostras de CCR e em linhagem celular de carcinoma colorretal humano na expressão de citocinas e miRNAs envolvidos no processo inflamatório e resposta imune, bem como o efeito em processos como ciclo celular, apoptose, viabilidade, proliferação e migração/invasão, visando auxiliar a compreensão do papel funcional desse microorganismo na carcinogênese colorretal, podendo evidenciar este como importante fator de risco para esta neoplasia.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos aos indivíduos participantes serão mínimos uma vez que se trabalhará com amostras previamente coletadas que já foram utilizadas em estudo anterior.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Espera-se que os resultados deste estudo possam evidenciar a associação da *F. nucleatum* com risco de câncer colorretal e o envolvimento dessa bactéria com alterações na expressão de miRNAs e citocinas relacionados ao processo inflamatório e desenvolvimento de CCR. Além disso, é esperado com o estudo *in vitro* possa contribuir com novas informações quanto à relação da inflamação causada por microorganismos com o crescimento tumoral, ciclo celular, viabilidade, proliferação celular, apoptose e processos como migração e invasão celular, assim como a relação desses fatores com a expressão de miRNAs e de citocinas envolvidos no processo inflamatório. Este tipo de estudo é importante, pois poderá auxiliar no esclarecimento de fatores que acentuam o desenvolvimento de CCR, podendo indicar novos alvos para diagnóstico precoce, e melhor prognóstico para CCR.

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

O termo de consentimento Livre e Esclarecido está bem redigido e consta a informação de que o material coletado ficará armazenado no laboratório e poderá ser utilizado para pesquisas futuras mediante aprovação do CEP ou CONEP.

**Recomendações:**

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

Aprovado

Endereço: CRISTOVAO COLOMBO 2265  
Bairro: JARDIM NAZARETH CEP: 15.054-000  
UF: SP Município: SAO JOSE DO RIO PRETO  
Telefone: (17)3221-2428 Fax: (17)3221-2500 E-mail: Illiane@ibioce.unesp.br

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
LETRAS E CIÊNCIAS  
EXATAS/CAMPUS DE SÃO**



Continuação do Parecer: 1.452.373

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Comitê de Ética em Pesquisa, em reunião de 14 de março de 2016, deliberou, por unanimidade, pela aprovação do presente projeto de pesquisa. Os relatórios parciais devem ser encaminhados semestralmente, a contar desta data.

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

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_574199.pdf	04/02/2016 14:28:39		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	22/01/2016 11:58:31	Marcela Alcântara Proença	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto_Marcela_CEP.doc	21/12/2015 11:29:45	Marcela Alcântara Proença	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Doutorado_2015_Marcela.doc	18/12/2015 14:49:30	Marcela Alcântara Proença	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**




Não

SAO JOSE DO RIO PRETO, 15 de Março de 2016

\_\_\_\_\_  
Assinado por:  
Claudia Regina Bonini Domingos  
(Coordenador)

Endereço: CRISTOVAO COLOMBO 2265  
Bairro: JARDIM NAZARETH CEP: 15.054-000  
UF: SP Município: SAO JOSE DO RIO PRETO  
Telefone: (17)3221-2428 Fax: (17)3221-2500 E-mail: illiane@ibioe.unesp.br

## ANEXO B: Comprovante de submissão do artigo.

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY		PUBLICATIONS	EVENTS	SCIENCE SKILLS	CAREERS	MEMBERSHIP	PUBLIC POLICY
Infection and Immunity®		Manuscript Submission and Peer Review System					
Home		Help for Authors		Help for Reviewers		Contact Us	
Logout							
<b>Detailed Status Information</b>							
Manuscript #	IAI00078-17						
Current Revision #	0						
Submission Date	2017-02-03 13:15:08						
Current Stage	Under Review						
Title	<i>Fusobacterium nucleatum</i> influence on inflammatory genes and microRNAs in colorectal adenoma and cancer						
Running Title	<i>Fusobacterium nucleatum</i> in colorectal carcinogenesis						
Manuscript Type	Full-Length Text						
Journal Section	Host Response and Inflammation						
Corresponding Author	Dr. Ana Elizabete Silva (UNESP- Univ Estadual Paulista)						
Contributing Authors	Ms. Marcela Alcântara Proença , Ms. Maysa Succí , Dr. Joice Matos Biselli , Dr. Fábio Eduardo Severino , Dr. David J. Hughes						
Abstract	Colorectal cancer (CRC) is associated with pathogens like <i>Fusobacterium nucleatum</i> ( <i>Fn</i> ), that may provide a favorable microenvironment for tumorigenesis through inflammatory changes. To examine the effect of <i>Fn</i> on microenvironment of gut lesions, we evaluated <i>Fn</i> abundance in colorectal adenoma (CRA) and CRC tissue samples and correlated these levels with mRNA expression of inflammatory mediators ( <i>TLR2</i> , <i>TLR4</i> , <i>NFKB1</i> , <i>TNF</i> , <i>IL1B</i> , <i>IL6</i> and <i>IL8</i> ) and microRNAs ( <i>miR-21-3p</i> , <i>miR-22-3p</i> , <i>miR-28-5p</i> , <i>miR-34a-5p</i> , <i>miR-135b-5p</i> ). We delineated a miR:mRNA interaction network to investigate the participation of miRNAs in this process. <i>Fn</i> and mRNA levels were measured by qPCR in DNA/RNA extracted from the disease and adjacent normal tissues (27 CRA and 43 CRC). Over-abundance of <i>Fn</i> was detected in CRA and more markedly in CRC. We observed a significantly higher expression of <i>TLR4</i> , <i>IL1B</i> , <i>IL8</i> , and <i>miR-135b</i> in CRA, and <i>TLR2</i> , <i>IL1B</i> , <i>IL6</i> , <i>IL8</i> , <i>miR-34a</i> and <i>miR-135b</i> in CRC compared to their respective normal tissues. Furthermore, <i>miR-22</i> and <i>miR-28</i> was found downregulated only in CRC tumor samples. mRNA expression of <i>IL1B</i> , <i>IL6</i> , <i>IL8</i> and <i>miR-22</i> was positively correlated with <i>Fn</i> quantification in CRC. The mRNA expression of <i>miR-135b</i> and <i>TNF</i> was inversely correlated, suggesting <i>TNF</i> as a novel possible target of this miRNA in CRC. miR:mRNA interactions suggest that the upregulation of <i>miR-34a</i> in CRC proceeds via a <i>TLR2/TLR4</i> dependent response to <i>Fn</i> . Our findings indicate that <i>Fn</i> is a risk factor for CRC by increasing the expression of inflammatory mediators <i>IL1B</i> , <i>IL6</i> and <i>IL8</i> through a possible miRNA mediated activation of <i>TLR2</i> or <i>TLR4</i> .						
Editor	Prof. Andreas J. Baumler						
Suggested Reviewers to Include	Rachel Purcell (University of Otago), Dertia Villalba Freire-Maia (UNIFESP), Pavel Soucek (National Institute of Public Health, Prague)						
Suggested Reviewers to Exclude	N/A						
Keywords	Colorectal Cancer, Colorectal Adenoma, <i>Fusobacterium nucleatum</i> , Inflammation, Cytokines, MicroRNAs						
Research Areas	Genetics and Molecular Biology, Host-Microbial Interactions, Immunology						
Conflict of Interest	No conflict of interest.						
Preprint Server	No						
Funding Sources	São Paulo Research Foundation (FAPESP)  : Ana Elizabete Silva 2012/15036-8 National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)  : Ana Elizabete Silva 474.776/2013-1 Science Foundation Ireland-Brazil International Strategic co-operation award to DJH  : David J. Hughes 13/ISCA/2843						

## TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Assinatura do autor